

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI UÇUCU YAĞLARIN DOMATES BAKTERİYEL KANSER ve
SOLGUNLUK (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) ETMENİNİN
KONTROLÜNDEKİ ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ ve BU YAĞLARIN
FİLM KAPLAMADA KULLANIMI**

Meral YILMAZ

**DOKTORA TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI**

2014

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI UÇUCU YAĞLARIN DOMATES BAKTERİYEL KANSER ve
SOLGUNLUK (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) ETMENİNİN
KONTROLÜNDEKİ ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ ve BU YAĞLARIN
FİLM KAPLAMADA KULLANIMI**

MERAL YILMAZ

**DOKTORA TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI**

Bu tez .././2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nurgül ERCAN (Danışman)

Prof. Dr. Hamide GÜBBÜK

Doç. Dr. Süleyman KAVAK

Prof. Dr. İbrahim DEMİR

Prof. Dr. Cengiz TOKER

ÖZET

BAZI UÇUCU YAĞLARIN DOMATES BAKTERİYEL KANSER ve SOLGUNLUK (*Clavibacter Michiganensis* subsp. *Michiganensis*) ETMENİNİN KONTROLÜNDEKİ ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ ve BU YAĞLARIN FİLM KAPLAMADA KULLANIMI

Meral YILMAZ

Doktora Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

1. Danışman Prof. Dr. Nurgül ERCAN,

2. Danışman Prof. Dr. Ömür BAYSAL

Ağustos 2014, 137 sayfa

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Cmm) tohumla taşınan gram pozitif bir fitobakteri olup, neden olduğu bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı domatesin (*Solanum lycopersicum* Mill.) fide, bitki ve pazarlanılabilir meyvesinde zarar oluşturmaktadır. Cmm karantinaya tabii bir patojendir ve tohum sağlık testlerinde sıfır bulaşıklık istenmektedir.

Cmm'ye karşı tohuma uygulabilen ruhsatlı bir kimyasal bulunmamaktadır. Son yıllarda Cmm ve benzeri fitopatojenlere karşı organik tarım ve biyolojik mücadeleye yönelik çok fazla sayıda araştırma yapılmaktadır. Günümüzde bitkisel kökenli sabit ve uçucu yağlar gibi bazı doğal bileşiklerin kimyasal pestisitlere karşı iyi bir alternatif olacağı düşünülmektedir. Bu çalışmada, domates tohumundaki Cmm mücadelesinde bazı ticari uçucu yağların (UY) etkinliğinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçla UY'nin Cmm'ye karşı antibakterisidal etkileri, uygun doz ve minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC), antibakterisidal etkili uçucu yağların domates tohum uygulamalarında ve film kaplamasında kullanabilirliği, UY tohum uygulamalarının ve film kaplamanın domatesin tohum ve fide kalite parametreleri, tohumdan Cmm eradikasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca bu uygulamaların hazır fide üretim koşullarında performansları, uçucu yağlar ile film kaplamanın kısa süreli depolama sonrası çıkış oranı, temiz tohum oranı ve tohumda bakteri yoğunluğuna etkisi belirlenmiştir.

Tohum uygulaması ve film kaplama çalışmalarında Cmm'ye karşı en etkili uçucu yağın *Origanum vulgare* olduğu saptanmış ve bunu sırasıyla *Origanum onites*, *Lavandula stoechas* ve *Rosmarinus officinalis* izlemiştir. Çalışmada kullanılan uçucu yağların MIC değerleri 62.5-500 ppm arasında değişim göstermiştir. Uçucu yağlar fide parametreleri ve depolamayı etkilememiş, buna karşın uçucu yağ türleri ve dozlara bağlı olarak tohum çimlenme ve çıkış oranı olumsuz etkilenmiştir. Ayrıca uçucu yağların ortalama çimlenme ve çıkış zamanına etkisi ile depolamanın çıkış oranı, temiz tohum oranı ve tohumda bakteri yoğunluğu üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Uçucu yağ film kaplamanın hazır fide üretim serasında çıkış oranı ve fide gelişimine etkisi ümitvar bulunmuştur. Araştırma sonuçları, uçucu yağ film kaplamanın domates tohumundaki Cmm'ye karşı etkili olabileceğini ve bu konudaki çalışmalara devam edilmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

ANAHTAR KELİMELELER: Antibakteriyel, *Cmm*, MIC, Tohum ve fide kalitesi, Real time PCR, Domates, Tohum film kaplama, Tohum uygulama, Ticari uçucu yağlar

JÜRİ: Prof. Dr. Nurgül ERCAN (Danışman)
Prof. Dr. Hamide GÜBBÜK
Doç. Dr. Süleyman KAVAK

ABSTRACT

DETERMINATION OF EFFECTIVENESS OF SOME ESSENTIAL OILS IN CONTROLLING OF TOMATO BACTERIAL CANCER AND WILT (*CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS*) AND ITS USE FOR SEED FILM COATING

Meral YILMAZ

PhD Thesis in Horticulture

1. Supervisor Prof. Dr. Nurgül ERCAN

2. Supervisor Prof. Dr. Ömür BAYSAL

Ağustos 2014, 137 pages

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Cmm) is a seed borne gram positive phyto bacteria. Bacterial cancer and wilt caused by Cmm can create damages in seedling, plant and marketable fruit of tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.), which is an important vegetable. Cmm is a quarantine pathogen. Due to a very low Cmm inoculum in tomato seed, it can also create a risk of contamination, so zero contamination is required in seed health tests for Cmm control.

A licensed chemical can be applied to tomato seed for Cmm control is not available. In recent years, many researches have been done for organic agriculture and biological control against Cmm and like phytopathogens. Today, some natural compounds like fixed and essential oils originated from plants are thought to be a good alternative to chemical pesticides. In this study, the effectiveness of some commercial essential oils (EOs) were conducted to determine for control of Cmm in tomato seed. Antibactericidal effects of EOs, appropriate dose and minimum inhibitory concentration (MIC), the usability of antibactericidal effected EOs for tomato seed treatment and film coating, effects of seed treatment and film coating with EOs on tomato seed and seedling parameters, Cmm eradication from tomato seed were investigated. Also, performances of these treatments in seedling production, effect of seed film coating with EOs and after short-term storage on emergency rate (ER), clean seed rate (CSR) and bacterial density in seed (BDS) were determined.

Origanum vulgare was detected the most effective EOs in seed treatment and film coating for Cmm control and followed *Origanum onites*, *Lavandula stoechas* and *Rosmarinus officinalis*, respectively. MIC values of EOs used in this study ranged from 62,5 to 500 ppm. EOs were not affected seedlings and storage parameters, whereas seed germination rate (GR) and ER rate was adversely affected depending on the type and dose of EOs. Also, effects of EOs on the mean germination time (MGT), the mean emergency time (MET) and effect of storage on ER, CSR and BDS were found statistically insignificant. Effect of seed film coating with EOs on ER and seedling growing has been found promising. Results of this research have revealed that seed film coating with EOs for Cmm control in tomato seed could be effective and new researches in this issue should be continued.

KEYWORDS: Antibacterial, Cmm, Commercial essential oils, MIC, Real time PCR, Seed and seedling quality, Seed film coating, Seed treatments, Tomato

COMMITTEE: Prof. Dr. Nurgül ERCAN(Supervisor)
Prof. Dr. Hamide GÜBBÜK
Assoc. Prof. Dr. Süleyman KAVAK

ÖNSÖZ

Örtü altı sebze yetiştiriciliğinin dünyada her yıl artan önemi nedeni ile günümüzde araştırmalar sebze tohumculuğu ve bunlar üzerinde baskı oluşturan problemlerin çözümüne yönelik konularda yoğunlaşmıştır. Ülkemizde hem örtü altında hem de açık yetiştiricilik koşullarında önemli bir ürün olan domates verim ve kalite kaybına neden olan, pazar değerini düşüren birçok biyotik ve abiyotik stres faktörlerine maruz kalmaktadır. Bu faktörler nedeni ile üretiminde kayıplar yaşanmaktadır. Dünyada ilk tespit edildiği tarihten bu yana domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* özellikle tohumla taşınımı nedeni domatesin en yıkıcı ve verim kaybına neden olan hastalığıdır. Cmm karantina tedbirlerine tabiidir ve test edilen örneklerde 0 bulaşıklık istenmektedir. Bazı fiziksel ve kimyasal tohum uygulamaları ise Cmm'yi tohumdan tamamen eradike edememekte ve aynı zamanda tohum kalite ve fide kalite parametreleri üzerine olumsuz etkilemektedir. Son yıllarda doğal ürünlere artan talep ve ilaç kalıntı sorunu nedeni ile başta tıp ve farmakoloji alanında olmak üzere birçok alanda olduğu gibi tarım alanında da biyolojik veya doğal mücadele yöntemleri öne çıkmaktadır. Bunlar arasında en çok dikkati çeken uçucu yağlar ve bunların uygulamalarıdır. Uçucu yağların birçok çalışmada antibakteriyel etkileri tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında ilk kez tarla bitkileri tohumlarında yapılmış olan uçucu yağ ve ana bileşen tohum kaplaması domates tohumuna uygulanmıştır. Bugüne kadar hiç çalışılmamış bir alanda, uçucu yağlar domates tohumuna uygulanmış ve ardından aynı uçucu yağ ile film kaplanması sonucu Cmm'ye karşı alternatif bir doğal mücadele yöntemi veya preparat adayı geliştirilmesi hedeflenmiştir. Yapılan uygulamaların ilk kez domateste Cmm etkinliğinin yanı sıra, tohum kalitesi, fide kalitesi üzerine etkileri *in vitro*, *in vivo* ve hazır fide üretim koşullarında araştırılmıştır. Çalışmamızda tohum ve fide parametrelerini etkilemeksizin Cmm'ye karşı uygulanabilecek ümit var sonuçlar elde edilmiştir. İlerleyen zamanlarda yapılacak tamamlayıcı diğer çalışmalar ile araştırma bulgularının tohum ve fide sektörüne faydalı olacağı ve pratiğe aktarılacağı saptanmıştır.

Doktora çalışmam süresince bana desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Nurgül ERCAN'a, değerli bilgi ve önerilerinden faydalandığım, tohum teknolojisi ve tohum kaplama konusundaki destek ve yardımları için Doç. Dr. Süleyman KAVAK'a, Fitopatoloji alanındaki desteklerinden dolayı Prof. Dr. Ömür BAYSAL'a, tezdeki yönlendirmelerinden dolayı Prof. Dr. Hamide GÜBBÜK'e, beni Tohum Patolojisi ve Teknolojisi alanına yönlendiren Dr. Suat YILMAZ'a, tez çalışmamın yürütülmesi sırasında desteklerini esirgemeyen Dr. Abdullah ÜNLÜ'ye (BATEM), Dr. Münevver GÖÇMEN'e (Antalya Tarım A.Ş.), Paul KOOMEN'e (Seed Processing, Hollanda) saha çalışmaları için tohum ve fide firmalarına, desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma, çalışmalarım sırasında kendilerine daha az zaman harcadığım oğlum ve kızıma, anneme, kardeşime ve eşime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI.....	4
2.1. Tohum Kalitesi	4
2.2. Domates Bakteriyel Kanseri ve Solgunluk Hastalığı.....	6
2.3. Uçucu Yağlar.....	9
2.4. Tohum Kaplama.....	14
3. MATERYAL ve METOT.....	18
3.1. Materyal.....	18
3.1.1. Tohum.....	18
3.1.2. İzolat.....	18
3.1.3. Uçucu yağlar.....	20
3.1.4. Polimer.....	20
3.1.5. Besi yerleri ve buffer çözeltileri.....	20
3.2. Metot.....	22
3.2.1. Antibakteriyel etki gösteren uçucu yağların belirlenmesi (Deneme 1).....	22
3.2.2. Cmm'ye karşı tohum uygulamalarında kullanılabilecek uçucu yağların belirlenmesi (Deneme 2).....	22
3.2.3. Tohum uygulamalarında kullanılacak olan uçucu yağların ve dozların belirlenmesi (Deneme 3).....	23
3.2.4. Uçucu yağların domates tohum film kaplanmasında kullanılabilirliğinin belirlenmesi (Deneme 4).....	23
3.2.5. Uçucu yağ film kaplamanın hazır fide üretim koşullarında bazı tohum ve fide kalite parametrelerine etkisinin belirlenmesi (Deneme 5).....	24
3.2.6. Uçucu yağ film kaplamanın depolama sonrası Cmm ve tohum kalitesine etkisinin belirlenmesi (Deneme 6).....	24
3.2.7. Analiz yöntemleri.....	25
3.2.7.1. Tohum örneklerinin hazırlanması.....	25
3.2.7.2. Cmm izolatlarının tanımlanması.....	25
3.2.7.3. Agar kuyu difüzyon metodu.....	26
3.2.7.4. Mikro kuyu dilüsyon metodu.....	27
3.2.7.5. Uçucu yağ tohum uygulanması.....	28
3.2.7.6. Film kaplama.....	28
3.2.7.7. Standart çimlendirme testi.....	29
3.2.7.8. Çıkış testi.....	30
3.2.7.9. TTC testi.....	30
3.2.7.10. Temiz tohum oranı.....	30
3.2.7.11. Log CFU/tohum değerinin hesaplanması.....	31

3.2.7.12. Log CFU/fide değerinin hesaplanması.....	32
3.2.7.13. Uçucu yağların içerik analizleri.....	33
3.2.7.14. İstatiksel Analiz.....	33
4. BULGULAR	34
4.1. Antibakteriyel etki gösteren uçucu yağları belirlemeye yönelik bulgular (Deneme 1).....	34
4.1.1. Uçucu yağların inhibisyon zonları ve antibakteriyel etkileri.....	34
4.1.2. Uçucu yağların minimum inhibisyon konsantrasyonları.....	36
4.2. Cmm'ye karşı tohum uygulamalarında kullanılabilecek uçucu yağların belirlenmesine yönelik bulgular (Deneme 2).....	38
4.3. Tohum uygulamalarında kullanılacak olan uçucu yağların ve dozların belirlenmesine yönelik bulgular (Deneme 3).....	40
4.3.1. Uçucu yağ tohum uygulamasının temiz tohum oranına etkisi.....	41
4.3.2. Uçucu yağ tohum uygulamasının tohumda bakteri yoğunluğuna etkisi.....	44
4.3.3. Uçucu yağ uygulamasının domates tohumlarının çimlenme oranına etkisi.....	46
4.3.4. Uçucu yağ uygulamasının domates tohumlarının çıkış oranına etkisi.....	48
4.3.5. Uçucu yağ uygulamasının domates tohumlarında fitotoksite oluşumuna etkisi.....	48
4.3.6. Uçucu yağların içerikleri.....	51
4.4. Uçucu yağların domates tohum film kaplanmasında kullanılabilirliğinin belirlenmesine yönelik bulgular (Deneme 4).....	51
4.4.1. Uçucu yağ film kaplamanın tohumlarda inhibisyon zonu üzerine etkisi.....	51
4.4.2. Uçucu yağ film kaplamanın temiz tohum oranına etkisi.....	54
4.4.3. Uçucu yağ film kaplamanın tohumda bakteri yoğunluğuna etkisine.	57
4.4.3.1. Tohum ekstraksiyonu ve yarı seçici besi yerinde tohumda bakteri yoğunluğunun belirlenmesi.....	57
4.4.3.2. Farklı uçucu yağlar ile film kaplı domates tohumlarında Cmm'nin real time PCR ile belirlenmesi.....	58
4.4.4. Uçucu yağ film kaplamanın çimlenme oranına etkisi.....	61
4.4.5. Uçucu yağ film kaplamanın çıkış oranına etkisi.....	64
4.4.6. Uçucu yağ film kaplamanın fidede bakteri yoğunluğuna etkisi.....	65
4.4.6.1. Fide ekstraksiyonu ve yarı seçici besi yerinde fidede bakteri yoğunluğunun belirlenmesi.....	66
4.4.6.2. Farklı uçucu yağlar ile film kaplı domates tohumlarından gelişen fidelerde Cmm'nin real time PCR ile belirlenmesi...	67
4.5. Uçucu yağ film kaplamanın hazır fide üretim koşullarında bazı tohum ve fide kalite parametrelerine etkisinin belirlenmesine yönelik bulgular (Deneme 5).....	71
4.6. Uçucu yağ film kaplamanın depolama sonrası Cmm ve tohum kalitesine etkisine yönelik bulgular (Deneme 6).....	74
4.6.1. Farklı depolama sürelerinin uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumlarının çıkış oranına etkisi.....	74
4.6.2. Farklı depolama sürelerinin uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumlarında temiz tohum oranına etkisi.....	76

4.6.3. Farklı depolama sürelerinin uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumlarında bakteri yoğunluğuna etkisi.....	77
5. TARTIŞMA.....	78
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	106
7. KAYNAKLAR.....	109
8. EKLER.....	129
EK-1. Tohum ve fide ekstraksiyonu, klasik ve real time PCR koşulları.....	129
EK-2. Deneme1, 2, 3, 4, 5 ve 6'nın verilerine ait şekiller.....	131
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
cc	Cubic Centimeter
g	Gram
Kg	Kilogram
m	Metre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
ppm	One Part Per Million (Milyonda bir birim), 1 ppm=mg/L =ug/ml=1000ug/L= µg/ml= µl/L= µg/g= mg/Kg=0.0001%
rpm	Dakikadaki döngü sayısı
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre

Kısaltmalar

BATEM	Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü
CFU/ml	ml’de koloni oluşturan birim
Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
DMSO	Dimethyl Sulfoxide(%10) (çözücü)
EPPO	Avrupa ve Akdeniz Bitki Sağlığı Örgütü
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectroscopy
ISF	Uluslararası Tohum Federasyonu
ISHI	Uluslararası Tohum Sağlık İlk Adımı
ISTA	Uluslararası Tohum Test Birliği
İZ	İnhibisyon Zonu (mm)
KB	King’s B agar
KOH	%3’lük potasyum hidroksit
log CFU/fide	Fide başına koloni oluşturan birim değerinin logaritması
log CFU/tohum	Tohum başına koloni oluşturan birim değerinin logaritması
MBC	Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
NA	Nutrient Agar katı besiyeri
NB	Nutrient Broth
OD	Optical Density
SCM	Cmm için yarı seçici besi yeri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Cmm'nin yaşam döngüsü ve infeksiyonlarının görüntüsü.....	7
Şekil 3.1.	Çalışmada kullanılan Rio Grande çeşidi domates tohumunun görüntüsü.....	19
Şekil 3.2.	NA besi yerinde gelişen Cmm 3/1A kolonileri ve domatesin kotiledon yapraklarında Cmm'nin oluşturduğu epidermis patlamasının görüntüsü.....	19
Şekil 3.3.	Film kaplama makinası ve tohum nem tayin cihazı.....	29
Şekil 3.4.	Steril saf su (negatif kontrol) uygulamasında tohumların etrafında Cmm gelişiminin görüntüsü.....	31
Şekil 3.5.	Uçucu yağ uygulaması sonrası tohum ekstraksiyonu için tohumların ve fidelerin ezilmesi.....	33
Şekil 4.1.	<i>O. vulgare</i> 'nın MIC değerlerinde Cmm gelişiminin görüntüsü.....	37
Şekil 4.2.	<i>O. vulgare</i> uçucu yağ uygulanmış domates tohumlarının NA besiyerinde 72 saat inkübasyondan sonra çimlenme ve 2 mm kökçük çıkışlarının görüntüsü.....	40
Şekil 4.3.	Kontrol (saf su) uygulanan domates tohumlarında Cmm gelişiminin görüntüsü.....	43
Şekil 4.4.	<i>O. vulgare</i> uçucu yağı uygulanan domates tohumlarında Cmm gelişmemesine ait görüntü.....	43
Şekil 4.5.	Uçucu yağ uygulanan domates tohumlarının ekstraksiyonunda gelişen Cmm kolonilerinin görüntüsü.....	44
Şekil 4.6.	Uçucu yağ uygulanan domates tohumlarında II. günde kökçük çıkışının görüntüsü.....	46
Şekil 4.7.	Uçucu yağ uygulanan domates tohumlarında tohum canlılığı ve fitotoksititeye ait görüntü.....	49
Şekil 4.8.	Uçucu yağ uygulanan domates tohumlarında canlı ve cansız embriyoların görüntüsü.....	50
Şekil 4.9.	Uçucu yağ uygulanan bazı tohumlarda tohum kabuğunun kararmasına ait görüntü.....	50
Şekil 4.10.	<i>O. vulgare</i> uçucu yağı ile film kaplanan domates tohumlarında inhibisyon zonlarına ait görüntü.....	53
Şekil 4.11.	<i>O. vulgare</i> uçucu yağı uygulanan domates tohumlarında inhibisyon zonlarına ait görüntü.....	53
Şekil 4.12.	<i>O. vulgare</i> uçucu yağı (5000 ppm) ile film kaplanan domates tohumlarında Cmm gelişmemesine ait görüntü.....	57
Şekil 4.13.	Bakır sülfat ile film kaplanan domates tohumlarında Cmm gelişmemesine ait görüntü.....	57
Şekil 4.14.	Uçucu yağ ile film kaplanan domates tohumlarında Cmm'nin real time PCR ile tespitine ait görüntü.....	61
Şekil 4.15.	<i>O. vulgare</i> uçucu yağı (5000 ppm) ile film kaplanan domates tohumlarında üçüncü günde kökçük çıkışları ve tohum çimlenmesine ait görüntü.....	63
Şekil 4.16.	Uçucu yağ ile film kaplanan domates tohumlarından gelişen fideelerde Cmm'nin real time PCR ile tespitine ait görüntü.....	70

Şekil 4.17.	<i>O. vulgare</i> uçucu yağı ile film kaplı tohumlardan gelişen fidelerde Cmm lezyonlarının ve sağlıklı fidelerin görüntüsü.....	71
Şekil 4.18.	<i>O. onites</i> uçucu yağı ile film kaplı tohumlardan gelişen fidelerde Cmm lezyonlarının ve sağlıklı fidelerin görüntüsü.....	71
Şekil 4.19.	<i>L. stoechas</i> uçucu yağı ile film kaplı tohumlardan gelişen fidelerde Cmm lezyonlarının ve sağlıklı fidelerin görüntüsü.....	72
Şekil 4.20.	Hazır fide denemesinin görüntüsü.....	73
Şekil 4.21.	<i>L. stoechas</i> uçucu yağının 500 ppm dozu ile film kaplanan domates tohumundan gelişen anormal fidenin görüntüsü.....	74
Şekil 4.22.	<i>O. vulgare</i> uçucu yağının 5000 ppm dozu ile film kaplanan domates tohumundan gelişen anormal fidenin (erkek fide) görüntüsü.....	75
Şekil 8.1.	Çalışmada kullanılan uçucu yağların Cmm'ye karşı oluşturdıkları inhibisyon zonlarına ait görüntü.....	131
Şekil 8.2.	Çalışmada kullanılan uçucu yağların Cmm'ye karşı MIC değerlerine ait görüntü.....	131
Şekil 8.3.	Domates tohumlarına uçucu yağ tohum uygulamasının (1000 ppm) temiz tohum oranına etkisi.....	132
Şekil 8.4.	Domates tohumlarına uçucu yağ (5000, 1000, 500, 400, 300, 250, 200, 125 ppm) uygulamasının temiz tohum oranına etkisi.....	132
Şekil 8.5.	Domates tohumlarına uçucu yağ (5000, 1000, 500 ppm) uygulamasının tohumda bakteri yoğunluğuna etkisi.....	133
Şekil 8.6.	Domates tohumlarına uçucu yağ (5000, 1000, 500 ppm) uygulamasının çimlenme oranı, çıkış oranı, çimlenme zamanı ve çıkış zamanına etkisi.....	133
Şekil 8.7.	Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen uçucu yağ ve dozların çimlenen tohum sayısına etkisi.....	134
Şekil 8.8.	Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen uçucu yağ ve Dozların tohumda bakteri yoğunluğuna etkisi.....	134
Şekil 8.9.	Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen <i>L. stoechas</i> uçucu yağının farklı dozlarının tohumda bakteri yoğunluğuna etkisi.....	135
Şekil 8.10.	Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen <i>O. onites</i> uçucu yağının farklı dozlarının tohumda bakteri yoğunluğuna etkisi.....	135
Şekil 8.11.	Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen <i>O. vulgare</i> uçucu yağının farklı dozlarının tohumda bakteri yoğunluğuna etkisi.....	135
Şekil 8.12.	Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen <i>R. officinalis</i> uçucu yağının farklı dozlarının tohumda bakteri yoğunluğuna etkisi.....	135
Şekil 8.13.	Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen <i>L. stoechas</i> uçucu yağının farklı dozlarının çimlenen tohum sayısına etkisi.....	136
Şekil 8.14.	Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen <i>O. onites</i> uçucu yağının farklı dozlarının çimlenen tohum sayısına etkisi.....	136
Şekil 8.15.	Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen <i>O. vulgare</i> uçucu yağının farklı dozlarının çimlenen tohum sayısına etkisi.....	136

Şekil 8.16.	Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen <i>R. officinalis</i> uçucu yağının farklı dozlarının çimlenen tohum sayısına etkisi.....	136
Şekil 8.17.	Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen uçucu yağ ve dozların hazır fide üretim serasında çıkış oranı, çıkış zamanı, fide yaş ve kuru ağırlığına etkisi.....	137
Şekil 8.18.	Farklı uçucu yağ dozları (5000, 1000, 500 ve 250 ppm) ile film kaplanan ve farklı sürelerde depolanan (0, 15, 30 ve 90 gün) domates tohumlarının çıkış oranındaki değişim.....	137
Şekil 8.19.	Farklı uçucu yağ dozları (5000, 1000, 500 ve 250 ppm) ile film kaplanan ve farklı sürelerde depolanan (0, 15, 30 ve 90 gün) domates tohumlarının temiz oranındaki değişim.....	138
Şekil 8.20.	Farklı uçucu yağ dozları (5000, 1000, 500 ve 250 ppm) ile film kaplanan ve farklı sürelerde depolanan (0, 15, 30 ve 90 gün) domates tohumlarında bakteri yoğunluğundaki değişim.....	138

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan Cmm izolatları.....	19
Çizelge 3.2.	Çalışmada kullanılan uçucu yağlar ve ana bileşenleri.....	20
Çizelge 4.1.	Uçucu yağların Cmm'ye karşı inhibisyon zonları ve antibakteriyel etkileri.....	35
Çizelge 4.2.	Uçucu yağların MIC değerleri.....	37
Çizelge 4.3.	Uçucu yağ uygulamasının (1000 ppm) bulaşık domates tohumundaki Cmm'ye etkisi.....	39
Çizelge 4.4.	Tohuma uçucu yağ uygulamasının temiz tohum oranına etkisi.....	42
Çizelge 4.5.	Uçucu yağ tohum uygulamasının domates tohumunda bakteri yoğunluğuna etkisi.....	45
Çizelge 4.6.	Uçucu yağ uygulamasının domates tohumlarının çimlenme oranına etkisi	47
Çizelge 4.7.	Uçucu yağ uygulamasının domates tohumlarının çıkış oranına etkisi.....	48
Çizelge 4.9.	Etkili bulunan uçucu yağların içerik analizi.....	51
Çizelge 4.10.	Uçucu yağlar ile film kaplamanın tohumların inhibisyon zonu üzerine etkisi.....	54
Çizelge 4.11.	Uçucu yağlar ile film kaplamanın temiz tohum oranına etkisi.....	56
Çizelge 4.12.	Uçucu yağlar ile film kaplamanın tohumda bakteri yoğunluğuna etkisi-tohum ekstraksiyonu ve SCM besiyerinde gelişim.....	59
Çizelge 4.13.	Uçucu yağ ile film kaplanan domates tohumlarının ekstraksiyonundan Cmm gelişiminin Real time PCR ile tespiti ve ortalama Ct değerleri.....	61
Çizelge 4.14.	Uçucu yağlar ile film kaplamanın domates tohumlarının çimlenme oranına etkisi.....	64
Çizelge 4.15.	Uçucu yağlar ile film kaplamanın domates tohumlarının çıkış oranına etkisi.....	66
Çizelge 4.16.	Uçucu yağlar ile film kaplamanın fidede bakteri yoğunluğuna etkisi-fide ekstraksiyonu ve SCM besiyerinde gelişim.....	68
Çizelge 4.17.	Uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumlarından gelişen fidelerin ekstraksiyonunda Cmm'nin real time PCR ile tespiti ve ortalama Ct değerleri.....	70
Çizelge 4.18.	Uçucu yağlar ile film kaplamanın hazır fide üretim koşullarında tohumların çıkış oranı üzerine etkisi.....	74
Çizelge 4.19.	Farklı depolama sürelerinin uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumlarının çıkış oranına etkisi.....	76
Çizelge 4.20.	Farklı depolama sürelerinin uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumlarında temiz tohum oranına etkisi.....	77
Çizelge 4.21.	Farklı depolama sürelerinin uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumlarında bakteri yoğunluğuna etkisi.....	78

1. GİRİŞ

Bitkisel üretimin ana çoğaltım materyali olan tohum ülkeler ve kıtalar arası ticareti yapılan bir üründür. Uluslararası tohum federasyonunun (ISF) 2013 yılı verilerine göre dünyada her yıl yaklaşık 2 959 276 ton tohum ihraç edilirken, 2 334 678 ton tohum ise ithal edilmektedir.

Tohum ticareti, verim ve kalite yönünden üstün özellikleri olan tohumların yeni üretim alanlarında değerlendirilmesini sağlamaktadır. Fakat tohum ithalatı aynı zamanda tohumla taşınan hastalık ve zararlıların da yeni bir üretim alanına bulaşmasına neden olmaktadır. Tohumla taşınan hastalık etmeninin temiz üretim bölgelerine taşınması sonucu orada uzun yıllar sürecek hastalık mücadelesine neden olmakta ve sonucunda ticari kayıplar yaşanmaktadır. Hastalık bulaştığı ülkede epidemi oluşturmakta veya çevre ülkelere de yayılmaktadır. O nedenle ki, birçok tohumla taşınan hastalık etmeni Avrupa ve Akdeniz Bitki Sağlığını Koruma Örgütü (EPPO 2013) tarafından karantina listesine alınmıştır.

Önemli bir sebze türü olan domatesin (*Solanum lycopersicum* Mill.) yetiştiriciliğini kısıtlayan biyotik ve abiyotik birçok stres faktörü bulunmaktadır. Bunlar arasında özellikle domates tohumu ile taşınan bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı etmeni *Clavibacter michiganense* subsp *michiganensis* (Cmm) ilk tespit edildiği 1910 yılından bu yana domates üretim alanlarında ciddi tahribatlar yapmıştır. Cmm ile mücadeleye yönelik bugüne kadar birçok çalışma yapılmıştır. Fakat Cmm'ye karşı dayanıklı çeşit geliştirilemeyişi, dayanıklılığın aktarımındaki problemler, kimyasal mücadelenin yeterli olmayışı, bakteriyel etmenler tarafından kullanılan bakırlı preparatlara karşı kısa sürede dayanıklılık kazanımı gibi nedenler ile halâ bütün dünyada önemini korumaktadır.

Tarımda bitki hastalık ve zararlıları ile mücadelede yoğun olarak kullanılan pestisitler kansere, doğum anormalliklerine, sinir sistemi rahatsızlıklarına, çevre ve hava kirliliğine, yoğun ve yanlış kullanımları nedeni ile patojenlerde dayanıklılık gelişimine, biyolojik mücadele ajanları ve doğal düşman populasyonların yok olmasına neden olmaktadır (Tiryaki 2010). Tarımsal ürünlerde kalıntı problemi pestisitlerin önemli yan etkileridir. Türkiye'de Yaş Meyve ve Sebze ihracatında sıklıkla yaşanan ilaç kalıntı sorunları ise bunun en bariz örneğidir (Yıldırım 2010). Bu nedenler ile son yıllarda biyolojik ve organik mücadele yöntemleri önem kazanmıştır. Bunlar arasında uçucu yağlar ve uçucu bileşenler ön plana çıkmaktadır. Uçucu yağlar doğada çabuk çözünmeleri nedeni ile kalıntı sorunu oluşturmamaktadırlar. Birçok bileşene sahip olmaları nedeni ile bakteriyel etmenler kolaylıkla dayanıklılık geliştirememektedirler.

Uçucu yağların *in vitro* ve *in vivo* koşullarda Cmm ve benzeri fitopatojen bakterilere karşı kullanılabilmesine yönelik birçok araştırma yapılmıştır (Basım 1998, Mirik ve Aysan 2005). *In vitro* çalışmalarda bazı uçucu yağların Cmm üzerine etkili oldukları tespit edilmiştir (Dimitra vd 2003, Güllüce vd 2003, Şahin vd 2003). Aynı zamanda tohumla taşınan etmenlerde alternatif mücadele aracı olabilecekleri bildirilmiştir (Nguefack vd 2005). Cmm'ye karşı yapılan uçucu yağ çalışmaları, etki var-yok, *in vivo* fideye ve bitkiye uygulamaları kapsamaktadır. Tohum uygulamaları ve

bunların tohum, fide kalite parametreleri üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar ise yok denecek kadar azdır (Tobias 2007, Talibi vd 2011).

Uçucu yağların etki dereceleri ve kalite özellikleri uygulanan yöntem, uçucu yağın elde edilişi, içeriği, elde edildiği döneme bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Dolayısıyla minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC) ve bakterisidal etkileri arasında ciddi farklılıklar görülmüştür (Soylu vd 2006, Altundağ 2007). Ayrıca ticari uçucu yağların bakterisidal etkileri ve MIC değerleri belirlenmemiştir. Ticari uçucu yağların tohuma uygulama ve film kaplama sonrası Cmm üzerine, domates tohum ve fide kalite parametrelerine etkisi de çalışılmamıştır. Ticari uçucu yağlar ile tohum uygulaması ve film kaplamanın hazır fide üretim koşullarındaki uygulanabilirliği üzerine de çalışma yapılmamıştır.

Önemli bir uçucu yağ bileşeni olan öjenolün içinde yer aldığı formülasyon (Öjenol+ Kitozan-lignosülfonet) çeltik tohumlarına film kaplama ile yüklenmiş ve depolanabilirliğin, çimlenme oranı ve tarla çıkış oranının önemli oranda arttığı tespit edilmiştir. Öjenol ile film kaplamanın soya fasulyesi tohumlarında taşınan *Colletotrichum* sp + *Macrophomina* sp'a karşı etkili olduğu ve tohumun çimlenme oranını etkilemediği tespit edilmiştir (Sawatvanich vd 2007).

Litaratüre geçen çalışmalar dikkate alındığında bugüne değin hiç yapılmamış olan uçucu yağların film kaplama şeklinde tohuma yüklenebileceği ve bu şekilde domates tohumundan Cmm'nin tohumdan eradike edilebileceği fikri ortaya konulmuştur. Uçucu yağlar ile tohum uygulaması ve film kaplamanın tohum, fide kalite parametrelerini olumsuz etkilemeksizin, domates tohumundan Cmm inokulumunu tamamen yok etmesi başarılırsa sonuçların diğer organik yetiştiricilikte ve biyolojik mücadele araştırmalarına da uygulanabileceği açıktır. Temiz tohumu üretim aşamasından sonra bulaşmalara karşı muhafaza edebilen film kaplama hasat sonrası rutin uygulama olarak önerilebilecektir ve teknik talimatlarda yer alabilecektir. Tohum ve hazır fide üretiminde Cmm ve benzeri etmenlerle mücadelede tohumların uçucu yağlar ile film kaplanması tavsiye edilebilecektir. Tohumla taşınan bakteriyel etmenlere karşı tohuma uygulanacak herhangi bir ilaç olmadığından ilk kez yerli ve doğal bir tohum ilacı elde edilmiş olacaktır. Dünyada pestisit kullanımı ve pestisit giderleri dikkate alındığında tohuma film kaplama ile uygulanabilecek uçucu yağ ilaç terkininin elde edilmesi ülkemiz ekonomisine de katma değer sağlayacaktır.

İfade edilen gerekçeler ve litaratürdeki boşluklar nedeni ile bu tez çalışmasında ilk kez tohumla taşınan bir bakteriyel etmene (Cmm) karşı uçucu yağların tohum uygulanması ve film kaplama ile tohuma yüklenmesi çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar ile farklı sektörlerde (tohum üretimi, hazır fide üretimi ve organik tarım) Cmm ve benzeri tohumla taşınan etmenlerin kontrol altına alınması planlanmıştır. Araştırmanın temel hedefi Cmm'den ari tohum üretimini kontrol altına alabilecek ve temiz tohumu tohum hasatı ve yetiştiricilik arasındaki bütün ara basamaklarda koruyabilecek doğal bir film kaplama yöntemi geliştirilmesidir. Tohumun Cmm'den arılığını üretim ve depolama aşamalarında muhafaza altına alabilmek, tohumda Cmm bulunsa bile hastalık oluşumunu domates fidesi ve bitkisinde engellemek hedeflenmiştir. Bu temel hedefe ulaşmak için çok sayıda farklı amaçla, uçucu yağların film kaplama ile tohuma yüklenebilmesi ve tohuma uygulanabilecek doğal bir ilaç geliştirilmesine yönelik olarak

kademeli denemeler kurulmuştur. Cmm'yi domates tohumundan tohum ve fide kalite parametrelerini olumsuz etkilemeksizin eradike edebilecek, bulaşmaları önleyebilecek ve sonuçlarının hazır fide sektöründe kullanılabileceği uçucu yağ tohum uygulaması ve film kaplamanın belirlenmesi amaçlanmıştır. Ticari uçucu yağların Cmm'ye karşı antibakteriyel etkileri, uygun doz ve MIC değerleri belirlenmiştir. Antibakteriyel etkili uçucu yağların Cmm mücadelesinde, domates tohum uygulamalarında ve film kaplamada kullanabilirlikleri araştırılmıştır. Uçucu yağlar ile film kaplamanın hazır fide üretim sırasında domates fide gelişimi, depolama sonrası tohum kalitesi ve Cmm üzerine etkileri belirlenmiştir.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

2.1. Tohum Kalitesi

Bitkisel üretimin ana çoğaltım materyali tohumdur. Tohum aynı zamanda gıdadır, gen kaynağıdır ve sanayi hammaddesidir. Dünya genelinde ticari değeri yüksek girdilerden biri de tohumdur ve günümüzde yaklaşık 45 milyar \$'lık tohum pazarı mevcuttur (ISF 2012).

1970'li yıllardan beri gelişme gösteren dünya tohumculuk sektöründe önemli olan (tohumluktan bir örnek çimlenme ve çıkış, sağlıklı bitki gelişimi) kaliteli tohumluktur. Tohum kalitesi ise tohumun yeni bir bitkiyi oluşturmaya için gerekli içsel veya dışsal özelliklerinin mükemmeliyeti veya bu mükemmeliyetin standardıdır. Tohumda kalite tohumluk ticareti ile ortaya çıkmıştır ve 19.yy'da tohum ticaretindeki sorunlar nedeni ile Avrupa ve ABD'de yeni yasal düzenlemeler yapılmıştır (Şehirli 1997).

Tohumda kaliteyi başlıca üç özellik (kimlik, hijyen ve performans) belirler. (Şehirli 1997, Venter 2000, Hampton 2002). Fiziksel ve genetik safiyet, üniformite ve tohum ağırlığı tohumluğun kimlik özelliklerini ifade eder ve tescil aşamasında yapılan klasik ve moleküler testler ile kayıt altına alınır. Ölü ve canlı dokulara sahip olabilen tohumun çimlenerek yeni bitkiyi oluşturabilme yeteneği olan canlılığın yanı sıra, tohum gücü (vigor), tohum nem içeriği, tarla çıkış oranı, üniformite ve depo ömrü gibi özellikler tohumluğun performans özellikleridir. Tohumun her türlü patojenden, zararlıdan ve yabancı ot tohumundan arı olmasını ifade eden hijyen özellikle tohumla taşınan etmenlerin epidemiy oluşturabilmeleri, neden oldukları hastalık etmenlerini temiz yetiştirme alanlarına ve diğer konukçularına bulaştırabilmeleri nedeni ile en önemli tohum kalite özelliğidir (Erkan 1998).

Tohum kalitesinin önemli bir parametresi olan tohum sağlığı (hijyen) tohumda bulunan veya taşınan mikroorganizmaların cinsini, miktarını zarar şeklini, tohum-mikroorganizma ilişkilerini ve etkili faktörleri inceleyen tohum patolojisi biliminin ana çalışma sahasıdır. İlk kez 1800'lü yıllarda başlayan tohum patolojisi çalışmalarında ilk kez virüs hastalıklarının ve fasulye tohumunda bir fungus ve bakterinin tohumla taşındığı tespit edilmiştir (Erkan 1998, 2005). Hastalık etmenin sadece tohumda taşınması veya bulaşık olması değil, aynı zamanda hastalık oluşturmaya gerekir. Tohumlarda hastalığın taşınımı ile ilgili 4 faz geçerlidir; 1) ana inokulum kaynağı tohum olan, tohum enfeksiyonunun önlenmesi ile hastalığın kontrol altına alınabileceği patojenler (Marul Mozaik Virüsü vb). 2) Tohumun minör inokulum kaynağı olduğu ve hastalığın daha çok arazide görüldüğü patojenler. 3) Tohumda taşınan ama hastalık oluşturmeyen patojenler. 4) Tohumda arazide ve depoda hastalık oluşturan patojenler (örneğin *Aspergillus* ve *Penicillium* fungusları) (Nome vd 2003). Tohumların hastalık etmenleri ile kontamine olması ya doğrudan ya da sistemik olur. Tohumda hastalık etmenlerin bulunması her zaman hastalık oluşturmaz. Tohum enfeksiyonu konukçu, patojen ve çevre koşulları interaksyonu sonunda gelişir. Ebeveyn bitkide tohum oluşumu sırasında çeşitli çiçek yapılarından, stigmadan, ovaryum duvarından, olgunlaşmamış tohumun etrafından, hilum ve mikrofil gibi doğal açıklıklardan doğrudan penetrasyonla, böcek faaliyeti ile veya ebeveyn bitkideki olası kontaminasyonun doğrudan tohuma geçmesi

şeklinde sistemik infeksiyondur. Tohumların o an içinde bulundukları ortamdan direkt hastalık etmenin, tohum yüzeyine ve tohum kabuğuna tutunması, tohum kabuğunu geçerek embriyo ve diğer tohum kısımlarına ulaşması ise tohum bulaşmasıdır. Başlıca hastalık etmenlerinden majör grubu oluşturan fungus, bakteri ve virüsler tohumların tohum kabuğu, embriyo, endosperm, hilum, kavuz, kotiledon ve diğer kısımlarında taşınırlar (Agarwal ve Sinclair 1987a ve b, Reis vd 1999, Singh ve Mathur 2004a, Erkan 2005). Hücre duvarına, membrana sahip prokaryotik canlılar olan bakterilerden genellikle *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* ve *Coryneform* tohumla taşınırlar (Schaad 1988, 1989). RNA veya DNA'dan oluşan 2000'in üzerindeki bitki patojeni virüs tohumla taşınır (Şevik 2012). Bilinen 800'ün üzerinde fungus bitkilerde hastalık oluşturmakta ve çoğunluğu tohumla taşınmaktadır (Singh ve Mathur 2004c).

Tohumla taşınan etmenler içerisinde özellikle bakteriler tohum kabuğunun yanı sıra embriyoda da taşınmaları nedeni ile mücadelesi zor gruptur. Günümüzde birçok kültür bitkisinin tohumları ile taşınırlar. Önemli bir sebze türü olan domatesin tohumlarında *A. rhizogens*, *A. rubi*, *A. tumefaciens*, *A. dissimutans*, *B. fructodestruens*, *B. leguminiperdus*, *B. lycopersici*, *B. tubifex*, *B. lycopersici vitati*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *E. c.* subsp. *carotovora*, *E. chrysanthemi* pv. *dianthicola*, *E. c.* pv. *zeae*, *E. rhapontici*, *P. briosii*, *P. cepacia*, *P. cichorii*, *P. hemmiana*, *P. lycopersici*, *P. marginalis* pv. *marginalis*, *P. syringae* pv. *atrofaciens*, *P. s.* pv. *gracae*, *P. s.* pv. *japonica*, *P. s.* pv. *mellea*, *P. s.* pv. *savastanoi*, *P. s.* pv. *syringae*, *P. s.* pv. *tabaci*, *P. viridiflava*, *P. viridilivida*, *R. fascians*, *X. campestris* pv. *physalidicola* ve *X. c.* pv. *raphani* tohumla taşınmaktadır (Agrawal vd 2012). Domateste en önemli tohumla taşınan bakteriyel hastalık etmenleri, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ve *Pseudomonas solanacearum*'dur (Singh 1999).

Tohumlar hasat edildikleri alandan çok çeşitli bölgelere veya ülkelere ihraç edildiklerinden özellikle, beraberinde taşıdıkları hastalık etmenlerinin o bölgeye girişine aracılık edebilmektedirler. Nitekim 2005 yılında Türkiye'de ithal edilen tohum örneklerinde yapılan tohum sağlık testlerinde tohumla taşınan viral ve bakteriyel etmenler saptanmıştır (Yılmaz vd 2005). Günümüzde tohumla taşınan birçok hastalık etmeni iç veya dış karantina tebbirlerine tabiidir. Tohum örnekleri ülkelere giriş ve çıkışlarda tohum sağlık testlerinden geçirilir (Morrison 1999). Tohumda patojenin varlığı klasik, serolojik ve PCR temelli yöntemler ile tespit edilebilmektedir (Gitaitis ve Walcott 2007). Tohum sağlık testlerinde 1957 yılından bu yana faaliyet gösteren ISTA (Uluslararası Tohum Test Birliği, Bitki Hastalıkları Komitesi), ISF (Uluslararası Tohum Federasyonu), EPPO, ISHI (Uluslararası Tohum Sağlık İlk Adımı) uluslararası tohum kuruluşları ve ASTA (Amerikan Tohum Ticareti Birliği) gibi bölgesel, Naktuinbouw (Holanda Tohum Test Laboratuvarı) ve TTSM (Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Laboratuvarı) gibi ülkesel veya özel laboratuvarlarda, uluslararası normlara göre belirlenen tohum sağlık test prosedürlerine göre analizler yapılmaktadır. Özellikle ülkelerin karantina laboratuvarı ve kamu tohum test ve araştırma laboratuvarları hastalıklı tohum örneklerinin ülkeye girişi ve çıkışının önlenmesine yönelik faaliyet göstermektedir.

2.2. Domates Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığı

Domates (*Solanum lycopersicum* Mill.) *Solanaceae* (Patlıcangiller) familyasından, 2012 yılı verilerine göre 161.8 milyon ton üretimi ile dünyada en yüksek üretim payına sahip yaş sebzedir (Fao 2013). 11 820 000 ton üretim ile domatesin özellikle örtüaltı yetiştiricilikte ekonomik değeri yüksektir (Türk 2013). Domates Antalya'da örtü altı alanlarının yaklaşık %44.3'üne sahiptir (Anonim 2013e).

Domatesin üretimini kısıtlayan çok sayıda fungal, viral ve bakteriyel hastalıkları vardır. Bunlar arasında özellikle tohumla taşınanlar yayılmaları ve epidemi oluşturmaları nedeni ile öne çıkan gruptur. Domateste tohumla taşınan bakteriyel hastalıklar içerisinde ise en önemlisi *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'dir (Agrawal vd 2012).

Hastalık etmeni ilk kez 1909'da ABD'de Michigan eyaletinde Grand Rapids'te domates seralarında Erwin F. Smith tarafından tespit edilmiş ve o yıllarda Grand Rapids hastalığı diye adlandırılmıştır. Hastalık etmeni Smith'in ilk isimlendirmesinde *Bacterium michiganense*'ne olmasına karşın sonraları, *Aplanobacter michiganense*, *Phytomonas michiganensis*, *Mycobacterium Michiganensis* olarak adlandırılmıştır. Uzun yıllar *Corynebacterium michiganense* olarak bilinmesine karşın 1980'lerin sonunda hücre duvarı ile ilgili çalışmaların sonunda *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak adlandırılmış, neden olduğu hastalığa ise Domates Bakteriyel Kanser ve Solgunluk hastalığı adı verilmiştir (Gleason vd 1993).

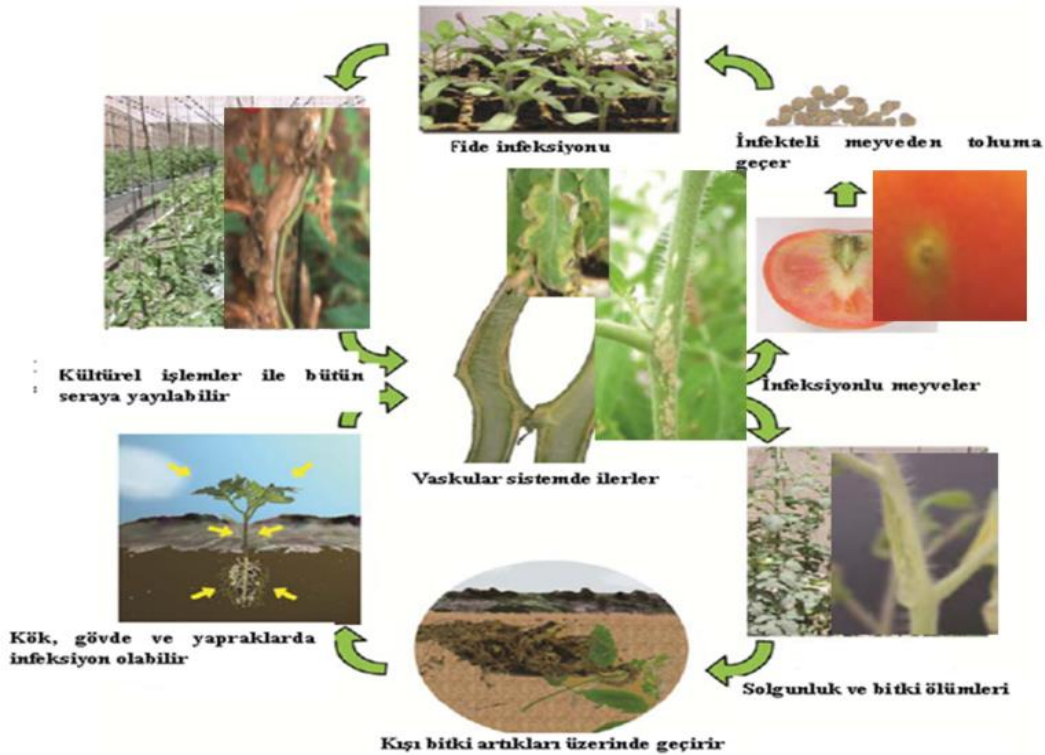
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* prokaryota âlemi, *Firmicutes* bölümü, *Thallobacteria* sınıfı, *Microbacteriaceae* familyası, *Clavibacter* cinsi içerisinde yer almaktadır (Agrios 2005). *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganensis* (Cmm) aerobik, çubuk şekilli, hareketsiz, gram pozitif bir bakteridir (Eichenlaub vd 2006). Cmm'nin konukçuları arasında *Solanaceae* familyası yer alsa da en fazla zarar oluşturduğu tür domatestir (Gleason vd 1993). Domates kadar ekonomik anlamda olmasa da biberde de (*Capsicum* spp.) hastalık oluşturmaktadır (Ivey ve Miller 2000).

Domates Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığı ABD'de Michigan eyaletinden bütün dünyaya yayılmış ve çoğu domates yetiştirme alanında tespit edilmiştir (EPPO Bulletin 2013). Türkiye'de ilk kez 1950 yılında İç Anadolu'da ve sonrasında Güney Doğu Anadolu, Marmara, Ege bölgesinde (Çetinkaya-Yıldız 2007), Doğu Anadolu'da (Şahin vd 2002), Batı Akdeniz Bölgesinde (Basım vd 2004) ve 2005 yılında İzmir'de (Özdemir 2005) tespit edilmiştir.

Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı domates üretiminde %31-83 sistemik fide infeksiyonu oluşturabilmekte ve en az %46'lara varan verim kayıplarına neden olmaktadır (Chang vd 1992).

Cmm toprakta ve bitki artıkları üzerinde bir buçuk yıla kadar yaşamını sürdürmektedir (Fatmi ve Schaad 2002). Başlıca bulaşma kaynakları, bulaşık toprak, topraktaki bulaşık bitki artıkları, yabancı otlar, bulaşık bitki artıkları, bulaşık tohumlardır. Üretim yapılan serada etmen ile temas eden her türlü alet (budama makinesi, tohum ekme makinesi, aşılama makinesi vb) etmenin taşınımını

sağlamaktadır (Gleason vd 1991). Primer inokulum kaynağı bulaşık tohumlardır. 10^1 CFU/ml yoğunluğundaki bir tohum bulaşıklığı arazide önemli boyutta epidemi oluşturabilmektedir (Chang vd 1991, EPPO 2005). Doğal infekteli tohumlarda taşınma oranının %46 olduğu bulunmuştur (Umesha 2006). Tohumda tohum kabuğunda ve embriyoda taşınmaktadır (Singh ve Mathur 2004b). İnfekteli tohumların rengi değişmekte ve tohumlar çimlenme gücünü yitirebilmektedir (Gleason vd 1993). Tohum enfeksiyonu sistemik veya lokal olabilmektedir. İnfekteli meyvenin gelişimi sırasında vasküler olarak tohumlar infekte olmaktadır (Uematsu vd 1977). Cmm tohumdan veya doğal açıklıklar yoluyla direkt iletim demetlerine girer. Bitkilerde solgunlukla başlayıp, tek taraflı solgunluk, renk değişimi ve yanıklık oluşturur. Genç fideler hızla solar, çöker ve ölür. İlerleyen dönemde hasta bitkilerin gövdelerinde iletim demetlerinde başta sarımsı renklenme daha sonra kızılımsı kahverengiye dönen renk değişimi olur. Bitkinin iletim demeti tıkandığından, yapraklara besin ve su taşınması gerçekleşmez sonuçta yanıklıklar hatta kavrulmuş gibi görünümdeki lezyonlar oluşur. Yara, budama, hidatodlar vb. doğal açıklıklardan bitkiye girerse, lokal enfeksiyon gerçekleşir, gövdede siğil oluşur. Lokal lezyonlar sistemik enfeksiyona dönüşebilir. Daha sonra bitkinin bütün yeşil aksamı solar, kavrulur ve bitkiler ölür. İnfeksiyon şiddetine göre meyvelerde kuşgözü şeklinde lezyonlar oluşur ve bu meyvelerden elde edilen tohumlar Cmm ile bulaşıktır (Şekil 2.1). Kuşgözü lezyonları meyvenin pazar değerini kaybettirir. Latent periyodunun uzun olması nedeni ile hasta ve sağlıklı fide ayrımının yapılması güçtür (Çetinkaya-Yıldız ve Aysan 2008). İnfekteli meyvelerde kuşgözü şeklindeki lezyonlar her zaman görülmeyebilir, çoğunlukla semptomsuz veya ağı ya da meyvenin sertleştiği görülür (ASTA 2010).



Şekil 2.1. Cmm'nin yaşam döngüsü ve enfeksiyonlarının görüntüsü (Eichenlaub vd 2006, De León vd 2011)

Cmm epifitik ve latent periyodu uzun olduğundan dolayı infekteli tohumlardan her zaman hastalık gelişmeyebilir. Cmm ile infekteli tohumların erken çimlenme döneminde Cmm kolonilerinin daha çok hipokotil ve kotiledonlarda kolonize olduğu, hem düşük (%45) hem de yüksek nispi nemli koşullarda (%83) Cmm'nin sürgünden daha çok kök bölgesine yığıldığı ve sistemik fide infeksiyonu oluşturduğu görülmüştür. Fide sıklığı çok yüksek bir yetiştiricilikte, epifitik patojenlerin çok hızlı bir şekilde sulama suyuyla ve yapraktan yaprağa geçtiği, hızlı bir şekilde fidelğin tamamını infekte edilebildiği belirtilmiştir (Xu 2010). İyi bir endofit olan Cmm bitkide hızla yayılmaktadır (Carlton vd 1998, Gartemann vd 2003).

Cmm olası bulaşık tohumların ithalatı ya da ülkelerin iç üretimlerinde yapılan yanlış uygulamalar nedeni ilk kez tespit edildiği tarihten bu yana domates üretim alanlarında sorun oluşturmaya devam etmektedir. Türkiye de yıllara göre domates üretimin artışıyla birlikte tohumluk açığı ortaya çıktığı ve bu nedenle çok sayıda yeni domates çeşidine ait tohumun ithaliyle bakteriyel hastalıklarda artış tespit edildiği bilinmektedir (Türküsay ve Tosun 2005). Batı Akdeniz bölgesinde ithal edilen domates tohum örneklerinde en fazla *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* tespit edilmiştir (Yılmaz vd 2005). Ülkemizde aynı bölgede yapılan bir çalışmada ise, hastalık belirtisi gösteren fide örneklerinden ve üretim amaçlı kullanılan tohumlardan elde edilen Cmm izolatlarının PCR ile doğrulaması yapılmıştır. Daha sonra da moleküler genetik işaretleyiciler kullanılarak izolatların genetik ayrımları gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda farklı lokasyon ve üretim materyallerinden elde edilen izolatların kendi aralarında genetik açıdan farklı gruplar oluşturmaları sebebiyle kontaminasyon kaynaklarının farklı olabileceği görülmüştür (Baysal vd 2011). Yine ABD'nin Michigan eyaletinde yürütülmüş benzer bir çalışmada bulaşık alanlardan izole edilen 718 adet Cmm izolatında BOX-PCR ve Multilokus analizi sonucunda tohum veya fide bulaşıklık kaynaklarının farklı olabileceği görülmüştür (Quesada-Ocampo vd 2012).

Cmm dünyada domates üretim alanlarında oluşturduğu kayıplar, tohumla taşınımı ve olası riskleri nedeni ile EPPO tarafından karantina listesine (A2) alınmıştır (EPPO/CABI 1997 ve 1998).

Cmm'den arı tohum üretimi, tohumdan Cmm bulaşıklığını eradike etmek için tohum uygulamaları ve tohumluk materyalin Cmm açısından güvenilirliğini ortaya koymak amacı ile yapılan tohum sağlık testleri mücadelenin temel taşlarıdır (De León vd 2011). Cmm'nin tohumlarda tespitinde immunofloresan mikroskop (Porter vd 1997), tohumların veya tohum ekstraktının seçici veya yarı seçici besi yerine ekimi (Schaad 1989) gibi yöntemler uygulanmaktadır. Fluorescence spectrofluorometry ve flowcytometry (FCM) yöntemi hassas olup, 10^2 - 10^3 CFU/ml düşük bakteri popülasyonu bile tespit edilebilmektedir (Franken vd 1993, Chitarra vd 2000). Cmm'nin PCR temelli tanısı ve benzer çalışmalarda kullanımı amacı ile birçok primer geliştirilmiştir. Cmm3/4 primerleri (Santos vd 1997, Baysal vd 2011), Cmm 5/6 primerleri (Louws vd 1998) geliştirilmiştir. Cmm'nin PCR tanısı konusunda Hadas vd (2005) ve Burokiene (2006) semptomsuz fidelerde, çok düşük inokulum miktarında Cmm tespitinin bio-PCR ile yapılabileceğini bildirmişlerdir. Tohum ve fideden Cmm'nin tanılanması konusunda TaqMan probunun güvenilir sonuçlar verdiği tespit edilmiştir (Bach vd 2003). Milijašević vd (2007) tarafından 2000 ve 5000 adet domates tohum örneklerinde tohumların öğütülerek ve santrifüj edilerek yapılan tohum ekstraksiyonlarının yarı seçici

besi yerlerinde (mSCM, D2ANX, mCNS), klasik PCR, bio PCR ve enrichment PCR'da Cmm'nin belirlenmesine yönelik etkisi araştırılmıştır. Bio-PCR ve tohumların ögütülerek yapıldığı tohum ekstraksiyonun daha iyi sonuç verdiğini, 2000 tohumda en az 1, 3 ve 5 adet tohumda bulaşıklık, 5 000 adet tohumda ise 5 adet bulaşık tohum tespit edilebildiği tespit edilmiştir. Toplam 67 adet Cmm izolatından TaqMan prop kullanılarak yapılan Cmm tanısında, real time PCR ile 40 adet izolat pozitif, 27 izolatın negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir (Berendsen vd 2011).

Cmm'nin tohum ve bitkiden teşhisinde kullanılan klasik PCR ve real time PCR primerleri/probları ve bu yöntemlerin hassasiyetleri ortaya konulmuştur. En güvenilir sonuçları, ITSYG-1/ITSYG-2 primerleri ile 10^3 CFU/ml saf kültür, ITSYG-1/ITSYG-2 primerleri ile 10 adet bulaşık tohum/1 000 tohum ve Spm4f/Spm2r primerleri ile 10^3 CFU/ml saf kültür olarak real time PCR'dan elde edilmiştir (De leon vd 2011).

Bilinen dayanıklılık kaynağı *S. peruvianum* domatesin yabanisidir ve bütün *S. lycopersicum* türleri ile melezlenememekte ve fertil bireyler oluşmamaktadır (Van Heusden vd 1999). Embriyo kurtarma ve moleküler tekniklerin (PCR ve real time PCR) kombinasyonu ile domatesde Cmm'ye dayanıklı hat veya çeşit geliştirmeye yönelik çalışmalar mevcut ise de dayanıklılığın aktarımındaki problemler nedeni ile henüz dünyada Cmm'ye dayanıklı çeşit geliştirilememiştir (Manrique 2012, Şen vd 2013).

Bordo bulamacı, bakır oksit, bakır oksiklorür, bakır hidroksit, bakır oksisülfat ve bunların ticari formülasyonları hastalığı tamamen önlememekte, sadece serada veya fidelikte baskı altına almaktadır (Anonim 1995a ve 1995b). Benzeri kimyasalların 5×10^5 CFU/ml Cmm yoğunluğunun altında hastalık gelişimini sınırladığı, fakat yine de meyve infeksiyonları görüldüğü tespit edilmiştir (Hausbeck vd 2000). Ayrıca fitopatojen bakteriler bakırlı preparatlara ve benzeri kimyasallara kısa sürede dayanıklılık geliştirebilmektedir (Mixon 2012).

Cmm'den ari tohum üretimi ve tohum sağlığının muhafazası bu etmenle mücadelenin ilk ve temel aşamasıdır. Tohum bulaşmasını kontrol altına almak için, depodaki yaşamı ve bu organizmayı tohumda kontrol eden faktörlerin anlaşılması gerekmektedir (Kızıl vd 2005). Bu amaçla ilk akla gelen tohum uygulamalarının ise tohum canlılığını düşürdüğü ve Cmm'yi tamamen eradike edemediği tespit edilmiştir (Fatmi vd 1991, Kritzman 1993, Türküsay ve Tosun 2005, Çetinkaya-Yıldız ve Aysan 2005, Umesha 2006, Pradhanang ve Collier 2009, Tireng Karut 2011).

2.3. Uçucu Yağlar

Tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen uçucu yağlar sabun, parfüm ve kozmetik endüstrisinde kullanılan önemli hammaddelerdir (Ayanoğlu vd 2000). Türkiye'de kimyon, anason, kekik, çemen, haşhaş, rezene, nane ve kişnişin tarımı yapılmakta, defne, mahlep, ıhlamur çiçeği, adaçayı, biberiye, meyan kökü ve ardıç kabukları doğadan toplanmaktadır (Yücer ve Altıntaş 2012). Türkiye'nin de içinde yer aldığı Akdeniz Bölgesi ise uçucu yağ taşıyan bitkiler bakımından en zengin bölgelerden birini oluşturmaktadır (Ceylan 1996). En fazla *Lamiaceae* familyası olmak üzere, toplam 60 farklı bitki familyasından 2000'in üzerinde bitki uçucu yağ içermekte, yaklaşık 100 adet bitki türünden ekonomik anlamda uçucu yağ elde edilmektedir (Van

de Braak ve Leijten 1999). Bitkilerin, yaprak, meyve, kabuk, kök, çim, sakız, tohum, çiçek ve sürgünlerinden elde edilmektedirler (Sood vd 2006, Cava vd 2007).

Uçucu yağlar ikincil metabolitlerdir. Bitkinin protoplazma, hücre çeperinin özel bir tabakasında, salgı tüylerinde, salgı kanallarında, salgı hücrelerinde ve salgı ceplerinde sentezlenirler. Savunma (böceklerle) başlıca sentez nedenidir. Atıkların uzaklaştırılması, su kaybının önlenmesi, tozlaşmanın sağlanması ise diğer uçucu yağ sentez nedenleridir. Uçucu yağlar kristalleşebilirler, çok sayıda kimyasal bileşenden (düzenli monoterpen, düzensiz monoterpen ve iridoidler) oluşurlar, bitkiye has koku ve lezzeti verirler. Uçucu yağlar uzun süre bekletildiklerinde oksitlenir, reçineleşir ve renkleri koyulaşabilir. Bunların kimyasal yapıları havadan, ışıktan ve ısıdan olumsuz yönde etkilenir ve özelliklerini yitirebilirler. Bu tür bileşiklerin renkli cam veya alüminyum kaplarda, ağzına kadar dolu ve sıkıca kapalı şekilde, serin yerde saklanmaları gerekir (Başer 2009). Uçucu yağlar suda az, etanol, benzen, eter, petrol eteri gibi organik çözücülerde ve sabit yağlarda çok çözünürler (Bakkali vd 2008).

Uçucu yağların antimikrobiyal etkilerinin olduğu bilinmekle beraber, etki mekanizmalarına dair çok fazla açıklayıcı bulgu yoktur. Ancak antimikrobiyal etkiye en fazla katkıyı içerikleri ve özellikle de ana bileşenlerin verdiği bilinmektedir. Uçucu yağı oluşturan kimyasal bileşenler bitkilere antiseptik, antibakteriyel, antioksidan vb. gibi birçok özellik kazandırır (Başer 2008). Bunların antimikrobiyal etki gösterebilmeleri, aromatik halkalı C10 ve C15 terpenlerin varlığı ve fenolik hidroksilik grubun bazı enzimlerin aktif merkezleriyle hidrojen bağı oluşturabilmesine bağlıdır. Terpenler, alkoller, aldehytler ve esterler gibi diğer aktif bileşenler de antimikrobiyal etkiye katkı yapmaktadır (Dorman ve Deans 2000).

Origanum ve *Thymus* kekik türleri antimikrobiyal özellikleri nedeni ile birçok alanda kullanılır (Kordali vd 2008). *Origanum onites* (İzmir Kekik) antibakteriyel etkilidir ve uçucu yağında ağırlıklı olarak timol, karvakrol ve sedrol içerir (Baydar 2002). *O. vulgare* kara kekik veya keklik otu gibi adlarla bilinir. Akdeniz bölgesinde yaygındır. *Origanum vulgare*'nin 4 alt türü (subsp. *gracile*, subsp. *hirtum*, subsp. *viride* ve subsp. *vulgare*) Türkiye'de yetişmekte olup, uçucu yağında (%4) karvakrol ve timol, limonen, terpinen, osimen, caryofilen, β -bisabolen ve *p*-simen, linalol, 4-terpinol içerir (Başer 2001).

Nane (*M. piperita*) uçucu yağında terpenler, serbest ve ester halinde mentol (%40-60), menton (%8-10) ve mentofuren bulunur. *M. spicata* (kedi nanesi) uçucu yağında en fazla karvon (%40-70), limonen, dihidrokarvon, 1,8-sineol, mentol ve menton vardır. Fesleğen (*Ocimum basilicum*) uçucu yağı estragol, linalol ve pinen içerir (Anonim 2013a). *Rosmarinus officinalis* (biberiye) uçucu yağı 1,8-sineol, kamfor ve borneol içerir. Adaçayı (*Salvia officinalis*) uçucu yağı ise humulen, pinen, borneol, kamfen, kamfor, sineol, isotuyon, limonen, manool, salven, sesquiterpenler ve tuyon içerir (Kutlular 2007).

Lavanta türlerinden karabaş lavantası (*Lavandula stoechas*) uçucu yağında β -pinen, linalol, kamfor, α -terpineol, fenkon ve 1,8- sineol içerir. İngiliz lavantasının (*Lavandula angustifolia*) ana bileşenleri ise %12.7–32.9 oranında linalil asetat ve %38.5–56.1 oranındaki linalol'dur (Başer 1993). Rezene bitkisinin (*Foeniculum*

vulgare) genellikle tohumlarından elde edilen uçucu yağ *trans*-anethol, fenkon, feonikulin ve metil karvakrol içerir (Kan vd 2006).

Cinnamomum zeylanicum (Seylan tarçını) uçucu yağında ağırlıklı *trans*-sinnamaldehit ve öjenol içerir (Guerra vd 2012). Ardiç (*Juniperus communis*) tohumu uçucu yağında saninol ve sabinen içerir (Yatağan 2011). Tohum ve yapraklarından uçucu yağ elde edilen defne (*Laurus nobilis*) uçucu yağında %35-50 oranında sineol bulunur. Mersin (*Myrtus communis*) uçucu yağı ağırlıklı olarak terpen içerir (Anonim 2013a). *Rosa damascena* (Isparta gülü veya pempe yağ gülü) uçucu yağı en fazla geraniol ve sitronellol içerir (Kazaz vd 2009). Alman papatyasının (*Matricaria recutita*, syn. *Matricaria chamomilla*) uçucu yağı antimikrobiyal etkilidir (Arslan ve Bayram 2012). *Pinus* spp. çam türleri de içerdikleri tanen ve uçucu yağlar nedeni ile antibakteriyel etkilidir (Anonim 2013b).

Uçucu yağların çok farklı yapı ve sayıda bileşen içermeleri ve uygulandıkları hedef hücre (bitki veya bakteri) içerisinde birçok hedef bulunduğundan özel bir etki mekanizmanın tanımlanması zordur (Carson vd 2002). Antibakteriyel etkiye yönelik mekanizma tanımlanmamış olmakla (Lambert vd 2001, Diao vd 2014) beraber, majör ve minör bileşenlerin etkisi büyüktür (Bajpai vd 2011). Örneğin karvakrol kekik uçucu yağının biyolojik aktivitesinden sorumlu ana bileşiktir (Başer 2008). *Origanum* ve *Thymus* türlerinin uçucu yağlarının ana bileşikler aromatik monoterpenler, karvakrol, timol ve p-simen'dir ve bunların antibakteriyel etkileri bu bileşikler ile ilgilidir (Daferera vd 2003). Karvakrol ve timole göre linalol daha düşük, sitronellal ve linalol, 1,8-sineol'e göre daha yüksek bir antibakteriyel etkilidir (Hussain 2009). Terpenoid ve fenilpropanoid türevleri antibakteriyel aktiviteye sahiptir. Bu türevlerin (aldehit, keton, eter ve ester) az veya önemsiz miktarları bile yüksek derecede antibakteriyel etki gösterebilmektedirler (Cantore vd 2009). Aromatik bileşikler, aromatik olmayanlara göre daha yüksek biyolojik aktivitelidir (Vang vd 2005). Fenolik bileşikler daha yüksek antimikrobiyal etkilidirler (Sivropoulou vd 1995) ve bunları aldehit, keton ve alkoller izler (Tepe vd 2007). Özellikle oksijene monoterpenlerin antibakteriyel etkileri daha yüksektir (Kotan vd 2007).

Uçucu yağların antimikrobiyal etkilerine dair ilk akla gelen mekanizma yapı ve fonksiyon değişikliği ile sitoplazma zarında zararlanma ve sitoplazma zarının seçici geçirgenliğinin kaybı nedeni ile hücre ölümüdür (Evren ve Tekgüler 2011). Antimikrobiyal etki uçucu yağ oluşturana bileşenlerin miktarı ve her bir bileşenin gücüne ve etkisine göre ortaya çıkar. Alkoller vejetatif hücrelere karşı bakterisidal etkilidirler. Sahip oldukları elektronegatiflik nedeni aldehitler protein ve nükleik asit gibi yaşamsal azotlu bileşiklerle reaksiyona girerek mikroorganizma gelişimini inhibe ederler (Sankarikutty ve Narayanan 1993). Uçucu yağlar sahip oldukları hidrofobiklik özelliği sayesinde bakteri hücre membranındaki lipidlere ve mitokondrialara tutunarak, yapılarını ve hücrenin yarı seçici geçirgen yapısını bozarlar (Bajpai vd 2011). Hücre duvarı ve membranına penetre olabilen terpenler ise bakterinin yağ dokusunu ve protein yapısını bozarak hücre ölümüne neden olurlar (Bajpai vd 2011). Kontrolde 0.42 olan elektron geçirgenliğini, 200 mg /l karvakrol ve timol uygulandığında sırasıyla 0.08 ve 0.07'ye düştüğü, gram (-) bakteride antibakteriyel etkinin membran geçirgenliği ve iyon dengesinin bozulması şeklinde olduğu bildirilmiştir (Xu vd 2008). Uçucu yağların suda çözünmeyen (hidrofobik) ve yağda çözünebilir (lipofilik) yapıları antimikrobiyal etkiyi

artırmaktadır. Bunların fiziko kimyasal yapılarının yanında, hedef bakterinin membranının lipit kompozisyonu ve elektriksel yükü antibakteriyel etkiyi değiştirebilmektedir (Özdikmenli ve Zorba 2014).

Gram (-) bakterilerde bulunan lipopolisakkarit dış hücre zarı uçucu yağlar gibi hidrofobik bileşiklerin difuzyonunu sınırladığından gram (-) bakteriler, gram (+) bakterilere göre uçucu yağlara daha dayanıklıdır (Evren ve Tekgüler 2011).

Uçucu yağların antimikrobiyal etkileri elde edilme yöntemleri, dönem, yetiştirilme koşulları, içerikleri, test yöntemi, uygulanan patojene göre farklılık gösterebilmektedir (Sivropoulou vd 1995, Şahin vd 2004). Uçucu yağların çözücüler, deterjanlar, antibiotikler veya diğer ilaçlar ile antimikrobiyal etkinlikleri değişebilmektedir (Toroğlu vd 2006).

Uçucu yağlar genellikle hedef organizmanın dışında, non-fitotoksik bileşikler olarak düşünülür (Christian and Goggi 2008, Groot vd 2006). Örneğin, kekik uçucu yağı nispeten düşük toksiteli, fakat fitopatojenlere karşı oldukça yüksek derecede aktiftir. Birçok Avrupa ülkesi kekik uçucu yağının düşük eko-toksik riskleri olduğunu düşündüğünden bitki koruma amaçlı kullanımına izin vermektedir. Aynı zamanda Organik EU düzenlemesi (2092/91) listesinde yer alan organik tarımda kullanılacak bir bitki koruma ürünüdür (Anonymous 1991). Bitki bakteri hastalıklarına karşı önemli bir mücadele aracı olarak görülmektedir. Hedef dışı organizmalara ve çevreye etkisi çok az olan uçucu yağların biyopestisit olarak kullanımı tarımsal pazarın dikkatini çekmektedir (Karakoç 2006).

Son yıllarda sağlıklı yaşam ve daha az kimyasal kullanımına doğru giden eğilimin baş aktörü olan uçucu yağların biyopestisit olma özellikleri üzerinde araştırmalar yoğunlanmıştır. Özellikle *in vitro* koşullarda birçok uçucu yağın fitopatojenlere karşı (Burt 2004, Raudales ve Gardener 2008) etkinliği araştırılmıştır.

Uçucu yağların Cmm üzerine etkisine dair birçok bulgu vardır. Bir kekik türü olan *T. spicata* var. *spicata*'nın Cmm'ye karşı minimum bakterisit dozu kontak etkide 405 mg/ml, fumigant etkide ise 91 mg/ml tespit edilmiştir (Basım vd 2000). Kekik uçucu yağlarının (*O. vulgare*, *T. capitatus*, *O. dictamnus*, *O. majorana*) düşük dozlarının bile Cmm gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Daferera vd 2003). *O. vulgare*, *O. dictamnus*, *O. majorana*, *O. Coridothymus*, *L. angustifolia*, *R. officinalis*, *S. fruticosa* ve *M. pulegium* uçucu yağlarının Cmm'ye karşı biyolojik aktivitesinin çok hassas olduğu tespit edilmiştir (Dimitra vd 2003).

O. vulgare subsp. *vulgare* uçucu yağının metanol ekstraktının Cmm'ye karşı antibakteriyel etki göstermemesine karşı, uçucu yağının yüksek etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şahin vd 2004). Toplam 30 farklı uçucu yağ içerisinde Cmm'ye karşı Origanum uçucu yağının en yüksek etkiyi gösterdiği belirlenmiştir (Groot vd 2004). Kızıl ve Uyar (2006) tarafından Türkiye'den toplanan *Tyhmbra*, *Origanum*, *Satureja*, *Thymus* ve *Coridathymus* türlerinin uçucu yağlarının Cmm'ye karşı çok güçlü bir antibakteriyel etki gösterdikleri tespit edilmiştir. *O. onites*'in %40.7, *S. hortensis* %20.6, *T. spicata* %81'in oranında karvakrol, *Thymus* ise %41.6 ile timol içerdiği bildirilmiştir. Türkiye'de yapılan bir başka araştırma bulgusunda Cmm'ye karşı en etkili uçucu yağın

sırası ile kekik (*O. syriacum* var. *bevanni*) ve lavanta (*L. stoechas* var. *stoechas*), en düşük antibakteriyel özelliğe sahip uçucu yağın ise rezene (*F. vulgare*) olduğu tespit edilmiştir (Eriş 2006). Altundağ (2007) tarafından *Labiatae* familyasından bir kekik türü olan *O. minutiflorum*'un *in vitro* çalışmalarda Cmm'ye karşı en etkili uçucu yağ olduğu rapor edilmiştir. Doğadan toplanan *O. vulgare*'nin kültür ve ticari formlarına göre Cmm'ye karşı daha yüksek antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir (Borboa-Flores vd 2010).

Toplamda 17 adet ticari uçucu yağın antifungal ve antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Tarçın, kekik, fesleğen ve rezene uçucu yağlarının fungisidal ve bakterisidal etki gösterdiği ve özellikle Cmm gelişimini inhibe ettikleri rapor edilmiştir (Tanovic vd 2007).

Uçucu yağların tohum çimlenmesi ve fide gelişimi üzerine etki mekanizmasının solunumu, mitoz bölünmeyi, fitohormon hareketini, aktioksidan savunma sistemi ve membran özelliklerine müdahale şeklinde olduğu bilinmektedir. Lipoksijenaz konsantrasyonu yüksek olan tohumların α -pinen'in oksidatif stresine daha duyarlı olduğu ve metabolik enerji ATP ve/veya membran geçirgenliğinin monoterpenler tarafından değiştirildiği rapor edilmiştir. ATP üretimi başlıca mitokondrial metabolizmaya bağlı olduğundan, özellikle tohum çimlenmesi ve ilk fide gelişimi sırasında bazı monoterpenlerin fitotoksik etkisinin ilk mekanizmasının mitokondrial fonksiyonlar üzerine olabileceği bildirilmiştir (Iwamoto vd 2012).

Tohumdaki hedef patojeni yok etmek amacı ile bazı uçucu yağ tohum uygulamalarından etkili sonuçlar alınmıştır (Nguefack vd 2005, Mirik ve Aysan 2005). Fakat belli bir dozun ve uygulama süresinin üstüne çıkıldığında tohum uygulamalarında tohum çimlenme oranının düştüğü görülmüştür (Groot vd 2004).

Tohum türüne, hedef patojene, uçucu yağ içeriğine ve uygulama yöntemine de bağlı olarak uçucu yağ ile tohum uygulamasının tohum ve fide kalite parametreleri üzerine etkileri farklılık göstermiştir. Uçucu yağların tohum ve fide parametrelerine olumsuz etkileri tespit edilmiştir (Rosado vd 2009). Bazı bulgularda tohum canlılığına etkilerinin önemsiz olduğu (Bankole ve Joda 2004, Waliwitiya 2005, Christian ve Goggi 2008), bazılarında ise hiç olumsuz etki görülmediği (Daouk vd 1995, Zhi-Hui vd 2011, El-Mougy vd 2012) rapor edilmiştir. Uçucu yağ uygulamasının tohumun çimlenmesini teşvik ettiği de görülmüştür (Leth 2002, Kritzingen vd 2002, Nguefack vd 2005, Uçkun vd 2006, Rahman ve Talukder 2006, Mancini vd 2009, Mbega vd 2012). Tohum ve fide kalite parametreleri üzerine sinerjistik veya antagonistik etkinin dozlara (Fikreyesus vd 2011), yönteme (El-Mougy vd 2012), uygulanan tohum türüne (Zhi-Hui vd 2011) bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir. Uçucu yağların tohumlara buhar halinde uygulanması, direkt uygulamaya göre tohum çimlenmesi üzerine daha fazla negatif etki göstermiştir (Rossi vd 2012).

2.4. Tohum Kaplama

Tohumların kaplanması hasat edilen tohumların satışa sunulmadan ve depo öncesi yapılması gereken en son ama en önemli basamağıdır. Tohum kaplama tohumun etiketidir. Tohumun pazar değerinin göstergesidir. Üretimde kullanılan tohumların

kaplanması, hasattan tekrar üretimde kullanıldıkları döneme kadar tohumun kalitesinin güvencesidir. Kaplanmış tohum, ekim kolaylığı, uniform ekim ve çıkış, üniform hasat, düşük iş gücü, düşük ekim ve işleme maliyeti demektir. Bu teknikle çimlenmeyi teşvik edici maddeler tohuma yüklenebilir. Şüphesiz bu tekniğin en faydalı ve yaygın kullanımı özellikle tohumla taşınan hastalık ve zararlılarla mücadelede sağladığı üstünlüktür. Tohum kaplama ile her türlü pestisit (fungusit, insektisit, bakterisid, akarisit, biyolojik mücadele ajanları, biyolojik preparatlar vb) tohuma yüklenir. Tohumların, hasat-depolama ve hasat-üretim arasında ve bizzat üretim aşamasında tohum kalitesi korunur (Scott 1989, Taylor vd 1998).

Tohum kaplama yaygın olarak pelletleme, film kaplama, pellet+film kaplama şeklinde yapılır. Küçük, hafif (süs bitkileri, tütün tohumları vb), şekilsiz (şeker pancarı, soğan vb), küçük, ince uzun tohumların (marul) makineli ekime uygun hale getirilmesi için kil, bentonit vb katı partiküller tohumun etrafına sardırılarak tohum pelletlenir. Polimer vb plastikliği sağlayıcı maddeler ile tohum mikron büyüklüğünde ince bir film tabakası ile kaplanır. Diğer şekilde pellet materyalinin tozlaşıp dağılmasının önlenmesi amacı pelletlenen tohuma son tabaka olarak film kaplanır (Kavak 2006).

Film kaplanan tohumların orijinal büyüklük ve şekillerinde bir değişiklik olmazken, pelletlenen tohumların orijinal şekilleri, büyüklükleri ve tohum ağırlıkları değişir. Kaplanan tohumlarda üniform, çimlenme ve fide çıkışı olur, tohumla taşınan fungal etmenler ve zararlılara karşı tohum ve gelişen fide korunur (Taylor ve Eckenrode 1993, Krishnasamy 2003). Tohumların tarla çıkışı garanti edilir. Pelletlenmeyen domates tohumlarında arazi çıkışı %80 iken, pelletleme ile tohuma 300 mg/kg ZnSO₄ yüklenen tohumlarda %92 ve 4 g/kg *Trichoderma viridae* yüklenen tohumlarda ise %88 tespit edilmiştir (Shashibhaskar 2008).

Film kaplamada kullanılan polimerler günümüzde renklendiriciler ile karışım halindedir. Renklendiriciler, tohumları ayırt etmenin yanı sıra, kaplama işleminin homojen yapıp yapılmadığının kontrolünü de sağlamaktadır (Anonim 2013c).

Kaplı tohumlarda, tohumun su-gaz alışverişinin engellenmemesi gerekir. Kullanılan polimerin hidrofobikliği (su tutmayan) ve hidrofilikliği (su tutucu) kaplama amacına yönelik olarak iyi dengelenmelidir. Düşük su stresinde suyu ortamdan çeken (hidrofilik), yüksek su stresinde ise su alımını önleyen (hidrofobik) kullanılabilir. Bu genelleme her durum için geçerli değildir. Örneğin tohumun hem depoda fazla su çekmemesi, hem de ekim sonrası çimlenme ve çıkışa olanak vermesi isteniyor ise kullanılan polimerin belli bir hidrofobik/hidrofilik dengesi olması gerekir (Kavak 2006, Shashibhaskar 2008).

Sıvı ekim, sıcaklık kontrolü sağlayan polimerlerin kullanımı, biyokontrol ajanlarının yüklenmesi, herbisit yüklenmesi, genetik olarak değiştirilmiş *Rhizobium* bakterilerinin yüklenmesi, tohum etiketlenmesi, tohumların gübre zararından korunması ve yavaş salımlı kimyasalların yüklenmesi tohum kaplamanın başlıca kullanım alanlarıdır (Walsh vd 1998).

Tohum ilaçlamasına göre kaplamanın en önemli avantajı pestisit tohum yüzeyine ve her tohuma homojen bir şekilde yüklenmesidir. Diğer avantajı ise birden

çok maddenin (pestisit, mikro besin elementi, biyolojik mücadele ajanı, çimlenmeyi teşvik ediciler vb.) aynı anda tohuma yükelenebilmesidir. O nedenle etkili sonuç alınabilmesi için tohumların homojen kaplanması gerekir (Pamuk vd 2002, Kavak 2006). Bir araştırma bulgusunda, hidrofobik polimer (keten yağı, polietilen, daran 8600C Vinamul 3240) ile kaplanan ve 25 °C’de 10 hafta %85 nispi nemde depolanan soğan tohumlarında çimlenme oranı önemli ölçüde düşmüştür. Polimerlerin tohum ile çimlenme ortamı arasında kökçük çıkışına engel olan bir bariyer oluşturdıkları görülmüştür (Kavak ve Eser 2009).

Tohum kaplama üretici, fideci ve yetiştirici açısından avantajlar sağlayan bir tekniktir. Kimyasal tohum kaplamanın çıkış zamanını etkilemeksizin, tarla çıkış oranını kontrole göre artırdığı bildirilmiştir (Manjunatha 2008). Film kaplama domates tohumunun çimlenme oranı, verimle ilgili özellikleri (meyve tutumu, meyvede tohum oranı, ilk çiçeklenme zamanı, bitki başına tohum verimi, parsel verimi) ve depolanabilirliğini kontrole göre artırmıştır (Shashibhaskar 2008). Tohum kaplama ile farklı bitki türlerinde olumlu sonuçlar alınmıştır (Assis ve Leoni 2009, Guan 2013).

Biber tohumları, mikro besin elementi (200 g ve 400 g aminoasit), bitki büyüme düzenleyici (5 ve 10 ml aminoasit), 10 ml aminoasit + zn, 5 ml aminoasit + zn, 10 ml aminoasit ve *trichoderma viride* ile film kaplanmıştır. Kontrolün çimlenme oranı %94.74 iken uygulamaların sırasıyla %81.85, 79.49, 98.22, 99.50, 98.85, 98.94 ve 96.29 olmuştur. Uygulamalar sürgün kuru madde, kök kuru madde ve fide boyunda önemli bir farklılık oluşturmamıştır (Diniz vd 2009).

Nano teknoloji ile elde edilen makro ve mikro besin elementlerini içeren Protinus isimli ürünün kaplama ile tohuma yüklenmesi durumunda mısır, soya fasulyesi ve sebzelerde erkenci, üniform fide ve kök gelişimi tespit edilmiştir (Anonim 2013d).

Incotec firması ve Seed Guard’ın ortak geliştirdikleri tohum işleme ve kaplama teknolojisinin çevre dostu olduğu ve hastalıklar ile mücadelede kullanılabileceği belirtilmiştir (Anonim 2013e).

Kaplama materyaline bağlı olarak tohum kalitesini olumsuz etkileyen bulgulara mevcuttur. Thiram + fenpropimorph ve iprodione ile kaplanan ayçiçeği tohumlarında çimlenme oranı düşmüştür. (Mcquillen vd 1997). Spectrum 511 ve Discoclear polimerleri kanola tohumunda kontrole yakın çimlenme oranı verirken, Gelgard polimerinin bütün dozları ise kontrolün çok altında çimlenme vermiştir. Polimer + pestisit film kaplamasının kanolada tohum çimlenmesini artırdığı, polimer ile tohum film kaplamanın etkinliğinin, çeşide ve çevre koşullarına (toprak tipi, su stresi, sıcaklık vb) bağlı olduğu tespit edilmiştir (Kaur ve Bishnoi 2011).

Marul fidelerinde görülen çökerten etmenine (*R. solani*) karşı, Alginate kaplama ile biyo kontrol ajanı (*P. aeruginosa* LY-11) marul tohumlarına yüklenmiş, sonuçta çökertenin ve sistemik enfeksiyonun kontrol altına alınabildiği görülmüştür (Kvang vd 2008).

Domates tohumları polivinil alkol ve karboksi metil selüloz ile (toplam tohum ağırlığının %1, %3 ve %5 oranlarında), KNO₃ ve Thiam ile kaplanmış ve bunların

tohum çimlenmesi ve toprak patojenlerine karşı etkisi araştırılmıştır. En iyi sonucu %1 oranında karboksi metil selüloz'un verdiği, KNO₃'ün etkili olmadığı, Thiamin ise toprak patojenlerine karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Çavuşlar ve Eser 2002).

Soya fasulyesinde depolama sırasında zararlılara karşı *azadirachtin* insektisi farklı kaplama materyalleri ile (akasya reçinesi, kitre reçinesi, çam sakızı reçinesi, hidroksietil selüloz, polietil methacrylate (methacrylic asidin kimyasal tuzu veya esteri), metil selüloz, polietilen glikol, polivinil klorid, polivinil asetat, polivinil pyrolidon ve Agrimer VA 6 ve bentonit) tohuma yüklenmiştir. *Azadirachtin* tohum gücü ve tohum çimlenmesi ile pozitif korrelasyon, tohum nem içeriği ile negatif korelasyon göstermiştir (Nisar vd 2009).

A. nilotica yaprak tozunun 10:3:22. oranında tohum (g): akasya tozu (ml):su (ml) formülasyonu ile domates tohumları pelletlenmiştir. Kontrolün (kaplanmayan) ortalama çimlenme zamanı 6.10 gün iken, kaplanan tohumlarda ortalama çimlenme zamanı 5.47-6.17 arasında değişmiş ve kaplanan tohumlar ortalama çimlenme zamanında önemli bir farklılık oluşturmamıştır. Kontrolün çimlenme oranı %65 iken, akasya tozu ile kaplanan domates tohumlarda daha yüksek oranda çimlenme oranı %70 rapor edilmiştir (Govinden-Soulange ve Levantard 2008).

Karanfil, fesleğen, nane uçucu yağları ve bunların farklı oranlarda (1:4, 2:3, 3:2 ve 4:1) karışımlarının (karanfil+fesleğen, karanfil+nane ve fesleğen+nane) tohum kaplamasının mısır tohumlarındaki tohum kaynaklı funguslara (*A. flavus*, *A.niger* ve *Rhizopus* sp.) karşı etkisi araştırılmıştır. Uçucu yağların tek başına kaplanmasına göre ikili karışımlarının fungusların misel gelişimini önlemede daha etkili olduğu, en uygun karışımın 2:3 oranında karanfil+fesleğen uçucu yağ karışımı olduğu ve bu karışımın fungusların misel gelişimini %80-90 oranında engellediği tespit edilmiştir. 2:3 oranında karanfil+nane uçucu yağ kaplamasının kaplama yapılmayan tohumlara göre daha iyi bir kök gelişimi olduğu görülmüştür. Uçucu yağ karışımlarının mısır tohumlarının çimlenmesini teşvik ettiği ve fungal gelişimi inhibe ettiği tespit edilmiştir (Kantapa vd 2011).

D. caryophyllus, *C. carvi*, *T. vulgaris*, *M. piperita*, *G. viscosissimum*, uçucu yağları bakla tohumunda taşınan funguslara karşı antifungal etkili bulunmuştur. Uçucu yağ tohum kaplaması bakla tohumlarında kontrole (rizolex fungusit kaplama) göre verimi %15.1-28.8 oranında artırmış ve hastalık şiddetini %40.1-50 oranında azaltmıştır (Abdel-Kader vd 2011).

Mısır tohumlarında limonotu, biber uçucu yağları ve bunların %25 (w/v) PEG 4000 ile tohum kaplamasının çimlenme oranı üzerine etkileri araştırılmıştır. Biber uçucu yağı + %25 (w/v) PEG 4000 karışımı ile kaplanan mısır tohumlarında çimlenme oranı artmış, limonotu uçucu yağı ile kaplanan tohumlarda ise çimlenme oranı düşmüş fakat tohumlarda fungal kontaminasyon tamamen engellenmiştir (Sompamitra vd 2011).

Çeltik tohumlarında tohumla taşınan funguslara (*Fusarium* sp. ve *Curvularia* sp) karşı tohumlar farklı dozlarda non-iyonik poliakrilamid (PAM) ile kaplanmıştır. PAM (%1) ile kaplanan tohumlarda çimlenme hızı (15.10 gün) artmış, fakat çimlenme oranı üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir. PAM + %0.05 oranında karanfil ve anason

uçucu yağı ile kaplanan tohumlarda fungus gelişimi en az Captan fungusiti kadar inhibe edilmiştir. Uçucu yağ ile kaplamanın tohum kalitesi, çimlenme hızı ve çimlenme oranı üzerine olumsuz bir etkisi tespit edilmemiştir. Anason (%0.05) ekstraktı ile tohum kaplamasında çok yüksek çimlenme görülmüştür. Karanfil ekstraktında (%0.01) ise yüksek oranda fide gelişimi görülmesine karşın çimlenme hızında bir parça düşüş olmuştur (Sriprasert vd 2008).

Kitozan tohum kaplamasının toksik tohum kaplama maddeleri ile karşılaştırıldığında mısır verimini %11.6-14.6 oranında artırdığı tespit edilmiştir. Kontrolün çimlenme oranı %82.8 iken, kitozan ile film kaplananlarda %98.7 çimlenme görülmüş, bu teknik mısır tohumlarında *S. reiliana* fungus gelişimini dozlara bağlı olarak %73.45-91.37 oranında engeller iken, mısır tohumlarının çimlenmesini de teşvik etmiştir. Uygulamalar, kaplı ve kaplanmayan tohumlar arasında sürgün boyu, kök boyu, sürgün ağırlığı, sürgün ve kök yaş ve kuru ağırlıkları bakımından önemli bir farklılık tespit edilememiştir (Zeng vd 2010a ve b). Benzer bir çalışmada neem uçucu yağı ile fasulye tohumlarında kaplamanın kök ur nematodlarına (*M. incognita*) karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Vani ve Yaqub Bhat 2012).

3. MATERİYAL ve METOT

Bu araştırmada, Cmm ile bulaşık domates tohumuna film kaplama ile yüklenen bazı ticari uçucu yağların tohumdaki Cmm'ye etkileri, temiz tohumun Cmm bulaşmalarına karşı ne ölçüde korunduğu, uygulamaların laboratuvar ve fidelik koşullarında Cmm ve tohum kalitesi üzerine etkileri ve bu etkilerin ne kadar sürede devam ettiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma sırasıyla uçucu yağların, antibakteriyel etki ve MIC değerlerini belirlemek, tohum uygulama ve film kaplamada kullanılabilirliklerini tespit etmek, uçucu yağ film kaplamasının hazır fide üretim serasındaki ve depolama sonrası performansını tespit etmek amacı ile altı farklı deneme olarak yürütülmüştür.

3.1. Materyal

3.1.1. Tohum

Çalışmada MayAgro Tohumculuk San. Tic. A.Ş. (Bursa / TÜRKİYE)'ye ait Rio Grande standart domates çeşidine ait, havı alınmış ve ilaçsız tohumlar kullanılmıştır (Şekil 3.1). Tohumlar analiz yöntemleri kısmında belirtildiği gibi standart çimlendirme testine alınmış ve test sonunda tohumların çimlenme oranı %92 tespit edilmiş ve paket üzerinde belirtilen oran ile eşdeğer olduğu görülmüştür. Tohumlarda analiz yöntemleri bölümünde belirtildiği gibi yüzey sterilizasyonu yapılmış ve Cmm açısından temiz oldukları doğrulanmıştır. Denemelerde kullanılan tohum örneği ise Cmm izolatu ile yapay inokulasyon yapılarak bulaştırılmıştır. Araştırma boyunca denemelerde kullanılan tohumlar, kontrol tohumu (işlem görmemiş stok tohum) ve yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra ise temiz tohum ve Cmm inokulasyonu yapılmış tohumlar da bulaşık tohum olarak farklı partiler halinde gruplandırılmıştır.

3.1.2. İzolat

Araştırmada Prof. Dr. Ömür BAYSAL (Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü) ve Prof. Dr. Yeşim AYSAN'dan (Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü) temin edilen sırasıyla Cmm 3/1A (Şekil 3.2a) ve diğer Cmm izolatları kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Analiz yöntemleri kısmında belirtildiği gibi, izolatların kullanılmadan önce değerleri kontrol edilmiş ve denemelerde gerekli görüldüğünde ek tanılamalar yapılmıştır. Yapılan virülenslik testi sonunda Cmm 3/1A ve Cmm Batem 2 izolatu en yüksek ve eşdeğer bir virülenslik göstermişlerdir. Cmm 3/1A'nın birçok çalışmada yaygın olarak kullanılması nedeni ile denemelerde bunun kullanılmasına karar verilmiştir (Bkz. Bölüm 3.2.7.2).



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan Rio Grande çeşidi domates tohumunun görüntüsü

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan Cmm izolatları

Cmm Çoruh	Cmm 785	Cmm 294	Cmm 290
Cmm 3/1A	Cmm 176	Cmm 295a	Cmm tuzla
Cmm 8/1A	Cmm tuzla 1	Cmm D2	Cmm Batem 1
Cmm 295	Cmm 171	Cmm D3	Cmm Batem 2
Cmm Tarsus 1	Cmm referans	Cmm 15 4a1	Cmm Batem 3



Şekil 3.2. NA besi yerinde gelişen Cmm 3/1A kolonileri ve domatesin kotiledon yapraklarında Cmm'nin oluşturduğu epidermis patlamasının görüntüsü

a) Cmm 3/1A kolonileri

b) Domatesin kotiledon yapraklarında Cmm lezyonu

3.1.3. Uçucu yağlar

Araştırmada İnan Tarım A.Ş.'den temin edilen 17 farklı türden toplam 20 adet ticari uçucu yağ kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Uçucu yağlar amber renkli şişelerde, +4°C'de muhafaza edilmiştir. Uçucu yağların çözündürülmesi ve dozlarının hazırlanmasında Dimethyl sulfoxide (DMSO %10) kullanılmıştır. DMSO çözeltisi %10'luk hazırlanmıştır; Bu amaçla 450 ml steril saf su içerisine 50 ml DMSO eklenmiş ve %10'luk DMSO elde edilmiştir. Her bir uçucu yağdan 25 mg tartılmış, 50 ml DMSO ile karıştırarak yaklaşık 500 ppm'lik stok hazırlanmıştır. Bu stok solüsyondan DMSO ile seyreltmeler yapılarak diğer uçucu yağ dozları hazırlanmıştır. Hazırlanan dozlar amber renkli şişelere bırakılarak, ağızları sıkıca kapatılmış, ayrıca parafilm çekilmiş ve +4°C'de kullanılabilecek kadar muhafaza edilmiştir (Altundağ 2007).

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan uçucu yağlar ve ana bileşenleri

Tür Adı	İsim	İçerik
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> L.	Seylan Tarçını	Trans-Sinamaldehit, Öjenol
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Rezene	Anetol, Myristikum
<i>Juniperus communis</i> L.	Ardıç	Saninol, Sabinen
<i>Lavandula angustifolia</i> L.	İngiliz Lavantası	Linalil Asetat, Linalol
<i>Lavandula stoechas</i> L.	Karabaş	β-Pinen, Linalol, Kamfor, Terpeneol, Fenkon, 1,8- Sineol
<i>Laurus nobilis</i> L.	Defne	1,8 Sineol
<i>Myrtus communis</i> L.	Mersin	Mirtenol, Limonen, Mirtenol asetat, α-pinen, α-terpinol, 1,8 sineol, Linalol
<i>Mentha piperita</i> L.	Nane	Terpenler, Serbest Ester halinde Mentol, Menton, Mentofuren
<i>Mentha spicata</i> L.	Kedi Nanesi	Karvon, Limonen, dihidrokarvon, 1,8-Sineol, Mentol, Menton
<i>Matricaria recutita</i> L.	Alman Papatyası	Bisabolon oksit, Bisabolol oksit
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Fesleğen	Estragol, Linanol, Pinen
<i>Origanum onites</i> L.	İzmir Kekigi	Timol, Karvakrol, Sedrol
<i>Origanum vulgare</i> L.	Keklikotu, Karakekik	Karvakrol, Timol, Limonen, Terpinen, Osimen, Caryofilen, B-Bisabolen, P-Simen, Linalol, 4-Terpinol
<i>Pinus</i> spp.	Çam	Karyofillen oksit, Thumbergol, Humulen oksit
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Biberiye	α-Pinen, Kamfen, 1,8-Sineol, Myrisen, Kamfor, Borneol
<i>Rosa damascena</i> Mill.	Yağ Gülü	Geraniol, Sitronellol
<i>Salvia officinalis</i> L.	Adaçayı	Humulen, Pinen, Borneol, Kamfen, Kamfor, 1,8 Sineol, İsoyuyon, Limonen, Manool, Salven, Sesquiterpenler, Tuyon

3.1.4. Polimer

Film kaplamada INCOTEC Group BV, Hollanda firmasına ait (Discoshine L88 Blue) kodlu hidrofilik (su tutucu) özellikteki kullanıma hazır ticari polimer kullanılmıştır.

3.1.5. Besi yerleri ve buffer çözeltileri

Araştırmada EPPO'nun Cmm tespitine yönelik referans protokolde yer alan besiyerleri ve buffer'lar kullanılmıştır (EPPO 2013).

Nutrient Agar (NA)

Nutrient Broth	: 8.00 g
Agar	: 15.00 g
Distile su	: 1.00 L

Yukarıdaki karışım kullanılarak NA besi yeri hazırlanmıştır. Uçucu yağların agar içerisinde daha kolay difüzye olabilmeleri için %1 oranında agar ilave edilmiştir. Hazırlanan NA besi ortamı 121°C’de 20 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası su banyosu içerisinde 45°C’ye kadar soğutulduktan sonra, homojen dağılım sağlanması için iyice karıştırılmıştır. Karıştırma sonrası besi ortamı 90 x 10 mm ebatlarındaki tek kullanımlık steril plastik petriler içine her bir petri kabına yaklaşık 20 ml olacak şekilde dökülmüş ve besi ortamının katılaşması için bir steril kabin içerisinde oda koşullarında bir gece bekletilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

SCM

SCM besiyeri (Duchefa)	: 32.20 g
Yeast extract	: 1.90 g
Distile su	: 1.00 L

Yukarıdaki karışım hazırlanmış, pH:7.3’e ayarlanmış, steril edilmiş, 45°C’ye kadar soğutulmuş, sırası ile aşağıdakiler ilave edilmiş ve plastik petrilere dökülmüştür:

Nalidixic asit	: 20.00 mg
Trimetoprim	: 80.00 mg
Nicotinic asit	: 50.00 mL (0,1 g nicotinic asit/50 ml çeşme suyu)
Nystatin	: 100.00 mg
Potassium tellurite	: 1.00 ml (%1’lik)

GF-rif (50 mg/L)

K ₂ HPO ₄	: 0.40 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	: 0.05 g
NaCl	: 0.10 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	: 0.50 g
FeCl ₃	: 0.01 g
Glukoz	: 1.00g
Gist extract (SIGMA)	: 3.00 g
Agar	: 15.00 g
Distile su	: 1.00 L

Yukarıdaki karışım hazırlanmış, pH:7.2’e ayarlanmış, steril edilmiş, 45°C’ye kadar soğutulduktan sonra içerisine 50 mg/L rifampisin ilave edilmiştir. Steril plastik petrilere dökülmüş ve kullanıma hazır hale gelmiştir.

Nutrient broth besi yeri (NB)

Nutrient broth	: 13.00 g
Distile su	: 1.00 L

Yukarıdaki karışım hazırlanmış ve steril edilmiştir.

Steril fosfat buffer (SPB)

Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	: 19.57 g
KH ₂ PO ₄	: 1.65 g
Na ₂ S ₂ O ₃	: 0.50 g

Yukarıdaki karışım hazırlanmış, pH:7.4 ayarlanmış ve steril edilmiştir.

Steril fosfat buffer+Tween 20 (SPBT)

Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	: 19.57 g
KH ₂ PO ₄	: 1.65 g
Na ₂ S ₂ O ₃	: 0.50 g

Yukarıdaki karışım hazırlanmış, pH:7.4 ayarlanmış ve steril edilmiştir. Tween 20 (%10) steril edilmiş ve 60°C'ye kadar soğutulmuştur. Steril fosfat buffer solüsyonunun içerisine steril Tween 20'den (%10) 2 ml ilave edilmiştir.

3.2. Metot

Bu araştırma film kaplama ile tohumu yüklendikleri durumda, domates tohumundaki Cmm inokulumunu tamamen yok edecek, hasattan üretime kadar ve belli bir süre (15-90 gün) depolama sonrası temiz tohumu bulaşmalara karşı koruyacak, fidelik performansı yüksek film kaplama formülasyonun, uçucu yağ ve dozların belirlenmesi amacı ile 6 ayrı deneme olarak planlanmıştır. Her bir deneme kendi içerisinde ayrı değerlendirilmiş ve bir sonraki denemeye yön vermiştir.

3.2.1. Antibakteriyel etki gösteren uçucu yağların belirlenmesi (Deneme 1)

Araştırma 2010-2011 yılları arasında yürütülmüştür. Aynı firmadan 2 farklı zamanda temin edilen ikişer farklı *R. officinalis* ve *S. officinalis*, biri tohum diğeri yapraktan çıkarılan iki farklı *L. nobilis* (yaprak) uçucu yağı olmak üzere toplamda 20 adet ticari uçucu yağ kullanılmıştır. Toplamda 20 adet ticari uçucu yağ içerisinden en yüksek antibakteriyel etki gösterenleri belirlemek amacı ile analiz yöntemleri bölümünde belirtildiği gibi, agar kuyu difüzyon yöntemine göre inhibisyon zonları (mm) ve bunlar üzerinden antibakteriyel etki (%) değerleri belirlenmiştir. Yüksek antibakteriyel etki (%) gösteren uçucu yağların ise mikro kuyu dilüsyon yöntemine göre minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC) belirlenmiştir. Yüksek antibakteriyel etki (%) veren ve en düşük MIC değerine sahip uçucu yağların araştırmanın diğer basamaklarında kullanılması hedeflenmiştir. Bütün denemeler *in vitro* koşullarda yürütülmüştür.

3.2.2. Cmm'ye karşı tohum uygulamalarında kullanılabilecek uçucu yağların belirlenmesi (Deneme 2)

Burada 2011-2012 yıllarında, bir önceki denemede (Deneme 1) Cmm'ye karşı %65 ve üzerinde antibakteriyel etki gösteren 10 adet uçucu yağın içerisinden Cmm'ye karşı tohumu uygulanabilecek en uygun uçucu yağların belirlenmesi amaçlanmıştır. Önce uçucu yağların tahmini minimum bakterisidal konsantrasyonları (MBC, Minimal

Bactericidal Concentration) olan dozu ile (1000 ppm) tohum uygulaması yapılmıştır. Denemede steril saf su, streptomisin sülfat (7,8 ppm) ve bakır sülfat (250 cc/100 l su) ile muamele edilmiş tohumlar kontrol uygulamaları olarak değerlendirilmiş olup, her petri bir tekerrür olmak üzere 4 tekerrürlü tesadüf parselleri faktöriyel düzende kurulmuştur. Analiz yöntemleri bölümünde belirtildiği gibi, inkübasyondan 48 ve 72 saat sonra alınan veriler üzerinden temiz tohum oranı (%) belirlenmiştir. Temiz tohum sayısı üzerinden varyans analizi yapılmıştır. İstatistiki olarak önemli tespit edilen uygulama ortalamaları arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre gruplandırılmıştır. Uygulama sonrası 0 bulaşıklık oranı ve %100 temiz tohum oranı veren uçucu yağlar belirlenmiştir.

3.2.3. Tohum uygulamalarında kullanılacak olan uçucu yağların ve dozların belirlenmesi (Deneme 3)

Deneme 3 araştırmanın en kapsamlı ve yoğun denemelerinden biri olup, Deneme 2'nin sonuçları dikkate alınarak, tohum uygulamaları ve film kaplama çalışmalarında kullanılabilecek en etkili uçucu yağların ve dozların belirlenmesi hedeflenmiştir. Önce *O. onites*, *O. vulgare*, *L. stoechas* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının her birinin farklı dozları (125, 200, 250, 300, 400, 500, 1000 ve 5000 ppm) ile tohum uygulaması yapılmıştır. Analiz yöntemleri bölümünde belirtildiği gibi, temiz tohum oranı (%), tohumda bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum), çimlenme oranı (%), çıkış oranı (%) belirlenmiştir. Uçucu yağların domates tohum dokusuna fitotoksite oluşturup oluşturmadığını saptamak amacıyla TTC testi (%) yapılmıştır. Tohum uygulamalarında etkili bulunan ve daha sonra kullanılması planlanan uçucu yağların içerik analizi yapılmıştır. Uçucu yağların içerdikleri bileşenlerin türü ve miktarları ile Cmm ve domates tohum kalitesi üzerine etkileri analiz edilmiştir.

3.2.4. Uçucu yağların domates tohum film kaplanmasında kullanılabilirliğinin belirlenmesi (Deneme 4)

Deneme 4'de, Deneme 3'de tohum uygulamalarında amaca uygun tespit edilen uçucu yağların ve dozlarının, film kaplama şeklinde Cmm ile bulaşık domates tohumuna yüklenmesinin tohumdaki Cmm'ye, bazı tohum ve fide parametreleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Uçucu yağ film kaplamasının domates tohumundan tohum ve fide parametrelerini olumsuz etkilemeksizin Cmm'yi ne ölçüde eradike ettiği, Cmm'ye karşı tohum etrafında koruyucu bir zon oluşturup oluşturmadıkları, polimer film kaplamanın uçucu yağları tohum üzerinde ne kadar tutabildiği, Cmm ve tohum kalitesi üzerine etkilerin ne kadar süre ile devam ettiği belirlenmiştir. *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare*, *R. officinalis* uçucu yağlarının 250, 500, 1000 ve 5000 ppm dozları ile önce tohumlara tohum uygulaması yapılmış, sonrasında aynı dozlar ile tohumlar film kaplanmıştır. Film kaplama sonrası tohum nem içerikleri %8-10'a düşürülen tohumlarda testler yapılmıştır. Bu testlerde analiz yöntemleri bölümünde belirtildiği gibi, sırasıyla kaplanan tohumların etrafında inhibisyon zonu (mm), temiz tohum oranı (%), tohumda bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum), fidede bakteri yoğunluğu (log CFU/fide), çimlenme oranı (%), ortalama çimlenme zamanı (gün), çıkış oranı (%) ve ortalama çıkış zamanı (gün) hesaplanmıştır.

Tohumda bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum) ve fidede bakteri yoğunluğu (log CFU/fide) değerleri, tohum ve fide ekstraksiyonundan besi yerinde (NA ve SCM) gelişen şüpheli bakteri (Cmm veya değil) kolonileri saflaştırılmıştır. Saflaştırılan bu izolatlar Promega DNA izolasyon kiti ve lizozim kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Şüpheli kolonilere ait bu DNA'lar Cmm 5 ve 6 primerleri, SYBRGREEN floresan boya kullanılarak real time PCR'de analiz edilmiştir. DNA'ların erime eğrileri (melt curve) değerleri ve eşik değerleri (Ct) dikkate alınarak ve kontrollerin değerleri ile kıyaslanarak Cmm pozitif ve negatif örnekler belirlenmiştir (Bkz. EK-1).

3.2.5. Uçucu yağ film kaplamanın hazır fide üretim koşullarında bazı tohum ve fide kalite parametrelerine etkisinin belirlenmesi (Deneme 5)

Uçucu yağ film kaplamanın hazır fide üretim serasında bazı tohum ve fide kalite parametrelerine etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare*, *R. officinalis* uçucu yağlarının 500, 1000 ve 5000 ppm dozları ile Cmm açısından temiz domates tohumları film kaplanmıştır. Bu tohumlar hazır fide üretim koşullarında yetiştirilerek, analiz yöntemleri bölümünde belirtildiği gibi, fidelik koşullarında kaplanan tohumların çıkış oranı (%), ortalama çıkış zamanına (gün), uygulamaların anormal fide oluşumuna, fide kalitesine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla deneme hazır fide üretim serasında, 3 tekerrürlü olarak, tesadüf blokları faktöriyel deneme deseninde kurulmuş, her bir uygulamanın her bir tekerrüründe 50 adet domates tohumu kullanılmıştır. Bakır sülfat, steril saf su ve işlem görmemiş orjinal temiz domates tohumları kontrol uygulamalar olarak değerlendirilmiştir. Daha sonra 30-45 günlük ve 3-5 yapraklı dönemdeki fideler laboratuvara getirilerek, fide yaş ve kuru ağırlıkları alınarak, değerler kaydedilmiştir. Günlük olarak çıkış yapan tohumlar üzerinden çıkış oranı (%) belirlenmiştir. Çıkış yapan tohum sayıları (adet), ortalama çıkış zamanı (gün), fide yaş ağırlığı (g) ve fide kuru ağırlığı (g) verileri üzerinden varyans analizi yapılmış, ortalamalar arası farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre gruplandırılmıştır.

3.2.6. Uçucu yağ film kaplamanın depolama sonrası Cmm ve tohum kalitesine etkisinin belirlenmesi (Deneme 6)

Uçucu yağlar esasen oda koşullarında özellikle açıkta bırakıldıklarında buharlaştıklarından (uçucu formda olduklarından) film kaplama ile domates tohumuna yüklendiklerinde tohum üzerinde ne kadar süre ile tutulabildikleri merak konusu olmuştur. Bu nedenle, uçucu yağ film kaplanan Cmm ile bulaşık domates tohumlarının çıkış oranı (%), temiz tohum oranı (%) ve tohumda bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum) değerlerinde kısa süreli depolamanın (15-90 gün süre ile +4°C'de) bir değişime neden olup olmadığı araştırılmıştır. Deneme 6 ile ticari uçucu yağların polimer vasıtasıyla domates tohumlarına yüklenerek yapılan film kaplamanın hazır fide üretiminde uygulamaya aktarılıp aktarılamayacağı belirlenmeye çalışılmıştır.

L. stoechas, *O. onites*, *O. vulgare*, *R. officinalis* uçucu yağları (250, 500, 1000 ve 5000 ppm) ile bulaşık domates tohumları film kaplanmıştır. Film kaplanan domates tohumları kaplama sonrası oda koşullarında kurutulmuşlar ve tohum nem içerikleri %8-10'a ayarlanmıştır. Tohumlar şeffaf küçük şişelere bırakılarak ağızları kapatılmış ve her bir uygulamaya özgü farklı bir tohum paketi içerisinde +4 °C'de depolanmıştır. Farklı sürelerde (15, 30 ve 90 gün depolama) depolanan domates tohumlarında analiz

yöntemlerinde belirtildiği gibi temiz tohum oranı (%), tohumda bakteri (log CFU/tohum) ve çıkış oranı (%) belirlenmiştir. Bu değerler üzerinden varyans analizi yapılmıştır. Depolama yapılmayan ve farklı sürelerde depolamanın temiz tohum oranı (%), tohumda bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum) ve çıkış oranı (%) üzerine etkilerinin önemli olup olmadığı istatistiksel olarak test edilmiştir.

3.2.7. Analiz yöntemleri

3.2.7.1. Tohum örneklerinin hazırlanması

Denemelerde kullanılan tohumların Cmm açısından temiz olması gerektiğinden tohumların Cmm açısından temiz olup olmadığı belirlenmiştir. Tohumların sağlık testleri ISF (2010 ve 2014) ve GSPP (2010) referans protokolleri modifiye edilerek yapılmıştır (Bkz. EK-1). Yapılan tohum sağlık testleri sonucunda Rio Grande domates çeşidine ait tohum örneklerinde Cmm bulaşıklığı tespit edilmemiş ve tohumların Cmm açısından temiz olduğu saptanmıştır.

Domates tohum paketi içerisinde hassas terazide 500 gramlık tohum örneği tartılmış ve steril cam kavanoz içerisinde +4 °C’de muhafazaya alınmıştır (işlem görmemiş stok tohum). Geri kalan domates tohumlarına 500 g’lık partiler halinde yüzey sterilizasyonu yapılmıştır; tohumlar önce %70’lik etil alkolde 5-10 dakika hızlı bir şekilde çalkalanmıştır. Steril saf su ile 1-2 kez yıkanan tohumlar %5’lik sodyum hipoklorit solüsyonu içerisinde 10 dakika çalkalanmış, 4-5 kez steril saf su ile yıkanmış, steril filtre kağıtları (Whatman no:44) arasında, oda koşullarında 24-48 saat süreyle kurutulmuştur (Xu 2010).

Yüzey sterilizasyonu yapılan ve kurutulan (tohum nem içeriği %8-10’a düşürülen) 500 g tohum örneği steril cam kavanoz içerisinde muhafaza edilerek (+4 °C’de) denemelerde temiz tohum olarak kullanılmıştır.

Yüzey sterilizasyonu yapılan ve kurutulan domates tohumlarına yaklaşık 1500 g’lık partiler halinde Cmm yapay inokulasyon ile bulaştırılmıştır; NA besi yerinde Cmm 3/1A izolatu geliştirilmiş, saf su ile seyreltilerek 630 nm de 0,2 değerine (Elisa okuyucu) ayarlanarak 10^8 CFU/ml yoğunluğunda 1000 ml’lik bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonu içerisine bırakılan tohumlar bir saat süre ile orbital çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Cmm’nin embriyoya geçmesi için çalkalama işlemi sırasında 10’ar dakika aralıklar ile vakum (8 psi basınçta) uygulanmıştır. Kuruyan tohumlar steril cam kavanozlara konulmuş ve kapakları kapatılan kavanozların ağzına bulaşmayı önlemek amacı ile parafilm çekilmiştir. Cmm ile bulaşık tohum örnekleri de +4°C’de muhafazaya alınmıştır (Xu 2010).

3.2.7.2. Cmm izolatlarının tanılanması

KOH testi: Cmm izolatlarına ait saf kültürler $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ’de 48 saat süre ile geliştirilmiştir. Öze ile alınan saf koloniler, lam üzerinde 1-2 damla KOH (%3) solüsyonuna dairesel hareketler ile batırılmıştır. Öze ucu yukarı kaldırıldığında viskoz, yapışkanimsi bir sünme oluşmaz ise (gram +) Cmm, oluşur ise (gram -) Cmm değil

olarak tanımlanmıştır. Negatif kontrol olarak *Xanthomonas vesicatoria* izolatı kullanılmıştır (Çetinkaya Yıldız 2007).

Yarı seçici besiyerinde gelişim: SCM besi yerine Cmm izolatları çizilmiş, $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 48-72 saat süre ile gelişime bırakılmıştır. Koyu gri etrafı açık renk haleli koloniler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Fatmi ve Schaad 1988).

Virülenslik testi: Cmm izolatlarının NA besiyerinde saf taze kültürleri geliştirilmiştir. Besi yeri üzerinden Cmm kolonileri toplanmış ve steril saf su ile seyreltilmiştir. Spektrofotometride 600 nm 'de 0.2 değerine ayarlanarak, yaklaşık 1.1×10^8 CFU/ml yoğunlukta bakteri süspansiyonu elde edilmiştir. Bu süspansiyon kontrollü koşullarında (16 saat ışık, 8 saat karanlık, $28 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık, %70-80 nisbi nem) 3-5 yapraklı domates fidelerinin gövdelerine şırınga ile inoküle edilmiştir. Kalan inokulum sprey şeklinde fidelere püskürtülmüş ve üzerleri delikli poşetler ile kapatılmıştır. Bir veya iki gün içerisinde delikli poşetler çıkarılmıştır. Yedi veya on gün sonrasında fidelere görülen hastalık belirtilerine (Şekil 3.2b) göre değerlendirme yapılarak izolatların virülensliği belirlenmiştir (Baysal vd 2003, Çetinkaya-Yıldız 2007).

3.2.7.3. Agar kuyu difüzyon metodu

Antibakteriyel etki denemelerinde, uçucu yağların inhibisyon zonlarının belirlenmesinde agar kuyu difüzyon metodu kullanılmıştır. Denemelerde NA besi yeri kullanılmış, besi yeri içerisine 10^8 CFU/ml yoğunlukta Cmm süspansiyonundan %1 oranında ilave edilmiştir. Bir gün sonrasında katılaşmış ve içerisinde Cmm bulunan besi yerlerinin ortası 5 mm çapındaki mantar delici ile delinmiş, açılan kuyudaki besi ortamı boşaltılmıştır. Kuyucukların dip kısımları önceden steril edilip 45°C 'ye kadar soğutulmuş NA besi yerinden yaklaşık 20-25 µl damlatılarak kapatılmıştır. Açılan kuyucuklara dışarıya taşmayacak şekilde yaklaşık 20 µl uygulamalar ile kontroller damlatılmıştır. Petriler $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır. İki ile dört gün sonrasında kuyucukların etrafında Cmm gelişmeyen alanın (inhibisyon zonu) çapı (zon çapı) mm olarak ölçülmüş, değerler kaydedilmiştir (Altundağ 2007).

Deneme 1'de (ekonomik olarak uygulanabilirliği ve önceki araştırma bulgularına dayanarak) antibakteriyel etki denemelerinde 20 adet uçucu yağın 500 ve 1000 ppm dozlarının Cmm'ye karşı oluşturdukları inhibisyon zonları bu teknikle belirlenmiştir. Pozitif kontrol 1 (Streptomisin sülfat) pozitif kontrol 2 (bakır sülfat, nanobakır 250 cc/100 l su) ve negatif kontrol (steril saf su) kontrol uygulamalar olarak değerlendirilmiştir. Deneme tesadüf paselleri deneme deseni faktöriyel düzende 4 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Her bir petri bir tekerrür kabul edilmiştir. Cmm gelişimine olanak vermeyen inhibisyon zonları mm olarak ölçülmüştür. İnhibisyon zonları (mm) üzerinden yapılan varyans analizine göre uçucu yağ ve dozların Cmm üzerine istatistiki olarak önemli bir etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre gruptandırılmıştır. İnhibisyon zonları üzerinden Soylu vd (2005) göre inhibisyon zon artışı (%) hesaplanmıştır;

$$\text{İnhibisyon zon artışı (\%)} = 100 - [(\text{Kontrol zon çapı} / \text{uygulama zon çapı}) \times 100] \quad (3.2.1)$$

Deneme 4'te *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının 5 farklı dozu (250, 500, 1000, 5000 ppm ve saf doz) ile film kaplı tohumların etrafında Cmm'ye karşı oluşan inhibisyon zonlarının belirlenmesinde bu teknik modifiye edilerek uygulanmıştır. NA besi yeri ortasına kuyucuk açılmamış, direkt film kaplı tohumlar bırakılmış ve tohumlar etrafında Cmm gelişmeyen alan (inhibisyon zonu) yukarıdaki gibi belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak bakır sülfat (nanobakır 250 cc/ 100 l su) ve negatif kontrol olarak steril saf su kullanılmıştır. Denemeler tesadüf parselleri deneme deseninde faktöriyel düzende 4 tekrarlı olarak kurulmuş, inhibisyon zonları üzerinden varyans analizi yapılmış ve ortalamalar arası farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre gruplandırılmıştır.

3.2.7.4. Mikro kuyu dilüsyon metodu

Deneme 1'de 10 adet uçucu yağın MIC değerleri (Minunum inhibisyon konsantrasyonu) bu yöntemle belirlenmiştir. Cmm'nin steril saf su içinde süspansiyonu hazırlanmış ve yoğunluğu elisa okuyucuda 10^8 CFU/ml (630 nm'de 0,2 değeri) olacak şekilde ayarlanmıştır. MIC denemelerinde elisa mikro küvetler (Linbro=96 kuyulu) ve sıvı NB besi ortamı kullanılmıştır. Soğutulmuş 100 ml NB besi yeri içerisine Cmm solusyonundan 5 ml (sıvı besi yerinin %5'i kadar Cmm kolonisi) ilave edilmiştir. Bu süspansiyon homojen karışım ve dağılım sağlanması amacı ile orbital çalkalayıcıda yaklaşık 800 rpm de 30 dakika çalkalanmıştır. Sonra bu karışımdan yaklaşık 100'er µl alınarak her bir elisa kuyucuğuna konulmuştur. Elisa mikro küvetlerdeki kuyucuklar yukarıdan aşağıya doğru uygulamalar ve soldan sağa ise uygulama dozları gelecek şekilde etiketlenmiştir. Her bir uygulamanın en yüksek dozundan başlayarak en düşük doza kadar sırası 100'er µl alınarak kuyucuklara sırası ile ilave edilmiştir. Ardından elisa mikro küvetler okuyucuda 630 nm'de okutulmuş, ilk değerler kaydedilmiştir. Sonra streç film ile kapatılan elisa mikro küvetler orbital çalkalayıcıda yaklaşık 800 rpm'de 2-4 saat çalkalanmıştır. Ardından inkübatöründe 28 ± 2 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan 24-48 saat sonrasında mikro küvetler elisa okuyucuda tekrar okutularak son değerler kaydedilmiştir. Cmm kolonisi gelişmeyen uygulama dozu o yağ için MIC değeri olarak hesaplanmıştır. Denemede her bir uçucu yağın 2, 4, 8, 15, 31, 62.5, 125, 200, 250, 300, 400 ve 500 ppm'lik dozları, 500 ppm'lik stok solüsyonlarından %10'luk DMSO kullanılarak hazırlanmıştır. Denemelerde pozitif kontrol 1 olarak streptomisin sülfat (7.8 ppm, Sigma), pozitif kontrol 2 olarak bakır sülfat (nanobakır, 250 cc/100 l su) ve negatif kontrol olarak steril saf su kullanılmıştır. Denemeler her bir elisa plate bir tekerrür ve her bir doz uygulaması için 3 tekrar olacak şekilde tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş, deneme 3 ayrı dönemde tekrar edilmiştir (Altundağ 2007).

3.2.7.5. Uçucu yağ tohum uygulaması

Her bir uçucu yağ uygulaması için Cmm ile bulaşık yaklaşık 0.25'er g domates tohumu kullanılmıştır. Uçucu yağ dozlarından mikropipet aracılığı ile yaklaşık 500 µl alınmış ve içerisinde domates tohum örneği bulunan ependorf tüplerine aktarılmıştır. Bu tüpler 13 000 rpm'de 25 dakika santrifuj edilmiştir. Uçucu yağların domates tohumlarına uygulanmasında kullanılan bu yöntem Xu'dan (2010) modifiye edilmiştir. Deneme 2'de 10 adet uçucu yağın (*O. vulgare*, *O. onites*, *C. zeylanicum*, *L. stoechas*, *R.*

officinalis, *M. piperita*, *R. damascena*, *M. rucutita*, *M. communis* ve *L. angustifolia*) 1000 ppm dozu domates tohumuna bu şekilde uygulanmıştır. Aynı şekilde Deneme 3'te 4 adet uçucu yağın (*O. onites*, *O. vulgare*, *L. stoechas* ve *R. officinalis*) farklı dozları ile (125, 200, 250, 300, 400, 500, 1000 ve 5000 ppm) tohum uygulaması bu yöntemle yapılmıştır.

3.2.7.6. Film kaplama

Film kaplamada kullanılan polimerin (Discoshine L88 Blue) önerilen su ile karışım oranı %60 polimer ve %40 sudur. Aynı polimerle daha önce soğan tohumlarında film kaplamada her 1 kg tohum için: 96 g polimer + 64 g su kullanıldığı görülmüştür (Kavak 2006). Uçucu yağların en uygun şekilde film kaplanabilmesi ve uygun polimer+su+tohum, polimer+uçucu yağ+tohum formülasyonu için ön denemeler yapılmıştır. Burada farklı karışım oranlarının (%30-70, %40-60, %50-50, %60-40, %70-30 polimer-su veya polimer- uçucu yağ) formülasyonları ile domates tohumları film kaplanmış ve sterio mikroskop altında homojen bir kaplama yapıp yapılmadığı test edilmiştir. Buna göre (%60-40 polimer-su veya polimer- uçucu yağ) oranı en ideal kaplamayı vermiştir. Kaplama sırasında polimer + su karışımında %40'lık su yerine hazırlanan uçucu yağ dozları kullanılmıştır. Her uygulama için yaklaşık 400 g domates tohumu kaplanmıştır (Şekil 3.3a).

Her bir uygulama için toplam kaplanacak tohum miktarı kaplama haznesi içerisine bırakılmıştır. Daha sonra %60 polimer ve %40 uçucu yağ olacak şekilde polimer + uçucu yağ karışımları hazırlanmıştır. Her 1 kg tohum için: 96 g polimer + 64 g su baz alınarak, kullanılan tohum miktarına göre gerekli polimer+uçucu yağ solüsyonun miktarı ayarlanmıştır. Cihazın çalıştırılması ile birlikte (yaklaşık 800 rpm ve üstü, 2. programda) steril şırınga vasıtası ile polimer + uçucu yağ solüsyonu tohumlara uygulanmıştır. Homojen bir kaplama işlemi gerçekleşinceye kadar devam edilmiştir. Daha sonra kaplanan her bir uygulamaya ait tohumlar kendi kabı içerisinde 24 - 48 saat süre ile oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır. Tohumlarda nem tayini yapılmış (Tohum nem tayin cihazı, Radwag Şekil 3.3b) ve yaklaşık tohumdaki nem oranı %8-10'a ayarlanarak kaplama işlemi sonlandırılmıştır. Bu yöntem Kavak (2006)'dan modifiye edilerek uygulanmıştır. Deneme 4 ve Deneme 6'da Cmm ile bulaşık domates tohumlarının ve Deneme 5'te Cmm açısından temiz tohumların film kaplanması bu yöntemle yapılmıştır.



Şekil 3.3. Film kaplama makinası ve tohum nem tayin cihazı

- a) Film kaplama makinası
- b) Tohum nem tayin cihazı (Radwag)

3.2.7.7. Standart çimlendirme testi

Domates tohumları 40x40 ebatlarında, nemli steril filtre kağıtları arasına ekilmiştir. Mantari bulaşmayı engellemek için %0.2'lik thiram %80 WP etken maddeli ilaç sulama suyuyla birlikte verilmiş, rulo yapılmış, 25 ± 2 °C'de 14 gün süre ile çimlenmeye bırakılmıştır. Kökçük uzunluğu 2 mm olan tohumlar çimlenmiş kabul edilerek sayılmıştır. Test sonunda normal, anormal ve çimlenmeyen tohumlar, günlük sayımlardan ortalama çimlenme zamanı belirlenmiştir (ISTA 1999).

$$\text{Çimlenme oranı (\%)} = \frac{1. \text{ gün çimlenen tohum sayısı} + 2. \text{ gün çimlenen tohum sayısı} + 14. \text{ gün çimlenen tohum sayısı}}{\text{Toplam tohum sayısı}} \times 100 \quad (3.2.2)$$

$$\text{Çimlenme zamanı (gün)} = \frac{\sum(\text{Sayımın yapıldığı gün} \times \text{sayımın yapıldığı gün çimlenen tohum sayısı})}{\text{Test sonunda toplam çimlenen tohum sayısı}} \quad (3.2.3)$$

Domates tohumunun başlangıç çimlenme oranının belirlenmesinde bu yöntemle her bir tekerrürde 100 tohum olmak üzere toplamda 4 x 400 tohum üzerinden çimlenme oranı belirlenmiştir.

Deneme 3 ve Deneme 4'te çimlendirme testleri kağıt arasında ve plastik kapaklı dondurma kaplarında yapılmış ve her bir tekerrürde 50 tohum olmak üzere toplamda 4 x 50 tohum üzerinden çimlenme oranı belirlenmiştir.

3.2.7.8. Çıkış testi

Deneme 3, Deneme 4 ve Deneme 6'da her bir tekerrürde 25 adet tohum olmak üzere toplamda 4 x 25 tohum üzerinden çıkış oranı belirlenmiştir. Burada çıkış testleri önce inkübatörde steril fide yetiştirme harcında (1:1:1, toprak: torf: perlit) 216'lık strafor ve siyah viyollerde kurulmuştur. İnkübatörde 25 ± 2 °C'de çimlenmeye bırakılmıştır. Nem durumları kontrol edilerek, günlük olarak çıkış kontrolleri ve sayımlar yapılmıştır. Yedinci günden itibaren viyoller inkübatörden kontrollü sera koşullarına alınmış ve deneme sonuna kadar burada tutulmuştur. Standart çimlendirme testinde olduğu gibi, günlük sayılan çıkış değerleri kullanılarak test sonunda çıkış oranı ve ortalama çıkış zamanları belirlenmiştir.

Deneme 5'te ise her bir tekerrürde 50 tohum olmak üzere toplamda 3 x 50 tohum üzerinden çıkış oranı belirlenmiştir. Çıkış testleri tamamen hazır fide üretim koşullarında 216'lık viyollerde kurulmuştur. Yetiştirme ortamı olarak yine 1: 1: 1, toprak: torf: perlit kullanılmış üzerine kapak olarak pomza taşı örtülmüştür. Üçüncü günden itibaren ilk sayımlar yapılmış, 21. günde sayıma son verilerek çıkış oranları ve ortalama çıkış zamanları belirlenmiştir.

3.2.7.9. TTC testi

Uçucu yağ uygulaması görmüş tohumlarda, TTC testi için ependorf tüpleri içerisinde yağ tabakası boşaltılmış, %70'lik alkolle hızlıca yıkanmış, daha sonrasında

steril saf su ile tohumlar 1-2 kez yıkanarak TTC testi için hazır hale getirilmiştir. Tohumlar yaklaşık 18 saat süre ile nemli kağıt arasında bekletilmiştir. Sonrasında tohumlarda kökçüğün ters tarafındaki karın bölgesinden enine bir kesim yapılmıştır. Her bir uygulamanın tohumları tekrar ependorf tüplerine bırakılmış, her bir uygulama için her bir ependorf tüpünün içerisine yaklaşık 600 µl %1'lik TTC solüsyonundan ilave edilmiştir. Ependorf tüplerinin etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak, 18 saat süre ile $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki inkübatörde bekletilmiştir. TTC solüsyonundan çıkarılan tohumlarda, tek tek embriyolar çıkarılmış ve dokuların boyanma durumlarına göre değerlendirme yapılmış, ortalamalar alınarak, değerler kaydedilmiştir (ISTA 1985). Bu yöntem Deneme 3'te 4 adet uçucu yağın (*O. onites*, *O. vulgare*, *L. stoechas* ve *R. officinalis*) 1000 ppm dozunun domates tohumunda fitotoksite oluşturup oluşturmadığını belirlemek için kullanılmıştır.

3.2.7.10. Temiz tohum oranı

Uygulama görmüş tohumlar içerisinde NA besi yeri bulunan petrilere her petriye 25 tohum gelecek şekilde steril koşullarda bırakılmıştır. Parafilm ile kapatılan petrilere $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan 48-72 saat sonrasında her bir uygulamadaki her bir tohum tek tek gözlenmiştir. Etrafında Cmm koloni gelişimi görülen tohumlar tek tek sayılmış, her bir uygulamanın her bir tekrarı için 100 adet tohum üzerinden veriler hesaplanmıştır (Şekil 3.4).

Deneme 2'de uçucu yağların 1000 ppm'lik tek bir dozunun temiz tohum oranı bu yöntemle tesadüf parselleri deneme deseninde, inkübasyondan 48 ve 72 saat sonrasında iki ayrı dönemde alınan gözlemlerle belirlenmiştir. Deneme 3, Deneme 4 ve Deneme 6'da ise deneme tesadüf parselleri faktöriyel düzende 4 farklı uçucu yağın 4 farklı dozu ile kurulmuş ve temiz tohum oranları bu yöntemle belirlenmiştir. Temiz tohum sayıları üzerinden varyans analizi yapılmış ve ortalamalar arası farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre gruplandırılmıştır. Bulaşık tohum sayısı üzerinden Abbott formülüne göre % etki değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 3.4. Steril saf su (negatif kontrol) uygulamasında tohumların etrafında Cmm gelişiminin görüntüsü

3.2.7.11. Log CFU/tohum değerinin hesaplanması

Uygulama görmüş domates tohumları (4 x100 adet tohum) her tüpe 100 adet tohum gelecek şekilde eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Tüpler içerisine önce 500 µl %70'lik etil alkol eklenerek, hızlıca vortekslenmiş ve sıvı kısım boşaltılmıştır. 1-2 kez steril saf su ile yıkanarak alkol ve yağ tabakası tohumlardan uzaklaştırılmıştır. Tüplerin içerisine 500 µl steril fosfat buffer+tween 20 bırakılmış ve 1 gece +4 °C'de bekletilmiştir. Tohum ekstrakt solüsyonundan 500 µl santrifuj tüplerine bırakılmış ve 1 dakika 1000 rpm santrifuj edilmiştir. Üst kısım yeni bir santrifuj tüpüne alınmış, 20 dakika 9000 rpm'de +4 °C'de santrifuj edilmiştir. Her bir uygulamanın ekstraksiyonundan 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} seyreltme yapılmıştır. 10^{-6} dilüsyonundan 100 µl alınarak, katı NA besisi yerine steril baget yardımı ile yayılmıştır. Sonra petri 28±2 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her bir petride gelişen Cmm kolonileri tek tek sayılarak değerler kaydedilmiştir. Üç tekerrürün ortalaması alınarak, 10^{-6} dilüsyon serisindeki ortalama Cmm koloni sayısı belirlenmiştir. Aşağıda belirtilen formül yardımı ile seyreltme yapılmayan orijinal tohum ekstraksiyon solüsyonundaki Cmm koloni sayısı (CFU/100 tohum) belirlenmiştir. Elde edilen değerler 100'e bölünerek, tohum ekstraksiyon solüsyonundaki tek domates tohumuna düşen ortalama Cmm koloni sayısı (CFU/tohum) belirlenmiştir (Şekil 3.5a). Bu değerlerin logaritması alınarak (log CFU/tohum) veriler analiz edilmiştir. Bu yöntem Xu'dan (2010) modifiye edilerek uygulanmıştır. Deneme 3, Deneme 4 ve Deneme 5'te bu yöntemle log CFU/tohum değerleri hesaplanmıştır. Log CFU/tohum değerleri üzerinden varyans analizi yapılmış ve ortalamalar arası farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre gruplandırılmıştır. Log CFU/tohum değerleri üzerinden Abbott formülüne göre % etki değerleri hesaplanmıştır.

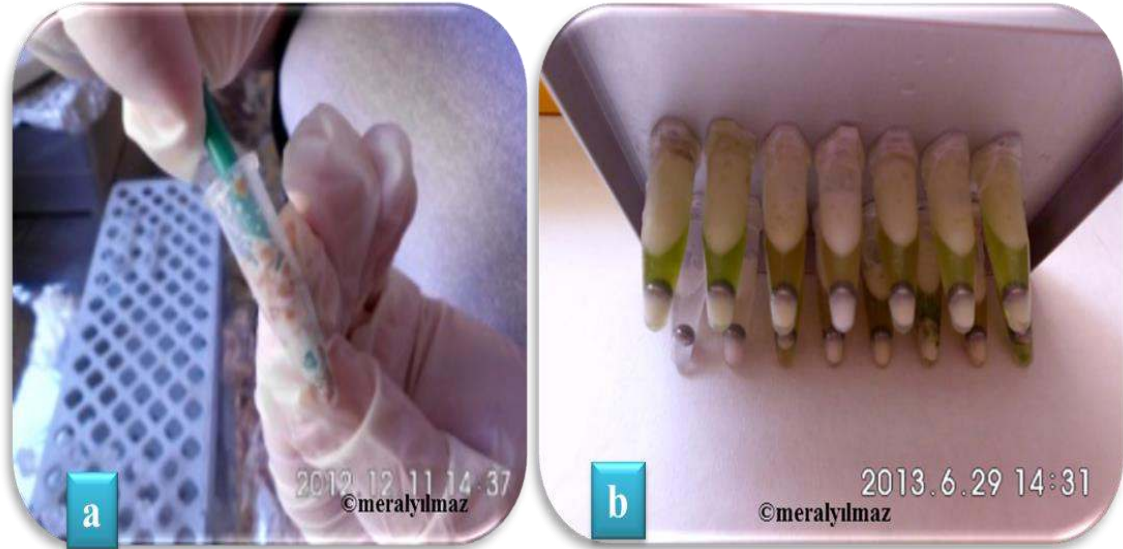
$$N=(1/V) \times A \times D \quad (3.2.4)$$

N=Orijinal süspansiyondaki Cmm koloni sayısı, V=Petri kutularına ekilen inokulum miktarı (ml), A=Ortalama Cmm koloni sayısı, D=Dilüsyonun ters logaritması (örn. 10^{-8} > 10^8).

3.2.7.12. Log CFU/fide değerinin hesaplanması

Fide çıkış testleri için kurulan denemelerde, fidelerde ilk gerçek yapraklar çıkınca, her bir uygulamadan 25'er adet fidenin kotiledon yaprakları steril koşullar altında toplanmıştır. Daha sonrasında, bu kotiledonlar eppendorf tüpler içerisinde yaklaşık 400 µl steril fosfat buffer (Tween 20'li) ilave edilerek, Tissue Lyser (Qiagen) aracılığı ile parçalanmıştır. Ezilen kotiledon doku parçaları bulunan solüsyon, steril bez parçaları ile süzölmüştür. Atıklarından temizlenen tohum ekstraksiyon solüsyonu, steril fosfat buffer (Tween 20'li) ile 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} seri dilüsyonlar yapılmıştır. Sonrasında, 10^{-6} dilüsyonundan yaklaşık 100 µl alınarak, SCM besisi yerine steril baget yardımı ile yayılmıştır. Daha sonra, 28± 2 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her bir petride gelişen Cmm kolonileri tek tek sayılarak değerler kaydedilmiştir. Üç tekerrürün de ortalaması alınarak, 10^{-6} dilüsyon serisindeki ortalama Cmm koloni sayısı belirlenmiştir. Bölüm 3.2.7.11'da belirtilen 3.2.4 nolu formül yardımı ile seyreltme yapılmayan orijinal fide ekstraksiyon solüsyonundaki Cmm koloni sayısı (CFU/25 fide) belirlenmiştir. Daha sonra elde edilen değerler 25'e bölünerek, fide

ekstraksiyon solüsyonundaki tek domates fidesindeki ortalama Cmm koloni sayısı (CFU/fide) saptanmıştır. Bu değerlerin logaritması (log CFU/fide) alınmış ve veriler analiz edilmiştir. Bu yöntem Xu'dan (2010)'dan modifiye edilerek uygulanmıştır. Deneme 4'te bu yöntemle log CFU/tohum değerleri hesaplanmıştır. Log CFU/tohum değerleri üzerinden varyans analizi yapılmış ve ortalamalar arası farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre gruplandırılmıştır. Log CFU/tohum değerleri üzerinden Abbott formülüne göre % etki değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 3.5. Uçucu yağ uygulaması sonrası tohum ekstraksiyonu için tohumların ve fidelerin ezilmesi
a) Tohumların elle ezilmesi
b) Fidelerin doku parçalayıcı ile ezilmesi (Qiagen Tissue Lyser)

3.2.7.13. Uçucu yağların içerik analizleri

Tohum uygulamasında etkili olduğu tespit edilen (Deneme 3) ve tohum film kaplama çalışmalarında kullanılması planlanan *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının BATEM Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Laboratuvarında Gaz kromatografi kütle spektrometresi (GC-MS) ile içerik analizi yapılmıştır. Her bir yağın içerisinde bulunan ana bileşenler % olarak belirlenmiştir; Örnekler analiz edilmek üzere 1:50 oranında aseton ile seyreltilmiştir. Örneklerin uçucu yağ bileşen analizi Gaz kromatografi (Agilent 7890A)-kütle detektör (Agilent 5975C) cihazı ile kapiler kolon (HP InnowaxCapillary;60.0 x 0.25 mm x0.25 µm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizde taşıyıcı gaz olarak 0,8 ml/dk akış hızında helyum kullanılmış, örnekler cihaza 1µl olarak 50:1 oranı ile enjekte edilmiştir. Enjektör sıcaklığı 250°C'de tutulmuş, kolon sıcaklık programı 60°C (10 dakika), 60°C'den 220°C'ye 4°C/dakika ve 220°C (10 dakika) olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu sıcaklık programı doğrultusunda toplam analiz süresi 60 dakika olmuştur. Kütle detektörü için tarama aralığı (m/z) 35-450 atomik kütle ünitesi ve elektron bombardımanı iyonizasyonu 70 eV kullanılmıştır, uçucu yağın bileşenlerinin teşhisinde ise WILEY ve OIL ADAMS kütüphanelerinin verileri esas alınmıştır (Zhao vd 2005).

3.2.7.14. İstatiksel Analiz

In vitro denemeler tesadüf parselleri faktöriyel deneme düzeninde 3 ve 4 tekerrürlü kurulmuştur. *In vivo* denemeler ise tesadüf blokları faktöriyel deneme deseninde 3 veya 4 tekerrürlü kurulmuştur. Tüm veriler [SAS (r) Proprietary Software Version 7 (TS P1)] kullanılarak varyans analizine tabii tutulmuş, ortalamalar üzerinden Duncan's Multiple Range Test, $P \leq 0.01$ 'e göre gruplandırmalar yapılmıştır. Ayrıca uçucu yağ film kaplama uygulamasının uçucu yağlar ve dozlara bağlı olarak bulaşık domates tohumundaki Cmm ve çimlenme oranı (%) üzerine etkileri regresyon modelleri hesaplanmış ve değerler EK-2'de verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Antibakteriyel etki gösteren uçucu yağları belirlemeye yönelik bulgular (Deneme 1)

Araştırmada aynı firmadan 2 farklı zamanda temin edilen ikişer farklı *R. officinalis* ve *S. officinalis*, biri tohum diğeri yapraktan çıkarılan iki farklı *L. nobilis* uçucu yağı olmak üzere toplamda 20 adet ticari uçucu yağ kullanılmıştır. Toplamda 20 adet ticari uçucu yağ içerisinde en yüksek antibakteriyel etki gösterenlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Uçucu yağların agar kuyu difüzyon yöntemine göre inhibisyon zonları (mm) ve bunlar üzerinden antibakteriyel etki (%) değerleri belirlenmiştir. Yüksek antibakteriyel etki (%) gösteren uçucu yağların ise mikro kuyu dilüsyon yöntemine göre minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC) belirlenmiştir. Yüksek antibakteriyel etki (%) gösteren ve düşük MIC değerine sahip uçucu yağlar araştırmanın diğer basamaklarında kullanılmıştır.

4.1.1. Uçucu yağların inhibisyon zonları ve antibakteriyel etkileri

Her bir petrinin bir tekerrür kabul edildiği ve 4 tekerrürlü olarak kurulan agar kuyu difüzyon denemesinde, petri içerisinde kuyucuk etrafında Cmm'nin gelişmediği dairenin çapı mm olarak ölçülmüş ve tekerrürlerin aritmetik ortalaması alınarak inhibisyon zonları (mm) elde edilmiştir. İnhibisyon zon (mm) ortalamaları üzerinden yapılan varyans analizi ve Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ortalamalar gruplandırılmıştır. Yağ x doz interaksyonunun, uçucu yağların ve dozların inhibisyon zonu üzerine etkileri $P \leq 0.01$ olasılık düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1'de belirtildiği gibi uçucu yağ x doz interaksyonunda *O. vulgare*'in 1000 ppm uygulaması 50 mm inhibisyon zonu ile en yüksek değeri vermiştir. İnhibisyon zonları (mm) üzerinden hesaplanan antibakteriyel etki (%) yönünden ise, %87 ile *O. vulgare* ve %86 ile *O. onites* en yüksek değeri verirken, bunları sırasıyla *C. zeylanicum*, *L. stoechas* ve *R. officinalis*'in izlediği ve *L. nobilis* (tohum) ve *J. Communis*'in ise en düşük değeri verdiği saptanmıştır.

Genel olarak değerlendirildiğinde uçucu yağlar içerisinde origanum türlerinin Cmm'ye karşı en yüksek inhibisyon zonu oluşturduğu ve yüksek antibakteriyel etki gösterdiği görülmüştür. Uygulanan iki farklı dozdan, yüksek doz olan 1000 ppm'in düşük doza göre bütün uçucu yağlarda daha yüksek inhibisyon zonu oluşturduğu saptanmıştır. Bazı uçucu yağların [*J. communis* ve *L. nobilis* (tohum)] 500 ppm'de inhibisyon zonu oluşturmadığı gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1).

Bitki hastalık ve zararlıları ile mücadelede önerilen ilacın %50 üzerinde etki göstermesi istenmektedir. Uçucu yağların Cmm'ye karşı oluşturdukları inhibisyon zonu ve antibakteriyel etkilerine ilişkin bulgular, %65 üzeri etki gösteren *O. vulgare*, *O. onites*, *C. zeylanicum*, *L. stoechas*, *R. officinalis*, *M. piperita*, *R. damascena*, *M. rucutita*, *M. communis* ve *L. angustifolia*'nın tohum uygulama ve film kaplama için üzerinde çalışılabilecek uçucu yağlar olduklarını göstermiştir.

Çizelge 4.1. Uçucu yağların Cmm'ye karşı inhibisyon zonları ve antibakteriyel etkileri

Uçucu yağlar	Dozlar (ppm)		İnhibisyon zonu (mm)	Antibakteriyel etki (%) ²
Streptomisin sülfat			10.00	50.00
Bakır sülfat			22.00	77.00
Steril saf su			5.00	0.00
DMSO			5.00	0.00
<i>C. zeylanicum</i>	500		15.00	67.00
	1000		30.00	83.00
		Ortalama	22.00	74.00
<i>F. vulgare</i>	500		11.00	55.00
	1000		16.00	69.00
		Ortalama	14.00	62.00
<i>J. Communis</i>	500		0.00	0.00
	1000		6.00	9.00
		Ortalama	3.00	5.00
<i>L. angustifolia</i>	500		11.00	55.00
	1000		20.00	75.00
		Ortalama	16.00	65.00
<i>L. nobilis</i> (yaprak)	500		13.00	62.00
	1000		20.00	75.00
		Ortalama	17.00	68.00
<i>L. stoechas</i>	500		15.00	67.00
	1000		28.00	82.00
		Ortalama	21.00	75.00
<i>L. nobilis</i> (tohum)	500		0.00	0.00
	1000		5.00	4.00
		Ortalama	3.00	2.00
<i>M. communis</i>	500		11.00	55.00
	1000		20.00	75.00
		Ortalama	16.00	65.00
<i>M. piperita</i>	500		13.00	61.00
	1000		24.00	79.00
		Ortalama	18.00	70.00
<i>M. rucutita</i>	500		12.00	57.00
	1.000		24.00	79.00
		Ortalama	18.00	68.00
<i>M. spicata</i>	500		12.00	57.00
	1000		18.00	72.00
		Ortalama	15.00	65.00
<i>O. basilicum</i>	500		12.00	57.00
	1000		19.00	74.00
		Ortalama	15.00	65.00
<i>O. onites</i>	500		23.00	78.00
	1000		48.00	90.00
		Ortalama	35.00	86.00
<i>O. vulgare</i>	500		24.00	79.00
	1000		50.00	95.00
		Ortalama	37.00	87.00
<i>Pinus</i> spp.	500		11.00	52.00
	1000		11.00	52.00
		Ortalama	11.00	52.00
<i>R. officinalis</i> ^a	500		12.00	58.00
	1000		18.00	72.00
		Ortalama	15.00	65.00
<i>R. officinalis</i> ^b	500		14.00	65.00
	1000		26.00	81.00
		Ortalama	20.00	73.00
<i>R. damascena</i>	500		12.00	58.00
	1000		24.00	79.00
		Ortalama	18.00	69.00
<i>S. officinalis</i> ^a	500		12.00	57.00
	1000		18.00	72.00
		Ortalama	15.00	65.00
<i>S. officinalis</i> ^b	500		14.00	63.00
	1000		19.00	74.00
		Ortalama	16.00	68.00

(devamı arkada)

Çizelge 4.1.'in devamı

İnhibisyon zonu (mm)			
Uçucu yağlar	Dozlar (ppm)		Yağ ortalaması
	500	1000	
<i>C. zeylanicum</i>	15.00 H	30.00 C	22.00 c
<i>F. vulgare</i>	11.00 H	16.00 H	14.00 e
<i>J. Communis</i>	0.00 İ	6.00 I	5.00 ı
<i>L. angustifolia</i>	11.00 H	20.00 G	16.00 e
<i>L. nobilis</i> (yaprak)	13.00 H	20.00 G	17.00 e
<i>L. stoechas</i>	15.00 H	28.00 D	21.00 c
<i>L. nobilis</i> (tohum)	0.00 İ	5.00 I	5.00 ı
<i>M. communis</i>	11.00 H	20.00 G	16.00 e
<i>M. piperita</i>	13.00 H	24.00 F	18.00 c
<i>M. rucutita</i>	12.00 H	24.00 F	18.00 c
<i>M. spicata</i>	12.00 H	18.00 G	15.00 e
<i>O. basilicum</i>	12.00 H	19.00 G	15.00 e
<i>O. onites</i>	23.00 F	48.00 B	35.00 b
<i>O. vulgare</i>	24.00 F	50.00 A	37.00 a
<i>Pinus</i> spp.	11.00 H	11.00 H	11.00 f
<i>R. officinalis</i> ^b	12.00 H	18.00 G	15.00 e
<i>R. officinalis</i> ^a	14.00 H	26.00 E	20.00 c
<i>R. damascena</i>	12.00 H	24.00 F	18.00 d
<i>S. officinalis</i> ^b	12.00 H	18.00 G	15.00 e
<i>S. officinalis</i> ^a	14.00 H	19.00 G	16.00 e
Doz ortalaması	11.00 b	19.00 a	
Streptomisin sülfat	10.00 H		10.00 f
Bakır sülfat	22.00 F		22.00 c
Steril saf su ¹	5.00 I		5.00 g
DMSO	5.00 I		5.00 g

Yağ x doz interaksyonuna ait ortalamalar büyük harf, yağ ve dozların ortalamaları ise küçük harfler kullanılarak gruplandırılmıştır. Aynı sütun ve satırlarda ortalama değerlerin yanında yer alan aynı harf büyük harf veya küçük harf ile gösterilen uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan's Multiple Range Test, $P \leq 0.01$). Gruplandırmalar inhibisyon zon (mm) ortalamaları üzerinden yapılmıştır.

¹Kuyucuk açmada kullanılan mantar delicinin çapı 5 mm'dir ve bu değer negatif kontrol (steril saf su) ile aynıdır.

²Antibakteriyel etki (%) değerleri inhibisyon zon (mm) artışı olarak değerlendirilmiştir. Bu değer Soylu vd (2005)'e göre aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır; antibakteriyel etki (%) : $100 - [(Kontrolün\ inhibisyon\ zonu / Uygulamanın\ zonu) \times 100]$.

^a 2010 yılında, ^b 2009 yılında olmak üzere iki ayrı dönemde aynı firmadan temin edilen *R. officinalis* ve *S. officinalis* uçucu yağlarını gösterir.

4.1.2. Uçucu yağların minimum inhibisyon konsantrasyonları

Antibakteriyel etki denemelerinde, en yüksek etkiyi gösteren *O. vulgare*, *O. onites*, *C. zeylanicum*, *L. stoechas*, *R. officinalis*, *M. piperita*, *R. damascena*, *M. rucutita*, *M. communis* ve *L. angustifolia* uçucu yağlarının MIC değerleri belirlenmiştir. Uçucu yağların DMSO (%10) ile seyreltilmiş 2, 4, 8, 15, 31, 62.5, 125, 200, 250, 300, 400 ve 500 ppm'lik dozlarının Cmm gelişimini durdurup durdurmaması değerlendirilmiştir. İlk okuma ve son okuma değerleri arasında fark görülmeyen, Cmm gelişimini engelleyen en düşük doz belirlenmiştir. MIC değerlerinin belirlenmesi, daha sonraki çalışmalarda kullanılacak bakteriyel ve bakterisidal konsantrasyonların belirlenmesi için önemlidir. Hazırlanan elisa mikropate'ler elisa okuyucuda okutulmuş, ilk değerler alınmış ve daha sonra $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de inkübasyona tabi tutulmuştur. Inkübasyondan 48 saat sonrasında elisa plateler tekrar elisa okuyucuda okutulmuştur. Hiç Cmm gelişimi olmayan uygulamalar MIC değeri olarak kaydedilmiştir. Elisa

platelerdeki uygulamalar gözle de kontrol edilmiş ve bulanıklık görülmeyen, bakteri gelişimi olmayan uygulamalar MIC değeri olarak dikkate alınmıştır (Şekil 4.1).

Mikro dilüsyon yöntemine göre *O. onites*, *O. vulgare* ve *C. zeylanicum* 62.5 ppm ile en düşük MIC değeri verirken, bunları sırası ile 125 ppm ile *L. stoechas*, *R. damascena* ve *R. officinalis* izlemiştir. Diğer uçucu yağlar 125 ppm'den daha yüksek MIC değeri vermiştir. En yüksek MIC değeri 500 ppm ile *L. angustifolia* ve *M. communis* uçucu yağlarında tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Antibakteriyel etki gösteren uçucu yağları belirlemeye yönelik inhibisyon zonları (Çizelge 4.1) ve MIC değerleri (Çizelge 4.2), *O. vulgare*, *O. onites*, *C. zeylanicum*, *L. stoechas*, *R. officinalis*, *M. piperita*, *R. damascena*, *M. rucutita*, *M. communis* ve *L. angustifolia* bitkilerinden buhar distilasyonu ile edilen ve ticari olarak üretilen uçucu yağların Cmm'ye karşı %65 üzeri antibakteriyel etkili olduklarını göstermiştir. Toplam 20 adet uçucu yağ içerisinde bu 10 uçucu yağın Cmm'yi eradike etmek için tohum uygulamalarında ve diğer mücadele şekillerinde kullanılabileceği saptanmıştır. *O. vulgare*, *O. onites*, *C. zeylanicum*, *L. stoechas* ve *R. officinalis* yüksek inhibisyon zonu ve düşük MIC değeri vermeleri nedeni ile antibakteriyel etkisi en yüksek uçucu yağlar olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1. *O. vulgare* 'nin MIC değerlerinde Cmm gelişiminin görüntüsü

- a) 62.5 ppm'de Cmm'nin gelişmemesi, renk berrak
- b) 31 ppm'de Cmm gelişimi, renk sarımtırak

Çizelge 4.2. Uçucu yağların MIC değerleri

Uçucu yağlar	MIC değerleri (ppm)
<i>L. angustifolia</i>	500.00
<i>L. stoechas</i>	125.00
<i>M. rucutita</i>	200.00
<i>M. piperita</i>	250.00
<i>M. communis</i>	500.00
<i>O. onites</i>	62.00
<i>O. vulgare</i>	62.00
<i>R. damascena</i>	125.00
<i>R. officinalis</i>	125.00
<i>C. zeylanicum</i>	62.00
Streptomisin sülfat	7.00
Bakır sülfat	300.00
Saf su	0.00

4.2. Cmm'ye karşı tohum uygulamalarında kullanılabilecek uçucu yağların belirlenmesine yönelik bulgular (Deneme 2)

Antibakteriyel etki denemelerinde, inhibisyon zon ve MIC değerlerine göre Cmm'ye karşı en yüksek antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilen, 10 adet uçucu yağ domates tohumuna uygulanmış ve Cmm üzerine etkisi araştırılmıştır. *O. vulgare*, *O. onites*, *C. zeylanicum*, *L. stoechas*, *R. officinalis*, *M. piperita*, *R. damascena*, *M. rucutita*, *M. communis* ve *L. angustifolia*'nın 1000 ppm dozu ile tohum uygulaması yapılmıştır. Uçucu yağ uygulanan Cmm ile bulaşık tohumlar katı NA besisi yerinde gelişime bırakılmıştır. Kırk sekiz ve yetmiş iki saatlik bir inkübasyondan sonra, her bir petride tohumların etrafında Cmm gelişimi olup olmadığı kontrol edilmiştir.

İnkübasyondan sonra 48 saatlik ilk gözlem sonrası alınan verilere göre uçucu yağların domates tohumunun yüzeyinden Cmm'yi eradike etmede etkili olduğu tespit edilmiştir. Her petride 25 adet temiz tohum sayısı veren uygulamalar %100 etkili olarak belirlenmiştir. *L. stoechas*, *M. rucutita*, *M. piperita*, *M. communis*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağları uygulanan petrilere bütün tohumların etrafında Cmm gelişmediği görülmüştür. Buna göre bu uçucu yağlar her bir petride 25 adet temiz tohum sayısı vererek %100 etkili uçucu yağlar olarak belirlenmiştir. Diğer bir ifade ile bu uçucu yağlar pozitif kontrol olan bakır sülfat ile aynı değeri vermiştir. Bu yağları sırası ile %79 etki ile *C. zeylanicum* ve %49 etki ile *L. angustifolia* izlemiştir. *R. damascena* en etkisiz uçucu yağ olarak tespit edilmiştir. *R. damascena*'nin domates tohumundaki Cmm'ye karşı düşük etki göstermesi, kullanılan uçucu yağın ticari bir yağ olması ve içeriğinin seyreltilmiş olmasından kaynaklanmıştır (Çizelge 4.3).

Gözlem yapılan petrilere 48 saatlik inkübasyondan sonra imha edilmemiş ve yaklaşık toplamda 7 gün inkübasyona devam ettirilmiştir. İnkübasyondan 72 saat sonra petrilere temiz tohum sayısı (etrafında Cmm gelişimi görülmeyen tohumların sayısı) ilgili veriler tekrar alınmıştır. İkinci gözlemden, ilk 48 saatlik gözlemden alınan verilere göre %100 temiz tohum oranı (% etki) veren *M. rucutita*, *M. piperita* ve *M. communis* uygulaması görmüş tohumların bazılarının etrafında Cmm gelişimi olduğu görülmüştür. Tohumlar etrafında gelişen Cmm kolonilerinden reizolasyon yapılmış ve tanı testleri uygulanarak Cmm kolonisi oldukları doğrulanmıştır (Çizelge 4.3).

İnkübasyondan 72 saat sonrasında (3. günün sonunda) petrilere uçucu yağ uygulaması görmüş domates tohumlarında yaklaşık 2 mm'lik kökçük çıkışları görülmüştür. Bu petrilere yedinci güne kadar çimlenme ile ilgili veriler alınmış, yedinci günün sonunda çimlenen tohum sayısında bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Burada planlanmayan bu tohum çimlenmeleri dikkate alınmış ve çimlenme oranlarının kontrol petrilere göre bir miktar düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

Deneme 2'de kullanılan uçucu yağ dozu, kullanılan uçucu yağların Deneme 1'de belirlenen MIC değerleri baz alınarak, tahmini optimum bir doz olarak belirlenmiştir. Uçucu yağların MIC değerleri 62.5-500 ppm arasında değiştiğinden, 1000 ppm'lik tek dozun kullanılan uçucu yağların hepsini kapsayacağı öngörülmüştür. Elde edilen bulgular *L. angustifolia*, *L. stoechas*, *M. rucutita*, *M. piperita*, *M. communis*, *O. onites*, *O. vulgare*, *R. damascena*, *R. officinalis* ve *C. zeylanicum*'ın 1000 ppm de domates tohumundaki Cmm'ye karşı etkili olduğunu ve MIC değerlerine bağlı olarak seçilen 1000 ppm'lik bakterisidal konsantrasyonun yeterli olduğunu göstermiştir.

Deneme 2'nin bulguları, *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının, embriyodaki Cmm'ye karşı etkili ya da etkisiz olduğu bilinmemekle beraber, tohum kabuğundaki Cmm'yi tamamen eradike etmeleri nedeni ile %100 etkili olduklarını göstermiştir. NA besiyerinde tohumlarda görülen çimlenme de tohum kalitesi açısından ümitvar bulunmuştur. Elde edilen bulgular *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis*'in yapılacak olan domates tohum uygulama ve film kaplama çalışmalarına uygun olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.3. Uçucu yağ uygulamasının (1000 ppm) bulaşık domates tohumundaki Cmm'ye etkisi

	48 saatlik gözlem			72 saatlik gözlem		
	Temiz Tohum Sayısı	Bulaşık tohum sayısı	% Etki ²	Temiz tohum Sayısı	Bulaşık Tohum sayısı	% Etki ²
<i>L. angustifolia</i>	12.20 D ¹	12.80	49.00	10.00 e	15.00	40.00
<i>L. stoechas</i>	25.00 A	0.00	100.00	25.00 a	0.00	100.00
<i>M. rucutita</i>	25.00 A	0.00	100.00	19.00 c	6.00	76.00
<i>M. piperita</i>	25.00 A	0.00	100.00	22.00 b	3.00	88.00
<i>M. communis</i>	25.00 A	0.00	100.00	18.00 c	7.0	72.00
<i>O. onites</i>	25.00 A	0.00	100.00	25.00 a	0.00	100.00
<i>O. vulgare</i>	25.00 A	0.00	100.00	25.00 a	0.00	100.00
<i>R. damascena</i>	8.00 E	17.00	32.00	8.00 f	17.00	32.00
<i>R. officinalis</i>	25.00 A	0.00	100.00	25.00 a	0.00	100.00
<i>C. zeylanicum</i>	19.00 B	5.30	79.00	18.00 c	7.00	72.00
Streptomisin sülfat	16.00 C	9.00	64.00	16.00 d	9.00	64.00
Bakır sülfat	25.00 A	0.00	100.00	25.00 a	0.00	100.00
Steril saf su	0.00 F	25.00	0.00	0.00 g	25.00	0.00

¹İnkübasyondan 48 saat sonra alınan gözleme ait ortalar büyük harf, 72 saat sonra alınan gözleme ait ortalar ise küçük harf ile gruplandırılmıştır. Aynı sütunda aynı büyük harf ve küçük ile gösterilen uygulamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir (Duncan's Multiple Range Test, P≤0.01)

²%Etki değerleri Abbott formülüne göre bulaşık tohum sayısı üzerinden hesaplanmıştır. %Etki= Kontrolün bulaşık tohum sayısı- Uygulamanın bulaşık tohum sayısı/Kontrolün bulaşık tohum sayısı x 100. Her bir petriye 25 tohum, 25 x 4 adet tohum/4 petri 1 tekrür kabul edilmiştir.



Şekil 4.2. *O. vulgare* uçucu yağı uygulanmış domates tohumlarının NA besiyerinde 72 saat inkübasyondan sonra çimlenme ve 2 mm kökçük çıkışlarının görüntüsü

4.3. Tohum uygulamalarında kullanılacak olan uçucu yağların ve dozların belirlenmesine yönelik bulgular (Deneme 3)

Araştırmada Deneme 3'ten önce ilk olarak toplam 20 adet ticari uçucu yağın elde edilen inhibisyon zon değerleri üzerinden antibakteriyel etkileri olup olmadığı araştırılmıştır. Antibakteriyel etki (%65 üzeri) gösteren 10 adet ticari uçucu yağın MIC değerleri belirlenmiştir. Düşük MIC değerine sahip antibakteriyel etkisi yüksek olan uçucu yağların (10 adet) Cmm'ye karşı tohum uygulamasındaki etkisi tespit edilmiştir. Deneme 3'te ise *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının domates tohumunun embriyo ve kabuğundaki Cmm'ye karşı etkisi, uygulanabilecek bakterisidal dozlar ve bunların tohum ve fide kalitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Her bir uçucu yağın DMSO (%10) ile hazırlanmış farklı dozları (125, 200, 250, 300, 400, 500, 1000 ve 5000 ppm dozları) Cmm ile bulaşık domates tohum örneklerine uygulanmıştır. Uçucu yağ uygulanan domates tohum örneklerinde sırasıyla, temiz tohum oranı (%), tohumda bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum), çimlenme oranı (%), çıkış oranı (%) ve fitotoksite (TTC testi) ilgili veriler alınarak analiz edilmiştir. Tohum ve fide kalitesi ile ilgili veriler alındıktan sonra, bu uçucu yağların içeriklerinin araştırılan özellikler (antibakteriyel etki, tohum ve fide kalitesine etki, temiz tohum oranı ve tohumda bakteri yoğunluğu) üzerine etkisini belirlemek için, uçucu yağlarda GC-MS ile içerik analizi yapılmış ve değerler % olarak ifade edilmiştir.

4.3.1. Uçucu yağ tohum uygulamasının temiz tohum oranına etkisi

Deneme 3 içerisinde ele alınan temiz tohum sayısı (adet) ve bunun üzerinden hesaplanan temiz tohum oranı (% etki) ile uçucu yağların Cmm ile bulaşık domates tohumlarının içerisinde ve kabuğundaki Cmm'nin baskılanarak kabuk üzerinde gelişiminin durdurulması hedeflenmiştir. Uçucu yağ uygulamasının etkili olması durumunda, tohumdaki var olan Cmm bulaşıklığının engellenmesi ve tohumlar etrafında Cmm gelişiminin olmaması (sıfır bulaşıklık), araştırmanın nihai hedeflerinden biri olan bulaşık tohumların temiz tohumları bulaştırması önleneneğinden önem arz etmektedir. Sıfır bulaşıklık (%100 temiz tohum oranı) tespit edilen uygulamalar ile aynı tohum lotu içerisinde, bulaşık tohumların temiz tohumları bulaştırması önlenebilecektir.

Uygulama görmüş tohumların NA besisi yerinde 48 saatlik inkübasyondan sonra her bir tohumun etrafında Cmm gelişimi kontrol edilmiş, temiz tohum, bulaşık tohum sayıları ile ilgili veriler değerlendirilmiştir. Sekiz farklı uçucu yağ dozu (125, 200, 250, 300, 400, 500, 1000 ve 5000 ppm) ile yapılan tohum uygulaması sonucunda yağ x doz interaksyonunun, uçucu yağların ve dozların temiz tohum oranı üzerine etkisi $P \leq 0.01$ düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4'te belirtildiği gibi yağ x doz interaksyonu açısından *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis*'in 500 ppm ve üstü dozları ile *R. officinalis*'in 1000 ppm ve üstü dozları %100 temiz tohum oranı vererek aynı istatistik grupta yer almışlardır. Uçucu yağların 125-500 ppm arasındaki diğer dozları ise yağ x doz interaksyonu bakımından farklı istatistiksel gruplarda yer almışlardır.

Uçucu yağlar içerisinde *O. vulgare* 19 adet temiz tohum sayısı ve %74 temiz tohum oranı (% etki) ile domates tohumundaki Cmm'ye karşı en etkili uçucu yağ olarak tespit edilmiş ve bunu sırasıyla *O. onites* (%65), *L. stoechas* (%64) ve *R. officinalis* (%55) izlemiştir. Uçucu yağ dozlarından 1000 ppm ve üstü dozların 25 adet temiz tohum sayısı ve %100 etki ile domates tohumundaki Cmm'yi eradike etmede başarılı oldukları ve bu dozların altında dozdaki düşmeye bağlı olarak bulaşık tohum sayının arttığı saptanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi domates tohumundaki Cmm'ye karşı uçucu yağların en az pozitif kontrol olan bakır sülfat kadar etkili olduğu görülmüştür. Bakır sülfat uygulamasında temiz tohum oranı (% etki) %100 olmuştur. Bakır sülfat ile uygulama gören domates tohumlarının etrafında Cmm gelişimi tespit edilmemiştir

Temiz tohum sayısı ile ilgili verilerin alındığı petrilerde kontrol uygulamasında petri içerisinde bütün tohumların etrafında Cmm kolonisi gelişirken (Şekil 4.3), *O. vulgare*'nin 500 ppm ve üstü dozların hiçbirinde Cmm gelişmediği fakat 500 ppm'in altındaki dozlarda, doz düştükçe Cmm ile bulaşık tohum sayısının arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).

Çizelge 4.4. Tohuma uçucu yağ uygulamasının temiz tohum oranına etkisi

Uçucu yağlar	Dozlar (ppm)	Temiz tohum sayısı (adet)	Bulaşık tohum sayısı (adet)	%Etki	
Bakır sülfat		25.00	0.00	100.00	
Steril saf su		0.00	100.00	0.00	
<i>L. stoechas</i>	125	3.00	23.00	10.00	
	200	5.00	20.00	20.00	
	250	9.00	16.00	36.00	
	300	16.00	10.00	62.00	
	400	21.00	4.00	84.00	
	500	25.00	0.00	100.00	
	1000	25.00	0.00	100.00	
	5000	25.00	0.00	100.00	
	Ortalama	16.00	8.00	64.00	
<i>O. onites</i>	125	4.00	21.00	16.00	
	200	7.00	19.00	26.00	
	250	10.00	15.00	40.00	
	300	15.00	10.00	60.00	
	400	20.00	5.00	80.00	
	500	25.00	0.00	100.00	
	1000	25.00	0.00	100.00	
	5000	25.00	0.00	100.00	
	Ortalama	16.00	9.00	65.00	
<i>O. vulgare</i>	125	7.00	19.00	26.00	
	200	10.00	15.00	40.00	
	250	16.00	9.00	64.00	
	300	20.00	5.00	80.00	
	400	21.00	4.00	84.00	
	500	25.00	0.00	100.00	
	1000	25.00	0.00	100.00	
	5000	25.00	0.00	100.00	
	Ortalama	19.00	6.00	74.00	
<i>R. officinalis</i>	125	2.00	23.00	8.00	
	200	4.00	21.00	16.00	
	250	7.00	18.00	28.00	
	300	11.00	14.00	44.00	
	400	14.00	11.00	56.00	
	500	20.00	4.00	84.00	
	1000	25.00	0.00	100.00	
	5000	25.00	0.00	100.00	
	Ortalama	14.00	11.00	55.00	
Temiz tohum sayısı (adet)					
Dozlar (ppm)	<i>L. stoechas</i>	<i>O. onites</i>	<i>O. vulgare</i>	<i>R. officinalis</i>	Doz ortalaması
125	2.50 E	4.00 E	6.50 E	2.00 E	4.00 g
200	5.00 E	6.50 E	10.00 D	4.00 E	6.50 f
250	9.00 D	10.00 D	16.00 C	7.00 E	10.50 e
300	15.50 C	15.00 C	20.00 B	11.00 D	15.50 d
400	20.80 B	20.00 B	21.00 B	14.00 C	19.00 c
500	25.00 A	25.00 A	25.00 A	20.00 B	23.80 b
1000	25.00 A	25.00 A	25.00 A	25.00 A	25.00 a
5000	25.00 A	25.00 A	25.00 A	25.00 A	25.00 a
Yağ ortalaması	16.00 b	16.00 b	19.00 b	14.00 c	
Bakır sülfat	25.00 A				25.00 a
Steril saf su	0.00 F				0.00 h

¹ Yağ x doz interaksyonuna ait ortalamalar büyük harf, yağ ve dozların ortalamaları ise küçük harfler kullanılarak gruplandırılmıştır. Aynı aynı büyük harf ve küçük harf ile gösterilen uygulamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir (Duncan's Multiple Range Test, P≤0.01)

²Her bir petriye 25 tohum, 25 x 4 adet tohum / 4 petri 1 tekerrür kabul edilmiştir. %etki değerleri Abbott formülüne göre bulaşık tohum sayısı üzerinden hesaplanmıştır. %Etki= Kontrolün bulaşık tohum sayısı-Uygulamanın bulaşık tohum sayısı / Kontrolün tohum sayısı x 100



Şekil 4.3. Kontrol (saf su) uygulanan domates tohumlarında Cmm gelişiminin görüntüsü



Şekil 4.4. *O. vulgare* uçucu yağı uygulanan domates tohumlarında Cmm gelişmemesine ait görüntü

4.3.2. Uçucu yağ tohum uygulamasının tohumda bakteri yoğunluğuna etkisi

Tohumda bakteri yoğunluğu ile belirlenmek istenen, yapılan uçucu yağ uygulamalarının başlangıçta tohuma bulaştırılan 10^8 CFU/ml yoğunluğunda olan ve negatif kontrolde bunun logaritmik değerlerinin 4.55 log CFU/tohum olduğu tespit edilen Cmm yoğunluğunu 0'a düşürüp düşürmediği veya ne kadar azalttığıdır. Burada temiz tohum oranındakine göre daha güvenli sonuçlar elde edilmektedir. Bulaşıklığın embriyoda veya tohum kabuğunda olması sonucu etkilememekte, önemli olan tohumdaki gerçek bulaşıklığın tespiti.

Tohumda bakteri yoğunluğunun (log CFU/tohum) belirlenmesi yöntem bölümünde belirtildiği gibi tohum ekstraksiyonundan gelişen Cmm kolonileri üzerinden analiz yapılmıştır. Şekil 4.5'te tohum ekstraksiyonuna ait farklı dilüsyonlardan NA besiyerinde gelişen Cmm kolonileri gösterilmiştir.

L. stoechas, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının, tohum kabuğundaki Cmm'nin %100 gelişimini engelleyen ve %100 temiz tohum oranı veren 500 ppm ve üst dozları uygulanan domates tohumlarında tohumda bakteri yoğunluğu belirlenmiştir. Tek bir domates tohumunda uçucu yağ uygulamasından sonra ne kadar Cmm kolonisinin yaşayıp yaşamadığı saptanmıştır. Uygulama gören domates tohumlarından yapılan tohum ekstraksiyonundan gelişen ortalama Cmm koloni sayısı (CFU/tohum) tespit edilmiş ve bu değerlerin logaritması alınarak (log CFU/tohum), veriler logaritmik ortalamalar üzerinden analiz edilmiştir. Varyans analizi sonucuna göre tohumda bakteri yoğunluğu üzerine uçucu yağ x doz interaksiyonunun, uçucu yağların ve dozların etkisinin $P \leq 0.01$ düzeyinde istatistiki olarak önemli olduğu tespit edilmiş ve ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre gruplandırılmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5'de belirtildiği gibi, uçucu yağ x doz interaksiyonunda *O. vulgare*'nin 1000 ve 5000 ppm dozları ile *L. stoechas*, *O. onites* ve *R. officinalis*'in 5000 ppm dozları 0 log CFU/tohum değeri vererek aynı istatistiki grup içerisinde yer almışlardır. Diğer uçucu yağ x doz interaksiyonunun hiçbirinde 0 log CFU/tohum değeri elde edilememiş ve bu uygulamalarda domates tohumundan Cmm bulaşıklığının tamamen yok edilemediği tespit edilmiştir.

Uçucu yağ uygulamaları içerisinde domates tohumundaki Cmm bulaşıklığını en fazla etkileyen ve dolayısı ile sıfır bulaşıklık (log CFU/tohum) verenler *O. vulgare* ve *O. onites* olmuştur. Uçucu yağ dozu ve log CFU/tohum değerleri arasında negatif linear bir ilişkinin olduğu, yüksek dozların daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Uçucu yağ uygulamalarının tamamında doz artıkça domates tohumundaki Cmm bulaşıklığının (log CFU/tohum) düştüğü saptanmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5'de atfedildiği gibi, domates tohumundaki Cmm'ye karşı uçucu yağların yüksek dozları pozitif kontrolden (bakır sülfat) daha yüksek bir engelleyici etki göstermiştir. İlginç bir şekilde temiz tohum oranı ve diğer *in vitro* çalışmalarda hep yüksek değer veren bakır sülfatın yeterince etkili olamadığı ve tohumdaki Cmm yoğunluğunu tamamen yok edemediği saptanmıştır.



Şekil 4.5. Uçucu yağ uygulanan domates tohumlarının ekstraksiyonunda gelişen Cmm kolonilerinin görüntüsü

Çizelge 4.5. Uçucu yağ tohum uygulamasının domates tohumunda bakteri yoğunluğuna etkisi

Uçucu yağlar	Dozlar (ppm)	Log CFU/tohum ²	% Etki ³
Steril saf su		4.55	0.00
Bakır Sülfat		1.28	72.00
<i>L. stoechas</i>	500	1.74	63.00
	1000	1.54	66.00
	5000	0.00	100.00
	Ortalama	1.09	76.00
<i>O. onites</i>	500	1.66	64.00
	1000	1.34	70.00
	5000	0.00	100.00
	Ortalama	1.00	78.00
<i>O. vulgare</i>	500	1.34	70.00
	1000	0.00	100.00
	5000	0.00	100.00
	Ortalama	0.45	90.00
<i>R. officinalis</i>	500	2.70	41.00
	1000	1.60	65.00
	5000	0.00	100.00
	Ortalama	1.43	69.00
Dozlar	500	1.86	59.00
	1000	1.12	75.00
	5000	0.00	100.00
	Ortalama	0.99	78.00

Tohumda bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum)					
Dozlar	<i>L. stoechas</i>	<i>O. onites</i>	<i>O. vulgare</i>	<i>R. officinalis</i>	Doz ortalaması
500	1.74 F	1.66 E	1.34 B	2.70 G	2.21 c
1000	1.54 C	1.34 B	0.00 A	1.60 D	1.71 b
5000	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.97 a
Yağ ortalaması	1.09 c	0.99 b	0.44 a	1.43 d	
Bakır sülfat	1.28 B				1.28 d
Steril saf su	4.55 H				4.55 e

¹Yağ x doz interaksiyonuna ait ortalamalar büyük harf, yağ ve dozların ortalamaları ise küçük harfler kullanılarak gruplandırılmıştır. Aynı aynı büyük harf ve küçük harf ile gösterilen uygulamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir (Duncan's Multiple Range Test, P≤0.01)

²Tohum ekstraksiyonundan her bir uygulama için elde edilen koloni sayılarına 10 tabanında logaritmik transformasyon yapılmış ve bu şekilde elde edilen log CFU/tohum değerleri üzerinden varyans analizi yapılmıştır.

³%Etki Abbott formülüne göre hesaplanmıştır: %Etki: Kontrol-Uygulama / Kontrol x 100.

4.3.3. Uçucu yağ uygulamasının domates tohumlarının çimlenme oranına etkisi

L. stoechas, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının tohum uygulamasında temiz tohum sayıları bakımından, %100 temiz tohum oranı veren 500 ppm ve üstü toplam üç dozu ile yapılan tohum uygulamalarının domates tohumlarında çimlenme oranı (%) üzerine etkisi belirlenmiştir. Uçucu yağ uygulaması gören tohumlar filtre kağıtları arasına ekilmiş ve inkübasyondan sonra 3. günde 2 mm kökçük çıkış gösteren tohumlar çimlenmiş kabul edilmiştir (Şekil 4.6). Ortalama çimlenen tohum sayıları (adet), çimlenme oranı (%) ve ortalama çimlenme zamanı (gün) belirlenmiştir. Çimlenen tohum sayısı ve ortalama çimlenme zamanı üzerinden varyans analizi yapılmıştır.



Şekil 4.6. Uçucu yağ uygulanan domates tohumlarında 2. günde kökçük çıkışının görüntüsü

500 ppm ve üstü uçucu yağ uygulaması domates tohumlarının çimlenen tohum sayısı üzerine farklı etkiler göstermiştir. Varyans analizi sonuçları yağ x doz interaksyonunun, uçucu yağların ve dozların çimlenen domates tohum sayısı üzerine etkisinin $P \leq 0.05$ düzeyinde önemli olduğunu ve ortalama çimlenme zamanı üzerine ise önemli bir etkisinin olmadığını göstermiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6’da belirtildiği gibi, uçucu yağ x doz interaksyonunda, 33 adet çimlenen tohum sayısı ile *O. vulgare*’nin 5000 ppm dozu tohum çimlenme oranını en fazla düşüren doz, *L. stoechas*’ın 500 ppm’lik dozu ise 44 adet çimlenen tohum sayısı ile kontrole göre tohum çimlenme oranını en az etkileyen veya düşüren uygulama olmuştur. Uçucu yağ tohum uygulamasının tohum çimlenmesi üzerine daha çok uçucu yağ türü ve doz artışına bağlı olarak antagonistik etki görülmüştür.

Cmm’ye karşı yüksek engeleyici etki gösteren (yüksek inhibisyon zonu oluşturan, temiz tohum oranı ve düşük tohum başına bakteri yoğunluğu) organum türü

kekik uçucu yağlarının her ikisi de tohum çimlenme oranını kontrole göre düşürmüşlerdir. *L. stoechas* 40.6 adet çimlenen tohum sayısı ve %81 çimlenme oranı ile en az negatif etki gösteren uçucu yağ olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

Uçucu yağ dozu ve çimlenen tohum sayısı arasında negatif linear bir ilişki saptanmıştır. Doz arttıkça çimlenen tohum sayısı ve çimlenme oranı düşmüştür (Bkz. Şekil 8.9, Şekil 8.10, Şekil 8.11, Şekil 8.12).

Uçucu yağlar ve dozlar domates tohumunun ortalama çimlenme zamanını değiştirmemiştir. Kontrolün (saf su) çimlenme zamanı 3.4 gün iken uçucu yağ uygulanan tohumların çimlenme zamanı 2.7-3.6 gün arasında değişmiştir (Çizelge 4.6)

Çizelge 4.6. Uçucu yağ uygulamasının domates tohumlarının çimlenme oranına etkisi

Uçucu yağlar	Dozlar (ppm)	Çimlenen tohum sayısı (adet) ²	Çimlenme oranı (%)	Çimlenme zamanı (gün) ²	
Steril saf su		46.00	92.00	3.40	
Bakır sülfat		43.50	87.00	3.40	
<i>L. stoechas</i>	500	44.00	88.00	3.00	
	1000	39.80	79.00	3.60	
	5000	38.00	76.00	3.00	
	<i>Ortalama</i>	40.60	81.00	3.20	
<i>O. onites</i>	500	43.30	87.00	3.60	
	1000	36.00	72.00	3.00	
	5000	35.00	70.00	2.70	
	<i>Ortalama</i>	38.10	76.00	3.10	
<i>O. vulgare</i>	500	39.00	78.00	3.10	
	1000	36.00	72.00	3.10	
	5000	33.00	66.00	3.00	
	<i>Ortalama</i>	36.00	72.00	3.10	
<i>R. officinalis</i>	500	40.50	81.00	3.10	
	1000	39.80	79.00	3.00	
	5000	37.30	75.00	2.70	
	<i>Ortalama</i>	39.20	78.00	2.90	
Dozlar	500	42.00	84.00	3.20	
	1000	38.50	77.00	3.20	
	5000	37.20	75.00	2.80	
	<i>Ortalama</i>	39.20	79.00	3.10	
Çimlenen tohum sayısı (adet)					
Dozlar	<i>L. stoechas</i>	<i>O. onites</i>	<i>O. vulgare</i>	<i>R. officinalis</i>	Doz ortalaması
500	44.00 B	43.30 B	39.00 C	40.50 C	42.00 c
1000	39.80 C	36.00E	36.00 E	39.80 C	37.90 d
5000	38.00 D	35.00 F	33.00 G	37.30 D	35.80 e
Yağ ortalaması	40.60 a	38.10 c	36.00 d	39.20 b	
Bakır sülfat	43.50 B				43.50 b
Steril saf su	46.00 A				46.00 a

¹Yağ x doz interaksyonuna ait ortalamalar büyük harf, yağ ve dozların ortalamaları ise küçük harfler kullanılarak gruplandırılmıştır. Aynı büyük ve küçük harf ile gösterilen uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan's Multiple Range Test, P≤0.05).

²Uçucu uygulaması gören tohumlardan 4 x 50 adet tohum her bir uygulama için filtre kağıtları arasında çimlenme testine alınmıştır. 3.günden itibaren günlük sayımların aritmetik ortalaması alınarak çimlenme oranı (%) ve ortalama çimlenme zamanı (gün) belirlenmiştir.

4.3.4. Uçucu yağ uygulamasının domates tohumlarının çıkış oranına etkisi

Laboratuvarında çimlenme oranı optimum koşullarda (ışık, sıcaklık, oksijen, nem) filtre kağıtları arasında yapılmaktadır. Fakat tohum ekiminin yapıldığı toprak, torf, fide yetiştirme harcında farklı faktörlerin etkisi ortaya çıkabilmektedir. Fideliklerde kullanılan fide harcında yapılan çıkış denemelerinin sonuçları pratiğe daha yakın değerler vermektedir. Bu nedenle, *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının 500 ppm ve üstü dozları ile yapılan tohum uygulamasının, domates tohumlarının çıkış oranı (%) ve ortalama çıkış zamanı üzerine etkisi araştırılmıştır. Çıkan tohum sayısı (adet), çıkış oranı (%) ve ortalama çıkış zamanı (gün) belirlenmiştir. Çıkış yapan tohum sayısı (adet) ve çıkış zamanı (gün) ortalamaları üzerinden varyans analizi yapılmış ve istatistiksel olarak önemli bulunan uygulamalar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre gruplandırılmıştır.

Uçucu yağ uygulamasının tohumların çıkış oranlarına etkileri konusunda elde edilen bulgular çimlenme oranlarındaki bulgulara paralellik göstermiştir. Yağ x doz interaksiyonunun, uçucu yağların ve dozların çıkış oranı üzerine etkileri $P \leq 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli bulunurken, aynı parametrelerin ortalama çıkış zamanı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7’de belirtildiği gibi, uçucu yağ x doz interaksiyonunda 23.5 çıkan tohum sayısı ile *L. stoechas*’ın 500 ppm dozu en yüksek değeri verirken, *O. vulgare*’nin 5000 ppm dozu ise 15 adet çıkan tohum sayısı ile en düşük değeri vermiştir.

Genel olarak bütün uçucu yağ uygulamalarında çıkış oranları kontrolün altında tespit edilmiştir. Uçucu yağlar içerisinde 21.5 adet ile en yüksek çıkan tohum sayısını *L. stoechas* vermiş ve bunu sırası ile *R. officinalis* ve *O. onites* izlemiştir. *O. vulgare* 17.3 çıkan tohum sayısı ve %69.3 çıkış oranı ile kontrole göre en düşük çıkış değerlerini vererek çıkış oranı en fazla olumsuz etkileyen uçucu yağ olmuştur (Çizelge 4.7).

Doz artışına bağlı olarak çıkış oranı düşmüş, en yüksek çıkış oranını (%88) en düşük doz olan 500 ppm vermiştir (Çizelge 4.7).

Uçucu yağlar ve dozlar domates tohumlarının ortalama çıkış zamanını değiştirmemiştir. Negatif kontrolün (steril saf su) çıkış zamanı 3.7 gün iken, uçucu yağ uygulamalarında 3.0-4.2 gün arasında değişmiştir (Çizelge 4.7).

Her ne kadar fide yetiştirme harcı kullanılmış olsa da uçucu yağ uygulamalarının domates tohumlarının fide çıkışlarına dair ilgili parametreleri üzerine etkileri çimlenme oranındakine benzer bulunmuştur.

Cmm üzerine yüksek engelleyici etkisi tespit edilen özellikle origanum türü kekik uçucu yağlarının çıkış oranını en fazla oranda olumsuz etkilediği saptanmıştır. Özellikle doz artışına bağlı olarak ta olumsuz etkinin arttığı görülmüştür.

Çizelge 4.7. Uçucu yağ uygulamasının domates tohumlarının çıkış oranına etkisi

Uçucu yağlar	Dozlar (ppm)	Çıkan tohum sayısı (adet)	Çıkış oranı (%)	Çıkış zamanı (gün)
Steril saf su		23.00	92.00	3.70
Bakır sülfat		22.00	88.00	3.60
<i>L. stoechas</i>	500	23.50	94.00	3.00
	1000	22.00	88.00	3.00
	5000	19.00	76.00	3.40
	Ortalama	21.50	86.00	3.10
<i>O. onites</i>	500	21.00	84.00	3.10
	1000	19.00	76.00	3.10
	5000	16.00	64.00	3.00
	Ortalama	18.70	75.00	3.10
<i>O. vulgare</i>	500	20.00	80.00	3.40
	1000	17.00	68.00	3.60
	5000	15.00	60.00	3.80
	Ortalama	17.30	60.00	3.60
<i>R. officinalis</i>	500	22.00	88.00	3.60
	1000	20.00	80.00	3.80
	5000	18.00	72.00	4.20
	Ortalama	20.00	80.00	3.90
Dozlar	500	22.00	88.00	3.20
	1000	19.50	78.00	3.30
	5000	17.00	68.00	3.60
	Ortalama	19.50	78.00	3.40

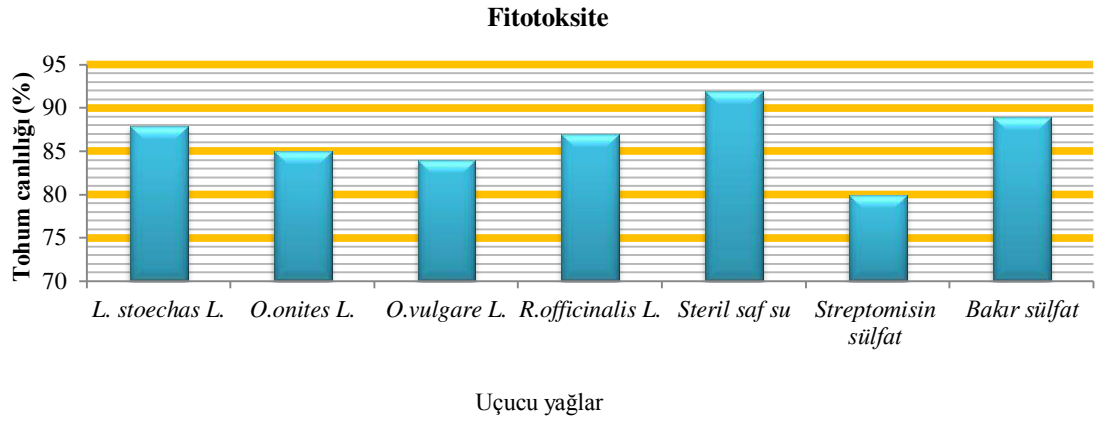
Çıkan tohum sayısı (adet)					
Dozlar	<i>L. stoechas</i>	<i>O. onites</i>	<i>O. vulgare</i>	<i>R. officinalis</i>	Doz ortalaması
500	23.50 A	21.00 D	20.00 D	22.00 B	22.00 b
1000	22.00 B	19.00 E	17.00 G	20.00 D	19.50 c
5000	19.00 E	16.00 H	15.00 I	18.00 F	17.00 d
Yağ ortalaması	21.50 a	18.70 c	17.30 d	20.00 b	
Bakır sülfat	22.00 B				22.00 b
Steril saf su	23.00 A				23.00 a

¹Yağ x doz interaksiyonuna ait ortalamalar büyük harf, yağ ve dozların ortalamaları ise küçük harfler kullanılarak gruplandırılmıştır. Aynı büyük ve küçük harf ile gösterilen uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan's Multiple Range Test, $P \leq 0.05$)

²Uçucu uygulaması gören tohumlardan 4 x 50 adet tohum her bir uygulama için filtre kağıtları arasında çimlenme testine alınmıştır. 3. günden itibaren günlük sayımların aritmetik ortalaması alınarak çimlenme oranı (%) ve ortalama çimlenme zamanı (gün) belirlenmiştir.

4.3.5. Uçucu yağ uygulamasının domates tohumlarında fitotoksite oluşumuna etkisi

L. stoechas, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının 1000 ppm'lik tek bir dozu ile tohum uygulaması yapılmıştır. Uçucu yağ uygulaması görmüş tohumlarda TTC (2,3,5 triphyl tetrazolium chloride) testi yapılarak, uçucu yağ uygulamasının domates tohumuna ve tohum dokularına fitotoksik olup olmadığı araştırılmıştır. TTC testine göre tohum canlılığı en yüksek olan uygulama %88 ile *L. stoechas* olmuş ve bunu sırasıyla %87 ile *R. officinalis* ve %85 ile *O. onites* izlemiştir. *O. vulgare* %84 ile en düşük tohum canlılığı veren uygulama olarak tespit edilmiştir. Kontrolde (saf su) tohum canlılığı %92 olarak saptamıştır. Sonuçta uygulamalar arasında tohum canlılığı %84-88 arasında değişmiş, kontrole göre %4-8 arasında daha düşük tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Test sırasında tohum kabukları kararmış veya kavrulmuş bir görüntü veren tohumların (Şekil 4.9), embriyolarında böyle bir bulguya rastlanılmamış (Şekil 4.8) ve canlı tohum olarak kaydedilmiştir.



Şekil 4.7. Uçucu yağ uygulanan domates tohumlarında tohum canlılığı ve fitotoksitaya ait görüntü



Şekil 4.8. Uçucu yağ uygulanan domates tohumlarında canlı ve cansız embriyoların görüntüsü



Şekil 4.9. Uçucu yağ uygulanan bazı tohumlarda tohum kabuğunun kararmasına ait görüntü

4.3.6. Uçucu yağların içerikleri

Burada Deneme 1, 2 ve 3’de etkili olan ve devam eden çalışmalarda kullanılması planlanan 4 adet uçucu yağın GC-MS ile içerik analizi yapılmıştır. İçerikleri ile Cmm’ye ve tohum kalitesi üzerine etkilerine açıklama getirilmeye çalışılmıştır. İçerik analizi sonucunda *L. stoechas* uçucu yağının 51, *O. onites* ve *O. vulgare*’in 41, *R. officinalis*’in ise farklı miktarlarda toplamda 37 adet uçucu bileşen içerdiği tespit edilmiştir. Miktarca %1 ve üstünde bulunan ana uçucu bileşenler antibakteriyel etki ve tohum kalite değerlerine etkileri yönünden incelenmiştir. *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının miktarca en fazla bulunan ana bileşenleri sırasıyla %44 kamfor, %65 karvakrol, %74 karvakrol ve %50 1,8-sineol olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Etkili bulunan uçucu yağların içerik analizi

<i>L. stoechas</i>		<i>O. onites</i>		<i>O. vulgare</i>		<i>R. officinalis</i>	
Bileşen	Miktar (%)	Bileşen	Miktar (%)	Bileşen	Miktar (%)	Bileşen	Miktar (%)
Kamfor	43.95	Karvakrol	64.78	Karvakrol	74.05	1,8-sineol	49.48
Fenkon	16.33	Simen	7.47	Linalol	5.46	α -pinen	13.22
Bornil asetat	6.28	β -bisabolen	4.64	Simen	3.79	Karyofillen	6.29
α -pinen	4.35	γ -terpinen	3.93	Timol	2.59	Kamfor	4.16
Kamfen	3.77	Linalol	1.71	γ -terpinen	1.92	Borneol	3.96
Valensen	2.84	Borneol	1.61	β -bisabolen	1.82	Simen	3.76
1,8-sineol	1.89	Trans-karyofillen	1.61	trans-karyofillen	1.61	Kamfen	3.39
Linalol	1.54	β -myrcene	1.46	Borneol	1.52	α -terpineol	3.03
Verbenon	1.29	α -terpinen	1.41			Limonen	2.84
Linalil asetat	1.17	Terpinen-4-ol	1.01			Bornil asetat	1.58
Linalol oksit	1.12	Timol	0.97			β -myrsen	1.58
Karvakrol	0.92						

4.4. Uçucu yağların domates tohum film kaplanmasında kullanılabilirliğinin belirlenmesine yönelik bulgular (Deneme 4)

Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen uçucu yağ ve dozlarının tohum yüzeyinde polimer aracılığı ile ne kadar etkin bir şekilde tutulabildiği, tohumdaki Cmm inokulumunu tamamen yok edip etmediği, tohumun üniform çimlenme ve çıkışını ne oranda etkilediği tespit edilmeye çalışılmıştır. *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağları ile film kaplanan domates tohumları 24 saat süre ile oda koşullarında kurutulmuştur. Bu tohum örnekleri üzerinde, film kaplı tohumlarda inhibisyon zonu (mm), temiz tohum oranı (%), tohumda bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum), çimlenme oranı (%), çıkış oranı (%) ve fide başına Cmm yoğunluğu (log CFU/fide) verileri alınmıştır.

4.4.1. Uçucu yağ film kaplamanın tohumlarda inhibisyon zonu üzerine etkisi

Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen uçucu yağ ve dozların tohum etrafında Cmm gelişimine olanak vermeyen ne kadar güçlü bir inhibisyon oluşturabilecekleri araştırılmıştır. Tohum etrafında güçlü bir inhibisyon zonu oluşturan uçucu yağ ve dozlar belirlenerek domates tohumunun dışsal bulaşmalara karşı korunması hedeflenmiştir. *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu

yağlarının 5 farklı dozu (250, 500, 1000, 5000 ppm ve saf doz) ile film kaplanan tohumlarda inhibisyon zonu (mm) ve %inhibisyon zon artışı ile ilgili değerler alınmıştır.

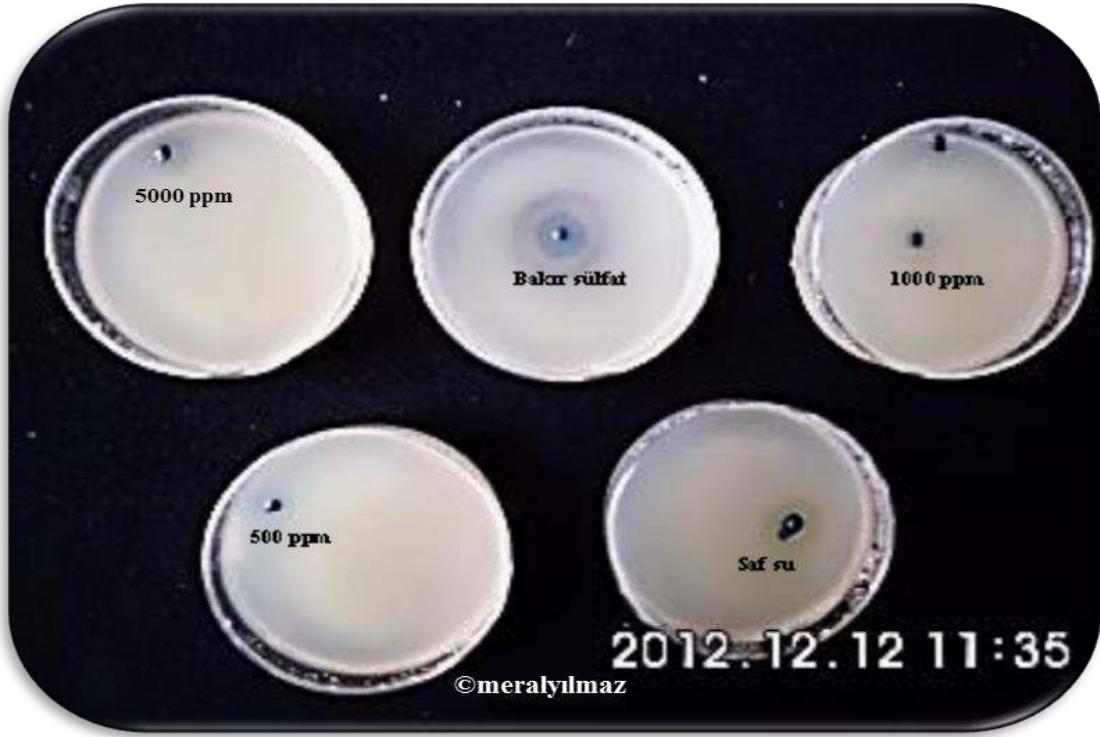
Araştırma bulgularına ait şekillerden de görüldüğü üzere, film kaplı tohumların (*O. vulgare*'nin 500, 1000 ve 5000 ppm) tohumların etrafında negatif kontrole (saf su) göre önemli bir inhibisyon zonu oluşmadığı saptanmıştır. Tohumun içindeki Cmm bulaşıklığı nedeniyle negatif kontrolde (saf su) tohumlar etrafında Cmm gelişimi görülürken, uçucu yağ dozları ile film kaplı tohumların hiçbirinin etrafında Cmm gelişmemiştir (Şekil 4.10). Tohum uygulamasında ise dozlara bağlı olarak tohumların etrafında inhibisyon zonu oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 4.11).

Uçucu yağlar ile film kaplı tohumların Cmm ile bulaşık besi yerinde inkübasyon sonrası oluşturdukları inhibisyon zonları (mm) ölçülmüş ve inhibisyon zon değerleri üzerinden % etki hesaplanmıştır. İnhibisyon zonları (mm) üzerinden yapılan varyans analizi sonuçlarına göre, inhibisyon zonu üzerine yağ x doz interaksiyonunun, uçucu yağların ve dozların etkisinin $P \leq 0.05$ düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.10).

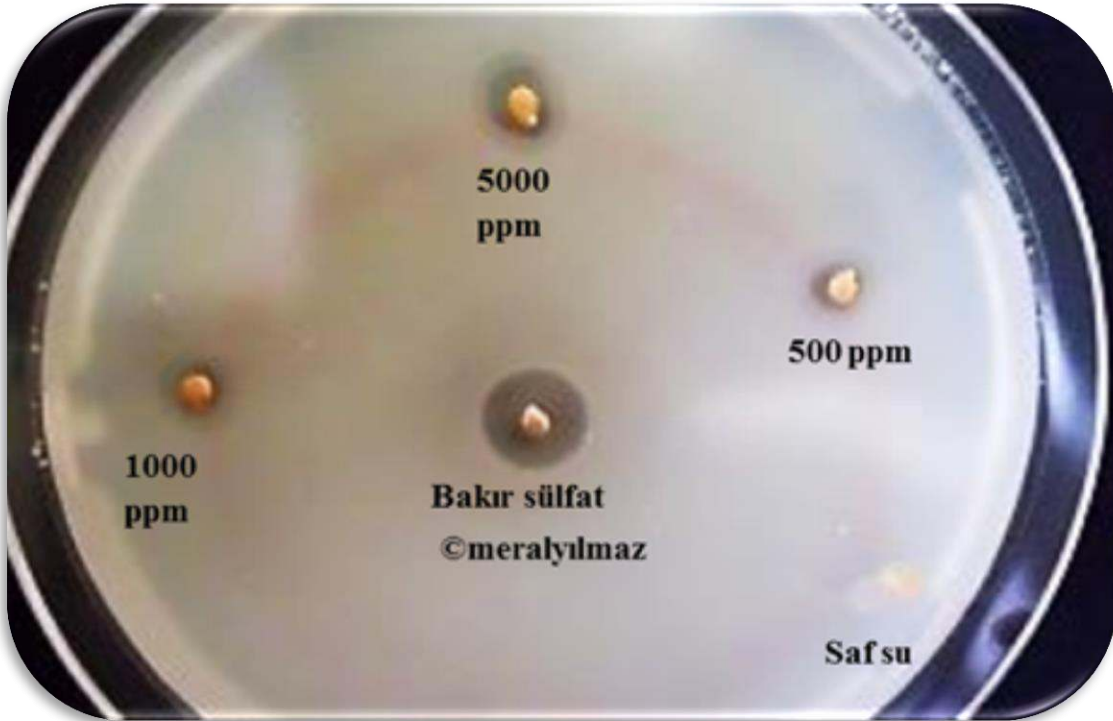
İnhibisyon zonu ile ilgili bulgulara görüldüğü gibi (Çizelge 4.10), saf doz hariç kullanılan uçucu yağ dozlarının kontrole göre önemli bir inhibisyon zonu oluşturmadığı tespit edilmiştir. Uçucu yağ x doz interaksiyonunda en yüksek inhibisyon zonunu 24 mm ile *O. vulgare* uçucu yağının saf dozu vermiş ve bunu sırasıyla *O. onites*, *L. stoechas* ve *R. officinalis* izlemiştir. Uçucu yağların tamamının DMSO (%10)'da çözündürmeden uygulanan dozları (saf doz) kontrole göre daha yüksek bir inhibisyon zonu oluştururken, DMSO (%10) ile çözündürülerek hazırlanan dozlarında (250, 500, 1000 ve 5000 ppm) kontrole göre önemli bir inhibisyon zonu oluşmadığı saptanmıştır.

Uçucu yağlar içerisinde ortalama 7.20 mm inhibisyon zonu ile *O. vulgare* en yüksek değeri vermiş ve bunu sırasıyla *O. onites*, *L. stoechas* ve *R. officinalis* izlemiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10'da belirtildiği gibi, pozitif kontrol (bakır sülfat) 22.30 mm inhibisyon zonu ile *O. vulgare*'nin saf dozundan (24.00 mm) daha düşük, diğer uçucu yağların saf dozlarından ise daha yüksek inhibisyon zonu oluşturmuştur. Bakır sülfat ticari bir preparat olup, zenginleştirilmiş bir formülasyondur. Bunun film kaplama ile domates tohumuna yüklendiğinde tohum yüzeyinde polimer vasıtasıyla daha iyi tutulduğu görülmüştür.



Şekil 4.10. *O. vulgare* uçucu yağı ile film kaplanan domates tohumlarında inhibisyon zonlarına ait görüntü



Şekil 4.11. *O. vulgare* uçucu yağı uygulanan domates tohumlarında inhibisyon zonlarına ait görüntü

Çizelge 4.10. Uçucu yağlar ile film kaplamanın tohumların inhibisyon zonu üzerine etkisi

Uçucu yağlar	Dozlar (ppm)	Zon çapı (mm)	% Etki ²		
Bakır sülfat		22.30	86.00		
Steril saf su		3.00 ³	0.00		
<i>L. stoechas</i>	250	3.00	0.00		
	500	3.00	0.00		
	1000	3.00	0.00		
	5000	3.00	0.00		
	Saf doz	14.30	80.00		
	<i>Ortalama</i>	4.90	38.00		
<i>O. onites</i>	250	3.00	0.00		
	500	3.00	0.00		
	1000	3.00	0.00		
	5000	3.00	0.00		
	Saf doz	22.50	86.00		
	<i>Ortalama</i>	6.90	56.00		
<i>O. vulgare</i>	250	3.00	0.00		
	500	3.00	0.00		
	1000	3.00	0.00		
	5000	3.00	0.00		
	saf doz	24.00	88.00		
	<i>Ortalama</i>	7.20	62.00		
<i>R. officinalis</i>	250	3.00	0.00		
	500	3.00	0.00		
	1000	3.00	0.00		
	5000	3.00	0.00		
	Saf doz	14.00	79.00		
	<i>Ortalama</i>	5.20	42.00		
Dozlar	250	3.00	0.00		
	500	3.00	0.00		
	1000	3.00	0.00		
	5000	3.00	0.00		
	Saf doz	19.00	84.00		
	<i>Ortalama</i>	6.20	52.00		
İnhibisyon zonu (mm)					
Dozlar (ppm)	<i>L. stoechas</i>	<i>O. onites</i>	<i>O. vulgare</i>	<i>R. officinalis</i>	Doz ortalaması
250	3.00 C	3.00 C	3.00 C	3.00 C	3.00 c
500	3.00 C	3.00 C	3.00 C	3.00 C	3.00 c
1000	3.00 C	3.00 C	3.00 C	3.00 C	3.00 c
5000	3.00 C	3.00 C	3.00 C	3.00 C	3.00 c
Saf doz	14.30 B	22.50 A	24.00 A	14.00 B	19.00 b
Yağ ortalaması	5.30 b	6.90 a	7.20 a ¹	5.20 b	
Bakır sülfat	22.30 A				22.30 a
Steril saf su	3.00 C				3.00 c

¹Yağ x doz interaksyonuna ait ortalamalar büyük harf, yağ ve dozların ortalamaları ise küçük harfler kullanılarak gruplandırılmıştır. Aynı büyük ve küçük harf ile gösterilen uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan's Multiple Range Test, P≤0.01)

²%Etki inhibisyon zonu artışı olarak Soylu vd (2005)'e göre aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır; %Etki:100-[(Kontrolün inhibisyon zonu/Uygulamanın zonu) x 100]

³Domates tohumunun çapı yaklaşık 3 mm kabul edilmiştir

⁴Saf doz:%60 polimer +%40 su karışımında %40'lık su yerine, uçucu yağların hiç çözündürmeden veya seyreltmeden direkt ilave edilerek kaplanmasını ifade eder

4.4.2. Uçucu yağ film kaplamanın temiz tohum oranına etkisi

Temiz tohum oranı özellikle uçucu yağlar ile film kaplı tohumlarda uçucu yağlar ile film kaplamanın tohum kabuğunda Cmm gelişimine etkisi yönünden önemli bir parametredir. Film kaplı tohumlarda, uçucu yağlar ile film kaplamanın tohum kabuğunda veya en azından tohumun dış yüzeyinde Cmm gelişimine etkisini belirlemek *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının farklı dozları (250, 500, 1000 ve 5000 ppm) ile kaplanan tohumlarda temiz tohum sayısı (adet) ve temiz tohum oranı (% etki) ile ilgili veriler elde edilmiştir. Film kaplı tohumlar Cmm ile bulaşık besiyerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her bir petride her bir tohumun etrafında Cmm koloni gelişimi gözlenmiş ve her bir uygulama için 100 tohum üzerinden alınan temiz tohum sayısı üzerinden veriler varyans analizine tabii tutulmuştur. Ortalamalar arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre gruplandırılmıştır.

Varyans analizi sonuçlarına göre yağ x doz interaksyonunun, uçucu yağların ve dozların temiz tohum sayısı üzerine etkisi (uçucu yağ ile film kaplamanın domates tohum kabuğunda Cmm gelişimi üzerine engeleyici etkisi) $P \leq 0.01$ düzeyinde istatistiki olarak önemli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.11).

Uçucu yağ film kaplama tohum kabuğunda Cmm gelişimini engellemiş ve aynı zamanda tohumda var olan Cmm'nin tohum kabuğundan çıkarak besiyerinde gelişimine olanak vermemiştir. Çizelge 4.11'de belirttiği gibi uçucu yağ x doz interaksyonunda, *L. stoechas*, *O. onites* ve *O. vulgare*'nin 500 ppm ve üstü dozlarının, *R. officinalis*'in ise 1000 ppm ve üst dozunun %100 temiz tohum oranı verdiği ve tohum kabuğunda Cmm gelişimini engelledikleri tespit edilmiştir.

Uçucu yağlar içerisinde %91 etki (temiz tohum oranı) ile *O. vulgare* domates tohum kabuğundaki Cmm'ye karşı en yüksek engeleyici etkiyi göstermiş ve bunu sırasıyla *O. onites*, *L. stoechas* ve *R. officinalis* izlemiştir (Çizelge 4.11).

Uçucu yağ dozları açısından üç adet uçucu yağın (*L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare*) 500 ppm ve üstü, bir adet uçucu yağın ise (*R. officinalis*) 1000 ppm ve üstü dozları domates tohum kabuğunda Cmm gelişimini tamamen engellemiş ve %100 temiz tohum oranı (% etki) vermiştir (Çizelge 4.11).

Ticari bir ürün olan bakır sülfat (nanobakır) Çizelge 4.11'de görüldüğü üzere Cmm ile bulaşık domates tohumlarında tohum kabuğunda Cmm'nin gelişimine olanak vermemiştir. Bakır sülfat uygulanan tohumlarda da %100 temiz tohum oranı elde edilmiştir.

Uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumlarında, tohum kabuğunda Cmm gelişiminin takibi için kurulan denemelerde kullanılan besi yerine antibiyotik ilave edilmemiştir. Benzer çalışmalarda besi yerinde hedef patojen dışında herhangi bir başka bir patojenin veya saprofit gelişim istenmediğinden besi yerine düşük dozlarda antibiyotik ilave edilir. Yapılan ön çalışmalarda antibiotik ilave edilen besi yerlerinde her ne kadar çok düşük oranlarda antibiyotik kullanılsa da negatif kontrol olan steril saf su uygulamasında bile Cmm gelişimi engellendiğinden denemeden sağlıklı sonuç

alınmayacağı görülmüştür. O nedenle besi yerine antibiyotik ilave edilmemiş ve gelişen saprofit ve diğer patojenler de izole edilerek değerlendirme dışı bırakılmıştır. Tohumun bırakıldığı ortamın nemli olmasından dolayı uçucu yağ ile film kaplı domates tohumları besi yerine bırakıldıktan sonra, az ya da çok bütün uygulamalarda *Fusarium* spp. ve saprofit gelişimler görülmüştür (Şekil 4.12 ve 4.13).

Çizelge 4.11. Uçucu yağlar ile film kaplamanın temiz tohum oranına etkisi

Uçucu yağlar	Dozlar (ppm)	Temiz tohum sayısı (adet)	Bulaşık tohum sayısı (adet)	% Etki	
Steril saf su		0.00	100.00	0.00	
Bakır sülfat		100.00	0.00	100.00	
<i>L. stoechas</i>	250	36.00	64.00	36.00	
	500	100.00	0.00	100.00	
	1000	100.00	0.00	100.00	
	5000	100.00	0.00	100.00	
	<i>Ortalama</i>	84.00	16.00	84.00	
<i>O. onites</i>	250	40.00	60.00	40.00	
	500	100.00	0.00	100.00	
	1000	100.00	0.00	100.00	
	5000	100.00	0.00	100.00	
	<i>Ortalama</i>	85.00	15.00	85.00	
<i>O. vulgare</i>	250	64.00	36.00	64.00	
	500	100.00	0.00	100.00	
	1000	100.00	0.00	100.00	
	5000	100.00	0.00	100.00	
	<i>Ortalama</i>	91.00	9.00	91.00	
<i>R. officinalis</i>	250	28.00	72.00	28.00	
	500	78.00	22.00	78.00	
	1000	100.00	0.00	100.00	
	5000	100.00	0.00	100.00	
	<i>Ortalama</i>	77.00	31.00	77.00	
Dozlar	250	42.00	58.00	42.00	
	500	100.00	0.00	100.00	
	1000	100.00	0.00	100.00	
	5000	100.00	0.00	100.00	
	<i>Ortalama</i>	86.00	15.00	86.00	
Temiz tohum sayısı (adet)					
Dozlar (ppm)	<i>L. stoechas</i>	<i>O. onites</i>	<i>O. vulgare</i>	<i>R. officinalis</i>	Doz ortalaması
250	36.00 E	40.00 D	64.00 C	28.00 F	42.00 b
500	100.00 A	100.00 A	100.00 A	78.00 B	100.00 a
1000	100.00 A	100.00 A	100.00 A	100.00 A	100.00 a
5000	100.00 A	100.00 A	100.00 A	100.00 A	100.00 a
Yağ ortalaması	84.00 b	85.00 b	91.00 a ¹	77.00 c	
Bakır sülfat	100.00 A				100.00 a
Steril saf su	0.00 G				0.00 c

¹Yağ x doz interaksyonuna ait ortalamalar büyük harf, yağ ve dozların ortalamaları ise küçük harfler kullanılarak gruplandırılmıştır. Aynı büyük ve küçük harf ile gösterilen uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan's Multiple Range Test, P≤0.01)

²Her bir petriye 25 tohum, 25 x4 adet tohum/4 petri 1 tekerrür kabul edilmiştir. %etki değerleri Abbott formülüne göre bulaşık tohum sayısı üzerinden hesaplanmıştır. %Etki= Kontrolün bulaşık tohum sayısı-Uygulamanın bulaşık tohum sayısı / Kontrolün bulaşık tohum sayısı x 100.



Şekil 4.12. *O. vulgare* uçucu yağı (5000 ppm) ile film kaplanan domates tohumlarında Cmm gelişmemesine ait görüntü



Şekil 4.13. Bakır sülfat ile film kaplanan tohumlarda Cmm gelişmemesinin görüntüsü

4.4.3. Uçucu yağlar ile film kaplamanın tohumda bakteri yoğunluğuna etkisine

Cmm tohum kabuğunun yanısıra embriyoda da taşınan fitobakteridir. Tohum kabuğunun altında taşınan bu bakteri ile yapılacak olan mücadele çalışmasının içsel ve dışsal bütün Cmm bulaşıklığına karşı etkili olması gerekir. Tohumda bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum) tohumdaki gerçek bulaşıklığı tespit etmeye yönelik güvenilir bir parametredir. Bu parametre ile Cmm ister tohum kabuğunda olsun ister embriyoda olsun tespit edilebilmektedir. Vakum infiltrasyonu ve çalkalama ile Cmm'nin bulaştırıldığı domates tohumları farklı uçucu yağların farklı dozları ile film kaplanmıştır. 24 saat süre ile oda koşullarında kurutulan bu tohumlarda başta 10^8 CFU/ml yoğunlukta bulaştırılan Cmm'nin uygulamalardan sonra ne kadar yoğunlukta bulunduğunu ve uygulamaların ne kadar etkili olduğunu belirlemek için tohumdan yapılan analizler ile log CFU/tohum değerleri belirlenmiştir. Log CFU/tohum değerleri tohum ekstraksiyonu sonrası besi yerinde bakteri gelişimi takip edilmiş ve bu şekilde klasik olarak belirlenmiştir. Klasik olarak tohumdan bakteri izolasyonu ile pozitif bulunan uygulamalardan gelişen koloniler ise saflaştırılarak DNA izolasyonu yapılmış ve real time PCR'da bunların gerçekten Cmm kolonisi olup olmadığı doğrulanmıştır.

4.4.3.1. Tohum ekstraksiyonu ve yarı seçici besi yerinde tohumda bakteri yoğunluğunun belirlenmesi

Tohum bulaşıklığının risk oluşturmaması için karantinaya tabii olan Cmm'nin tohumda 0 oranında bulunması istenmektedir. Dolayısı ile embriyoda taşınan Cmm'ye karşı başarılı bir tohum film kaplaması için 0 log CFU/tohum değerinin elde edilmesi gerekmektedir. Diğer bir ifade ile yapılan uçucu yağlar ile film kaplamanın %100 etkili olması hedeflenmiştir. *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının farklı dozları (250, 500, 1000 ve 5000 ppm) ile film kaplanan Cmm ile bulaşık domates tohumlarından tohum ekstraksiyonu yapılmış, SCM besi yerinde gelişen Cmm kolonileri üzerinden, logaritmik transformasyon yapılarak, log CFU/tohum değerleri hesaplanmıştır. Log CFU/tohum verileri üzerinden varyans analizi yapılmış ve ortalamalar arası farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre gruplandırılmıştır. Log CFU/tohum değerleri üzerinden Abbott formülüne göre % etki değerleri hesaplanmıştır.

Cmm ile bulaşık domates tohumuna film kaplama ile yüklenen farklı uçucu yağların farklı dozlarının tohumda bakteri yoğunluğuna etkisini belirlemek üzere yapılan film kaplamanın log CFU/tohum değerleri üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir. Yapılan varyans analizi sonuçlarına göre, log CFU/tohum değerleri üzerine yağ x doz interaksiyonunun, uçucu yağların ve dozların $P \leq 0.01$ olasılık düzeyinde istatistiki olarak önemli etkilerinin olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.12).

Araştırma bulgularına ait Çizelge 4.12'de belirtildiği gibi, uçucu yağ x doz interaksiyonunda *O. vulgare*'nin 1000 ppm ve üstü, *O. onites*, *L. stoechas* ve *R. officinalis*'in 5000 ppm dozu 0 log CFU/tohum değeri vererek en yüksek etkiyi göstermişlerdir. Uçucu yağlar içerisinde en düşük log CFU/tohum değerini veren *O. vulgare* en etkili uçucu yağ olmuş, bunu sırasıyla *O. onites*, *L. stoechas* ve *R. officinalis* izlemiştir. Dozlar içerisinde 5000 ppm 0 log CFU/tohum değeri ile en etkili doz olmuş, dozlara bağlı olarak log CFU/tohum değerinin düştüğü saptanmıştır.

Çizelge 4.12. Uçucu yağlar ile film kaplamanın tohumda bakteri yoğunluğuna etkisi- tohum ekstraksiyonu ve SCM besi yerinde gelişim

Uçucu yağlar	Dozlar (ppm)	Log CFU/tohum	% Etki		
Bakır sülfat		1.20	72.00		
Steril saf su		4.24	0.00		
<i>L. stoechas</i>	250	2.44	43.00		
	500	1.44	66.00		
	1000	1.32	67.00		
	5000	0.00	100.00		
	<i>Ortalama</i>	1.30	69.00		
<i>O. onites</i>	250	1.90	55.00		
	500	1.30	69.00		
	1000	1.20	72.00		
	5000	0.00	100.00		
	<i>Ortalama</i>	1.10	74.00		
<i>O. vulgare</i>	250	1.82	57.00		
	500	1.25	73.00		
	1000	0.00	100.00		
	5000	0.00	100.00		
	<i>Ortalama</i>	0.77	83.00		
<i>R. officinalis</i>	250	2.82	34.00		
	500	2.22	48.00		
	1000	1.41	67.00		
	5000	0.00	100.00		
	<i>Ortalama</i>	1.62	62.00		
Dozlar	250	2.25	47.00		
	500	1.54	64.00		
	1000	0.99	77.00		
	5000	0.00	100.00		
	<i>Ortalama</i>	1.20	72.00		
Tohumda bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum)					
Dozlar (ppm)	<i>L. stoechas</i>	<i>O. onites</i>	<i>O. vulgare</i>	<i>R. officinalis</i>	Doz ortalaması
250	2.44 K	1.90 I	1.82 H	2.82 L	2.25 e
500	1.44 G	1.30 D	1.25 C	2.22 İ	1.54 d
1000	1.32 E	1.20 B	0.00 A	1.41 F	0.99 b
5000	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.00 a
Yağ ortalaması	1.30 c	1.10 b	0.77 a	1.61 d	
Bakır sülfat	1.20 B				1.20 c
Steril saf su	4.24 M				4.24 f

¹Yağ x doz interaksyonuna ait ortalamalar büyük harf, yağ ve dozların ortalamaları ise küçük harfler kullanılarak gruplandırılmıştır. Aynı büyük ve küçük harf ile gösterilen uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan's Multiple Range Test, P≤0.01)

²%Etki Abbott formülüne göre hesaplanmıştır:%Etki: Kontrol-Uygulama / Kontrol x 100

4.4.3.2. Farklı uçucu yağlar ile film kaplı domates tohumlarında Cmm'nin real time PCR ile belirlenmesi

Tohum ekstraksiyonu ile yarı seçici besi yerinde Cmm'nin tespitinde olası yanlışların ve yanlış sonuçların önüne geçilmesi amaçlanmıştır. *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının farklı dozları (250, 500, 1000 ve 5000 ppm) ile kaplanan Cmm ile bulaşık domates tohumlarından tohum ekstraksiyonu yapılmış, SCM besi yerinde gelişen Cmm kolonileri saflaştırılarak DNA izolasyonu (Promega DNA izolasyon kiti) yapılmıştır. EK-1'de verilen protokole göre yapılan izolasyondan sonra, uygulamalara ait DNA örnekleri real time PCR'da analiz edilmiştir.

SCM besi yerinde 0 log CFU/tohum değerini veren, *O. vulgare* uçucu yağının 5000 ppm'lik dozu, referans Cmm izolatının gösterdiği pik veya erime eğrisine göre eşik değerinin altında kalarak negatif sonuç vermiş ve burada Cmm gelişimi olmadığı doğrulanmıştır (Şekil 4.13).

Uçucu yağ ile film kaplanan tohumlardan yapılan ekstraksiyonun besi yerine yayma ve burada koloni gelişiminin takibi ve sayımı sonuçlarında bütün uçucu yağların 5000 ppm'lik dozunda Cmm gelişimi görülmezken, real time PCR sonuçlarına göre, *R. officinalis*'nin 5000 ppm'lik dozundan yapılan tohum ekstraksiyonu Cmm açısından pozitif sonuç vermiştir. Çizelge 4.13'de belirtildiği gibi, doz artışına bağlı olarak ortalama Ct değerlerinin de artışı ve *O. vulgare*'nin 1000 ppm ve üstü dozlarında, *L. stoechas* ve *O. onites*'in 5000 ppm'de Ct değeri 35'in üstüne çıkmış ve Cmm açısından negatif değer vermiştir. *R. officinalis*'te ise doz artışına bağlı olarak Ct değerleri artmış, hiçbir dozda 35'ün üstüne çıkmamış ve bütün dozlar Cmm açısından pozitif sonuç vermiştir.

Cmm tohumunda embriyo ve tohum kabuğunda taşındığından, karantina etmeni olması ve 10^1 CFU/ml bulaşıklığın bile bütün tohum lotunu bulaştırma riski nedeni ile, 0 bulaşıklık istenmektedir. Yapılan tohum film kaplamanın da etkili olabilmesi için %100 temiz tohum oranı ve 0 log CFU/tohum değerini vermesi gerekmektedir. Besiyerinde (SCM) gelişim ve real time PCR sonuçlarına göre, *O. vulgare*'nin 1000 ppm ve üstü, *L. stoechas* ve *O. onites*'in 5000 ppm ve üstü dozları 0 log CFU/tohum değeri verdiklerinden çalışmanın hedefine yönelik uçucu yağ film kaplama uygulamaları olmuştur (Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13).

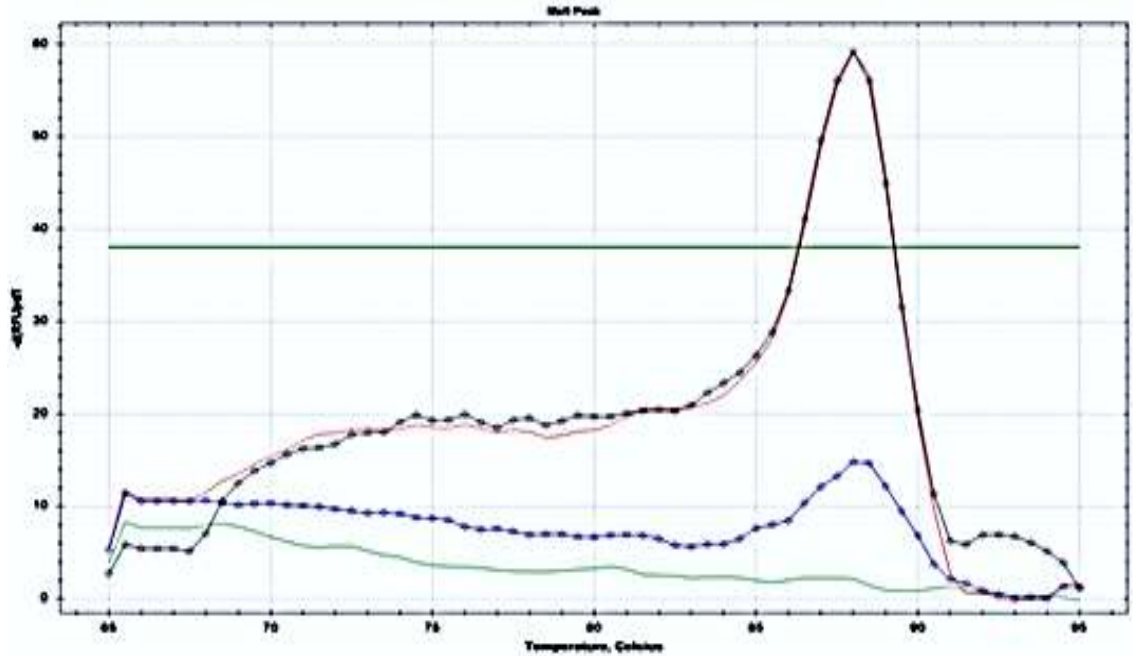
O. vulgare'nin 5000 ppm dozundan yapılan DNA'nın PCR için negatif kontrol olan suya yakın bir değer vererek Cmm gelişimi açısından negatif sonuç vermiştir. PCR için pozitif kontrolün (direkt Cmm 3/1A izolatına ait DNA'nın) ve deneme için negatif kontrolün (steril saf su, Cmm ile bulaşık tohum sadece su+polimer karışımı ile kaplanması) tohum ekstraksiyonundan izole edilen DNA, 88 °C'deki erime eğrisi ile aynı pikleri vermişler ve her ikisinin de Cmm oldukları doğrulanmıştır. PCR için negatif kontrol olan saf su ise hiç pik vermeyerek sonuçları teyit etmiştir (Şekil 4.13).

Tohum ekstraksiyonu ve besi yerinde gelişim sonucunda *R. officinalis*'in diğer bütün dozlarında tohumda bulaşıklık olduğu tespit edilirken, 5000 ppm dozunda 0 log CFU/tohum değeri elde edilmiştir (Çizelge 4.12). Fakat aynı dozun real time PCR ile doğrulamasında 34 Ct değeri ile bu dozda uçucu yağ uygulamasının tohumdaki Cmm'yi tamamen yok etmediği ve Cmm açısından pozitif sonuç verdiği görülmüştür. Bu ilginç bir bulgudur. Tohum ekstraksiyonu ve besiyerinde gelişim değerleri *R. officinalis*'in 5000 ppm dozunun etkili olduğu ve başarılı bir sonuç alındığını göstermiştir. Fakat real time PCR sonuçları *R. officinalis*'in 5000 ppm dozunda az da olsa Cmm açısından bulaşıklık olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu araştırma bulgusu *R. officinalis*'in 5000 ppm dozunun 0 log CFU/tohum değeri ile domates tohumunda Cmm gelişimini tamamen engellediği ve %100 etkili bir uygulama olduğu yanılığını ortadan kaldırmıştır (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. Uçucu yağ ile film kaplanan domates tohumlarının ekstraksiyonundan Cmm gelişiminin real time PCR ile tespiti ve ortalama Ct değerleri

Uygulamalar/dozlar (ppm)	Ortalama Ct	<Ct (35) >	Pozitif (+) / Negatif (-)
Cmm 3/1A ⁴	18.00	<	+
Steril saf su ³	19.00	<	+
Bakır sülfat ²	32.00	<	+
Su ¹	0.00	0.00	-
<i>L. stoechas</i>			
250	28.00	<	+
500	32.00	<	+
1000	33.00	<	+
5000	0.00	0.00	-
<i>O. onites</i>			
250	29.00	<	+
500	28.00	<	+
1000	30.00	<	+
5000	0.00	0.00	-
<i>O. vulgare</i>			
250	30.00	<	+
500	34.00	<	+
1000	0.00	0.00	-
5000	0.00	0.00	-
<i>R. officinalis</i>			
250	23.00	<	+
500	29.00	<	+
1000	33.00	<	+
5000	34.00	<	+

¹PCR için negatif kontrol, ²Deneme için pozitif kontrol, ³Deneme için negatif kontrol, ⁴Deneme ve PCR için pozitif kontrol



1:—Cmm 3/1A (pozitif kontrol), —:O. vulgare 5000 ppm, — :Steril saf su (Cmm bulaşık tohum+uygulama yapılmamış tohum), —: su (Real time PCR için kontrol).

Şekil 4.14. Uçucu yağ ile film kaplanan domates tohumlarında Cmm'nin real time PCR ile tespitine ait görüntü

4.4.4. Uçucu yağ film kaplamanın çimlenme oranına etkisi

Tohum uygulamalarına benzer şekilde film kaplamada da hedef patojenin gelişiminin önlenmesi amacı ile tohumla yüklenen uçucu yağın tohumun çimlenme oranı, çıkış oranı, çimlenme zamanı gibi tohum kalitesine yönelik parametreleri olumsuz etkilememesi gerekmektedir. Uçucu yağların film kaplama ile domates tohumuna yüklenmesinin tohumun çimlenme oranı ve çimlenme zamanı gibi parametreleri nasıl etkilediğinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Domates tohumları *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının 4 farklı dozu (250, 500, 1000 ve 5000 ppm) ile film kaplanmıştır. Film kaplı domates tohumlarında çimlenen tohum sayısı (adet), çimlenme oranı (%) ve ortalama çimlenme zamanı (gün) ile ilgili değerler alınarak, uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumunun çimlenme oranındaki değişim araştırılmıştır.

Yapılan gözlemler sonucunda film kaplamada kullanılan polimerin ve uçucu yağların kökçük çıkışına engel bir bariyer oluşturmadıkları görülmüştür. Uçucu yağ ve doza bağlı olarak, hemen hemen bütün uygulamalarda tohumdan kökçük çıkışının gerçekleştiği tespit edilmiştir. Polimerin hidrofilik (suyu seven) yapısı ile uçucu yağlar ile film kaplama sonrası çimlendirme denemelerinde çimlenme suyuyla kolaylıkla dağıldığı ve tohumun çimlenme için su ve oksijen alımına olanak verdiği tespit edilmiştir. Kökçük çıkışları ağırlıklı olarak üçüncü günde yoğunlaşmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. *O. vulgare* uçucu yağı (5000 ppm) ile film kaplanan domates tohumlarında üçüncü günde kökçük çıkışları ve tohum çimlenmesine ait görüntü

Yapılan varyans analizi sonuçlarına göre domates tohumlarının çimlenen tohum sayısı ve çimlenme oranı üzerine film kaplama ile tohumla yüklenen yağ x doz etkileşiminin, uçucu yağların ve dozların $P \leq 0.05$ olasılık düzeyinde istatistik olarak önemli etkilerinin olduğu saptanırken, aynı parametrelerin sırasıyla ($P=0.0856$,

P=0.2040 ve P=0.2530) çimlenme zamanı üzerine istatistiki olarak önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Uçucu yağlar ile film kaplamanın domates tohumlarının çimlenme oranına etkisi

Uçucu yağlar	Dozlar (ppm)	Çimlenen tohum sayısı	Çimlenme oranı (%) ²	Ortalama Çimlenme zamanı (gün) ²	
Steril saf su		46.00	91.00	3.40	
Bakır sülfat		44.00	88.00	3.40	
<i>L. stoechas</i>	250	44.00	88.00	3.00	
	500	42.00	84.00	3.00	
	1000	40.00	80.00	3.00	
	5000	37.00	74.00	3.40	
	Ortalama	41.00	82.00	3.10	
<i>O. onites</i>	250	41.00	82.00	3.00	
	500	38.00	76.00	3.00	
	1000	37.00	74.00	3.00	
	5000	35.00	70.00	3.60	
	Ortalama	38.00	76.00	3.20	
<i>O. vulgare</i>	250	39.00	78.00	3.00	
	500	37.00	74.00	3.10	
	1000	36.00	72.00	3.20	
	5000	32.00	64.00	3.20	
	Ortalama	36.00	72.00	3.10	
<i>R. officinalis</i>	250	41.00	82.00	3.10	
	500	40.00	80.00	3.00	
	1000	39.00	78.00	3.20	
	5000	36.00	72.00	3.20	
	Ortalama	39.00	78.00	3.10	
Dozlar	250	41.00	82.00	3.00	
	500	39.00	78.00	3.00	
	1000	38.00	76.00	3.10	
	5000	35.00	70.00	3.40	
	Ortalama	38.00	76.00	3.10	
Çimlenen tohum sayısı (adet)					
Dozlar (ppm)	<i>L. stoechas</i>	<i>O. onites</i>	<i>O. vulgare</i>	<i>R. officinalis</i>	Doz ortalaması
250	44.00 A	41.00 C	39.00 E	41.00 C	41.00 b
500	42.00 B	38.00 F	37.00 G	40.00 D	39.00 c
1000	40.00 D	37.00 G	36.00 H	39.00 E	38.00 d
5000	37.00 G	35.00 I	32.00 İ	36.00 H	35.00 e
Yağ ortalaması	41.00 a ¹	38.00 c	36.00 d	39.00 b	
Bakır sülfat	46.00 A				46.00 a
Steril saf su	44.00 A				44.00 a
Ortalama çimlenme zamanı (gün)					
Uçucu yağ	P=0.2040				
Doz	P=0.2530				
Uçucu yağ x doz	P=0.0856				

¹Yağ x doz interaksyonuna ait ortalamalar büyük harf, yağ ve dozların ortalamaları ise küçük harfler kullanılarak gruplandırılmıştır. Aynı büyük ve küçük harf ile gösterilen uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan's Multiple Range Test, P≤0.05)

²Uçucu yağlar ile film kaplanan tohumlardan 4 x 50 adet tohum her bir uygulama için filtre kağıtları arasında çimlenme testine alınmıştır. 3.günden itibaren günlük sayımların aritmetik ortalaması alınarak çimlenme oranı (%) ve ortalama çimlenme zamanı (gün) belirlenmiştir

Çizelge 4.14'de belirtildiği gibi, uçucu yağ x doz interaksyonunda 44 adet çimlenen tohum sayısı ile *L. stoechas*'ın 250 ppm dozu en yüksek değeri ve dolayısı ile en yüksek çimlenme oranını verirken, 32 adet ile *O. vulgare*'nin 5000 ppm dozu en düşük çimlenen tohum sayısı ve çimlenme oranını vermiştir.

Uçucu yağ ve dozların kontrollere (bakır sülfat ve saf su) göre, çimlenme oranını düşürdüğü, uygulamalar içerisinde en yüksek çimlenme oranını *L. stoechas* ve en düşük ise *O. vulgare* uçucu yağlarının verdiği tespit edilmiştir. Doz artışına bağlı olarak bütün uçucu yağlarda çimlenen tohum sayısı ve çimlenme oranının düştüğü saptanmıştır. Dozlar içerisinde en yüksek doz olan 5000 ppm en düşük (35 adet, %70), 250 ppm ise en yüksek çimlenen tohum sayısı ve çimlenme oranını vermiştir (41 adet, %82) (Çizelge 4.14).

Yağ x doz interaksyonu, uçucu yağlar ve dozlar domatesin ortalama çimlenme zamanını değiştirmemiştir. Kontrollerin (Bakır sülfat ve saf su) ortalama çimlenme zamanı 3.4 gün iken, uçucu yağ uygulamalarında ortalama çimlenme zamanının 3.0-3.4 gün arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.14).

4.4.5. Uçucu yağlar ile film kaplamanın çıkış oranına etkisi

Uçucu yağlar ile film kaplı domates tohumlarının pratikte kullanılan fide yetiştirme harcındaki çıkış oranı ve üniform fide çıkışına dair etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Domates tohumları *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının 4 farklı dozu (250, 500, 1000 ve 5000 ppm) ile film kaplanmıştır. Film kaplı domates tohumlarında çıkan tohum sayısı (adet), çıkış oranı (%) ve ortalama çıkış zamanı (gün) ile ilgili değerler alınarak, uçucu yağlar ile film kaplamanın domates tohumunun çıkış oranındaki ve çıkış zamanındaki değişime etkisi araştırılmıştır.

Varyans analizi sonuçlarına göre, yağ x doz interaksyonunun çıkan tohum sayısı üzerine etkisi önemsiz ($P=0.9998$) tespit edilirken, uçucu yağların ve dozların çıkan tohum sayısı üzerine etkisi $P\leq 0.05$ olasılık düzeyinde istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Yağ x doz interaksyonunun ve uçucu yağların sırasıyla ortalama çimlenme zamanı üzerine etkileri istatikselsel olarak önemsiz bulunurken ($P=0.5123$, $P=0.2940$), dozlarının ise $P\leq 0.05$ olasılık düzeyinde istatistiki olarak önemli etkisinin olduğu, yüksek dozlar ile düşük dozların ayrı gruplarda yer aldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15’de belirtildiği gibi, uçucu yağlar içerisinde *origanum* türleri en düşük çimlenen tohum sayısı ve çimlenme oranını vererek aynı istatistiki grup içinde yer almışlardır. Benzer şekilde en yüksek çimlenme oranı veren *L. stoechas* ve *R. officinalis*’te aynı grupta yer almışlar ve çıkış oranları açısından ikisi arasında önemli bir farklılık tespit edilememiştir.

Doz artışına bağlı olarak çıkan tohum sayısı ve çıkış oranı düşmüş, en yüksek çıkış oranını en düşük doz olan 250 ppm vermiştir. Uçucu yağlar ile dozların çıkış oranı üzerine etkilerinde negatif linear bir ilişki olduğu ($r^2=0.94$) tespit edilmiştir (Çizelge 4.15).

Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen uçucu yağ ve dozlar domates tohum çıkış zamanında bir değişime neden olmamıştır. Kontrollerin ortalama çıkış zamanı 3.4-3.5 gün iken, uçucu yağ ve dozların ortalama çıkış zamanı 3.0-3.7 gün arasında değişim göstermiştir (Çizelge 4.15). Uçucu yağ ile film kaplanan domates

tohumlarının çıkış zamanlarının kontrole göre çok fazla değişmemesi, fidelikte yetiştirme harcında üniform çıkış için önemlidir.

Çizelge 4.15. Uçucu yağlar ile film kaplamanın domates tohumlarının çıkış oranına etkisi

Uçucu yağlar	Dozlar (ppm)	Çıkan tohum sayısı (adet) ²	Çıkış oranı (%) ²	Çıkış zamanı (gün) ²		
Bakır sülfat		22.00	86.00	3.50		
Steril saf su		23.00	92.00	3.40		
<i>L. stoechas</i>	250	22.00	86.00	3.00		
	500	22.00	83.00	3.20		
	1000	20.00	80.00	3.60		
	5000	19.00	75.00	3.60		
	<i>Ortalama</i>	20.00	81.00	3.40		
<i>O. onites</i>	250	21.00	82.00	3.20		
	500	20.00	78.00	3.20		
	1000	18.00	72.00	3.20		
	5000	17.00	69.00	3.50		
	<i>Ortalama</i>	19.00	75.00	3.30		
<i>O. vulgare</i>	250	20.00	80.00	3.00		
	500	19.00	77.00	3.40		
	1000	18.00	73.00	3.60		
	5000	18.00	70.00	4.00		
	<i>Ortalama</i>	19.00	75.00	3.50		
<i>R. officinalis</i>	250	21.00	84.00	3.40		
	500	20.00	80.00	3.60		
	1000	20.00	78.00	3.40		
	5000	18.00	73.00	3.70		
	<i>Ortalama</i>	20.00	79.00	3.50		
Dozlar	250	22.00	88.00	3.10		
	500	20.00	80.00	3.30		
	1000	19.00	76.00	3.50		
	5000	18.00	71.00	3.70		
	<i>Ortalama</i>	20.00	79.00	3.40		
Uçucu Yağ	<i>L. stoechas</i>	<i>O. onites</i>	<i>O. vulgare</i>	<i>R. officinalis</i>	Bakır sülfat	Saf su
<u>CTS</u>	20.00 C	19.00 D	19.00 D	20.00 C ¹	22.00 B	23.00 A
<u>CZ</u>	P=0.2940					
Dozlar (ppm)	250	500	1000	5000		
<u>CTS</u>	22.00 b	20.00 c	19.00 d	18.00 e	22.00 b	23.00 a
<u>CZ</u>	P=0.2020					
Uçucu yağ x doz						
<u>CTS</u>	P=0.9998					
<u>CZ</u>	P=0.5123					

¹Yağlara ait ortalamalar büyük harf, dozlara ait ortalamalar ise küçük harf ile gösterilmiştir. Aynı büyük ve küçük harf ile gösterilen uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan's Multiple Range Test, P≤0.05)

²Uçucu yağlar ile film kaplanan tohumlardan 4 x 50 adet tohum her bir uygulama için filtre kağıtları arasında çimlenme testine alınmıştır. 3.günden itibaren günlük sayımların aritmetik ortalaması alınarak çimlenme oranı (%) ve ortalama çimlenme zamanı (gün) belirlenmiştir. ÇTZ: Çıkan tohum sayısı, ÇZ: Çıkış zamanı

4.4.6. Uçucu yağ film kaplamanın fidede bakteri yoğunluğuna etkisi

Tohumla taşınan Cmm'nin tohumdan fideye geçişi ile fideler ve dolayısı ile bütün fidelik bulaşık hale gelebilmektedir. Cmm'nin tohumdan fideye geçişine dair farklı bilgiler olsa da, düşük bir bulaşıklığın bile geçme olasılığı dikkate alınmak durumundadır. Tohum lotu içerisinde yapılan örneklemede 10 000 adet domates tohumundan 1 tanesinin bile Cmm ile bulaşık olması bütün tohum lotunu ve fideligi bulaştırabilen ve epidemiy oluşturabilmektedir. Her ne kadar tohumda bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum) değerleri belirlense de, bu tohumlardan gelişen fidede

de bakteri yoğunluğunun belirlenmesi gerekmektedir. Cmm ile bulaşık domates tohumlarına farklı uçucu yağların farklı dozları film kaplama ile yüklenmiştir. Laboratuvar koşullarında her biri ayrı petride çimlendirilen 25 adet fidecik ve serada çıkan fidelerin kotiledon yapraklarından örnekler alınmıştır. Bunlar doku parçalayıcı ile ekstrakte edildikten sonra, yarıseçici besi yerinde gelişime bırakarak, gelişen koloniler tek tek sayılarak fidede bakteri yoğunluğu (log CFU/fide) belirlenmiştir. Besi yerinde gelişen koloniler saflaştırılmış ve DNA izolasyonu yapılmış ve EK-1’de verilen protokole göre real time PCR’da fidelerde Cmm olup olmadığı doğrulanmıştır.

4.4.6.1. Fide ekstraksiyonu ve yarı seçici besi yerinde fidede bakteri yoğunluğunun belirlenmesi

Cmm bulaşıklığının yapılan uçucu yağlar ile film kaplama sonucu fideye geçip geçmediği, 0 log CF/tohum veren uygulamaların, 0 log CFU/fide verip vermediği belirlenmiştir. *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının farklı dozları (250, 500, 1000 ve 5000 ppm) kaplanan Cmm ile bulaşık domates tohumlarından *in vitro* koşullarda gelişen fideciklerden (her bir uygulama için 25 adet) ve serada çıkış yapan fidelerin kotiledon yapraklarından fide ekstraksiyonu yapılmıştır. SCM besi yerine yayma yapılmış ve gelişen Cmm kolonileri üzerinden logaritmik transformasyon yapılarak log CFU /fide değerleri hesaplanmıştır. Log CFU/fide verileri üzerinden varyans analizi yapılmış ve ortalamalar arası farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre gruplandırılmıştır. Log CFU/fide değerleri üzerinden Abbott formülüne göre % etki değerleri hesaplanmıştır.

Cmm ile bulaşık domates tohumuna film kaplama ile yüklenen farklı uçucu yağların farklı dozlarının tohumda bakteri yoğunluğuna etkisini belirlemek üzere yapılan film kaplamanın log CFU/tohum değerleri üzerine olduğu gibi fidede bakteri yoğunluğu (log CFU/fide) üzerine de etkili olduğu tespit edilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre, log CFU/fide değerleri üzerine yağ x doz interaksiyonunun, uçucu yağların ve dozların $P \leq 0.01$ olasılık düzeyinde istatistiki olarak önemli etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16’da görüldüğü üzere uçucu yağ x doz interaksiyonunda 1000 ppm ve üstü dozlarda *O. vulgare* 0 log CFU/fide değeri ile fidedeki Cmm’ye karşı en etkili uçucu yağ olmuştur. Genel olarak, *O. vulgare*’nin 1000 ppm ve üstü dozları, *O. onites*, *L. stoechas* ve *R. officinalis*’in ise 5000 ppm ve üstü dozları 0 değeri vererek çalışmanın amacına en uygun uygulamalar olarak saptanmış ve istatistiki olarak diğerlerinden farklı grupta yer almışlardır.

Uçucu yağlar içerisinde 0.71 log CFU/fide değeri ile *O. vulgare* en düşük log CF/fide değerini vererek fidedeki Cmm’ye karşı en yüksek etkili (%84 etki) uçucu yağ olarak tespit edilmiştir. Onu sırasıyla *O. onites*, *L. stoechas* ve *R. officinalis* izlemiş ve bütün uçucu yağlar istatistiki olarak farklı gruplarda yer almışlardır. Origanum türü kekik uçucu yağları film kaplama ile tohumdaki Cmm’nin gelişimini engelleyen, fideye geçmesini önleyen ve fidedeki Cmm’yi inhibe eden en yüksek etkili uçucu yağlar olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16’da gösterildiği gibi doz artışına bağlı olarak fidelerde log CFU/fide değeri düşmüştür. En yüksek doz olan 5000 ppm *L. stoechas*, *O. onites* ve *O. vulgare*’de 0 log CFU/fide değeri verirken, 250 ppm’de bütün uçucu yağlarda Cmm gelişmiştir.

Çizelge 4.16. Uçucu yağlar ile film kaplamanın fidede bakteri yoğunluğuna etkisi-fide ekstraksiyonu ve SCM besi yerinde gelişim

Uçucu yağlar	Dozlar (ppm)	Log CFU /fide	% Etki		
Bakır sülfat		1.22	71.00		
Steril saf su		4.30	0.00		
<i>L. stoechas</i>	250	2.44	43.00		
	1000	1.32	69.00		
	500	1.43	67.00		
	5000	0.00	100.00		
	<i>Ortalama</i>	1.30	70.00		
<i>O. onites</i>	250	1.78	58.00		
	500	1.34	69.00		
	1000	1.24	71.00		
	5000	0.00	100.00		
	<i>Ortalama</i>	1.09	75.00		
<i>O. vulgare</i>	250	1.74	60.00		
	500	1.11	74.00		
	1000	0.00	100.00		
	5000	0.00	100.00		
	<i>Ortalama</i>	0.71	84.00		
<i>R. officinalis</i>	250	2.83	34.00		
	500	1.87	56.00		
	1000	1.41	67.00		
	5000	0.00	100.00		
	<i>Ortalama</i>	1.53	64.00		
Dozlar	250	2.20	49.00		
	500	1.41	67.00		
	1000	0.98	77.00		
	5000	0.00	100.00		
	<i>Ortalama</i>	1.15	73.00		
Fidede bakteri yoğunluğu (log CFU/fide)					
Dozlar	<i>L. stoechas</i>	<i>O. onites</i>	<i>O. vulgare</i>	<i>R. officinalis</i>	Doz ortalaması
250	2.44 H	1.78 F	1.74 F	2.83 I	2.20 e
500	1.43 E	1.34 D	1.11 B	1.87 G	1.41 d
1000	1.32 D	1.24 C	0.00 A	1.41 E	0.98 b
5000	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.00 a
Yağ ortalaması	1.30 c	1.09 b	0.71 a ¹	1.53 d	
Bakır sülfat	1.22 C				1.22 c
Steril saf su	4.30 İ				4.30 f

¹Yağ x doz interaksiyonuna ait ortalamalar büyük harf, yağ ve dozların ortalamaları ise küçük harfler kullanılarak gruplandırılmıştır. Aynı büyük ve küçük harf ile gösterilen uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan’s Multiple Range Test, P≤0.01)

²%Etki Abbott formülüne göre hesaplanmıştır. %Etki: Kontrol-Uygulama/Kontrol x 100

4.4.6.2. Farklı uçucu yağlar ile film kaplı domates tohumlarından gelişen fidelerde Cmm’nin real time PCR ile belirlenmesi

L. stoechas, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının farklı dozları (250, 500, 1000 ve 5000 ppm) ile kaplanan Cmm ile bulaşık domates fidelerinden fide ekstraksiyonu yapılmış, SCM besi yerinde gelişen Cmm kolonileri saflaştırılarak DNA

izolasyonu yapılmıştır. İzolasyondan sonra, EK-1’de verilen protokole göre fidelere Cmm’nin tespitine yönelik real time PCR ile analiz edilmiştir.

Cmm’nin tohumda karantina prosedürleri gereği istenen 0 bulaşıklık değerini 0 log CFU/fide ile *O. vulgare*’nin 1000 ppm ve üstü, *L. stoechas* ve *O. onites*’in ise 5000 ppm dozlarının verdiği, real time PCR sonuçları da örtüşerek, çalışmanın amacına uygun uçucu yağlar ve dozlar oldukları görülmüştür. Fide ekstraksiyonu ve yarı seçici besi yerinde gelişme verilerine göre 0 log CFU/fide veren *R. officinalis*’in 5000 ppm dozunun ise real time PCR analizi sonuçlarının 34 Ct değeri ile Cmm açısından pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Real time PCR sonuçlarına göre *R. officinalis*’in hiçbir dozu 0 log CFU/fide değerini vermediğinden amaca uygun başarılı bir uygulama olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17’de gösterildiği gibi doz artışına bağlı olarak Ct değerlerinin de arttığı görülmüştür. Uçucu yağ dozları ve Ct değerleri arasında pozitif doğrusal bir ilişki olduğu saptanmıştır. Denemenin pozitif kontrolleri olan Cmm 3/1A izolatının saf kültüründen elde edilen DNA’lar ile bunun domates tohumuna bulaştırılması ve sonrasında sadece su+polimer karışımı ile film kaplanan tohumlardan izole edilen DNA’nın yakın Ct değeri verdiği ve Cmm açısından pozitif olduğu tespit edilmiştir. Sadece su ile film kaplanan Cmm ile bulaşık domates tohumlarından tekrar elde edilen kolonilerin Cmm olduğu real time PCR ile teyit edilmiş ve Cmm 3/1A ile tohum bulaştırılmasının başarılı olduğu saptanmıştır.

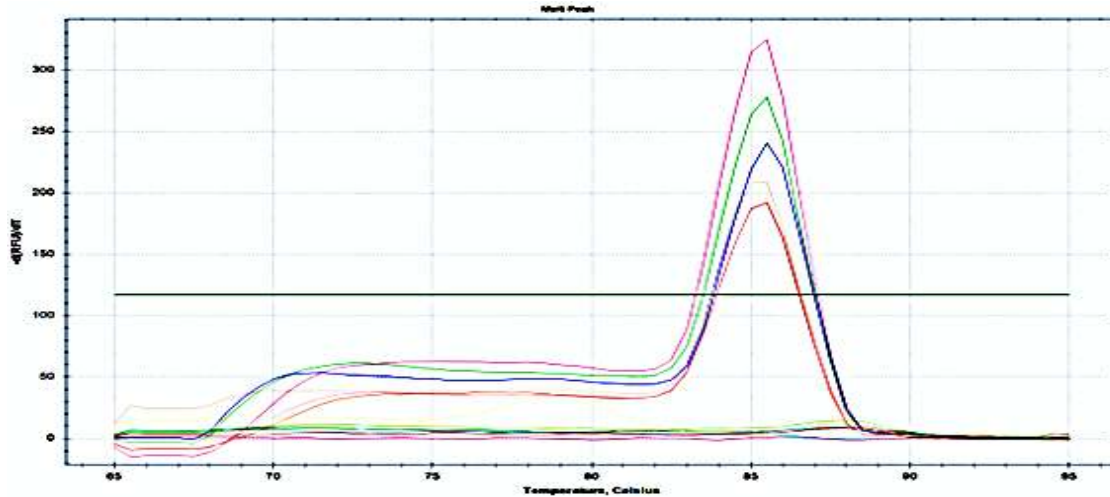
Cmm ile bulaşık domates tohumlarının uçucu yağlar ile film kaplanması sonrası, kaplı tohumlardan elde edilen Cmm DNA’larının, Cmm açısından pozitif uygulamalarının eşik değerin üstünde yer aldığı ve yaklaşık erime noktalarının (melt curve) 88°C olduğu tespit edilmiştir. Cmm açısından negatif sonuç veren uygulamaların (*O. vulgare*’in 1000 ppm ve üstü, *L. stoechas* ve *O. onites*’in 5000 ppm) eşik değerin altında kaldığı saptanmıştır. Cmm açısından negatif sonuç veren uygulamalara ait DNA’ların, real time PCR için negatif kontrol olan su, gram negatif bakteriler (*X. vesicatori*, *A. Citrulli*) ve saprofit gelişimlere (3 adet) ait DNA’lar ile aynı pikleri verdikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.16).

Diğer taraftan, uçucu yağ ile film kaplı tohumlardan tohum ekstraksiyonu ve besi yerinde gelişim ile elde edilen ve real time PCR analizi ile de doğrulanan log CFU/fide değerlerini, aynı tohumlardan yapılan çıkış testlerinde görülen Cmm simptomları da desteklemiştir. Çıkış testlerinde serada Cmm ile bulaşık domates tohumuna sadece su ile kaplanan (negatif kontrol) uygulamasında viyolde sıradaki bütün fidelerin kotiledon yapraklarında epidermis patlaması olduğu ve solgunluk belirtileri görülerek tamamının öldüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.19). Uçucu yağ uygulamalarında tıpkı real time PCR sonuçları gibi, *O. vulgare*’nin 1000 ve 5000 ppm, *L. stoechas* ve *O. onites*’in ise 5000 ppm dozlarında viyolde sıradaki hiçbir fidede Cmm simptomu gözlenmemiş ve fidelerin tamamen sağlıklı olduğu saptanmıştır. Belirtilen dozların dışında fidelere doza bağlı olarak kotiledon ve fide simptomları gözlemlenmiştir (Şekil 4.16, Şekil 4.17 ve Şekil 4.19).

Çizelge 4.17. Uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumlarından gelişen fidelerin ekstraksiyonunda Cmm'nin real time PCR ile tespiti ve ortalama Ct değerleri

Uçucu yağlar ve dozlar (ppm)	Ortalama C _t	< C _t (35)>	Pozitif (+) / Negatif (-)
Cmm 3/1A ⁴	18.00	<	+
Steril saf su ³	19.00	<	+
Bakır sülfat ²	32.00	<	+
Su ¹	0.00	0.00	-
<i>L. stoechas</i> .			
250	27.00	<	+
500	32.00	<	+
1000	33.00	<	+
5000	0.00	0.00	-
<i>O. onites</i>			
250	29.00	<	+
500	28.00	<	+
1000	30.00	<	+
5000	0.00	0.00	-
<i>O. vulgare</i>			
250	30.00	<	+
500	34.00	<	+
1000	0.00	0.00	-
5000	0.00	0.00	-
<i>R. officinalis</i>			
250	23.00	<	+
500	28.00	<	+
1000	34.00	<	+
5000	34.00	<	±

¹PCR için negatif kontrol, ²Deneme için pozitif kontrol, ³Deneme için negatif kontrol, ⁴ Deneme ve PCR için pozitif kontrol.

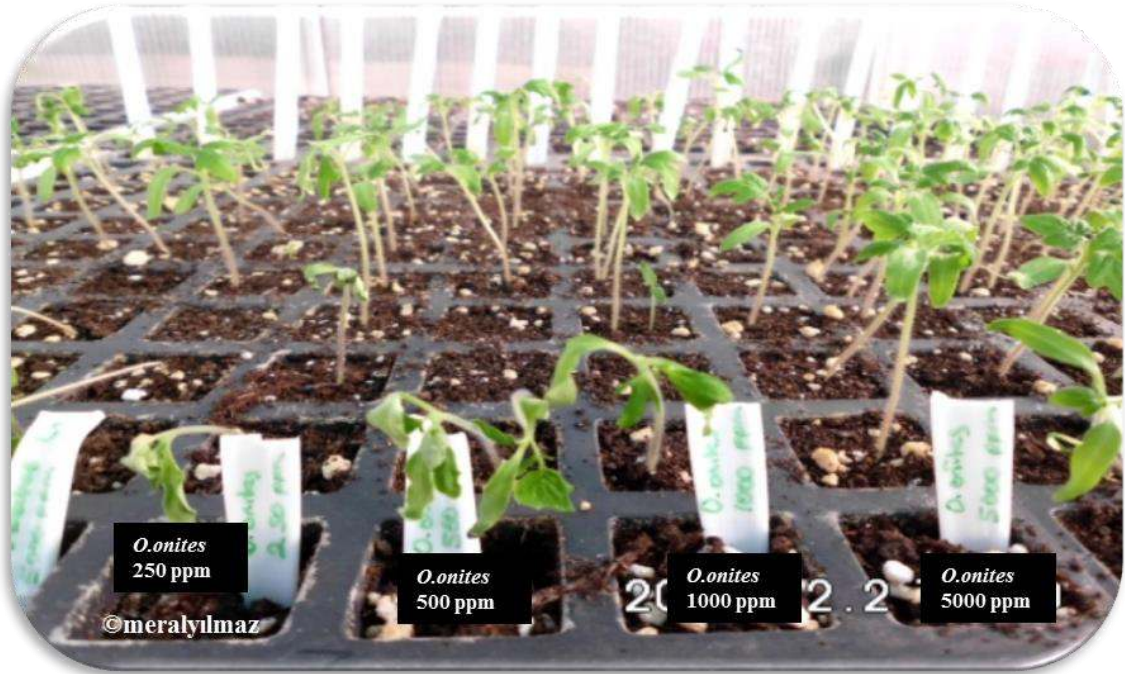


Her bir pik farklı bir uygulamayı gösterir. *O. vulgare*'nin 1000 ve 5000 ppm, *L. stoechas* ve *O. onites*'in 5000 ppm, *X. vesicatori*, *A. citrulli*, saprofit gelişimlere (3 adet) ait uygulamalar PCR için negatif kontrol olan su (yeşil düz çizgi) aynı piki göstermiş ve eşik değerinin altında kalarak Cmm açısından negatif sonuç vermiştir. Diğer bütün uygulamalar pozitif kontrol olan Cmm 3/1A izolatu (pembe düz çizgi) ile aynı piki göstererek Cmm açısından pozitif sonuç vermiştir. Cmm açısından pozitif piklerin erime sıcaklığı 88°C'dir.

Şekil 4.16. Uçucu yağ ile film kaplanan domates tohumlarından gelişen fidelerde Cmm'nin real time PCR ile tespitine ait görüntü



Şekil 4.17 *O. vulgare* uçucu yağı ile film kaplı tohumlardan gelişen fidelerde Cmm lezyonlarının ve sağlıklı fidelerin görüntüsü



Şekil 4.18. *O. onites* uçucu yağı ile film kaplı tohumlardan gelişen fidelerde Cmm lezyonlarının ve sağlıklı fidelerin görüntüsü



Şekil 4.19. *L. stoechas* uçucu yağı ile film kaplı tohumlardan gelişen fidelerde Cmm lezyonlarının ve sağlıklı fidelerin görüntüsü

4.5. Uçucu yağ film kaplamanın hazır fide üretim koşullarında bazı tohum ve fide kalite parametrelerine etkisinin belirlenmesine yönelik bulgular (Deneme 5)

Laboratuvar denemeleri genellikle optimum koşullar altında yapıldığından bunların toprak veya yetiştirme alanlarına adaptasyonlarında sonuçlar arasında farklılıklar görülebilmektedir. *İn vitro* koşullarda yürütülen bu denemelerde, deneme alanı homojen kabul edilmektedir. Örneğin toprak pH'sı, toprağın mikro ve makro besin elenti durumu, sulama, gübreleme, ışık, nem, sıcaklık vb birçok faktör yetiştirme ortamında deneme sonuçlarını etkileyebilmektedir. Yapılan araştırmanın nihai hedefi tohum ve özellikle de fide sektörüne yönelik olması, etkili ve uygulanabilir sonuçların bu sektörlerde uygulanabilmesini gerektirmektedir. *İn vitro*'da tohum uygulamaları ve film kaplamada etkili bulunan uçucu yağ ve dozlar ile film kaplamanın domates tohumunun hazır fide üretim serasındaki çıkış oranına etkisi araştırılmıştır. Uçucu yağ ile film kaplamanın özellikle üniform fide gelişimi açısından çıkış zamanına, sağlıklı kök ve sürgün gelişimi açısından ise fide yaş ve kuru ağırlıkları üzerine etkisi belirlenmiştir.

Araştırmanın bu bölümünde uçucu yağların ticari polimer ile film kaplanarak domates tohumuna yüklenmesi durumunda hazır fide üretim koşullarında çıkış oranına ve üniform fide çıkışını etkileyecek çıkış zamanına, sağlıklı fide gelişimine etkisi belirlenmek hedeflenmiştir. Cmm açısından temiz domates tohumları, *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının 3 farklı dozu (500, 1000 ve 5000 ppm) ile film kaplanmıştır. Hazır fide üretim serasında kurulan denemede, film kaplı

domates tohumlarının çıkış oranı (%), çıkış zamanı (gün), fide yaş ağırlığı (g) ve fide kuru ağırlığı değerleri alınmıştır. Bu parametreler üzerinden varyans analizi yapılmıştır.

Yapılan varyans analizi sonuçlarına göre yağ x doz interaksyonunun, uçucu yağların ve dozların çıkan tohum sayısı ve dolayısıyla çıkış oranı üzerine etkileri önemsiz tespit edilmiştir (sırasıyla $P=0.809$, $P=0.4982$ ve $P=0.7145$). Aynı parametrelerin ortalama çıkış zamanı, fide yaş ağırlığı ve fide kuru ağırlığı üzerine de etkilerinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18’de gösterildiği gibi film kaplama ile domates tohumuna yüklenen uçucu yağlar, genellikle kontrollere göre (saf su, orijinal tohum ve bakır sülfat uygulaması) daha düşük çıkış oranı (%69-72) vermiştir, fakat farklı istatistiki gruplarda yer almamışlardır. En düşük çıkış oranını *O. vulgare* vermiş (%69) ve çıkış oranları %69-72 arasında değişmiştir.

Film kaplama ile temiz domates tohumuna yüklenen uçucu yağ ve dozlar ortalama çıkış zamanı, fide yaş ağırlığı ve fide kuru ağırlığını değiştirmemiştir. Uçucu yağ film kaplaması domates tohumunun hazır fide serasında çıkış zamanını kontrole göre düşürmemiş veya yükseltmemiş, üniform tohum çıkışını etkileyecek antagonistik bir etki göstermemiştir. Kontrollerde ortalama çıkış zamanı 4.1-4.2 gün iken, uygulamalarda 3.0-4.2 arasında değişim göstermiştir. Benzer şekilde kontrollerde fide yaş ağırlığı 8.1-8.2 g iken uygulamalarda 8.0-8.7 arasında değişim göstermiştir. Fide kuru ağırlığında kontrollerde 5.3-5.4 g ağırlık görülürken, uygulamalarda 5.2-5.5 g arasında değişim görüldüğü saptanmıştır (Çizelge 4.18).

Uçucu yağ x doz interaksyonu, uçucu yağlar ve dozların fide gelişimi üzerine herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.20). Sadece bazı uçucu yağ uygulamalarında yaklaşık %1 oranında anormal fide (*L. stoechas*’da şerit gövde şeklinde) (Şekil 4.21) ve (*O. vulgare*’de erkek fide) (Şekil 4.22) görülmüştür.



Şekil 4.20. Hazır fide denemesinden görüntü

Çizelge 4.18. Uçucu yağlar ile film kaplamanın hazır fide üretim koşullarında tohumların çıkış oranı üzerine etkisi

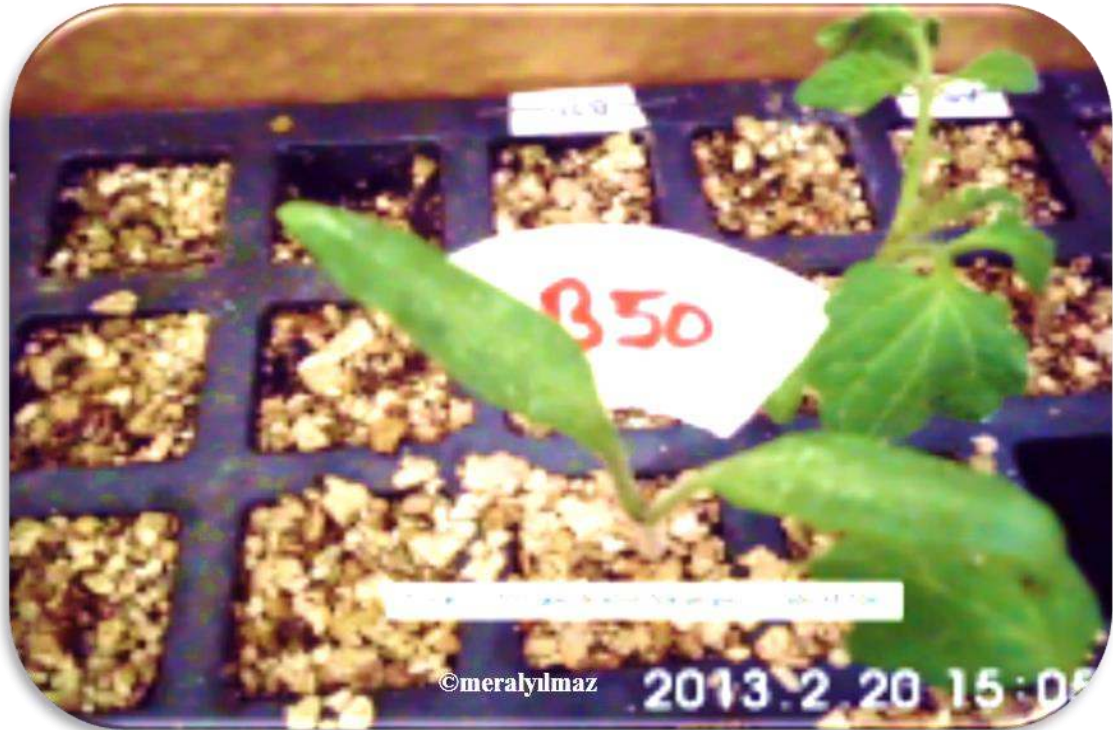
Uçucu yağlar	Dozlar (ppm)	Çıkan tohum sayısı (adet)	Çıkış oranı (%)	Ortalama Çıkış zamanı (gün)	Fide yaş ağırlığı (g)	Fide kuru ağırlığı (g)
Bakır sülfat		41.00	82.00	4.20	8.20	5.40
Orijinal tohum		42.00	84.00	4.20	8.10	5.30
Steril saf su		40.00	80.00	4.10	8.10	5.30
<i>L. stoechas</i>	500	38.00	75.00	4.00	8.00	5.40
	1000	35.00	70.00	3.00	8.30	5.50
	5000	35.00	70.00	4.20	8.50	5.30
	Ortalama	36.00	72.00	3.70	8.30	5.40
<i>O. onites</i>	500	35.00	70.00	5.00	8.10	5.40
	1000	35.00	69.00	4.00	8.70	5.70
	5000	33.00	66.00	3.00	8.50	5.50
	Ortalama	35.00	70.00	4.00	8.40	5.50
<i>O. vulgare</i>	500	36.00	72.00	3.60	8.10	5.40
	1000	35.00	70.00	4.00	8.50	5.30
	5000	34.00	68.00	4.00	8.50	5.50
	Ortalama	34.00	69.00	3.90	8.40	5.40
<i>R. officinalis</i>	500	37.00	73.00	3.00	8.10	5.40
	1000	36.00	72.00	4.10	8.50	5.50
	5000	35.00	70.00	4.20	8.50	5.20
	Ortalama	36.00	72.00	3.80	8.40	5.40
<i>Dozlar</i>	500	36.00	73.00	3.90	8.10	5.40
	1000	35.00	71.00	4.00	8.50	5.50
	5000	34.00	69.00	4.00	8.50	5.40
	Ortalama	35.00	71.00	4.00	8.40	5.50
		Çıkan tohum sayısı ¹	Ortalama çıkış zamanı ¹	Fide yaş ağırlığı ¹	Fide kuru ağırlığı ¹	
Uçucu yağ		P=0.4982	P=0.9143	P=0.8159	P=0.6430	
Doz		P=0.7145	P=0.7259	P=0.3644	P=0.9001	
Uçucu yağ x doz		P=0.8090	P=0.8349	P=0.4882	P=0.9463	

¹Çıkan tohum sayısı (adet), çıkış zamanı (gün), fide yaş ağırlığı (g) ve fide kuru ağırlığı (g) üzerine film kaplanan uçucu yağlar istatistiki olarak önemli bir etkide bulunmamıştır (Duncan's Multiple Range Test, P≤0.01)

²Fide yaş ve kuru ağırlıkların her tekrardan 3-5 gerçek yapraklı dönemdeki 10'ar fide üzerinden kaydedilmiştir.



Şekil 4.21. *L. stoechas* uçucu yağının 500 ppm dozu ile film kaplanan domates tohumundan gelişen anormal fidenin görüntüsü



Şekil 4.22. *O. vulgare* uçucu yağının 5000 ppm dozu ile film kaplanan domates tohumundan gelişen anormal fidenin (erkek fide) görüntüsü

4.6. Uçucu yağ film kaplamanın depolama sonrası Cmm ve tohum kalitesine etkisine yönelik bulgular (Deneme 6)

Uçucu yağlar ile film kaplamanın, tohumların kısa süreli depolama (+4°C’de 15, 30 ve 90 gün depolama) sonrası tohum kalitesi (tohumların çıkış oranı) ve Cmm üzerine (temiz tohum oranı ve tohumda bakteri yoğunluğu) etkileri araştırılmıştır. Burada özellikle Cmm açısından başarılı uygulamaların (uçucu yağ dozları) film kaplama sonrası 15 gün ile en fazla 3 ay içerisinde incelenen parametrelerde bir değişimin olup olmadığı belirlenmiştir. Depolama sonrası elde edilen çıkış oranı (%), temiz tohum oranı (%) ve tohumda bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum) ile ilgili veriler, hiç depolama yapmaksızın film kaplama sonrası analize alınan tohumların verileri ile karşılaştırılmıştır.

4.6.1. Farklı depolama sürelerinin uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumlarının çıkış oranına etkisi

Uçucu yağlar ile film kaplı domates tohumlarının çıkış oranları üzerine depolamanın etkisi araştırılmıştır. Cmm ile bulaşık domates tohumları *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının farklı dozları (250, 500, 1000 ve 5000 ppm) ile kaplanmış ve kaplama sonrası oda koşullarında 24-48 saat süre ile kurutulmuşlardır. Yapılan nem tayininde tohumların nem oranı %8-10’a düşürülmüştür. Tohumların bir bölümünden hemen kaplama sonrası çıkış testleri yapılmış ve çıkış oranları (%) belirlenmiştir. Kalan film kaplı tohumlar sırasıyla 15, 30 ve 90 gün +4°C’de depolandıktan hemen sonra aynı şekilde çıkış testleri yapılmış ve çıkış oranları (%) tespit edilmiştir. Çıkış oranları üzerinden yapılan varyans analizi sonuçlarına göre, depolamanın film kaplı tohumların çıkış oranına etkisi belirlenmiştir.

Depolanan ve hiç depolama yapılmayan uçucu yağlar ile film kaplı tohumların çıkış oranları ilgili veriler ve bu veriler üzerinden yapılan varyans analizi sonuçları depolamanın tohumların çıkış oranı üzerine önemli bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Depolama sonrası domates tohumlarının çıkış oranı üzerine yağ x doz interaksiyonunun, uçucu yağların ve dozların istatistiki olarak önemli bir etkisi tespit edilememiştir (Çizelge 4.19).

Depolama sonrası uçucu yağ ile film kaplanan domates tohumlarının çıkış oranlarında bir değişim görülmemiş ve başlangıçta sahip oldukları değerleri muhafaza etmişlerdir. Çizelge 4.19’da gösterildiği gibi uçucu yağ film kaplamanın depolama yapılmayan ve farklı sürelerde depolanan tohumların çıkış oranları *L. stoechas* için %81-82, *O. onites* için %75-78, *O. vulgare* için %74-75 ve *R. officinalis* için 79-80 arasında değişim göstermiştir. Çıkış oranı en yüksek doz olan 5000 ppm’de %72-73 arasında değişirken en düşük doz olan 250 ppm’de ise %83-84 arasında değiştiği saptanmıştır.

Çizelge 4.19. Farklı depolama sürelerinin uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumlarının çıkış oranına etkisi

		Çıkış oranı (%)			
Uçucu yağlar	Dozlar (ppm)	0 gün	15 gün	30 gün	90 gün
Bakır sülfat		86.00			
Steril saf su		92.00			
<i>L. stoechas</i>	250	86.00	87.00	88.00	86.00
	500	83.00	83.00	83.00	81.00
	1000	80.00	82.00	80.00	80.00
	5000	75.00	75.00	76.00	75.00
	<i>Ortalama</i>	81.00	82.00	82.00	81.00
<i>O. onites</i>	250	80.00	81.00	84.00	83.00
	500	77.00	77.00	79.00	77.00
	1000	73.00	73.00	75.00	73.00
	5000	70.00	72.00	74.00	70.00
	<i>Ortalama</i>	75.00	76.00	78.00	76.00
<i>O. vulgare</i>	250	82.00	80.00	82.00	80.00
	500	78.00	76.00	77.00	78.00
	1000	72.00	72.00	72.00	72.00
	5000	69.00	68.00	68.00	69.00
	<i>Ortalama</i>	75.00	74.00	75.00	75.00
<i>R. officinalis</i>	250	84.00	85.00	83.00	83.00
	500	80.00	83.00	82.00	80.00
	1000	78.00	79.00	77.00	79.00
	5000	73.00	74.00	75.00	73.00
	<i>Ortalama</i>	79.00	80.00	79.00	79.00
Dozlar	250	83.00	83.00	84.00	83.00
	500	79.00	79.00	80.00	79.00
	1000	75.00	76.00	76.00	76.00
	5000	72.00	72.00	73.00	72.00
	<i>Ortalama</i>	77.00	78.00	78.00	78.00
Uçucu yağ	P=0.6146				
Doz	P=0.9123				
Uçucu yağ X Doz	P=0.8234				

4.6.2. Farklı depolama sürelerinin uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumlarında temiz tohum oranına etkisi

Cmm ile bulaşık domates tohumları *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının farklı dozları (250, 500, 1000 ve 5000 ppm) ile kaplanmış ve kaplama sonrası oda koşullarında 24-48 saat süre ile kurutulmuşlardır. Yapılan nem tayininde tohumların nem oranı %8-10'a düşürülmüştür. Tohumların bir bölümünden hemen kaplama sonrası temiz tohum oranına dair testler yapılmış ve temiz tohum oranları (%) belirlenmiştir. Kalan film kaplı tohumlar sırasıyla 15, 30 ve 90 gün +4°C'de depolandıktan hemen sonra aynı şekilde temiz tohum oranları (%) belirlenmiştir.

Varyans analizi sonuçları depolama (15, 30 ve 90 gün) sonrası yağ x doz interaksiyonunun, uçucu yağların ve dozların film kaplı tohumların temiz tohum oranı üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.20. Farklı depolama sürelerinin uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumlarında temiz tohum oranına etkisi

		Temiz tohum oranı (%)			
Uçucu yağlar	Dozlar (ppm)	0 gün ¹	15 gün ²	30 gün ²	90 gün ²
Steril saf su		0.00			
Bakır sülfat		100.00			
<i>L. stoechas</i>	250	36.00	36.00	36.00	30.00
	500	100.00	100.00	100.00	100.00
	1000	100.00	100.00	100.00	100.00
	5000	100.00	100.00	100.00	100.00
	Ortalama	84.00	84.00	84.00	83.00
<i>O. onites</i>	250	40.00	44.00	40.00	36.00
	500	100.00	100.00	100.00	100.00
	1000	100.00	100.00	100.00	100.00
	5000	100.00	100.00	100.00	100.00
	Ortalama	85.00	86.00	85.00	84.00
<i>O. vulgare</i>	250	64.00	65.00	64.00	61.00
	500	100.00	100.00	100.00	100.00
	1000	100.00	100.00	100.00	100.00
	5000	100.00	100.00	100.00	100.00
	Ortalama	91.00	91.00	91.00	90.00
<i>R. officinalis</i>	250	28.00	32.00	32.00	30.00
	500	78.00	79.00	76.00	78.00
	1000	100.00	100.00	100.00	100.00
	5000	100.00	100.00	100.00	100.00
	Ortalama	77.00	78.00	77.00	77.00
Dozlar	250	94.00	93.00	94.00	94.00
	500	100.00	100.00	100.00	100.00
	1000	100.00	100.00	100.00	100.00
	5000	100.00	100.00	100.00	100.00
	Ortalama	99.00	98.00	99.00	99.00
Uçucu yağ ³	P=0.9245				
Doz ³	P=0.8643				
Uçucu yağ X Doz ³	P=0.8654				

¹ Uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumları kaplamadan hemen sonraki temiz tohum oranı (%) değerleri

² Uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumları, nem içerikleri %8-10'a kadar kurutulduktan sonra, sırası ile 15, 30 ve 90 gün sürelerde +4°C'de ticari tohum paketleri içerisinde depolandıktan sonraki temiz tohum oranı (%) değerleri³ Uçucu yağlar ile film kaplı tohumlarda kısa süreli depolamanın temiz tohum oranı (%) üzerine uçucu yağlar, dozlar ve uçucu yağ x doz etkilerinin istatistiki olarak önemli bir etkisi olmamıştır.

4.6.3. Farklı depolama sürelerinin uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumlarında bakteri yoğunluğuna etkisi

Uçucu yağlar ile film kaplanan Cmm ile bulaşık domates tohumlarında depolamanın tohumdaki Cmm yoğunluğunu log CFU/tohum değiştirip değiştirmediği belirlenmiştir. *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının 4 farklı dozu (250, 500, 1000 ve 5000 ppm) ile kaplanan domates tohumlarında 15, 30, 90 gün süre ile depolamanın tohumda bakteri yoğunluğuna (log CFU/tohum) etkisi belirlenmiştir ve % etki ile ilgili değerler alınmıştır.

Depolama sonrası yapılan testlerde yapılan varyans analizi sonuçlarına göre yağ x doz etkisinin, uçucu yağların ve dozların 15, 30 ve 90 gün depolanan domates tohumlarında bakteri yoğunluğuna etkisi önemsiz bulunmuştur. Depolanan ve depolama yapılmayan domates tohumlarında sırasıyla *L. stoechas*, *O. vulgare*, *O. onites* ve *R. officinalis* uçucu yağlarında log CFU/tohum değerleri 1.3-1.61, 1.12-1.19, 0.74-0.80 ve 1.61-1.41 arasında değişim göstermiştir. Log CFU/tohum değerleri 250, 500, 1000 ve

5000 ppm’de sırasıyla 2.25-2.39, 1.28-1.48, 0.99-1.14 ve 0-0 arasında değişim gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.21. Farklı depolama sürelerinin uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumlarında bakteri yoğunluğuna etkisi

Uçucu yağlar	Dozlar (ppm)	Log CFU/tohum			
		0 gün ¹	15 gün ²	30 gün ²	90 gün ²
Bakır sülfat		1.20			
Steril saf su		4.24			
<i>L. stoechas</i>	250	2.44	2.45	2.46	2.74
	500	1.44	1.40	1.42	1.99
	1000	1.32	1.30	1.34	1.70
	5000	0.00	0.00	0.00	0.00
	<i>Ortalama</i>	1.30	1.29	1.31	1.61
<i>O. onites</i>	250	1.92	1.92	1.90	1.99
	500	1.34	1.34	1.33	1.44
	1000	1.24	1.24	1.20	1.34
	5000	0.00	0.00	0.00	0.00
	<i>Ortalama</i>	1.12	1.13	1.11	1.19
<i>O. vulgare</i>	250	1.82	1.86	1.87	1.95
	500	1.17	1.20	1.23	1.25
	1000	0.00	0.00	0.00	0.00
	5000	0.00	0.00	0.00	0.00
	<i>Ortalama</i>	0.74	0.77	0.78	0.80
<i>R. officinalis</i>	250	2.82	2.82	2.85	2.90
	500	1.17	1.20	1.23	1.25
	1000	1.41	1.41	1.41	1.50
	5000	0.00	0.00	0.00	0.00
	<i>Ortalama</i>	1.61	1.36	1.37	1.41
Dozlar	250	2.25	2.26	2.27	2.39
	500	1.28	1.29	1.30	1.48
	1000	0.99	0.99	0.99	1.14
	5000	0.00	0.00	0.00	0.00
	<i>Ortalama</i>	1.13	1.13	1.14	1.25
Uçucu yağ ³	P=0.8212				
Doz ³	P=0.8424				
Uçucu yağ X doz ³	P=0.8642				

¹ Uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumları kaplamadan hemen sonraki Log CFU/tohum değerleri

² Uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumları, nem içerikleri %8-10’a kadar kurutulduktan sonra, sırası ile 15, 30 ve 90 gün sürelerde +4 °C’de ticari tohum paketleri içerisinde depolandıktan sonraki log CFU/tohum değerleri

³ Uçucu yağlar ile film kaplı tohumlarda kısa süreli depolamanın tohumda bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum) üzerine uçucu yağlar, dozlar ve uçucu yağ x doz interaksyonlarının istatistiki olarak önemli bir etkisi olmamıştır.

5. TARTIŞMA

Cmm tohumla, tohumda da tohum kabuğu ve embriyoda taşınan, alınan karantina tebbirlerine rağmen mücadelesi zor bir bakteriyel fitopatojendir. Dayanıklı çeşit geliştirilemeyişi, dayanıklılığın aktarımındaki problemler, kimyasal mücadelenin yeterli olmayışı, bakırlı preparatlara karşı dayanıklılık kazanımı gibi nedenler ile kesin çözümü yoktur. Cmm dünyada ilk tespit edildiği 1910 yılından bu yana dünya domates üretim alanlarını tehdit etmektedir. Zaman zaman ülkelerde ve domates yetiştirme alanlarında atak yapmakta çoğunlukla da ciddi epidemiler oluşturarak, özellikle meyvede pazar değerinin düşmesine yol açmaktadır. Bu lezyonlar domates tohum üreticilerini, fide üreticilerini ve bizzat yetiştiricileri ticari kayba uğratmaktadır. Ticari kaybın en kötüsü de özellikle tohum ıslah eden ve üreten firmalar ile hazır fide yetiştiren firmaların Cmm'nin bulaşıklık kaynağının tam olarak tespit edilemeyişinden kaynaklanan ticari itibar kayıplarıdır. Ürün kayıpları bir yıl veya bir yetiştirme dönemi sonrasında telafi edilebilirken firmaların itibar kayıpları uzun yıllar etkisini göstermekte ve firmanın kapanmasına bile neden olabilmektedir. Cmm'nin latent periyodunun uzun olması, şartların uygun olmadığı durumlarda gelişmesini engelleyerek, ilk bulaşmanın hangi firmada veya hangi tohumda başladığının tespitini güçleştirmektedir. Bu durum aynı zamanda üreticinin hak kaybı ve tohum ve fide firmaları arasında uzun süren bir hukuk mücadelesi anlamına da gelmektedir.

Dünyada Cmm'nin tohum, fide veya bitkiden tespitine yönelik son geliştirilen, klasik, moleküler ve biyokimyasal tekniklerin kombine uygulandığı akredite protokoller uygulansa da analiz yapılan laboratuvar koşullarına bağlı olarak da farklı sonuçlar alınabilmektedir. Bu durum analizin yanlışlığından değil tamamen Cmm'nin zor bir patojen olmasından kaynaklanmaktadır. Domates tohum üretiminde ana ve baba ebeveynlerin melezlenmesi ile belirli döllerdeki meyveler tohumluğa ayrılmaktadır. Aynı tohumluk üretim sırasındaki meyvelerden tohum çıkarılmakta ve bu tohumlar harmanlanarak o yılın toplam tohum miktarı, partisi ve lotu elde edilmektedir. Bu işlem sırasında Cmm'nin latent periyotta olması nedeni ile gözden kaçan tek bir domates bitkisindeki bulaşıklık o yıl üretilen tohum lotunu bulaştırabilmektedir. Tohum sağlığına yönelik testlerde yapılan analiz sadece analize alınan tohum örneğini garanti etmekte ve o tohum lotunun Cmm bulaşıklığına dair ön fikir vermektedir. Kısacası bir alt örnek Cmm ile bulaşık tespit edilmezken diğeri bulaşık çıkabilmekte hatta analiz örnekleri temiz bulunsan bile tohum lotundan gelişen fidelerde koşulların Cmm gelişimi (aşılı fide eldesinde aşılama sırasında olduğu gibi) için uygun olduğu bir yetiştiricilikte Cmm hızla gelişmekte ve epifitik özelliği (bitki yüzeyine tutunabilen ve yaşayabilen) ile bütün seraya yayılabilmektedir.

Cmm ile mücadelede dayanıklı çeşit geliştirilemediğinden (Şen vd 2013), temiz tohum üretimi ve tohumluğun temizliğinin (hijyen) kontrol altına alındığı uygulamalar temel mücadelesini oluşturmaktadır. Ama özellikle de son yıllarda her ne kadar iyi tohum uygulamaları adı altında, üretimden hasata kadar serada her türlü hijyen kurallarına uyarak yapılan bir çok yöntemle elde edilen tohum örneklerinde bile Cmm'nin tespiti, hasattan üretime tohumu koruyacak bir tekniğin çalışılması gerektiğini göstermiştir. Bu teknik hem tohumu dış ortamdaki bulaşmalara (fidelikte, ekim makinasında, işçinin eli, aşı makinası, paket vb) hem üretim ve depo yerindeki diğer domates tohumlarını olası içsel Cmm bulaşıklığına (tohum kabuğu ve embriyo) karşı

korunmalıdır. Benzer amaçla, tarımda özellikle tarla ürünleri ve depo zararlılarına karşı yapılan tohum ilaçlamasında ilaç tohum yüzeyine homojen bir şekilde uygulanamadığından zaman zaman negatif sonuçlar da alınabilmektedir. Örneğin thriam ile ilaçlı domates tohumlarında *Fusarium* spp. gelişmesi gibi. Eczacılık ve şekerleme endüstrisinden uyarlanan, aslında bugünün birçok tohum devi ülkede ve Türkiye’de ise sınırlı sayıda yerli firmanın uyguladığı tohum kaplama tohum ilaçlamasına iyi bir alternatiftir. Bu teknikte ilacın dışında birçok etken madde (mikro ve makro besin elementleri, pestisitler, biyolojik mücadele ajanları, çimlenme teşvik ediciler vb.) aynı anda tohuma homojen bir şekilde yüklenebilmekte ve etkin bir mücadele olanağı sunmaktadır. Tohum kaplama kısaca pelletleme, film kaplama ve pelletleme+film kaplama gibi günümüzde ticari polimerler (renklendirici+yapıştırıcı birarada) ile yapılabilir (Kavak 2006, Anonim 2013c).

Tohum kaplama veya ilaçlama amaçlı Cmm’ye karşı tohuma uygulanabilecek ve etkin bir preparatın olmaması Cmm ile mücadelenin başka bir zor tarafıdır. Diğer bir zorluk ise Cmm ve benzeri fitobakterilerin özellikle serada uygulandıklarında etmeni tamamen yok etmeyen ve sadece hastalık oluşumunu baskılayan bakırlı preparatlara karşı dayanıklılık geliştirmeleridir (Mixon 2012). Tohuma uygulanan bazı kimyasalların (HCl, NaOCl, antagonistik bakteri, biyolojik ajanlar, hidrojen peroksit, aside edilmiş nitrit) Cmm’yi tamamen yok etmediği ve domates tohum canlılığını kabul edilebilir sınırların çok altına düşürmektedir (Fatmi vd 1991 Çetinkaya-Yıldız ve Aysan 2005, Türküsay ve Tosun 2005, Tireng Karut 2011, Kasselakia vd 2011). Tarımda genel anlamda kullanılan bitki korumaya yönelik pestisitlerin insan sağlığı ve çevreye etkileri (Gill ve Garg 2014) nedeniyle doğal ürünlerin kullanıma yönelik eğilim içerisinde Cmm ile mücadele çalışmaları da yer almıştır. Fakat günümüze kadar bu konuda özellikle de uçucu yağların Cmm üzerine antibakteriyel etkinin tespiti gibi *in vitro* aşamalar çalışılmıştır. Buna karşın uçucu yağlar tohum uygulaması ve film kaplama ile domates tohumuna yüklenmemiştir. Dolayısı ile uçucu yağların film kaplama ile domates tohumuna yüklenmesi durumunda Cmm ve tohum kalite parametrelerine etkisi de belirlenmemiştir.

Yapılan tez çalışması ile Cmm gibi mücadelesi zor ve önemli bir tohumla taşınan bakteriyel hastalık etmenine karşı üretimden hasata tohumu etkin ve doğal bir şekilde koruyabilecek uçucu yağ film kaplama formülasyonu ve metodolojisi geliştirilerek Cmm’nin mücadelesinde yaşanan sıkıntıları çözmek hedeflenmiştir. Diğer bir ifade ile yukarıda bahsedilen Cmm tohum, fide ve üretici arasındaki sorunlara çözüm getirecek alternatif bir yöntem geliştirilmesi planlanmıştır. Doğal ve antibakteriyel özellikleri olan bazı ticari uçucu yağların Cmm’ye karşı etkileri ve MIC değerlerini belirlemek, etkili bulunan uçucu yağların domates tohumundaki Cmm’ye karşı tohum dezenfektanı olarak kullanılabilirliğini ortaya koymak, tohum uygulamalarında kullanılabilecek optimum dozları belirlemek, polimer ile film kaplamada kullanılacak uçucu yağ ve dozlarını tespit etmek, uçucu yağ film kaplamasının hazır fide üretim koşullarında domates tohumundaki Cmm’ye ve bazı fide parametrelerine etkisini belirlemek, depolama sonrası uçucu yağ film kaplamasının domates tohumundaki Cmm ve tohum kalitesine etkisini saptamak araştırmanın başlıca amaçlarını oluşturmuştur. Bu hedeflere ulaşmak için yapılan denemelerin bulguları incelendiğinde araştırmada belirtilen amaçlara ulaşıldığını göstermiştir.

Araştırmanın ilk amaçlarından biri olan bazı ticari uçucu yağların Cmm üzerine antibakteriyel etkileri toplam 20 adet ticari uçucu yağın NA besiyerinde oluşturdukları inhibisyon zonları (mm) üzerinden belirlenmiştir. Antibakteriyel etkinlik yönünden uçucu yağlarda tarama yapılmıştır. Benzer araştırma bulguları (Basım vd 2000, Daferera vd 2003, Dimitra vd 2003, Şahin vd 2004, Soylu vd 2006, Kızıl ve Uyar 2006), yapılan ön çalışmalar ve kullanılacak olan dozun ekonomik anlamda kullanılabilirliği dikkate alınarak, 500 ve 1000 ppm olmak üzere iki dozda çalışılmıştır. Bir doz çalışması olmamasına karşın, bu iki dozda bile doz artışına bağlı olarak uçucu yağların Cmm'ye karşı antibakteriyel etkisinin de arttığı saptanmıştır. Uçucu yağ dozu ve inhibisyon zonu arasında doğrusal bir ilişki tespit edilmiştir.

Uçucu yağların inhibisyon zon değerlerinde toplam 20 adet uçucu yağ içerisinde *origanum* türü iki adet uçucu yağ, diğerlerine oranla çok daha yüksek antibakteriyel etki göstermiştir. En yüksek inhibisyon zonu oluşturan *O. vulgare* (37 mm) ve *O. onites* (35 mm) ile en yakın diğer bir uçucu yağın (*C. zeylanicum*, 22 mm) değeri arasında oldukça fark tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Genel olarak bilindiği üzere kekik olarak adlandırılan türler içerisinde *origanum* uçucu yağları antibakteriyel etki yönünden yüksek değerlidirler. Daha önce *origanum*lar üzerinde yürütülen bazı araştırma bulguları Deneme 1'de elde edilen bulguları desteklemektedir. Nitekim Cmm'ye karşı *O. vulgare* 33 mm (Şahin vd 2004), *O. minutiflorum*'ın 1/5 ve 1/10 dozları sırasıyla 33 ve 31 mm (Altundağ 2007), *O. syriacum* var. *Bevanni* disk difüzyon yönteminde 35.6 mm (Eriş 2006) inhibisyon zonu oluşturmuştur. *O. vulgare*'nin doğadan toplanan formları 36.7 mm inhibisyon zonu ile kültür ve adaptasyon formlarına oranla Cmm'ye karşı daha yüksek bir antibakteriyel etki gösterdiği rapor edilmiştir (Borboa-Flores vd 2010). Aynı uçucu yağ 15.3-25.5 mm inhibisyon zonu ile gram (+) bakterilere karşı daha etkili olduğu saptanmıştır (Hussain 2009). Araştırmada kullanılan diğer *origanum* türü olan *O. onites*'in de Cmm'ye karşı yüksek antibakteriyel etkisinin olduğunu gösteren bulgular mevcuttur (Sivropoulou vd 1995, Kızıl ve Uyar 2006, Tanovic 2007). Bulguların literatür ile uyumlu olduğu ve bu sonuçların tohumla taşınan Cmm ve benzeri bakteriyel etmenler ile mücadelede kullanılabileceği saptanmıştır.

Uçucu yağlar içerisinde *origanum*lardan sonra Cmm'ye karşı en yüksek inhibisyon zonu oluşturan (Çizelge 4.1) ve ana etkili bileşeni öjenol olan *C. zeylanicum* uçucu yağı benzer araştırmalarda da gram (+) bakterilere (Guerra vd 2012) ve Cmm'ye karşı etkili bulunmuştur (Tobias 2007). *C. zeylanicum*'un Van Der Wolf vd (2008) tarafından %1.25 dozunun Cmm gelişimini tamamen engellediği rapor edilmiştir. Aynı uçucu yağın sırasıyla 1:1, 1:5 ve 1:10 dozlarının Cmm'ye (Borboa-Flores vd 2010) ve 0.16 µl/ml hava dozunun Cmm'nin de içinde bulunduğu patojenlere karşı yüksek antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. Seylan tarçını olarak bilinen *C. zeylanicum* antibakteriyel etki çalışmaları ve bitki koruma amaçlı araştırmalar için göstermiş olduğu yüksek antibakteriyel etki ve inhibisyon zon değerleri ile ümitvar bir uçucu yağ olarak değerlendirilmiştir.

Türkiye'de karabaş lavantısı olarak bilinen *L. stoechas* uçucu yağı *origanum*lar ve *C. zeylanicum*'dan sonra 21 mm inhibisyon zonu ile Cmm'ye karşı yüksek antibakteriyel etki gösteren bir diğer uçucu yağ olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Doğadan toplanarak Clevenger aleti ile buhar distilasyonu ile taze çıkarılarak disk difüzyon yöntemi ile uygulanan *L. stoechas* uçucu yağının Cmm'ye karşı 23.7 mm

inhibisyon zonu oluşturduğu ve 5 µl/ml dozunun Cmm gelişimini tamamen engellediği saptanmıştır (Eriş 2006). İki araştırma arasındaki inhibisyon zonu farkı kullanılan *L. stoechas* uçucu yağının taze çıkarılan ve ticari olması veya test yöntemlerinden (agar kuyu difüzyon ve disk difüzyon) kaynaklanmaktadır. Başka bir çalışmada ise *L. stoechas*'ın Cmm'ye karşı 30.3-33.3 mm ile daha yüksek bir inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir (Talibi vd 2011). Yüksek inhibisyon zonunun nedeni taze çıkarılan ürünün kullanılmış olmasından kaynaklanmaktadır.

Türkiye'de biberiye olarak bilinen *R. officinalis* 20 mm inhibisyon zonu oluşturmuş, *C. zeylanicum* ve *L. stoechas* ile aynı istatiski grupta yer almıştır. *R. officinalis* uçucu yağı Cmm'ye karşı %73 ile yüksek antibakteriyel etkili olarak tespit edilmiştir (izelge 4.1). *R. officinalis*'in fitopatojen bakterilere karşı antibakteriyel etki açısından farklı sonuçlar gösterdiği bilinmektedir. Bazı alışmalarda Cmm ve benzeri tohumla taşınan etmenlere (Dimitra vd 2003, Mbega vd 2012) ve gram (+) fitopatojen bakterilere 18.0-26.2 mm inhibisyon zonu ile (Hussain 2009) yüksek antibakteriyel etki göstermiştir. Fakat Cmm'ye karşı düşük antibakteriyel etki gösterdiğini bildirilen raporlar da (Daferera vd 2003) mevcuttur. Benzer antibakteriyel etki çalışmalarındaki sonuçlar arasındaki farklılık uçucu yağ çalışmalarının zorluğunu ve ticari formlarının bitki koruma amaçlı kullanım için standardize edilmesi gerektiğini göstermiştir.

R. damascena uçucu yağının inhibisyon zonu ve antibakteriyel etkisi diğer uçucu yağlara oranla daha düşük tespit edilmiştir. Bu uçucu yağ Origanumlara göre Cmm'ye karşı daha düşük inhibisyon zonu oluşturmuştur (izelge 4.1). Diğer taraftan bu uçucu yağın *Erwinia amylovora* üzerine çok güçlü antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir (Basım ve Basım 2003, Basım ve Basım 2004). Her iki çalışmada ayrı hedef patojenlerin çalışılması, birinde ticari diğerinde taze ıkarılan *R. damascena* uçucu yağının kullanılması antibakteriyel etkideki farkın en önemli nedenleridir. Gerçek gül uçucu yağı pahalı olması, ticari boyutta düşünöldüğünde uçucu yağın seyreltilmiş olabileceği gibi nedenler ile de farklı antibakteriyel etkiler görölmüştür.

Çizelge 4.1'de açıkça göröldüğü üzere sırasıyla, 2.00-2.68 mm inhibisyon zonları ile *L. nobilis* (tohum) ve *J. Communis* en düşük antibakteriyel etkili uçucu yağlar olarak tespit edilmiştir. Her iki uçucu yağın Cmm üzerine etkileri konusunda herhangi bir araştırma bulgusuna rastlanılamamıştır. Fakat *J. Communis* uçucu yağının fitopatojen olmayan gram (+) ve (-) bakterilere karşı 0-39 mm inhibisyon zonu oluşturduğu bildirilmiştir (Haziri vd 2013). Benzer bir araştırma bulgusunda *L. nobilis* (tohum) uçucu yağının tıpta patojen bakterilere karşı 18-29 mm arasında inhibisyon zonu oluşturduğu ve etkili olduğu tespit edilmiştir (Moghtader ve Farahmand 2013).

Araştırma bulguları ve daha önceki çalışmaların verilerinden de açıkça göröldüğü üzere, uçucu yağlarda antibakteriyel etkinliği tayin eden çok faktör vardır. Gram pozitif bakterilerin lipopolissakkarit hücre zarına sahip olmadıklarından gram negatiflere göre uçucu yağlara karşı daha hassas oldukları (Evren ve Tekgöler 2011) bilinmektedir. Deneme 1'in inhibisyon zonu ve antibakteriyel etkiye dair bulguları literatürde ifade edilen tezi doğrular niteliktedir. Toplamda 20 adet uçucu yağın tamamı az ya da çok gram pozitif bir bakteri olan Cmm'ye karşı inhibisyon zonu oluşturmuştur. Yüksek dozun (1000 ppm) bütün uçucu yağlarda düşük doza (500 ppm) göre daha yüksek bir inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir (izelge 4.1). Uçucu yağ dozu

ve antibakteriyel etki arasında doğrusal bir ilişkinin varlığını saptanmıştır. Hedeflenen doza ulaşmaya kadar doz artışı yapılması gerekmektedir. Nitekim benzer bulgular araştırma sonuçlarını desteklemektedir. Bir araştırma bulgusunda uçucu yağ tipi, doz ve Cmm'ye karşı antibakteriyel etki arasında ($p < 0.05$) önemli korrelasyon ve farklılıkların olduğu rapor edilmiştir (Borboa-Flores vd 2010). Kızıl vd (2005) çalışmalarında ise doz artışına bağlı olarak inhibisyon zonunun da arttığı saptanmış ve uçucu yağ uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonrasında inhibisyon zonu değerlerinin değişmediği bildirilmiştir. Deneme 1'de ve literatüre dayalı bulgularda inkübasyondan sonra farklı sürelerde inhibisyon zonlarının değişmemesi uçucu yağların antibakteriyel etkinliğinin bakteriyostatik (geçici etkinlik) etkinlikten daha çok bakterisidal (kalıcı etkinlik) etkinlikten kaynaklandığını göstermiştir (Eriş 2006).

İnhibisyon zonu ve antibakteriyel etki ile ilgili bulguların içerisinde aynı firmadan iki farklı dönemde temin edilen *R. officinalis* ve *S. officinalis*'in değerleri arasındaki farklılık dikkati çekmektedir. Her ikisi ticari olan, aynı firmadan ve sadece farklı zamanlarda temin edilen iki uçucu yağ ile ilgili bulgu, uçucu yağların antibakteriyel etki yönünden karmaşık bir mekanizmalarının olduğu ve bu konuda çok fazla faktörün etkili olduğunu (Evren ve Tekgüler 2011) bir kez daha göstermiştir. Nitekim Çizelge 4.1'de ticari *F. vulgare* uçucu yağının Cmm'ye karşı inhibisyon zonu 14 mm tespit edilirken, Soylu vd (2006) tarafından Clevenger aparatı ile taze çıkarılmış *F. vulgare* uçucu yağının Cmm'ye karşı disk difüzyon yöntemine göre 9.62 mm inhibisyon zonu oluşturduğu saptanmıştır. Her iki araştırma bulgusu arasındaki bu fark antibakteriyel test yöntemi, uçucu yağın elde ediliş şekli, hedef patojen, bitkinin yetiştirme dönemi, ekolojisi, vejetasyon dönemi, kurutulması, taze veya ticari formu gibi birçok faktörden kaynaklanmaktadır. Bu tür çalışmalarda uçucu yağların standardize edilmiş ticari formlarının kullanılması gerekmektedir. Bu standardizasyonun yapılabilmesi için, doğadan toplama ve taze çıkarılan uçucu yağların karşılaştırıldığı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Herhangi bir ilacın hedef patojene etkili minimum konsantrasyonu (MIC) ile minimum bakterisidal konsantrasyonun (MBC) yakın değerler verebildiği gibi farklı değerlerde alabilmektedir. MBC, MIC'nin 2, 3 veya 4 katına kadar değerlere çıkabilmektedir. MIC bakteri gelişimini engelleyen en düşük doz, MBC ise ilacın bizzat hedef uygulamanın tohumu, bitkiye vb. etkili olabilmesini belirleyen sınır değeri ifade etmektedir. Yüksek antibakteriyel etki gösteren *O. vulgare*, *O. onites*, *C. zeylanicum*, *L. stoechas*, *R. officinalis*, *M. piperita*, *R. damascena*, *M. rucutita*, *M. communis* ve *L. angustifolia* uçucu yağlarının Deneme 1'de MIC değerleri belirlenmiştir. Bazı uçucu yağların MIC değerleri ile ilgili çok sayıda bulgu rapor edilmiştir (Basım vd 2000, Soylu vd 2006, Eriş 2006, Altundağ 2007, Tinivella vd 2008). Fakat bu çalışmalarda MIC değerleri taze çıkarılan uçucu yağlar üzerinde yapıldığından, ticari üretimleri farklı sonuçlar verebilmektedir. Nitekim MIC değerleri ile ilgili araştırma bulguları bu yaklaşımın doğru olduğunu göstermiştir.

Uçucu yağların Cmm gelişimini engelleyen minimum dozu olarak tanımlanan MIC değerleri ne kadar düşükse, antibakteriyel etki o kadar yüksektir. MIC değerleri açısından en düşük değeri veren *O. vulgare*, *O. onites* ve *C. zeylanicum* en yüksek antibakteriyel etkili uçucu yağlar olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Benzer bir araştırma bulgusunda *O. vulgare* uçucu yağının Cmm'ye karşı MIC değeri %0.15, *C.*

zeylanicum'un ise %1.25 rapor edilmiştir. MIC değerinin belirlenmesinde %0.01'lik resazurin kullanılmıştır (Van der Wolf vd 2008, Tinivella vd 2008). Deneme 1'in ve literatür bulgularında MIC değerlerinde görülen farklılık, MIC değerinin belirlenmesinde kullanılan metodtan, uçucu yağın taze veya ticari üretim olması, test yönteminden kaynaklanmaktadır. Literatür çalışmasında kullanılan resazurin okside olunca mavi renkli, fakat canlı hücrelerde pembe renge dönüşen bir boya olup, renk değerlendirilmesine göre yapıldığı için zaman zaman yanıltıcı sonuçlar verebilmektedir. Fakat son yıllarda yeni bir metod olarak önerilmektedir (Gahlaut ve Chhillar 2013). Diğer origanum türlerinden *O. syriacum* var *bevanni*'nin Cmm'ye karşı MIC değerleri ise sırasıyla, disk difüzyon yöntemine göre 10 µg/ ml (Soylu vd 2005), mikro dilüsyon yöntemine göre 1 µl/ml'dir (Eriş 2006). *O. minutiflorum*'un ise taze çıkarılmış uçucu yağının Cmm'ye karşı MIC değeri 300 µg/ ml olarak tespit edilmiştir (Altundağ 2007). Origanumlar dışında başka bir kekik türü olan *Thymbra spicata* var. *spicata* taze çıkarılmış uçucu yağının Cmm'ye karşı kontakt etkide MIC değeri 405 mg/ml ve fumigant etkide ise 91 mg/ml olarak tespit edilmiştir (Basım vd 2000).

L. stoechas, *R. damascena* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının MIC değerleri 125 ppm olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Fakat rapor edilen araştırma bulguları arasında bazı uçucu yağların MIC değerleri ile ilgili farklılık göze çarpmaktadır. Disk difüzyon yöntemine göre *Lavandula stoechas* subsp. *stoechas*'ın Cmm'ye karşı MIC değeri 50 µg/ml ve *Mentha spicata* için 25 µg/ ml tespit edilmiştir (Soylu vd 2005). Eriş (2006) tarafından ise *Lavandula stoechas* subsp. *stoechas*'ın Cmm'ye karşı MIC değeri 5 µl/ml'dir. Fitopatojen bakteri olan *E. carotovora* subsp. *carotovora*'a karşı *R. officinalis* uçucu yağının MIC değeri 250 µl/ml olduğu bildirilmiştir (Alamshahi vd 2012). Kokulu gül türlerinden (*R. damascena*, *R. centifolia*, *R. alba*, *R. gallica*, *R. phoenicia*, *R. canina*, *R. moschata*) *R. canina* uçucu yağının Cmm'ye karşı MIC değeri ise 6.25 mg/ml olduğu rapor edilmiştir (Talibi vd 2011). Çizelge 4.2'ye göre *M. rucutita*'ın Cmm'ye karşı MIC değeri 200 ppm tespit edilmesine karşın, başka bir araştırma bulgusunda %10'dan daha yüksek bir değerdir (Van Der Wolf ve Van Der Birnbaum 2012). Deneme 1'in araştırma bulguları ve literatürde görülen MIC değerlerindeki farklılık, araştırmada kullanılan ticari uçucu yağların MIC değerlerinin belirlenmesi yaklaşımının doğru olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu konuda da ortak norm geliştirilmesinin zorunluluğu görülmüştür.

Bitki hastalık ve zararlıları ile mücadelede önerilen ilacın en az %50-70 oranında patojeni baskı altına alması beklenmektedir. Deneme 1'de antibakteriyel etki gösteren uçucu yağları belirlemeye yönelik inhibisyon zonları (Çizelge 4.1) ve MIC değerleri (Çizelge 4.2), *O. vulgare*, *O. onites*, *C. zeylanicum*, *L. stoechas*, *R. officinalis*, *M. piperita*, *R. damascena*, *M. rucutita*, *M. communis* ve *L. angustifolia* bitkilerinden buhar distilasyonu ile edilen (ticari olarak üretilen) uçucu yağların %65 ve üzeri etki ile Cmm gelişimini inhibe ettikleri saptanmıştır. Deneme 1'in sonuçları 20 adet uçucu yağ içerisinde bu 10 adet uçucu yağın Cmm'yi eradike etmek için tohum uygulamalarında ve diğer mücadele şekillerinde kullanılabileceğini göstermiştir. *O. vulgare*, *O. onites*, *C. zeylanicum*, *L. stoechas* ve *R. officinalis* oluşturdıkları yüksek inhibisyon zonu ve düşük MIC değerlerine sahip olmaları nedeni ile antibakteriyel etkisi en yüksek uçucu yağlar olarak belirlenmiştir.

İnhibisyon zonu ve MIC değerleri ile ilgili bulguların literatür ile uyumu incelendiğinde uçucu yağ çalışmalarında hedeflenen etkiye (antibakteriyel, antimikrobiyal, antiviral, antifungal vb) çok sayıda faktörün katkıda bulunduğu görülmüştür. Günümüze kadar uçucu yağlar üzerinde çok fazla çalışma yürütülmüştür. Fakat bu araştırmalar daha çok hedeflenen etki var yok, MIC ve MBC belirleme, içerik, uçucu yağ verimi gibi konuları kapsamıştır. Artık bu çalışmalarda ortak bir norm oluşturabilmek için her bir ayrı hedef patojene yönelik etkili uçucu yağlar, MIC, MBC değerleri belirlenmeli ve bunların ticari üretimlerinin amaca yönelik etkileri optimize edilmelidir. Örneğin, Batı Akdeniz bölgesinde ticari bir firma tarafından üretilen ve ticareti yapılan bir uçucu yağın, her türlü denemesi yapılmalı ve standardize edilmeli ki o uçucu yağ üzerinde aynı çalışmayı yürütülen farklı araştırmacıların bulguları istatistiki olarak çok farklı olmasın. Kısaca ticari bir preparat haline getirilebilmelidir. Aynı firmadan alınan uçucu yağların aynı patojene karşı MIC, MBC değerleri farklılık göstermemelidir. Günümüzde piyasaya sürülen (azadirachtin) insektisiti örneğinde olduğu gibi (Özger vd 2013) kullanılan uçucu yağların pestisit formülasyonları geliştirilmelidir.

Deneme 2’de, Deneme 1’de etkili bulunan uçucu yağların tahmini tek bir bakterisidal dozlarının tohum kabuğundaki Cmm’ye karşı ne kadar etkili olduğu belirlenerek, uçucu yağ/yağların Cmm’yi tohum kabuğundan eradike edip edemediği araştırılmıştır. Cmm tohumla, tohumda da tohum kabuğu ve embriyoda taşındığından (Chang vd 1991, Umesha 2006) mücadelede tohumla uygulanan maddenin etkinliğinin testinde dikkate alınacak ölçütler önemlidir. Tohum kabuğunda taşınması mücadeleyi kısmen kolaylaştırır da, embriyoda taşınması kontrol altına alınmasını güçleştirmektedir. Tohum embriyosundaki Cmm’yi eradike etmek isterken aynı anda embriyonun zarar görmesi ve dolayısı ile tohumda çimlenme, canlılık, güç veya kalite kayıpları yaşanabilmektedir. Etken maddenin (uçucu yağ veya kimyasal) Cmm’yi domates tohumundan eradike etmesi için en azından tohum kabuğunda kontrol altına alması beklenmektedir. Cmm için karantina açısından sıfır bulaşıklık istendiğinden (EPPO 2013), denemeye alınan tek bir tohumun bile etrafında Cmm gelişmemesi gerekmektedir. Yapılan uygulamanın tohum kabuğundaki Cmm’ye karşı etkili olabilmesi için %100 temiz tohum oranı vermelidir. Araştırma bulgularında gerek ilk 48 saatlik gözlem sonunda gerekse 72 saatlik gözlem sonunda tek bir tohumun bile etrafında Cmm gelişimine olanak vermeyen *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağları %100 etkili olarak tespit edilmiştir. Diğer bir ifade ile bu uçucu yağlar uygulandıkları Cmm ile bulaşık domates tohumundaki 10^8 CFU/ml yoğunluğundaki Cmm’nin gelişimini tamamen engellemişlerdir. Bu çok ilginç ve önemli bir bulgudur. Ticari tohum üretiminde gözden kaçan bir Cmm bulaşıklığının, bu tarz bir tohum uygulaması ile Cmm’nin gelişiminin, bulaşık tohumların aynı lotta temiz tohumları bulaştırmasının ve fidelikte yaşanabilecek herhangi bir bulaşmanın önlenebileceğini göstermektedir (Çizelge 4.3). Literatürde tohum uygulamaları dair çalışmalar incelendiğinde diğer bitki tohumları ve tohumla taşınan çeşitli patojenlere karşı araştırmalar yapıldığı (Kritzing vd 2002, Nguefack vd 2005, Mbega vd 2012), Cmm ve domates tohumuna yönelik uygulamaların ise çok sınırlı sayıda olduğu görülmüştür. Antagonist bakteri, Serenade, ISR 2000, sodyum hipoklorit, üzüm sirkesi, elma sirkesi, sıcak su ve laktik asit ile yapılan tohum uygulamalarının tohumdaki bakteri popülasyonunu %77-100 oranında, bulaşık tohum sayısını ise %31-100 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Fakat %100 temiz tohum oranı elde edilememiştir (Tireng

Karut 2011). Ana bileşen olarak %86.72 oranında sinnamik aldehid içeren tarçın uçucu yağının, %50.21 timol ve 3.15 karvakrol içeren kekik uçucu yağına göre daha etkili bir tohum uygulaması olduğu, kekik uçucu yağının tarçından sonra Cmm'ye karşı en yüksek etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir (Tobias vd 2007). Burada Cmm'ye karşı tarçın uçucu yağına oranla daha düşük etki görülmesinin ana nedeni antibakteriyel etkisi diğer bileşenlere göre çok daha yüksek olan karvakrolün düşük oranda bulunmasıdır. Toplamda 30 farklı uçucu yağ içerisinde %0.25 dozunda *O. vulgare* uçucu yağı lahana tohumlarında Cmm'nin de içinde bulunduğu tohum kökenli bakterileri ve saprofitik fungus gelişimlerini tamamen inhibe etmiştir (Groot vd 2004). Etki derecelerinde farklılıkların görülmesine karşın bulguların önceki araştırma bulguları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Deneme 2'nin bulguları ve Cmm'ye karşı sınırlı sayıdaki tohumuygulamasına dair bulgular bu konuda ümitvar sonuçların olduğunu ve daha çok araştırmanın yapılması gerektiğini göstermiştir.

Cmm ve benzeri tohumla taşınan patojenler ile mücadelede tohum uygulamalarının sonuçlarının değişken olmaması gerekir. Bakteriostatik (geçici veya baskılayıcı etkinlik) değil bakterisidal (kalıcı, stabil etkinlik) görülmelidir. Deneme 2'de NA besiyerinde ilk 48 saatlik inkübasyondan sonra %100 temiz tohum sayısı veren *M. rucutita*, *M. piperita*, *M. communis* uçucu yağ uygulamalarının bulunduğu petrilere 72 saatlik inkübasyon sonrasında tohumlar etrafında Cmm gelişimi görülmüştür. Bu uçucu yağlar %100 temiz tohum sayısı vermemişlerdir (Çizelge 4.3). Her üç uçucu yağında bakterisidal değil bakteriostatik etki gösterdiği, tohumu uygulamadan bir süre sonra geçici baskılama ortadan kalktığından, etkinin kaybolduğu ve aslında ölmeyen sadece gelişimi baskılanan Cmm'nin yeniden geliştiği tespit edilmiştir. Literatürde bu konuyla ilgili tespitlerin bazısında aslında antibakteriyel etki denemelerinde 24 saatlik inkübasyon süresinin yeterli olduğu, 48 ve 72 saatlik inkübasyonun sonunda değişiklik olmadığı görülmektedir (Cimanga vd 2002, Kızıl vd 2005). Fakat bu çalışmalarda direkt bakteriye uygulama sürecinin olması ve diğer tohum uygulamalarına dair bir bulgunun olmaması, tohum uygulamalarında *in vitro* direkt hedef patojene karşı uygulamalardan farklı olarak diğer faktörlerin (tohum türü, uygulama şekli, süresi vb) de etkili olması nedeni ile sonuçlar doğrudur.

Şekil 4.2'de görüldüğü üzere 1000 ppm uçucu yağ uygulanan Cmm ile bulaşık domates tohumlarının NA besiyerinde 72 saatlik inkübasyonundan sonra, tohumların çimlendiği görülmüştür. Bu bulgu uçucu yağ tohum uygulamasının etkinliği açısından önemlidir. Deneme 2 bir tohum çimlendirme denemesi olmamasına karşın, tesadüfen tespit edilen bu bulgu uçucu yağ uygulamaları sonrasında tohumların tamamen veya yüksek oranda çimlenmediği (Önen 2003, Paudel ve Gupta 2008, Rosado vd 2009) tezinin aksine, tohumların çimlendiğini göstermiştir. Nitekim herhangi bir tohum uygulamasının tohumdaki hedef patojeni tamamen yok etmesi ama aynı zamanda da tohumun kalitesinde kayıplara neden olmaması gerekir. Domates tohumlarında görülen çimlenme çalışmanın sonunda asıl hedeflenen sonuca ulaşmak açısından ümitvar bulunmuştur. *O. vulgare* uygulanan tohumların da çimlenmesi, kekik uçucu yağının nispeten düşük toksiteli, fakat fitopatojenlere karşı oldukça yüksek derecede aktif ve tohum dezenfektanı olarak kullanılmasının mümkün olduğunu göstermiştir (Anonymous 1991, 2007).

Deneme 2'nin bulguları, *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının, embriyodaki Cmm'ye karşı etkili ya da etkisiz olduğu bilinmemekle beraber, tohum kabuğundaki Cmm'yi tamamen eradike etmeleri nedeni ile %100 etkili olduklarını ve ayrıca tohumlarda görülen çimlenmenin de tohum kalitesi açısından ümitvar olduğunu göstermiştir. Elde edilen bu verilerin ışığında hedeflenen ileriki çalışmalar için bu uçucu yağların uygun olduğu tespit edilmiştir.

Araştırma içerisinde Deneme 3, uçucu yağların Cmm'ye karşı domates tohum uygulamasında kullanılabilirliğinin ve uygun dozların belirlendiği, bunların Cmm ve tohum kalite parametreleri üzerine etkilerinin tespit edildiği en kapsamlı bölümlerden biridir. Temiz tohum sayısı ile ilgili verilerin alındığı petrilere kontrol uygulamasında petri içerisinde bütün tohumların etrafında Cmm kolonisi gelişmiştir. *O. vulgare*'nin 500 ppm ve üstü dozlarının hiçbirinde Cmm gelişmediği, 500 ppm'in altındaki dozlarda, doz düşükçe Cmm ile bulaşık tohum sayısının arttığı tespit edilmiştir. Dört farklı uçucu yağın (*L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis*) sekiz farklı dozunun (125, 200, 250, 300, 400, 500, 1000 ve 5000 ppm) Cmm ile bulaşık domates tohumuna uygulandığında, yapılan uygulamaların tohum kabuğundaki Cmm üzerine etkilerinin araştırıldığı araştırmanın bu bölümündeki bulgular dikkate değerdir. Herhangi bir uçucu yağın antibakteriyel etkisi yüksek ise veya *in vitro* koşullarda yüksek inhibisyon zonu oluşturuyor ya da düşük MIC değeri veriyorsa hedef patojene karşı yapılacak tohum uygulamasında da etkili olması doğaldır. Fakat çalışılan patojen Cmm gibi tohumla taşıyor ve sıfır bulaşıklık isteniyor ise tohumla yapılacak uygulama dozlarının etkisi önemlidir. Kısaca %70 etkili demek yeterli ve etkin bir sonuç değildir. Sonuçlar inhibisyon zon verileri ve 1000 ppm dozunda yapılan tohum uygulamasındaki sonuçlar ile paralellik göstermiştir. İnhibisyon zonu yüksek, MIC değeri düşük ve 1000 ppm dozundaki tohum uygulamasında etkili olan uçucu yağlar burada da etkili olmuştur. *L. stoechas*, *O. onites* ve *O. vulgare* uçucu yağlarının 500 ppm ve üstü bütün dozlarında petrilere tohumlar etrafında Cmm koloni gelişimi görülmemiş ve %100 temiz tohum oranı elde edilmiştir. Burada içsel yani embriyodaki Cmm bulaşıklığı ile ilgili herhangi bir yargıya varılamaz. Fakat en azından bu uçucu yağların tohum kabuğundaki Cmm bulaşıklığına karşı yüzde yüz etkili olduğu saptanmıştır. Domates tohum kabuğundaki bulaşıklıkla mücadelede bu üç uçucu yağın 500 ppm dozu önerilebilmektedir. *R. officinalis*'in ise 1000 ve üstünde %100 temiz tohum oranı elde edildiğinden bu uçucu yağında 1000 ppm dozu tohum kabuğundaki Cmm'nin kontrolü için önerilmektedir. Dört farklı uçucu yağ içerisinde en etkili olarak tespit edilen ve %74 etki ile *O. vulgare*'nin 500 ppm ve üstü dozları benzer çalışmalarda değerlendirilebilecek önemli bir bulgudur (Çizelge 4.4). Nitekim Origanum türü kekik uçucu yağlarının hem Cmm hem de benzeri tohumla taşınan etmenlere karşı etkili olduğu bilinmektedir. Burada ticari üretimleri kullanıldığı için her iki uçucu yağın bulguları uygulamaya aktarılabilir. Çünkü taze çıkarılan ve ticari uçucu yağların etkileri arasında fark olmaktadır. Bulguların önceki araştırma sonuçları ile ilgili uyumunu belirlemek için yapılan taramada tohum kabuğundaki Cmm üzerine yapılmış benzer bir araştırma bulgusuna rastlanılamamıştır. Fakat Cmm dışındaki patojenlere yönelik sınırlı sayıda tohum uygulamasına yönelik bulgudan birinde (*A. vera*, *B. pendula*, *C. arabica*, *G. uralensis*, *J. communis*, *O. basilicum*, *Q. robur*, *R. palmatum*, *R. officinalis*, *R. graveolens*, *S. alba*, *Y. schidigera* ve *S. officinalis*) ekstraktları domates tohumuna uygulanmıştır. Ekstraktların *in vitro* ve *in vivo* domates tohum uygulamalarında *X. perforans* gelişimini tamamen engellediği bildirilmiştir (Mbega vd

2012). İçerik olarak %60-40 karvakrol ve %5-25 oranında timol içeren Meksika kekiği (*L. berlandieri*) uçucu yağının %0.5 dozu ile yapılan domates tohum uygulamasının *F. oxysprum* gelişimini %100 engellediği tespit edilmiştir (Cueto Wong vd 2010). Daouk vd (1995) tarafından yapılan benzer çalışmada da *O. syriacum* uçucu yağının domates tohumunda fungus gelişimini tamamen durdurduğu rapor edilmiştir. Önceki bulgulardan da görüldüğü üzere tohum uygulamalarında başarı hedef patojene, uçucu yağ ve kullanılan dozlara bağlı olarak %100 etkiden daha düşük seviyelere kadar düşebilmektedir.

Çizelge 4.4'te uçucu yağ x doz interaksyonunun, uçucu yağların ve dozların temiz tohum sayısı üzerine ($P \leq 0.01$) etkili olduğu tespit edilmiştir. Doz artışına bağlı olarak uygulamalar arasında temiz tohum sayısının da arttığı, herhangi bir dozda en yüksek seviyeye ulaştığı ve bu dozun üstündeki dozlarda değerin değişmediği görülmüştür. Uçucu yağ ile tohum uygulamalarında da tıpkı *in vitro*'da direkt patojene yönelik çalışmalarda olduğu (Kızıl vd 2005) gibi, doz artışına bağlı olarak antibakteriyel etkinlik ve tohum uygulamalarındaki etkinlik artmakta, bir noktada kırılmakta ve sonrasında hep sabit gitmektedir. Uçucu yağ dozu ve antibakteriyel etki arasında linear pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Nitekim lahanaya tohumlarına *A. brassicicola*'a karşı %0.1 ve 1 oranında uygulanan kekik uçucu yağı aynı oranda sağlıklı bitki vermiş ve %0.1 dozun üstünde etkinin değişmediği tespit edilmiştir (Amein vd 2011).

Deneme 3'de tohumda bakteri yoğunluğu ile asıl belirlenmek istenen, yapılan uçucu yağ uygulamalarının başlangıçta tohumla bulaştırılan 10^8 CFU/ml yoğunluğunda olan ve negatif kontrolde bunun logaritmik değerlerinin 4,55 log CFU/tohum olduğu tespit edilen Cmm yoğunluğunu 0'a düşürüp düşürmediği veya ne kadar azalttığıdır. Burada temiz tohum oranındakine göre daha güvenli sonuçlar elde edilmektedir. Bulaşıklığın embriyoda veya tohum kabuğunda olması sonucu etkilememekte, önemli olan tohumdaki gerçek bulaşıklığın tespit edilmesidir. 10^1 CFU/ml'lik bulaşıklığın veya tek bir domates tohumundaki Cmm bulaşıklığı bile bütün tohum lotunu veya fideliği bulaştırabilirdiğinden, tohum kabuğunda ve embriyodaki Cmm'ye karşı tohum uygulamasının etkinliğinin en iyi göstergesi 0 log CFU/tohum elde edilebilmesidir. Yapılan tohumda bakteri yoğunluğunun belirlenmesine yönelik denemelerin bulguları bu amaca ulaşıldığını göstermiştir. En etkili uçucu yağ 1000 ppm ve üstü değerlerde 0 log CFU/tohum veren *O. vulgare* olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). Nitekim Cmm'ye karşı yapılan bir tohum uygulamasında kontroldeki 6.1 log CFU/ml değerini, *O. vulgare*'nin %0.1 ve 0.33'lik dozu 4.9 log CFU/ml, %1 dozu 3.8 log CFU/ml'ye düşürmüştür. Sadece %3.3 dozunda 0 log CFU/ml elde edilebilmiştir (Van der Wolf vd 2008). Deneme 2 ve literatür bulgusunda aynı dozlarda (%0.1=1000 ppm) bir kırılma olduğu, birinde 1000 ppm'de 0 log CFU/tohum elde edilirken diğerinde, %0.1'de 0 log CFU/ml değeri elde edilememiş ve bundan çok daha yüksek doz olan %3.3'de elde edilmiştir. Literatür çalışmasında kullanılan *O. vulgare* uçucu yağının içeriği ile ilgili bilgi verilmemesine karşın, MIC değerinin de yüksek olması (%0.15) nedeniyle iki çalışma arasında farkın ana nedeni uçucu yağlar arasındaki içerik farklılığıdır. Bu tür araştırmalarda uçucu yağların içerikleri ve antibakteriyel etkisi yüksek ana bileşenlerin miktarca oranları araştırma bulguları arasındaki farkın ilk ve en büyük nedenidir. Bir diğer neden de uçucu yağın tohumla nasıl ve ne kadar süre ile uygulandığıdır. Literatür çalışması detaylı incelendiğinde 30 dakika süre ile çalkalayıcıda tutularak uçucu yağın uygulandığı ve uygulamadan hemen sonra yağın tohumdan uzaklaştırılarak oda

koşullarında kurutulduğu görülmüştür. Vakum yapılmadığı için tohum içerisine iyi nüfuz etmemiş olabilir ve hemen uçucu yağın yıkanması da uçucu yağın tohumdaki bakteriye etkinliğini düşürmüştür. *Origanum* türü kekik uçucu yağlarının antibakteriyel etkinliği genellikle yüksektir. Fakat lahana tohumlarına %1 *T. vulgaris* ve *O. vulgare* uçucu yağı uygulamasının tohumda bakteri yoğunluğunu (Cmm ve Xcc) sırasıyla 3.0 ile 4.0 log CFU/ml düşürdükleri ve yakın değer verdiğine dair bulgu da mevcuttur (Groot vd 2006). Lahana tohumlarına 30 dakika süre ile uygulanan *T. vulgaris* uçucu yağının bakteri popülasyonunu (Cmm ve Xcc), %1 dozunda 0 CFU/ml'ye düşürmesi (Groot vd 2004) kekik uçucu yağlarının tohum uygulamalarında Cmm ve benzeri bakteriyel etmenlere karşı etkili olduğunu göstermektedir. Nitekim kekik uçucu yağlarının içerisinde en önemli iki ana bileşenden biri olan timol uygulanan (0.5 ve 1.0 ug/tohum) tohumlardan gelişen fidelerde sırasıyla %35 ve 15 bakteriyel kanser simptomları görülürken, 5 ug/tohum dozunda 0 simptom görülmüştür. Diğer taraftan 1.5 mg/g dozu kontrolde 5.3 log CFU/100 tohum olan Cmm yoğunluğunu ortalama 3.13 log CFU/100 tohum'a düşürmüştür (Xu 2010).

Uçucu yağ, doz ve uçucu yağ x doz interaksiyonlarının log CFU/tohum değerleri üzerine etkisi ($P \leq 0.01$) önemli bulunmuştur. Log CFU/tohum değerleri açısından uçucu yağlar içerisinde *O. vulgare*'den sonra 0.99 log CFU/tohum ile *O. onites* gelmiş ve bunu sırasıyla 1.09 log CFU/tohum ile *L. stoechas* ve 1.43 log CFU/tohum ile *R. officinalis* izlemiştir. Her üç uçucu yağın 5000 ppm dozu 0 log CFU/tohum değerini vererek, domates tohumundaki Cmm gelişimini tamamen engellemiştir (Çizelge 4.5). Literatürde benzer çalışmalar incelendiğinde *O. onites* 'in tohum uygulamalarında içerisinde Cmm'nin de yer aldığı fitopatolojik bakterilere karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Kotan vd 2014). Lavanta grubu uçucu yağlar da yine kekik uçucu yağları gibi antibakteriyel etkisi yüksek ve tohum uygulamalarında kullanılabilecek uçucu yağlardır. Nitekim kontrolde 5.6 log CFU/tohum değeri, *Lavandulla coronopifolia* ekstraktı 1.55 log CFU/tohum'a düşürmüştür. Karabaş lavantası olarak bilinen *L. stoechas*'ın ekstraktı ise 4.90 log CFU/tohum değerine düşürmüştür (Talibi vd 2011). *R. officinalis* uçucu yağının Cmm üzerine domates tohumunda yapılmış herhangi bir araştırma bulgusuna rastlanılmamakla beraber, bu bitkinin ekstraktı (%10 w/v) ile yapılan tohum uygulamasının kontrolde 10^{10} CFU/ml olan *X. perforans* bakteri yoğunluğunu 2.5×10^3 CFU/ml'ye düşürmüştür (Mbega vd 2012). Görüldüğü üzere uçucu yağlar ile tohum uygulaması bulaşık tohumlarda patojen yoğunluğunu düşürmede etkilidir. Nitekim domatesin dışında soya fasulyesi tohumlarına 4 mg/ml öjenol uygulamasının tohumdaki bakteri (*X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) yoğunluğunu 2.6×10^6 CFU/tohum'dan 7.0×10^2 CFU/tohum'a düşürmüştür.

Tohum uygulamasıyla tohumdaki hedef patojenin tamamen yok edilmesi hedeflenir. Aynı zamanda üretimde kullanılacak olan bu tohumluğun canlılığının ise uygulamadan olumsuz etkilenmemesi istenir. Deneme 3'de çimlenen tohum sayıları üzerinden yapılan varyans analizi sonuçlarına göre uçucu yağ, doz ve uçucu yağ x doz interaksiyonu çimlenen tohum sayısı veya çimlenme oranı üzerine etkileri ($P \leq 0.05$) önemli bulunurken, çimlenme zamanı üzerine önemsiz tespit edilmiştir. Uçucu yağ türü ve doz artışı çimlenen tohum sayısını etkilemiş ve buna göre değerler arasında farklılıklar görülmüştür. Aynı parametrelerin çimlenme zamanı üzerine ise önemli bir etkisinin olmaması ve kontrole yakın değerler vermesi ilginç bir bulgudur.

Antibakteriyel etki denemelerinde, tohum uygulamasında temiz tohum oranı ve tohum başına bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum) değerlerinde Cmm gelişimini inhibe eden, en yüksek elgelleyici etkiyi gösteren origanum türü kekik uçucu yağlarının her ikisi de tohum çimlenme oranını kontrole göre istatistiki açıdan önemli düzeyde ($P \leq 0.05$) düşürmüşlerdir. *L. stoechas* ise uçucu yağlar içerisinde %81.2 çimlenme oranı ile tohum çimlenmesini fazla azaltmamış ve kontrole yakın değer vermiştir. Domates tohumlarının çimlenme oranlarında en fazla düşüşe neden olan *O. vulgare*'nin 5000 ppm dozunda bile domates tohum çimlenme oranı %66 tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Benzer bir literatür bulgusunda kontrolde %84 olan çimlenme oranı, %50 oranında timol ve 3.5 karvakrol içeren *T. vulgaris* uçucu yağının %25'lik dozu ile %68'e düşürmüştür (Tobias vd 2007). %25 gibi yüksek dozda %60'ın üzerinde çimlenme oranı görülmesi kekik uçucu yağlarının dozlarının optimize edilerek tohum uygulamalarında kullanılabileceğini göstermektedir.

Literatürde uçucu yağların tohum çimlenmesi üzerine farklı etkilerinin olduğu görülmektedir. *T. vulgaris* uçucu yağının %0.25 dozunun altında lahana tohumlarının çimlenmesini etkilemezken, üst dozlarda ise tohum çimlenme oranını düşürmüştür (Van der Wolf ve Van der Birnbaum 2012). *A. vera*, *B. pendula*, *C. arabica*, *G. uralensis*, *J. communis*, *O. basilicum*, *Q. robur*, *R. palmatum*, *R. officinalis*, *R. graandolens*, *S. alba*, *Y. schidigera* ve *S. officinalis* ekstraktları domates tohum çimlenmesi teşvik etmiştir (Mbega vd 2012). 4 saatlik uygulama süresinde %0.25'in üstündeki dozlarda kekik uçucu yağ uygulamasında lahana tohumlarının çimlenme oranları önemli oranda düşmüştür (Groot vd 2004). Öjenol uygulaması mısır tohumlarının çimlenme oranını düşürmüştür (%23 çimlenme oranı), timol, sitronellal ve biberiye uçucu yağı negatif etki göstermemiş (Waliwitiya 2005), öjenolün 2, 4, ve 8 mg/ml'lik dozları soya fasulyesi tohumlarının çimlenme oranını dozlara bağlı olarak sırası ile %3, 7 ve 13 oranında düşürmüştür (Iacobellis vd 2005). Farklı tohum türlerindeki bazı bulgular ise uçucu yağların tohum çimlenmesini teşvik ettiğini göstermektedir (Bankole ve Joda 2004, Nguetack vd 2005). Bu tür çalışmalarda tohuma uygulanan uçucu yağ türü ve içeriği kadar, uygulama şekli, süresi vb birçok faktör etkindir. Tohum çimlenme oranı doza, uygulama süresine, tohum türüne bağlı olarak değişebilmektedir. Ayrıca uçucu yağlar dışında farklı tohum uygulamaları da (antagonistik bakteri, Serenade, ISR 2000, sodyum hipoklorit, üzüm sirkesi, elma sirkesi, sıcak su ve laktik asit) domates tohum çimlenme oranını %1.5-12.5 arasında değişen oranlarda düşürmüştür (Tireng Karut 2011). Tohuma uygulanan her etken maddenin tohumun çimlenme oranına sinerjistik, antagonistik veya nötr bir etki göstermesi doğaldır. Ancak hedef patojene ve tohum türüne özgü uygun doz ve uygulama süresinin belirlenmesi bu etkileri ortadan kaldıracaktır.

Çimlenme oranı optimum koşullarda (ışık, sıcaklık, oksijen, nem) yapıldığından, fideliklerde tohum ekiminin yapıldığı toprak, torf ve fide yetiştirme harcında farklı faktörlerin etkisi ortaya çıkabilmektedir. Çimlenme oranına ilave olarak belirlenen çıkış oranları bu sorunu ortadan kaldırmaktadır. Deneme 3'de uçucu yağ uygulamasının tohumların çıkış oranlarına etkileri konusunda elde edilen bulgular çimlenme oranlarındaki bulgulara paralellik göstermiştir. Antibakteriyel etkisi yüksek olan origanum türü kekik uçucu yağlarının diğer uçucu yağlara oranla düşük çıkış oranı verdikleri tespit edilmiştir. Antibakteriyel etkisi, temiz tohum oranı ve tohumda bakteri yoğunluğu parametreleri açısından en yüksek değeri veren *O. vulgare* uçucu yağı çıkış

oranı açısından en düşük değeri vermiştir (Çizelge 4.7). Antibakteriyel etkinlik ve tohum kalite değerleri arasında negatif bir ilişki olduğu görülmektedir. Bunun uçucu yağ içeriğinden mi veya uygulama dozlarından ya da tohum uygulama yönteminden mi kaynaklandığı ilave çalışmalar ile belirlenmelidir. Ancak literatür bulguları incelendiğinde farklı sonuçların olduğu görülmektedir. Nitekim vigoru düşük lahana tohum lotundan alınan tohum örneklerine *T. vulgaris*, *O. vulgare*, *C. zeylanicum*, *S. Aromaticum* (karanfil), Biosept (greyfurt ekstraktı ve organik asit içeren preparat), askorbik asit ve propiyonik asit uygulamalarından, *S. Aromaticum* ve propiyonik asitin %1 ve 3.3, Biosept'in %3.3 dozunun çıkış oranı ve normal fide gelişimini ($P \leq 0.1$) olumsuz etkilediği, diğer uygulamaların ise önemli bir etkisi olmadığı saptanmıştır. *O. vulgare*'nin %0.1 dozunda %23, %0.33'ünde %30, %1'ünde %26 ve %3.3 dozunda ise %20 normal fide gelişimi görülmüştür. Doz artışına bağlı olarak düşük vigorlu lahana tohum lotunda kontrole göre normal fide gelişimini arttırdığı ve belli bir dozdan (%3.3) sonra ise olumsuz etkilediği tespit edilmiştir (Van der Wolf vd 2008). Deneme 3 ve literatür bulgusu arasında tohum gücü (vigor), kullanılan dozlar, dozların hazırlanması, tohum uygulama şekli ve literatür bilgisinde belirtilmemiş olmakla birlikte muhtemelen uçucu yağ içerikleri arasında farklılıklar vardır. Sadece steril su içerisinde hazırlanan uçucu yağ dozlarının sonikasyon şeklinde tohum uygulaması etkili bir uygulama olamadığı düşünülmektedir. Uçucu yağlar için en etkili çözücü DMSO (%10)'dur. Embriyoda taşınan bir patojene karşı etkili olabilmesi için mutlaka vakum infiltrasyonu ile tohumlara uçucu yağ uygulanmalıdır. DMSO ile çözünme ve vakum infiltrasyonu ile uygulamanın antibakteriyel etkinliği arttırdığı ve daha fazla kontak etki söz konusu olacağından çıkış oranlarında doza bağlı olarak düşüşlerin olması doğaldır. Literatür bulgusunda düşük vigorlu tohum lotunun doz artışına bağlı olarak normal fide oranını artırması mekanizmasının tam olarak açıklanamamasına rağmen, benzer araştırma bulgularının varlığı (Kritzing vd 2002, Waliwitiya 2005, Mbega vd 2012) nedeni ile mümkün olduğu görülmektedir. Uçucu yağ uygulaması çıkış oranını düşerebilmektedir. Nitekim Cmm'yi eradike etmek için domates tohumuna timol uygulamasının fide çıkışı üzerine etkisi incelendiğinde kontrolün fide çıkışı %94.5 iken, timol uygulamasında %88.9 tespit edilmiştir (Xu 2010).

Deneme 3'de uçucu yağların domates tohum dokusuna (kabuk veya embriyo gibi iç dokulara) fitotoksik bir etkisinin olup olmadığını belirlemek için yapılan TTC testine göre tohum canlılığı en yüksek olan uygulama %88 ile *L. stoechas* olmuş ve bunu sırasıyla %87 ile *R. officinalis* ve %85 ile *O. onites* izlemiştir. *O. vulgare* ise %84 ile en düşük tohum canlılığı veren uygulama olup, uygulamalar arasında tohum canlılığı %84-88 arasında değişmiş, kontrole göre %4-8 arasında daha düşük olmuştur. Tohum kabukları kararmış veya kavrulmuş bir görüntü veren tohumların (Şekil 4.9), embriyolarında böyle bir bulguya rastlanılmamıştır (Şekil 4.8). TTC testi tohum kalite çalışmalarında kullanılmasına karşın (Sivritepe 2011), uçucu yağ uygulanan tohumlarda fitotoksitenin belirlenmesine yönelik bir bulguya ulaşılamadığından bir karşılaştırma yapılamamıştır. Fakat özellikle tohum canlılığının çok fazla düşmediği görülmüştür. TTC testinin sonuçları standart çimlendirme testi ve çıkış testlerine göre daha yüksek tohum canlılığı vermiştir. Uçucu yağ uygulanan bazı domates tohumlarının tohumun dış gözlemine göre sanki bir fitotoksik etkiden dolayı kavrulmuş bir görüntü vermesine karşın, embriyolarının canlı olduğunun görülmesi acaba uçucu yağ uygulaması embriyoya değil de direkt tohum kabuğunda mı bir deformasyon oluşturuyor diye düşündürmüştür.

Uçucu yağların gerek antibakteriyel gerekse tohum kalitesi üzerine etkilerinde içerikleri ve özellikle ana bileşenlerin türü ve miktarı önemlidir. Deneme 3’de GC-MS ile yapılan içerik analizine göre *L. stoechas* uçucu yağının 51, *O. onites* ve *O. vulgare*’in 41, *R. officinalis*’in ise farklı miktarlarda toplamda 37 adet uçucu bileşen içerdiği tespit edilmiştir. *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının miktarca en fazla bulunan ana bileşenleri sırasıyla %43.95 kamfor, %64.78 karvakrol, %74.05 karvakrol ve %49.48 1,8-sineol’dür (Çizelge 4.9). Matematiksel olarak değerlendirildiğinde, bu uçucu yağların domates tohumundaki Cmm üzerine antibakteriyel etki göstermesi, tohumların çimlenme ve çıkış oranlarını kontrole göre düşürmeleri içerdikleri ana bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Nitekim bu tezi doğrular araştırma bulguları mevcuttur. Ana uçucu yağ bileşenlerinden öjenol, karvakrol, sinamik asit, basil methyl havicol, sinamaldehit, sitral, geraniol olduğu ve öjenol, timol, karvakrol, sinamik asit, methyl havicol, sinamit aldehit, sitral, geraniol, trans-anethol, bisabolon oksit, linalol, sabinen, sitranelol, geraniol, karvon ve *cis*-carandol, pulegone gibi ana bileşenlerin antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. Karvakrol ve timol, sırasıyla linalol, sitronellal ve 1,8-sineol’e göre daha yüksek bir antibakteriyel etkilidir. Aksine γ - terpinen ve *p*-simen gibi ana bileşenler ise antibakteriyel etki göstermemektedirler (Burt 2004). Önemli bir uçucu yağ bileşeni olan kamforun antibakteriyel etkisi düşüktür (Inouye vd 2001). Sırasıyla Linalil asetat< limonen< β -pinen < α -pinen < kamfor< linalol< 1,8-sineol<mentol< timol< karvakrol daha yüksek antibakteriyel etki göstermektedir (Sokovic vd 2010). Sitral, methon, limonen ve timol yüksek antibakteriyel etkilidir (Vimal vd 2013). Yüksek oranda karvakrol %74.09 ve timol %2.59 içeren *O. vulgare* uçucu yağının, bunları daha düşük oranlarda sırasıyla %64.78 karvakrol ve %0.97 timol içeren *O. onites*’e göre daha yüksek bir antibakteriyel etki göstermiştir. Her iki *origanum* türü içeriklerindeki karvakrol ve timol nedeni ile diğer uçucu yağlara göre daha yüksek inhibisyon zonu, düşük MIC değeri, tohum uygulamalarında yüksek temiz tohum oranı ve düşük tohumda bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum) vermiştir. Aynı şekilde yüksek oranda kamfor içeren *L. stoechas*’ın *origanum*lara göre daha düşük antibakteriyel etki göstermesi de içerdikleri ana uçucu bileşenlerin sahip oldukları antibakteriyel etkiler nedeni ile mantıklıdır. Ayrıca bu uçucu yağın yüksek kamfor içeriğine rağmen göstermiş olduğu antibakteriyel etkinin kaynağı 1,8-sineol %1.89, linalol %1.54 ve karvakrol %0.92 gibi yüksek antibakteriyel etkili bileşiklerin sinerjistik etkisidir. İçeriğindeki yüksek miktarda %49.48 1,8-sineole rağmen *R. officinalis*’in *L. stoechas*’a göre daha düşük antibakteriyel etki göstermesi uçucu yağların antibakteriyel etkinliğinde sadece ana bileşenlerin yeterli olmadığını göstermiştir. Miktarca %1’in üzerinde veya altında bulunan ana uçucu bileşenin dışındaki uçucu bileşenlerin kombinasyonu nötr, antagonistik veya sinerjistik etki gösterebilmektedir (Çizelge 4.9). Nitekim timol ve karvakrol oranı %1’den düşük olan *S. coerulea* uçucu yağı, timol ve karvakrol’ü ana bileşik olarak taşıyan türlerle aynı antibakteriyel ve antifungal aktiviteyi göstermiştir ve seskiterpen hidrokarbonlarının da yüksek seviyede antibakteriyel etkiye sahip olabilecekleri tespit edilmiştir (Azaz vd 2002). Fakat sadece uçucu bileşenlerin etkili olduğu gibi genelleme yapılamaz. Uçucu yağlardaki uçucu bileşenlerin miktarı ve kombinasyonuna, hedef patojene, uygulama şekline, yöntem ve amaca yönelik uçucu yağların antimikrobiyal etkinliği değişmektedir. Uçucu yağlar Çizelge 4.9’da görüldüğü gibi çok sayıda uçucu bileşen içermektedir. Bunların optimizasyonu için ticari üretimlerinin kullanılması iyi bir çözüm olabilir. Fakat teorik olarak bütün bileşenlerin ve bunların farklı kombinasyonlarının optimize edilmesi zordur.

Uçucu yağ içeriklerinin tohum kalite değerleri çimlenme oranı, çıkış oranı, çimlenme ve çıkış zamanı üzerine etkileri ile ilgili olarak tıpkı antibakteriyel etkideki teoremlerde bulunulabilir. Hidrokarbon ve oksijen monoterpenlerin *A. retroflexus*, *C. album* ve *R. crispus* yabancı ot tohumlarında tohum çimlenmesini düşürmüştür (Kordali vd 2007). 2010 yılında sanılanın aksine karvakrol, timol ve γ -terpinen gibi ana uçucu bileşenlerin tohum çimlenmesini düşürmediği aksine teşvik ettiği tespit edilmiştir. Etki sırasına göre geraniol, karvon, borneol, β -citronellol, α -terpineol, kamfor, menthol, menthone, limonene, sitralin tohum çimlenmesini en fazla engelleyen uçucu yağ bileşenleri olduğu rapor edilmiştir. 1,8-sineol, kamfen, karvakrol, estragol, geranil asetat, linalol, linalil asetat, myrcene, *p*-simen, timol, α -phellverene, α -pinen, α -terpinen, α - β thujone, β -pinen ve γ -terpinen gibi ana uçucu bileşenlerin ise tohum çimlenmesini teşvik ettiği bildirilmiştir (De Martino vd 2010). İçeriğinde %27.5-35.8 oranında α -pinen bulunan *Cupressus sempervirens* uçucu yağı çeşitli yabancı ot tohumlarının dozlara bağlı olarak (1.25, 2.5, 3.75 ve 5 μ l/ml) çimlenme oranını düşürmüştür (Ismail vd 2013). Deneme 3'de *Origanum* türlerinin domates tohum çimlenme ve çıkış oranlarını kontrole ve diğer uçucu yağlara *L. stoechas* ve *R. officinalise* göre daha fazla düşürmesinin nedeni matematiksel olarak yüksek oranda karvakrol 64-74 ve timol %0.97-2.59 içermeleri gibi görünse de, literatür bilgileri ışığında bunun böyle olmadığı görülmüştür. En azından karvakrol ve timolün sanılanın aksine domates tohumu üzerine çok fazla fitotoksik olmadığı tespit edilmiştir. Her iki uçucu yağda bulunan borneol tohum çimlenmesini inhibe etmiştir. *L. stoechas* ve *R. officinalis*'te ortak olan kamfor bunların uygulandığı domates tohumlarını kontrole göre çimlenme ve çıkış oranlarını düşürmüştür. Kamfora ilave olarak *R. officinalis* uçucu yağında bulunan α -terpineol ve limonen tohum çimlenmesini engellemiş ve çimlenme oranını düşürmüştür (Çizelge 4.9). Domates tohumları ve fideleri üzerine timol ve karvakrolün fitotoksik olmadığı (Gwinn vd 2010), aksine karvakrol, timol, karvon ve limonenin 500, 250, 125 ve 62.5 μ g/ml dozlarında yabancı ot tohum çimlenmesini düşürmeleri (Azırak ve Karaman 2008) ve özellikle karvakrol içeriği yüksek uçucu yağların *O. vulgare* ve *O. onites* kabul edilebilir sınırlarda (%70) en düşük çimlenme ve çıkış oranını vermesi (Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10) uçucu bileşenlerin tohum türü ve uygulama şekline bağlı olarak etkisinin değiştiğini göstermiştir. Timolün artan dozlarının domates tohumu üzerine fitotoksik etki göstermesi, bu etkinin muhtemel nedenlerinin uygulama dozu, yöntem ve bitki yaşına bağlı olduğu saptanmıştır (Xu 2010). Görüldüğü üzere uçucu yağların ve ana bileşenlerin tohum çimlenmesi üzerine etkileri muhtemelen uygulama dozu, yöntem, uygulama süresi, şekli, tohum ve bitki türüne göre değişmektedir. Araştırma bulguları ve literatür bilgileri kıyaslandığında uçucu yağların (uçucu bileşenlerin) tohum çimlenme ve çıkışı üzerine etkileri kesinlikle şu faktördendir diye bir yargıya varmak güçtür. Bu konuda konuyu açıklayıcı yeterince çalışma yapılmış değildir. Uçucu bileşenlerin tohum canlılığı üzerine etkisini anlamak için bunların tohum çimlenme sırasındaki etki mekanizmalarının araştırılması gerekir. Direkt doku veya hücreye mi bir zarar veriyorlar ya da tohum çimlenmesindeki kayıpların çimlenme gereksinimlerinde bir değişiklik mi bir ilgisi var sorularının cevaplanması gerekmektedir. Örneğin direkt tohuma uygulanan uçucu yağ veya bileşen çimlenme sırasında tohumun oksijen alınımlı bloke edebilir. *M. piperita* uçucu yağının 500 ppm dozunun hıyar bitkilerinin solunumunu %50 oranında düşürdüğü (Mucciarelli vd 2001), α -pinenin'in soya fasulyesi kotiledonlarında oksijen tüketimini azaltarak çimlenmeyi engellediği rapor edilmiştir (Penuelans vd 1996). Direkt uçucu yağ uygulamasına göre buhar halinde uygulanması tohum çimlenmesi üzerine daha fazla

negatif etki göstermiştir (Vicherkova vd 1999). Diğer bir konuda ne kadar süre ile uçucu yağın tohuma uygulandığıdır. Kekik uçucu yağının bir saatten fazla (Van der Wolf vd 2008) ve %25 dozunun üstünde ve 4 saatlik uygulanması kontrole göre tohum canlılığını düşürmüştür (Groot vd 2004). Uçucu yağların Cmm üzerine antibakteriyel etkisi ve domates tohum kalitesine etkisi hakkında kesin bir yargıya varabilmek için, öncelikle ticari üretilen uçucu yağların bileşenlerinin (bireysel ve kombine etkilerinin) Cmm ve domates tohum kalitesine etkilerinin araştırıldığı çalışmalara ihtiyaç vardır. Antibakteriyel etki ve tohum canlılığı üzerine olan etki tohum türüne göre de değiştiğinden burada olduğu gibi farklı tohumlar ile yapılmış çalışmaların sonuçlarını karşılaştırmak bilimsel açıdan yeterli değildir. Fakat 1,8-sineol, kamfen, karvakrol, estragol, geranil asetat, linalol, linalil asetat, myrcene, *p*-simen, timol, α -pellveren, α -pinen, α -terpinen, α - β thujon, β -pinen, γ -terpinenin tohum çimlenmesini teşvik etmesi ve öjenol, timol, karvakrol, sinnamik asit, metil havikol, sinnamik aldehit, sitral, geraniol, trans-anethol, bisabolon oksit, linalol, sabinen, sitranelol ve geraniol, karvon ve *cis*-carandol, pulegonun yüksek antibakteriyel etkili olması nedeni ile her iki grup uçucu yağ kombinasyonların tohum uygulamalarında başarılı ve tersi kombinasyonların ise tohum uygulamalarında negatif sonuçlar verebileceği belirtilebilir. Sonuç olarak, tohum uygulamasında uçucu yağ türü ve dozuna bağlı olarak, Cmm'ye antibakteriyel etkisi, tohum canlılığı üzerine negatif ve pozitif etkisi değişebilmektedir.

Deneme 3'ün sonuçları tohum çimlenme ve çıkış oranlarındaki bir miktar düşüşle beraber genellikle uçucu yağların 500 ppm ve üstü dozların domates tohumundaki Cmm'ye karşı etkili olduğunu göstermiştir. Deneme 4'te ise bu uçucu yağların *L. stoechas*, *O. onites*, *O. vulgare* ve *R. officinalis* film kaplamada kullanılabilirliği, film kaplı tohumlarda inhibisyon zonu (mm), temiz tohum oranı (%), tohumda bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum), çimlenme oranı (%), çıkış oranı (%) ve fide başına Cmm yoğunluğu (log CFU/fide) üzerine etkisi belirlenmiştir.

Uçucu yağlar ile film kaplanan tohumların etrafında Cmm içeren besi yerinde Cmm gelişmeyen alan (inhibisyon zonu) ne kadar büyük ise, uçucu yağlar ile film kaplama tohumun üretimden tekrar üretimde kullanıldığı ara kademelerde dışsal bulaşmalara korunması o kadar iyi demektir. Tohum Cmm ile bulaşık ortama maruz kalsa bile film kaplama ile tohum kabuğuna yüklenen uçucu yağın repellent (uzaklaştırıcı) etkisi ile tohuma bulaşmasının önlebileceğini göstermektedir. Uçucu yağlar ile film kaplamada öyle bir formülasyon geliştirilmeli ki, tohuma yüklenen formülasyon Cmm ile bulaşık ortamda yüksek inhibisyon zonu oluşturabilmeli ve mümkünse bu etkiyi uzun bir süre devam ettirebilmelidir. Ticari boyuta düşünüldüğü zaman etkili bir uçucu yağ uygulamasının mutlaka dozlarının hazırlanması ve çözündürülmesi gerekir. Yoğunluk farkı nedeni ile su–yağ fazı oluşacağından su ile seyreltilerek uçucu yağ dozlarının hazırlanması mümkün değildir. Diğer uçucu yağ çözücülerden %70'lik etil alkol, gerek tohum uygulaması gerek film kaplama sonrası tohumlarda uçucu yağın kalıcı olması istendiğinden etkili bir uygulama değildir. Deneme 4'te DMSO (%10) ile çözündürerek ve seyreltilerek hazırlanan uçucu yağ dozlarının ise film kaplama sonrası tohumlarda Cmm ile bulaşık ortamda inhibisyon zonu oluşturmadığı ve kontrolle (sadece steril saf su ile kaplanan Cmm ile bulaşık domates tohumu) aynı değeri verdiği tespit edilmiştir. Bütün uçucu yağların çözündürülerek hazırlanan dozlarının (250, 500, 1000 ve 5000 ppm) kontrolle aynı inhibisyon zonu 3 mm oluşturmasına karşın, hiç seyreltme yapılmayan saf doz

dozlarının ise etkili bir uygulama olan bakır sülfattan (ticari nanobakır) bile daha yüksek inhibisyon zonu oluşturdıkları saptanmıştır. Uçucu yağların seyreltilmiş olan dozları film kaplama ile tohumla yüklendiğinde kontrole göre önemli bir inhibisyon zonu oluşturmamasına rağmen, aynı dozlar ile sadece tohum uygulaması yapılan ve uygulamadan hemen sonra tohumların etrafında Cmm gelişmeyen inhibisyon zonlarının olduğu tespit edilmiştir. Film kaplama ve tohum uygulamasında bakır sülfat (ticari nanobakır) uygulanan tohumların güçlü bir inhibisyon zonunun oluşması ise dikkat çekicidir (Çizelge 4.10). Uçucu yağların antimikrobiyel etkinliği birçok faktörün yanı sıra, çözücü olarak kullanılan maddeler ile de farklılık gösterebilmektedir (Evren ve Tekgüler 2011). Başka maddeler ile beraber kullanımları sinerjistik veya antagonistik etkiye neden olmaktadır (Toroğlu vd 2006). Aseton, etil asetat, su ile kaynatma, metanol, kloroform ve etanol içerisinde çözündürme gibi (Benli ve Yiğit 2005) birçok çözücü yöntem olmasına karşın DMSO iyi ve etkili bir çözüdür (Azaz vd 2002, Altundağ 2007). Film kaplı tohumlarda görülen düşük inhibisyon zonu değerlerini artırmak için daha etkili film kaplama formülasyonları çalışılmalıdır. Uçucu yağın etkinliğini artırmak için mutlaka iyi çözünmesi ve etkili bileşenlerin doz içerisinde iyi homojenize olması gerektiğinden, çözünen bu etkili maddeleri tohum yüzeyinde daha iyi tutabilecek formülasyonlar araştırılmalıdır.

Deneme 4'te Cmm ile bulaşık domates tohumlarının film kaplanması ve bunlarda %100 temiz tohum oranının hedeflenmesi yapılan film kaplamanın kabuktan olabilecek bulaşmaları önlemesi ve embriyoda Cmm bulaşıklığı var ise bunun ortama bulaşmasının önlenmesi açısından önemlidir. Uçucu yağlar ile film kaplamanın Cmm ile bulaşık domates tohumunda %100 temiz tohum oranı vermesi kaplamanın etkinliği açısından önemli bir bulgudur, ancak bunun sahaya uygulanabilmesi için yeterli değildir. Bu parametrede uygulamalar %100 etkili olsa bile tohumda hiç Cmm inokulumu yok anlamına gelmez. Bulgular *L. stoechas*, *O. onites* ve *O. vulgare* uçucu yağlarının 500 ppm ve üstü uygulamalarında ve *R. officinalis*'in ise 1000 ppm ve üstünde %100 etkili olduğunu göstermiştir. Bu uygulamalarda domates tohum kabuğunda her ne kadar içsel bir Cmm bulaşıklığı olsa bile Cmm gelişiminin engellendiği ve besi yerinde tohumlar etrafında Cmm gelişmediği tespit edilmiştir. Bulguların literatür ile uyumunu incelemek üzere yapılan taramada domates tohumuna uçucu yağların film kaplama ile Cmm'ye karşı yüklendiği bir bulguya rastlanılamamıştır. Elde edilen bulguların bu konudaki ilk veriler olduğu görülmektedir.

Cmm tohum kabuğunun yanı sıra embriyoda da taşınan bir fitobakteridir. Tohum kabuğunun altında taşınan bu bakteri ile yapılacak olan mücadele çalışmasının içsel ve dışsal bütün Cmm bulaşıklığına karşı etkili olması gerekir. Vakum infiltrasyonu ve çalkalama ile Cmm'nin bulaştırıldığı domates tohumları farklı uçucu yağların farklı dozları ile kaplanmış ve tohumdan Cmm inokulumunun ne ölçüde yok edildiği Deneme 4'te araştırılmıştır. Uçucu yağ film kaplamanın log CFU/tohum değerleri üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir. Embriyoda taşınan Cmm'ye karşı başarılı bir tohum film kaplaması için log CFU/tohum değerlerinin 0 olması, karantinaya tabii olan Cmm'nin tohumda 0 oranında bulunması hedeflenmiştir. Diğer bir ifade ile yapılan uçucu yağlar ile film kaplamanın %100 etkili olması hedeflenmiştir. Klasik olarak tohum ekstraksiyonundan sonra besi yerine yayma ile belirlenen log CFU/tohum değerlerine göre, *O. vulgare*'nin 1000 ve üstü dozları ve diğer bütün uçucu yağların ise 5000 ppm dozu 0 log CFU/tohum değeri, verirken bunun real time PCR ile doğrulamasında, *O.*

vulgare'nin yine 1000 ppm ve üstü dozları, *L. stoechas* ve *O. onites*'in ise 5000 ppm dozu Cmm açısından negatif sonuç verirken, *R. officinalis* ise 5000 ppm dahil bütün dozları Cmm açısından pozitif sonuç vermiştir.

Besi yerinde (SCM) gelişim ve real time PCR sonuçlarına göre, *O. vulgare*'nin 1000 ppm ve üstü, *L. stoechas* ve *O. onites*'in 5000 ppm ve üstü dozları 0 log CFU/tohum değeri verdiklerinden, çalışmanın hedefine yönelik başarılı uçucu yağ film kaplaması olarak tespit edilmişlerdir (Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13). Özellikle *O. vulgare*'nin 5000 ppm dozundan yapılan DNA'nın PCR için negatif kontrol olan suya yakın bir değer verdiği, Cmm gelişimi açısından negatif sonuç verdiği görülmektedir. Oysa pozitif kontrol olan direkt Cmm 3/1A izolatına ait DNA'nın ve deneme için negatif kontrol olan steril saf su Cmm ile bulaşık tohum sadece su+polimer karışımı ile kaplanmış uygulamasından tohum ekstraksiyonu sonunda izole edilen DNA ise 88 °C'deki erime eğrisi ile aynı pikleri vermişler ve her ikisinde Cmm oldukları doğrulanmıştır. Bulguların literatür ile uyumu incelendiğinde doğrudan domates tohumunda uçucu yağlar ile film kaplama, bunun Cmm ve tohum kalitesi üzerine etkilerine dair bir bulguya rastlanılamamıştır.

Besi yerinde gelişim ve real time PCR bulgularına göre *L. stoechas* tohumda bakteri yoğunluğunun düşürülmesi konusunda üçüncü yüksek etkili uçucu yağ olduğu görülmektedir. Kontrolde 4.24 log CFU/tohum değeri, bu uçucu yağın 5000 ppm dozunda 0 log CFU/tohum değeri vermiştir (Çizelge 4.12). Diğer dozlarda ortalama Ct değerleri sırasıyla 28, 32 ve 33 gibi değerler olarak Cmm gelişimi pozitif iken, 5000 ppm de Ct değeri 35'in üstüne çıkarak, Cmm açısından negatif değer vermesi, bu dozda Cmm gelişiminin olmadığını ve bunun benzer amaçlı yapılacak olan film kaplama çalışmalarında kullanılabileceğini göstermiştir.

Tohum ekstraksiyonu ve besi yerinde gelişim sonucunda *R. officinalis*'in diğer bütün dozlarında tohumda bulaşıklık olduğu tespit edilirken, 5000 ppm dozunda 0 log CFU/tohum değeri elde edilmiştir (Çizelge 4.13). Fakat aynı dozun real time PCR ile doğrulamasında 34 Ct değeri ile bu dozda uçucu yağ uygulamasının tohumdaki Cmm'yi tamamen yok etmediği ve Cmm açısından pozitif sonuç verdiği görülmüştür. Tohum ekstraksiyonu ve besiyerinde gelişim değerlerinin real time PCR ile de doğrulanması, *R. officinalis* uçucu yağının 5000 ppm dozunda 0 log CFU/tohum değeri vererek etkili bir uygulama olduğu yanlıgısını ortadan kaldırmıştır. Doz artışına bağlı olarak Ct değerlerinin de artışı ve *O. vulgare*'nin 1000 ppm ve üstü dozlarında, *L. stoechas* ve *O. onites*'in 5000 ppm'de Ct değeri 35'in üstüne çıkmış ve Cmm açısından negatif değer vermiştir. *R. officinalis*'te ise doz artışına bağlı olarak Ct değerleri artmış ve hiçbir dozda 35'ün üstüne çıkmamış ve bütün dozlar Cmm açısından pozitif sonuç vermiştir (Çizelge 4.13). Besi yerinde gelişim sırasında çok sayıda faktör patojen gelişimini etkileyebilmekte ve yanlış sonuçlar da alınabilmektedir. Gelişen koloni yapısındaki farklılık nedeni ile Cmm kolonisi olan koloniler Cmm değilmiş gibi veya Cmm dışı gelişimler Cmm imiş gibi değerlendirilebilmektedir. Fakat buradan elde edilecek saf kültürlerin DNA analizi (PCR bulguları) daha güvenilir sonuçlar vermektedir. Real time PCR DNA amplikasyonunun eş zamanlı olarak görüntülenmesini sağlayan daha çok floresan boyaların ve probaların kullanıldığı kantitatif bir PCR tekniğidir. Primer dimerleri oluşma riskinin dışında güvenilir bir tekniktir. Ct değerinin açılımı threshold cycle olup, DNA amplifikasyonu sırasında floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü

sayısıdır ve real time PCR analizlerinde önemli bir parametredir. DNA'nın ölü ve canlı hücreleri ayırmak amacı ile Cmm üzerinde yapılan bir çalışmada, DNA'nın boyanması için etidium monoazid (EMA)'nın kullanılmış ve bu şekilde domates tohumunun ekstraksiyonundan Cmm'nin teşhisinde real time PCR'ın etkili teknik olduğu ifade edilmiştir (Lou vd 2008). EPPO tarafından da real time PCR'ın 10^1 CFU/ml gibi düşük bakteri yoğunluklarında bile Cmm'nin tohum lotundan tespitine olanak verdiğinden etkili bir teknik olduğu belirtilmiş ve Cmm'nin tohum lotlarından tespitini önerilen protokollere dahil edilmiştir (EPPO 2013). Bu teknikle tohumdan Cmm'nin tespitine yönelik başarılı sonuçlar alındığı görülmektedir. Cmm'nin tespitinde, tohum ekstraksiyonlarının dilüsyonuna dayanan, Terminal Dilüsyon TDPCR ile timol uygulamasında 0 log CFU/ml tespit edilmiştir. Zenginleştirilmiş besiyerinde gelişimden sonra yapılan izolasyon anlamına gelen bio-enrichment TDPCR'ın, 10^{-6} seyreltmede bile Cmm açısından pozitif sonuç verdiğinden etkili olduğu ancak zenginleştirilmiş besiyerinde gelişim sırasında saprofit gelişimlerinde Cmm ile rekabete gireceğinden doğru sonuçlar alınamayacağı görülmüştür (XU 2010). Bio-PCR ile CMM5/CMM6; CM3/CM4 primerleri ile 1 bulaşık tohum/10 000 tohum ve CMM5/CMM6, PSA-4/PSA-R primerleri ile 1 bulaşık tohum/10 000 tohum tespit edilebilmektedir (Hadas vd 2005). Real time PCR'da ITSYG-1/ITSYG-2 primerleri ile 10 bulaşık tohum/1000 tohum elde edildiği ve tohumdan Cmm tespitinde real time PCR'ın daha etkili olduğu görülmektedir (Zhao vd 2007).

Üretimde kullanılacak tohuma uygulanacak her bir işlemin tohum kalitesine olumlu veya olumsuz bir etkisinin olması mutlaklıdır. Nitekim mücadele amaçlı domates tohumuna yapılan bazı tohum uygulamalarının tohumun canlılığını düşürdüğü görülmüştür. *X. campetris* pv. *vesicatoria*'yı tohumdan eradike etmek için uygulanan streptomisin sülfat ve sodyum hipoklorit uygulama zamanına da bağlı olarak 30 dakika-24 saat kontrolde %92 olan domates tohumunun çimlenme oranını sırasıyla %19 ve %68'e düşürmüştür (Kebede vd 2013). Deneme 4'te yapılan uçucu yağ film kaplamasında da tıpkı uçucu yağlar ile tohum uygulamasında olduğu gibi, domates tohumlarının çimlenme oranını düşürdüğü tespit edilmiştir. Negatif kontrole (%92 çimlenme oranı) uçucu yağlar ile film kaplanan tohumlarda çimlenme oranının genellikle %70-80'lere düştüğü saptanmıştır. Yağ x doz interaksyonu, uçucu yağ tipi ve dozlar çimlenme oranını olumsuz yönde etkilemiştir ($P \leq 0.05$). Çimlenme oranlarında en fazla düşüş genellikle *O. vulgare* uygulamalarında ve doz artışına bağlı olarakta bu düşmenin arttığı görülmüştür (Çizelge 4.14). Doğrudan domates tohumu üzerine uçucu yağların film kaplandığı çalışmanın bulgularına rastlanılamadığından, bu araştırma bu konuda bir ilki oluşturmaktadır. Ancak literatürde yapılan tohum uygulamalarında uçucu yağ türü ve doza bağlı olarak çimlenme oranının etkilendiği görülmektedir. Düşük vigorlu domates tohumuna %54 çimlenme oranı, origanum uçucu yağının %0.1, %0.33, %1 ve %33 dozlarının uygulandığı domates tohumunda çimlenme oranları sırasıyla %46, %60, %52 ve %40 tespit edilmiştir. Doz artışına bağlı olarak çimlenme oranlarında düşüş olduğu ve bunun %0.1 dozu için yaklaşık %12 olduğu görülmektedir. Kullanılan uçucu yağın içeriği bilinmemekle beraber, çok yüksek bir doz olan %33 dozunun çimlenme oranını %14'lük bir kayıpla sadece %40'a düşürmesi (Van Der Wolf vd 2008), kekik uçucu yağlarının herbisidal etkilerinin savunulduğu araştırma bulgularının (Kordali vd 2008, De Almeida vd 2010), aksine domates tohumuna çok fazla fitotoksik olmadığını göstermektedir. Nitekim origanum türü kekik uçucu yağının domates tohumuna uygulanan %0.5 dozunun domates tohum çimlenmesi üzerine olumsuz etkisinin

olmadığını göstermiştir (Cueto-Wong vd 2010). %50.21 timol ve %3.15 karvakrol içeren kekik uçucu yağının uygulandığı domates tohumunda %25’lik dozda kontrolde %86 olan tohum çimlenme oranı yaklaşık %14’lük bir kayıpla %72’e düşmüştür (Tobias vd 2007). Ana uçucu bileşen olarak sırasıyla %64-74 karvakrol ve %0.97-2.59 oranlarında timol içeren *O. vulgare* ve *O. onites* tohum çimlenmesini diğerlerine *L. stoechas* ve *R. officinalis* ve kontrole göre daha fazla inhibe etmişlerdir. *O. vulgare*’de doz artışına bağlı olarak çimlenme oranındaki düşüşler %13-27 arasında değişmiştir. Çimlenme oranındaki kayıplar *O. onites* içinse %9-19 arasında değişmiştir (Çizelge 4.14). Her iki bulguda timol karvakrol içeriklerinin farklı, literatür bulgusunda kullanılan yüksek doza (%25) rağmen domates tohumunda oluşan çimlenme kayıplarının yakın oranlarda olması, timol ve karvakrolün tohum çimlenmesini olumsuz etkilemediği (De Martino vd 2010) tezini doğrulamaktadır. Tohum türüne görede etki değişebilmektedir. Nitekim başka bir tohum türünde benzer uçucu yağların çimlenme oranı üzerine etkisi farklı olmuştur. Origanum ve thymus türü kekik uçucu yağlarının mısır tohum çimlenmesi üzerine doz artışına bağlı olarak %3 çimlenme kaybı olduğu tespit edilmiştir. En yüksek doz olan 16 000 ppm’de bile tohum çimlenmesinde kontrole göre önemli kayıp olmadığı, kontrolde %95 olan çimlenme oranının en fazla %93’e düştüğü görülmüştür (Christian ve Goggi 2008). Bu bulgular domates tohumunda çimlenme oranındaki kayıpların kekik uçucu yağları için timol ve karvakrolün dışındaki bileşenler tarafından etkilendiğini göstermiştir.

Film kaplamada kullanılan lavanta *L. stoechas* uçucu yağı şaşırtıcı bir şekilde en yüksek çimlenme oranını (%82) vermiştir. Bu uçucu yağın kontrole göre çimlenme oranındaki kayıplar dozlara bağlı olarak %3-17 arasında değişmiştir (Çizelge 4.14). Lavanta uçucu yağlarının tohum uygulamasına dair bir araştırma bulgusunda, kontrolün çimlenme oranı %90 iken, *L. coronopifolia* ekstraktının 500 mg/ml dozu ile domates tohum uygulamasında %98 çimlenme oranı elde edilmiş ve uçucu yağın domates tohum çimlenmesini teşvik ettiği görülmüştür (Talibi vd 2011). Uçucu bileşenlerin doğrudan petriye çimlenme solüsyonu olarak verilmesi 10 ve 20 µg/petri, yüksek oranda sodyum hipoklorit içeriği %15 ile tohumların yüzey sterilizasyonu yapılması ve farklı tohum türlerinde çalışılması gibi farklılıklara rağmen, kamfor, fenkon ve kamfen’in yabancı ot tohum çimlenmesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Kordali vd 2007). *L. stoechas*’ın içeriğinde kamfor, fenkon ve kamfen’in yüksek oranda bulunmasına rağmen diğer uçucu yağlara oranla daha yüksek tohum çimlenmesi vermesi ilginçtir (Çizelge 4.14). Bu sonuç sadece ana uçucu bileşenlerin tohum çimlenmesi üzerine tek başlarına etkilerinin yeterli olmadığı ve diğer uçucu bileşenlerin kombinasyonun önemli katkısı olduğunu göstermiştir. İçeriğinde %37.78 oranında kamfor içeren uçucu yağın hekzan ekstraktı, normal uçucu yağına göre yabancı ot tohum çimlenmesini daha az düşürmüştür (Kordali vd 2009). *O. onites*’in uçucu yağının %70.5 karvakrol ve %2.19 timol ve hekzan ekstraktı ise %80.50 karvakrol ve %7.53 içermekte ve uçucu yağına göre hekzan ekstraktlarının daha yüksek karvakrol ve timol içerdiği görülmektedir. Buna rağmen domates tohum çimlenme oranını düşürmemesi (Kotan vd 2014) tohum çimlenmesinin sadece karvakrol ve timol içeriğinden etkilenmediğini, çözücünün, ekstrakt veya uçucu yağ olmasının da çimlenme oranlarını farklı şekilde etkilediği görülmüştür.

Çimlenme testleri *in vitro* koşullarda yapılmaktadır. Bu testlerin yapıldığı ortam koşulları çimlenme gereksinimleri okjijen, sıcaklık, nem ve tohum açısından optimum

düzeydedir. Bundan dolayı laboratuvar ortamında yüksek tohum canlılığı veren uygulamaların yetiştirme ortamında da aynı sonucu vermesi beklenemez. Nitekim aynı uçucu yağlar *O. vulgare* ve *O. onites* ile film kaplanan domates tohumları laboratuvar koşullarında en düşük ve farklı çimlenme oranları vermesine karşın, çıkış testlerinde aynı çıkış oranlarını vermiştir. Yüksek çimlenme oranı veren *L. stoechas* ve *R. officinalis* ise benzer şekilde aynı çıkış oranlarını vermişlerdir (Çizelge 4.15). Nitekim istenmeyen bitki tohumlarının çimlenmesinin engellenmesine yönelik uçucu yağlar ile yapılan araştırmalarda (Kordali vd 2009, Rahimi vd 2013) uçucu yağ solüsyonu ile tohum çimlendirme solüsyonu (su) bir arada verilmektedir. Bu şekilde yapılan uygulamalarda uçucu yağ buharı tohumun çimlenme ortamından uzaklaşmamaktadır. Gaz formundaki uçucu bileşenler laboratuvar koşullarında çimlenme sırasında tohumların oksijen alımını engelleyebilmekte ve sonuç olarak çimlenme oranını düşürmektedirler. Fakat fide yetiştirme harcında, ortama verilen sulama suyu hem uçucu yağ dozunu seyreltebilir hem de uçucu bileşenlerin yetiştirme harcında gaz formunun iyi homojenize olması yoğunluklarının düşmesi ve tohum çimlenme ortamından gaz formunda uzaklaşmaları nedeni ile daha yüksek çıkış oranları verebilirler. Nitekim depo zararlılarına karşı uçucu yağlar ile fumigasyon tohum çimlenmesini etkilememekte, tohumdaki zararlıyı uzaklaştırarak primer ve sekonder tohum zararları önlemediğinden çimlenme ve çıkış teşvik edilmektedir (Ratnasekera ve Knayanathara 2010). Herbisidal çalışmalarda ise bizzat tohumun çimlenme ortamına veya çıkış ortamına uçucu yağ verilmesi, çimlenme ve çıkış oranını düşürmektedir (Amri vd 2012, Yılar vd 2012). Fumigasyonda tohum belli bir süre uçucu yağ buharına maruz bırakılmakta ve daha sonrasında uçucu yağ buharı ortamdaki uzaklaşmaktadır. Uçucu yağ buharı tohum çimlenme veya çıkış ortamında bulunmadığından olumsuz bir etkisi olmamaktadır. Ama herbisidal çalışmalarda uçucu yağ direkt tohum çimlenme ve çıkış ortamına verildiğinden ve burada denemelerde oluşan uçucu yağ buharı ortamdaki uzaklaşmadığı için tohumun oksijen alımını engellemekte, çimlenme veya çıkışı düşürmektedir (Penuelans vd 1996, Mucciarelli vd 2001). Nitekim uçucu yağlar güçlü fumigant etkileri ile patojen gelişimini engelleyebildikleri gibi (Basım vd 2000), tohum çimlenmesini de düşürebilmektedirler (Vicherkova vd 1999). Monoterpenlerin tohum çimlenmesi üzerine etkileri tam anlamıyla ortaya konulamamıştır. Ancak, bu etkilerinin solunum, mitoz bölünme, fitohormonların aktivitesi, bitki savunma sistemleri ve hücre membran özellikleri ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Cin sütlegeşi *Euphobia heterophylla* bitkisinin tohum çimlendirme testinin birinci gününde embriyo solunumu çimlenme sırasında oksijen tüketimi üzerine limon otu *C. winterianus* uçucu yağının farklı dozlarının %0.03-0.25 (v/v) etkisi araştırılmıştır. İnkubasyondan 24 saat sonrasında yapılan gözlemlerde, toplam embriyo solunumunun ya da oksijen tüketiminin limon otu uçucu yağ uygulamasından etkilenmediği görülmüştür (Iwamoto vd 2012).

Deneme 4'te film kaplama ile domates tohumuna yüklenen uçucu yağ x doz interaksyonun, uçucu yağların ve dozların domates tohum çıkış zamanı üzerine önemli bir etkisi tespit edilememiştir. Kontrole yakın değerler aldıkları ve ortalama çıkış zamanının 3.1-3.7 gün arasında değiştiği görülmüştür (Çizelge 4.15). Uçucu yağ ile film kaplanan domates tohumlarının çıkış zamanlarının kontrole göre çok fazla değişmemesi, fidelikte yetiştirme harcında üniform çıkış için önemlidir. Konuyla ilgili literatür taramasında domates tohumunun uçucu yağ ile film kaplanmasına dair herhangi bir bulguya ulaşılamamıştır. Fakat tıpkı deneme 3 ve 4'teki gerek uçucu yağ tohum uygulaması gerekse film kaplamada uçucu yağların tohum çimlenme ve çıkışını

etkilemesi, çimlenme ve çıkış zamanını etkilememesinde olduğu gibi, domates tohumuna uygulanan *Myrtaceae* familyasına dahil 15 adet bitki ekstraktı (%10 w/v) içerisinde *Eugenia punicifolia*, *Myrcia multiflora* ve *Myrcia splendens*'in domates tohum çimlenme oranını düşürmesine rağmen tohum çimlenme ve çıkış zamanını etkilemediği görülmüştür (Imatomi vd 2013). Bu bulgular uçucu yağların olası tohum üzerine negatif etkilerinin ilk uygulandıkları anda olduğunu ve sonrasında bir etkilerinin olmadığını göstermektedir. Diğer bir ifade ile uçucu yağın tohumu uygulama ve film kaplamasında, eğer bir negatif etkisi var ise çimlenme sırasında görülmekte, çimlenme veya çıkış zamanına bir etkisi olmamaktadır.

Tohumla taşınan Cmm'nin tohumdan fideye geçişi ile fideler ve dolayısı ile bütün fidelik bulaşık hale gelebilmektedir. Cmm'nin tohumdan fideye geçişine dair farklı bilgiler olsa da, düşük bir bulaşıklığın bile geçme olasılığı dikkate alınmak durumundadır. Tohum lotu içerisinde yapılan örneklemede 10 000 adet domates tohumundan 1 tanesinin bile Cmm ile bulaşık olması bütün tohum lotunu ve fideligi bulaştırabilir ve epidemi oluşabilir. Bu nedenle her ne kadar tohumda bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum) değerleri belirlense de, bu tohumlardan gelişen fidelerde de bakteri yoğunluğunun belirlenmesi gerekir. Deneme 4'te log CFU/fide değerleri uçucu yağlar ile film kaplı domates tohumlarından gelişen fidelerden ekstraksiyon yapılarak hem yarı seçici besi yerinde (SCM) hem de bu sonuçların doğrulanması amacı real time PCR ile yapılmıştır. Cmm gibi emriyo ile taşınan etmenlerin karantina prosedürleri gereği önerilecek olan tohum uygulaması veya film kaplamanın risk oluşturmaması istenmektedir. Yapılan film kaplama Cmm ile bulaşık domates tohumundaki var olan inokulum miktarını tamamen yok etmelidir. Diğer bir ifade ile test edilen parametrelerden temiz tohum oranı açısından %100 etki gösterirken aynı zamanda 0 log CFU/tohum, fide veya ml vermelidir. Bu açıdan araştırmanın bütün basamaklarında en etkili uçucu yağ olan *O. vulgare*'nin 1000 ppm ve üstü dozlarında bu başarılmıştır (Çizelge 4.17). Film kaplamaya dair benzer bir literatür bulgusuna rastlanılmamakla beraber, ana uçucu bileşenlerden sadece timol ile tohum uygulamasının, sonuçlarının terminal dilüsyon PCR ile doğrulandığı bir çalışmada domates tohumundaki inokulum miktarını Cmm yoğunluğunu tamamen yok ettiği tespit edilmiştir (Xu 2010). Tohumu uygulanan *O. vulgare*'nin %33 dozu 6.1 log CFU/ml domates tohumunda Cmm yoğunluğunu 0 log CFU/ml'ye düşürmüştür (Van Der Wolf vd 2008). Çizelge 4.17'de görüldüğü gibi *L. stoechas*'ın 5000 ppm dozu 0 log CFU/fide vermiştir. Benzer bir tohum uygulamasında farklı bir lavanta türünün *L. coronopifolia* 500 mg/ml dozunda ekstraktı tohumda Cmm miktarını düşürmüş fakat tamamen yok etmemiştir (Talibi vd 2011). Kantitatif bir teknik olan real time PCR, besi yerinde gelişim değerleri açısından negatif bulunan *R. officinalis*'in 5000 ppm'de 0 log CFU/fide sonucunun, PCR açısından pozitif sonuç vermesi (Ct>35) ile bu uçucu yağın bu dozunun etkili olduğu yanılığını ortadan kaldırmıştır. Real time PCR tohumda Cmm tespit konusunda etkili tekniktir (De Leon vd 2011). Bu durum Deneme 4'de çıkış testlerindeki Cmm lezyonları ile de teyit edilmiştir. Çıkış testlerinde yarı seçici besiyerinde ve real time PCR sonuçlarında Cmm gelişiminin pozitif tespit edildiği uygulama ve dozlardan gelişen fidelerde doza bağlı olarak kotiledon ve fide simptomları görülürken, Cmm açısından negatif sonuç verenlerden gelişen fidelerde ise hiç simptom görülmemiştir.

Log CFU/fide değerlerinin besi yerinde koloni gelişimi ve real time PCR sonuçları *R. officinalis* hariç bütün uçucu yağlar için örtüştüğü görülmektedir. Bu uçucu

yağın 5000 ppm dozu ile film kaplanan domates tohumlarından gelişen fidelerde, besiyerinde gelişimde hiç Cmm gelişimi görülmez iken, real time PCR ile Cmm saptanması benzer araştırmalarda sonuçların güvenilirliği için mutlaka moleküler tekniklerin de kullanılması gerektiğini göstermiştir. Real time PCR olası primer dimerleri dışında hassas ve kantitatif bir teknik olduğundan düşük yoğunluktaki inokulumlar bile tespit edilebilmektedir. Ayrıca besi yerinde gelişim sırasında besi yerinin pH'sı, içeriği, miktarı, sıcaklık nem gibi koşullar patojen gelişimi üzerinde etkilidir. Sadece besi yerinde koloni gelişimi farklı sonuçlar doğurabilir. Bakteriler logaritmik olarak çoğalan canlılar olduklarından her ne kadar spesifik besi yerleri kullanılsa da koloni morfolojileri kolaylıkla ve hızla değişebilmektedir. Besi yerinde koloni gelişimine göre uygulamaların etkili ve etkisiz diye nitelendirilmesi sonuçların uygulamaya aktarılması açısından risk oluşturmaktadır. Bulaşık bir uygulama örneği temiz diye ifade edilebilmekte ve bu uygulamadan üretim sahasında domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı gelişebilmektedir. ISTA, ISF, EPPO ve ISHI uluslararası kuruluşlar ve bunlara akredite laboratuvarların tohum sağlık testlerinde önerdikleri protokollerde klasik ve moleküler birkaç teknik aynı anda uygulanmaktadır (EPPO 2013).

Deneme 5'te uçucu yağlar ile film kaplamanın hazır fide üretim serasında domates tohumlarının çıkış oranı, çıkış zamanı, fide yaş ve kuru ağırlıkları gibi fide parametrelerine etkisi araştırılmıştır. Laboratuvar çıkış testlerinde sadece steril saf su ile film kaplanan negatif kontrol olan uygulama %91 çıkış oranı verirken, hazır fide üretim serasında %80 çıkış oranı vermiştir. Kullanılan domates tohumu standart bir çeşit olduğundan bu çıkış oranındaki düşüş normal görünmektedir. Benzer şekilde incelenen parametreler çıkan tohum sayısı, çıkış oranı, çıkış zamanı, fide yaş ve kuru ağırlığı üzerine film kaplanan uçucu yağ x doz interaksiyonunun, uçucu yağların ve dozların önemli bir etkisi tespit edilemezken, uçucu yağlarının çıkış oranları kontrole göre düşmüş ve %69-72 arasında değişmiştir. Laboratuvar denemelerinde uçucu yağ film kaplamalarının çıkış oranı kontrole göre %11-17 daha düşükken, hazır fide üretim serasında kontrole göre %8-11 daha düşük çıkış oranı vermişlerdir. Hazır fide üretim serasındaki düşük çıkış oranı, kontrole de laboratuvara göre yaklaşık %11 düşüş olduğundan dolayı sadece uçucu yağ film kaplamasından değil, tohumun kendi değerinden de kaynaklanmıştır. Yine çıkış zamanı laboratuvar çıkış testlerine göre biraz daha uzamış, yaklaşık 3.0-4.2 gün arasında değişmiştir. Fide yaş ağırlığı 8.1-8.7 g, fide kuru ağırlıkları ise 5.3-5.7 g arasında değişmiştir (Çizelge 4.18). Bulguların literatür ile uyumunu karşılaştırmak için yapılan taramada, domates tohumuna uçucu yağ film kaplamasına dair bir bulguya ulaşılamamıştır. Araştırma bulgularına benzer bir çalışmada domates tohumuna timol uygulandığı ve yapılan bu uygulamanın bazı fide parametrelerine (sürgün kuru ağırlığı, kök kuru ağırlığı ve sürgün boyu) önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. (Xu 2010). Benzer şekilde domates tohumuna bitkisel ekstraktların uygulanmasının, fide boyu, toplam kuru madde, fide gövde kalınlığı ve anormal fide gelişimine etkisinin önemsiz olduğu saptanmıştır (Tobias vd 2007). Deneme 5 ve literatür bulguları uçucu yağ tohum uygulaması, domates fidelerinin kök ve yeşil aksam gelişimini önemli düzeyde etkilemediğini göstermiştir. Fakat domates tohumu dışındaki diğer tohumlara ve hedef patojenlere ve farklı amaçlara yönelik tohum film kaplamalara dair farklı bulgular vardır. Çeltik tohumlarında antifungal amaçlı, öjenol+kitozan lignosülfat polimer film kaplamasına dair araştırma bulgusunda, uçucu yağlar ile film kaplamanın *in vivo* sonuçlarının *in*

vitro'dan farklı olduğu, özellikle uçucu yağ+polimer kombinasyonu ve polimerin su, oksijen geçirgenliğinin üzerinde çalışılması gerektiği vurgulanmıştır. Uçucu yağ +polimer +patojen+tohum etki mekanizmasının karmaşık olduğu belirtilmiştir (Thobunluepop 2009). Modifeye kitozan ile kaplanan mısır tohumlarında, kontrolde %82.8 olan tohum çimlenmesi %98.7'ye çıkmış ve pozitif etkilemiştir (Zeng vd 2010a). Limon otu uçucu yağı PEG 400 ile yapılan tohum kaplamanın mısır tohumlarının çimlenmesini ve vigoru düşürdüğü, şili biberinin uçucu yağının ise PEG 400 ile kaplanmasının fide gelişimini teşvik ettiği görülmüştür (Sompamitra vd 2011). Karanfil, fesleğen ve nane uçucu yağlarının ikiyeşerli kombinasyonları ile antifungal amaçlı yapılan film kaplamada, uçucu yağ kombinasyonları ile yapılan tohum film kaplamanın mısır çimlenmesini teşvik ettiğini göstermiştir (Kantapa vd 2011).

Uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumlarında (Deneme 6) kısa süreli depolamanın (15, 30 ve 90 gün, +4°C'de, ticari tohum paketleri içerisinde) çıkış oranı (%), temiz tohum oranı (%) ve tohumda bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum) etkileri önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.19, Çizelge 4.20 ve Çizelge 4.21). Tohumların depolama öncesi çıkış oranı, temiz tohum oranı ve tohumda bakteri yoğunluğu depolama süresince değişmemiştir. Bu bulgu uçucu yağ ile film kaplanan tohumların, pratikte hemen ya da 15 gün-3 ay süre ile depolanarak yeni üretim sezonunda fidelikte değerlendirilmesi açısından olumlu bir sonuçtur. Bilindiği üzere, araştırmanın yürütüldüğü ve Türkiye'de özellikle örtü altı domates yetiştiriciliğinde başı çeken Antalya ili ve çevresinde ilkbahar, sonbahar, tek ürün veya son yıllarda olduğu gibi hemen arka arkaya yetiştiricilik yapılabilmektedir. Hatta bazı durumlarda elde kalan tohumların bir sonraki yetiştirme sezonunda değerlendirilmesi sözkonusudur. Depolama sonrası uçucu yağlar ile film kaplı domates tohumlarının depolama sonrası çıkış oranı (%), temiz tohum oranı (%) ve tohumda bakteri yoğunluğu (log CFU/tohum) gibi değerlerin değişmemesi geliştirilen film kaplama formülasyonunun pratikte kullanılabileceğini göstermiştir. Daha önce sonuçlandırılmış olan araştırma bulguları içerisinde domates tohumunda uçucu yağ film kaplamaya dair bir veriye rastlanmamıştır. Fakat içerisinde timolün de yer aldığı farklı kimyasalların Cmm ile bulaşık domates tohumuna uygulandığı bir çalışmada, tohum uygulaması sonrası 6, 12 ve 18 ay süre ile yapılan depolama sonrasında tohum vigor indeks değerlerinde $P \leq 0.05$ düzeyinde önemli bir farklılık tespit edilememiştir (Xu 2010). Araştırma bulguları uçucu bileşenler ile yapılan tohum uygulamalarının depolama sonrası etkileri 0-12 ay süresince önemli oranda değişmediğini göstermiştir. Uçucu yağ tohum uygulaması ve film kaplama sonrası incelenen parametreler üzerine etkisinin izlenebilmesi için en az 12-18 aylık farklı sürelerde depolama yapılması gerektiğini göstermiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde çalışmada başarılı sonuçların alındığı ve belli amaçlara ulaşıldığı görülmektedir. Bu tez çalışmasında ilk kez ticari üretimleri olan bazı uçucu yağların Cmm ve domates tohum kalite parametreleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Uçucu yağların antibakteriyel etkilerine yönelik bulgular içerisinde, aynı firmadan farklı zamanlarda temin edilen *S. officinalis* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının farklı inhibisyon zonu oluşturmaları ticari üretilen uçucu yağlarda üretimde kullanılan bitkisel ham maddeye bağlı olarak muhtemelen içeriğinin ve sonuçta antibakteriyel etkinliğinin değişebileceğini göstermiştir. Uçucu yağlarda antimikrobiyel etki mekanizmaları tam olarak açıklanamakla beraber (Diao vd 2014), çok sayıda faktörün etkili olduğu gerçeği değiştirilemez (Ojha vd 2013). Fakat özellikle ticari üretimleri

üzerinde bir standardizasyonuna gidilirse, birçok faktörün etkisi ortadan kaldırılabilir. Aynı firmadan aynı şekilde aynı ekolojik koşullarda yetişen, aynı yöntemle elde edilen ve muhafaza edilen uçucu yağlar üzerinde araştırmaların yürütülmesi gibi. Fakat ürün ne kadar sanayileştirilirse etkisinin değişeceği mutlak. Özellikle bu uçucu yağlar için daha elzemdir, aromatik bileşikler özellikle doğal ekolojilerinde yetiştirilen bitkilerde daha kuvvetlidir ve doğadan toplanan formlar daha yüksek antibakteriyel etki göstermektedir (Borboa-Flores vd 2010). Fakat her ne kadar ticari veya doğadan toplanırsa toplansın bir gerçek var ki antibakteriyel etki gösteren bitki türlerinin ticari veya doğadan toplanan formları da antibakteriyel etki göstermektedir. Tıpkı burada, daha önce bir çok araştırma bulgusunda (Groot vd 2004, Kızıl ve Uyar, 2006) Cmm'ye karşı antibakteriyel etki gösteren *origanum* türü uçucu yağların *O. vulgare* ve *O. onites* yine yüksek antibakteriyel etki göstermesi gibi (Çizelge 4.1). Bu yüksek antibakteriyel aktivitede en büyük pay ana bileşenler olan timol ve karvakrol'e aittir (Hussain 2009, Ojha vd 2013). Dolayısı ile uçucu yağlarda biopestisit olma veya geliştirme yönünde bir standardizasyona gidilecekse, ana uçucu bileşenler üzerinde de çalışılmalıdır. Özellikle Cmm ile mücadelede elde edilen yüksek inhibisyon zonları nedeni ile *O. vulgare* ve *O. onites* ileri çalışmalar için üzerinde çalışılması gereken bitkiler olarak önerilmektedir.

Tohumla taşınan bakteriyel etmenler ile ilgili mücadeleye yönelik araştırmalarda patojenin tohum kabuğundan %100 eradikasyonu ve eğer tohum gömleğinin altındaki kısımlarda embriyo, endosperm taşıyor ise tohumda 0 inokulum hedeflenir. Yapılan tohum uygulamalarında etkinlik sadece patojene ve uygulanan madde ve dozuna değil uygulamanın hangi koşullarda ne kadar süre ile yapıldığına da bağlıdır. Her ne kadar bazı uçucu yağların *M. rucutita*, *M. piperita* ve *M. communis*, 72 saat sonrasında yapılan gözlemlerde geçici etkinlik bakteriostatik etkigösterdikleri tespit edilse de, *L. stoechas*, *O. onites* ve *O. vulgare*'in yüksek dozları Cmm'nin domates tohum kabuğundan %100 eradikasyonu için önerilmektedir. *O. vulgare*'nin 1000 ppm ve üstü dozlar Cmm'nin domates tohumunda içsel ve dışsal bulaşmalara karşı 0 log CFU/tohum değeri ile önerilmektedir. Tohumdaki inokulum miktarını belirleme konusunda hassas ve güvenilir bir kantitatif yöntem olan real time PCR ile, seçici besiyerinde gelişim sonrası örneklerin doğrulanması ise önemlidir. Nitekim tohum ve fide ekstraksiyonu sonucunda SCM besi yerinde koloni gelişimine göre *R. officinalis* uçucu yağının 5000 dozu 0 log CFU/tohum değeri vererek etkili bir uygulama olarak görünse de, nihayetinde real time PCR analizinde Cmm açısından pozitif sonuç vermiştir.

Uçucu yağlar ile film kaplama, Cmm'nin tohumdan eradikasyonunda hedeflenen 0 log CFU/tohum değerinin bazı uçucu yağların bazı dozlarında *O. vulgare* 1000 ppm ve üstü, *L. stoechas* ve *O. onites* 5000 ppm ve üstü elde edildiği görülmektedir. Aynı zamanda bu uçucu yağların tohum kabuğundaki Cmm'yi de inhibe ettikleri ve uygulamalar sonucunda %100 temiz tohum oranı verdikleri görülmüştür. Hem tohum kabuğundan hem de embriyodan Cmm inhibe edilmiştir. Uçucu yağ film kaplaması domates tohumundaki Cmm'yi tamamen engellemiş ve araştırmanın nihai hedefi açısından başarılı sonuçlar alınmıştır. Ancak DMSO (%10) ile çözülerek hazırlanan uçucu yağ dozlarının kontrole göre tohum etrafında önemli bir inhibisyon zonu oluşturmaması ve çözündürmeden yapılan dozun ise çok daha yüksek bir inhibisyon zonu oluşturması uçucu yağ film kaplamasının domates tohumundan Cmm'ye karşı repellent (uzaklaştırıcı) etkisine dair yeni kaplama formülasyonlarının çalışılması gerektiğini

göstermiştir. Uçucu yağ tohum yüzeyinde daha uzun süre tutarak, film kaplı domates tohumlarında Cmm'ye karşı daha yüksek inhibisyon oluşturacak polimer ve çözücü formülasyonları çalışılmalıdır. Film kaplama tekniğinde etken madde direk tohum üzerine yüklenmektedir. Ama peletleme tekniğinde etken madde tohum etrafına katı partiküller yardımı ile sardırılmaktadır. Bu bakımdan etkili bulunan uçucu yağların pellet tekniği ile tohum etrafına sardırılması hem istenilen amaca ulaşmada hemde tohum üzerine toksik etkileri azaltmada etkin bir yöntem olabilir.

Uçucu yağ film kaplama domates tohumundaki Cmm'ye karşı etkili olmuş ve tohumdaki inokulum miktarını tamamen düşürerek 0 log CFU/tohum vermiş ve real time PCR sonuçları da bunu doğrulamıştır. Ancak gerek laboratuvar gerekse kontrollü sera koşullarında yürütülen çimlenme testi ve çıkış testlerinde kontrole göre çimlenme ve çıkış oranları %69-70'e kadar düşmüştür. Uçucu yağların içerik analizinde öne çıkan ana bileşenlerin miktarı ve TTC testi sonuçlarına göre çimlenme ve çıkış oranındaki kayıpların büyük olasılıkla içerikler ve tohumun çimlenmesi sırasında çimlenme gereksinimlerindeki değişiklikle olduğu kanısına varılmıştır. Kısaca uçucu yağların direkt tohum dokusuna veya embriyoya karşı oluşturduğu bir fitotoksiden değil de, tohum kabuğunda oluşturduğu etkiyle tohumun oksijen alımını engellediği düşünülmüştür. Şüphesiz bunu doğrulayan bulgular mevcuttur (Penuelans vd 1996, Mucciarelli vd 2001). Genel olarak değerlendirildiğinde araştırma bulgularına benzer şekilde daha önce birçok çalışmada (Groot vd 2004, Altundağ 2007, Van Der Wolf vd 2008, Borboa-Flores vd 2010) kekik uçucu yağlarının özellikle de *origanum* türlerinin yüksek antibakteriyel etki gösterdikleri atfedilmektedir. Daha önce *O. vulgare* ve *O. onites* uçucu yağlarının ana bileşenleri olan karvakrolün ve timolün tohum çimlenmesi üzerine fitotoksik olmadığı (De Martino vd 2010) bilinmemektedir. Uçucu yağların domates tohum çimlenmesini olumsuz etkilemediği (Cueto Wong vd 2010), diğer bitki tohumlarına fitotoksik olduğu (Ismail vd 2013), fitotoksite göstermediği (Christian ve Goggi 2008, El-Mougy vd 2012) veya çimlenmeyi teşvik ettiği (Mancini vd 2009, Mbega vd 2012) saptanmıştır. Deneme 3 ve Deneme 4'te ise doza bağlı olarak domates tohum çimlenmesini düşürdükleri tespit edilmiştir. Uçucu yağların tohum uygulamasına dair farklı bulgular uçucu yağ ve ana bileşenlerin direkt domates tohum kalitesi üzerine etkine dair detaylı araştırmaların yapılması gerektiğini göstermiştir.

Uçucu yağların her ne kadar tohum çimlenmesi üzerine etki mekanizmaları tam olarak tanımlanmasa da (Iwamoto vd 2012), hangi mekanizma ile tohumların çimlenmesine antagonistik, sinerjistik veya nötr etki görüldüğünün açıklanması gerekmektedir. Bu tez çalışmasındaki bulgular gerek *in vitro* gerekse *in vivo* koşullarda uçucu yağ tohum uygulaması ve film kaplamasının domates tohumunun çimlenme ve çıkış oranını düşürdüğünü göstermiştir. Fakat çimlenme ve çıkış oranlarındaki bu kayıplar genel olarak kontrole göre %5-17 oranında daha düşük olmuş ve en yüksek dozlarda bile %70'in altına düşmemiştir. Dolayısıyla bulgular uçucu yağların tohum çimlenmesine tamamen fitotoksik olmadığını göstermiştir. Benzer şekilde 1600 µg/tohum $\approx$ 16000 ppm timol uygulaması mısır tohumunun çimlenme oranını sadece %20 oranında düşürmüştür (Waliwitiya vd 2005). %0.125 oranında timol, öjenol, karvon ve terpinen-4-ol'un ve %1 1,8 sineol'ün arpa tohum çimlenmesine negatif etki göstermediği bulunmuştur (Morcia vd 2013). Hıyar tohumlarına fumigant uygulama sonrası sarımsak, nane uçucu yağları kontrole göre %50 oranında çimlenme oranını artırmıştır (Farrag ve Moharam 2012). Tamamıyla uçucu yağların gaz formuna maruz

bırakılan *A. githago*, *A. retroflexus*, *S. arvensis*, *C. album* ve *L. sativa* tohumlarında çimlenme ve kök gelişiminin tamamen durduğu görülmüştür (Yılar vd 2012). Uçucu yağların kontakt ve fumigant uygulamaların domates tohum çimlenmesi üzerine etkilerinin belirlenmesi gerekir. TTC testinin sonuçları uçucu yağların tohum çimlenmesi üzerine etkisinin direkt tohum dokusuna fitotoksiteden değil, tohumun çimlenmesi sırasında oksijen alımını engellemesinden kaynaklabileceğini göstermiştir. Bu etki tohumun çimlenme ortamında uçucu yağların gaz formunda olması, henüz mekanizması bilinmemekle beraber, çimlenme ortamının havasındaki gazların oksijen ve uçucu yağların buharlaşarak ortama verdikleri gazların tohumun oksijen alımının önlenmesi şeklinde olabilir.

Domates tohumlarına uçucu yağ uygulaması ve film kaplamanın çimlenme ve çıkış zamanı üzerine önemli bir etkisi olmamıştır. Tohum çimlenmesi gecikmemiş veya kontrole göre hızlanmamıştır. Bu nedenle fide üretimi sırasında heterojen bir çıkış görülmemiştir ve bu özellikleri nedeni ile pratikte kullanılabilecektir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında ilk kez ticari uçucu yağlar ile domates tohumundaki Cmm'ye karşı tohum uygulaması ve film kaplama çalışılmıştır. Özellikle film kaplama ile domates tohumuna yüklenen uçucu yağların tohumun hasattan tekrar üretimde kullanıldığı bütün ara kademelerde Cmm'ye karşı tohumu koruması, olası içsel bulaşıklığı yok etmesi ve özellikle domates fide üretimindeki Cmm kaynaklı sorunların çözümü hedeflenmiştir.

Kullanılan toplam 20 adet ticari uçucu yağ içerisinde 10 adet uçucu yağ (*O. vulgare*, *O. onites*, *C. zeylanicum*, *L. stoechas*, *R. officinalis*, *M. piperita*, *R. damascena*, *M. rucutita*, *M. communis* ve *L. angustifolia*) Cmm'ye karşı %65 ve üzerinde antibakteriyel etki göstermiştir. Bunlar ileri de yapılması planlanan benzer araştırmalarda kullanılabilir. Özellikle düşük MIC değeri veren *O. onites*, *O. vulgare*, *C. zeylanicum*, *L. stoechas*, *R. damascena* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının kullanımı ise ayrıca önerilir.

Uçucu yağlar ile ilk yapılan tohum uygulamasında 48 saatlik inkübasyon süresinin temiz tohum oranını belirlemede yeterli olmadığı ve benzer çalışmalarda uçucu yağların tohum uygulamasında bakterisidal etkisinin görülebilmesi için en az 72 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirmenin yapılması gerekir. Burada 3. günden itibaren uçucu yağ uygulanan tohumların NA besiyerinde çimlenmeleri, benzer araştırmalarda doğrudan besi yerinde bakteriye karşı etkinliği gözlemlerken aynı anda çimlenme verilerinin de alınabileceğini göstermiştir. Tohum kabuğundaki Cmm'ye karşı etkinlikte tohum etrafında besi yerinde Cmm gelişiminin gözlenmesi ile alınan verilerden elde edilen temiz tohum oranının yeterli bir parametre olduğu görülmüştür. Ancak tohumun gerçek bulaşıklığını belirlemek için mutlaka tohumdan ve fidede ekstraksiyon yapılarak elde edilen log CFU/tohum veya log CFU/fidetespit edilmesi gerekir. Tohuma uygulanan ve film kaplanan tohum ve fidelerden yapılan ekstraksiyon sonucunda, 0 log CFU/tohum ve 0 log CFU/fide değeri veren *O. vulgare*'nin 1000 ppm ve üstü dozları, *L. stoechas* ve *O. onites*'in 5000 ppm ve üstü dozları benzer tohum dezenfektanı ve film kaplama çalışmalarında kullanılabilir. Bunlar araştırmanın amacına yönelik başarılı uygulamalardır. *R. officinalis*'in tohum uygulaması ve film kaplamasında, 5000 ppm dozu yarı seçici besiyerinde (SCM) 0 log CFU/tohum veya 0 log CFU/fide vermesine karşın, Ct=34 değeri ile real time PCR Cmm açısından pozitif vermiştir. Burada real time PCR ile seçici besi yerinde 0 log CFU/tohum veya 0 log CFU/fide yanılışı ortadan kaldırıldığından benzer araştırmalarda uluslararası tohum sağlık test protokollerinde olduğu gibi klasik ve moleküler testlerin özellikle de real time PCR'ın kullanılması önerilir.

DMSO (%10) ile çözündürülerek hazırlanan uçucu yağ dozları tohum inhibisyon zonu oluşturmamıştır. Aksine hiç çözündürmeden doğrudan polimer ile film kaplanan dozun ise hem film kaplı hem de direkt tohuma uygulamada pozitif kontrol olan bakır sülfattan ticari nanobakır bile daha yüksek bir inhibisyon zonu oluşturmuştur. Bu nedenle film kaplama çalışmalarında daha etkili çözücüler ve film kaplama formülasyonu çalışılmalıdır.

Uçucu yağlar ile tohum uygulamaları ve film kaplamanın Cmm üzerine etkilerine dair veriler, tohumdan Cmm'nin tamamen eradike edildiği ve kabuktan oluşabilecek bulaşmalara karşı %100 etkili olan başarılı sonuçların %100 temiz tohum oranı ve 0 log CFU/tohum, 0 log CFU/fide alındığını göstermektedir. Ancak tohum çimlenme ve çıkış oranlarında görülen %17-20 kayıplar nedeni ile uçucu yağ ve ana bileşenlerin doğrudan domates tohumunun çimlenme ve çıkış değerleri üzerine etki mekanizmasının belirlenmesine yönelik araştırmalar yapılmalıdır.

Uçucu yağlar ile film kaplanan domates tohumlarının kısa süreli depolanma +4°C'de, ticari tohum paketleri içersinde, 15, 30 ve 90 gün durumunda incelenen parametreler çıkış oranı, temiz tohum oranı ve log CFU/tohum açısından istatistiki olarak önemli bir farklılık görülmemiştir. Bu sonuçlar film kaplanan tohumların film kaplama sonrası 90 güne kadar depolanması sonucunda pratikte kullanılabileceğini göstermiştir. Ancak yapılan uçucu film kaplamasının tohum depo sürecindeki parametrelere etkisinin de araştırılması gerekir. Bu tarz depolamada ise en az 12 ay ve üstünde depolama yapılmalıdır.

Film kaplama ile tohuma yüklenen uçucu yağların hazır fide üretim serasındaki tohumların çıkış oranı, çıkış zamanı, fide yaş ağırlığı ve fide kuru ağırlığı gibi parametreler üzerine etkisi ümitvar bulunmuştur. Ancak kullanılan tohum standart bir çeşit olduğundan muhtemelen düşük vigorlu olmasından dolayı hazır fide üretim serasında kontrol uygulamalarında bile %12 oranında çıkış oranlarında kayıp olmuştur. Bu nedenle ileriki çalışmalarda özellikle vigoru düşük ve yüksek tohumların ve F₁ hibrit tohumların uçucu yağlar ile film kaplanarak fide serasında tohum kalite performanslarına etkileri araştırılmalıdır.

Kimyasal preparatlara karşı organik ve entegre üretim modellerinde iyi alternatif olan uçucu yağların özellikle içeriklerine bağlı olarak etkilerinin de farklı olduğu görülmüştür. Ancak uçucu yağların gerek tohum kalitesi gerekse Cmm üzerine etkilerinde sadece içerikleri değil, üretim şekli, elde ediliş şekli, bitki türü, elde edildiği ekoloji ve vejetasyon dönemi, test yöntemi, çözündürmede kullanılan etken maddeler, uygulama süresi, yöntem, doğadan toplama ve kültür formu, ticari veya araştırma amaçlı taze çıkarılmaları, tohum türü, uygulama amacı vb çok sayıda faktör etkilidir. Örneğin herbisidal etki hedeflenen çalışmalar ile burada yapılmak istenen ve hedeflenen amaçlar arasında fark olduğu gibi uygulamada da farklılıklar vardır. O nedenle uçucu yağların kültür bitkilerinin tohumları üzerine olan etkileri herbisidal çalışmalar ile yorumlanmamalıdır. Burada olduğu gibi ileride hedef patojene ve tohumda istenen özelliğe yönelik özellikle ticari formların kullanıldığı ve doğadan toplanarak elde edilen uçucu yağlar ile aralarındaki farkların değerlendirildiği araştırmalar yapılmalıdır. Bu tarz çalışmalar doğrudan hedeflenen kültür bitkisi tohumları üzerinde yapılmalı ve ticari uçucu yağlar kullanılmalıdır.

Araştırmanın gerek domates tohumundaki Cmm inokulumunu tamamen yok edilmesi ve tohumun temizliğinin korunması, gerekse tohum ve fide kalitesine kabul edilebilir çimlenme ve çıkış oranlarındaki düşüş, çimlenme ve çıkış zamanlarının etkilenmemesi, yeşil aksam ve kök gelişiminin etkilenmemesi etkisi açısından başarılı sonuçlar alınmıştır. Ancak sonuçların pratikte kullanılabilmesi için yukarıda önerilen ilave araştırmaların yapılması gerekmektedir. Özellikle çimlenme ve çıkış oranlarındaki

kayıplar ortadan kaldırılırsa, uçucu yağlar ile film kaplama Cmm ile mücadelede güvenli ve kesin bir çözüm olabilecektir. Bu teknikle tohum üretiminde ve devamında tohum analizinde gözden kaçan bir bulaşıklık veya latent dönemdeki Cmm'nin tespit edilememesinin ortaya çıkardığı tohum ve fide bulaşıklığı önleneceğinden etkili bir yöntem olacaktır. Özellikle bulaşık tohum örneklerinin ekim işlemlerinde kullanılan alet ve ekipmanın bulaşması önleneceğinden temiz tohumların bulaşması önlenebilecektir. Böylece ticari kayıpların yanısıra tohumcu, fideci ve üreticilerin sıklıkla yaşadıkları hukuksal sorunlara da çözüm getirilebilecektir.

7. KAYNAKLAR

- ABBOTT, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- ABDEL-KADER, M.M., EL-MOUGY, N.S. and LASHIN, S.M. 2011. Essential oils and *Trichoderma harzianum* as an integrated control measure against faba bean root rot pathogens. *Journal of Plant Protection Research*, 51 (3): 306-313.
- AGARWAL, V.K. and SINCLAIR, J.B. 1987a. Seed transmittion and inoculation. In: V. K. Agarwal, J.B. Sinclair (Editors), Principles of Seed Pathology. CRC Press, Inc. London, Uk, p. 176.
- AGARWAL, V.K. and SINCLAIR, J.B. 1987b. Mechanism of seed infection. In: V. K. Agarwal, J.B. Sinclair (Editors), Principles of Seed Pathology, CRC Press, Inc. London, Uk, p. 176.
- AGRAWAL, K., SHARMA, D.K. and JAIN, V.K. 2012. Seed-borne bacterial diseases of tomato (*Lycopersicon Esculentum* Mill.) and their control measures: A Review. *International Journal Of Food, Agriculture ve Veterinary Sciences*, 2 (2): 173-182.
- AGRIOS, G.N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Elviesier Academic Press. London, Uk, 530 p.
- ALAMSHAHI, M., NEZHAD, H., PANJEHKEH, N., SABBAGH, S.K. and SADRI, S. 2012. Antibacterial effects of some essential oils on the growth of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* L. *The 8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology*, 170-176.
- ALTUNDAG, Ş. 2007. *Labiatae* familyasına ait bazı endemik türlerin önemli bitki patojeni bakteriler üzerine antimikrobiyal etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, 85 s.
- AMEIN, T., WRIGHT, S., WIKSTROM, M., KOCH, E., SCHMITT, A., STEPHAN, D., JAHN, M., TINIVELLA, F., GULLINO, M.L., FORSBERG, G., WERNER, S., VAN DER VAN DER WOLF, J. and GROOT, S.P.C. 2011. Evaluation of non-chemical seed treatment methods for control of *Alternaria brassicicola* on cabbage seeds. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 118 (6): 214–221.
- AMRI, I., GARGOURI, S., HAMROUNI, L., HANANA, M., FEZZANI, T. and JAMOUESSI, B. 2012. Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil. *Journal of Pest Science*, 85: 199-207.
- ANONİM, 1995a. Zirai Mücadele Teknik Talimatları, T. K. B. Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara, 2: 19-38.
- ANONİM, 1995b. Zirai Mücadele Teknik Talimatları, T.K.B. Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara, 3: 9-53.
- ANONİM, 2013a. Tıbbi ve aromatik bitkiler, www.batem.gov.tr. (Son erişim tarihi:6.6.2013)

- ANONİM, 2013b. Essential oils, <http://bioweb.uwlax.edu>. (Son erişim tarihi:6.6.2013)
- ANONİM, 2013c. Polymers, www.incotec.com. (Son erişim tarihi:6.6.2013)
- ANONİM, 2013d. Protinus seed coating agent, [www.van der wolftrax.com](http://www.van.der.wolftrax.com). (Son erişim Tarihi:6.6.2013)
- ANONİM, 2013e. <http://www.turkted.orgtr//content/othernews.aspx?id86>. (Son erişim tarihi:6.6.2013)
- ANONYMOUS, 1991. Council Regulation (EEC) No 2092/91 of 24 June 1991 on organic production of agricultural products and indications referring there to on agricultural products and food stuffs, including all amendments. Official Journal No L 198.
- ANONYMOUS, 2007. Organic Revision EEC 2092/91, [Www.Worldseed.Org/Position-Papers/Pos-Fise.Htm#Dise](http://www.worldseed.org/Position-Papers/Pos-Fise.Htm#Dise).
- ARSLAN, D. ve BAYRAM, E. 2012. Farklı ekim zamanlarının ve sıra arası mesafelerinin bir mayıs papatyası (*Matricaria recutita* L.) çeşidi olan bodegold'da bazı verim öğelerine etkisi. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, ss.191, 13-15 Eylül, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat.
- ASSIS, O.B.G. and LEONI, A.M. 2009. Protein hydrophobic dressing on seeds aiming at the delay of undesirable germination. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 66 (1): 123-126.
- ASTA, 2010. <http://www.amseed.com/pdfs/DiseaseGuide-BCT-English.pdf>. (Son erişim tarihi: 5.5.2010)
- AYANOĞLU, F., MERT, A. ve KAYA, A. 2000. Hatay florasında yetişen karabaş lavantanın (*Lavandula stoechas* subsp. *stoechas* L.) çelikle köklendirilmesi üzerine farklı lokasyonların ve hormon dozlarının etkisi. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 24: 607-610.
- AZAZ, A.D., DEMİRCİ, F., SATIL, F., KÜRKÇÜOĞLU, M., BAŞER, K.H.C. 2002. Bazı satureja uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, ss. 349-254, Eskişehir.
- AZIRAK, S. and KARAMAN, S. 2008. Allelopathic effect of some essential oils and components on germination of weed species. *Acta Agriculturae Scandinavia*, 58: 88-92.
- BACH H.J., JESSEN I., SCHLOTER M. and MUNCH, J.C. 2003. A TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis*. *Journal of Microbiological Method*, 52: 85-91.
- BAJPAI, V.K., KANG, S., XU, H., LEE, S., BAEK, K. and KANG, S.C. 2011. Potential roles of essential oils on controlling plant pathogenic bacteria *Xanthomonas* species: A Review. *Plant Pathol. J.*, 27 (3): 207-224.

- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D. and IDAOMAR, M. 2008. Biological effects of essential oils. *Food ve Chemical Toxicology*, 46: 446–475.
- BANKOLE, S.A. and JODA, A.O. 2004. Effect of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) powder and essential oil on mould deterioration and aflatoxin contamination of melon seeds (*Colocynthis citrullus* L.). *African Journal of Biotechnology*, 3 (1): 52-59.
- BASIM, H. 1998. Kekik yağının *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'ya karşı *in vitro* ve *in vivo* etkileri. *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 12 (17): 14–21.
- BASIM, E. and BASIM, H. 2003. Antibacterial activity of *Rosa damascene* essential oil. *Fitoterapia*, 74: 394–396.
- BASIM, E. and BASIM, H. 2004. Evaluation of antibacterial activity of essential oil of *Rosa damascena* on *Erwinia amylovora*. *Phytoparasitica*, 32 (4):409-412.
- BASIM E., BASIM, H., DICKSTEIN, E.R. and JONES, J.B., 2004. Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on greenhouse grown tomato in the western mediterranean region of Turkey. *Plant Disease*, 88: 1048.
- BASIM, H., YEĞEN, O., and ZELLER, W. 2000. Antibacterial effect of essential oil of *Thymbra spicata* L. var. *spicata* on some plant pathogenic bacteria. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 107 (3): 279-284.
- BAŞER, K.H.C. 1993. Essential oils of Anatolian *Labiatae*. *Acta Horticulturae*, 333: 217-237.
- BAŞER, K.H.C. 2001. Her derde deva bir bitki kekik. *Bilim ve Teknik*, 74-77.
- BAŞER, K.H.C. 2008. Biological and pharmacological activities of carvacrol ve carvacrol bearing essential oils. *Curr. Pharm. Des.*, 14 (29): 106-119.
- BAŞER, K.H.C. 2009. Uçucu yağlar ve aromaterapi. *Fitomed Dergisi*, 7: 8-16.
- BAYDAR, H. 2002. Isparta koşullarında izmir kekiğinin (*Origanum onites* L.) verimi ve uçucu yağ kalitesi üzerine araştırmalar. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6 (2): 15-21.
- BAYSAL, O., SOYLU, E.M., and SOYLU, S. 2003. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter Michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Plant Pathology*, 52: 747-753.
- BAYSAL, O., MERCATI, F., IKTEN, H., ÇETINKAYA-YILDIZ, R., CARIMI, F., AYSAN, Y. and TEIXEIRA DA SILVA, J.A. 2011. *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: tracking strains using their genetic differentiations by ISSR markers in southern Turkey. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75: 113-119.

- BENLİ, M. ve YİĞİT, N. 2005. Ülkemizde yaygın kullanımı olan kekik (*Thymus vulgaris*) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 03 (08): 1-8.
- BERENDSEN, S.M.H., KOENRAADT, H., WOUTDT, B. and OOSTERHOF, J. 2011. The development of a specific Real-Time TaqMan for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. www.rijkzwaan.com. (Son erişim tarihi: 10.10. 2011)
- BORBOA-FLORES, F., RUEDA-PUENTE, E. O., ACEDO-FÉLIX, E., PONCE, J. F., CRUZ-VILLEGAS, J.L., GARCÍA-HERNÁNDEZ, Y.M. and ORTEGA-NIEBLAS, M. 2010. Evaluation of antibacterial activity *in vitro* of essential oils *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12: 539-547.
- BUROKIENE, D. 2006. Early detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seedlings. *Agronomy Research*, 4: 151-154.
- BURT, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- CANTORE, P.I., SHANMUGAIAH, V. and IACOBELLIS, N.S. 2009. Antibacterial activity of essential oil components and their potential use in seed disinfection. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 9454–9461.
- CARLTON, W.M., BRAUN, E.J. and GLEASON, M.L. 1998. Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology*, 88: 525-529.
- CARSON, C.F., MEE, B.J. and RILEY, T.V. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage ve salt tolerance assays ve electron microscopy. *Antimicrob. Agent Chemother.*, 46: 1914–1920.
- CAVA, R., NOWAK, E., TABOADA A. and MARININIESTA, F. 2007. Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *Journal of Food Protection*, 70: 2757-2763.
- CEYLAN, A. 1996. Tıbbi bitkiler-II, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, No: 481.
- CHANG, R.J., RIES, S.M. and PATAKY, J.K. 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology*, 81: 1276-1281.
- CHANG, R.J., RIES, S.M. and PATAKY, J.K. 1992. Reduction in yield of processing tomatoes and incidence of bacterial canker. *Plant Diseases*, 76: 805-809.
- CHITARRA, L.G., BREEUWER, P., VAN DEN BULK R.W. and ABEE, T. 2000. Rapid fluorescence assessment of intracellular pH as a viability indicator of

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 809-816.

- CHRISTIAN, E.J. and GOGGI, A.S. 2008. Aromatic plant oils as fungicide for organic corn production. *Crop Science*, 48: 1941-1951.
- CIMANGA, K., KAMBU, K., TONA, L., APERS, S., De BRUYNE, T., HERMANS, N., TOTTE, J., PIETERS, L. and VLIETINCK, A.J. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.*, 79: 213-220.
- CUETO-WONG, M.C., RIVAS-MORALES, C., ALANÍS-GUZMÁN, M. A. G., ORVEAY-CÁRDENAS, A., AMAYA-GUERRA, C.A., NÚÑEZ-GONZÁLEZ, A., SAMANIEGO-GAXIOLA, J.A. and CANO-RÍOS, P. 2010. Antifungal properties of essential oil of mexican oregano (*Lippia palmeri*) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Revista Mexicana De Micologia* 31: 29-35.
- ÇAVUŞLAR, F. ve ESER, B. 2002. Domates tohumlarının film kaplama tekniği ile kaplanmasında kullanılabilecek değişik materyallerin etkinliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, 67 s.
- ÇETİNKAYA-YILDIZ, R. ve AYSAN, Y. 2005. Bakteriyel solgunluk hastalığı etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) ile bulaşık domates fidelerinde bitki aktivatörlerinin etkinliğinin belirlenmesi. Türkiye II. Tohumculuk Kongresi, s.359, Çukurova üniversitesi, 9-11 Kasım 2005, Adana.
- ÇETİNKAYA-YILDIZ, R. 2007. Domates bakteriyel solgunluk hastalığı etmeni [*Clavibacter Michiganensis* Subsp. *Michiganensis* (Smith) Davis Vd]'nin tanılanması ve bitki büyüme düzenleyici Rizobakteriler ile biyolojik mücadele olanaklarının araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 173 s.
- ÇETİNKAYA-YILDIZ, R. ve AYSAN, Y. 2008. Domates bakteriyel solgunluk hastalığı. H. Saygılı, F. Şahin, Y. Aysan (Editörler). Bitki Bakteri Hastalıkları, Meta Basım Matbaacılık, İzmir, s. 49-52.
- 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.
- DAOUK, R.K., DAGHER, S.M. and SATTOUT, E.J. 1995. Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection*, 58: 1147-1149.
- DE ALMEIDA, L.F.R., FREI, F., MANCINI, E., DE MARTINO, L. and DE FEO, V. 2010. Phytotoxic activities of mediterranean essential oils. *Molecules*, 15: 4309-4323.

- DE LEÓN, L., SIVERIO, F., DE CANARIAS, G., LÓPEZ, M.M. and RODRÍGUEZ, A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a seedborne tomato pathogen: Healthy seed are still the goal. *Plant Disease*, 95 (11).
- DE MARTINO, L., MANCINI, E., DE ALMEIDA L.F.R. and DE FEO, V. 2010. The Antigerminative activity of twenty-seven monoterpenes. *Molecules*, 15: 6630-6637.
- DIAO., W.R., HU, Q.P., ZHANG, H., and XU, J.G. 2014. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill). *Food Control*, 35: 109-116.
- DINIZ, K.A., SILVA, P., OLIVEIRA, J.A. and EVANGELISTA, J.R.E. 2009. Sweet pepper seed responses to inoculation with microorganisms ve coating with micronutrients, aminoacids ve plant growth regulators. *Sci. Agric.*, 66 (3): 293-297.
- DIMITRA J.D., 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 Protect.*, 22 (1) : 39-44.
- DORMAN, H.J.D. ve DEANS, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308–316.
- EICHENLAUB, R., GARTEMANN, K.H., and BURGER, A. 2006. *Clavibacter michiganensis*, a group of gram-positive phytopathogenic bacteria: *Plant-Associated Bacteria*. S. S. Gnanamanickam (Editor), p.p. 385-421, Germany.
- EL-MOUGY, N.S., ABDEL-KADER, M.M., ALY, M.D.E. and LASHIN, S.M. 2012. Application of fungicides alternatives as seed treatment for controlling root rot of some vegetables in pot experiments. *Advances in Life Sciences*, 2 (3): 57-64.
- EPPO BULLETIN. 2013. PM 7/42 (2) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. 43 (1): 46–67. <http://www.eppo.int/>. (Son erişim tarihi:6.06.2013).
- EPPO. 2013. Diseases and Pests, <http://www.eppo.int/>. (Son erişim tarihi:6.06.2013).
- EPPO/CABI. 1997. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn., pp. 980–985. CAB International, Wallingford (GB). <http://www.eppo.int/>. (Son erişim tarihi:6.05.2009).
- EPPO/CABI. 1998. Map 253. In: *Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe*. CAB International, Wallingford (GB). <http://www.eppo.int/>. (Son erişim tarihi:6.05.2009)
- EPPO/CABI. 2005. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. EPPO Bull. 35: 275-283. <http://www.eppo.int/>. Son erişim tarihi:6.05.2009)
- ERİŞ, M. 2006. Bitki uçucu yağ ve bileşenlerinin domates bakteriyel hastalık etmenleri üzerine olan antibakteriyel potansiyellerinin *in vitro* koşullarda araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, 58 s.

- ERKAN, S.1998. Tohum Patolojisi. Gözdem Ofis, İzmir.
- ERKAN, S. 2005. Tohumla Taşınan Hastalıkların Tanılanması. Tohum Bilimi ve Teknolojisi. Editörler: B. ESER, H. SAYGILI, A. GÖKÇOL ve E. İLKER. *Cilt II. Ege Üniv. TOTEM*, İzmir.
- EVREN, M. ve TEKGÜLER, B. 2011. Uçucu yağların antimikrobiyel özellikleri. *OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 9 (3): 28-40.
- FAO. 2013. FAOSTAT Agriculture, Vegetable production, <http://faostat.fao.org>. (Son erişim tarihi: 6.05.2013)
- FARRAG, E.S. and MOHARAM, M.H.A. 2012. Pathogenic fungi transmitted through cucumber seeds and safely elimination by application of peppermint extract and oil. *Notulae Scientia Biologicae*, 4 (3):83-91.
- FATMI, M. and SCHAAD, N.W. 1988. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. *Phytopathology*, 78: 121-126.
- FATMI, M., SCHAAD, N.W. and BOLKAN, H.A. 1991. Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. *Plant Disease*, 75: 383-385.
- FATMI, M. and SCHAAD, N.W. 2002. Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathology*, 51: 149–154.
- FIKREYESUS, S., KEBEBEW, Z., NEBIYU, A., ZELEKE, N. and BOGALE, S. 2011. Allelopathic effects of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. on germination and growth of tomato. *Am-Euras. J. Agric. and Environ. Sci.*, 11 (5): 600-608.
- FRANKEN A.A., KAMMINGA G.C., VANDER ZOUWEN, P.S. and VAN DER BIRNBAUM Y.E. 1993. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds by immunofluorescence microscopy ve dilution plating. *European Journal of Plant Pathology*, 99: 125-137.
- GAHLAUT, A. and CHHILLAR, A.K. 2013. Evaluation of antibacterial potential of plant extracts using resazurin based microtiter dilution assay. *Int. J. Pharm. Sci.*, 5 (2): 372-376.
- GARTEMANN, K.H., KIRCHNER, O., ENGEMANN, J., GRAFEN, I., EICHENLAUB, R. and BURGER, A. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in th understanding of virulence of a gram-positive phytopathogenic bacterium. *J. Biotechnol.*, 106: 179-191.
- GILL, H.K. and GARG, H. 2014. Pesticides: environmental impacts and management strategies. <http://dx.doi.org/10.5772/57399>. (Son erişim tarihi: 02.05.2014)
- GITAITIS, R. and WALCOTT, R. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 371-397.

- GLEASON, M.L., BRAUN, E.J., CARLTON, W.M. and PETERSON, R.H. 1991. Survival and disesemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology*, 81: 519-1523.
- GLEASON, M.L., GITAITIS, R.D. and RICKER, M.D. 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. *Plant Disease*, 77: 1069-1076.
- GOVINDEN-SOULANGE, J. and LEVANTARD, M. 2008. Comparative studies of seed priming and pelleting on percentage and meantime to germination of seeds of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *African Journal of Agricultural Research*, 3 (10): 725-731.
- GROOT, S.P.C., VAN DER WOLF, J.M., JALINK, H., LANGERAK, C.J. and VAN DER BULK, R.W. 2004. Challenges for the production of high quality organic. *Seed Testing International*, 27: 12-15.
- GROOT, S.P.C., JALINK, H., KOHL, J., LANGERAK, C.J., MICHTA, A., WERNER, S., VAN DER WOLF J.M. and VAN DEN BULK, R.W. 2006. The need for a supply of high quality organic vegetable seeds. Proceeding of European joint organic congress, pp. 382-383, May 30-31. 2006, Denmark.
- GSPP, 2010. Protocol for diagnosis of Cmm in plant material of symptomatic tomato plants, GSPP standard: section Protocols 14.2. Sampling and testing instructions for suspected plants, www.gspp.eu. (Son erişim tarihi 6.06. 2010).
- GUAN, Y.J., VANG, J.C., HU, J., TIAN, Y.X., HU, W.M. and ZHU, S.J. 2013. A novel fluorescent dual-labeling method for anti-counterfeiting pelleted tobacco seeds. *Seed Science and Technology*, 41 (1): 158-163.
- GUERRA, F.Q.S,J.M. MENDES, W.A. OLIVEIRA, J.G.M. COSTA, H.D.M. and LIMA, E.O. 2012. Chemical composition ve antimicrobial activity of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil on multi-drug resistant. *Acinetobacter* spp. strains. *Biofar.*, 08 (01): 62-70.
- GULLUCE M., SOKMEN, M., SAHIN, F., SOKMEN, A., ADIGUZEL A. and OZER, H. 2003. Biological activities of the essential oils and methanolic extract of *Micromeria fruticosa* (L) Druce spp. *serpyllifolia* (Bieb) PH Davis plants from the eastern Anatolia region of Turkey, *J. Sci. Food Agric.*, 84 (7): 735-741.
- GWINN, K.D., OWNLEY, B.H., GREENE, S.E., CLARK, M.M., TAYLOR, C.L., SPRINGFIELD, T.N., TRENTLY, D.J., GREEN, J.F., REED, A. and HAMILTON, S.L. 2010. Role of essential oils in control of *Rhizoctonia* damping-off in tomato with bioactive monarda herbage. *Phytopathology*, 100: 493-501.
- HADAS, R., KRITZMAN, G., KLIETMAN, F., GEFEN, T. and MANULIS, S. 2005. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathology*, 54: 643-649.
- HAMPTON, J.G. 2002. What is seed quality? *Seed Sci. and Technol.*, 30: 1-10.

- HAUSBECK, M.K., BELL, J., MEDINA-MORA, C.M., PODOLSKY, R. and FULBRIGHT, D.W. 2000. Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology*, 90: 38-44.
- HAZIRI, A., FATMIR, F., ARBEN, M., SEVDIJE, G., SOKOL, A., MAJLINDA D., IMER, H., ARLINDA, B.D. and ALTIN, M. 2013. Antimicrobial properties of the essential oil of *Juniperus communis* (L) growing wild in east part of Kosova. *American journal of pharmacology and toxicology*, 8 (3): 128-133.
- HUSSAIN, A.I. 2009. Characterization and biological activities of essential oils of some species of *Lamiaceae*. Ph.D. Thesis, University of Agriculture of Pakistan, 249 p.
- IACOBELLIS, N.S., LA CANTORE P., CAPASSO F. and SENATORE F. 2005. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 53: 57–61.
- IMATOMI, M., NOVAES, P. and GUALTIERI, S.C.J. 2013. Interspecific variation in the allelopathic potential of the family *Myrtaceae*. *Acta Botanica Brasilica* 27 (1): 54-61.
- INOUE, S., TAKIZAWA, T. and YAMAGUCHI, H. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47: 565-573.
- ISF, 2010. Method for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato seed. <http://www.worldseed.org>. (Son erişim tarihi: 4.04.2010)
- ISF, 2012. http://www.worldseed.org/isf/seed_statistics.html. (Son erişim tarihi: 2.05.2012)
- ISF, 2013. <http://www.worldseed.org/cms/medias/file/ResourceCenter/SeedStatistics>. (Son erişim tarihi: 2.07.2013)
- ISF, 2014. Method for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato seed. <http://www.worldseed.org>. (Son erişim tarihi: 6.04.2014)
- ISMAIL, A., LAMIA, H., MOHSEN, H., SAMIA, G. and BASSEM, J. 2013. Chemical composition, bio-herbicidal and antifungal activities of essential oils isolated from Tunisian common cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 7 (16): 1070-1080.
- ISTA, 1985, *Handbook on tetrazolium testing*. Edited by R.P. Moore, Zurich, Switzerland, 99p.
- ISTA, 1999. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology*, 27: 1-299. Zurich, Switzerland.

- IVEY, M.L. and MILLER, S.A. 2000. First report of bacterial canker of pepper in Ohio. *Plant Dis.*, 84: 810.
- IWAMOTO, E.L.I., COELHO, E.M.P., REIS, B., MOSCHETA, I.S. and BONATO, C.M. 2012. Effects of monoterpenes on physiological processes during seed germination and seedling growth. *Current Bioactive Compounds*, 8: 50-64.
- KAN, Y., KARTAL, M., ASLAN S. ve N. YILDIRIM. 2006. Farklı koşullarda yetiştirilen rezene meyvelerinin uçucu yağ bileşenleri. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 35 (2): 95-101.
- KANTAPA, K., KUNASAKDAKUL, K., VEARSILP, S. and THANAPORNPOONPONG, S. 2011. Effect of mixed essential oils coating on growth inhibition of seed-borne fungi of maize seeds. *Agricultural Science Journal*, 42 (1): 425-428.
- KARAKOÇ, Ö.C., GÖKCE, A. ve TELCİ, I. 2006. Bazı bitki uçucu yağlarının *Sitophilus oryzae* L., *Sitophilus granarius* L. (Col.: Curculionidae) ve *Acanthoscelides obtectus* Say. (Col.: Bruchidae)'a karşı fumigant etkileri. *Türk. Entomoloji Dergisi*, 30 (2); 123-135.
- KAUR, G. and BISHNOI, U.R. 2011. Effect of polymer and pesticide seed coatings on winter canola seed germination at various osmotic potentials. *World Journal of Agricultural Sciences*, 7 (5): 591-598.
- KASSELAKIA, A.M., GOUMASA, D., TAMMB, L., FUCHSB, J., COOPERC, J. and LEIFERT, C. 2011. Effect of alternative strategies for the disinfection of tomato seed infected with bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). *Wageningen Journal of Life Sciences*, 58: 145-147.
- KAVAK, S. 2006. Farklı polimer kaplama materyal ve uygulamalarının soğan tohumlarında depo ömrü ve yaşlanma üzerine etkileri. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, 202 s.
- KAVAK S. and ESER, B. 2009. Influence of polymer coatings on water uptake and germination of onion (*Allium cepa* L. cv. Aki) seeds before and after storage. *Scientia Horticulturae*, 121: 7-11.
- KAZAZ, S., ERBAS, S. and BAYDAR, H. 2009. The effects of storage temperature and duration on essential oil content and composition oil rose (*Rosa Damascena* Mill.) *Turkish J. of Field Crops*, 14 (2) : 89-96.
- KEBEDE, K., AYALEW, A. and YUSUF, M. 2013. Efficacy of plant extracts, traditional materials and antibacterial chemicals against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato seed. *African Journal of Microbiology Research*, 7 (20) :395-240.
- KIZIL S., UYAR, F. and ABUZER, S. 2005. Antibacterial activities of some essential oils against plant pathogens. *Asian Journal of Plant Sciences*, 4: 225-228.

- KIZIL, S. and UYAR, F. 2006. Antimicrobial activities of some thyme (*Thymus*, *Satureja*, *Origanum* and *Thymbra*) species against important plant pathogens. *Asian Journal of Chemistry*, 18: 1455-1461.
- KORDALI, S., ÇAKIR, A. and SUTAY, S. 2007. Inhibitory effects of monoterpenes on seed germination and seedling growth. *Z. Naturforsch.*, 62 (3-4) :7-14.
- KORDALI, S., KOTAN, R., MAVI, A., ÇAKIR, A., ALA, A. and YILDIRIM, A. 2008. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 9452-9458.
- KORDALI, S., ÇAKIR, A.A., AKCINC, T.A., METED, E., AKCINE, A., AYDIN, T. and KILIÇ, H. 2009. Antifungal and herbicidal properties of essential oils and *n*-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii* Afan. Asteraceae). *Industrial Crops and Products*, 29: 562–570.
- KOTAN, R., ÇAKIR, A., ÖZER, H., KORDALI, S., ÇAKMAKÇI, R., DADAŞOĞLU, F., DİKBAŞ, N., AYDIN, T. and KAZAZ, C. 2014. Antibacterial effects of *Origanum onites* against phytopathogenic bacteria: possible use of the extracts from protection of disease caused by some phytopathogenic bacteria. *Scientia Horticulturae*, 172: 210–220.
- KOTAN, R., KORDALI, S. and ÇAKIR, A. 2007. Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Z. Naturforsch.*, 62: 507-513.
- KRISHNASAMY, V. 2003. Seed pelleting principles and practices. *ICAR Short Course on Seed Hardening and Pelleting Technologies for Rainfed/Garden Land Ecosystems*: Tamil Nadu Agric. Univ., Coimbatore, 96 p.
- KRITZINGER, Q., AVELING, T.A.S. and MARASAS, W.F.O. 2002. Effect of essential plants oils on storage fungi, germination and emergence of cowpea seeds. *Seed Sci. and Technology*, 30: 609-619.
- KRITZMAN, G. 1993. A chemi-thermal treatment for control of seedborne bacterial pathogens of tomato. *Phytoparasitica*, 21: 101-109.
- KUTLULAR, Ö. 2007. Bazı adaçayı ve kekik türlerinin uçucu yağlarının süper ısıtılmış su ile ekstraksiyonları ve GC-MS ile karakterizasyonları. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, 83 s.
- KVANG R.H., KVANG Y.L., SANG H.L., SOON J.J., SEON-WOO, L. and BYUNG J.M. 2008. Control of crisphead lettuce damping-off and bottom rot by seed coating with alginate and *Pseudomonas aeruginosa*. *Plant. Pathol. J.*, 24 (1) : 67-73.
- LAMBERT, R.J.W., SKANDAMIS, P.N., COOTE, P. and NYCHAS, G.J.E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 453–462.

- LETH, V. 2002. Use of essential oils as seed treatment. *IPGRI Newsletter*, 15-16.
- LOUWS, F.J., BELL, J., MEDINA-MORA, C.M., SMART, C.D., OPGENORTH, D., ISHIMARU, C.A., BRUJIN, F.J. and FULBRIGTH, D.W. 1998. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, 88: 862.
- LUO, L.X., WALTERS, C., BOLKAN, H., LIU, X.L. and LI, J.Q. 2008. Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and a real-time PCR assay. *Plant Pathology*, 57: 332–337.
- MANCINI, E., ARNOLD, N.A., DE MARTINO, L., DE FEO, V., FORMISANO, C., RIGANO, D. and SENATORE, F. 2009. Chemical composition and phytotoxic effects of essential oils of *Salvia hierosolymitana* boiss. and *Salvia multicaulis* vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon. *Molecules*, 14: 4725-4736.
- MANJUNATHA, S.N. 2008. Influence of seed tapes on nursery performance and seed pelleting on seed yield and storage potential in paprika chilli (*Capsicum annuum* L.) cv. kt-pl-19. M.Sc. Thesis, Dharwad University, 120 p.
- MANRIQUE, M.J. 2012. *Clavibacter* detection and QTL mapping of resistance in tomato. M.Sc. Thesis, Wageningen University, 44 p.
- MBEGA, E.R., MORTENSEN, C.N., MABAGALA R.B. and WULFF, E.G. 2012. The effect of plant extracts as seed treatments to control bacterial leaf spot of tomato in Tanzania. *J. Gen. Plant. Pathol.*, 78: 77–286.
- MCQUILKEN, M.P., BUDGE S.P. and WHIPPS, J.M. 1997. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by film coating *Coniothyrium minitans* on to sunflower seed and sclerotia. *Plant Pathology*, 46 (6): 919-929.
- REIS E.M., BARRETO, D and CARMONA, M. 1999. Patología de Semillas de Cereales de Invierno. *Gráfica Condal SRL*, 94.
- MILIJAJŠEVIĆ, S., TODOROVIĆ, B., REKANOVIĆ, E., POTOČNIK I. and BALAZ, J. 2007. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, bacterial canker of tomato: comparison of the effectiveness of extraction procedures and sensitivity of methods for detection in tomato seeds. *Pestic. Phytomed.*, 22: 121-130.
- MIXON, J.T. 2012. Prevalence of copper resistance among foliar bacterial pathogens of tomato in tennessee. M.Sc. Thesis, The University of Tennessee, 66 p.
- MIRIK, M. ve AYSAN, Y. 2005. Effect of some plant extracts as seed treatments on bacterial spot disease of tomato and pepper. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 34: 9-16.
- MOGHTADER, M. and FARAHMAND, A. 2013. Evaluation of the antibacterial effects of essential oil from the leaves of *Laurus nobilis* L. in Kerman Province. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 5 (2): 13-17.

- MORCIAA, C., MALNATIB, M. and TERZI, V. 2013. In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Additives and Contaminants*, 1-24.
- MORRISON, R.H. 1999. Sampling in seed health testing. *Phytopathology*, 89: 1084-1087.
- MUCCIARELLI, M., CAMUSSO, W., BERTEA, C.M., BOSSI, S. and MAFFEI, M. 2001. Effect of pulegone and other oil components of *Mentha piperita* on cucumber respiration. *Phytochemistry*, 57: 91-98.
- NGUEFACK, J., SOMDA, I., MORTENSEN, C.N. and AMVAM ZOLLO, P.H. 2005. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling seed-borne bacteria of rice (*Oryza sativa* L.). *Seed Sci. Technol.*, 33: 397-407.
- NISAR, K., JITENDRA, K., KUMAR, A., SURESH, W., NAJAM, S., RAJENDER, P. and BALRAJ, P. 2009. Pesticidal seed coats based on azadirachtin-A: release kinetics, storage life ve performances. *Pest Management Science*, 65 (2): 175-182.
- NOME, S.F., BAARETO, D. and DOCAMPO, D.M. 2003. Seedborne Pathogens. Seeds: Trade, Production and Technology. www.seedconsortium.org. (Son erişim tarihi: 4.2.2010).
- OJHA, S.N., NEGI, K.S., TIWARI, L.M., MEHTA, P.S., RANA, J.C., PANDE, V., SHARMA, S. and PANWAR, A. 2013. Variation in essential oil composition and anti-microbial activity of Indian oregano (*Origanum vulgare* L.) population from Indian Himalayan Region (IHR). *Journal of Medicinal Plants Research*, 7 (46): 3375-3384.
- ÖNEN, H. 2003. Bazı bitkisel uçucu yağların bioherbisidal etkileri. *Türkiye Herboloji Dergisi*, 6 (1): 39-40.
- ÖZDEMİR, Z. 2005. First report of fruit infections of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, on processing tomato in Turkey. *Plant Pathology Journal*, 4: 143-145.
- ÖZDİKMENLİ, S. ve ZORBA, N.N. 2014. Uçucu yağların *Staphylococcus aureus* üzerine etkisi. *Türk Tarım, Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2 (5): 228-235.
- ÖZGER, Ş., POHL, D. ve KARACA, İ. 2013. Neem ekstraktların biyoinsektisit olarak kullanımı. *Türk. Biyo. Müc. Derg.*, 4 (2): 165-178.
- PAMUK, G.S., OLSSON, T., BERGSTEN, U. and LINDBERG, H. 2002. Evaluation of polymer coating on scots pine (*Pinus sylvestris*) seeds using Scanning Electron Microscopy (SEM). *Seed Sci. and Technol.*, 30: 167-176.
- PAUDEL, V.R. and GUPTA, V.N.P. 2008. Effect of some essential oils on seed germination and seedling length of *Parthenium hysterophorus* L. *Ecoprint*, 5: 69-73.

- PENUELANS, J., RIBAS-CARBO, M. and GILES, L. 1996. Effects of allelochemical on plant respiration and oxygen isotope fragrance industries. JANICK, J. and SIMON, J.E. (editors), *New Crops*, pp. 620-627, New York.
- PORTER, J., PICKUP, R. and EDWARDS, C. 1997. Evaluation of flow cytometric methods for the detection and viability assessment of bacteria from soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 91-100.
- PRADHANANG, P.M. and COLLIER, G. 2009. How effective is hydrochloric acid treatment to control *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* contamination in tomato seed. *Acta Horticulturae*, 808: 81-85.
- QUESADA-OCAMPO, L.M., LANDERS, N.A., LEBEIS, A.C., FULBRIGHT, D.W. and HAUSBECK, M.K. 2012. Genetic structure of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populations in Michigan tomato fields. *Plant Disease*, 96: 788-796.
- RAHIMI, A.R., MOUSAVIZADEH, S.J., MOHAMMADI, H., KOKHZADI, A., MAJIDI, M. and AMINI, S. 2013. Allelopathic effect of some essential oils on seed germination of *Lathyrus annuus* and *Vicia villosa*. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 3 (4): 67-73.
- RAHMAN, A. and TALUKDER, F. A. 2006. Bioefficacy of some plant derivatives that protect grain against the pulse beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Science*, 6.
- RATNASEKERA, D. and KNAYANATHARA, H.G. 2010. Efficacy of cinnamon and citronella oil vapours in the control of *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Food and Agriculture*, 03 (1): 1-6.
- RAUDALES, R.E. and GARDENER B.B.M. 2008. Microbial biopesticides for the control of plant diseases in organic farming. the Ohio state university, agriculture and natural resources, *Fact Sheet*, 08: 5s.
- ROSADO, L.D.S., RODRIGUES, H.C.A., PINTO, J.E.B.P., CUSTÓDIO, T.N., PINTO L.B.B. and BERTOLUCCI, S.K.V. 2009. Allelopathy of aqueous extract and essential oil of leaves from basil Maria Bonita on lettuce, tomato and melissa germination. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 11 (4): 422-428.
- ROSSI, E., STEFANO, S. and LONI, A. 2012. Bioactivity of essential oils from mediterranean plants: insecticidal properties on *Sitophilus Zea Mais* and effect on seed germination. *J. of Entomology*, 9 (6): 403-412.
- SANKARIKUTTY, B. and NARAYANAN, C.S. 1993. Essential oils/isolation and production. *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*, 2185-2189.
- SANTOS, M., CRUZ, S., NORSKOV L. and RASMUSSEN, O.F. 1997. A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. *Seed Science and Technology*, 25: 581-584.

- SAS, 1999. SAS proprietary software version 7 (TSP1). SAS Institute, Cary, NC.
- SAWATVANICH, A., THOBUNLUEPOP, P., JATISATIENR, C., VEARASILP, S., PAWELZIK, E., DHEERANUPATTANA S. and A. JATISATIENR. 2007. Using eugenol for seed coating technology as storage fungi controller in soybean seeds. *Tropentag*, 9-11.
- SCHAAD, N.W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. second edition, APS Press St. USA. 455p.
- SCHAAD, N.W. 1989. Detection and identification of bacteria: detection of bacteria in seed and other planting material. Saettler, A.W., Schaad, N.W. and Roth, D.A. St Paul, M.N. (Editors), *The American Phytopathological Society*, 9-16.
- SCOTT, J.M. 1989. Seed coatings and treatments and their effects on plant establishment. *Advances in Agronomy*, 42: 43-83.
- SHASHIBHASKAR, M.S. 2008. Influence of seed pelleting on field performance and storability of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Pkm-1. M.Sc. Thesis, Dharwad University, 235p.
- SINGH, R.S.1999. Diseases of vegetable crops. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi and Kolkatta, 406 p.
- SINGH, D. and MATHUR, S.B. 2004a. Histopathology of seed-borne infections. CRC Press LLC, 2000 N.W. Corporate Blvd Boca Raton, Florida 33431. www.crcpress.com. (Son erişim tarihi: 2.5.2010)
- SINGH, D. and MATHUR, S.B. 2004b. Seed infection by bacteria. CRC Press LLC, 2000 N.W. Corporate Blvd Boca Raton, Florida 33431. www.crcpress.com. (Son erişim tarihi: 2.5.2010)
- SINGH, D. and MATHUR, S.B. 2004c. Penetration and establishment of fungi in seed. CRC Press LLC, 2000 N.W. Corporate Blvd Boca Raton, Florida 33431. www.crcpress.com. (Son erişim tarihi: 2.5.2010)
- SIVROPOULOU, A., KOKKINI, S., LANARAS T. and ARSENAKIS, M. 1995. Antimicrobial activity of mint essential oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43: 2384-2388.
- SİVRİTEPE, Ö. 2011. Tohum Canlılığının Değerlendirilmesi. *Ala Tarım*, 10 (2): 94-105.
- SOKOVIĆ, M., GLAMOČLIJA, J., MARIN, P.D., BRKIĆ, D. and VAN GRIENSVEN, L.J. 2010. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules*, 15: 7532-7546.
- SOMPAMITRA, C., CHAIMONGKON, O., SAWADEEMIT, C., VEARASILP, S. and THAPORNPOONPONG, S. 2011. Performance of essential oil and polyethyleneglycol coating on sweet corn seed. *Citation Agricultural Science Journal*, 42 (1): 407-409.

- SOOD, S., DHIRAJ, V. and NAGAR, P.K. 2006. Physiological and biochemical studies during flower development in two rose species. *Scientia Horticultura*, 108: 390-396.
- SOYLU, S., SOYLU, E.M., BOZKURT, A. and KAYA, A.D. 2003. Antibacterial activities of essential oils from oregano, thyme, rosemary ve lavender plants against *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, the causal agent of halo blight of bean. *Ovidius University Annals of Medical Science and Pharmacy*, 1: 40-44.
- SOYLU, S., SOYLU, E.M., BAYSAL, O. and ZELLER, W. 2005. Antibacterial activities of the essential oils from medicinal plants against the growth of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Biocontrol of Bacterial Plant Diseases, 1st Symposium, p. 83-85, 23rd - 26th October 2005, Germany.
- SOYLU, S., SOYLU E.M. ve EVRENDİLEK, G. 2006. Dereotu (*Anethum graveolens* L.) ve rezene (*Foeniculum vulgare* Mill.) uçucu yağlarının gıda ve bitki kaynaklı patojen bakteriler üzerine antibakteriyel etkilerinin incelenmesi. *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, s. 485-488, 24-26 Mayıs. 2006, Bolu.
- SRIPRASERT, K., VEARASILP S., THANAPORNPOONPONG, S., KRITTIGAMAS, N. and SURIYONG, S. 2008. New drive for rural development control of seedborne pathogen in rice seed by coating with organic substances. *Tropentag*, 7-9.
- SAHİN, F., USLU, H., KOTAN, R. and DONMEZ, M.F. 2002. New disease report bacterial canker, caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, on tomatoes in Eastern Anatolia Region of Turkey. *Plant Pathology*, 51: 399.
- SAHİN F., KARAMAN, M., GULLUCE, H., OGUTÇU, M., SENGUL, A., ADIGUZEL, S., OZTURK, S. and KOTAN, R. 2003. Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. *J. Ethnopharmacol.*, 87 (1): 61-65.
- SAHİN, F., GULLUCE, M., DAFERERA, D., SOKMEN, A., SOKMEN, M., POLISSIOU, M., AGAR, G. and OZER, H. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the eastern anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15: 549-557.
- ŞEHİRALİ, S. 1997. Tohumluk ve Teknolojisi. Fakülteler Matbaası, İstanbul, 368-387s.
- ŞEN, Y., ZHU, F., VANDENBROUCKE, H., VAN DER WOLF, R.G.F. and VAN HEUSDEN, V.W. 2013. Erratum to: screening for new sources of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in tomato. *Euphytica*, 190: 319.
- ŞEVİK, M.A. 2012. Tohum ile taşınan virüsler ve tohum sağlığı. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 26 (3): 75-79.

- TALIBI, I., AMKRAZ, N., ASKARNE, L., MSANDA, F., SAADI, B., BOUDYACH, E.H., BOUBAKER, H., BOUIZGARNE, B. and AOUMAR, A. 2011. Antibacterial activity of moroccan plants extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (17) : 4332-4338.
- TANOVIC, B., MILIJASEVIC, S. and OBRADOVIC, A. 2007. *In vitro* effect of plant essential oils on growth of some soil-borne pathogens. *Acta Hort.*, 729: 467-471.
- TAYLOR, A.G. and ECKENRODE, C.J. 1993. Seed coating technologies to apply triggered for the control of onion maggot and to reduce pesticide application. *Pertinent to the Integrated Pest Management at Cornell University, NYS IPM Publication*, 117: 73-78.
- TAYLOR, A.G., ALLEN, P.S., BENNET, M.A., BRADFORD, K.J., BURRIS, J.S. and MISRA, M.K. 1998. Seed enhancements. *Seed Science Research*, 8: 245-256.
- TEPE, B., DAFERERA, D., TEPE, A., POLISSIOU M. and SOKMEN, A. 2007. Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepta flavida* hud.-mor. from Turkey. *Food Chemistry*, 103: 1358-1364.
- THOBUNLUEPOP, P. 2009. The inhibitory of the various seed coating substances against rice seed borne fungi and their shelf-life during storage. *Pakistan J. of Biological Sciences*, 12 (16): 1102-1110.
- TINIVELLA, F., GULLINO, M.L., AMEIN, T., WRIGHT, S.A.I., VAN DER VAN DER WOLF, J., SCHMITT, A. and KOCH, E. 2008. Evaluation of microorganisms, plant extracts and other agents of natural origin as seed treatments for vegetables in organic farming. German Plant Protection Conference, p. 305, Hamburg.
- TİRENG KARUT, Ş. 2011. Organik tarımda domates bakteriyel solgunluk hastalığı etmenine (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) karşı kullanılabilir tohum uygulamaları. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, 61s.
- TİRYAKİ, O., CANHİLAL, R. ve HORUZ, S. 2010. Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26 (2): 154-169.
- TOBIAS, A., LEHOCZKI-TORNAL J., SZALAI, Z., CSAMBALIK, L. and RADICS L. 2007. Effect of different treatments to bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) in tomato, and bacterial spot (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) in pepper. *International Journal of Horticultural Science*, 13 (2): 49-53.
- TOROĞLU, S., DIĞRAK, M. ve ÇENET, M. 2006. Baharat olarak tüketilen *Laurus nobilis* Linn. ve *Zingiber officinale* Roscoe bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri ve antibiyotiklere *in-vitro* etkilerinin belirlenmesi. *KSÜ, Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9 (1).

- TÜİK, 2013. Bitkisel üretim istatistikleri. www.tuik.gov.tr. (Son erişim tarihi: 06.06.2013)
- TÜRKÜŞAY, H. ve TOSUN, N. 2005. Hidrojen peroksit uygulamalarının domates bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığı (*Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (Smith) Davis vd)'na etkileri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 42: 45-56.
- UÇKUN, A.Y., RUŞEN, M. ve TINMAZ, A.B. 2006. *Melissa officinalis* L. (Oğul otu)'nin hıyar ve kavun tohumlarına allelopatik etkisinin belirlenmesi. Allelopati Çalıştay (Türkiye'de Allelopatinin Kullanımı: Dün, Bugün, Yarın). Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, s.426, Yalova.
- UEMATSU, T., FUJI, H. and OHATA, K. 1977. Relationship between inoculation methods and seed infection with tomato canker bacteria. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.*, 43: 412- 418.
- UMESHA, S. 2006. Occurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. *Crop Prot.*, 25: 375-381.
- VAN DE BRAAK, S.A. and LEIJTEN, G.C. 1999. Essential oils and oleoresins: A survey in the Netherlands and other major markets in the European Union. CBI. *Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam*, p. 116.
- VAN DER WOLF, J.M. and VAN DER BIRNBAUM, Y.E. 2012. Compounds of natural origin for seed treatment. edepot. wur. NI/37930. (Son erişim tarihi: 30.07.2012)
- VAN DER WOLF, J.M., BIRNBAUM, Y., ZOUWEN, P.S. and GROOT, S.P.C. 2008. Disinfection of vegetable seed by treatment with essential oils, organic acids and plant extracts. *Seed Sci.and Technol.*, 36: 76-88.
- VAN HEUSDEN, A.W., KOORNEEF, M., VOORRIPS, R., BRUGGERMANN, W., PET, G., VRIENLINK-VAN GINKEL, R., CHEN, X. and LINDHOUT, P. 1999. Three QTLs from *Lycopersicon peruvianum* confer a high level of resistance to *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Theoretical and Applied Genetic*, 99: 1068-1074.
- VANG, S.Y., CHEN P.F. and CHANG, S.T. 2005. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology*, 96: 813–818.
- VANI, A.H. and YAQUB BHAT, M. 2012. Control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* by urea coated with Nimin or other natural oils on mung, *Vigna radiata* (L.) R. J. Biopest., 5: 255-258.
- VENTER, H.A. 2000. What is seed vigor? *ISTA News Bulletin*, 121: 13-14

- VICHERKOVA, M., PLHAK, F. and KOUSALOVA, I. 1999. Research on allelopathy in Czech Republic. In: S.S. Narwal, ed.: Allelopathy Update. Science Publishers, Inc. Enfield, New Hampshire, USA.
- VIMAL, M., VIJAYA, P.P., MUMTAJ, P. and FARHATH, M.S. 2013. Antibacterial activity of selected compounds of essential oils from indigenous plants. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5 (1): 248-253.
- WALIWITIYA, R. 2005. Toxicities of thymol, citronellal, eugenol and rosemary oil to control *Agriotes obscurus* (Coleoptera: Elateridae). M.Sc. Thesis, The University of Peradeniya, 61p.
- WALSH, J., ROONEY, K. and CANESTRINO, J. 1998. Seed coating innovations proceedings, California/Nevada alfalfa Symposium, p. 209-210, USA.
- XU, J., ZHOU, F., JI, B.P., PEI, R.S. and XU, N. 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 47: 174-179.
- XU, X. 2010. Seed transmission of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and development of strategies to control the pathogen in seed. Ph.D. Thesis, The Ohio State University, 150p.
- YATAĞAN, G. 2011. Uçucu yağlarda bulunan ana bileşiklerin preparatif fraksiyon toplayıcı ile izolasyonları ve biyolojik aktiviteleri. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, 189 s.
- YILAR, M., BAYAN, Y., ÖZCAN, S., AKŞİT, H. ve KADIOĞLU, I. 2012. *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. uçucu yağının biyoherbisidal etkisi. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2 (1): 11-20.
- YILMAZ, S., ÜNLÜ, A., GÜNEŞ, S., BAYSAL, Ö., GÖLÜKCÜ, Ş.B., YEŞİLOVA, Ö., GÜMRÜKCÜ, E., ÇELİK, N., KARATEKİN, N., KAYA, N. ve KAYACAN, N. 2005. İthal tohumlarda tespit edilen hastalık etmenleri. Türkiye II. Tohumculuk Kongresi, s.301-306, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- YILDIRIM, A. E. 2010. Yaş meyve sebze de ilaç kalıntısı. www.tarimdunyasi.net/p:785. (Son erişim tarihi:10.5.2010)
- YÜCER, A. ve ALTINTAŞ, G. 2012. Türkiye'nin tıbbi ve aromatik bitkiler dış ticareti. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, s. 55-63, Tokat.
- ZENG, D., MEI, X. and WU, J. 2010a. Study and preparation of an environmentally friendly corn seed coating agent. *Journal of Plant Protection Research*, 50: 2.
- ZENG, D., MEI, X. and WU, J. 2010b. Effects of an environmentally friendly seed coating agent on combating head smut of corn caused by *Sphacelotheca reiliana* and corn growth. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development*, 2 (6): 108-112.

- ZHAO, C.X., LIANG, Y.Z., FANG, H.Z. and LI, X.N. 2005. Temperature-programmed retention indices for gas chromatography-mass spectroscopy analysis of plant essential oils. *J. Chromatogr.*, 1096: 76-85.
- ZHAO, W.J., CHEN, H.Y., ZHU, S.F., XIA, M.X. and TAN, T.W. 2007. One step detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato seeds using a TaqMan probe. *J. Plant Pathol.*, 89: 349-35.
- ZHI-HUI, C., CHUN-HUI, W., XUE-MEI, X. and KHAN, M.A. 2011. Allelopathic effects of decomposing garlic stalk on some vegetable crops. *African Journal of Biotechnology*, 10 (69):15514-15520.

8. EKLER

EK 1. Tohum ekstraksiyonu, klasik ve real time PCR koşulları ve protokolleri

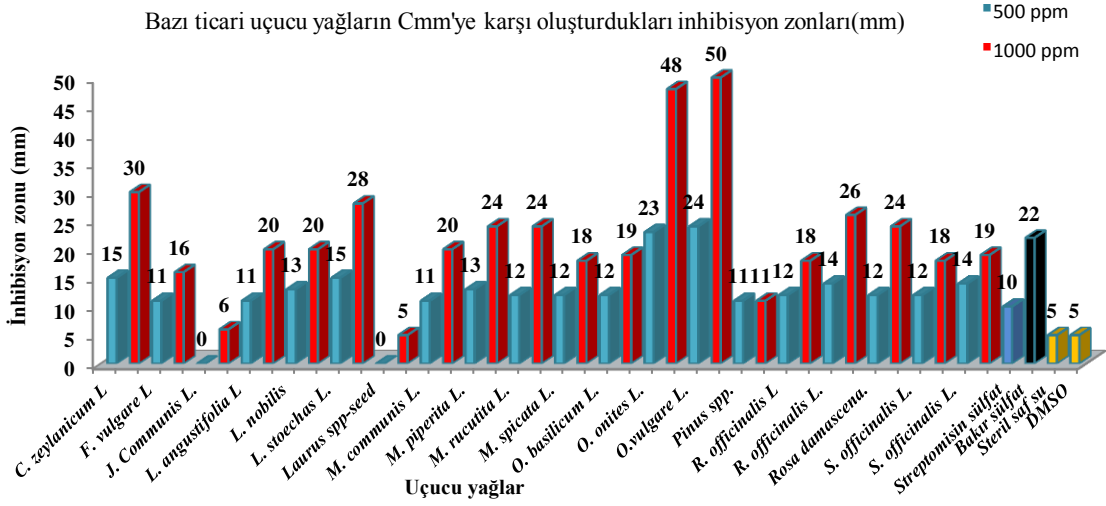
1. 100 mL SPBT içerisine 1000 adet tohum bırakılmış ve 1 gece +4 °C'de bekletilmiştir.
2. Bu tohum ekstrakt solusyonundan 50 mL santrifuj tüplerine bırakılmış ve 1 dakika 1000 rpm'de santrifuj edilmiştir.
3. Üst kısım yeni bir santrifuj tüpüne alınmış, 20 dakika 9000 rpm'de +4 °C'de santrifuj edilmiştir.
4. Üst kısım tüpten atılmış ve altaki pellet 3 mL 0,07 M SPB ile ilave edilerek karıştırılmıştır.
5. Bu solusyon 2 adet 1 mL'lik santrifuj tüplerine alınmış, 0,07 M SPB ile 10^1 ve 10^2 seyreltilmiştir.
6. Dilüe edilen bu tohum extract solusyonları ekim yapıncaya kadar oda koşullarında muhafaza edilmiştir.
7. Her bir dilüsyondan 100 µl alınarak SCMF, GF-rif ve NA besisi yerine ekilmiş ve 28 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir.
8. Pozitif kontrol olarak referans Cmm izolatu aynı şekilde 0,07 M SPB ile dilüe edilerek (yaklaşık 4000 CFU/mL olacak şekilde), SCMF, GF-rif ve NA besisi yerine yayılmış ve 28 °C'de 7 gün inkübe edilerek karşılaştırmada kullanılmıştır.
9. Testin doğruluğu için 3 tekerrürde pozitif kontrol petrilerinde 20-50 CFU/petri olması gerekir ve eğer <1 CFU olursa tekrar edilmiştir.
10. Alt örnek başına 20 koloni alınarak PCR da kullanılmıştır.
11. Alınan bu şüpheli Cmm kolonileri ve pozitif ve negatif kontroller 1 mL 5 mM NaOH içeren santrifuj tüpüne aktarılmış ve vortekslenmiştir.
12. Daha sonra 10 dakika 100 °C'de inkübe edilmiş ve sonrasında buzda bekletilmiştir.
13. Sonrasında 1 dakika 10 000 rpm'de santrifuj edilmiştir.
14. Üst kısımdan 2 µl alınarak 23 µl'lik PCR-mix'ne ilave edilmiştir.
15. Master-mixler:

qPCR Cmm-IGS PCR reaksiyon karışımı		
Master-mix	1 reaksiyon	x
PCR water	8 µl	...µl
2 x gene expression mastermix	12.5 µl	...µl
10 µM CmmIGS-F (258a)	0.75 µl	...µl
10 µM CmmIGS-R (258b)	0.75 µl	...µl
10 µM CmmIGS-Probe (258c)	1 µl	...µl
Alt Toplam	23 µl	...µl
Örnek	2 µl	...µl
<u>Toplam</u>	25.0 µl	...µl

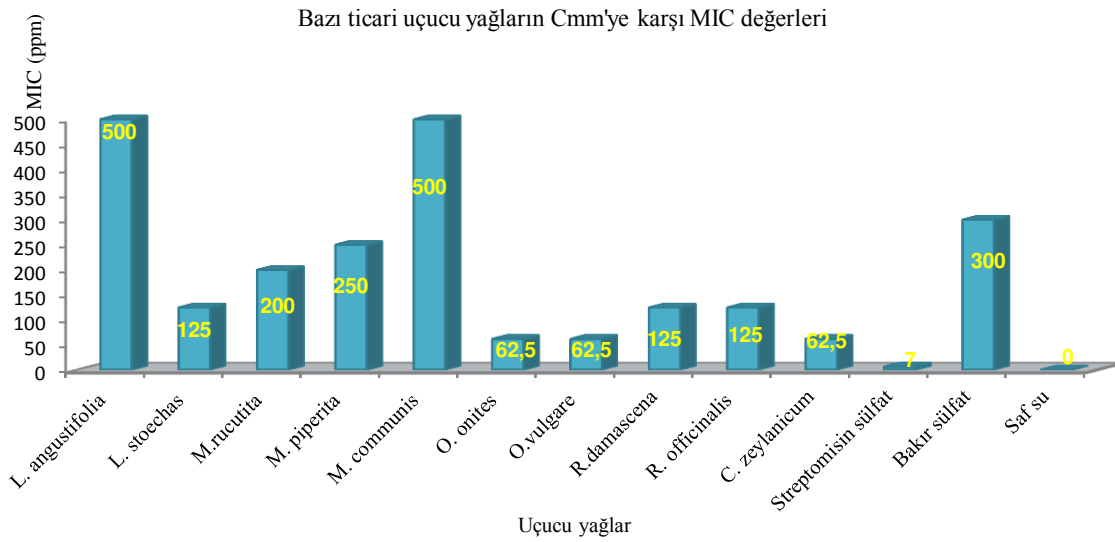
qPCR-Pat1 BAC reaksiyon karışımı		
Master-mix	1 reaksiyon	...x
PCR water	4.5 µl	...µl
2 x gene expression mastermix	12.5 µl	...µl
10 µM CmmPat1-R (259b)	0,75 µl	...µl
10 µM CmmPat2-F (259e)	0,75 µl	...µl
10 µM CmmPat1-Probe (259c)	1,0 µl	...µl
10 µM CmmPat1-Probe2 (259d)	1,0 µl	...µl
10 µM BAC16S-F (183a)	1,0 µl	...µl
10 µM BAC16S-R (183b)	1,0 µl	...µl
10 µM BAC16S-Probe (183d)	0,5 µl	...µl
Alt Toplam	23 µl	...µl
Örnek	2 µl	...µl
<u>Toplam</u>	25.0 µl	...µl

PCR Koşulları (qPCR ve gradient PCR için)		
Basamak	sıcaklık	zaman
Hold	95°C	10'00
40 cycli	95°C	0'15
	60°C	1'00

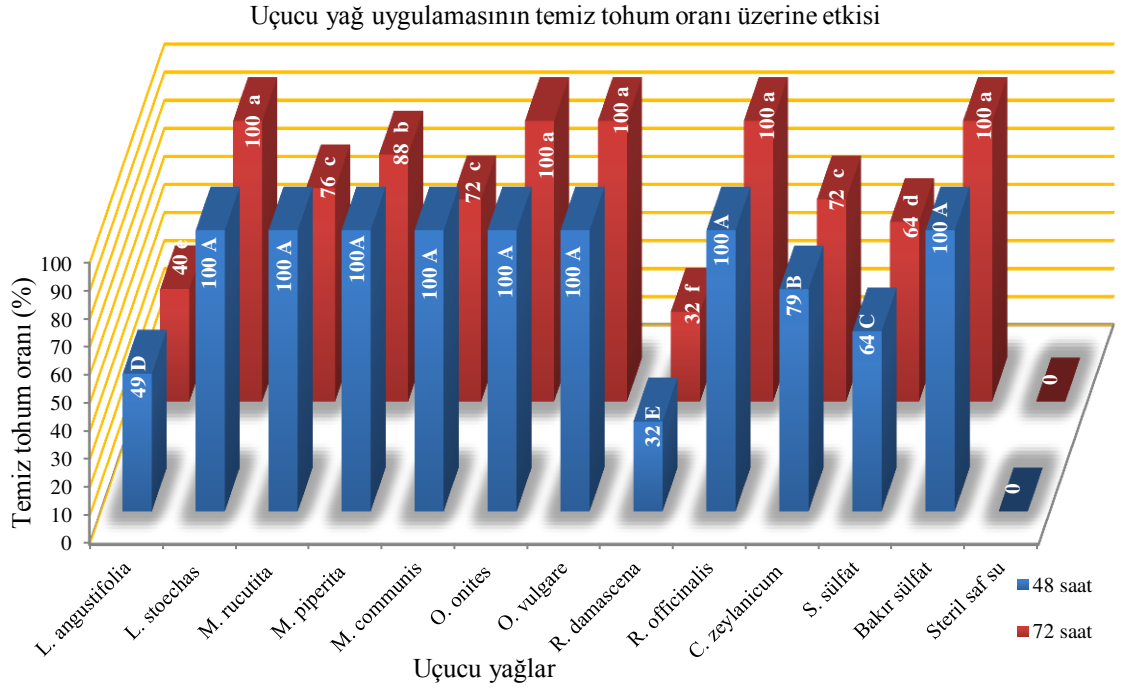
EK 2. Deneme 1, 2, 3, 4, 5 ve 6'nın verilerine ait şekiller



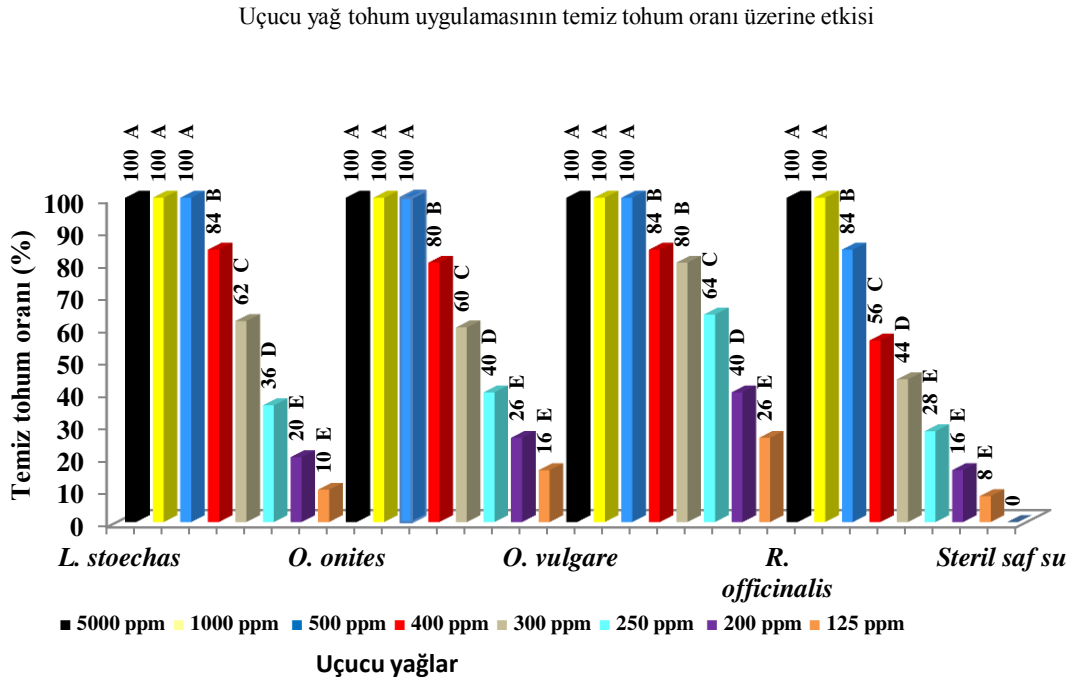
Şekil 8.1. Çalışmada kullanılan uçucu yağların Cmm'ye karşı oluşturdukları inhibisyon zonlarına ait görüntü



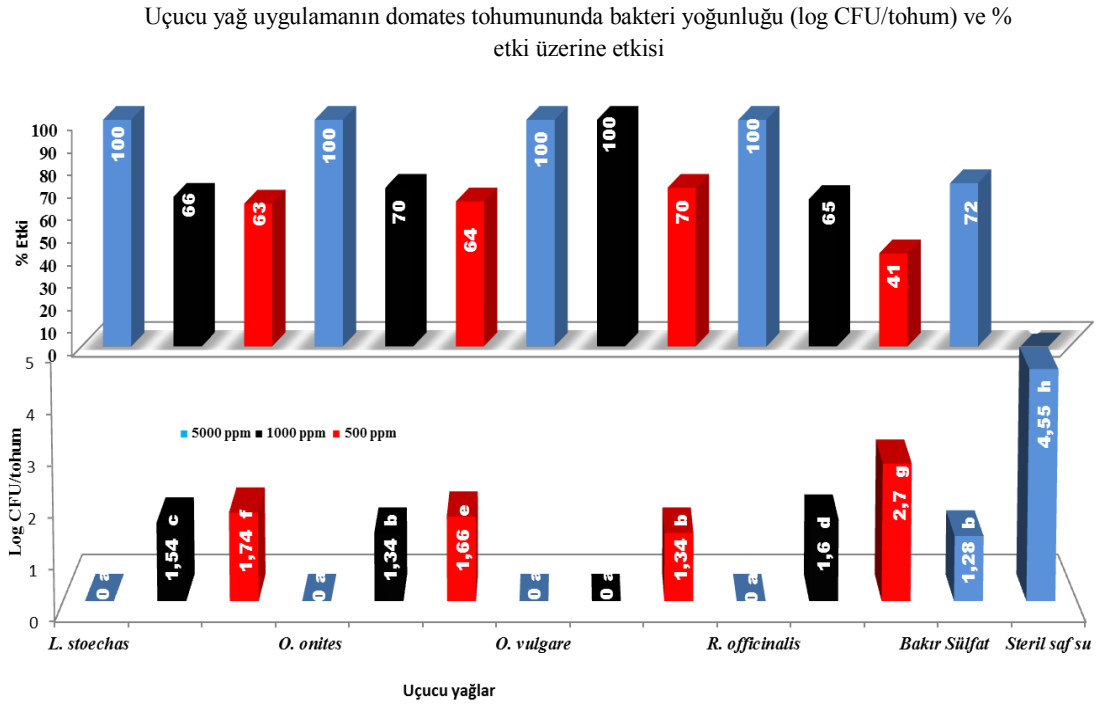
Şekil 8.2. Çalışmada kullanılan uçucu yağların Cmm'ye karşı MIC değerlerine ait görüntü



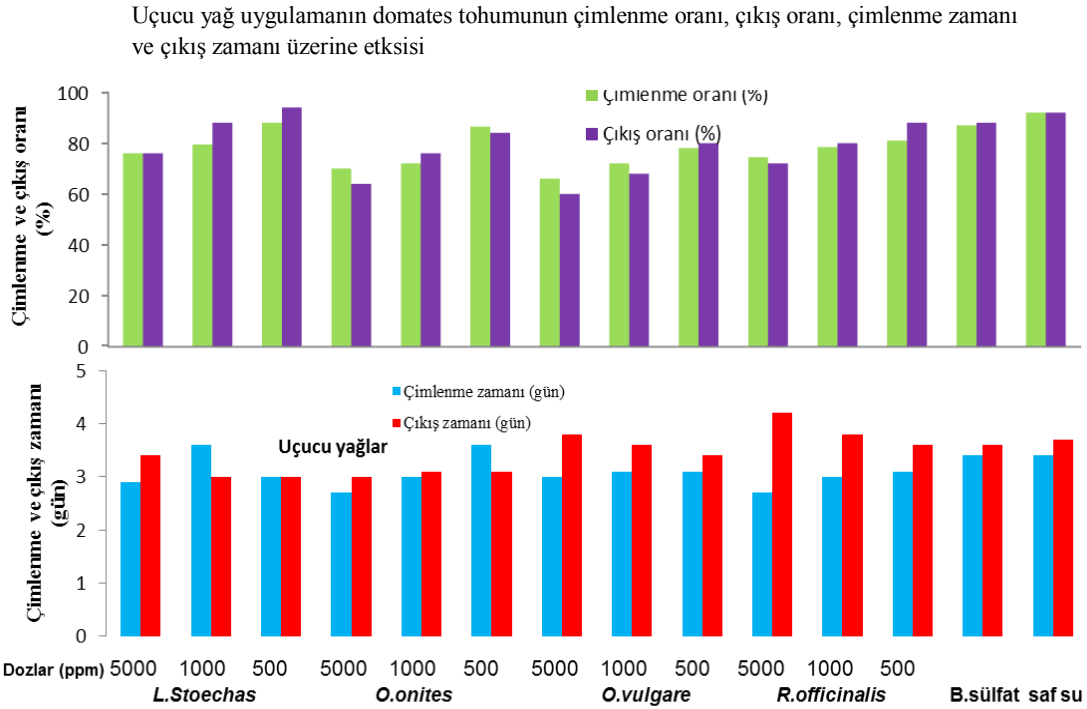
Şekil 8.3. Domates tohumlarına uçucu yağ tohum uygulamasının (1000 ppm) temiz tohum oranına etkisi



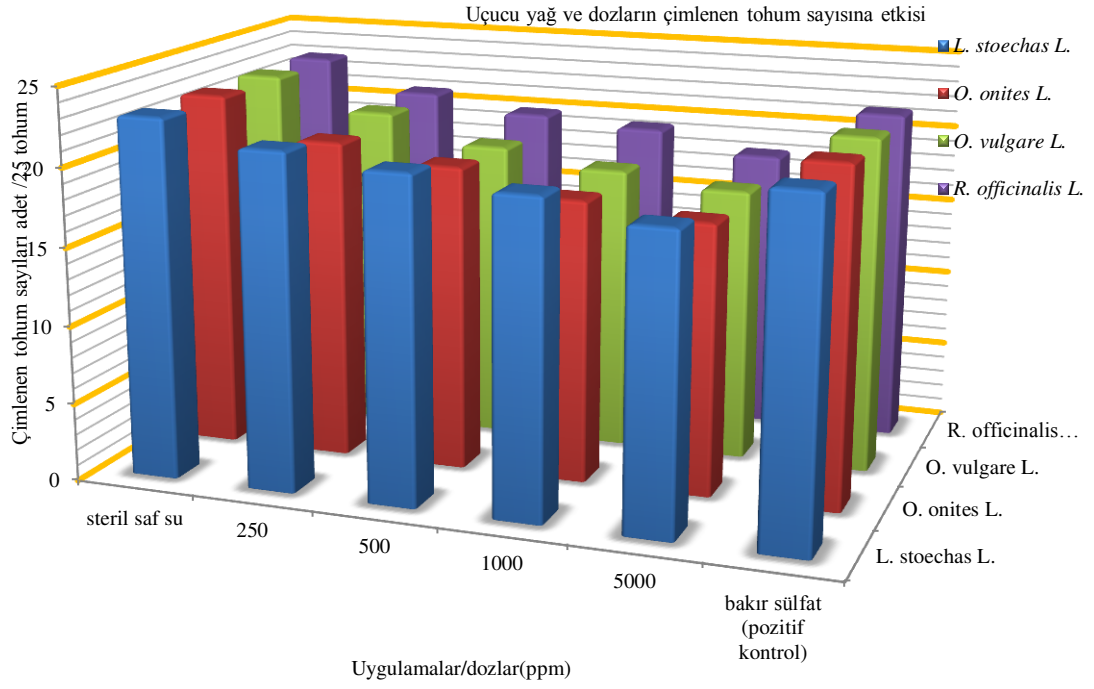
Şekil 8.4. Domates tohumlarına uçucu yağ (5000, 1000, 500, 400, 300, 250, 200, 125 ppm) uygulamasının temiz tohum oranına etkisi



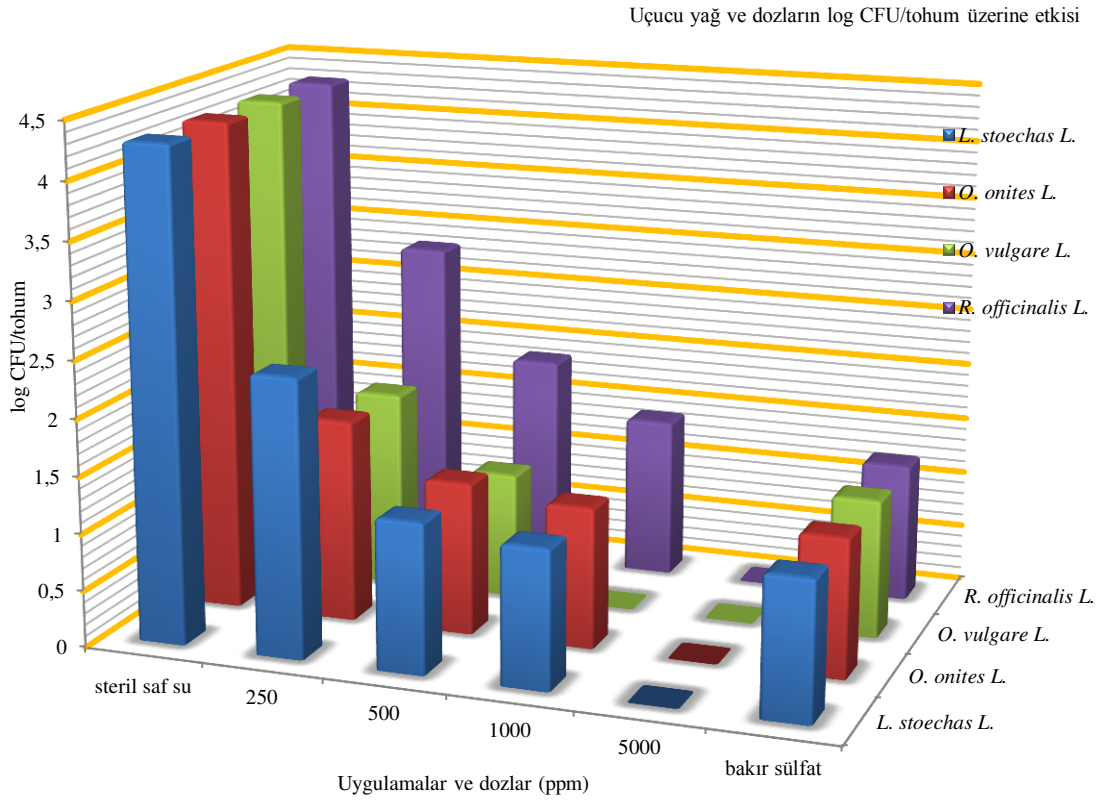
Şekil 8.5. Domates tohumlarına uçucu yağ (5000, 1000, 500 ppm) uygulamasının tohumda bakteri yoğunluğuna etkisi



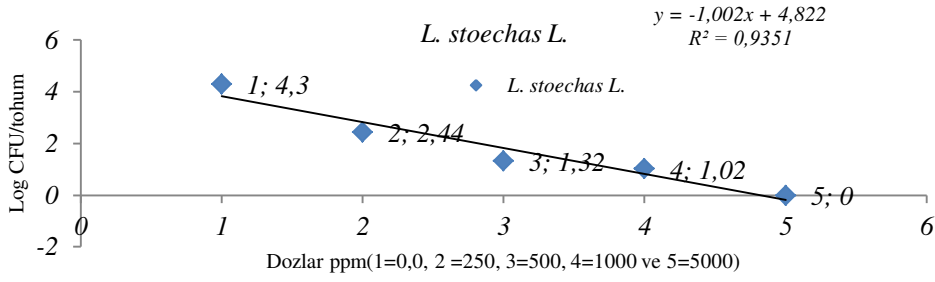
Şekil 8.6. Domates tohumlarına uçucu yağ (5000, 1000, 500 ppm) uygulamasının çimlenme oranı, çıkış oranı, çimlenme zamanı ve çıkış zamanına etkisi



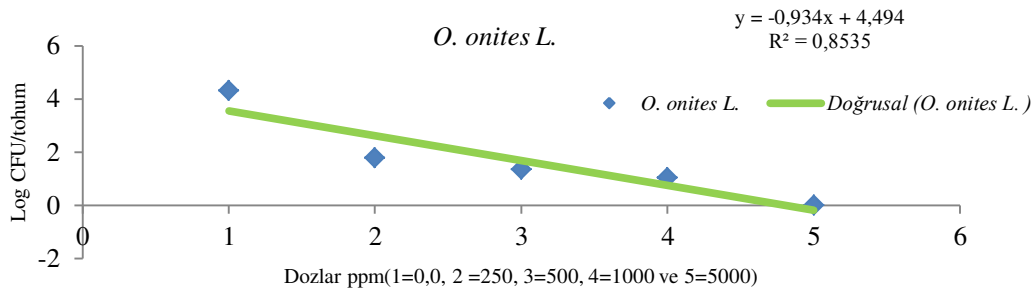
Şekil 8.7. Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen uçucu yağ ve dozların çimlenen tohum sayısına etkisi



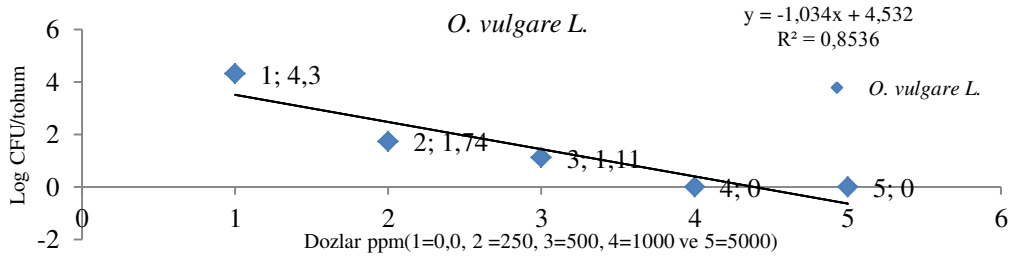
Şekil 8.8. Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen uçucu yağ ve dozların tohumda bakteri yoğunluğuna etkisi



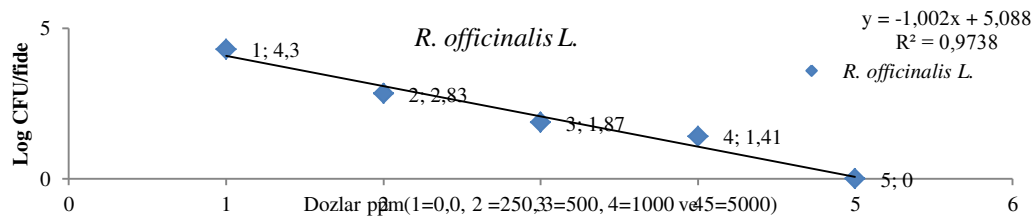
Şekil 8.9. Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen *L. stoechas* uçucu yağının farklı dozlarının tohumda bakteri yoğunluğuna etkisi



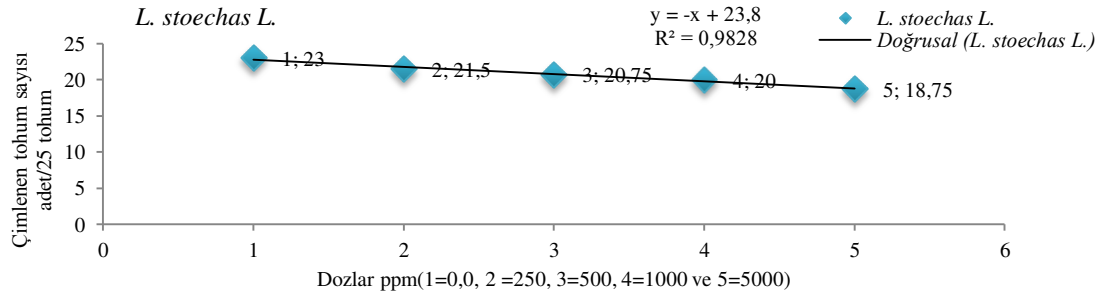
Şekil 8.10. Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen *O. onites* uçucu yağının farklı dozlarının tohumda bakteri yoğunluğuna etkisi



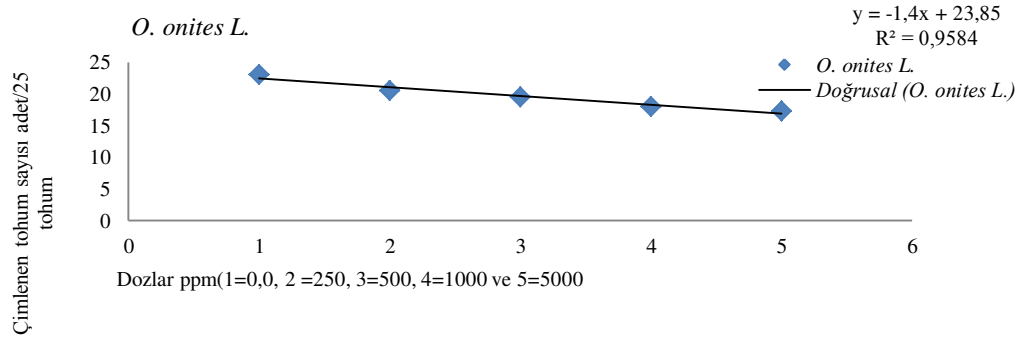
Şekil 8.11. Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen *O. vulgare* uçucu yağının farklı dozlarının tohumda bakteri yoğunluğuna etkisi



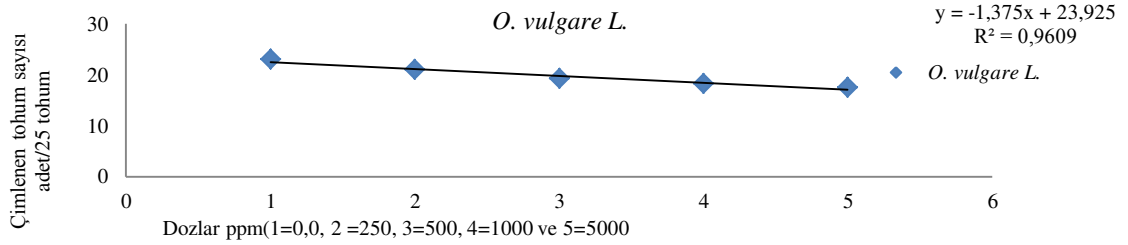
Şekil 8.12. Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen *R. officinalis* uçucu yağının farklı dozlarının tohumda bakteri yoğunluğuna etkisi



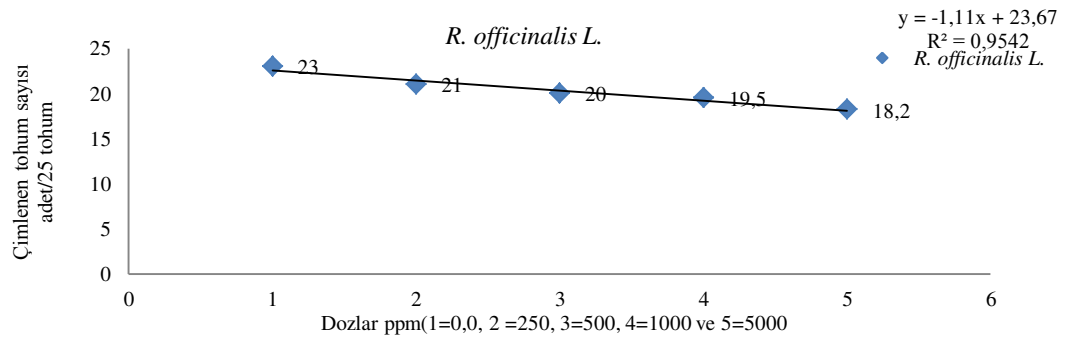
Şekil 8.13. Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen *L. stoechas* uçucu yağının farklı dozlarının çimlenen tohum sayısına etkisi



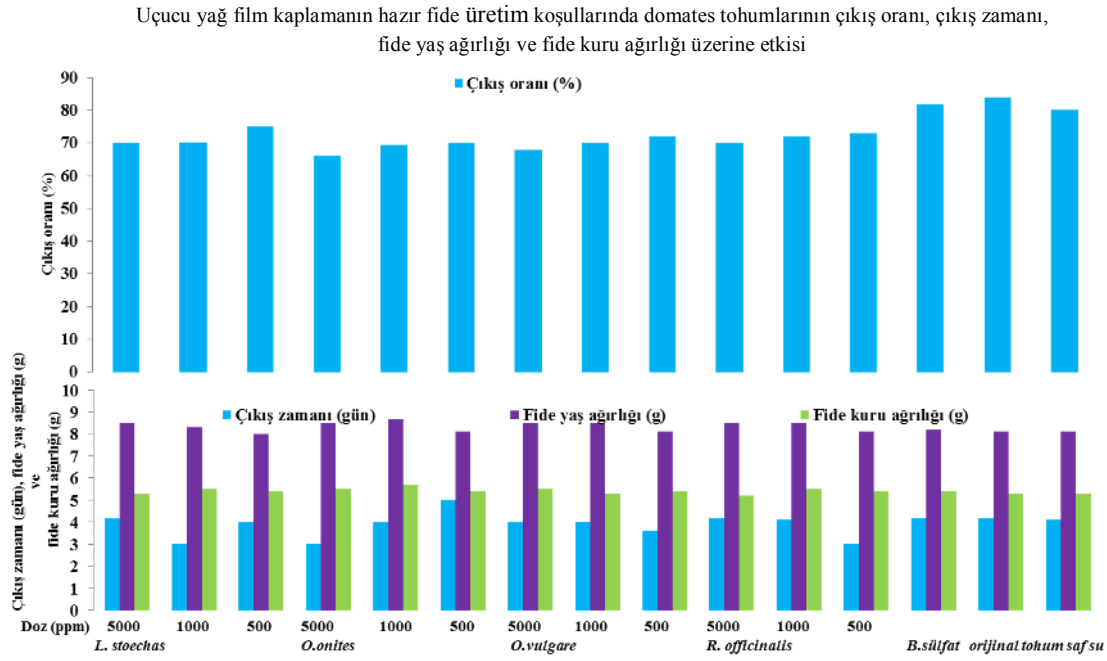
Şekil 8.14. Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen *O. onites* uçucu yağının farklı dozlarının çimlenen tohum sayısına etkisi



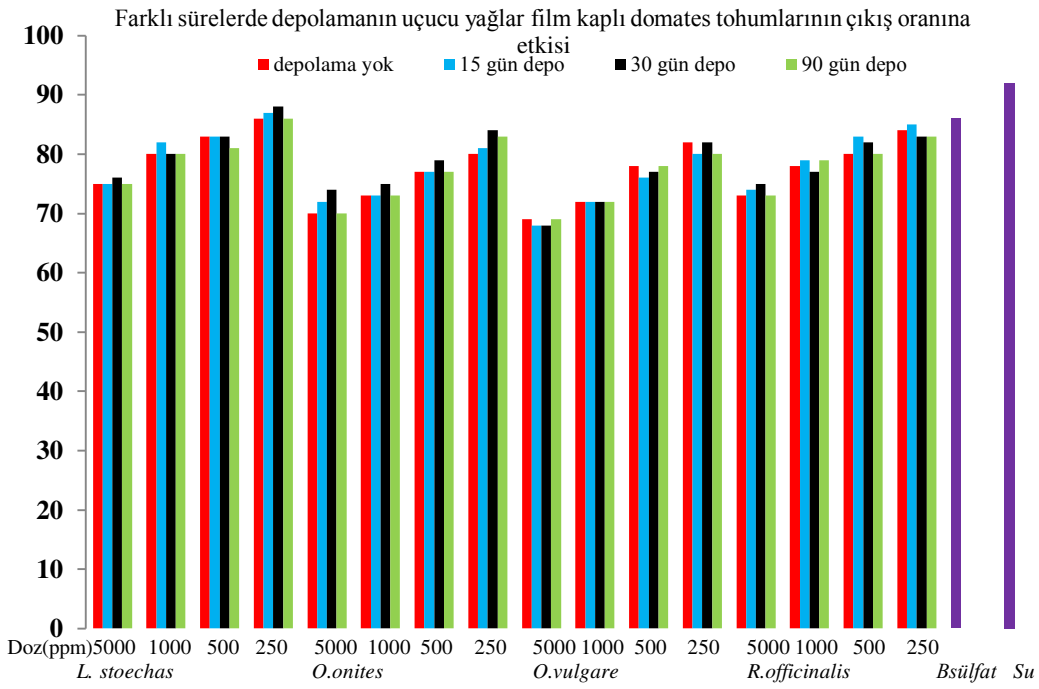
Şekil 8.15. Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen *O. vulgare* uçucu yağının farklı dozlarının çimlenen tohum sayısına etkisi



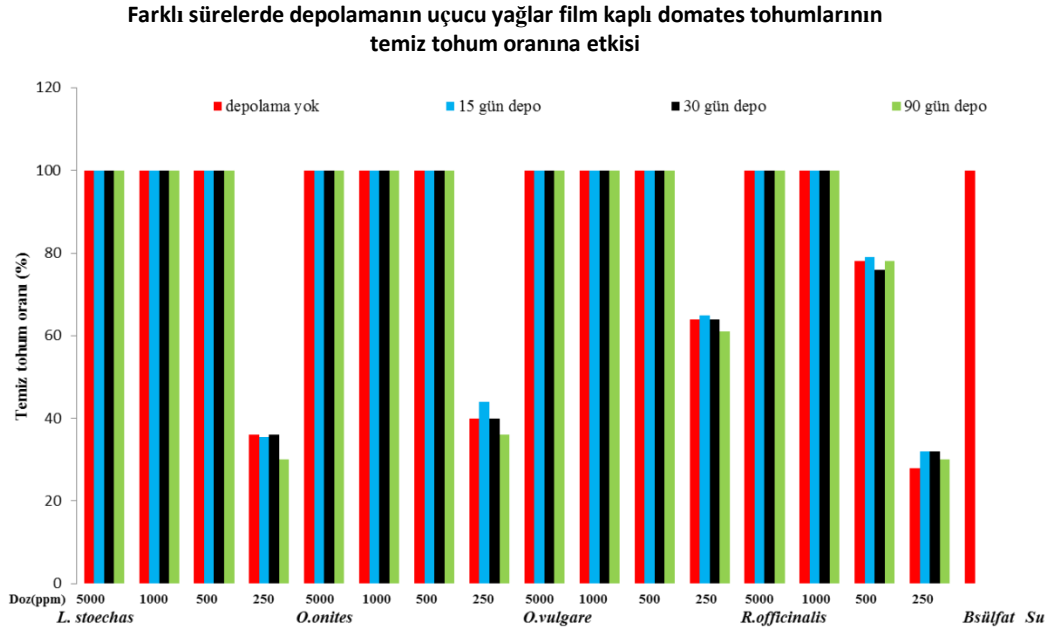
Şekil 8.16. Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen *R. officinalis* uçucu yağının farklı dozlarının çimlenen tohum sayısına etkisi



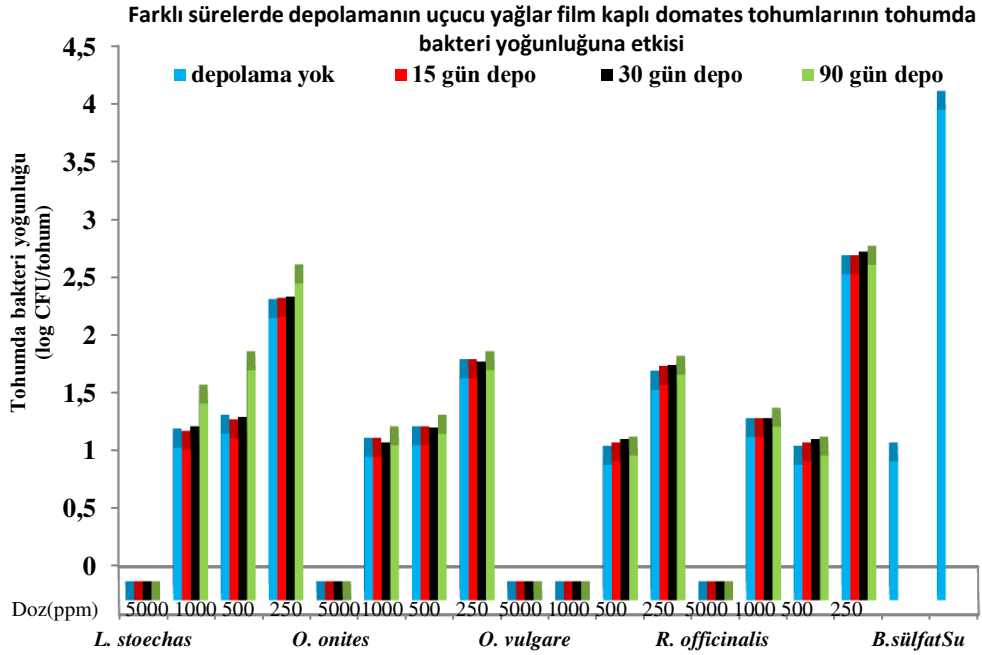
Şekil 8.17. Film kaplama ile domates tohumuna yüklenen *R. officinalis* uçucu yağının farklı dozlarının çimlenen tohum sayısına etkisi



Şekil 8.18. Farklı uçucu yağ dozları (5000, 1000, 500 ve 250 ppm) ile film kaplanan ve farklı sürelerde depolanan (0, 15, 30 ve 90 gün) domates tohumlarının çıkış oranındaki değişim



Şekil 8.19. Farklı uçucu yağ dozları (5000, 1000, 500 ve 250 ppm) ile film kaplanan ve farklı sürelerde depolanan (0, 15, 30 ve 90 gün) domates tohumlarının temiz oranındaki değişim



Şekil 8.20. Farklı uçucu yağ dozları (5000, 1000, 500 ve 250 ppm) ile film kaplanan ve farklı sürelerde depolanan (0, 15, 30 ve 90 gün) domates tohumlarında bakteri yoğunluğundaki değişim

ÖZGEÇMİŞ

Meral YILMAZ 1976 yılında Fethiye/MUĞLA’da doğdu. İlk öğrenimini Fethiye’de, orta ve lise eğitimini Antalya’da tamamladı. 1994-1998 yıllarında BURSA Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Yetiştirme ve Islahı ABD’de lisans eğitimini ziraat mühendisi olarak tamamladı. 1999-2003 yıllarında aynı bölümde Yüksek Lisans eğitimini Yüksek Ziraat Mühendisi olarak tamamladı. 2002-2004 yıllarında ANTALYA Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsünde sebze ıslahı konusunda görev yaptı. 2004-2010 yıllarında ANTALYA Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsünde sebze ıslahı konusunda görev yaptı. 2009 yılından bu yana da aynı enstitünün Bitki Sağlığı Bölümünde, Fitopatoloji Birimi altında Tohum Patolojisi ve Teknolojisi konusunda çalışmalarını sürdürmektedir. 2007 yılında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi ve Biyoteknoloji Enstitüsünde başladığı doktora eğitimine, 2009 yılından sonrasında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri ABD’de devam etmiştir. Evli ve iki çocuk annesidir.