

## Fosfat çözen bakterilerin pamuk bitkisinin gelişimine ve *Verticillium solgunluğu*'na etkileri

Ümit ÖZYILMAZ<sup>1</sup>, Kemal BENLİOĞLU<sup>1</sup>

### Effect of phosphate solubilizing bacteria to growth of cotton plant and *Verticillium wilt*

**Abstract:** The five bacterial strains (6k8-*Pseudomonas putida*, 6ba6-*Pseudomonas fluorescens*, F5-*Burkholderia cepacia*, E21-*Pseudomonas sp.*, C5-*Bacillus megaterium*) isolated from rizosphere of various crop plants were selected for their potential to solubilize organic or inorganic phosphate, and investigated for the effect of *Verticillium wilt* of cotton and plant growth. Bacterization of cotton seeds (cv. Carmen) with F5 and 6ba6 significantly increased the uptake of phosphorus and dry weight of cotton plants by 47.9% and 23.1%, respectively. After inoculation of cotton plants by stem injection, seed bacterization with E21 and F5 resulted in significant protection (68.4% and 38.9%, respectively) against non-defoliating strain of *Verticillium dahliae*, but none of the strains was effective against the defoliating strain. In the presence of mikrosklerotia (10 ms/g soil) of two different strains of *V. dahliae*, seed bacterization with E21 and 6ba6 was significantly suppressed the disease by 69% and 66% respectively, against the non-defoliating strain and by 51.4% and 54% respectively, against the defoliating strain.

**Key words:** Phosphorus, cotton, *Verticillium dahliae*, biocontrol

**Özet:** Organik veya inorganik fosfatı çözebilme potansiyeline sahip, çeşitli kültür bitkilerinin rizosferinden izole edilen 5 bakteri izolatının (6k8-*Pseudomonas putida*, 6ba6-*Pseudomonas fluorescens*, F5-*Burkholderia cepacia*, E21-*Pseudomonas sp.*, C5-*Bacillus megaterium*) Pamuk *Verticillium Solgunluğu*'na ve bitki gelişimine etkisi araştırılmıştır. Tohum bakterizasyonu uygulanmış Carmen çeşiti pamuk bitkilerinde F5 ve 6ba6 izolatları fosfor alınımını önemli derecede artırmış, sırasıyla % 47.9 ve % 23.1 oranında bitki kuru ağırlığında artış sağlamıştır. Gövde enjeksiyon yöntemi ile inokule edilen pamuk bitkilerinde, E21 ve F5 ile tohum bakterizasyonu *Verticillium dahliae*'nin yaprak dökmeyen ırkına karşı sırasıyla % 68.4 ve % 38.9 oranında etkili olurken, yaprak döken ırka karşı hiç bir izolat etkili bulunmamıştır. Toprakta iki farklı *V. dahliae* ırkına ait mikrosklerotların (10 ms/g toprak) varlığı durumunda, E21 ve 6ba6 izolatları ile tohum bakterizasyonu, yaprak dökmeyen ırka karşı sırasıyla % 69 ve % 66, yaprak döken ırka karşı da sırasıyla % 51.4 ve % 54 oranında önemli düzeyde etkili bulunmuştur.

**Anahtar sözcükler:** Fosfor, pamuk, *Verticillium dahliae*, biyokontrol

<sup>1</sup>Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 09100, Aydın  
Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: uozyilmaz@gmail.com  
Alınış (Recieved): 26.03.2012 Kabul ediliş (Accepted): 04.05.2012

## Giriş

Fosfor (P) biyolojik gelişme ve büyüme için en önemli makro besin elementlerinden biridir. Biyosferdeki fosfor çevrimi bir dizi indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları şeklinde olur ve bu çevrimde mikroorganizmalar çok önemli rol oynar. Topraktaki çözünebilir P konsantrasyonu genellikle düşük olup normalde 1 ppm veya daha az orandadır (Rodriguez & Fraga 1999). Dünyamızda P doğal olarak fosfat kayaları ve apatit şeklinde mineral formlarda bulunmaktadır ve bunların en önemli özelliği de çözünemez durumda olmalarıdır. Bitkiler topraktan  $\text{HPO}_4^{2-}$  veya  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  formundaki fosforu alabilir. Bitkiler için topraktaki diğer bir fosfor kaynağı da özellikle tarım yapılan alanlarda kullanılan normal çözünebilir formda P içeren gübrelerdir. Ancak uygulanan bu çözünebilir formdaki inorganik fosfatın büyük bir kısmı toprakta kısa sürede tutunarak çözünemez forma geçer. Fosfor fiksasyonu olarak bilinen bu olayda toprak pH'sı çok önemli rol oynar. Toprak yapısına bağlı olarak fosfor ülkemizde de olduğu gibi pH'sı yüksek kireçli topraklarda kalsiyum tarafından, asitli topraklarda ise demir ve alüminyum tarafından tutularak çözünemez forma geçer. Topraktaki üçüncü P kaynağı organik fosfattır. Toprakların pek çoğunda toplam fosforun % 30-50 si organik fosfat kaynaklıdır. Ancak bunlar yüksek molekül ağırlıklı bileşikler (nukleik asitler, fosfolipitler, fosfodiesterler) şeklinde bulunmaktadır. Bu nedenle de alınabilmesi için çözünebilir iyonik fosfatlara ( $\text{Pi}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  veya  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) veya düşük molekül ağırlıklı fosfor bileşiklerine dönüşmesi gerekmektedir (Paul & Clark 1996).

Toprakta bulunan bitki köklerinde simbiyotik olarak yaşayan kök fungusları (mikorhiza) ve pek çok bakteri başta olmak üzere bir çok mikroorganizma çözünemez durumunda bulunan inorganik fosfatı metabolik işlevleri sonucu çözünebilir hale getirebilmektedir. Özellikle *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* ve *Burkholderia* cinsine bağlı olan bu bakterilerin ürettikleri organik asitler yardımı ile inorganik fosfatı, fosfataz enzimleri yardımıyla da organik fosfatı çözünebilir hale getirebilme yeteneğinde oldukları bilinmektedir (Rodriguez & Fraga 1999). Son yıllarda yapılan çalışmalar bu bakterilerin büyük bir kısmının bitkinin kök ve yakın çevresinde (rizosfer) bulunduğu, aynı zamanda indol asetik asit ve antibiyotik gibi metabolitler ürettiğine ve bu nedenle de bitki gelişimini teşvik etmesinin yanısıra bitki hastalıklarına karşı da biyokontrol ajanı olarak kullanıldığına dikkati çekmektedir (Vassilev et al. 2006).

Dünyada 200'den fazla bitki türünde görülen *Verticillium* Solgunluk hastalığı *Verticillium dahliae* (Kleb.) adı verilen toprak kaynaklı bir fungus tarafından oluşturulmaktadır. Fungusun toprakta mikrosklerot adı verilen 10-120  $\mu\text{m}$  boyutlarındaki zor koşullara dayanıklı yapıları sayesinde yaşamını sürdürdüğü ve toprakta 10 yılı aşkın bir süre canlı kalabileceği bilinmektedir. Hastalığa duyarlı konukçuların varlığı durumunda mikrosklerotlar kök salgılarıyla çimlenerek kökten bitkiye giriş yapmakta ve odun boruları (xylem) yoluyla ilerleyerek konukçu bitkilerde solgunluk belirtileri oluşturmaktadır (Agrios 1997). Dünyada en tahripkar hastalıklardan biri olan *Verticillium* Solgunluğu'na karşı tek yıllık bitki

türlerinin bazılarında mevcut olan dayanıklı çeşit yetiştiriciliği dışında etkin bir mücadele yöntemi bulunmamaktadır. Hastalık ülkemizde ilk defa 1941 yılında Manisa Kırkağaç'ta pamuklarda saptanmıştır (İyriboz 1941). Ülkemizde yapılan çalışmalar bu hastalığın Türkiye'nin bütün pamuk ekim alanlarında yaygın olduğunu ve önemli ürün kayıplarına sebebiyet verdiğini göstermektedir. Bu hastalık nedeniyle pamukta ürün kayıplarının İzmir, Aydın ve Manisa illerinde % 12 (Sezgin 1985), Adana'da % 0.03, Antalya'da % 4 olduğu (Esentepe 1979), Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde ise hastalığın bölgedeki ortalama yaygınlık oranının % 79.28 ve yakalanma oranının ise % 16.27 olduğu saptanmıştır (Karacaet al. 1971; Sağır et al. 1995). Hastalık son yıllarda özellikle ülkemizin en önemli tarım ürünlerinden biri olan zeytin ağaçlarını da tehdit eder konuma gelmiştir. Ege Üniv. Ziraat Fakültesi ve TARİŞ tarafından ortaklaşa yürütülen bir araştırmada Çanakkale, İzmir, Manisa, Aydın ve Muğla illerinde yetiştirilen zeytinlerde hastalığın yaygınlık oranının %55, yakalanma oranının % 1 olduğu belirlenmiş (Yolageldi et al. 2003), Aydın ilinde hastalık görülen zeytinliklerde ise yakalanma oranının % 9 olduğu rapor edilmiştir (Benlioğlu et al. 2001).

Ülkemizde azot fikse eden ve fosfat çözen bakterilerle ilgili yapılan bir çalışmada azot fikse eden iki *Bacillus* (OSU-140, OSU-142) türünün şeker pancarı ve arpada hiç uygulama yapılmayan kontrole göre % 5.6-11, P çözen bir *Bacillus* (M-13) türünün de % 5.5-7.5 oranında verimi artırdıkları saptanmıştır. İki veya üç bakterinin kombinasyonlu birlikte uygulanması durumunda ise verim artışı % 7.7-12.7 olarak bulunmuştur (Şahin et al. 2004). Akgül & Mirik (2008) fosfat çözünürlüğünü dikkate alarak seçtikleri üç *Bacillus megatorium* izolatını (M1-3, M3-1, H8-8) ayrı ayrı ve kombinasyonlar şeklinde kullanmışlar ve biber fidelerinin köklerini bakteri inokulumuna daldırarak *in-vivo* denemeler yürütmüşlerdir. Çalışmada bakterilerin birlikte uygulanmasının hastalığı önemli derecede azalttığı ve % 36.2-47.7 oranında verim artışına neden olduğu belirtilmiştir.

Dünyada antagonistik bakteri uygulamaları ile *Verticillium* Solgunluğu'nun başarılı şekilde kontrol edilebildiği pek çok örnek vardır (Leben et al. 1987; Safiyazov et al. 1995; Zhengjun et al. 1996; Berg et al. 2001; Tjamos et al. 2004). Ülkemizde de Turhan et al. (1995) patlıcanda *Verticillium* Solgunluğu'na karşı *Chaetomium jodhpurensis* fungal izolatının saksı koşullarında hastalığı % 75-80 oranında azalttığını bildirmişlerdir. Çubukçu & Benlioğlu (2007) ise pamuk bitkilerinden izole edilen endofitik bakterilerin tohum uygulamaları ile pamukta *Verticillium* Solgunluğu'nu önemli düzeyde azalttığını rapor etmişlerdir. Son yıllarda *Verticillium*'a duyarlı ve dayanıklı pamuk çeşitlerinde antagonist floresan *Pseudomonas*'lar ile tohum bakterizasyonu yapılarak yürütülen tarla denemelerinde bakteri uygulamalarının *V. dahliae*'a karşı etkili olduğu ve aynı zamanda verim artışı da sağladığı saptanmıştır (Erdogan & Benlioğlu 2010).

Bu çalışma, pamuk bitkilerinde fosfat çözme yeteneğindeki farklı bakterilerin bitkinin fosfor alımına, bitki gelişmesine ve *Verticillium* Solgunluğu'na neden olan iki farklı *V. dahliae* ırkına karşı etkilerini belirlemek amacıyla ele alınmıştır.

## Materyal ve yöntem

Çalışmada; Aydın ilinde yetiştirilen çeşitli kültür bitkilerinden izole edilmiş beş bakteri izolatu (6k8: *Pseudomonas putida* karnabahar rizosfer, 6ba6: *Pseudomonas fluorescens* brokoli rizosfer, F5: *Burkholderia cepacia* pamuk gövde endofitik, E21: *Pseudomonas* sp. pamuk gövde endofitik, C5: *Bacillus megaterium* pamuk gövde endofitik), Aydın ili pamuk ekim alanlarından izole edilmiş olan iki *Verticillium dahliae* izolatu (VP1A: Yaprak dökmeyen ırk, PYDV6: Yaprak döken ırk) ve Carmen çeşiti pamuk tohumları materyal olarak kullanılmıştır. Bakterilerin fosfat çözümüne ve fosfor alınımına etkisine yönelik yapılan denemelerde; daha önce Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Toprak Bölümünce analizi yapılmış, fosforca düşük (pH 7.56, alınabilir fosfor 3.2 ppm) olduğu bilinen ve tarım arazisi olarak kullanılmayan bir alandan temin edilen toprak kullanılmıştır.

## Bakterilerin *in-vitro* fosfat çözme ve IAA, siderofor, 2,4-DAPG, HCN üretimi

Bu amaçla testlenen bakterilerin inorganik fosfatı çözme yetenekleri Freitas et al. (1997)'de belirtilen yöntemle göre katı besiyerine (glikoz 10 g, Ca(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 4 g, NH<sub>4</sub>Cl 5 g, NaCl 1 g, MgSO<sub>4</sub> 1 g, damıtık su 1000 ml, agar 20 g, pH=7.2) bakterilerin nokta inokulasyonu şeklinde yapılmıştır. Yirmi dört saatlik kültürlerinden steril damıtık su içinde bakteri süspansiyonları (10<sup>8</sup> hücre/ml) hazırlanmış ve 10 µl olacak şekilde üç tekerrürlü olarak katı besiyerine nokta inokulasyonu yapılmıştır. Petriler 25 °C'de 48 saat inkubasyona bırakılmış ve gelişen bakteri kolonilerinin etrafındaki açık zonun çapı ölçülerek kaydedilmiştir. Organik fosfatı çözme testleri Nutrient Agar (Merck) katı besi yerine % 0.5 sodyum fenolfitaleyn trifosfat eklenerek yapılmıştır. Besi yerine bakteri ekimi yukarıda belirtilen nokta inokulasyonu şeklinde yapılmış ve petriler 25 °C de 48 saat inkubasyona bırakılmıştır. Gelişimin ardından petriler ters çevrilerek petri kapaklarına ikişer damla amonyak damlatılmış ve besiyeri içeren petriler kapakların üzerine konmuştur. İki dakika içinde pembemsi kırmızı renk alan koloniler pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Schaad et al. 2001).

Siderofor üretimi Crom Azurol S (CAS) agar besiyeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Schwyn & Neiland 1987). Bunun için 24-48 saatlik taze bakteri kültürleri ile CAS agar besiyeri nokta inokulasyonu şeklinde inokule edilmiş ve 25 °C'de beş gün inkubasyon sonunda koloni çevresindeki portakal renkli alan oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Bakterilerin indol asetik asit (IAA) üretimi kantitatif olarak Patten & Glick (2002) tarafından tanımlanan kolorimetrik yöntem ile belirlenmiştir. Bakteriler L-triptofan içeren Dworkin Foster (DF) mineral besiyerinde geliştirilmiş ve Salkowski ayırıcı kullanılarak renk değişimi spektrofotometrede 535 nm de ölçülmüştür. Belirlenen ölçüm değerleri, daha önceden bilinen konsantrasyonlarda IAA içeren çözeltiler ile spektrofotometrede yapılan ölçümler sonrası elde edilen standart kurveye göre hesaplanarak IAA miktarları µg/ml olarak belirlenmiştir.

Bakterilerin antibiyotik üretiminin saptanması 2.4 Diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG) üretiminden sorumlu *phlD* geninin spesifik primer çifti (B2BF: 5'-ACCCACCGCAGCATCGTTTATGAGC-3', BPR4: 5'-CCGCCGGTATGGAAGATGAAAAAGTC-3') kullanılarak PCR ile amplifikasyonu yoluyla belirlenmiştir (McSpadden Gardener et al. 2001). Steril damıtık suda hazırlanan bakteri süspansiyonu 13 dakika kaynatılmış, hemen ardından buza alınmış ve daha sonra 13,000 rpm'de +4 °C'de iki dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvıdan alınan 2 µl PCR testlerinde kalıp DNA olarak kullanılmıştır (Benlioğlu et al. 1998). PCR 0.2 ml'lik tüplerde 20 µl PCR karışımı kullanılarak Eppendorf® Personnel thermal cyclerde, 94 °C de 3 dk, 30 x (94 °C de 10 sn, 60 °C de 15 sn ve 72 °C de 15 sn) ve 72 °C'de 5 dk son döngü koşullarında gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri % 1.5 agaroz jel elektroforezde yürütülmüş ve jel etidium bromür ile boyandıktan sonra UV ışık altında incelenmiş ve 629 baz çiftlik bant varlığı pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Bakterilerin zehirli uçucu bileşik olan hidrojen siyanid (HCN) oluşturma yetenekleri Bakker & Schippers (1987)'in önerdiği yöntemle yapılmıştır. Bunun için bakteriler; içinde 5 ml sıvı besi yeri (King B + % 0.44 glisin) bulunan tüplerde, 150 devir/dakika çalkalama kültür olacak şekilde, 20 °C'de 4 gün boyunca inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyona bırakılmadan önce tüplerin kapaklarına besi yerine değmeyecek ve hava almayacak şekilde, pikrik asit solusyonu emdirilmiş (% 2 sodyum karbonat, % 0.5 pikrik asit) 10 mm genişliğinde 100 mm uzunluğundaki filtre kağıdı şeritleri tutturulmuştur. İnkubasyon sonrası filtre kağıtlarının renginin portakal renginden kahverengine dönmesi pozitif sonuç olarak kayıt edilmiştir.

### **Bakterilerin bitki gelişimine ve fosfor alınımına etkileri**

Bu denemelerde kullanılan Carmen çeşiti pamuk tohumlarına % 1 NaOCl ile yüzey dezenfeksiyonu yapılmış ve üç defa steril 0.05 M fosfat tamponu ile (pH 7.4) durulandıktan sonra tohumlar bakteri ile kaplanmıştır. Tohum bakterizasyonu Quadt-Hallmann et al. (1997) tarafından belirtilen yöntemle göre 20 pamuk tohumuna 100 mg bakteri gelecek şekilde ve % 1 karboksil metil selüloz içinde yapılmıştır. Bakteriler 25 °C'de 48 saat süreyle triptik soya sıvı besiyerinde çalkalanarak geliştirilmiş, daha sonra 10,000 rpm'de beş dakika santrifüj edilmiş ve pellet miktarı belirlenerek % 1'lik karboksil metil selüloz içinde süspansiyon edilmiştir. Pamuk tohumları bu süspansiyon içinde karıştırılmış ve steril kabin içinde 12 saat süreyle kurutulduktan sonra saksı denemelerinde kullanılmıştır. Kontrol olarak kullanılan pamuk tohumları sadece % 1 karboksil metil selüloz ile kaplanmıştır.

Daha önce analizi yapılmış fosforca fakir olduğu (3.2 ppm) saptanan toprağa 30 ppm fosfor içerecek şekilde çözülemes formdaki trikalsiyum fosfat ilave edilmiş ve 10 cm çaplı plastik saksılara her birinde 300'er ml toprak olacak şekilde dağıtılmıştır. Benzer şekilde pozitif kontrol olarak fosforca fakir toprağa 30 ppm fosfor olacak şekilde alınabilir formdaki K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ilave edilmiş ve saksılara dağıtılmıştır. Bu denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre, çözülemes formda fosfat içeren toprakta 5 bakteri uygulaması ve hiç bakteri uygulanmamış

kontrol (negatif kontrol) ile çözülebilir formda fosfat içeren toprakta hiç bakteri uygulanmamış kontrol (pozitif kontrol) olmak üzere 7 karakterli ve 3 tekerrürlü olarak, 25 °C ye ayarlı 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık ışık periyodundaki iklim odasında yürütülmüştür.

Bitki çıkışından sonra bitkilere besin maddesi gereksiniminin karşılanması için değerlendirme yapılıncaya kadar haftada bir olmak üzere makro ve mikro besin elementleri içeren Hoagland solusyonu ile (Hoagland & Arnon 1950) gübreleme yapılmıştır. Bakteri uygulaması yapılmış ve bakteri uygulaması yapılmamış (negatif kontrol) karakterlerin gübrenmesinde fosfor içermeyen solüsyon kullanılırken; pozitif kontrole ait karakterin gübrenmesinde 30 ppm olacak şekilde fosfor içeren ( $K_2HPO_4$  ilave edilmiş) Hoagland solusyonu kullanılmıştır.

Değerlendirme için bitkiler ekimden yedi hafta sonra 4-6 yapraklı olduğu devrede saksılardan dikkatlice çıkarılmış, kökleri çeşme suyu ile yıkanmış ve suyu iyice süzöldükten sonra kese kağıtlarına konarak 65°C'de iki gün süreyle kurutulmuştur. Kurutulan bitkilerdeki mevcut fosforun saptanması Lott et al. (1956)'da belirtilen vanadomolibdofosforik sarı renk yöntemine göre kolorimetrik olarak yapılmıştır. Örnekler havanda ezilerek toz haline getirilmiş, 500 mg alınarak porselen klozelere konulmuş ve 450 °C'de iki saat yakılmıştır. Fırından çıkarılan kül haline gelmiş bitki örneklerine 10 ml 1 N HCl ilave edilmiş ve filtreden geçirilerek süzölmüştür. Örneklerden 5 ml alınarak 25 ml'lik erlenlere konulmuş ve üzerine 2 ml Barton çözeltisi (30 ml amonyum molibdat, 30ml % 0.25 amonyum beta-vanadat) ilave edilmiştir. İki saat beklendikten sonra spektrofotometrede 430 nm'de ölçüm yapılmış ve absorbans değerleri kaydedilmiştir. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen fosfor miktarlarının belirlenmesi için 100 ppm fosfor stok çözeltisinden (0.439 g/L  $K_2HPO_4$ ) 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 ppm'lik standart seriler hazırlanmıştır. Bu seriler yukarıda belirtilen ve bitki örneklerine uygulanan işlemlerden geçirilmiş ve absorbans değerleri spektrofotometrede okunmuştur. Hesaplamalarda; sulandırma ve standartlara göre saptanan kurve faktörü dikkate alınarak her örnekteki yüzde fosfor oranları belirlenmiştir.

### **Bakterilerin *Verticillium solgunluğu*'na etkileri**

Bakterilerin *Verticillium Solgunluğu*'na olan etkilerinin araştırıldığı denemeler; iki farklı inokulasyon yöntemine göre, iki farklı patojen izolat ile, beş karakter, bir kontrol ve dört tekerrürlü olacak şekilde, iklim odasında saksılarda yürütülmüştür. Bunun için pamuk tohumları yukarıda anlatıldığı gibi testlenecek bakteriler ile ayrı ayrı kaplanmış, ayrıca bakteri uygulaması yapılmayan bir de kontrol karakteri bırakılmıştır. Pamuk tohumları 300 ml steril toprak karışımı (1:1:1 toprak:kum:torf) bulunan saksılara ekilmiş ve bitkilere altı gerçek yapraklı olduğu devrede inokulasyon yapılmıştır. İnokulasyon steril damıtık su içine hazırlanan *V. dahliae* (VP1A ve PYDV6) spor süspansiyonu ( $4 \times 10^6$  spor/ml) ile, her bitkiye 5 µl olacak şekilde, steril şırınga yardımıyla, gövde enjeksiyonu şeklinde yapılmıştır (Erdogan & Benlioglu 2010). İnokule edilen bitkiler 11 gün sonra incelenmiş ve

hastalık belirtileri kloroz, nekroz, solgunluk ve yaprak dökümü dikkate alınarak 0-4 skalasına (0=sağlıklı bitki veya yaprak, 1=% 1-33, 2=% 34-66, 3=% 67-99, 4=ölü bitki veya dökülmüş yaprak) göre değerlendirilmiştir (Bejarano-Alcazar et al. 1995). Sayım için her bitkide kotiledon ve en üstteki yeni gelişen 2-3 yaprak hariç tüm yapraklar skalaya göre değerlendirilmiş ve toplam skala değeri incelenen yaprak sayısına bölünerek o bitki için indeks değeri bulunmuştur.

İkinci inokulasyon yönteminde bakteri ile kaplanan pamuk tohumları mikrosklerot içeren toprağa ekilerek uygulanmıştır. Bunun için patates dekstroz agar besi yerinde 24 °C’de 21 gün boyunca geliştirilen *V. dahliae* kültürleri yaklaşık 200 ml steril damıtık su içinde üç petri içeriği, üç dakika süreyle, yüksek devirde blender yardımıyla parçalanmış ardından sırasıyla 110 ve 32 mikrometrelik eleklerden geçirilmiştir. Otuziki mikrometrelik elekte toplanan sklerotlardan 1 g toprağa 10 mikrosklerot gelecek şekilde süspansiyon oluşturulmuş ve denemelerde kullanılacak toprağa el spreyi ile püskürtülerek karıştırılmıştır (Bejarano-Alcázar et al. 1995). Bu şekilde inokule edilen toprak 500 ml’lik saksılara 375 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra her saksıya 125 ml inokulum içermeyen steril toprak ilave edilmiştir. Saksılara tohum kaplaması şeklinde bakteri uygulaması yapılan pamuk tohumları ekilmiş, ayrıca bakteri uygulaması yapılmayan bir karakter de denemeye eklenmiştir. Denemeler yine yukarıda belirtilen koşullarda iklim odasında tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Bitkilerde tohum ekiminden itibaren 7, 8, 9 ve 10. haftalarda yukarıda belirtilen 0-4 skalasına göre her bitki yaprağı ayrı ayrı değerlendirilerek hastalık indeksi ve yüzde hastalık değerleri saptanmıştır. Yapılan 4 sayım sonrasında haftalık veriler dikkate alınarak her tekerrür için hastalık baskısı altındaki alan (AUDPC) değeri aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır (Campbell & Madden 1990).

$$AUDPC = \sum_{i=1}^n [(R_{i+1} + R_i) / 2] * [t_{i+1} - t_i]$$

$R_i$ : Sayım yapılan günde hastalık yüzdesi

$t_i$ : İlk sayım zamanı

$n$ : Toplam değerlendirme sayısı

Her iki denemede de uygulamaların etkililiği (%) Abbott formülü yardımı ile kontroldaki indeks ve AUDPC değerlerine göre hesaplanmıştır (Karman 1971). Denemelerde elde edilen verilere JMP 5.01 istatistik programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi yapılmış ve ortalamalar asgari önemli fark testi (LSD) ile karşılaştırılmıştır.

## Bulgular

### Bakterilerin fosfat çözme yeteneklerinin *in-vitro*'da saptanması

Denemede kullanılan 5 bakteri izolatının katı besiyerinde inorganik ve organik fosfatı çözme özellikleri Çizelge 1’de verilmiştir. Çizelge 1 incelendiğinde C5

(*Bacillus megaterium*) izolatu haricindeki tüm bakterilerin inorganik fosfatı çözme özelliğinde olduğu, buna karşın C5 izolatının organik fosfatı en iyi şekilde parçaladığı görülmüştür. 6ba6 (*Pseudomonas fluorescens*) ve E21 (*Pseudomonas* sp.) izolatları diğerlerine göre inorganik fosfatı çözme açısından en etkili izolatlar olarak belirlenmiş, bu bakterilerin aynı zamanda organik fosfatı da çözme yeteneğinde oldukları görülmüştür. F5 (*Burkholderia cepacia*) ve 6k8 (*Pseudomonas putida*) izolatları organik fosfatı parçalayamazken, inorganik fosfatı çözdüğü saptanmıştır. Bunlara ek olarak izolatların indol asetik asit, siderofor, 2,4 DAPG (Şekil 1) ve HCN oluşturma yetenekleri Çizelge 1'de verilmiştir.

**Çizelge 1.** Bakteri izolatlarının sekonder metabolit üretimi ve fosfat çözme yeteneği

**Table 1.** Phosphate-solubilizing activity and secondary metabolite production of bacterial strains

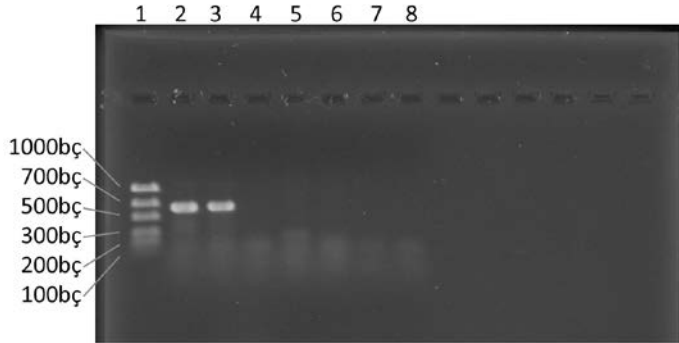
Bakteriler	İnorganik P çözme (mm) <sup>1</sup>	Organik P çözme <sup>2</sup>	IAA µg/ml	Siderofor (mm) <sup>3</sup>	2,4 DAPG <sup>4</sup>	HCN
F5	10.3 b	-	0.1	16.5	-	-
6k8	10.0 b	-	2.1	-	-	-
C5	0.0 c	+++	1.4	-	-	-
6ba6	15.3 a	++	0.7	23.0	+	+
E21	13.3 a	+	1.4	-	-	+

<sup>1</sup>açık renkli zon çapı (3 tekrerrüt ortalamasıdır, aynı harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki olarak fark yoktur (LSD testi P<0.05))

<sup>2</sup>koloni renk değişimi - negatif, + açık pembe (düşük), ++ kırmızı (orta), +++ koyu kırmızı (yüksek aktivite)

<sup>3</sup>koloni etrafında oluşan portakal renkli zon çapı

<sup>4</sup>2,4-DAPG antibiyotiği üretiminden sorumlu *phlD* geninin varlığı



**Şekil 1.** Bakteri izolatlarından ekstrakte edilen kalıp genomik DNA'ların *phlD* genine özgü B2BF/BPR4 primer çifti ile çoğaltılması sonucu oluşan PCR ürünlerinin etidium bromür ile boyanmış agarozel fotoğrafı (Sıra 1, 1Kb marker-Fermentas; Sıra 2, 3k9 [*Pseudomonas fluorescens*, pozitif kontrol]; 3, 6ba6; 4, 6k8; 5, F5; 6, E21; 7, C5 ve 8, damıtık su).

**Figure 1.** Photograph of an ethidium bromide stained agarose gel containing PCR products amplified with B2BF/BPR4 primer pairs specific for *phlD* gene from template genomic DNA isolated from bacterial strains (Lane 1, 1Kb marker-Fermentas;



Lane 2, 3k9 [*Pseudomonas fluorescens* as positive control]; 3, 6ba6; 4, 6k8; 5, F5; 6, E21; 7, C5 and 8, distilled water).

### Bakterilerin bitki gelişimine ve fosfor alınımına etkileri

Bakteri uygulamalarının bitki gelişimine ve fosfor alınımına etkileri Çizelge 2’de verilmiştir. Çizelgeden görüleceği gibi en iyi gelişme ve yüksek fosfor içeriği alınabilir formda fosfor verilen pozitif kontrol bitkilerinde görülmüştür. Veriler istatistiki olarak değerlendirildiğinde fosfat çözme özelliğinde olan F5 ve 6ba6 bakteri uygulamaları istatistiki olarak önemli düzeyde fosfor alınımı artırmış ve sırasıyla bitkide % 47.9, % 23.1 oranlarında kuru ağırlık artışı sağlamıştır. Diğer bakteri uygulamaları negatif kontrol ile aynı grupta yer almış ve bitki kuru ağırlığı ve fosfor içeriği açısından önemli bir farklılık oluşturmamıştır.

**Çizelge 2.** Tohuma bakteri uygulamalarının pamuk bitkisi gelişimine ve bu bitkilerdefosfor alınımına etkisi

**Table 2.** The effect of seed bacterization on cotton plant growth and phosphore uptake

Uygulamalar	Bitki kuru ağırlığı (g) <sup>1</sup>	Bitkide yüzde fosfor <sup>1</sup>	Bitkide toplam fosfor miktarı (mg) <sup>1</sup>
F5	4.41 b	0.053 bc	2.34 b
6ba6	3.67 bc	0.056 b	2.06 b
E21	3.00 c	0.052 bc	1.56 c
6k8	2.94 c	0.049 c	1.44 c
C5	2.92 c	0.051 bc	1.49 c
Kontrol (-)	2.98 c	0.053 bc	1.58 c
Kontrol (+)	5.68 a	0.083 a	4.71 a

<sup>1</sup>3 tekrerrür ortalamasıdır, her sütunda aynı harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki olarak fark yoktur (LSD testi P<0.05).

### Bakterilerin *Verticillium solgunluğu*’na etkileri

Tohumları fosfat çözme yetenekleri bilinen beş bakteri izolatu ile kaplanmış Carmen çeşiti pamuk bitkilerinde, iki farklı *V. dahliae* ırkı kullanılarak, iki farklı yöntem ile inokulasyonu sonrası elde edilen hastalık indeks değerleri ve bakteri uygulamalarının yüzde etkileri Çizelge 3 ve 4’te verilmiştir.

Çizelge 3’teki veriler VP1A (yaprak dökme) izolatu açısından değerlendirildiğinde E21 bakteri izolatının bakteri uygulaması yapılmamış kontrole göre % 68.4 oranında istatistiksel olarak hastalığa en etkili izolat olduğu bulunmuştur. Bu izolatı F5 % 38.9 etki oranı ile izlemiştir. C5, 6ba6 ve 6k8 uygulamalarının etkileri ise istatistiksel anlamda kontrole göre farklı çıkmamıştır. Yaprak dökme *V. dahliae* izolatına karşı ümitvar sonuç veren bakteri uygulamalarının çok daha virulent olduğu bilinen PYDV6 (yaprak dökme) izolatına karşı gövde inokulasyon yönteminde saptanan hastalık indeksi değerleri kontrol ile aynı grupta yer almış ve etkisiz olduğu görülmüştür.

**Çizelge 3.** İki farklı *Verticillium dahliae* ırkı ile (yaprak dökmeyen-VP1A ve yaprak dökken-PYDV6) gövde enjeksiyon yöntemi ile inokule edilmiş pamuk bitkilerinde tohum bakterizasyonu uygulamalarının etkileri

**Table 3.** The effects of seed bacterization on cotton plants inoculated with two different *Verticillium dahliae* strain (non-defoliating-VP1A and defoliating-PYDV6) by means of stem injection.

Uygulamalar	Hastalık indeksi		Hastalık indeksi	
	VP1A <sup>1</sup>	Etki (%)	PYDV6 <sup>1</sup>	Etki (%)
E21	0.87 a	68.4	4.00 a	0.0
6ba6	2.25 bc	18.2	3.06 a	14.1
F5	1.68 ab	38.9	3.56 a	0.0
C5	2.18 bc	20.7	3.06 a	14.1
6k8	2.25 bc	18.2	4.00 a	0.0
Kontrol (+)	2.75 c		3.56 a	

<sup>1</sup>4 tekerrür ortalamasıdır, her sütunda aynı harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki olarak fark yoktur (LSD testi P<0.05)

**Çizelge 4.** İki farklı *Verticillium dahliae* ırkının (yaprak dökmeyen-VP1A ve yaprak dökken-PYDV6) mikrosklerotları varlığında yetiştirilen pamuk bitkilerinde tohum bakterizasyonu uygulamalarının etkileri

**Table 4.** The effects of seed bacterization on cotton plants grown in the presence of microsclerotia of two different *Verticillium dahliae* strain (non-defoliating-VP1A and defoliating-PYDV6)

Uygulamalar	AUDPC		AUDPC	
	VP1A <sup>1</sup>	Etki (%)	PYDV6 <sup>1</sup>	Etki (%)
E21	136.02 a	69.0	336.35 a	51.4
6ba6	149.19 ab	66.0	318.33 a	54.0
F5	220.59 bc	49.7	490.88 b	29.0
C5	285.61 c	34.9	536.74 bc	22.4
6k8	424.43 d	3.3	609.91 cd	11.8
Kontrol (+)	438.79 d		691.81 d	

<sup>1</sup>4 tekerrür ortalamasıdır ve her sütunda aynı harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki olarak fark yoktur (LSD testi P<0.05)

Patojen mikrosklerotlarının toprağa karıştırılarak doğal enfeksiyon koşullarının sağlandığı denemelerde, tohum bakterisi uygulamalarından E21 ve 6ba6 izolatları etkili sonuçları vermiştir (Çizelge 4). Adı geçen izolatlar yaprak dökmeyen VP1A'ya karşı sırasıyla % 69.0 ve 66.0, yaprak dökken PYDV6'ya karşı % 51.4 ve % 54.0 oranında etkili bulunmuştur. Çizelge 4 te görüleceği gibi F5 ve C5 uygulamaları da VP1A'ya karşı istatistiki olarak farklı bir grup oluşturmuş ve sırasıyla % 49.7 ve 34.9 oranında etki göstermişlerdir. Aynı izolatlar PYDV'e karşı da % 29.0 ve 22.4 oranında etki sağlamışlardır.

## Tartışma

Çalışmalarımızda *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Burkholderia* olmak üzere üç farklı genusa ait rizobakterilerden yararlanılmıştır. Fosfat çözen bakteriler içinde en çok çalışılan genus *Rhizobium* olmakla birlikte özellikle, *Pseudomonas*, *Burkholderia* ve *Bacillus* cinsi bakterilerin de inorganik fosfatı çözme yeteneğinde olduğu bilinmektedir (Kampfer 2007). Söz konusu bakterilerin mineral fosfatı çözmeye yararlandıkları en önemli mekanizma organik asit üretmeleridir. Bu bakterilerden *Pseudomonas*, *Burkholderia* türleri özellikle bol miktarda glukonik asit üreterek fosfatı çözmektedir (Rodrigues & Fraga 1999). Fosfat çözen pek çok bakterinin aynı zamanda kültür bitkisinde gelişmeyi de teşvik ettiği ve PGPR olarak adlandırılan “Bitki gelişimini teşvik eden rizobakteriler” içinde yer aldığı (Rodriguez & Fraga 1999; Çakmakçı 2005; Vassilev et al. 2006) ve pek çok kültür bitkisinde verim artışına neden olduğu (Freitas et al. 1997; Rodriguez & Fraga 1999; Şahin et al. 2004) bilinmektedir.

Denemelerimizde inorganik fosfatı çözme yeteneğine sahip F5 kodlu *Burkholderia cepacia* ve 6ba6 kodlu *P. fluorescens* bakterisi uygulamaları pamuk bitkisinde kuru ağırlık artışı yanısıra bitkide fosfor alımına da önemli düzeyde katkı sağlamıştır. Sundara et al. (2002) Hindistan’da fosfat çözebilen *Bacillus megatherium* var *phosphaticum* bakterisi ile yapmış olduğu tarla denemelerinde şeker pancarı ve şeker kamışında verim artışı sağladığı ve bitkide fosfor alımına katkı sağlayarak fosforlu gübre kullanımında % 25 oranında tasarruf sağladığını bildirmiştir.

Çalışmalarımızda inorganik ve organik fosfat çözebilen 6ba6 ve E21 bakterileri bitkinin fosfor alımına katkı sağlaması ve bitki gelişimini teşvik etmelerinin yanısıra pamukta *V. dahliae*’nın yaprak dökme ve dökmeyen patotiplerine karşı hastalığı % 50-60 oranında baskı altında tutmuştur. Söz konusu bakterilerin etki mekanizmaları ile ilgili özellikleri dikkate alındığında 6ba6 kodlu *P. fluorescens*’in fosfat çözme özelliğinin yanısıra IAA, siderofor ile HCN metabolitlerini ürettiği ve 2,4-DAPG antibiyotiği oluşturduğu saptanmıştır (Çizelge 1). E21 kodlu *Pseudomonas* sp. ise fosfat çözme özelliğine ilaveten IAA ve HCN ürettiği belirlenmiştir.

Fosfat çözen bakterilerde IAA ve siderofor üretimi en sık rastlanan biyokontrol mekanizmalarından biridir (Vassilev et al. 2006). Özellikle IAA glutatyon S transferaz ile birlikte bitki dayanıklılığı ile ilgili reaksiyonlarda rol oynamakta (Hahn & Strittmatter 1994; Droog 1997) ve pek çok fungusun miseloyal gelişim ve spor çimlenmesini engelleyebilmektedir (Brown & Hamilton 1993). HCN sitokrom oksidaz yolunu bloke ederek etki eden ve pikomolar düzeylerde tüm aerobik mikroorganizmalara son derece toksik olan bir maddedir. Bu maddenin floresan *Pseudomonas*’lar tarafından salgılanarak pek çok kök patojenini kontrol etmede rol oynadığı bilinmektedir (Pal & McSpadden Gardener 2006). Son yıllarda Hindistan’da yapılan bir çalışmada çeltik ve muz üretim alanlarından toplanan 443 floresan *Pseudomonas* kök bakterisinden 80 tanesinin inorganik fosfatı çözme

yeteneğinde olduğu, bunların tümünün siderofor oluşturduğu, % 49'unun IAA, % 41'inin antibiyotik, % 25'inin de HCN ürettiği bildirilmiştir (Naik et al. 2008).

Çalışmalarımızda bakterilerin *V. dahliae*'a *in-vivo* etkinlikleri iki farklı inokulasyon yöntemi ile testlenmiştir. Bunlardan birincisi antagonist bakteri ile patojenin karşılaşmadığı gövde enjeksiyonu şeklinde patojenin doğrudan bitkiye verilmesiyle yapılmıştır. Gövde enjeksiyon yönteminde yaprak dökmeyen ırka karşı sadece E21 (*Pseudomonas* sp.) uygulamasından %68 oranında bir etkinlik elde edilirken yaprak döken ırka karşı bakteri uygulamalarının hiç birinden olumlu sonuç alınmamıştır (Çizelge 3). *V. dahliae*'nin yaprak döken ırkının daha virüent olduğu ve gövde enjeksiyonu yapılan pamuk bitkilerinin 5-8 gün içinde tamamen çöktüğü (Tzeng & De Vay 1985), eşit inokulum koşullarında tarlada daha erken enfeksiyonlara neden olduğu ve hastalığın çok süratle ilerlediği (Bejarano-Alcazar et al. 1995), pamukta yaprak dökmeyene oranla çok daha yüksek verim kayıplarına neden olduğu (Frietbertshouser & DeVay 1982) bildirilmiştir.

Toprağa mikrosklerot bulaştırarak yürütülen denemelerde E21 ve 6ba6 izolatları ile *V. dahliae*'nin hem yaprak döken hem de yaprak dökmeyen patotipine karşı etkili sonuçlar alınmıştır (Çizelge 4). Doğal enfeksiyon koşullarına uygun olan bu yöntemde toprağın suni olarak konidi veya mikrosklerot ile bulaştırıldığı pek çok denemede *Verticillium* Solgunluğu'na karşı bakteri uygulamalarının olumlu sonuçlar aldığı bilinmektedir (Leben et al. 1987; Berg et al. 2001; Mercado-Blanco et al. 2004; Tjamos et al. 2004; Malandraki et al. 2008; Uppal et al. 2008). Son yıllarda ülkemizde çeşitli yabancıot ve pamuk bitkilerinin rizosferinden izole edilen floresan *Pseudomonas*'lar ile *V. dahliae*'nin yaprak dökmeyen patotipi ile doğal olarak bulaşık olduğu bilinen tarlalarda yapılan denemelerde tohum bakterizasyonu sonrası *Verticillium*'a duyarlı ve dayanıklı çeşitlerde hastalığın kontrol altına alındığı bildirilmiştir (Erdogan & Benlioglu 2010). Ege bölgesi pamuk ekim alanlarında *V. dahliae*'nin yaprak döken patotipinin varlığı da bilinmektedir (Göre 2007).

Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar, dünyada etkin bir mücadelesi bulunmayan bu hastalığa karşı yapılacak olan biyolojik mücadele çalışmalarına ışık tutacaktır. Ayrıca organik pamuk üretiminde dünyada önemli bir yeri olan ülkemizde organik pamuk yetiştiriciliğinde hastalığa karşı alternatif bir mücadele yöntemi olacağı gibi, bakterilerin fosfat çözme özellikleri nedeniyle de suni gübreleme ile giderek artan çevre kirliliğinin önlenmesine katkıda bulunabilecektir. Ancak bu bakterilerin tek başına veya karışım şeklinde tarla koşullarında farklı pamuk çeşitleri ile denemelerinin de yapılması pratikte kullanımı açısından gerekli görülmektedir.

## Kaynaklar

- Agrios G.N. 1997. Plant Pathology. *Academik Press*. Florida, USA, 635 pp.  
 Akgül D.S. & M. Mirik 2008. Biocontrol of *Phytophthora capsici* on pepper plants by *Bacillus megatarium* strains. *Journal of Plant Pathology*, 90 (1): 29-34.

- Bakker A.W. & B. Schippers 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield Reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth-stimulation. *Soil Biology and Biochemistry*, 19 (4): 451-457.
- Bejarano-Alcázar J., M. Melero-Vara, M.A. Blanco-López & R.M. Jiménez-Díaz 1995. Influence of inoculum density of defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* on epidemics of Verticillium wilt of cotton in southern Spain. *Phytopathology*, 85: 1474–1481.
- Benlioğlu S., H. Ulusal & M. Demirbaş 2001. Aydın ilinde zeytin ağaçlarında Verticillium Solgunluğu. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi, 3-8 Eylül 2001, Tekirdağ, 307-316.
- Benlioğlu K., S.H. De Boer & L. Ward 1998. Sensitive detection of the Blackleg pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* by PCR. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 27: 9-17.
- Berg G., A. Fritze, N. Roskot & K. Smalla 2001. Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. *Journal of Applied Microbiology*, 156: 75–82.
- Brown A.E. & J.T.G. Hamilton 1993. Indole-3-ethanol produced by *Zygorrhynchusmoelleri*, and indole-3-acetic acid analogue with antifungal activity. *Mycological Research*, 96: 71–74.
- Campbell C.L. & L.V. Madden 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. *Wiley-Interscience*, 532 pp.
- Çakmakçı R. 2005. Bitki Gelişiminde Fosfat Çözücü Bakterilerin Önemi. *Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19 (33): 93-108.
- Çubukçu N. & K. Benlioğlu 2007. Biological control of Verticillium wilt of cotton by endophytic bacteria, Working Group “Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens”, “Fundamental and Practical Approaches to Increase Biocontrol Efficacy”. In: Elad, Yigal, Ongena, Marc, Höfte, Monica, Haïssam Jijakli, M. (Eds.), Proceedings of the Meeting at Spa (Belgium), 6–10 September 2006, 30 (6–2): 371–375.
- Droog F. 1997 Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. *Journal of Plant Growth Regulation*, 16: 95–107.
- Erdogan O. & K. Benlioğlu 2010. Biological control of Verticillium wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions, *Biological Control*, 53: 39 - 45.
- Esentepe M. 1979. Adana ve Antalya İllerinde Pamuklarda Görülen Solgunluk Hastalığının Etmeni, Yayılışı, Kesafeti ve Zarar Derecesi ile Ekolojisi Üzerinde Araştırmalar. Bornova Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Araştırma Eserleri Serisi No:32, Bornova/İzmir, 47 s.
- Freitas J.R., M.R. Banerjee & J.J. Germida 1997. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 24: 358-364.
- Friebertshauer G.E. & J.E. DeVay 1982. Differential effects of the defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* upon the growth and development of *Gossypium hirsutum*. *Phytopathology*, 72: 872-877.
- Göre M.E. 2007. Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium dahliae* isolates from the Aegean region of Turkey. *Phytoparasitica*, 35 (3): 222–231.
- Hahn K. & G. Strittmatter 1994. Pathogen-defence gene prp1-1 from potato encodes an auxin-res. *European Journal of Biochemistry*, 226: 619–626.

- Hoagland D.R. & D.I. Arnon 1950. The Water-culture Method for Growing Plants without Soil, California Agricultural Experiment Station Circular 371. The College of Agriculture. University of California, Berkeley, CA, USA.
- İyriboz N. 1941. Mahsul hastalıkları. No:1, Ziraat Vekaleti Neşriyatı, Ankara, 237 s.
- Kampfer P. 2007. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization.” Eds. E Velázquez & C Rodríguez-Barrueco. *Developments in Plant and Soil Sciences*, 102: 101-106.
- Karaca İ., A. Karcılıoğlu & S. Ceylan 1971. Wilt diseases of cotton in the Ege Region of Turkey. *The journal Turkish Phytopathology*, İzmir. 1 (1): 4-11.
- Karman M. 1971. Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler, Denemelerin Kuruluşu ve Değerlendirilme Esasları. T.C. Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü Yayınları, 279 s.
- Leben S.D., J.A. Wadi & G.D. Easton 1987. Effects of *Pseudomonas fluorescens* on potato plant growth and control of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 77: 1592-1595.
- Lott W.L., J.P. Nery, J.R. Gallo & Medcaff J.C. 1956. Leaf Analysis Technique in Coffee Research IBEC. Research Institute, 9: 21-24.
- Malandraki I., S.E. Tjamos, I.S. Pantelides & E. J. Paplomatas 2008. Thermal inactivation of compost suppressiveness implicates possible biological factors in disease management. *Biological Control*, 44: 180-187.
- McSpaddenGardener B.B., D.V. Mavrodi, L.S. Thomashow & D.M. Weller 2001. A rapid polymerase chain reaction-based assay characterizing rhizosphere population of 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing bacteria. *Phytopathology*, 91: 44-54.
- Mercado-Blanco J., D. Rodriguez-Jurado, A. Hervas & R.M. Jimenez-Diaz 2004. Suppression of Verticillium wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* sp., *Biological Control*, 30: 474-486.
- Naik P.R, G. Raman, K.B. Narayanan & N. Sakthivel 2008. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC Microbiology*, 8: 1-14.
- Pal K.K. & B. McSpadden Gardener 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Patten C.L. & B.R. Glick 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 3795-3801.
- Paul E.A. & F.E. Clark 1996. Soil Microbiology and Biochemistry, San Diego: Academic Press, 340 pp.
- Quadt-Hallmann A., J. Hallmann & J.W. Kloepper 1997. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 43 (3): 254-259.
- Rodriguez H. & R. Fraga 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17: 319-333.
- Safiyazov J.S., R.N. Mannanov & R.K. Sattarova 1995, The use of bacterial antagonists for the control of cotton diseases. *Field Crops Research*, 43 (1): 51-54.
- Sağır A., F. Tatlı & B. Gürkan 1995. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde pamuk ekim alanlarında görülen hastalıklar üzerine çalışmalar. GAP Bölgesi Bitki Koruma Sorunları ve Çözüm Önerileri Sempozyumu, 27-29 Nisan1995, Şanlıurfa.

- Schaad N.W., J.B. Jones & W. Chun 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Third Edition). American Phytopathological Society, St. Paul. Minnesota, 373 pp.
- Schwyn B & J.B. Neilands 1987. Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160 (1): 47-56.
- Sezgin E. 1985. Pamuk solgunluk hastalığı ile savaşta kültürel işlemlerin önemi. Bornova Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü, Yıllık, 3: 23-31.
- Sundara B., V. Natarajan & K. Hari 2002. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research*, 77: 43-49.
- Şahin F., R. Çakmakçı & F. Kantar 2004. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N<sub>2</sub>-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant and Soil*, 265: 123-129.
- Tjamos E.C., D.I. Tsitsigiannis, S.E. Tjamos, P. Antoniou & P. Katinakis 2004. Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarised soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 35-44.
- Turhan G., L.Y. Gökova & T. Hayat 1995. *Chaetomium jodhpurensis*'nin Patlıcanda *Verticillium Solgunluğu*'yla Biyolojik Savaşta Etkinliği Üzerinde Araştırmalar. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 26-29 Eylül, 1995, Adana, 87-90.
- Tzeng D.D. & J.E. De Vay 1985. Physiological responses of *Gossypium hirsutum* L. to infection by defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* Kleb. *Physiological Plant Pathology*, 26: 57-72.
- Uppal A.K., A. El Hadrami, L.R. Adam, M. Tenuta & F. Daayf 2008. Biological control of potato wilt under controlled and field conditions using selected bacterial antagonists and plant extracts. *Biological Control*, 44: 90-100.
- Vassilev N., M. Vassileva & I. Nikolaeva 2006. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 137-144.
- Yolageldi L., E. Onoğur & C. Tunç 2003. Present status of *Verticillium* wilt of olive in Western Anatolia and some factors affecting the disease prevalence. *Journal of Turkish Phytopathology*, 32: 31-39.
- Zhengjun X., G. Benkang & W. Aiming 1996. Studies on biocontrol of *Verticillium* wilt of cotton by endophytic and rhizosphere bacteria. In: Wenhua, T., Cook, R. J., and Rovira, A. (eds) *Advances in Biological Control of Plant Diseases*, Beijing, China. Agricultural University Press, 125-127.