

Çilekte Kök ve Taç Çürüklüğü Hastalığı (*Phytophthora cactorum*)'na Karşı Kök Bakterileri ile Biyolojik Mücadele

Ümit ÖZYILMAZ^{*1}, Kemal BENLİOĞLU¹

¹ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, AYDIN

Öz: *Phytophthora* kök ve taç çürüklüğü (*Phytophthora cactorum*) çilek üretimini sınırlayan hastalıklardan bir tanesidir. Bu çalışma hastalık ile mücadelede antagonist bakterilerin kullanılmasını hedeflemektedir. Bu amaçla; çilek, karnabahar, kırmızı lahana, brokoli, lahana, turp, bakla ile yabancı otlardan yabancı turp, darıcan ve çoban çantası bitkilerinin kök bölgesinden toplam 362 adet bakteri izole edilmiştir. Yapılan ikili kültür ve bazı ön eleme testleri ile çalışılan bakteri sayısı 101'e daha sonra da 24 düşürülmüştür. Bu antagonistlerin sahip oldukları etki mekanizmalarını belirlemeye yönelik testlerde; hiç bir izolatin kitinaz, selülaz ve pektinaz aktivitesine sahip olmadığı, 13 izolatin proteaz, 3 izolatin fosfataz aktivitesine sahip olduğu, 20 izolatin inorganik fosfatı çözebildiği saptanmıştır. 19 izolatin HCN, 18 izolatin siderofor, 11 izolatin yüzey aktif madde ve 16 izolatin da 2-4,DAPG ürettiği bulunmuştur. Antagonistlerin IAA üretim kabiliyetlerine bakıldığında 62.4 ve 1.9 µg/ml olarak iki izolatin IAA ürettiği belirlenmiştir. Tüm bakteriler *Pseudomonas* spp. olarak tanımlanmıştır. Sakı denemelerinde 3ss9 ve 6l10 izolatlarının *P. cactorum*'a karşı %50 oranında bir engelleme gösterdiği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Phytophthora, antagonist, kök bakterileri, Pseudomonas

Biological Control of Root and Crown Rot Disease of Strawberry (*Phytophthora cactorum*) with Rhizobacteria

Abstract: *Phytophthora* Root and Crown Rot (*Phytophthora cactorum*) is one of the diseases of strawberry that limit production. This study aims to use antagonistic bacteria against the disease. For this purpose, a total of 362 bacteria were isolated from the rhizosphere of strawberry, cauliflower, red cabbage, broccoli, cabbage, radish, wild radish, broad bean, barnyard grass, and shepherd's purse plants. The number of bacteria studied was reduced to 101 and then to 24 according to dual culture and pre-tests. In tests to determine the mode of actions of these antagonists; out of 24 bacteria, none of the isolates produced chitinase, cellulase, and pectinase, while 13 produced protease, 19 produced HCN, 18 produced siderophore, 11 produced biosurfactant, 16 produced 2-4 DAPG, 2 produced IAA (62.4 ve 1.9 µg/ml). Three antagonists had a phosphatase activity. Twenty had able to solubilize inorganic phosphorus. All bacteria were identified as *Pseudomonas* spp. 3ss9 and 6l10 reduced the disease severity by %50 in pots trials.

Keywords: *Phytophthora*, antagonist, rhizobacteria, *Pseudomonas*

GİRİŞ

Çileğin (*Fragaria × ananassa* Duch.) bitki koruma açısından birçok problemi bulunmaktadır. Bunlar içinde belki de en önemli olanlarından biri toprak kaynaklı patojenlerdir. Bu patojenler *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *Phytophthora cactorum*, *Pythium* spp., *Phoma* spp., *Colletotrichum* spp. ve *Macrophomina phaseolina* olarak belirlenmiştir (Benlioğlu ve ark., 2018; Maas, 1998; De los Santos ve ark., 2003; Golzar ve ark., 2007). Aydın ili Sultanhisar ilçesinde yetiştirilen çileklerde 1997-2000 yılları arasında *Rhizoctonia solani* ve *Phytophthora cactorum*'un öne çıkan patojenler olduğu rapor edilmiştir (Benlioğlu ve ark., 2004).

Toprak patojenlerine ve yabancı otlara karşı kullanılan metil bromürün yasaklanmasının ardından, çilek üretiminde solarizasyon çevre dostu ve iyi bir alternatif olarak öne çıkmıştır (Benlioğlu ve ark., 2005). Gerek fümigasyon gerekse solarizasyon sonunda topraktaki mikroorganizmalar ölmekte ve rekabet ortamı ortadan kalkmaktadır. Bu durumda bazı mikroorganizmaların sayısı diğerlerine göre artmaktadır. Örneğin fümigasyon uygulanmış topraklarda bitki köklerinde toplam fluoresan *Pseudomonas*'ların sayısının arttığı bildirilmiştir (Martin ve Bull, 2002). Farklı

bitkilerde çeşitli patojenlere karşı yapılan biyolojik savaş araştırmalarında *Pseudomonas*'ların iyi birer bakteriyel antagonist ya da bitki gelişimini arttıran bakteri (PGPR) oldukları birçok çalışmada belirtilmiştir (Gamliel ve Katan, 1993; Koch ve ark., 1998; Gulati ve ark., 1999; De La Fuente ve ark., 2000; Berg ve ark., 2000a; Berg ve ark., 2001). Çileğin önemli problemlerinden biri olan *Phytophthora cactorum* dünyanın birçok bölgesinde çilek üretimini etkilemektedir. Fideler yardımıyla farklı lokasyonlara taşınabilen hastalık drenaj ve sulama suları ile kolaylıkla yayılabilmektedir (Eikemo ve ark., 2000; 2003). Kök ve taç çürüklüğüne neden olan hastalık aynı zamanda derimsi meyve çürüklüğüne de sebep olmaktadır (Irzykowska ve ark., 2005).

Sorumlu Yazar: uozyilmaz@adu.edu.tr Bu çalışma ilk yazarın doktora çalışmasının bir bölümüdür. Çalışmanın bir kısmı Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresinde (28-30 Haziran 2011) sunulmuş ve özet metni basılmıştır. Çalışma Tübitak TOVAK-TOGTAG 103 O 146 nolu proje ile desteklenmiştir.

Geliş Tarihi: 1 Şubat 2019

Kabul Tarihi: 25 Haziran 2019

Bu çalışma; *Phytophthora cactorum*'a karşı etkili olabilecek antagonist *Pseudomonas*'ları bazı bitkilerin köklerinden izole etmek, bu antagonistlerin etki mekanizmalarını belirlemek ve gerek *in-vitro* gerekse iklim odası çalışmaları ile antagonizmi ortaya koymak amacıyla yürütülmüştür.

MATERYAL ve YÖNTEM

Antagonist Bakteri İzolasyonu ve Ön Testler

Çalışmada kullanılacak antagonist bakteriler Aydın ili Sultanhisar ilçesinde, 2003 yılı Şubat, Nisan, Kasım ve 2004 yılı Nisan, Ağustos, Eylül aylarında, çilek bitkileri (*Camarosa* ve Sweet Charlie çeşidi) ile aynı yörede çilek ekim alanlarında yetiştirilen Crucifereae familyası sebzeleri karnabahar (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*), kırmızı lahana (*Brassica oleracea* L. var. *rubra*), brokoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*), lahana (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*), turp (*Raphanus* sp.) bitkilerinden, ayrıca bakla (*Vicia faba*) bitkileri ile yabani turp (*Raphanus raphanistrum* L.), darıcan (*Echinochloa crus-galli* L.) ve çoban çantası (*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik.) yabancı otlarının köklerinden izole edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan 11 adet tanısı yapılmış *P. cactorum* çilek izolatu Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü stok kültürlerinden sağlanmıştır. Saksı koşullarında yapılan hastalık etmeni virülenslik belirleme testleri ve biyolojik etkinlik testleri; 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık döngülü, $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 'ye ayarlı iklim odasında, çalışma sırasında bölgede yaygın ekimi yapılan hastalığa orta duyarlılıktaki (Browne ve ark., 2003) *Camarosa* çeşidi frigo fideleri kullanılarak yapılmıştır.

Antagonist bakterilerin bitki köklerinden izolasyonu için 3 g kök örneği 27 ml steril fizyolojik serum (%0.85 NaCl, pH7.0) içinde stomacher (BagMixer*, Interscience, Fransa) ile homojenize edilmiştir (Berg ve ark., 2001). Hazırlanan seyreltme serilerinden King B (King ve ark., 1954) besiyerlerine ekim yapılmış ve 25°C 'de 4 gün gelişme sonunda farklı koloni morfolojisine sahip koloniler saflaştırılmıştır. Ayrıca King B besiyerinde UV ışık altında fluoresans verme durumları kaydedilmiştir. Saflaştırılan her bakteri izolatu *P. cactorum* (P2/01) ile PDA besi yerinde karşılıklı ekilerek, potansiyel antimikrobiyal etkisi olanlar ikili kültürde oluşan engelleme zonu ölçüm yapılmaksızın değerlendirilmesi ile belirlenmiş ve -80°C 'ye yedeklenmiştir.

İkili kültür ön eleme testleri ile sayıları azaltılan antagonist adaylarının detaylı ikili kültür testleri üç tekerrürlü olarak petri kabında Bora ve Özaktan (1998)'nin önerdiği yöntemle ufak eklemeler yapılarak gerçekleştirilmiş ve engelleme zonları ölçülmüştür. Bunun için; PDA besiyerinin (pH 7) merkezinden 25 mm uzaklıktaki 4 farklı noktaya $5 \mu\text{l}$ 10^8 hücre/ml bakteri süspansiyonu damlatılmış ve 24 saat sonra

merkeze 10 mm çaplı *P. cactorum* (P2/01) diski yerleştirilmiştir. Değerlendirme bakteri uygulaması yapılmayan kontrol petrilerindeki miseliyal gelişimin merkezden 25 mm mesafeye ulaşmasıyla birlikte engelleme zonlarının ölçülmesi şeklinde yapılmıştır.

Çalışma kapsamında değerlendirilmeyecek bakteri izolatlarının belirlenmesi için bazı testler yapılmıştır. Bunun için; bitkilerde oluşabilecek bir duyarlılığın belirlenmesi için tütünde aşırı duyarlılık testleri (Klement, 1963), çilek fide dikim uygulaması sırasında çevre sıcaklıklarını tolere edemeyecek izolatların belirlenmesi için 37°C 'de gelişme testleri, ayrıca gram boyama testleri yapılmıştır.

Sekonder Metabolit Üretme Kabiliyetleri

Potansiyel antagonist izolatların *in-vitro*'da bazı sekonder metabolitleri üretme yetenekleri araştırılmıştır. Tüm testler en az üç tekerrürlü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Kitinaz: Kitinaz aktivitesini belirlemek için bakteriler Kitin Agar (CA; 1.62 g Nutrient broth, 0.5 g NaCl, 3.6 g Na_2HPO_4 , 1.8 g KH_2PO_4 , 0.6 g NH_4Cl , 2 g kitin, 0.1 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , 3 nM Thiamin-HCl, 15 g agar, 1 L damıtık su, pH 7.2) besi yerine ekilmiş ve 30°C 'de 5 günlük inkubasyonun sonunda bakterilerin çevresinde oluşan açık alanlar pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir (Berg, 1996; Berg ve ark., 2000b).

Proteaz: Proteaz aktivitesini belirlemek için bakteriler skim milk agar besi yerine (50 ml sterilize edilmiş skim milk, 50 ml 1/5 TSA ve %4 agar) ekilmiştir. 5 günlük 20°C 'de inkubasyonun sonunda koloniler etrafındaki açık alanlar pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir (Krechel ve ark., 2002).

Pektinaz: Pektinaz aktivitesi için pektat agar besiyerinden (4.5 ml 1 N NaOH, 3 ml %10 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 ml %1.5 brothymol blue, 5 g yeast ekstrakt, 1.5 g agar, 15 g sodyum polipektat ve 500 ml su) yararlanılmıştır (Beraha, 1968). 25°C 'de 18 saatlik inkubasyonun ardından bakterilerin bir çukur oluşturarak gelişmesi pozitif reaksiyon olarak kaydedilmiştir.

Selüloz: Selüloz aktivitelerinin belirlenmesi için dört ayrı solüsyondan oluşan besiyeri kullanılmıştır (Andro ve ark., 1984). Her biri ayrı ayrı otoklav edilen solüsyonlardan (Solüsyon A: 0.25 g NaCl, 1.5 g K_2HPO_4 , 2.5 g karboksi metil selüloz, 400 ml damıtık su; Solüsyon B: 3 g Na_2HPO_4 , 0.5 g NH_4Cl , 2.5 g glycerol, 0.5 g yeast ekstrakt, 6.5 g agar 100 ml damıtık su; Solüsyon C: 1 M MgSO_4 ve Solüsyon D: %7.5 v/w CaCl_2) A ve B karıştırıldıktan sonra C ve D solüsyonlarından 1'er ml bu karışımın üzerine eklenmiştir. 25°C 'de 4 gün inkubasyonun sonunda gelişen bakteri kolonilerinin üzerine %0.1 kongo kırmızısı dökülmüş, 20 dk sonra uzaklaştırılmış, 1 M NaCl konulmuş ve 5 dk beklenmiştir. Koloniler etrafındaki sarı alanlar pozitif olarak kaydedilmiştir (Andro ve ark., 1984; Klement ve ark., 1990).

DNAz: Merck DNAz hazır besiyerinden faydalanılan testte 25°C'de 5 günlük inkubasyonun sonunda bakteri kolonilerinin üzerine 1N HCl dökülmüş ve oluşan açık zon pozitif olarak kaydedilmiştir (Jeffries ve ark., 1957). **Fosfataz:** Holt ve diğerlerinin (1994) önerdiği yöntem ile bakterilerin organik fosfatı çözebilme kabiliyetleri test edilmiştir. Hazırlanan besiyeri (8 g nutrient broth, 28 g agar, 1 L damıtık su, %0.05 phenolphthalein phosphate [otoklav sonrası filtre ile sterilize edilmiş]) ekilen bakteriler 25°C'de 2 gün inkubasyona bırakılmıştır. Petriler ters çevrilerek kapagina 100 µl %25 amonyak konulmuş ve besiyerindeki kolonilerin renginin pembe-kırmızıya dönmesi pozitif olarak kaydedilmiştir.

İnorganik fosfatı çözebilme: De Freitas ve ark. (1997)'nin önerdiği yöntemden yararlanılmıştır. Besiyeri (10 g glukoz, 4 g Ca₃(PO₄)₂, 5 g NH₄Cl, 1 g NaCl, 1 g MgSO₄, 20 g agar, 1 L damıtık su pH 7.2) bakteriler 10 µl 10⁸ hücre/ml olacak şekilde damlatılarak ekilmiş ve 25°C'de 7 gün inkubasyona bırakılmıştır. Koloniler etrafında oluşan açık alan pozitif sonuç olarak kaydedilmiş ve zonun çapı ölçülmüştür.

İndol asetik asit üretimi: Bakterilerin indol 3 asetik asit üretme yetenekleri Patten ve Glick (2002)'in önerdiği yöntemden yararlanılarak saptanmıştır. 25°C'de 5 ml Triptik Soya Broth (TSB) sıvı besiyerinde gece boyu geliştirilen bakteriler yine 5 ml TSB sıvı besiyerine buradan alınan 20 µl ile inokule edilmiştir. Aynı şekilde gece boyu inkubasyonun ardından 20 µl olacak şekilde içinde 200 µg/ml L-triptofan bulunan 5 ml Dworkin Foster (DF) tuz minimal besiyeri (4 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 0.2 g MgSO₄.7H₂O, 2 g glukoz, 2 g glukonik asit, 2 g sitrik asit, 2 g (NH₄)₂SO₄, 0.1 ml Solüsyon A, 0.1 ml Solüsyon B, 1 L damıtık su; [Solüsyon A: 10 mg H₃BO₃, 11.19 mg MnSO₄.H₂O, 124.6 mg ZnSO₄.7H₂O, 78.22 mg CuSO₄.5H₂O, 10 mg MoO₃, 100 ml damıtık su; Solüsyon B: 100 mg FeSO₄.7H₂O, 10 ml damıtık su]) (Dworkin ve Foster, 1958) alınmıştır. İki günlük çalkalamalı inkubasyonun ardından 1.5 ml bakteri süspansiyonu 5500 g'de 10 dk santrifüj edilmiş, üst sıvıdan 40 µl alınmış, mikropleyt kuyularına konulmuş, 160 µl Salkowski ayırıcı [150 ml H₂SO₄, 250 ml damıtık su, 7.5 ml 0.5 M FeCl₃.6H₂O; (Gordon ve Weber, 1951)] eklenmiş ve karıştırılmıştır. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 20 dk bekletmenin ardından 535 nm'de spektrofotometrede okunmuş ve hazırlanan IAA standardı (çalışma verileri gösterilmemiştir) ile karşılaştırılarak her bir izolat için IAA miktarları hesaplanmıştır.

Hidrojen siyanid üretimi (HCN): Bakker ve Schippers (1987)'in önerdiği yöntem ile bakterilerin HCN oluşturup oluşturmadıkları belirlenmiştir. Bunun için %0.44 glisin içeren 5 ml King B sıvı besiyeri bakteriyel ekimleri yapılmış, besiyeri değmeyecek şekilde pikrik asit (%2 sodyum karbonat, %0.5 pikrik asit) emdirilmiş filtre kağıtları tüp kapaklarına tutturulmuş ve ağızları sıkıca kapatılmıştır. 4

günlük 20°C'de çalkalamalı inkubasyonun ardından kağıtların portakal renginden kahverengine dönmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Yüzey aktif madde üretimi: Siegmund ve Wagner (1991)'in önerdiği yöntemde belirtilen besiyeri (1 L damıtık su, 20 g glycerol, 0.7 g KH₂PO₄, 0.9 g Na₂HPO₄, 2 g NaNO₃, 0.4 g MgSO₄.7H₂O, 0.1 g CaCl₂.2H₂O, 0.2 g cethyltrimethyl ammonium bromide, 0.005 g methylen blue, 15 g agar ve 2 ml iz element solüsyonu [FeSO₄.7H₂O 2 g, (NH₄)₆Mo₇O₂₄.H₂O 0.6 g, MnSO₄.H₂O 1.5 g ve 1 L damıtık su], toplam besiyerinin pH'sı 6.7) bakteriyel ekimi yapılmıştır. 24 saat 30°C'de gelişen kolonilerin etrafında meydana gelen mavi alan pozitif olarak kaydedilmiş ve çapı ölçülmüştür.

2,4-Diacetylphloroglucinol üretimi: McSpadden Gardener ve ark. (2001)'nin önerdiği yöntemden yararlanılmıştır. Bu yöntem 2,4-DAPG üretiminden sorumlu *phlD* geninin B2BF/BPR4 primer çiftleri kullanılarak (F: ACC CAC CGC AGC ATC GTT TAT GAG C, R: CCG CCG GTA TGG AAG ATG AAA AAG TC) PCR ile amplifiye edilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon toplam 20 µl PCR karışımı olacak şekilde 94°C'de 3 dk başlangıç denatürasyonu, 30 × (94°C'de 10 sn denatürasyon, 60°C'de 15 sn annealing ve 72°C'de 15 sn uzama) ve 72°C'de 5 dk son uzama koşullarında gerçekleştirilmiştir (Eppendorf Mastercycler). Amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi için ürünler %1.5'lik agaroz jelde yürütülmüş, etidyum bromür ile boyanmış ve jel görüntüleme sistemi ile fotoğrafı çekilmiştir. 629 baz çifti (bc) büyüklüğündeki bantların varlığı pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Siderofor Üretimi: Bu testler için Blue CAS besiyeri kullanılmıştır (Schwyn ve Neilands, 1987). Testlerde kullanılan kasamino asit solüsyonu Cox (1994)'e göre demirden arındırılmıştır. Beş günlük 25°C'de inkubasyonun ardından koloniler etrafında oluşan portakal rengi alan pozitif olarak değerlendirilmiş, çapı ölçülerek kaydedilmiştir. Ayrıca, metabolit üretimi test edilen bu bakterilerin yağ asitleri metil ester (FAME) profilleri çıkarılmış ve tanılanmaya çalışılmıştır (Agilent 6890N, Sherlock MIS, TSBA40 kütüphanesi) (Midi, 2006).

***P. cactorum* İzolatlarının Virülensliğinin Belirlenmesi**

P. cactorum izolatlarının virülensliğinin belirlenmesine yönelik test çalışmalarında kullanılmak üzere ilk önce çilek fideleri saksılara dikilerek 3 hafta boyunca taze kök oluşturması sağlanmıştır. Daha sonra bitkiler dikkatlice alınarak ağırlıkları ölçülmüş ve steril yetiştirme harcı ile hazırlanmış %1 (hacim/hacim) inokulumunlu toprağa şaşırtılmıştır (Kurze ve ark., 2001; Martin, 2000). İnokulum, patojenlerin 250 ml buğday kepeği, 250 ml vermiculit, 30 gr soya unu ve 84 ml saf sudan oluşan kepek besiyeri üzerine ekilmesi ve 22°C'de 4 hafta inkube edilmesi şeklinde hazırlanmıştır. Bitkilerin beş hafta yetiştirilmesi sonunda, Kurze ve ark. (2001)'nin önerdiği yöntemde değişiklik

yapılarak hazırlanan 0–3 skalası (0: belirti yok, 1: yaprak uçlarında kuruma ve yaprak sapında kararma ama henüz solgunluk yok, 2: solgun bitki, 3: ölü bitki) kullanılarak değerlendirilmeler yapılmıştır. Daha sonra bitkiler saksılardan dikkatlice sökülüp, topraklarından arındırılmış, tekrar tartılmıştır ve başlangıçtaki ağırlığı ile karşılaştırılarak oransal değişim hesaplanmıştır. Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak yapılmıştır.

Saksı Koşullarında Biyolojik Kontrol Testleri

Bu testlerde; *P. cactorum* izolatlarının virülenslik testi sonucunda en yüksek hastalık skala değeri alan izolatlardan biri olan P5 izolatu kullanılmıştır. Antagonist bakterilerin etkinliğinin değerlendirildiği saksı denemelerinde, bitki hazırlığı ve inokulumlu toprak hazırlığı yukarıda anlatıldığı gibi yapılmıştır. Bitkiler köklendirilip patojen inokule edilmiş toprağa alınırken bitkilerin kökleri 10^9 hücre/ml yoğunluğundaki antagonsit bakteri süspansiyonuna yarım saat süre ile daldırılmıştır. Tesadüf parselleri deneme desenine göre üç tekerrürden oluşan çalışmada değerlendirme şaşırtmadan 5 hafta sonra yukarıda anlatılan skala kullanılarak yapılmış, Towsend-Heuberger formülü ile hastalık oranlarına çevrilmiş ve Abbott formülü ile etki oranları hesaplanmıştır (Karman, 1971).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Bitkilerin kök bölgeleri salgıladıkları maddeler nedeniyle içinde biyolojik savaş ajanlarının da bulunduğu bir mikroorganizma yoğunluğuna sahiptir (Sorensen, 1997). Farklı bitki tür ve çeşitlerinin kök bölgesindeki mikroorganizmaların farklı olduğu da bilinmektedir (Smalla ve ark., 2001). Bu çalışmada değişik bitkilerin kök bölgelerinden toplam 362 adet antagonist adayı elde edilmiştir. Yapılan ikili kültür ön eleme testlerinde 101 izolatin potansiyel antagonist olabileceği belirlenmiştir. İkili kültürde ön inceleme şeklinde değerlendirilen bu 101 bakteri detaylı olarak ikili kültür çalışmalarına alınmış ve etmeni engelleme oranları hesaplanmıştır. Etmene; 35 çilek, 6 bakla, 10 brokoli, 12 karnabahar, 2 kırmızı lahana, 5 lahana, 6 turp, 3 yabancı turp, 3 darıcan ve 6 çoban çantası izolatinin az ya da çok bir engelleme gösterdiği saptanmıştır. Detaylı ikili kültür testlerine göre; toplam 88 adet *P. cactorum*'a etkili antagonist elde edilmiş, bunlardan 37 tanesi %40 ve üzeri bir engelleme göstermiş ve maksimum engelleme %84 (6ba3) olarak belirlenmiştir. Bu antagonistlerden 5 tanesi bütün yapraklarında aşırı duyarlılık belirtisi göstermiş ve diğer bitkilerde de buna benzer hassasiyetin meydana gelebileceği düşüncesiyle elenmiştir. Antagonistlerin hepsi 25°C'de iyi bir gelişim gösterirken 33 tanesi 37°C'de ya hiç gelişmemiş ya da sınırlı bir gelişim sergilemiştir, bu nedenle çalışmada değerlendirilmemiştir. Ayrıca 5 izolat gram pozitif

buldukları için çalışma konusu dışında tutulmuştur. Çalışma dışında tutulan izolatlar ve ikili kültür testlerinde öne çıkan izolatlar değerlendirildiğinde nihai antagonist sayısı 24'e düşürülmüştür (3k9, 3mb12, 3msss12, 3msss5, 3ss9, 3tg13, 3tg8, 4b7, 4k1, 6b2, 6b6, 6ba2, 6ba3, 6ba6, 6k4, 6k8, 6l10, 6l14, 6t14, 7ec11, ka, ke, mbe ve mbj).

Sekonder Metabolit Üretme Kabiliyetleri

Antagonist bakterilerin metabolit üretim yetenekleri; kitinaz, proteaz, pektinaz, selüla, DNAz, fosfataz enzim aktiviteleri ile inorganik fosfatı çözebilme kabiliyetlerinin araştırılması ile gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda indol asetik asit (IAA), hidrojen siyanid (HCN), yüzey aktif madde, 2,4-Diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG) ve siderefor üretme yetenekleri de araştırılmıştır.

Çizelge 1 incelendiğinde; kitinaz ve selüla enzim aktivitesini sadece çalışmalarda kontrol olarak kullanılan HRO-C48 (*Serratia plymuthica*) göstermiştir. Değişen miktarlardaki proteaz aktivitesi 3k9, 3msss12, 3ss9, 4b7, 6ba2, 6ba3, 6ba6, 6l10, 6l14, 7ec11, ke, mbe, mbj ve HRO-C48 izolatlarında gözlenirken pektinaz aktivitesine sahip bir izolat bulunmamıştır. 6l10, 6l14 ve 6t14 izolatlarında DNAz aktivitesi saptanmış ancak HRO-C48 izolata göre daha düşük olduğu görülmüştür. 3k9, 3mb12, 3msss5, 3ss9, 3tg13, 3tg8, 4b7, 4k1, 6b2, 6b6, 6ba3, 6ba6, 6k8, 6l10, 6l14, 6t14, ka, ke, mbe, mbj ve E11 izolatları değişik oranlarda inorganik fosfatı çözebilirken 4b7, 6b2, 6b6 ve HRO-C48 izolatları fosfataz pozitif olarak bulunmuştur.

Antagonist bakterilerin IAA üretim miktarlarının test edildiği denemede spektrofotometrede okunan absorbans değerleri standart seri denkleminde ($r^2=0.97$, veri sunulmamıştır) yerine konulduğunda 6k4 izolatinin 62.4 ve 6k8 izolatinin ise 1.9 µg/ml oranında IAA ürettiği hesaplanmıştır. 3k9, 4b7, 6l10, 6l14, mbj, 3mb12, 3msss12, 3msss5, 3ss9, 3tg8, 4k1, 6b6, 6ba2, 6ba3, 6ba6, 6t14, 7ec11, ke, mbe ve E11 izolatlarının değişik oranlarda HCN ürettiği bulunurken; 6l10, 6ba2, 3ss9, 3k9, 3tg8, 6ba3, 6ba6, 6l14, 6t14, ke, mbj ve E11 izolatlarının yine değişik oranlarda yüzey aktif madde ürettiği saptanmıştır.

2,4-DAPG üretimini saptamak amacıyla yapılan PCR çalışmasında amplifikasyon sonunda *phlD* genine özgü primer çiftlerinin 629 bp büyüklüğünde bant oluşturduğu gözlenmiş ve 3k9, 3mb12, 3msss5, 3ss9, 3tg13, 3tg8, 4b7, 6ba2, 6ba3, 6ba6, 6l10, 6l14, 6t14, ka, ke mbj ile E11 izolatları pozitif olarak bulunmuştur (Şekil 1).

Son olarak izolatların büyük bir kısmının farklı oranlarda siderefor ürettiği belirlenmiştir (6ba3, 6ba6, 6ba2, 3k9, 3mb12, 3msss5, 3ss9, 3tg13, 3tg8, 4b7, 4k1, 6l10, 6l14, 6t14, 7ec11, ka, ke, mbj ve E11). Yapılan yağ asitleri profili analizine göre izolatların tümünün *Pseudomonas* genusunda yer aldığı belirlenmiştir.

Çizelge 1. Çalışmalar için seçilen antagonist bakteriler ve test sonuçları

izolat	Orijin Bitki ¹	KB besiyerin UV ışınma ²	Kitinaz ²	Proteaz ³	Pektinaz ²	Selüloz ²	DNAz ⁴	Fosfataz ⁵	İnorganik fosfatı çözebilme (mm çap)	IAA üretimi (µg/ml)	HCN ⁶	Yüzey aktif madde (mm çap)	2-4 DAPG ⁷	Siderophore (mm çap)	İkili Kültür Engelleme (%)
3k9	Ç	+	-	+	-	-	-	-	9	0	+++	20	+	12	13
3mb12	Ç	+	-	-	-	-	-	-	9	0	++	0	+	16	22
3msss12	Ç	+	-	+++	-	-	-	-	0	0	+	0	-	0	60
3msss5	Ç	+	-	-	-	-	-	-	11	0	+++	0	+	15	62
3ss9	Ç	+	-	+	-	-	-	-	9	0	+++	21	+	15	22
3tg13	Ç	+	-	-	-	-	-	-	13	0	-	0	+	12	66
3tg8	Ç	-	-	-	-	-	-	-	12	0	+	14	+	16	75
4b7	B	+	-	+++	-	-	-	++	9	0	++++	0	+	5	78
4k1	K	+	-	-	-	-	-	-	13	0	+	0	-	6	56
6b2	B	+	-	-	-	-	-	+	13	0	-	0	-	0	45
6b6	B	+	-	-	-	-	-	+	12	0	++	0	-	0	50
6ba2	Ba	+	-	++	-	-	-	-	0	0	+++	22	+	22	72
6ba3	Ba	+	-	+	-	-	-	-	10	0	++	14	+	25	84
6ba6	Ba	+	-	++	-	-	-	-	8	0	++	16	+	23	83
6k4	K	+	-	-	-	-	-	-	0	62.4	-	0	-	0	25
6k8	K	+	-	-	-	-	-	-	10	1.9	-	0	-	0	28
6l10	L	+	-	++	-	-	±	-	11	0	++++	23	+	15	27
6l14	L	+	-	++	-	-	±	-	8	0	++++	19	+	18	23
6t14	T	-	-	-	-	-	±	-	9	0	+	14	+	23	67
7ec11	Ç	+	-	+++	-	-	-	-	0	0	++	0	-	5	60
ka	Ç	+	-	-	-	-	-	-	11	0	-	0	+	15	63
ke	Ç	+	-	+	-	-	-	-	12	0	+++	11	+	14	71
mbe	Ç	+	-	+	-	-	-	-	14	0	++	0	-	0	42
mbj	Ç	+	-	+	-	-	-	-	11	0	++++	14	+	17	56
*HRO-C48	Ko	nt	+	+	-	+	+	+++	0	0	-	0	nt	0	49
*E11	Ko	nt	-	-	-	-	-	-	13	0	+	17	+	16	63
*ECC-133		nt	nt	nt	+	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt

¹ Ç: çilek, B: brokoli, K: karnabahar, Ba: bakla, L: lahana, T: turp, Ko: kolza

² +: pozitif sonuç, -: negatif sonuç

³ Açık zonun çapı 5mm'ye kadar olanlar +, 5-10 mm olanlar ++, 10 mm'den büyük olanlar +++

⁴ +: pozitif sonuç, ±: zayıf pozitif, -: negatif sonuç

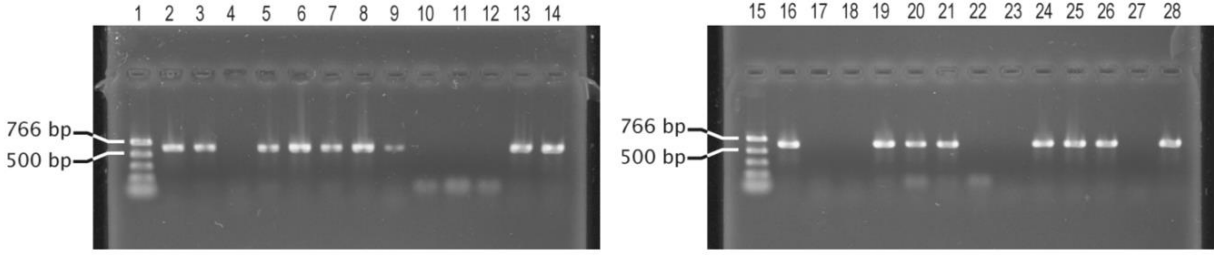
⁵ Oluşan kırmızı rengin şiddetine göre; kırmızı ise +++, açık kırmızı ise ++, hafif pembemsi ise +

⁶ Elde edilen kahverenginin tonuna göre en koyu renk ++++ ve en açık + olmak üzere pozitif sonuç dört sınıfa ayrılmıştır.

⁷ Yürütülen jelde 629 bp büyüklüğünde bant oluşumu +

* Pozitif ve negatif kontroller (HRO-C48: *Serratia plymuthica*, E11: *Pseudomonas fluorescens*, ECC-133: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)

nt: Test edilmedi



Şekil 1. B2BF/BPR4 primer çiftleriyle yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünlerin %1.5 agaroz jelde elektroforez edilip ethidium bromide ile boyanması ile gözlenen 629 bp büyüklüğündeki bantlar. 1 ve 15: Marker (New England Biolabs), 2: 3k9, 3: 3mb12, 4: 3msss12, 5: 3msss5, 6: 3ss9, 7: 3tg13, 8: 3tg8, 9: 4b7, 10: 4k1, 11: 6b2, 12: 6b6, 13: 6ba2, 14: 6ba3, 16: 6ba6, 17: 6k4, 18: 6k8, 19: 6l10, 20: 6l14, 21: 6t14, 22: 7ec11, 23: steril saf su, 24: E11, 25: ka, 26: ke, 27: mbe, 28: mbj

P. cactorum İzolatlarının Virülensliğinin Belirlenmesi

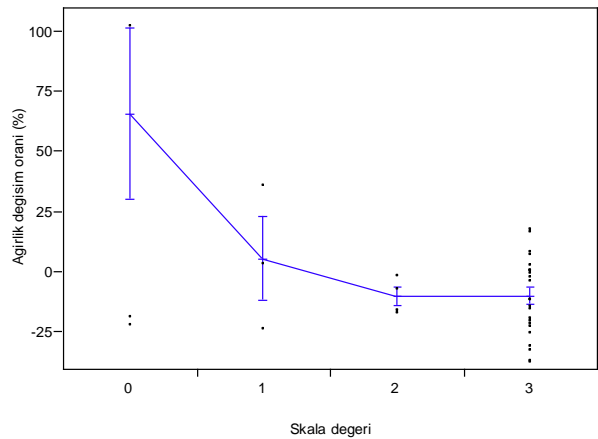
Yapılan hastalık etmeni virülenslik belirleme testleri sonucunda P3, P14, P13, P5 ve P12 *P. cactorum* izolatlarının diğerlerine göre daha virulent olduğu, yaş ağırlık değişimi açısından bakıldığında ise P3, P7, P14, P4, P2/01, P5 ve P13 izolatlarının öne çıktığı görülmektedir (Çizelge 2). Tüm tekerrürlerde her bir skala değerine denk gelen ağırlık değişimlerinin patojen bağımsız olarak ortalaması alındığında, skala değeri ile ağırlık değişim oranı arasında negatif yönde bir korelasyonun olduğu hesaplanmıştır ($R^2 = 0.7573$). Çizelge 2'de verilen grafiğe bakıldığında 2 skala değerine ulaşan bir bitkinin ileriki durumlarda artık daha da ağırlık kaybetmediği görülmektedir.

Saksı Koşullarında Biyolojik Kontrol Testleri

Skala değeri ve ağırlıktaki değişim oranı arasında hesaplanan bu ilişkiden dolayı saksı koşullarında biyolojik

Çizelge 2. Çilek bitkilerinde *Phytophthora cactorum* izolatlarına yapılan virülenslik testi sonucunda beşinci haftada elde edilen skala değerleri ortalamaları ve bitkilerde meydana gelen ağırlık değişim oranları (%) (sol). Skala değeri ile ağırlık değişimi arasındaki ilişki (sağ)

İzolat	Skala değeri(Ort)	Ağırlık yüzde değişim (Ort)
P3	3.00 a	-30.05 a
P14	3.00 a	-17.30 ab
P13	3.00 a	-12.60 abc
P5	3.00 a	-12.62 abc
P12	3.00 a	7.07 cd
P1	2.67 ab	-2.59 bcd
P2/01	2.33 ab	-12.85 abc
P8	2.33 ab	-2.32 bcd
P2	2.33 ab	16.44 d
P7	1.67 ab	-19.31 ab
P4	1.33 b	-13.31 abc
kontrol	0.00 c	123.38 e



Üç tekerrürün ortalamasıdır, aynı sütunda aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur (LSD, $P < 0.05$), skala değerlerine $\sqrt{\text{sakala değeri} + 0.5}$ transformasyonu yapılmıştır

Çizelge 3. Antagonist bakterilerin çilek bitkisini *Phytophthora cactorum*'a karşı koruma durumları

İzolat	Skala Ort ¹	Yüzde Hast. ²	Yüzde Etki ²
kontrol (hastaliksız)	0.00 a	0	
3ss9	0.67 ab	22	50
6l10	0.67 ab	22	50
HRO-C48	1.00 bc	33	25
ka	1.00 bcd	33	25
6b2	1.33 bcde	44	0
6ba6	1.33 bcde	44	0
6k4	1.33 bcde	44	0
3msss5	1.33 bcde	44	0
kontrol (hastalıklı)	1.33 bcde	44	0
E11	1.67 cdef	56	0
3msss12	1.67 cdef	56	0
6b6	1.67 cdef	56	0
6l14	1.67 cdef	56	0
3tg8	1.67 cdef	56	0
6k8	1.67 cdef	56	0
6t14	1.67 cdef	56	0
ke	2.00 def	67	0
4k1	2.00 def	67	0
mbe	2.00 def	67	0
6ba2	2.00 def	67	0
3tg13	2.00 def	67	0
3mb12	2.00 def	67	0
7ec11	2.33 ef	78	0
3k9	2.33 ef	78	0
6ba3	2.33 ef	78	0
mbj	2.67 f	89	0
4b7	2.67f	89	0

¹ Aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur (LSD, P<0.05)

² Yüzde hastalık değerleri Towsend-Heuberger, yüzde etki Abbott formüllerine göre hesaplanmıştır

morfolojisine sahip toplam 362 bakteri izole edilmiştir. Yapılan ikili kültür testleri sonucunda bu sayı ilk önce 101'e ve daha sonra yapılan ek test ve değerlendirmeler ile de 24'e düşürülmüştür. Ön eleme testleri sonucunda seçilen bu 24 bakteri geri kalan testlerin ve saksı denemelerinin hepsinde değerlendirilmiştir.

Biyokontrol çalışmalarına başlamadan önce mevcut *P. cactorum* izolatlarının virülenslik belirleme testleri yapılmıştır. Bu testler sonucunda hastalık skalası ile hastalıktan dolayı yaş ağırlıkta meydana gelen azalma arasında bir bağlantının olduğu ve skala değerlendirmesinin hastalığın ölçülmesinde kullanılabilir olacağı kanısına varılmıştır.

Bakterilerin hastalığa karşı antagonistik etkileri saksı koşullarında değerlendirildiği denemede en yüksek hastalık skala değerine sahip olan izolarlardan biri olan P5 kullanılmıştır. Denemede 3ss9 ve 6l10 izolatlarının etkili olduğu bulunmuş ve ümitvar sonuçlar verdiği görülmüştür.

Ancak bu izolatların ikili kültür test sonuçlarının diğer antagonistlere göre daha az olduğu görülmektedir. Bununla birlikte bazı antagonistlerin (mbj, 4b7) saksı denemelerinde hastalığın şiddetini istatistiki olarak arttırdığı görülmüştür. Bu izolatlar ikili kültür testlerinde iyi birer engelleyici olarak karşımıza çıkmıştır. Biyolojik mücadele araştırmalarında laboratuvar ve doğa çalışmaları arasındaki uyumsuzluk karşılaşılan bir durumdur (Fravel, 1988). Antagonist bakterilerin seçiminde *in-vitro* testlerin *in-vivo* çalışmalar ile desteklenerek sonuca gidilmesi gerektiği görülmüştür. Antagonist arayışı içinde, iklim odası çalışmalarının mevcut antagonist adaylarının hepsine ya da büyük çoğunluğuna uygulanabilmesi ancak koparılmış bitki parçaları veya doku kültürü ile üretilmiş bitkiciklerin devreye sokulması ile mümkün görülmektedir.

Belirli bir hastalığa etkili antagonist bakterinin aynı zamanda farklı patojenlere de etki edebileceği bilinmektedir (Berg ve ark., 2000a; Berg ve ark., 2001; Krechel ve ark., 2002). Çilek üretiminde toprak dezenfeksiyonu yapılmakta ve bu birçok toprak kaynaklı patojeni kontrol edebilmektedir. Ancak günümüzde Aydın ilinde kömür çürüklüğüne neden olan *Macrophomina phaseolina* majör patojen durumuna geçmeye başlamıştır. Çilekte biyolojik mücadele çalışmalarında bu hastalığın da göz önünde bulundurulması ve mevcut izolatların bu etmene karşı da değerlendirilmesi çalışılabilecek konular arasındadır.

Teşekkür

Phytophthora cactorum izolatlarını sağladıkları için Prof. Dr. Seher Benlioğlu ve Prof. Dr. Ayhan Yıldız'a, çalışmada kontrol izolatu olarak kullanılan *Serratia plymuthica* (HRO-C48) ve *Pseudomonas fluorescens* (E11) izolatlarını sağladığı için Prof. Dr. Gabriele Berg'e, yağ asitleri profillerinin çıkarılmasına imkan sağladığı için Prof. Dr. Fikretin Şahin'e ve 1030146 nolu proje ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Andro T, Chambost JP, Kotoujansky A, Cattano J, Bertheau Y, Barras F, Van Gijsegem F, Coleno A (1984) Mutants of *Erwinia chrysantemi* Defective in Secretion of Pectinase and Cellulase. J. Bacterial. 160:119-1203.
- Bakker AW, Schippers B (1987) Microbial Cyanide Production in the Rhizosphere in Relation to Potato Yield Reduction and *Pseudomonas* spp-mediated Plant Growth-stimulation. Soil Biol. Biochem. 19(4): 451-457.
- Benlioğlu S, Yıldız A, Döken T (2004) Studies to Determine the Causal Agents of Soilborne Fungal Diseases of Strawberries in Aydın and to Control them by Soil Disinfestation. J. Phytopathology 152(18): 509-513
- Benlioğlu S, Boz Ö, Yıldız A, Kaşkavalcı G, Benlioğlu K (2005) Alternative Soil Solarization Treatments For the Control of Soil-borne Diseases and Weed of Strawberry in the Western Anatolia of Turkey. J. Phytopathology 153: 423-430.

- Benlioğlu S, Dinler H, Yıldız A, Özyılmaz Ü, Benlioğlu K (2018) Türkiye'de Çilek Fidelerinde Karşılaşılan Sorunlar. Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 15(1): 121-126.
- Beraha L (1968) A Rapid Method for the Preparation of A Semi-Solid Agar Medium for Detection of Pectolytic Enzyme Activity in *Erwinia Carotovora*. Plant Disease Reporter 52(2) February 1968.
- Berg G (1996) Rhizobacteria of Oilseed Rape Antagonistic to *Verticillium dahliae* var. longisporum STRAK. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 103(1): 20-30.
- Berg G, Kurze S, Buchner A, Wellington EM, Smalla K (2000a) Successful Strategy for the Selection of New Strawberry-associated Rhizobacteria Antagonistic to *Verticillium* Wilt. Canadian-Journal-of-Microbiology. 46(12): 1128-1137.
- Berg G, Frankowski J, Bahl H (2000b) Interactions Between *Serratia plymuthica* and the Soil Borne Pathogen *Verticillium longisporum*. In: Tjamos EC, Rowe C, Heale JB, Fravel DR (eds.), Advances in *Verticillium* Research and Disease Management. St Paul, MN, USA: American Phytopathological Society Press, 269-273.
- Berg G, Fritze A, Roskot N, Smalla K (2001) Evaluation of Potential Biocontrol Rhizobacteria from Different Host Plants of *Verticillium dahliae* Kleb. Journal of Applied Microbiology 91(6):963-971.
- Bora T, Özaktan H (1998) Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Savaş. Prizma Matbaası, İzmir, 205 s.
- Browne G, Becherer H, McLaughlin S, Fennimore S, Duniway J, Martin F, Ajwa H, Winterbottom C, Guerrero L (2003) Integrated Management of Phytophthora on Strawberry without Methyl Bromide. Proceedings of Methyl Bromide Alternatives Conference.
- Cox CD (1994) Deferration of Laboratory Media and Assays for Ferric and Ferrous Ions. Methods Enzymol. 235: 315-372.
- De La Fuente L, Bajsa N, Bagnasco P, Quagliotto L, Thomashow L, Arias A (2000) Antibiotic Production by Biocontrol *Pseudomonas fluorescens* Isolated from Forage Legume Rhizosphere. Proceedings of the 5th International PGPR Workshop, Córdoba, Argentina.
- De los Santos B, Barrau C, Romero F (2003) Strawberry Fungal Disease. Food, Agriculture & Environment Vol. 1 (3&4): 129-132.
- De Freitas JR, Banerjee MR, Germida JJ (1997) Phosphate-solubilizing Rhizobacteria Enhance the Growth and Yield But Not Phosphorus Uptake of Canola (*Brassica napus* L.). Biol Fertil Soils 24:358-364.
- Dworkin M., Foster J (1958) Experiment with Some Microorganisms which Utilize Ethane and Hydrogen. J. Bacteriol 75: 592-601.
- Eikemo H, Stensvand A, Tronsmo AM (2000) Evaluation of Methods of Screening Strawberry Cultivars for Resistance to Crown Rot Caused by *Phytophthora cactorum*. Ann. appl. Biol. 137: 237-244.
- Eikemo H, Stensvand A, Tronsmo AM (2003) Induced Resistance as a Possible Means to Control Diseases of Strawberry Caused by *Phytophthora* spp. Plant Dis. 87: 345-350.
- Fravel DR (1988) Role of Antibiosis in the Biocontrol of Plant Diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 26: 75-91.
- Gamliel A, Katan J (1993) Suppression of Major and Minor Pathogens by Fluorescent *Pseudomonads* in Solarized and Nonsolarized Soils. Phytopathology 83: 68-75.
- Golzar H, Phillips D, Mack S (2007) Occurrence of Strawberry Root and Crown Rot in Western Australia. Australian Plant Disease Notes 2:145-147.
- Gordon SA, Weber RP (1951) Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid. Plant Physiology 26: 192-195.
- Gulati MK, Koch E, Zeller W, Sisler HD (1999) Isolation and Identification of Antifungal Metabolites Produced by Fluorescent *Pseudomonas*, Antagonist of Red Core Disease of Strawberry. Modern Fungicides and Antifungal Compounds II. 12th International Reinhardtsbrunn Symposium, Friedrichroda, Thuringia, Germany, pp 437-444.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth edition. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Irzykowska L, Irzykowski W, Jarosz A, Golebniak B (2005) Association of *Phytophthora citricola* with Leather Rot Disease of Strawberry. J. Phytopathology 153: 680-685.
- Jeffries CD, Holtmann DF, Guse DG (1957) Rapid Method for Determining the Activity of Microorganisms on Nucleic Acid. J. Bact., 73: 590-591.
- 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, 279s.
- King EO, Ward MK, Raney DE (1954) Two Simple Media for the Demonstration of Pyocyanin and Fluorescein. J. Lab. Clin. Med. 44: 301-307.
- Klement Z (1963) Rapid Detection of the Pathogenicity of Phytopathogenic *Pseudomonas*. Nature, 199: 299-300p.
- Klement Z, Rudolph K, Sands DC (1990) Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapest, 568p.
- Koch E, Kempf HJ, Hessenmüller A (1998) Characterization of the Biocontrol Activity and Evaluation of Potential Plant Growth-promoting Properties of Selected Rhizobacteria. Journal of Plant Disease and Protection, 105(6): 567-580.
- Krechel A, Faupel A, Hallmann J, Ulrich A, Berg G (2002) Potato-associated Bacteria and their Antagonistic Potential towards Plant-pathogenic Fungi and the Plant-parasitic Nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. Can. J. Microbiol. 48: 772-786.
- Kurze S, Bahl H, Dahl R, Berg G (2001) Biological Control of Fungal Strawberry Disease by *Serratia plymuthica* HRA-C48. Plant Dis. 85: 529-534.

- Maas JL (1998) Compendium of Strawberry Diseases, Second edition. APS press Minnesota USA, 98p.
- Martin FN (2000) *Rhizoctonia* spp. Recovered from Strawberry Roots in Central Coastal California. *Phytopathology* 90: 345-353.
- Martin FN, Bull CT (2002) Biological Approaches for Control of Root Pathogens on Strawberry. *Phytopathology* 92: 1356-1362.
- McSpadden Gardener BB, Mavrodi DV, Thomashow LS, Weller DM (2001) A Rapid Polymerase Chain Reaction-based Assay Characterizing Rhizosphere Population of 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing Bacteria. *Phytopathology* 91: 44-54.
- Midi (2006) Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids. Microbial Identification System, Technical operating manual. MIDI, Inc., 115 Barksdale Prof. Center, Newark, Delaware.
- Patten CL, Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* Indole acetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology*, 3795-3801.
- Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. *Analytical Biochemistry* 160: 47-56.
- Siegmund I, Wagner F (1991) New Method for Detecting Rhamnolipid Excreted by *Pseudomonas* Species During Growth on Mineral Agar. *Biotechnol. Tech.* 5 (4): 265 – 268.
- Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Roskot N, Heuer H, Berg G (2001) Bulk and Rhizosphere Soil Bacterial Communities Studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Plant Dependent Enrichment and Seasonal Shifts. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4742-4751.
- Sorensen J (1997) The Rhizosphere as a Habitat for Soil Microorganisms. In: Van Elsas JD, Trevors JT, Wellington EMH (eds.), *Modern Soil Microbiology*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 21-45.
- Vestberg M, Kukkonen S, Saari K, Parikka P, Huttunen J, Tainio L, Devos N, Weekers F, Kevers C, Thonart P, Lemoine MC, Cordiwe C, Alabouvette C, Gianinazzi S (2004) Microbial Inoculation for Improving the Growth and Health of Micropropagated Strawberry. *Applied Soil Ecology* 27: 243-258.

