

**T. C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZBK-YL-2007-001**

**PAMUKLARDA VERTİCİLLİUM SOLGUNLUĞU
(*Verticillium dahliae* Kleb.)' NA KARŞI ENDOFİTİK
BAKTERİLERLE BİYOLOJİK MÜCADELE
OLANAKLARI**

HAZIRLAYAN: Nalan Çubukcu

DANIŞMAN: Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU

AYDIN- 2007

**T. C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZBK-YL-2007-001**

**PAMUKLARDA VERTİCİLLİUM SOLGUNLUĞU
(*Verticillium dahliae* Kleb.)' NA KARŞI ENDOFİTİK
BAKTERİLERLE BİYOLOJİK MÜCADELE
OLANAKLARI**

HAZIRLAYAN: Nalan Çubukcu

DANIŞMAN: Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU

AYDIN- 2007

*** Bu Yüksek Lisans Tezi Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından (ZRF- 05030 no' lu proje) ve Tübitak (TOVAK- 1040181 no' lu proje) desteğiyle yürütülmüştür.**

ÖZ

Aydın İlinin pamuk yetiştirilen alanlarından 2004-2005 yılları arasında yetiştirme mevsimi boyunca farklı pamuk çeşitlerinden ve yabancı otlardan endofitik bakteriler izole edilmiştir. İzole edilen 280 izolat arasından 12 adet bakteriyel ırk patates dekstroz agar (PDA) besiyerinde *Verticillium dahliae*'nın gelişimine karşı önemli ölçüde engelleme göstermiştir. 12 adet antagonist ırk *in-vitro*'da uçucu organik bileşik üretimi ve fosfat çözünürlüğü açısından test edilmiştir. Antagonist ırklar ayrıca *in-vivo*'da *Verticillium* Solgunluğunun kontrolü ve tohum kaplamasıyla da *in-vitro*'da gelişimi teşvik açısından değerlendirilmiştir. İki adet Fluorasans *Pseudomonas* ve bir adet *Bacillus* cinsi bakteri pamuk bitkilerinde *Verticillium* Solgunluğunu önemli ölçüde azaltmıştır.

Anahtar sözcükler: Aydın, *Verticillium dahliae*, uçucu bileşikler

ABSTRACT

Endophytic bacteria were isolated from the roots of various cotton cultivars and weeds in the cotton fields of Aydın province during 2004-2005 growing season. 12 bacterial strains out of 280 isolates showed significant inhibition zone towards *Verticillium dahliae* Kleb. on potato dextrose agar (PDA) plate. Twelve antagonistic strains were tested for their *in vitro* ability of producing volatile organic compounds, and phosphate solubilization. The antagonistic strains were further evaluated for the capacity to control *Verticillium* wilt *in vivo* and to induce growth promotion *in vitro* by bacterial seed treatment. Two fluorescent *Pseudomonas* and one *Bacillus* strains significantly reduced the incidence of *Verticillium* wilt on cotton plants.

Key words: Aydın, *Verticillium dahliae*, volatile chemicals

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZ.....	i
ABSTRACT	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÇİZELGELER LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
KISALTMALAR ve ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
3. MATERYAL ve METOT	16
3.1. Örneklerin Toplanması	16
3.2. İzolasyon Çalışmaları	16
3.2.1. Fungus izolasyonu ve patojenisite testleri	16
3.2.2. Endofitik bakteri izolasyonu	18
3.3. <i>In-vitro</i> Etkinlik Denemeleri ve Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi.....	19
3.4. <i>In-vivo</i> Etkinlik Denemeleri	20
3.5. Etki Mekanizmalarına Yönelik Testler	21
3.5.1. Kolonizasyon.....	21
3.5.2. Fosfatı çözme.....	22
3.5.3. Uçucu bileşik üretimi.....	22
- <i>Verticillium dahliae</i> 'a etkileri.....	22
-Çimlenmeye etkileri.....	23
3.6. Biyokimyasal Testler	24
3.6.1. Gram boyama.....	24
3.6.2. Potasyum hidroksit testi	25
3.6.3. Floresan pigment oluşumu.....	25
3.6.4. Oksidaz testi	25
3.6.5. Isı testi.....	25
3.6.6. Levan oluşumu	26
3.6.7. Patateste yumuşak çürüklük testi.....	26
3.6.8. Nitratı indirgeme testi	26
3.6.9. Oksidatif fermentatif (O/F) reaksiyon testi	27
3.6.10. Arginine hidrolizi testi	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	28
4.1. İzolasyon Çalışmaları	28
4.1.1. <i>V. dahliae</i> izolatları	28
4.1.2. Endofitik bakteri izolatları	30

4.2. <i>In- vitro</i> Etkinlik Denemeleri	32
4.3. <i>In- vivo</i> Etkinlik Denemeleri	33
4.4. Etki Mekanizmalarına Yönelik Testler	38
4.4.1. Kolonizasyon	38
4.4.2. Fosfat çözünürlüğü	39
4.4.3. Uçucu bileşik üretimi	40
- <i>Verticillium dahliae</i> 'a etkileri	40
-Çimlenmeye etkileri	41
4.5. Biyokimyasal Testler	43
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	49
ÖZET	50
SUMMARY	51
TEŞEKKÜR	52
KAYNAKLAR	53
EKLER	vii
ÖZGEÇMİŞ	59

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
No	No
1. Dünya'da 1997-2003 yılları arasındaki pamuk (kütlü) ekim alanları, üretim ve lif verim değerleri.....	2
2. Dünyada bazı pamuk üreticisi ülkelerde pamuk ekim alanları, üretim ve kütlü verim değerleri.....	2
3. 2000-2005 yılları arasında Aydın İli pamuk ekim alanı, üretim miktarı ve kütlü verimi	4
4. Aydın İli ve ilçelerine ait 2005 yılı pamuk ekim alanı, kütlü ve lif üretimi, kütlü verimi.....	4
5. İzolasyon çalışmalarından sonra elde edilen <i>Verticillium</i> spp. izolatlarının ve Sayar 314 çeşiti pamuk bitkilerinde oluşturduğu hastalık şiddeti.....	28
6. Survey çalışmaları sonucunda elde edilen bakteri izolatları.....	31
7. <i>In-vitro</i> 'da <i>V. dahliae</i> 'nin gelişimine karşı antagonistik bakterilerin etkileri	32
8. Antagonist bakteri izolatları ile kaplanmış Sayar 314 çeşidi pamuk tohumlarından oluşan bitkilerde <i>V.dahliae</i> inokulasyonu sonrası hastalık şiddetleri.....	33
9. Beş Antagonist bakteri izolatları ile kaplanmış Sayar 314 çeşidi pamuk tohumlarından oluşan bitkilerin 2 <i>V. dahliae</i> izolatı ile inokulasyonu sonrası yüzde hastalık şiddeti.....	35
10. Mutant antagonist bakteri izolatlarının pamuk fidelerindeki dağılımı.....	38
11. Mutant ve Normal Antagonist bakteri izolatları ile inokule edilen 2 farklı pamuk çeşitinin <i>V. dahliae</i> 'a (PYDV-6) reaksiyonları.....	39
12. Antagonist bakteri izolatlarının fosfat çözebilme yetenekleri	39
13. Antagonistik bakterilerin <i>in-vitro</i> 'da <i>V. dahliae</i> 'nin gelişimine karşı oluşturdukları engelleme zonları	40
14. Antagonist bakteri izolatlarının Sayar 314 pamuk tohumlarının kökçük uzunluğuna olan etkileri.....	41
15. Pamuk bitkilerinden izole edilen endofitik bakterilerin gram boyama ve bazı biyokimyasal test sonuçları.....	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No		Sayfa No
1.	Ülkemizde bölgelere göre 2003 yılı pamuk üretimi.....	3
2.	Aydın İli İncirliova ilçesinde <i>V. dahliae</i> ile enfekteli bir horozibiği (<i>Amaranthus</i> sp.) bitkisinin görünümü	29
3.	Aydın İli İncirliova ilçesinde <i>Verticillium</i> Solgunluğu belirtileri gösteren bir pamuk bitkisi.....	29
4.	Antagonist bakteri izolatları ile kaplanmış Sayar 314 çeşidi pamuk tohumlarından oluşan bitkilerde <i>V.dahliae</i> inokulasyonu sonrası yüzde hastalık şiddetleri	34
5.	Tohumlarına antagonist bakteri uygulanmış pamuk bitkilerinin <i>V. dahliae</i> (Vp1a) inokulasyonundan 1 gün sonraki görünümü.....	36
6.	Tohumlarına antagonist bakteri uygulanmış pamuk bitkilerinin <i>V. dahliae</i> (Vp1a) inokulasyonundan 7 gün sonraki görünümü	36
7.	Tohumlarına antagonist bakteri uygulanmış pamuk bitkilerinin <i>V. dahliae</i> (Vp1a) inokulasyonundan 14 gün sonraki görünümü	37
8.	Tohumlarına antagonist bakteri uygulanmış pamuk bitkilerinin <i>V. dahliae</i> (Vp1a) inokulasyonundan 21 gün sonraki görünümü.....	37
9.	B4 no'lu endofitik bakterinin bölmeli petride Sayar-314 çeşiti pamuk tohumlarında kökçük uzunluğuna etkisi.....	42
10.	C5 no'lu endofitik bakterinin bölmersiz petride Sayar-314 çeşiti pamuk tohumlarında kökçük uzunluğuna etkisi.....	42
11.	Antagonistik bakterilerin biyokimyasal tanılama testleri ve sonuçları. [1- O/F testi a) pozitif, pozitif b) pozitif, negatif, c) pozitif, pozitif d) inokule edilmemiş. 2-Nitrat redüksiyonu testi a) negatif b) pozitif c) inokule edilmemiş d) pozitif e)pozitif. 3-Arginine dehidrolizi testi a) inokule edilmemiş b)pozitif c) negatif d) pozitif].....	44

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

cfu	Colony forming unit
D	Yaprak dökken
ISR	Uyarılmış sistemik dayanıklılık
NA	Nutrient Agar
ND	Yaprak dökmeyen
N.P.A.Enst.	Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsü
NSA	Nutrient Sükroz Agar
PAF	Pseudomonas F Agar
PDA	Patates Dekstroz Agar
SA	Su Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UV	Ultraviyole ışık

1. GİRİŞ

Malvales takımına bağlı Malveceae familyasının *Gossypium* cinsine ait olan pamuk (Anonymous, 2006) insanlar tarafından tarımının yapılma tarihi çok eski dönemlere rastlayan ve lifi işlenen bir bitkidir. Pamuğun eski dünyadaki beşiği olan Hindistan'da pamuk tarımının en az 5000 yıl önce yapıldığı, kumaş dokumasında kullanılmasının da M.Ö. 3000 yılına rastladığı arkeolojik kazılarda belirlenmiş ve buradan da I. yüzyılda Anadolu'ya getirildiği bildirilmiştir (Anonymous, 2004a).

Pamuk sıcaklığı seven 32° güney ve 47° kuzey enlemleri arasında kuru ve sulu şartlarda yetiştirilebilen bir bitkidir. Toprak isteği bakımından fazla sorunlu olmamakla beraber süzek ve alüviyal topraklarda yetişmektedir. Toprak asitliği bakımından ise toleranslı olup pH'sı 6,5 – 7,5 olan orta dereceli (tuzsuz) topraklarda iyi yetişmektedir (Anonymous, 2004c).

İnsan yaşamındaki yeri ve faydaları nedeniyle pamuk gerek dünya gerekse Türkiye ekonomisinde önemli bir yere sahiptir. Endüstri bitkileri içinde lif ve yağ bitkilerinin her ikisine de giren pamuk, birçok sanayi kolunun temel ham maddesini karşılayan önemli bir bitkidir. Lifiyle tekstil sanayisinin, çekirdeğinden elde edilen pamuk yağı ile bitkisel yağ sanayinin, kapçık ve küspesiyle yem sanayinin ayrıca lifleriyle selüloz sanayinin hammaddesini oluşturan en önemli tarımsal ürünlerden birisidir. Pamuk doğal oluşu, teri emmesi, ısıtılıp kaynatıldığında diğer liflere göre sağlam kalışı, statik elektriği daha az iletmesi, hava geçirgenliği ve hijyenik özellik taşıma avantajları ile beşeri ihtiyaçların karşılanmasında diğer bitkisel ve sentetik elyaflara göre tercih edilmektedir. Pamuk tohumlarında %20 oranında bulunan çiğit yağı ile bitkisel yağ, lifleri ile selüloz sanayinin hammaddesini teşkil etmekte, kalan aminoasitlerce zengin küspesi ise hayvan beslenmesine katkıda bulunmaktadır. Pamuk bitkisi dünyada soya fasulyesinden sonra ikinci önemli bitkisel yağ kaynağıdır. Dünya pamuk yağı üretimi 3,8-4,3 milyon ton arasında değişirken ülkemizde 130-150 bin ton arasında olup bitkisel yağ ihtiyacımızın %25'ini karşılamaktadır. Pamuk sahip olduğu özellikleri nedeniyle stratejik bir ürün olup uluslararası ticarete yeri büyüktür. Ayrıca ülkemizde de 6 milyon kişinin geçimini sağlamaktadır (Anonymous, 2004a,b,c).

Dünya ve ülkemiz için önemli olan pamuğun 1997-2003 yılları arasında Dünyadaki ekim alanları, üretim ve lif verim değerleri Çizelge 1’de gösterilmiştir.

Çizelge 1. Dünya’da 1997-2003 yılları arasındaki pamuk (kütlü) ekim alanları, üretim ve lif verim değerleri (Anonymous, 2004b)

Yıllar	Ekim alanı (ha)	Üretim (ton)	Lif verimi (kg/da)
1997	33.956.827	54.374.752	160
1998	33.345.648	51.885.163	156
1999	32.611.052	52.884.385	162
2000	31.561.755	53.143.086	168
2001	34.433.546	60.508.684	176
2002	32.281.621	54.165.613	168
2003	32.374.092	56.969.044	176

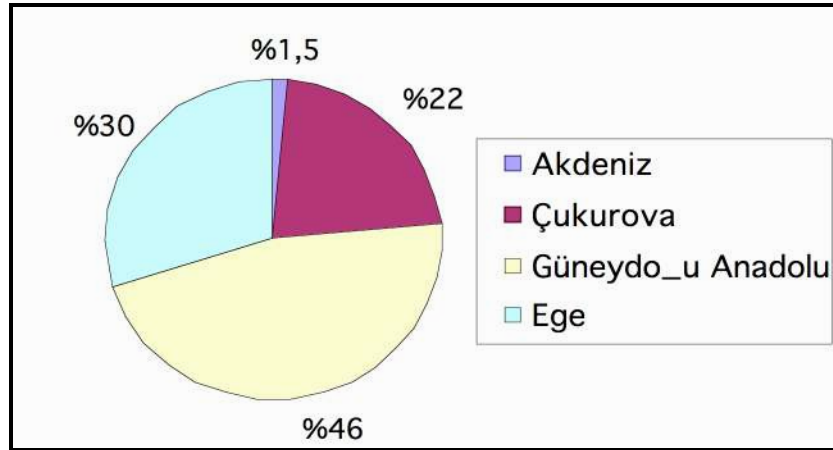
Çizelge 1’de görüldüğü gibi dünyada 1997-2003 yılları arasındaki 7 yıllık veriler değerlendirildiğinde ekim alanlarının 31-34 milyon hektar arasında olduğu, üretimin ise 51-60 milyon arasında değiştiği görülmektedir. Dünya ortalama pamuk lif verimi ise 156-176 kg/da arasında değişmektedir. Dünyada pamuk tarımı yapılan bazı önemli pamuk üreticisi ülkeler Çizelge 2’de verilmiştir.

Çizelge 2. Dünyada bazı pamuk üreticisi ülkelerde pamuk ekim alanları, üretim ve kütlü verim değerleri (Anonymous, 2004b)

Ülkeler	Ekim alanı (ha)	Üretim (ton)	Verim (kg/da)
Çin	4.500.000	15.600.000	347
Amerika	4.879.750	10.100.000	207
Hindistan	8.390.000	6.300.000	75
Pakistan	3.000.000	5.455.000	181
Özbekistan	1.393.000	2.856.000	205
Türkiye	711.000	2.489.000	350
Brezilya	717.160	2.200.143	307
Türkmenistan	750.000	713.700	95
Avustralya	145.000	628.000	433
Yunanistan	365.000	1.300.000	356
Dünya	32.374.092	56.969.044	176

Dünyada pamuk ekimi daha çok Asya kıtasında toplanmıştır. Bunu izleyen kıtalar sırasıyla Amerika ve Afrika'dır. Dünyanın en büyük pamuk üretici ülkesi Çin olup, toplam dünya pamuk üretiminin % 27'sini gerçekleştirmektedir. Dünyanın ikinci pamuk üretici ülkesi ABD'dir. ABD'nin dünya pamuk üretiminden aldığı pay %17'dir. Bu ülkeleri sırasıyla Hindistan, Pakistan ve Özbekistan izlemektedir. Ülkemiz 711.000 ha'lık ekim alanı ile dünya pamuk ekiliş alanlarının %2'sine, 2.489.000 ton'luk üretimi ile de dünya pamuk üretiminin %4'üne sahip olup dünyanın altıncı pamuk üreticisidir. Ülkemizin kütlü verimi 350 kg/da ile dünya verim ortalamasının iki katıdır (Çizelge 2).

Ülkemizin oldukça geniş bir alanı pamuk üretimi bakımından elverişli ekolojik şartlara sahiptir. Özellikle Ege, Güneydoğu Anadolu, Akdeniz Bölgesi ana üretim merkezleridir. Ancak Doğu ve Orta Anadolu'da mikroklima olarak adlandırdığımız 2 ilimizde de pamuk yetişebilmektedir. 2003 yılı pamuk üretiminin %22'si Çukurova, %46,5'i Güneydoğu Anadolu ve %30'u Ege Bölgesi'nde gerçekleşmiştir. Akdeniz Bölgesi ise üretimin sadece %1,5'lik kısmını oluşturmaktadır (Şekil 1) (Anonymous, 2004b).



Şekil 1. Ülkemizde bölgelere göre 2003 yılı pamuk üretimi (Anonymous, 2004b).

Ege Bölgesi'nde pamuk ekim alanı bakımından ilk sırada yer alan Aydın ilinde 2000-2005 yılları arasındaki pamuk ekim alanı, üretim miktarı ve verim değerleri Çizelge 3 ve 4'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 2000-2005 yılları arasında Aydın İli pamuk ekim alanı, üretim miktarı ve kütlü verimi (*)

Yıllar	Ekim Alanı (ha)	Üretim Miktarı (ton)	Verim(kg/da)
2000	76691	249248	325.0
2001	82601	252559	305.7
2002	79463	269147	338.7
2003	77685	267309	344.0
2004	67636	247008	366.2
2005	47695	190123	398.6

* Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Aydın Tarım İl Müdürlüğü Kayıtları, 2000–2005

Çizelge 4. Aydın İli ve ilçelerine ait 2005 yılı pamuk ekim alanı, kütlü ve lif üretimi, kütlü verimi(*)

İlçeler	Ekim Alanı (Ha)	Kütlü Üretimi (Ton)	Lif Üretimi (Ton)	Kütlü Verimi (kg/da)
Merkez	3500	14750	5900	421
Bozdoğan	504	1512	605	300
Buharkent	417	1667	667	399
Çine	2200	8800	3520	400
Didim	2400	9600	3840	400
Germencik	1600	6400	2560	400
İncirliova	2000	6200	2480	310
Karacasu	450	1350	540	300
Karpuzlu	600	2500	1000	416
Koçarlı	5100	17000	6800	333
Köşk	194	582	232	300
Kuşadası	-	-	-	
Kuyucak	1800	7200	2880	400
Nazilli	2500	8500	3485	340
Söke	22000	94600	37840	430
Sultanhisar	430	1462	584	340
Yenipazar	2000	8000	3200	400
TOPLAM	47695	190123	76133	Ort. 398

*Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Aydın Tarım İl Müdürlüğü Kayıtları, 2006

Çizelge 4 incelendiğinde Söke ilçesi 22000 ha’lık ekiliş alanı ve 430.0 kg/da kütlü verimi ile ilk sırada yer almış olup, Aydın İli ortalama kütlü veriminin de üzerinde bir değere sahip olmuştur. Koçarlı ilçesi ise ekim alanı bakımından 2. sırada olup kütlü verimi açısından diğer ilçelere göre daha düşük bir değer kaydetmiştir. 3.

sırada ise 3500 ha'lık ekim alanı ve 421.4 kg/da kütlü verimi ile Aydın Merkez yer almıştır. Kuşadası ilçesinde ise pamuk tarımının yapılmadığı dikkat çekmektedir.

Pek çok kültür bitkisinde olduğu gibi pamukta da hastalık ve zararlılar verim ve kaliteyi etkileyen en önemli unsurlar arasında yer almaktadır. Bunlardan "Verticillium Solgunluğu" hastalığı (*Verticillium dahliae* Kleb.) dünyada pamuk yetiştirilen her yerde görülen pamuk bitkisinin en önemli hastalıkları arasındadır. Hastalık etmeni özellikle ılıman bölgeleri tercih eden (25-27 °C), 200 den fazla konukçusu bulunan, toprak kaynaklı bir fungustur ve kışı mikrosklerot olarak geçirir. Toprakta konukçu bitki olmadan uzun yıllar canlı kalabilen sklerotlar sayesinde etmenin 10 yılı aşkın bir süre canlı kalabileceği ileri sürülmektedir. Kuraklık ve yüksek sıcaklık, konidileri kolaylıkla öldürdüğü için, fungusun yaşamını devam ettirmesinde konidilerin önemli bir rolü bulunmamaktadır (Agrios, 1997).

V. dahliae'nin farklı ırklarının bulunduğu da tespit edilmiştir. Hastalık belirtileri ve şiddeti bu ırklara göre de değişebilmektedir. Schnathorst and Mathre (1966) dünyada ilk defa *V. dahliae* izolatlarının farklı virulenslikte olduğunu ve pamuklarda yaprak dökümü şeklinde belirtilerle ortaya çıkan virulent ırkın "Yaprak Döken" (Defoliating-D), diğerinin ise daha hafif şiddette belirtilere neden olan "Yaprak Dökmeyen" (Nondefoliating-ND) ırk olduğunu Amerika Birleşik Devletleri'nde Kaliforniya'da pamuklarda yapmış olduğu çalışmalarla kanıtlamıştır.

Hastalık etmeninin toprak patojeni olması, toprakta uzun süre canlı kalması ve geniş bir konukçu dizisine sahip olması bu hastalıkla mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Hastalığa karşı ne kimyasal ne de etkin başka bir mücadele olanağı bulunmamaktadır. Hastalığın kontrolünde sağlıklı üretim materyali ve özellikle toprağın bulaşık olmaması çok önemlidir. Bu nedenle toprak dezenfeksiyonu en etkili mücadele yöntemi olarak uygulanabilir ancak yüksek maliyeti nedeniyle pamuk gibi geniş ekim alanlarında üretimi yapılan tarla bitkilerinde ekonomik olmamaktadır. Hastalığın zararını azaltabilmek için dayanıklı çeşit, ekim nöbeti ve bir dizi kültürel önlemlerle birlikte entegre bir mücadele yöntemi önerilmektedir (Agrios, 1997).

Son yıllarda yapılan çalışmalar pek çok organizmanın kültür bitkileri içinde endofitik olarak yaşadığını (Hallmann *et al.*, 1997; McInroy and Kloepper, 1995;

(HongLian *et al.*, 1999), bu endofitlerden bazı bakterilerin Fusarium Solgunluğu ve Verticillium Solgunluğu gibi iletim demeti hastalıklarının kontrolünde alternatif bir biyolojik mücadele yöntemi olabileceğini göstermiştir (Chen *et al.*, 1995; Zheng Jun *et al.*, 1997; Zheng-Qing *et al.*, 1999a). Bu çalışma pamuk bitkilerinden ve pamuk üretim alanlarında görülen yabancı otlardan izole edilen endofitik bakterilerin pamukta Verticillium Solgunluğu'na ve pamuk gelişimine olası etkilerini belirlemek amacıyla ele alınmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Türkiye’de pamuk tarımını etkileyen faktörlerden biri de *Verticillium dahliae* Kleb. fungusunun neden olduğu solgunluk hastalığıdır. Pamuklarda *Verticillium* Solgunluğu ülkemizde ilk kez 1941 yılında Manisa Kırkağaç’ta İyriboz (1941) tarafından saptanmış, ancak etmenin *V. dahliae* Kleb. olduğu Karaca *et al.*, (1971) tarafından bildirilmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, bu hastalığın Türkiye’nin bütün pamuk ekim alanlarında yaygın olduğu ve önemli ürün kayıplarına neden olduğunu göstermektedir. Hastalığa yakalanma oranının İzmir, Aydın ve Manisa illerinde %27 (Uygun ve ark., 1978’e atfen Sezgin, 1985), Adana’da %0.01 (Esentepe, 1979), Güneydoğu Anadolu Bölgesinde %16.27 (Sağır ve ark., 1995), Antalya’da %14 (Esentepe, 1979) olduğu, ürün kaybının ise İzmir, Aydın ve Manisa illerinde %12 (Uygun ve ark., 1978’e atfen Sezgin, 1985), Adana’da %0.03, Antalya’da %4 olduğu bulunmuştur (Esentepe, 1979). Yapılan başka bir çalışmada da, bu hastalığın Türkiye’nin bütün pamuk ekim alanlarında yaygın olduğu ve önemli ürün kayıplarına neden olduğu, Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde bir survey çalışmasında hastalığın bölgedeki ortalama yaygınlık oranının %79.28 ve yakalanma oranının ise %16.27 olduğu saptanmıştır (Karaca *et al.*, 1971; Sağır ve ark., 1995).

Saydam ve ark. (1973), pamuklarda solgunluk etmeni *V. dahliae* fungusu ile inokulasyon metodları üzerine yaptıkları çalışmada yapılacak ıslah çalışmalarında çabuk ve etkili sonuç verecek inokulasyon yöntemini saptamak amacıyla laboratuvar koşullarında 10 farklı inokulasyon yöntemi (köklerin misel süspansiyonuna daldırılması, yulaf unu kültürü, mısır unu kültürü, mısır unu kum kültürü, hipodermik şırınga ile inokulasyon, toprağa içirme ve steril tüp yöntemi, PDA besiyerinde gelişen inokulumun steril toprağa karıştırılması, doğal inokulum ile inokulasyon, inokule edilmiş pamuk tohumları) denemişlerdir. Bunlardan köklerin daldırılması ve benzeri inokulasyon metotlarında oldukça yüksek değerlerde hastalık şiddeti tespit edilmiş ancak bu yöntemlerin şaşırtma sırasında bitkide zararlanmalara neden olduğu için pamuk fidelerinin kök boğazına hipodermik şırınga ile yapılan inokulasyonların en uygun metot olduğu bildirilmiştir.

Pamukta *Verticillium* Solgunluğuna karşı dayanıklı çeşit yetiştiriciliğinin en etkili mücadele yöntemlerinden biri olması nedeniyle ülkemizde bu konuda pek çok

araştırma yapılmıştır. Dolar (1984), Akdeniz Bölgesi pamuklarında görülen solgunluk hastalığına karşı 19 pamuk çeşit ve hattını saksı ve tarla koşullarında denemeye almış ve 19 çeşitten Taşkent 1 çeşidinin en dayanıklı, Acala S.J.1, Aleppo 1, Nazilli 66-100, QF 34/1 ve Coker 310 çeşitlerinin orta derecede duyarlı, bölgenin standart çeşitleri olan Deltapine 15/21, Çukurova 1518, Adana 967-10 ve Sayar 314 çeşitlerinin en duyarlı olduklarını belirlemişlerdir. Ege Bölgesi'nde Karcıoğlu ve ark. (1992) sera ve tarla denemeleri sonucunda 18 pamuk çeşit ve hattı içinde ST 250/1, ST 250/2 ve ST 226/2'nin dayanıklı, Stoneville-506, Stoeville-825 çeşitlerinin duyarlı olduğunu bildirmiştir. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yapılan tarla denemelerinde Taşkent 1, Nazilli 87, Nazilli M 39, Nazilli M503-6, ST 250/1, ST 250/2 Erşan 92 (SAT 32), Maraş 92 (KAT 64) ve Delta Pine 90 çeşitleri tolerant, Sayar 314, Stoneville 453, Stoneville 825, Stoneville 691/32, Stoneville907, Delta Pine 20, Delta Pine 50, Mc Neir 235 ve Aktaş 3 çeşitleri duyarlı bulunmuştur (Sağır ve Tatlı, 1995). Adana'da 11 pamuk çeşidinin *V. dahliae*'a duyarlılıklarının belirlendiği bir araştırmada Erşan 92, Nazilli 84, M 503/6, Nazilli 87, M-39 ve Maraş 92 çeşitleri dayanıklı, Aktaş 3 ve Çukurova 1518 çeşitleri duyarlı bulunmuştur (Çetin ve Ataç 1995). Ege Bölgesi'nde pamuk solgunluk hastalık etmeni *V. dahliae*'nin patotiplerini ve Nazilli 84 pamuk çeşidinin solgunluğa toleransının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada *V. dahliae*'nin SS-4 tipi patotipinin sorumlu olduğunu ve Verticillium Solgunluğu hastalığına karşı tolerant olan Nazilli 84 çeşidinin patojene karşı toleranslığını yitirdiği belirlenmiştir (Onan ve Karcıoğlu,1998).

Ülkemizde pamuklarda Verticillium Solgunluğuna karşı dayanıklı çeşit yetiştiriciliği dışında diğer mücadele yöntemleri konusunda da çalışmalar yapılmıştır. Diyarbakır'da pamuklarda yapılan bir araştırmada damlama sulama yönteminin karık sulama yöntemine göre verimde % 10,80-48,84 arasında artış, solgunluk hastalığında ise % 36,21-53,46 arasında bir azalış kaydedilmiştir (Sağır ve Başbağ, 1998). Uçkan ve ark. (1998) Ege Bölgesi'nde pamuk üretiminde kullanılan 4 adet bitki gelişim düzenleyicisinden Aminofol, Atonik ve Pix'in Verticillium Solgunluğuna etki etmediklerini, Megahix'in ise önerilen doz ve zamanda uygulandığında hastalığı önemli ölçüde gerilettiğini bildirmişlerdir. Onan (1993), Ege Bölgesi'nde toprak solarizasyonun *V. dahliae* etmeninin mikrosklerot canlılığı üzerine etkisini incelemiş ve 30 günlük toprak solarizasyonunun *V. dahliae*'nin canlı kalan mikrosklerot

sayısını büyük oranda azalttığını veya tamamen yok ettiğini tespit etmiştir. Adı geçen araştırmacı bir başka çalışmada 6 haftalık toprak solarizasyonunun topraktaki mikrosklerot populasyonunun ortalama % 97,5 oranında azalmış olduğunu Verticillium Solgunluğuna karşı ise % 93,4 oranında etkili olduğu saptamıştır (Onan ve ark.,1994).

Ülkemizde Verticillium Solgunluğuna karşı biyolojik mücadele çalışmaları ise *in-vitro* ikili kültür testlerine dayalı 2 ön çalışmadan ibarettir. Ulukuş (1988), topraktan izole ettiği *Bacillus* sp. izolatının *in-vitro* koşullarda *V.dahliae*'nin gelişmesini engellediğini, Turhan ve ark. (1995) ise patlıcanda Verticillium Solgunluğuna karşı *Chaetomium jodhpurens* izolatının saksı koşullarında hastalığı %75-80 oranında azalttığını kaydetmişlerdir.

Son yıllarda özellikle iletim demetlerinde solgunluğa neden olan hastalıklara karşı yüzey dezenfeksiyonu uygulanmış bitki dokularından veya bitkinin içinden izole edilen ve bitkiye görünebilir bir zararı olmayan mikroorganizmalar olarak tanımlanan endofitik bakterilerin potansiyel biyokontrol ajanları olabileceği bildirilmiştir (Hallmann *et al.*, 1997). Endofitik bakterilerin iletim demetleri solgunluk hastalıkları ve bitki gelişimini teşvik edici etkileri üzerine yapılan araştırmalar aşağıda özetlenmiştir.

Pseudomonas fluoresces' in M4 ırkının *in-vitro* koşullarda patates bitkisinin gelişimi ve *V. dahliae*' a karşı etkinliğini araştırmak amacıyla yapılan saksı denemelerinde *V. dahliae* ile bulaşık topraklarda *P. fluoresces*' in toz halde patates yumrularına uygulanmasıyla bitkilerin boy, sürgün ve yaş ağırlıklarının artış gösterdiği ayrıca etmenin inokulum yoğunluğunun önemli ölçüde azaldığı kaydedilmiştir. Steril toprakta ise köklerde yoğun bir bakteri kolonizasyonu olmasına rağmen *V. dahliae* ile bulaşık toprağa göre bitki gelişimi açısından önemli bir artış kaydedilmemiştir. Tarla denemelerinde ise *P. fluoresces*'in Verticillium Solgunluğuna veya ürün miktarına etki etmediği saptanmıştır (Leben *et al.*,1987).

Berg *et al.* (1994), *in-vitro* ' da antagonist *Pseudomonas* bakterilerinin çilekte Verticillium Solgunluğu etmeni (*V. dahliae*)'ni kitinaz ve hücre duvarını parçalayan enzimler sayesinde engellediğini belirlemişlerdir.

Musson *et al.* (1995), yapmış oldukları çalışmada 15 adet endofitik bakteri izolatinın pamuk bitkisinin kök ve gövdesindeki dağılımını belirlemek amacıyla; bakterilerin gövde de yarık açılarak bitki içerisine inokule edilmesi, tohumların bakteri süspansiyonuna daldırılması, methylcellulose ile tohum kaplaması, yaprağa süspansiyon olarak uygulama, bakterinin granül halde uygulanması, vakum infiltrasyonu ve köklerin daldırılması şeklinde yöntemler uygulamışlardır. Gövde üzerine veya kökçüklere yarık açarak yapılan inokulasyonda 10 adet endofitik bakteri pamukta *Fusarium Solgunluğu*na karşı uygulanmış ve inokule edilen bitkilerin % 50'sinden başarılı bir şekilde tekrar bakteri izole edilmiştir. Ancak bu metodun bitkide yara oluşturabileceği ve bazen bitki gelişimini azaltabileceği ifade edilmiştir.

Mısır (*Zea mays* L.) ve pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) bitkilerinin kök ve gövdesindeki endofitik bakterilerin genotipik çeşitliliğini belirlemek amacıyla yürütülen tarla çalışmasında yetiştirme mevsimi boyunca dokuların yüzeyinden izole edilen 36 bakteri izolatu yağ asit analizleri yapılarak tanımlanmış 27'si endofitik olarak belirlenmiş, % 70'inin de gram negatif olduğu saptanmıştır. Her iki üründe de bakteri yoğunluğunun köklerde gövdeye oranla daha fazla olduğu kaydedilmiştir (McInroy and Kloepper, 1995).

Chen *et al.*(1995), tarafından yapılan bir çalışmada *P. fluorescens* 89B-61 ırkının pamukta *Fusarium Solgunluğu*nun şiddetini önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. Bu konukçu patojen sisteminde 89B-61 ırkı fide gövdesine yarık açılarak inokule edilmiş, 13 gün sonra da *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* bakteriyel inokulasyon noktasının 1,5 cm üzerine inokule edilmiştir. Çalışmada 89B-61'in rifampicine dayanıklı ırkı kullanılmış ve gövde üzerinde bakteriyel inokulasyon noktasının üst kısmına doğru bakteriyel bir hareket olmadığı görülmüştür.

Quadt-Hallman *et al.*(1997a), tarafından yapılan çalışmada uyarılmış sistemik dayanıklılığı (ISR) teşvik eden bir endofitik bakteri olan *Pseudomonas fluorescens*'in 89B-61 izolatına özgü poliklonal antikor kullanılarak ELISA ve immunogold labeling sistemi ile bakterinin pamuk bitkisinde ki kolonizasyonu incelenmiştir. İzolasyon çalışmaları sonucunda tohum uygulaması sonrası 89B-61'in köklerdeki

içsel kolonizasyonunda bakteri popülasyonu ortalama 1.1×10^3 cfu/g iken bakterinin gövde, kotiledon veya yapraklardan izole edilemediği bildirilmiştir. Irk 89B-61 ELISA testi ile köklerin içinde ve dışında belirlenmiş fakat gövde, kotiledonlar veya yaprakların içinde ve dışında tespit edilememiştir. Elektron mikroskopunda immunogold labeling yöntemi ile 89B-61'in köklerin içsel kolonizasyonu incelenmiş bakterilerin epidermisin hücreler arası boşluklarında, zaman zaman epidermis hücrelerinin içinde ve korteks dışında hücreler arasında kolonize olduğu saptanmıştır.

Aynı bakteri, yapraklara inokule edildiğinde yaprak dokusu içinde ortalama bakteri popülasyonu $1,6 \times 10^3$ cfu/g olarak bulunmuştur. Gövdeye inokule edildiğinde *P. fluorescens* 89B-61'in kök ve yapraklarda kolonize olmadığı görülmüştür. JM 22 kodlu *Enterobacter asburiae*'nin diğer endofit *Paenibacillus macerans* Tri2-10 ile birlikte uygulandığı durumlarda JM 22'nin tek başına uygulandığı duruma göre içsel popülasyonunda azalma olduğu dikkati çekmiştir. Bununla bir rizosfer bakterisi olan *Micrococcus agilis* (2 RD-11) birlikte inokule edildiğinde JM 22 negatif olarak etkilanmemiştir. Bu çalışmalar biyolojik kontrol aktivitesine sahip bir bakterinin bitki patojenlerine karşı konukçuyu korumada önemli rol oynayabileceği ancak içsel kolonizasyonunda diğer bakteri kolonilerinin de önemli rol oynayabileceğini göstermiştir (Quadt-Hallmann *et al.*, 1997 a).

Sistemik olarak bitki içinde kolonize olabilen *Enterobacter asburiae* JM 22'nin pamuk bitkisi içine nasıl girdiğinin belirlenmesi için yapılan bir araştırmada bakterinin pasif olarak alınımına yönelik olarak glutaraldehit ile fikse edilmiş bakteri hücreleri tohumla uygulanmış ancak kök ve yaprakların içinde ve dışında varlığı saptanmamıştır. JM 22'nin dış yara açılmaksızın su agarda çimlenen pamuk tohumlarına bakteri süspansiyonu şeklinde uygulanması sonucu fide içinde bakteri popülasyonunun $3,8 \times 10^3$ cfu/g'a ulaştığı görülmüştür. Bitkide yapılan çalışmalar JM 22 hücrelerinin bulunduğu yerde hücre duvarlarında selülozun hidrolize olduğu ve aynı olayın *P. fluorescens* 89B-61'de görüldüğünü göstermiştir (Quadt-Hallmann *et al.*, 1997 b).

Peroksidaz, SOD (Super oksit dismutaz) ve esteraz enzim aktiviteleri üzerine yapılan çalışmada *V. dahliae* ile mücadele için endofitik bakteriler kullanılmıştır.

Pamuk gövdeleri 73a bakterisi ile inokule edildikten sonra izoenzim aktivitesinde artış gözlenmiştir. Yapraklar 73a bakterisi ile inokule edildiğinde inokulasyondan 4 gün sonra peroksidaz aktivitesinin bakterisiz kontrole göre daha yüksek olduğu görülmüştür (ZhengJun *et al.*, 1997).

Çin’de *Verticillium* Solgunluğunun endofitik bakterilerle kontrol mekanizması amacıyla pamuktan izole edilen A1a ve 73a endofitik bakteri izolatları, Czapek ortamında *V. dahliae*’nin yaprak dökme ırkı JC1B ve yaprak dökmeyen BP2 ırkı ile ikili kültür testine alınmıştır. A1a bakteri izolatının BP2 nin toksin üretimini %51,97 oranında azalttığı kaydedilirken, 73a ırkının JC1b’nin toksin üretimini % 72,6 oranında engellediği bildirilmiştir. Ayrıca A1a ve 73a ırklarının JC1b ve BP2’ nin hifsel gelişimini de engellediği kaydedilmiş ve 73a uygulanan pamuk tohumlarının çimlenme gücünün arttığı saptanmıştır (Zheng-Qing *et al.* 1999a).

Zheng-Qing *et al.* (1999b), Çin’de yapmış oldukları diğer çalışmada pamuklarda *Verticillium dahliae*’ nin mycelial gelişimi ve toksin üretiminin endofitik bakterilerle engellenmesi amacıyla endofitik bakteri ırklarından 73a ve A1a’ nin pamukta *V. dahliae* ırklarından JC1b ve BP2 nin mycelial gelişimini sırasıyla %51,0 ve 53,3 oranında engellediğini saptamışlardır. Ayrıca 73 a ırkının bitki gelişimine % 19,15 oranında etkili olduğu bildirilirken A1a ırkının etkili olmadığı tespit edilmiştir.

Çin’de dayanıklı ve duyarlı pamuk kültürlerinin rizosferindeki fungal floranın *V. dahliae*’a karşı etkisi farklı gelişme dönemlerinde test edilmiştir. Dayanıklı pamuk kültürlerinin rizosferinde duyarlılara göre daha fazla fungal türün olduğu bildirilmiş ve pamukta *V. dahliae*’a karşı dayanıklılığın rizosferdeki mikroorganizmalarla ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Dayanıklı pamuk çeşitlerinin rizosferinde baskın olan funguslar *Myrothecium*, *Gliocladium*, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi olarak kaydedilirken duyarlı çeşitlerin rizosferinde ise *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Doratomyces*, *Gliocladium* ve *Myrothecium* cinsine ait funguslar bulunmuştur (HongLian *et al.*, 1999).

Rizosfer, filosfer ve sağlıklı bitki dokuları içindeki bitki bakteri ilişkisini araştırmak amacıyla toprak kaynaklı ve yaprak hastalıklarının önlenmesinde bu ilişkinin doğal olarak nasıl meydana geldiğinin belirlenmesi amacıyla yürütülen bir çalışmada toprak kaynaklı patojen ve nematodlara karşı biyolojik kontrol ajanı olarak

rizobakter ve endofitik bakterilerden yararlanılmıştır. Rizobakterlerle yapılan uygulamada kök veya tohumda yaprak patojenlerine karşı sistemik koruma sağlanmış ve elde edilen sonuçlara göre virüs, fungus ve bakteri gibi birçok patojenin zararının azaldığı kaydedilmiştir. Kök çevresindeki antagonistlerin varlığının çoğalmasının özel antagonistlerin varlığına bağlı olduğu ve bu çoğalmanın özel organik maddelerin oluşumu ya da ilavesi ile biyolojik kontrol mekanizmalarının ortaya çıkabileceği belirtilmiştir. Bazı tropikal Legüminacea üyelerinin örneğin kadife fasulyesinin (*Mucuna deeringiana*) ekim nöbetinde kullanımı ile fitoparazitik nematodların kontrol altına alınabileceği bildirilmiştir (Kloepper *et al.*, 1999).

Sera koşullarında steril olmayan toprakta kolza ve domates tohumları belirti göstermeyen kolza bitkisinden elde edilen endofitik bakteri ırkları ile veya ırkların karışımları ile inokule edilmiş, *V. dahliae* ve *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici* ile bulaşık toprakta yetiştirilen domates ve kolza bitkilerinde hastalığın kontrol altına alınması ve gelişme hızı incelenmiştir. *V. dahliae*' nin toprakta varlığında veya yokluğunda 4 bakteri izolatının (PO, PP, PN ve PV) toprak inokulasyonu sonrasında kolza bitkisinin kuru ağırlığı ve bitki boyunda artış görülmüştür. Bakteri izolatları tohuma uygulandığında söz konusu patojenler baskı altına alınmış, kolza ve domates bitkilerinin kuru ağırlıkları ve bitki boylarında artış gözlenmiştir. PF, PA ve PN' nin tohum uygulamaları ile domates bitkisinin yaş ağırlığı uygulama yapılmamış sağlıklı bitkilere göre daha fazla olmuştur. Farklı izolatların birlikte uygulanması ile 2 patojenin hastalık şiddeti % 75 oranında azalmış ve *in-vitro* koşullarda kolza tohumlarının çimlenme gücü artmıştır. Ayrıca bu çalışmada izolatların çoğu patojenlerin miselial gelişiminin uçucu metabolitlerle engellendiğini göstermiştir (Nejad and Johnson, 2000).

Pamuk fidelerinde tohum, gövde ve kök dokularında endofitik bakteri popülasyonunun konukçu genotipine olan etkileri iklim odası ve tarla denemelerinde araştırılmıştır. 9 pamuk çeşitinin tohumları içinde bakteri popülasyon yoğunluğunun başlangıçta çok düşük düzeyde olduğu görülmüş ancak su agarda 4 gün sonra kökçük gelişimi ile birlikte önemli ölçüde artmış ve çeşitler arasında belirgin farklılık olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde tarla denemelerinde dikimden 5, 8 ve 15 gün sonra fidelerdeki bakteri popülasyonu çeşitlere göre önemli ölçüde farklılaşmıştır. Sonuç olarak pamuk bitkilerinde endofitik bakteri kolonizasyonundaki farklılıkların fidenin

gelişme başlangıcında genetik, morfolojik ve fizyolojik faktörlere göre değişebileceği belirtilmiştir (Adams and Kloepper, 2002).

Solarizasyon uygulanmış toprakta yetişen domates bitkilerinin kök uçlarından *V. dahliae*'a karşı antagonistik endorizosfer bakterileri izole edilmiş ve 435 bakteriyel izolattan 53 tanesinin *V. dahliae*'a ve diğer çeşitli toprak kaynaklı patojenlere karşı ikili kültür testlerinde antagonist etki gösterdiği saptanmıştır. Sera koşullarında yapılan denemelerde 18 antagonistik bakteriden 3'ü *V. dahliae*'a karşı etkili bulunmuş ve *Bacillus* cinsi bakteriler olduğu ifade edilmiştir. Domates bitki rizosferinden elde edilmiş olan Floresan *Pseudomonas*ların hiç birisinde *V. dahliae*'a karşı ikili kültürlerde önemli antagonistik aktivite sağlanamamıştır. En etkili bakteriyel izolat olarak bulunan K-165 ve 5-127 izolatlarının rizosferde kolonize olduğu belirlenmiş, serada patlıcan bitkilerinin köklerin daldırılması veya bakterilerin toprağa süspansiyon şeklinde uygulanması ile yapraklardaki hastalık belirtilerinin yüzde %40–70 oranında azaldığı kaydedilmiştir. Aynı çalışmada *Verticillium*'la bulaşık patates tarlalarında bakteri toz formülasyon şeklinde patates tohumlarına uygulanmış, patates bitkilerindeki hastalığın yüzde olarak gelişimi ve simptom oluşumu önemli ölçüde azaldığı ve ayrıca % 25 oranında ürün artışı sağlandığı kaydedilmiştir. K-165 ve 5-127 bakterilerinin indol bütirik, indol pirüvik ve indol propionik asit ürettiği ve her ikisinin de bitki gelişimini teşvik ettiği belirlenmiştir. Yağ asit analizlerinin sonucunda K-165 *Paenibacillus alvei*, 5-127 ise *Bacillus amiloliquefaciens* olarak tanımlanmıştır (Tjamos *et al.*, 2004).

Zeytinde *Verticillium* Solgunluğunun kontrolü amacıyla *V. dahliae* ile bulaşık bitkilerin yayılmasının önlenmesi ve sağlıklı bitkilerin korunma yollarının araştırılması üzerine yapılan bir çalışmada 8 izolat *Pseudomonas fluorescens* (6) ve *Pseudomonas putida* (2) zeytin bitkilerinin köklerinden izole edilmiş ve kontrollü koşullar altında fidanlık üretiminde *Verticillium* Solgunluğunun baskı altına alınması için test edilmişlerdir. *P. fluorescens* ve *P. putida*'nın antagonistik aktivitesi kültür ortamında zeytinde *V. dahliae*'nin yaprak döken (D) ve dökmeyen (ND) patotiplerine karşı test edilmiş ve PDA besiyerinde *P. putida*'nın patojene karşı *P. fluorescens*'e göre daha engelleyici olduğu bildirilmiştir. Kök uygulaması ile bazı *P. fluorescens* izolatları başlangıç simptomlarını önemli ölçüde geciktirmiş ve sonuçta hastalığın yoğunluğunu ve şiddetini % 31–82 ve %73–96 oranında azalttığı

bildirilmiştir. Ayrıca bu bakterilerin patojen tarafından enfekte edilmiş bitkinin gelişimini artırdığı ve patojenin etkisini azalttığı kaydedilmiş ve kök uygulaması ile seçilmiş olan *P. fluorescens* izolatlarının zeytinde *V. dahliae*'nin yaprak döken ırkının biyokontrolünde kullanılabileceği belirtilmiştir. Ancak test edilen bakteriyel izolatların *in-vitro*'daki etkinlikleri ile antagonistlerin *in-vivo* da Verticillium Solgunluğunun baskı altına alınması arasında bir ilişki bulunamamıştır (Mercado-Blanco *et al.*, 2004).

3. MATERİYAL ve METOT

Aydın İli ve ilçelerinde (Aydın Merkez, Buharkent, Çine, Germencik, İncirlioğlu, Karpuzlu, Koçarlı, Köşk, Kuyucak, Nazilli, Söke ve Yenipazar) pamuk alanlarından *Verticillium dahliae*'nin konukçusu olan (Thanassouloupoulos *et al.*, 1981, Johnson and MacKinnon, 2002) yabancı otlar (*Amaranthus* spp., *Avena* spp., *Calendula arvensis*, *Capsella bursa pastoris*, *Chenopodium album*, *Datura* spp., *Malva sylvestris*, *Portulaca oleraceae*, *Solanum* spp., *Xanthium* spp.) ve pamuk bitkileri çalışmanın ana materyalini oluşturmuştur. Ayrıca bu bitkilerden elde edilen bakteri ve *V. dahliae* izolatları patojenisite ve *in-vivo* etkinlik denemelerinde kullanılan Sayar 314 ve Acala Maxa çeşidi pamuk tohumları çalışmada materyal olarak kullanılmıştır.

3.1. Örneklerin Toplanması

Örnek toplama çalışmaları, 2004 (Temmuz - Kasım) ve 2005 (Eylül) yıllarında Aydın ili ve ilçelerinde yapılmıştır. 2004 yılı Ekim ayında yapılan çalışmalarda yukarıda belirtilen Aydın Merkez ve ilçelerinden toplam 20 adet yabancı ot türü örneği alınmıştır. 2004 yılı Kasım ayında 13 adet, 2005 yılı Eylül ayında ise 10 adet olmak üzere toplam 23 adet pamuk bitki örneği ise Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsü deneme alanlarından endofitik bakteri izole etmek için alınmıştır. Ayrıca *Verticillium dahliae* izolatları toplamak amacıyla pamuk tarlalarında hastalık belirtisi gösteren yabancı ot ve pamuk bitkilerinden de örnekler alınmıştır. Alınan bitki örnekleri polietilen torbalara konmuş ve etiket bilgileri yazılarak (tarih, alındığı yer) laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen örneklerden 24-48 saat içerisinde bakteri ve fungus izolasyon çalışmaları tamamlanmıştır.

3.2. İzolasyon Çalışmaları

3.2.1. Fungus izolasyonu ve patojenisite testleri

Laboratuvara getirilen hastalıklı yabancı ot ve pamuk bitkilerinin kök boğazından yukarı 5-7 cm'lik gövde parçaları çıkarılmış ve %2'lik sodyum

hipoklorür çözeltisinde 2 dakika bekletilmiştir. Daha sonra steril su ile durulanmış ve steril kurutma kağıtları arasında kurulanmıştır. Yüzey dezenfeksiyonu yapılan bu parçalardan steril bistüri yardımıyla 0,5-1 mm kalınlığında enine kesitler alınmış ve doku parçaları Su Agar-SA (agar 18g, 1000ml damıtık su) besiyeri üzerine bırakılmıştır. İnkubasyon için petriler 24 ± 2 °C’ deki inkubatöre yerleştirilmiş ve 48-72 saatlik inkubasyon sonrası mikroskopik incelemeye alınmıştır. Verticillat dallanma gösteren fungal kolonilerden steril öze yardımıyla alınan kültür Patates Dekstroz Agar-PDA (dekstroz 20g, agar 18g, patates 200g, damıtık su 1000ml) besiyeri bulunan petrilere inokule edilmiştir. Daha sonra petriler inkubasyon için 24 ± 2 °C’deki inkubatöre konmuş ve 10 günlük bir inkubasyon sonrasında izolatlar sklerot oluşumu ve verticillat dallanma yönünden tekrar incelendikten sonra içinde PDA bulunan tüplere saflaştırılmıştır. Tüpler aynı sıcaklıkta inkubasyona bırakılmış ve çalışmalarda kullanılmak üzere buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır.

Tek Spor İzolasyonu: *V.dahliae* izolatları PDA besiyerinde 14 gün süreyle 24 ± 2 °C’de geliştirilmiş ve petride gelişen izolatların üzerine 5 ml, litresinde 1-2 damla Tween 80 içeren steril su dökülmüştür. Elde edilen spor süspansiyonunun hemacytometrede spor sayımı yapılmış 10^3 spor/ml olacak şekilde spor yoğunluğu ayarlanmıştır. Elde edilen süspansiyondan mikropipetle 100µl çekilerek içerisinde SA bulunan petrilere damlatılmış ve cam bagetle yayılarak 24 ± 2 °C’ de inkubasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkubasyon periyodundan sonra petriler mantar delici yardımıyla 2mm çapında diskler açılarak delinmiş ve diskler mikroskop altında incelenmiştir. İçerisinde bir adet çimlenmiş spor bulunan disk steril öze yardımıyla alınarak PDA besiyerine aktarılmış ve 24 ± 2 °C’de gelişmeye bırakılmıştır. Daha sonra gelişen izolatlar % 15 glycerol içeren tüplerde -80° C’de saklanarak stoğa alınmıştır.

Patojenisite çalışmaları için hastalığa duyarlı Sayar-314 çeşiti pamuk bitkileri kullanılmıştır. Bu amaçla pamuk tohumları 24 ± 1 °C’de 16 saat aydınlık/8 saat karanlık koşullardaki iklim odasında steril torf, kum, toprak (1/3) karışımına ekilmiştir. Bitkiler 5-6 yapraklı olduğu devrede *V. dahliae* konidi süspansiyonu kullanılarak inokule edilmiştir. Patojenisite çalışmalarında *V. dahliae* izolatlarının tek spor kolonilerinden üretilen 24 °C’de 14 günlük PDA’daki kültürleri kullanılmıştır. Kültürlerin bulunduğu petri kaplarının içerisinde, litresinde 1-2 damla

Tween 80 içeren 5 ml steril su konulmuş ve steril cam baget besi yeri yüzeyine hafifçe sürtülerek spor süspansiyonu elde edilmiştir. Hazırlanan süspansiyon tüp karıştırıcıda çalkalanmış ve kan sayım aleti ile lam-lamel arasına 20 µl koyularak spor sayımı yapıldıktan sonra inokulum yoğunluğu 4.10^6 spor/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. İnokulasyon işlemi Saydam *et al.* (1973)'e göre şırınga ile fide gövdesine yapılmıştır. İnokule edilen bitkiler 4 hafta boyunca incelenmiş ve 4. hafta sonunda aşağıdaki skalaya göre değerlendirilmiştir.

0-4 Skalası

İndeks	Hastalık Şiddeti (%)
0	Belirti yok
1	% 1-25
2	% 26-50
3	% 51-75
4	> %75 veya ölü bitki

3.2.2. Endofitik bakteri izolasyonu

Laboratuvara getirilen yabancı ot ve pamuk bitki örneklerinin kök boğazının üst kısmından (4-5 cm uzunluğunda) parçalar alınmış ve bu parçalar yüzey dezenfeksiyonu için % 3' lük sodyum hipoklorür çözeltisinde 3 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 3 defa 30'ar saniye 0.01 M steril fosfat tamponu (Na_2HPO_4 0,724g/l, KH_2PO_4 0,21g/l, damıtık su 1000ml, pH=7,2) ile durulanmış ve steril kurutma kağıtları arasında kurulanmıştır. Bu parçalardan steril bir bistürü yardımıyla enine kesit şeklinde çıkarılan 300-400 mg doku parçaları steril havan içinde 5-10 ml fosfat tampon içinde ezilmiştir. Elde edilen süspansiyondan 10^{-2} ye kadar seyreltme serileri hazırlanmış ve her seriden mikropipet yardımıyla 100µl çekilerek R2A (Oxoid) besiyerine cam bagetle ekim yapılmıştır. İnkubasyon için petriler 24-72 saat süreyle 24 ± 2 °C' deki inkubatöre konmuştur. Bu sürenin sonunda R2A besi yerinde gelişmelerini tamamlayan bakterilerden farklı gelişim gösteren koloniler renk, biçim ve kenar özellikleri dikkate alınarak gruplandırılmış ve her gruptan birer temsilci koloni, Pseudomonas Agar F (PAF) (Merck) ve Nutrient agar (NA) besiyerlerine saflaştırılmıştır. PAF besiyerinde UV ışık altında fluoresans verme özellikleri kaydedilmiş (King *et al.*, 1954), NA besiyerindekiler de tekrar saflaştırılarak *in-vitro* koşullarda ikili kültür testlerini yapmak üzere -80 °C'de %15 glycerol içinde saklanmıştır.

3.3. *In-vitro* Etkinlik Denemeleri ve Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi

Yabancı otlar ve pamuk bitkilerinden izole edilen endofitik bakterilerin *in-vitro* etkinliklerini belirlemek amacıyla içinde PDA besiyeri bulunan petrilerde merkezden eşit uzaklıktaki 4 ayrı noktaya öze ile antagonist adayı bakteriler ekilmiş, 24 saat sonra merkeze 5 mm çapında *V. dahliae* (Vp1a) misel diski konmuştur. Petriler 1 hafta süreyle 24±1 °C de inkube edilmiştir. Fungus kolonisinde engelleme zonu oluşturan izolatlar potansiyel antagonist olarak değerlendirilmiştir.

In-vitro ön testlerde etkili bulunan endofitik bakteriyel izolatların Nutrient agar besiyerinde 24-48 saat süreyle gelişmiş kültürlerinden içinde 2 ml steril fizyolojik serum (% 0.85g NaCl) bulunan tüplerde mililitrede 3×10^8 hücre olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyondan mikropipet yardımıyla 10µl çekilerek içinde PDA besiyeri bulunan petrilere her petride aynı bakteri olmak üzere karşılıklı olarak 4 noktaya merkezden 2 cm uzaklıkta olacak şekilde inokule edilmiştir. İnokulasyon işleminden 24 saat sonra *V.dahliae* (Vp1a) fungus izolatının PDA daki kültürlerinden 0,5 cm çaplı mantar delici ile çıkarılan diskler 1 gün önce bakteri ekimi yapılmış petrilerin merkezine ekilmiştir. Denemeler 3 tekerrürlü olarak yürütülmüş ve fungusun gelişme zonları günlük olarak takip edilmiştir. Değerlendirmeler ise fungus ekiminden 9 gün sonra fungal koloni çapları ölçülerek yapılmış ve uygulama yapılmamış kontrol petrideki çapa göre yüzde engelleme oranı aşağıdaki formüle göre saptanmıştır.

$$\% \text{ engelleme} = \frac{\text{Kontrol petrideki çap} - \text{Bakterili petrideki fungus koloni çapı}}{\text{Kontrol petrideki çap}} \times 100$$

Pamuk bitkilerinden izole edilen endofitik bakterilerin bitki patojeni olup olmadıklarını saptamak amacıyla tütünde aşırı duyarlılık testi (Klement, 1963) uygulanmıştır. Tütünde aşırı duyarlılık testi White Burley cinsi tütün bitkilerinin yaprakları kullanılmıştır. Nutrient agar besiyerinde 24-48 saat gelişmiş olan bakterilerden steril su ile süspansiyon hazırlanmıştır (10^7 hücre/ml). Hazırlanan süspansiyon enjektör yardımıyla tütün yaprağının iki yan damarı arasına enjekte edilmiştir. Tütün bitkileri 16h aydınlık / 8h karanlık koşullardaki iklim odasında 24 ±1°C'de tutulmuş ve inokulasyondan 24 saat sonra incelenmiştir. Bakteri süspansiyonu enjekte edilen bölgenin nekroze olması pozitif sonuç, belirti

oluşmaması ise negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmalarda pozitif kontrol amacıyla *Pseudomonas syringae* pv *syringae* - Pss-577 nolu bakteri izolatu kullanılmıştır.

3.4. *In-vivo* Etkinlik Denemeleri

Pamuk bitkilerinden elde edilen, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu negatif olup *in-vitro*'da *Verticillium dahliae*'a engelleyici etkisi saptanan 12 adet bakterinin *in-vivo* etkinlik çalışmaları şu şekilde yürütülmüştür: Duyarlı Sayar 314 pamuk çeşidi tohumları %3'lük sodyum hipoklorür çözeltisi içerisinde 1 dakika bekletildikten sonra 3 kez 30'ar saniye steril fosfat tampon ile durulanmış ve steril kurutma kağıtları arasında kurulanmıştır. Tryptic Soy Broth –TSB (Oxoid) içerisinde 24 saat süreyle gelişmiş olan bakteriler santrifüj tüpleri içerisinde 6.000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüpü içerisinde elde edilen 200 mg bakterinin üzerine steril su içerisinde eritilen 2 ml %1'lik carboxymethylcelulase (Sigma) ilave edilmiş ve tüp karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 20 adet pamuk tohumu karışımın içerisine atılmıştır (Quadt-Hallmann *et al.*,1997a). Tohumlar yarım saat süreyle hazırlanan karışımın içerisinde bekletildikten sonra kuruması için steril kurutma kağıtları üzerine alınmıştır. Kuruyan tohumlar $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 16h aydınlık / 8h karanlık iklim odası koşullarında içerisinde kum, toprak, torf (1/3) bulunan saksılara ekilmiştir. Gelişen fidelere ekimden 21 gün sonra sıvı gübre süspansiyonu (Sheffer 16-8-24, N P K) verilmiştir. İnokulasyon işlemi patojenisite testlerinde anlatılan yöntemle göre yapılmış ve 0-4 skalasına göre 4 hafta boyunca her hafta sayım yapılarak sonuçlar istatistiki olarak değerlendirilmiştir. Denemeler her saksıda 1 bitki olacak şekilde 5 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

In-vivo testlerde etkili bulunan 5 endofitik bakteri izolatu ayrıca 2 farklı *V. dahliae* izolatu (Vp1a ve PYDV-6) kullanılarak Sayar-314 çeşiti pamuk bitkilerinde etkinlik testleri tekrarlanmıştır. Bu amaçla yukarıda belirtilen yöntemle pamuk tohumları bakteri izolatları ile kaplanmış ve bitkiler 2 farklı *V. dahliae* izolatu ile inokule edilmiştir. Denemeler her saksıda tek bitki olacak şekilde ve 10 yinelemeli olarak yürütülmüştür. İnokulasyondan sonra birer hafta aralıklarla sayımlar yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.5. Etki Mekanizmalarına Yönelik Testler

3.5.1. Kolonizasyon

Bu amaçla *in-vivo* testlerde en etkili bulunan endofitik bakteri izolatlarının (C5, E21, F5) pamuk bitkisinde kolonizasyonunu belirlemek amacıyla bu izolatlar rifampicine dayanıklı hale getirilmeye çalışılmış ve pamuk tohumuna uygulanarak bakterilerin pamuk bitkisinde kolonize olma durumları incelenmiştir. Bunun için Nutrient agar besi yeri 121°C’ de 15 dakika otoklav edildikten sonra 50°C’ye kadar soğutulmuş ve her petride 15 ml olacak şekilde ve gradient oluşturacak şekilde 30 ° eğimle steril plastik petrilere dökülmüştür. 24 saat sonra tekrar NA besi yeri hazırlanmış ve 50°C’ye kadar soğutulduktan sonra içerisine 100 µg/ml olacak şekilde rifampicine ilave edilmiştir. Dikkatlice karıştırılarak antibiyotiğin karışımı sağlanmış ve bir gün önce hazırlanmış olan besiyerinin üzerine dökülmüştür. Yüzeyleri steril kabin içinde iyice kuruyan antibiyotik içeren besiyerleri 24 saatlik NA kültürlerinden hazırlanan bakteri süspansiyonundan (yaklaşık 10⁻⁷ hücre/ml) 200µl bağıtle yayılarak inokule edilmiştir. Antibiyotiğin en yoğun olduğu kısımda gelişen koloniler seçilmiş ve tekrar içinde 100 µg/ml rifampicine bulunan besiyerlerine ekilmiştir (Klement *et al.*, 1990). Bu işlem 3 kez tekrarlanmış ve sonuçta elde edilen koloniler rifampicine dayanıklı mutant izolat olarak değerlendirilmiştir.

Rifampicine’e dayanıklı hale getirilen mutant ve normal bakteri izolatları tryptic soy brothda geliştirilmiş ve *in-vivo* testlerde belirtilen yöntemle göre Sayar 314 ve Acala Maxa çeşidi pamuk tohumları bakteri ile kaplanmıştır. Tohum ekiminden 8 gün sonra gelişen fidelerden izolasyon yapılmıştır. Bu amaçla 5 adet bitki dikkatlice köklenip çeşme suyunda iyice yıkandıktan sonra her bir bitkinin kök boğazının altında kalan ilk 5 cm’ lik kısım, kök üzerindeki ilk 5 cm ve daha sonraki 5 cm olmak üzere 3 eşit parçaya ayrılmıştır. Eşit parçalara ayrılan bu kısımlar ayrı ayrı %3’lük sodyum hipoklorür çözeltisi içerisinde 1 dakika bekletildikten sonra 2 kez steril su ile durulanmış ve steril kurutma kağıtları arasında kurulanmıştır. Daha sonra kurulan parçaların her bir grubu içinde 2 ml fizyolojik serum bulunan steril porselen havan içinde iyice ezilmiş ve bakteri süspansiyonu elde edilmiştir. Hazırlanan süspansiyondan 500µl çekilerek içinde 4,5 ml steril fizyolojik serum

bulunan tüpe aktarılmış ve her seferinde tüp karıştırıcıda karıştırmak suretiyle -3'e kadar seyreletme serisi hazırlanmıştır. Daha sonra her seyreletme serisinden mikropipetle 100 µl çekilerek mililitresinde 50µg rifampicin içeren ve rifampicin'siz PAF besiyerine damlatılmış ve cam baget yardımıyla yayılarak ekim yapılmıştır. Her gün petrilerin gelişimleri düzenli olarak incelenmiş 24-48 saat sonra gelişen bakteri kolonilerinin binokülerde sayımları yapılmıştır. Böylece tohumlarına bakteri bulaştırılan pamuk bitkilerinde endofitik bakteri izolatının yeşil aksamda ulaşabileceği seviye belirlenmeye çalışılmıştır.

Mutant antagonist bakteri izolatlarının etkinliklerinde farklılık olup olmadığını belirlemek için normal ve mutant izolatlarla inokule edilen pamuk bitkilerinde patojenisite testleri yapılmıştır. Bu amaçla Sayar 314 ve Acala Maxa çeşidi pamuk tohumları normal ve mutant bakteri izolatları ile daha önce belirtilen yöntemle göre kaplanmış 10 yinelemeli olarak saksılarda yetiştirilerek *V. dahliae* PYDV-6 izolatı ile inokule edilmiştir. İnokulasyondan 10 gün sonra patojenisite testlerinde belirtilen skalaya göre değerlendirilmiş ve farklılık istatistiki olarak değerlendirilmiştir.

3.5.2. Fosfatı çözme

Bu test işleminde Freitas *et al.*, (1997)'de belirtilen yöntemle göre hazırlanan besiyeri (glucose 10g, Ca(PO₄)₂ 4g, NH₄Cl 5g, NaCl 1g, MgSO₄ 1g, purified water 1000ml, agar 20g, pH=7,2) kullanılmıştır. İçinde 3ml hacimli steril su bulunan tüplere Nutrient agar besiyerinde 24-48 saat süreyle gelişmiş bakteri kültürlerinden bir süspansiyon (10⁸-10⁹ hücre/ml) hazırlanmıştır. Elde edilen süspansiyondan hazırlanan besiyerine 4 farklı bakteri karşılıklı olarak 10 µl inokule edilmiştir. Daha sonra 24±2°C'de 24-72 saat süreyle inkubasyona bırakılmıştır ve bu sürenin sonunda renk açılması gözlenen alanlar pozitif sonuç, gözlenmeyen alanlar ise negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca renk açılması görülen alanların çapları ölçülerek kaydedilmiştir.

3.5.3. Uçucu bileşik üretimi

***Verticillium dahliae*'a etkileri:** Antagonistik bakteriler tarafından besi yerinde oluşturulan uçucu maddelerin *V. dahliae*'a karşı etkilerini belirlemek amacıyla bölmeli ve bölmesiz petrilerde PDA besi yeri hazırlanmıştır. Bu işlem için

bölmeli petrinin alt kısmı merkezden eşit uzaklıkta olacak şekilde karşılıklı iki noktadan işaretlenmiştir. Daha sonra bölmeli petrinin bir yarısına testlenecek olan antagonist bakteriler merkezden eşit uzaklıkta olacak biçimde steril bir öze yardımıyla 3cm uzunluğunda çizgi ekim yapılarak inokule edilmiştir. İnokulasyon işleminden 24 saat sonra petrilerin diğer yarısına *V. dahliae* (PYDV-6 tekspor) agar diskisi (5mm çaplı) öze ile misel içeren yüz aşağı gelecek şekilde ekilmiştir. Kontrol amaçlı olarak ise antagonist bakteri uygulanmadan sadece PYDV-6 fungus izolatu ekimi yapılmıştır. Denemeler 3 tekerrürlü olarak yürütülmüş ve engelleme zonları günlük olarak incelenmiş ve fungus ekiminden 10 gün sonra engelleme zonları ölçüm yapılarak kaydedilmiştir. Sonuçlar fungus izolatının merkezinden 10. günde ulaştığı mesafeye kadar yarı çap ölçümü yapılarak değerlendirilmiştir.

Çimlenmeye etkileri: Antagonistik bakterilerin pamuk tohumlarında kökçük (radicle) uzunluğuna etkilerini belirleme çalışmaları bakterilerin doğrudan uygulandığı ve bölmeli petrilere bakterilerin oluşturduğu uçucu maddelerin kökçük oluşumuna etkilerini saptayabilmek amacıyla iki yöntemle yürütülmüştür. Bunun için 200 adet Sayar 314 pamuk çeşidi tohumları %1'lik sodyum hipoklorür çözeltisi içerisinde 1 dakika bekletilmiş, daha sonra steril su ile durulanarak steril kurutma kağıtları arasında kurulanmıştır. Her iki yöntem için kullanılacak olan tohumlar bakteri uygulaması öncesi steril pens yardımıyla içerisinde %1'lik su agar bulunan petrilere her petride toplam 50 adet tohum olacak şekilde yerleştirilmiş ve 24 saat süreyle çıtlatmak amacıyla $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de inkubasyona bırakılmıştır.

Bakterilerin besiyerinde oluşturduğu uçucu maddelerin tohum gelişimine etkilerini belirlemek amacıyla ortasında bölmesi olan steril plastik petriler kullanılmıştır. Bu işlem için bölmeli petrinin bir yarısına %1'lik su agar diğer yarısına ise PDA besiyeri konmuştur. Bölmeli petrinin PDA içeren bölümüne testlenecek olan antagonist bakteriler steril öze yardımıyla çizgi ekim yapılarak inokule edilmiştir. İnokulasyondan 24 saat sonra, bölmeli petrilerin SA içeren kısmına her petride 2 adet tohum olacak şekilde %1'lik su agarda daha önce çıtlatılan tohumlar steril pens ile yerleştirilmiş ve petri kenarları saran film ile iyice kapatılarak $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'deki inkubatöre yerleştirilmiştir. Antagonist bakterilerin doğrudan pamuk tohumu çimlenmesine etkilerini belirlemeye yönelik çalışmalar, içinde sadece %1 su agar içeren bölmesiz petrilere yapılmıştır. Bu amaçla her petriye 2 adet daha önce

çıtlatılan tohum konmuş ve tohumların çim tüpü oluşturduğu uç kısma steril suda hazırlanmış bakteri süspansiyonundan (10^8 hücre/ml) mikropipetle her tohuma 25 µl olacak şekilde damlatılmıştır. Her iki denemede de kontrol olarak bakteri uygulaması yapılmaksızın sadece pamuk tohumlarının yerleştirildiği petriler kullanılmıştır. Petriler 24 ± 2 °C’de 3 gün süreyle inkubatöre yerleştirilmiştir. Bakteri uygulamasından 48 ve 96 saat sonra kökçük boyları ölçülerek kaydedilmiş ve kökçük büyüme oranı mm/gün olarak hesaplanmıştır. Bu denemeler her petride 2 tohum olacak şekilde 3 tekerrürlü olarak yürütülmüş ve elde edilen tüm verilere istatistiki analiz uygulanarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.6. Biyokimyasal Testler

Pamuk bitkilerinden izole edilen antagonistik bakterilerin tanılanmasında ikili kültür testi sonucunda engelleme gösteren ve *Verticillium dahliae*’a karşı *in-vivo* etkileri saptanan toplam 12 adet endofitik bakterinin ön tanılanmasını yapmak amacıyla uygulanmıştır. Bu testlerde pozitif kontrol amacıyla daha önce tanılanmış bilinen bakteri kültürleri kullanılmıştır.

3.6.1. Gram boyama

Gram boyama işlemi Klement (1968)’de belirtilen yöntemle göre yapılmıştır. Öncelikle temiz bir lam alınarak üzerine bir damla steril su damlatılmıştır. Sonra Nutrient agar besiyerinde gelişmiş olan 24-48 saatlik bakteriler steril öze yardımıyla yayılmış ve daha sonra lam hafifçe alevden geçirilerek bakteriler lam üzerine sabitlenmiştir. Lam üzerine crystal violet solüsyonu damlatılarak bir dakika bekletilmiş ve lamlar çeşme suyunda yıkanmıştır. Sonra gram iodine damlatılarak bir dakika beklenmiş ve tekrar çeşme suyunda yıkanmıştır. Ardından lamın üzeri % 95’lik etil alkol ile yıkanıp 30 saniye beklenmiştir. Son olarak lamın üzeri safranin solüsyonu ile kaplanmış ve 1 dakika beklenerek lam yıkanmış ve temiz bir peçete ile kurulanmıştır. Hazırlanan preparatlara mikroskopta 100× objektif altında immersiyon yağı ile bakılmış mavi-mor görülen bakteriler gram pozitif, pembe-kırmızı olarak görülenler ise gram negatif olarak değerlendirilmiştir. İncelenen bakterilerin hücre şekilleri kaydedilmiştir.

3.6.2. Potasyum hidroksit testi

Bu test için bir adet lam üzerine % 3'lük Potasyum hidroksit solüsyonundan pastör pipeti yardımıyla 1 damla damlatılmıştır. Nutrient agar besiyerinde 24-48 saat süreyle gelişmiş olan bakteri kültürlerinden steril bir kürdan yardımıyla bir miktar alınarak lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Lam üzerine yayılan bakteri kültüründe kürdanı hafifçe kaldırdığımızda erime olup uzama sağlanıyorsa pozitif reaksiyon (gram negatif), uzama olmuyorsa negatif reaksiyon (gram pozitif) olarak değerlendirilmiştir (Fahy and Hayward, 1983).

3.6.3. Floresan Pigment Oluşumu

Bu amaçla izole edilen bakterilerin King *et al.*, (1954)'e göre Pseudomonas Agar F (Merck) besiyerinde UV ışık altında floresan verme özellikleri incelenmiştir

3.6.4. Oksidaz testi

Bu test için Kovacs (1956)'da belirtilen yöntemine göre %1 tetra methyl-p-phenylendiamine dihydrochloride içeren test solüsyonu kullanılmıştır. Nutrient agar besiyerinde 24-48 saat süreyle geliştirilmiş olan bakterilerden platin öze (veya steril kürdan) ile bir miktar alınmış ve steril kurutma kağıdına yayılmıştır. Daha sonra hazırlanmış olan test solüsyonundan pastör pipeti yardımıyla 1 damla damlatılmış kültürün 10 saniye içinde mavimsi mor renk alması pozitif, 15-60 saniye arasındaki renklenme gecikmiş pozitif, 5 dakika içerisinde renk değişimi gözlenmemişse negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

3.6.5. Isı testi

Bu test işleminde içinde 2,5-3ml hacimli steril su bulunan tüplere Nutrient agar besiyerinde 24-48 saat gelişmiş taze bakteri kültürlerinden bir süspansiyon hazırlanmış ve su banyosuna koymadan önce hazırlanan süspansiyondan bir öze dolusu bakteri Nutrient agar besiyerine çizgi ekim yapılmıştır. Daha sonra tüpler su banyosunda 80°C'de 15 dakika kaldıktan sonra tekrar Nutrient agar besiyerine çizgi ekim yapılmıştır ve 24±2 °C'de inkubasyona bırakılmıştır. 48 saat sonra ısı sonrası gelişen bakteriler pozitif olarak değerlendirilirken gelişme göstermeyenler negatif olarak kaydedilmiştir (Bradbury, 1970).

3.6.6. Levan oluşumu

Bu test işleminde %5 sakkaroz içeren Nutrient agar (sakkaroz 50g, Difco NA 23g, damıtık su 1000ml, pH=7,2) besiyeri kullanılmıştır. Nutrient agar besiyerinde 24-48 saat süreyle gelişmiş bakteri kültürlerinden NSA besiyerine ekim yapılmış ve gelişen bakterilerin NSA besiyerinde kubbe şeklinde koloni oluşturması pozitif, oluşturmaması negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

3.6.7. Patateste yumuşak çürüklük testi

Bu test için yaklaşık 1cm kalınlığında kesilen patates dilimleri önce alkolden (% 96'lık) ardından alevden geçirilmiş ve steril kurutma kağıtlarında kurutulmuştur. Daha sonra her bir halkanın orta kısmından steril bisturi yardımıyla 3-4 mm derinlikteV şeklinde bir şerit çıkarılmıştır ve içinde nemlendirilmiş steril kurutma kağıdı bulunan steril petri kaplarının içine patates dilimleri yerleştirilmiştir. Şerit şeklinde çıkarılan kısma 24-48 saatlik bakteri kültürlerinden steril öze yardımıyla alınan inokulum yayılmış ve petriler $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat inkube edilmiştir. Bu süre sonunda yumuşama görülen patates dilimleri pozitif, görülmeyenler ise negatif sonuç olarak kaydedilmiştir (Bradbury, 1970).

3.6.8. Nitratı indirgeme testi

Nitrat indirgeme testi Lelliot *et al.* (1966)' da belirtilen yöntemle göre yapılmıştır. Bu amaçla 5 ml hacimli tüplere hazırlanan besiyeri (peptone 10g, K_2HPO_4 5g, agar 2g, yeast extract 1g, damıtık su 1000ml pH= 7.2) kullanılmıştır. Nitrat ayırıcı olarak solüsyon A (sulfanilik asit 400mg, 5N asetik asit 50 ml) ve solüsyon B (1- naphthylamine 300mg, 5N asetik asit 50 ml) kullanılmıştır. Hazırlanan besiyeri 121°C ' de 3 dakika eritilerek vida kapaklı tüplere 5' er ml konmuş 121°C ' de 15 dakika otoklav edilmiştir. Nutrient agar besiyerinde 24-48 saat süreyle gelişmiş bakteri kültürlerinden steril özeyle bakteri alınmış ve hazırlanan tüplere batırma inokulasyon yapılmıştır. Tüpler $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat süreyle inkube edilmiş daha sonra 1 damla gram iodine ardından 0.5ml solüsyon A ve 0.5ml solüsyon B mikropipet yardımıyla alınarak tüplerin üzerine damlatılmıştır. Tüplerde nitratın indirgendiğini gösteren rengin kırmızı olması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Birkaç dakika içerisinde renk oluşmazsa bistüri ucuyla çinko

tozu ilave edilmiş ve tüplerde renk oluşması negatif, renk oluşmaması ise pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

3.6.9. Oksidatif fermentatif (O/F) reaksiyon testi

Bu test işleminde peptone 1g, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1g, KCl 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, bromothymol blue 0.03g, agar 3g, 100g glikoz (%10), damıtık su 1000ml (pH= 7.2) kullanılmıştır. Hazırlanan besiyeri 121°C’ de 3 dakika eritilerek vida kapaklı tüplere 4.5’ er ml konmuş ve 121°C’ de 15 dakika otoklav edilmiştir. Glikoz 100 ml suda eritilmiş ayrı otoklav edildikten sonra besiyerine ilave edilmiştir. Besiyeri otoklav edilip 50°C’ ye kadar soğutulduktan sonra ayrı olarak otoklav edilen glikozdan mikropipetle 0.5 ml çekilerek her bir tüpe ayrı ayrı koyularak tüp karıştırıcıda homojen olarak karıştırılmıştır. Daha sonra Nutrient agar besiyerinde 24-48 saat süreyle geliştirilen bakteriler steril özeyle alınmış ve 2 ayrı tüpe batırma inokulasyon yapılmıştır. Tüplerden birinin üzerine 1.5 ml mineral yağ ilave edilmiş diğerine ise yağ konmadan 24±2°C’de 24-48 saat süreyle inkube edilmiştir. İnkubasyon süresinin sonunda tüplerde sarı renk oluşumu pozitif sonuç, yeşil renk ise negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Bradbury, 1970).

3.6.10. Arginine hidrolizi testi

Bu amaçla L+ arginine hydrochloride 10g, sodium chloride 5g, peptone 1g, K_2HPO_4 0.3 g, phenol red 0.01g, damıtık su 1000ml (pH=7.2) olmak üzere hazırlanan besiyeri 121°C’ de 3 dakika eritilerek vida kapaklı tüplere 4’er ml konmuş ve 121°C’ de 15 dakika otoklav edilmiştir. Nutrient agar besiyerinde 24-48 saat süreyle gelişmiş taze bakteri kültürlerinden steril özeyle bir miktar bakteri alınmış ve tüpler steril öze yardımıyla batırma şeklinde inokule edilmiştir. Daha sonra tüplerin üzerine 1ml steril minerel yağ ilave edilmiş 24±2°C’de 24 – 48 saat süreyle inkube edilmiştir. Bu sürenin sonunda tüplerde sarı renk oluşumu negatif sonuç, kırmızı renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Bradbury, 1970).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. İzolasyon Çalışmaları

4.1.1. *V. dahliae* izolatları

Kasım 2004 yılında Aydın İli ve ilçelerindeki pamuk üretimi yapılan alanlardan hastalık belirtisi gösteren yabancı ot (Şekil 2) ve pamuk bitki (Şekil 3) örnekleri alınmış ve yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda 8 adet *Verticillium dahliae* izolatı elde edilmiştir. Bu izolatların tek spor izolatları elde edilerek denemelerde kullanılmıştır. Yapılan mikroskobik değerlendirmelerde konidi taşıyıcılarının verticillat dallanma gösterdiği ve PDA besiyerinde mikrosklerot oluşturduğu saptanmıştır. Sayar-314 pamuk bitkilerinde yapılan patojenisite testleri sonucunda 8 adet izolat *V. dahliae* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 5).

Çizelge 5. İzolasyon çalışmalarından sonra elde edilen *Verticillium* spp. izolatları ve Sayar 314 çeşiti pamuk bitkilerinde oluşturduğu hastalık şiddeti

İzolat no	Alındığı yer	Alındığı bitki	Hastalık şiddeti	
			% *	İndeks*
AmRVD-1	İncirliova	<i>Amaranthus</i> spp	22.8	1.5
PYDV-2	Köşk	Pamuk	11.4	0.5
PYDV-3	Yenipazar	Pamuk	61.4	3.0
PYDV-4	Köşk (Dalama)	Pamuk	27.0	1.5
PYDV-5	İncirliova	Pamuk	64.5	3.0
PYDV-6	Ortaklar	Pamuk	75.0	3.0
PYDV-7	Nazilli	Pamuk	45.8	2.5
Vp1a	AD.Ü. Zir. Fak.	Pamuk	57.29	2.5

(*) iki tekerrürün ortalamasıdır



Şekil 2. Aydın İli İncirlioğa ilçesinde *V. dahliae* ile enfekteli bir horozibiği (*Amaranthus* sp.) bitkisinin görünümü.



Şekil 3. Aydın İli İncirlioğa ilçesinde *Veriticillium* Solgunluğu belirtileri gösteren bir pamuk bitkisi.

Çizelge 5 değerlendirildiğinde 1 adet *Amaranthus* sp. yabancı ot bitkisinden ve 7 adet pamuk bitkisinden olmak üzere toplam 8 adet *Verticillium dahliae* izolatu elde edilmiştir. Elde edilen izolatların hastalık şiddeti inokulasyon tarihinden 4 hafta sonra her bitkideki yaprak alanları esas alınarak değerlendirilmiştir. Pamuk bitkisinden elde edilen PYDV-3, PYDV-5 ve PYDV-6, VP1A izolatları % 50 ile %75 arasında hastalık şiddeti oluşturmuş ve virülenslikleri diğer izolatlara göre yüksek bulunmuştur. En düşük virülenslik ise hastalık şiddeti ortalaması %1-25 arasında olup hastalık indeks ortalaması ise 0.5 olan PYDV-2 izolatında tespit edilmiştir. *Amaranthus* spp.' den izole edilen AmRVD-1 ve pamuktan elde edilen PYDV-4 izolatları Sayar 314 çeşiti pamuk bitkilerinde sırasıyla % 22,8 ve % 27 oranında hastalık oluşturmuştur.

4.1.2. Endofitik bakteri izolatları

Aydın İli ve ilçelerindeki pamuk ekim alanları 2004 Temmuz ayında alınan toplam 20 adet yabancı ot türü örneklerinden yapılan izolasyon çalışmalarında 117 adet bakteri izolatu elde edilmiş ancak ikili kültür testlerinde etkili bir antagoniste rastlanmamıştır (Çizelge 6). 2004 yılı Kasım ayında 13 adet, 2005 yılı Eylül ayında ise 10 adet olmak üzere toplam 23 adet pamuk bitki örneği Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsü deneme alanlarından alınmış ve izolasyon çalışmaları sonucunda koloni morfolojisi bakımından gruplandırılmış toplam 163 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Yapılan ikili kültür testleri sonucunda 2004 yılında 3 adet, 2005 yılında ise 9 adet olmak üzere antagonistik etki gösteren toplam 12 adet endofitik bakteri izolatu elde edilmiştir. Çizelge 6'da elde edilen bakteri izolatları sayısı ve *in-vitro* etkileri sonucunda ön elemeye tabi tutularak etkili bulunan endofitik bakteri izolatları isimleri ve alındığı konukçu bitkilerin isimleri verilmiştir. Etkili bulunan bu izolatların hiç birisi tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu göstermemiştir.

Çizelge 6. Survey çalışmaları sonucunda elde edilen bakteri izolatları

Izolat Sayısı	Alındığı yer	Alındığı bitkinin türkçe ve bilimsel adı		İn-vitro etkili izolat No
6	AD.Ü Zir. Fak.	Semiz otu	<i>Portulaca oleracea</i>	
17	AD.Ü Zir. Fak	Köpek üzümü	<i>Solanum nigrum</i>	
2	AD.Ü Zir. Fak	Pıtrak	<i>Xanthium strumarium</i>	
22	AD.Ü Zir. Fak	Benekli darıcan	<i>Echinochloa colonum</i>	
21	AD.Ü Zir. Fak	Beneksiz darıcan	<i>Echinochloa crus-galli</i>	
7	AD.Ü Zir. Fak	Yapışkan ot	<i>Seteria verticillata</i>	
1	Aydın-Merkez	Köpek üzümü	<i>Solanum nigrum</i>	
3	Aydın-Merkez	Pıtrak	<i>Xanthium strumarium</i>	
16	Yenipazar	Horoz ibiği	<i>Amaranthus retroflexus</i>	
1	Yenipazar	Köpek üzümü	<i>Solanum nigrum</i>	
1	N.P.A.Enst.	Eşek marulu	<i>Sonchus oleraceus</i>	
3	Pamukören	Yabani hardal	<i>Sinapis arvensis</i>	
1	Buharkent	Sirken	<i>Chenopodium murale</i>	
3	Buharkent	Yabani turp	<i>Raphanus raphanistrum</i>	
1	Çine	Yabani turp	<i>Raphanus raphanistrum</i>	
1	İncirliova	Yabani turp	<i>Raphanus raphanistrum</i>	
3	İncirliova	Sütlegən	<i>Euphorbia spp.</i>	
6	İncirliova	Şeytan elması	<i>Datura stramarium</i>	
1	Koçarlı	Sirken	<i>Chenopodium murale</i>	
1	Sazlıköy/Söke	Şeytan elması	<i>Datura stramarium</i>	
9	N.P.A.Enst.	Pamuk-GC 8915	<i>Gossypium hirsutum</i>	E-2
1	N.P.A.Enst.	Pamuk-108F	<i>Gossypium hirsutum</i>	
3	N.P.A.Enst.	Pamuk-Deltapine886	<i>Gossypium hirsutum</i>	
2	N.P.A.Enst.	Pamuk-Bahar 82	<i>Gossypium barbadense</i>	
5	N.P.A.Enst.	Pamuk-TKY 9309	<i>Gossypium hirsutum</i>	
4	N.P.A.Enst.	Pamuk-Aşkabat 71	<i>Gossypium hirsutum</i>	
3	N.P.A.Enst.	Pamuk-Deltapine 882	<i>Gossypium hirsutum</i>	E-21, E22
4	N.P.A.Enst.	Pamuk-Giza 45	<i>Gossypium barbadense</i>	
3	N.P.A.Enst.	Pamuk-Mc namara	<i>Gossypium hirsutum</i>	
2	N.P.A.Enst.	Pamuk-GW 8752	<i>Gossypium hirsutum</i>	
9	N.P.A.Enst.	Pamuk-Is 10	<i>Gossypium sp.</i>	
9	N.P.A.Enst.	Pamuk-Tamcot	<i>Gossypium hirsutum</i>	B-4
9	N.P.A.Enst.	Pamuk- Tamcot	<i>Gossypium hirsutum</i>	B-5
9	N.P.A.Enst.	Pamuk- Tamcot	<i>Gossypium hirsutum</i>	B-8
9	N.P.A.Enst.	Pamuk-Giza 45	<i>Gossypium barbadense</i>	C-5
8	N.P.A.Enst	Pamuk-Albania	<i>Gossypium barbadense</i>	
8	N.P.A.Enst	Pamuk-Coker 100AWR	<i>Gossypium hirsutum</i>	
8	N.P.A.Enst	Pamuk-Stonville 825	<i>Gossypium hirsutum</i>	F-2
8	N.P.A.Enst	Pamuk- Stonville 825	<i>Gossypium hirsutum</i>	F-5
8	N.P.A.Enst	Pamuk- Stonville 825	<i>Gossypium hirsutum</i>	F-8
8	N.P.A.Enst	Pamuk-Varamine	<i>Gossypium hirsutum</i>	
9	N.P.A.Enst	Pamuk-Aşkabat 100	<i>Gossypium barbadense</i>	H-9
9	N.P.A.Enst	Pamuk-Gedera 5	<i>Gossypium hirsutum</i>	I-3
3	N.P.A.Enst	Pamuk-GS 247	<i>Gossypium hirsutum</i>	

4.2. *In-vitro* Etkinlik Denemeleri

Pamuk bitkisinden elde edilen *in-vitro*’ da ön eleme testinde etkili bulunan ve bitki patojeni olmadığı tütün testi ile tespit edilen 12 adet endofitik bakteri izolatının *V. dahliae*’a karşı *in-vitro*’ da etkilerini belirlemek amacıyla yapılan 3 yinelemeli ikili kültür testlerinin sonuçları Çizelge 7 ve Ek 1’ de özetlenmiştir.

Çizelge 7. *In-vitro*’da *V. dahliae*’nın gelişimine karşı antagonistik bakterilerin etkileri

İzolat no	Ortalama (mm)*	% Engelleme
F 2	11.0 a	66.8
F 5	12.7 a	61.8
B 8	17.0 b	48.7
C 5	17.3 bc	47.7
E 22	18.7 bcd	43.7
B 4	19.2 bcde	42.2
B 5	20.7 cde	37.7
E 2	22.2 def	33.2
I 3	22.2 def	33.2
H 9	22.5 de	32.1
F 8	24.7 fg	25.6
E 21	26.5 g	20.1
Kontrol	33.2 h	00.0

(*) Aynı harfle ifade edilen değerler arasında istatistiksel açıdan fark yoktur, LSD testi P<0.05

Çizelge 7 değerlendirildiğinde antagonist bakterilerin yüzde engelleme oranları % 20,1-66,8 oranında değiştiği tespit edilmiştir. En yüksek etki %66,8 engelleme oranıyla F2 izolatında gözlenirken onu F5 izolatı % 61,8 oranla takip etmiş ve bu iki izolatında istatistiksel olarak farklı olmadığı kaydedilmiştir. B8 % 48,7, C5 %47,7, E22 % 43,7 ve B4 % 42,2 oranlarında engelleme göstermişler ve bunlar istatistiksel olarak kendi aralarında farksız bulunmuştur. E2 ve I3 izolatları aynı derecede engelleme göstermiş ve yüzde engellemeleri 33,2 olarak tespit edilmiştir. H9, F8 ve E21 ise *in-vitro* koşullarda *V. dahliae*’a karşı en düşük etkiyi gösteren izolatlar olarak belirlenmişlerdir. Hiçbir inokulasyon yapılmayan kontrol petride saptanan koloni çapı tüm diğer karakterlerden istatistiki olarak farklı bulunmuştur.

4.3. *In-vivo* Etkinlik Denemeleri

In-vitro testlerde antagonistik etkisi saptanan 12 adet endofitik bakteri izolatının, *V. dahliae*'a karşı *in-vivo* etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla duyarlı Sayar 314 çeşidi pamuk tohumları kullanılarak saksı koşullarında yürütülen denemelerde; tohum ekimi 27/12/05, inokulasyon 25/01/2006, gübreleme 17/01/2006, sayımlar da 1/02/2006, 8/02/2006, 15/02/2006 ve 22/02/2006 tarihlerinde olmak üzere 4 sayım yapılmıştır. Her sayımda skalaya göre değerlendirilen hastalık şiddetleri her sayım için ayrı istatistiki analiz yapılarak sonuçlar Çizelge 8 ve Ek 2' de özetlenmiştir.

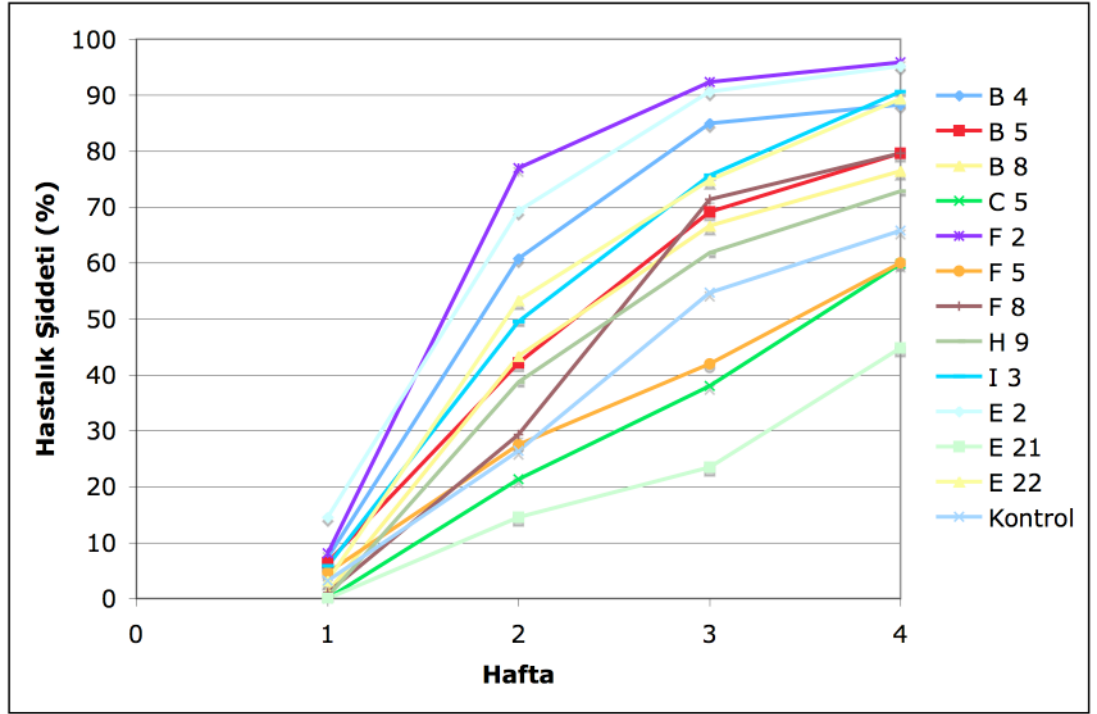
Çizelge 8. Antagonist bakteri izolatları ile kaplanmış Sayar 314 çeşidi pamuk tohumlarından oluşan bitkilerde *V.dahliae* inokulasyonu sonrası hastalık şiddetleri

İzolatlar	Hastalık Şiddeti (%)*			
	1. Sayım	2. Sayım	3. Sayım	4. Sayım
B4	7.33 bc	60.83 abc	79.49 abc	88.33 ab
B5	6.49bcd	42.16 bcde	69.16 abcd	79.66 abc
B8	1.08 cd	43.32 bcde	66.83 abcde	76.83 abc
C5	0.00 d	17.83 e	37.99 ef	59.82 cd
E2	14.49 a	69.33 ab	90.66 ab	95.16 a
E21	0.00 d	14.49 e	23.49 f	44.82 d
E22	3.49bcd	53.32abcd	74.83 abc	89.33 ab
F2	8.08 ab	76.99 a	92.33 a	95.83 a
F5	4.66bcd	27.50 de	42.00 def	59.99 cd
F8	1.00 cd	29.32 de	71.33 abcd	79.66 abc
H9	0.32 d	38.66 cde	61.83 bcde	72.83 abc
I3	5.82bcd	44.49bcde	75.66 abc	90.66 a
Kontrol	3.16bcd	26.39 de	54.66 cde	65.82 bcd

(*) Aynı sütunda aynı harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur, LSD testi P<0.05

Çizelge 8 incelendiğinde antagonist bakterilerin *V.dahliae*'a karşı etkinliklerini belirlemeye yönelik yapılan hastalık şiddeti değerlendirmelerinde sırasıyla E21, C5, F5 in en etkili izolatlar olduğu, H9 ve B8 nolu izolatların da ikinci derecede ümitvar etkiye sahip oldukları görülebilir. Dört sayım sonucu değerlendirildiğinde bazı izolatlarda hastalık şiddetinin sadece patojen fungusun

verildiği başka hiç uygulama yapılmayan kontrole göre hastalık şiddetini arttırdığı görülmüştür. Bunlar sırasıyla F2, E2, I3, E22 ve B4 olarak sayılabilir. Bu bulgular tüm sayım sonuçları grafik şeklinde gösterimi (Şekil 4) ile daha belirgin şekilde görülebilmektedir. Şekil 4 incelendiğinde E21, C5 ve F5 nolu izolatların tüm sayımlarda kontrole göre daha düşük düzeyde hastalık oluşturduğu buna karşın diğer izolatların kontrole göre daha yüksek oranda hastalığa neden olduğu açıkça görülmektedir.



Şekil 4. Antagonist bakteri izolatları ile kaplanmış Sayar 314 çeşidi pamuk tohumlarından oluşan bitkilerde *V. dahliae* inokulasyonu sonrası yüzde hastalık şiddetleri.

Saksı testlerinde en etkili bulunan E21, C5, F5 ve ümitvar sonuç veren B8 ve H9 nolu izolatlar ile 2 farklı *V. dahliae* izolatı kullanılarak yürütülen *in -vivo* etkinlik denemelerinde PYDV-6 izolatının kullanıldığı bitkilerde inokulasyondan 21 gün sonra tüm bitkiler yapraklarını döküp öldükleri için sayım yapılamamıştır. Bu nedenle deneme 2. sayım verileri dikkate alınarak değerlendirilmiş ve sonuçları Çizelge 9 ve Ek 3’de verilmiştir.

Çizelge 9. Beş Antagonist bakteri izolatları ile kaplanmış Sayar 314 çeşidi pamuk tohumlarından oluşan bitkilerin 2 *V. dahliae* izolatı ile inokulasyonu sonrası yüzde hastalık şiddeti

Bakteri İzolatları	<i>V. dahliae</i> izolatları		Ortalama
	Vp1a	PYDV-6	
F5	7.83 D	58.70 C	33.27
H9	13.83 D	79.00 B	46.41
E21	16.19 D	81.50 B	48.84
B8	7.81 D	93.87 AB	50.84
C5	16.70 D	87.41 AB	52.05
Kontrol	12.54 D	98.00 A	55.27
Ortalama	12.48	83.08	

(*) Aynı harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur, LSD testi $P < 0.05$

Beş antagonist bakteri izolatının 2 farklı *V. dahliae* izolatına karşı yürütülen denemelerde izolatların *V. dahliae* açısından etkinlikleri farklı bulunmuş ve bu etkinin 2 farklı *V. dahliae* izolatına göre değiştiği görülmüştür. Denemelerde en iyi etkinlik F5 nolu izolatın kullanımı ile elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan PYDV-6 izolatı virülensi çok yüksek bir izolat olup inokulasyondan 2 hafta sonra bitkilerde yaprakların tamamen döküldüğü ve bitkilerin öldüğü görülmüştür.

Birinci *in-vivo* denemelerde inokulasyondan sonra her sayım öncesi bitkilerin fotoğrafları Şekil 5, 6, 7 ve 8 de gösterilmektedir. Şekillerde görüleceği gibi inokulasyondan 1 hafta sonra bitkilerde yapraklarda sararma ve nekrozlar şeklinde belirtiler başlamış, 2 haftadan sonra yaprak dökümleri görülmüş 3 hafta sonunda ise bazı karakterlerde yapraklar tamamen dökülerek bitkiler ölmeye başlamıştır.



Şekil 5. Tohumlarına antagonist bakteri uygulanmış pamuk bitkilerinin *V. dahliae* (Vp1a) inokulasyonundan 1 gün sonraki görünümü.



Şekil 6. Tohumlarına antagonist bakteri uygulanmış pamuk bitkilerinin *V. dahliae* (Vp1a) inokulasyonundan 7 gün sonraki görünümü.



Şekil 7. Tohumlarına antagonist bakteri uygulanmış pamuk bitkilerinin *V. dahliae* (Vp1a) inokulasyonundan 14 gün sonraki görünümü.



Şekil 8. Tohumlarına antagonist bakteri uygulanmış pamuk bitkilerinin *V. dahliae* (Vp1a) inokulasyonundan 21 gün sonraki görünümü.

4.4. Etki Mekanizmalarına Yönelik Testler

4.4.1. Kolonizasyon

In-vivo testlerde en etkili bulunan antagonist bakterilerden E21, F5 ve C5 izolatlarının rifampicine dayanıklı mutant ırklarının elde edilmesine yönelik çalışmalarda sadece E21 ve F5 izolatları için mutant ırk elde edilebilmiş, buna karşılık C5 izolatından dayanıklı ırk elde edilememiştir. Bu nedenle kolonizasyon çalışmaları sadece normal ve mutant E21 ve F5 izolatları kullanılarak yürütülmüştür. Bu amaçla elde edilen bu izolatların pamuk fidelerindeki dağılımını tespit etmek amacıyla yapılan çalışmanın sonuçları aşağıdaki Çizelgede verilmiştir.

Çizelge 10. Mutant antagonist bakteri izolatlarının pamuk fidelerindeki dağılımı

İzolat	Kök boğazı altı ilk 5 cm	Kök boğazı üstü 1'inci 5cm	Kök boğazı üstü 2'inci 5cm
E21 Rif	16100*	20*	0
F5 Rif	700*	-	-

(*) 5 adet 5 cm lik bitki parçasından hazırlanan süspansiyonunun mililitresindeki bakteri sayısı

Çizelge 10 değerlendirildiğinde pamuk fidelerinin kök boğazı altı ilk 5 cm, kök boğazı üstü birinci 5 cm ve kök boğazı üstü ikinci 5 cm' lik bitki parçalarından yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda hazırlanan süspansiyonun mililitresindeki bakteri sayısını belirlemek amacıyla yürütülen çalışmada E21Rif izolatı ile kaplı tohumlardan oluşan bitkilerde, ekimden 8 gün sonra köklerde yoğun olarak kolonize olduğu aynı zamanda kök boğazı üstü birinci 5 cm'de de kolonize olabildiği belirlenmiştir. Fakat kök boğazı üstü ikinci 5 cm' den bakteri izole edilememiştir.

Mutant F5 Rif izolatının ise kök bölgesinde (kök boğazı altı ilk 5 cm) kolonize olabildiği ancak E21 Rif izolatı ile kıyaslandığında bu kolonizasyonun daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bitkilerin diğer kısımlarından ise bakteri izole edilememiştir.

Mutant antagonist bakteri izolatlarının *V. dahliae*'a karşı etkinliklerinde mutasyon sonrası farklılık olup olmadığını belirlemek için 2 farklı pamuk çeşitinin (Sayar 314 ve Acala Maxa) tohumları normal ve mutant bakteri izolatları ile daha önce belirtilen yöntemle kaplanarak bitkiler *V. dahliae* PYDV-6 izolatı ile inokule edilmiştir. İnokulasyondan 10 gün sonra 0-4 skalasına göre yapılan değerlendirme sonuçları Çizelge 11 ve Ek 4' de verilmiştir.

Çizelge 11. Mutant ve Normal Antagonist bakteri izolatları ile inokule edilen 2 farklı pamuk çeşitinin *V. dahliae*'a (PYDV-6) reaksiyonları.

İzolatlar	Sayar 314	Acala Maxa
	Hastalık Şiddeti (%)*	Hastalık Şiddeti (%)*
E21	24.62 a	34.75 a
E21-Rif	31.25 a	36.50 a
F5	35.00 a	23.62 a
F5 Rif	39.25 ab	41.25 ab
Kontrol	48.49 b	45.91 b

(*) 10 tekerrür ortalamasıdır. Aynı sütundaki rakamlar istatistiki olarak farksızdır P<0.05

Çizelge 11'de verilen mutant ve normal antagonist bakteri izolatları ile inokule edilen Sayar 314 ve Acala Maxa pamuk çeşitlerindeki yüzde hastalık şiddetleri istatistiki olarak incelenmiş ve normal ve mutant izolatların etkinlikleri arasında bir fark olmadığı ve hastalığı kontrol altına alabildiği görülmüştür.

4.4.2. Fosfat çözünürlüğü

Fosfat çözünürlüğüne yönelik olarak kalsiyum fosfat içeren besiyerinde bakteri kolonileri etrafındaki açık zon dikkate alınarak yürütülen test sonuçları Çizelge 12' de verilmiştir.

Çizelge 12. Antagonist bakteri izolatlarının fosfat çözebilme yetenekleri

İzolatlar	Açık zon çapı (mm)*	İzolatlar	Açık zon çapı (mm)*
B4	0	E22	11
B5	9	F2	0
B8	0	F5	0
C5	0	F8	8
E2	0	H9	10
E21	10	I3	8

(*) 3 tekerrür ortalamasıdır.

Çizelge 12 incelendiğinde endofitik bakterilerden sırasıyla E22, E21, H9, B5, F8 ve I3 izolatlarının fosfat çözebilme özelliğine sahip olduğu, buna karşın B4, B8, C5, E2, F2 ve F5' in fosfat çözme özelliği olmadığı görülmektedir.

4.4.3. Uçucu bileşik üretimi

V. dahliae'a etkileri: Antagonistik bakteriler tarafından besi yerinde oluşturulan uçucu bileşiklerin *V. dahliae*'a (PYDV-6) karşı etkilerini belirlemek amacıyla bölmesi petrielerde yürütülen denemelerde endofitik bakterilerin varlığında *V. dahliae* fungusunun koloni yarıçapları ve yüzde engelleme değerleri Çizelge 13 ve Ek 5' de verilmiştir.

Çizelge 13. Antagonistik bakterilerin *in-vitro*'da *V. dahliae*'nın gelişimine karşı oluşturdukları engelleme zonları

İzolatlar	Bölmesiz Petri		Bölmeli Petri	
	Koloni yarı çapı (mm)	% engelleme	Koloni yarı çapı (mm)	% engelleme
B4	16.3 ab	6.67	17.0 abc	3.77
B5	17.0 ab	2.86	16.5 abc	6.60
B8	16.0 ab	8.57	18.0 ab	-1.89
C5	15.5 b	11.43	18.3 a	-3.77
E2	17.5 a	0.00	17.3 abc	1.89
E21	17.5 a	0.00	16.0 bc	9.43
E22	17.0 ab	2.86	14.0 d	20.75
F2	12.0 c	31.43	17.5 abc	0.94
F5	12.0 c	31.43	17.3 abc	1.89
F8	17.0 ab	2.86	17.5 abc	0.94
H9	16.5 ab	5.71	17.0 abc	3.77
I3	16.7 ab	4.76	15.7 cd	11.32
Kontrol	17.5 a	0.00	17.7 ab	0.00

(*) 3 tekrerrüt ortalamasıdır, aynı harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur $P \leq 0.05$

(**) % Engelleme = (kontrol-uygulama)/kontrol x 100

Çizelge 13 incelendiğinde bakterilerin doğrudan fungus gelişimine etkilerini belirlemek amacıyla bölmesiz petride yürütülen denemede en yüksek engelleme oranı sırasıyla F5, F2, C5 bakterilerinden elde edilmiştir. Bunları sırasıyla B8, B4, H9, I3 izolatları izlemiştir. Uçucu bileşiklerin etkilerini tespit etmek amacıyla içinde bölmeli petride ise en yüksek etkiyi % 20,75 ile E22 izolatı göstermiş olup bunu % 11,32 oranla I3 ve %9,43 ile E21 no'lu izolat izlemiştir. Geride kalan izolatların ise PYDV-6 nolu *V.dahliae* fungus izolatına karşı uçucu bileşikler açısından önemli bir etkisi görülmemiştir.

Çimlenmeye etkileri: Antagonistik özellikte olan endofitik bakterilerin pamuk tohumlarının çimlenmesine yönelik etkilerini belirlemek amacıyla bakterinin doğrudan ve oluşturduğu uçucu bileşikler yoluyla etkilerini saptamak için kökçük (radicle) uzunluklarının büyüme oranları dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 14 ve Ek 6’ da verilmiştir.

Çizelge 14. Antagonist bakteri izolatlarının Sayar 314 pamuk tohumlarının kökçük uzunluğuna olan etkileri

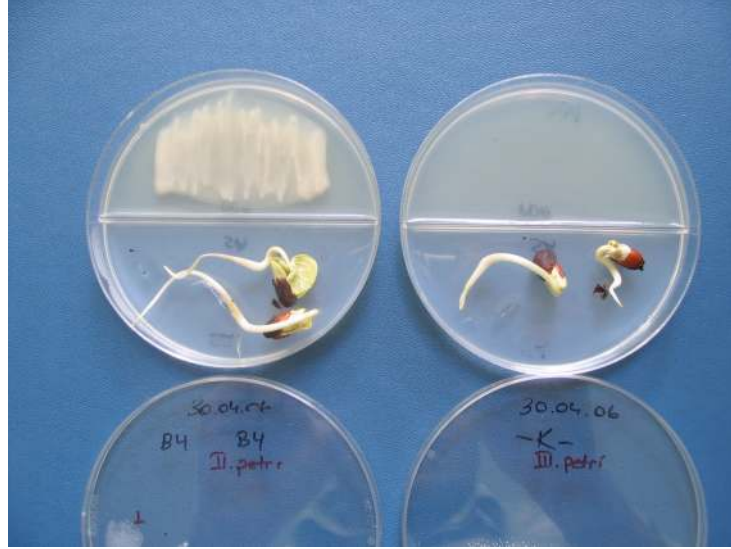
İzolatlar	Bölmesiz Petri		Bölmeli Petri	
	Kökçük büyüme oranı (mm/gün)*	% büyüme oranı**	Kökçük büyüme oranı (mm/gün)*	% büyüme oranı**
B4	12.75 cd	-12.59	20.32 ab	34.60
B5	22.25 a	52.51	17.08 bcd	13.16
B8	15.58 bc	6.79	22.16 a	46.79
C5	12.07 cd	-17.25	11.65 f	-22.81
E2	18.58 ab	27.40	14.33 def	-5.10
E21	10.90 d	-25.25	17.14 bcd	13.56
E22	15.77 bc	8.11	16.69 bcd	10.53
F2	12.51 cd	-14.24	19.80 abc	31.15
F5	14.58 bcd	-0.02	17.75 bcd	17.60
F8	16.23 bc	11.24	11.98 ef	-20.64
H9	15.48 bc	6.12	16.58 bcd	9.83
I3	13.50 cd	-7.47	15.89 cde	5.28
Kontrol	14.59 bcd	0.00	15.10 def	0.00

(*) 3 tekrerrüt ortalamasıdır, aynı harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur $P \leq 0.05$

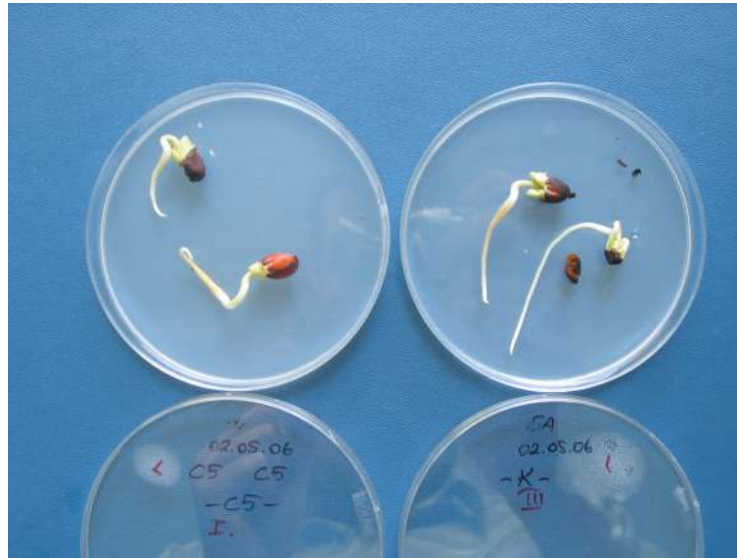
(**) % büyüme oranı = (uygulama-kontrol)/kontrol x 100

Endofitik bakterilerin bölmesiz petride pamuk tohumlarında kökçük büyüme oranlarına doğrudan etkileri incelendiğinde (Çizelge 14) B5 ve E2 nolu izolatların gelişmeyi önemli oranda teşvik ettiği, bu bakterileri ikinci derecede F8, B8 ve H9’un izlediği, bazı bakteriyel izolatların da (E21, C5, F2, B4) gelişmeyi yavaşlattığı dikkati çekmiştir. Aynı bakteriler, bölmeli petride uçucu bileşiklerinin kökçük uzunluğuna etkileri yönünden değerlendirildiğinde gelişmeyi teşvik eden bakteriyel izolatlar sırasıyla B8, B4 ve F2 olarak bulunmuştur. Bunları ikinci derecede F5, B5, H9, E21 ve E22 bakterileri izlemiştir. Buna karşılık bazı izolatların (F8, C5, E2) da aksine gelişmeyi yavaşlattığı saptanmıştır.

Ortasında bölmesi olan steril plastik petriler kullanıldığı bu denemelerde bazı endofitik bakteri izolatlarından bazılarının kökçük uzunluğuna yönelik etkileri Şekil 9’ da gösterilmektedir.



Şekil 9. B4 no’lu endofitik bakterinin bölmeli petride Sayar-314 çeşiti pamuk tohumlarında kökçük uzunluğuna etkisi.



Şekil 10. C5 no’lu endofitik bakterinin bölmesiz petride Sayar-314 çeşiti pamuk tohumlarında kökçük uzunluğuna etkisi.

4.5. Biyokimyasal Testler

Pamuk bitkilerinden elde edilen toplam 12 adet antagonistik bakteri izolatının gram boyama ve biyokimyasal tanılama testleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 15’de değerlendirilmiştir.

Çizelge 15. Pamuk bitkilerinden izole edilen endofitik bakterilerin gram boyama ve bazı biyokimyasal test sonuçları

İzolat No	Gram boyama	KOH testi	Isı Testi	Fluoresan pigment	Oksidaz testi	Patateste yumuşak çürüklük	Levan oluşumu	Nitrat redüksiyon testi	O/F testi	Arginine dehidrolizi testi
B4	-	+	-	+	+	-	-	+	+/-	-
B5	-	+	-	+	+	-	+	+	+/-	+
B8	-	+	-	+	+	-	-	+	+/-	-
C5	+	-	+	-	-	-	-	-	+/+	-
E2	+	-	+	-	-	-	-	-	+/+	-
E21	-	+	-	+	+	-	-	+	+/-	+
E22	-	+	-	+	+	-	-	+	+/-	+
F2	-	+	-	-	+	-	-	-	+/-	-
F5	-	+	-	-	+	-	-	-	+/-	-
F8	-	+	-	+	+	-	+	+	+/-	+
H9	-	+	-	+	+	-	+	+	+/-	-
I3	-	+	-	+	+	-	-	+	+/-	+
Ecc-133*		+			-	+		+	+/+	
Pss-577*	-	+		+	-	-	+			+
Bt*	+	-	+		+					
E-595*	-	+			-		+			
<i>P.tolasii</i>		+								+

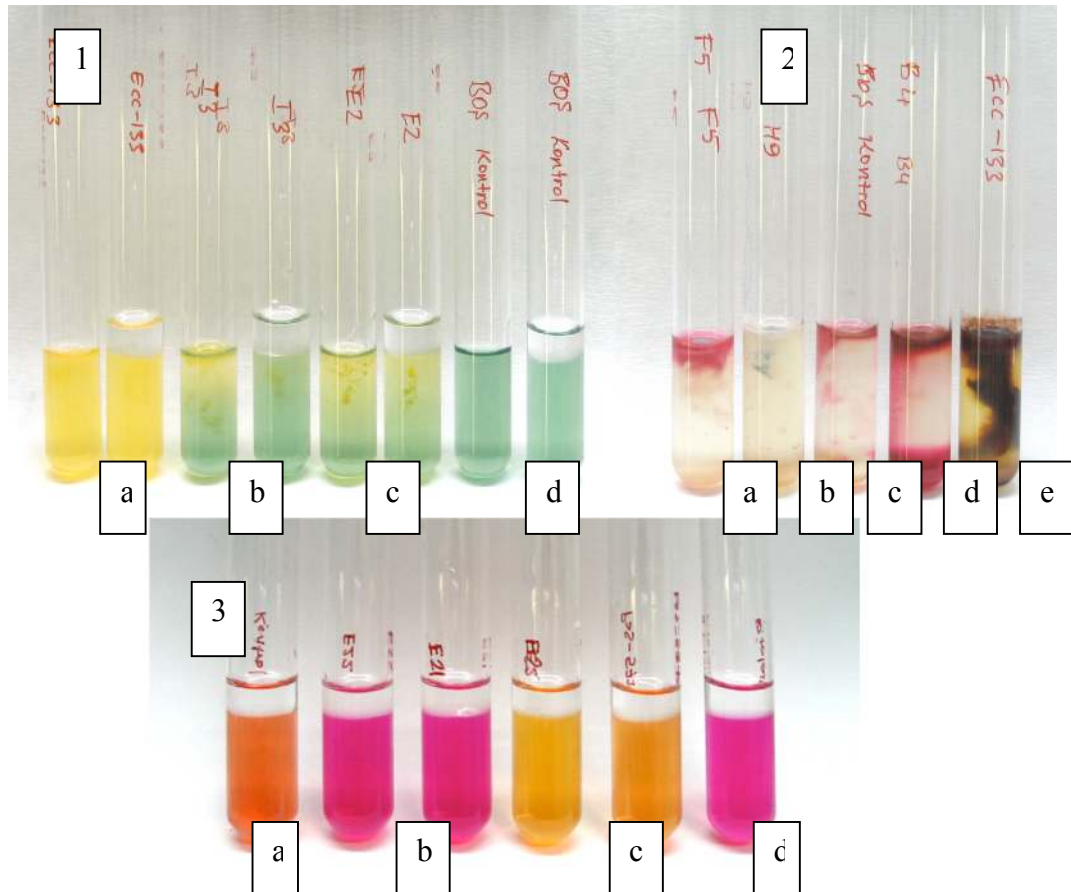
(+) Pozitif (-) Negatif Sonuç

Ecc -133 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, Bt *Bacillus thuringiensis*, E-595 *Erwinia amylovora*, *P.tolasii* *Pseudomonas tolasii*, Pss-577 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Çizelge 15’de görüldüğü gibi test edilen bakterilerden C5 ve E2’nin gram pozitif diğerlerinin ise gram negatif bakteri olduğu belirlenmiştir. C5 ve E2 bakterileri KOH (potasyum hidroksit) ve ısı testlerine pozitif sonuç verirken diğer bakteriler ise bu testlere negatif sonuç vermiştir. Bu bakteriler gram boyama sonucu

mikroskop altında incelendiğinde çubuk şekilli ve endospor içerdikleri dikkati çekmiş ve *Bacillus* cinsine bağlı bakteriler olabileceği kanısına varılmıştır.

Gram negatif izolatlardan B4, B5, B8, E21, E22, F8, H9 ve I3 PAF besiyerinde UV ışık altında floresans veren bakteriler olduğu görülmüştür. Bu nedenle Fluorasan *Pseudomonas*lar olarak değerlendirilmiş ve *Pseudomonas* genusuna ait bakteriler olduğu sonucuna varılmıştır. Tüm *pseudomonas* izolatları oksidaz pozitif, nitrat pozitif olarak bulunmuş ve hiç birisi patatesten yumuşak çürüklüğe neden olmamıştır. *Pseudomonas* izolatlarından, 3 tanesi (B5, F8 ve H9) levan pozitif, 5 tanesi de (B5, E21, E22, F8, I3) Arginine hidrolaz pozitif bulunmuştur. Biyokimyasal testlerde gram negatif bakterilerin hiç birisi glikozu hem oksidatif hemde fermentatif olarak kullanmamış, bu nedenle de izolatlar içinde *Enterobacteriaceae*'e ait bir bakteri türü olmadığı kanısına varılmıştır.



Şekil 11. Endofitik bakterilerin biyokimyasal test sonuçları. [1- O/F testi a) pozitif, pozitif b) pozitif, negatif, c) pozitif, pozitif d) inokule edilmemiş kontrol 2-Nitrat redüksiyonu testi a) negatif b) pozitif c) inokule edilmemiş d ve e) pozitif 3-Arginine dehidrolizi testi a) inokule edilmemiş kontrol b)pozitif c) negatif d) pozitif].

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda Aydın İli ve ilçelerindeki pamuk üretimi yapılan alanlardan hastalık belirtisi gösteren yabancı ot ve pamuk bitki örnekleri alınmış ve yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda 7 tanesi pamuk bitkilerinden 1 tanesi de Horoz ibiği bitkisinden olmak üzere toplam 8 adet *Verticillium* spp. izolatu elde edilerek morfolojik yapıları, sklerot oluşturma özellikleri ve pamuk bitkilerinde patojenisite testleri sonucunda *V. dahliae* olarak tanılanmıştır (Çizelge 5). Ülkemizde yapılan çalışmalarda, hastalığa yakalanma oranının İzmir, Aydın ve Manisa illerinde %27 (Uygun ve ark., 1978'e atfen Sezgin, 1985), Adana'da %0.01(Esentepe, 1979), Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde %16.27 (Sağır ve ark., 1995), Antalya'da %14 (Esentepe, 1979) olduğu bulunmuştur. Ege Bölgesi'nde *V. dahliae* kayısı, yer fıstığı, kavun, *Amaranthus viridis*, *Datura* sp., *Erigeron* sp. ve *Xanthium strumarim*'dan izole edilmiştir (Kocatürk ve Karcıhoğlu, 1976).

Pamuk üretim alanlarından alınan pamuk ve yabancı ot bitki örneklerinden yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda yabancı otlardan 117 adet bakteri izolatu elde edilmiş ancak *Verticillium dahliae*'a etkili bir antagonist endofitik bakteriye rastlanmamıştır. Pamuk bitkilerinden ise toplam 163 adet bakteri izolatu elde edilmiş antagonistik etki gösteren toplam 12 adet endofitik bakteri elde edilebilmiştir. Zinniel *et al.* (2002) 4 kültür bitkisi (soya, sorgum, buğday ve mısır) ve 27 farklı bitki türünden 853 endofitik bakteri izolatının fenotipik özelliklerini belirlemiş ve hiçbirinin patojenik özellik taşımadığını ve izolatlardan bazılarının biyolojik mücadelede kullanılabileceğini bildirmiştir.

Çalışmamızda pamuk bitkisinden elde edilen 12 adet endofitik bakteri izolatından *V. dahliae*'nın misel gelişimine karşı *in-vitro*' da etkilerini belirlemek amacıyla yapılan ikili kültür testlerinin sonucunda en yüksek antagonistik etki sırasıyla F2 (% 66,8), F5 (%61,8), B8 (%48,7), C5 (%47,7), E22 (43,7) ve B4 (%42,2) izolatlarından elde edilmiştir. Buna karşılık *in-vivo* testlerde *V. dahliae*'a karşı en iyi sonuç E21, C5 ve F5 izolatlarından alınabilmiştir (Çizelge 8). Bu endofitlerden sadece 2 tanesi *in-vitro* da antagonistik etkiye sahip olup E21 nolu izolatın *in-vitro* etkinliği ise oldukça düşüktür. Zheng-Qing *et al.* (1999b), Çin'de yapmış oldukları çalışmada endofitik bakteri izolatlarından 73a ve A1a' nın pamukta

V. dahliae ırklarından JC1b ve BP2 nin misel gelişimini sırasıyla %51,0 ve 53,3 oranında engellediğini bildirmişlerdir.

Endofitik bakterilerin *in-vitro* ve *in-vivo* etkinlikleri arasında tam bir korelasyon söz konusu olmadığı gibi (Mercado-Blanco *et al.*, 2004) bu bakteri türünden türüne ve biyolojik etki mekanizmasına göre de değişebilmektedir. Örneğin Chen *et al.* (1995), pamuklarda Fusarium Solgunluk hastalığına karşı endofitik bakterilerle biyolojik mücadele olanaklarını araştırdığı çalışmasında pamuk bitkilerinden izole ettiği 170 endofitik bakteriden 49 tanesi pamukta kök hastalıklarına karşı *in vitro*’da etkili bulunurken Fusarium Solgunluğuna karşı *in-vivo* testlerde sadece 6 izolatin etkili olduğunu belirtmiştir. Adı geçen araştırmacılar etkili bulunan bu endofitlerin pamuk gövdesinde 28 güne kadar kolonize olabildiğini, testlenen 5 izolattan 2 tanesinin bitki içinde hareket edebildiğini bildirmiştir. Denemelerimizde etkili bulunan endofitik bakterilerden F5 ve E21 tohum inokulasyonu sonrası bitki köklerinde içsel olarak kolonize olabildiğini, bunlardan E21’in gövde de kolonize olabileceğini göstermiştir. Quadts-Hallman *et al.* (1997a), endofitik bir SIR özellikli bakteri olan *P. fluorescens* 89B-61’in pamuk bitkisindeki içsel kolonizasyonu serolojik testlerle incelemiştir. Araştırmacılar izolasyon çalışmaları sonucunda tohum uygulaması sonrasında 89B-61’in kök içindeki popülasyonu gram dokuda 1.1×10^3 hücre şeklinde bulunurken bakterinin gövde, kotiledon veya yapraklardan izole edilemediğini bildirilmiştir. Quadts-Hallmann *et al.* (1997b), pamuklardan izole ettikleri bir başka endofit bakteri *Enterobacter asburiae* ırk JM22’nin pamuk tohumlarının su agarda çimlendirilerek bakteri ilavesi şeklinde uyguladıkları çalışmada; endofitik bakterinin yara açılmaksızın aktif bir şekilde dokuların içine girebildiğini ve kökçük içinde bakteri popülasyonunun gram dokuda 3.8×10^3 bakteri hücresine ulaştığını belirtmişlerdir. Adams and Kloepper (2002), pamuk bitkilerinde endofitik bakterilerin varlığının belirlenmesinde konukçu genotipinin etkisini araştırmışlar ve pamuk bitkisinin tohum çimlenmesini takiben orijini ister toprak isterse tohum olsun endofitik bakterileri bünyesine aldığını saptamışlardır. Bu kolonizasyonun pamuk çeşitlerine göre değişen oranda genetik, fizyolojik ve morfolojik kriterlere göre farklılıklar gösterebileceğini ifade etmişlerdir. Çalışmalarımızda etkili bulunan endofitik bakteriler hepsi pamuk orijinli olup farklı pamuk çeşitlerinden izole edilmiştir (Çizelge 6).

Biyolojik mücadelede kullanılan ve bitki gelişimini teşvik eden bakterilerin önemli etki mekanizmalarından biri de fosfat çözme yeteneklerinin olmasıdır (Freitas *et al.*, 1997). Pamuklardan izole edilen endofitik bakteri izolatlarımız fosfatı çözme özellikleri açısından değerlendirildiğinde 12 izolattan 6 tanesi fosfatı çözebilme özelliğinde olduğu belirlenmiştir. Gerek bitki gelişimini teşvik gerekse hastalığın engellenmesi ile fosfat çözebilme özelliği arasında bir ilişkinin varlığı ilerde yürütülecek çalışmalarla aydınlatılması gerekir.

Bölmeli petriler kullanarak endofitik bakterilerin uçucu bileşikler yardımı ile fungal gelişmeyi engelleyebildiği ve de pamuk bitkilerinin kökçük gelişimini teşvik ettiği çalışmalarımızla saptanmıştır (Çizelge 13 ve 14). Benzer şekilde Çin’de yapılan bir çalışmada 73a kodlu endofitik bakteri ile muamele edilen pamuk tohumlarının çimlenme gücünün arttığı saptanmıştır (Zheng-Qing *et al.* 1999a). *V. dahliae* ve *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici* ile bulaşık toprakta yetiştirilen domates ve kolza bitkilerinde endofitik bakteriler tarafından hastalığın kontrol altına alınması ve bitki gelişme hızının incelendiği bir çalışmada *in-vitro* koşullarda kolza tohumlarının çimlenme gücünün arttığı ayrıca patojenlerin miselial gelişiminin uçucu bileşiklerle engellendiği rapor edilmiştir (Nejad and Johnson, 2000). Avustralyada yapılan bir çalışmada (Dass and Teyegaga, 1996) *Bacillus subtilis* bakterisinin oluşturduğu uçucu bileşiklerin odun dokularında çürümeye neden olan funguslarda engelleyici etkiye sahip uçucu bileşikler oluşturduğunu bildirmiştir. Son yıllarda yapılan bir araştırma ile bazı gelişmeyi teşvik edici rizobakteriler tarafından üretilen uçucu bileşiklerin *Arabidopsis thaliana* bitkisinin gelişmesini teşvik ettiğini kesin olarak ortaya konmuştur (Ryu *et al.*, 2003).

Çalışmalarımızda izole edilen endofitik bakterilerden 2 tanesinin *Bacillus* türü olabileceği, 8 tanesinin *Pseudomonas* cinsi bakteriler olduğu sonucuna varılmış bunlardan 1 *Bacillus* türü ve 1 Fluoresan *Pseudomonas* türü *in-vivo*’ da en etkili izolatlar olarak saptanmıştır. Pamuk bitkilerinde endofitik bakterilerin varlığına yönelik araştırmalarda yaygın olarak bulunan bakterilerin *Agrobacterium* sp., *Serratia* sp., *Burkholderia* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Pseudomonas* sp., *Variovorax* sp., *Acinetobacter* sp., *Arthrobacter* sp. ve *Enterobacter* sp. olabileceği (McInroy and Kloepper, 1995), ancak bunların içinde Fluoresan *Pseudomonas*ların

en yaygın endofitler olduğu bilinmektedir (Leben *et al.*,1987; Berg *et al.* 1994; Chen *et al.*, 1995, Mercado-Blanco *et al.*, 2004).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemizde *Verticillium dahliae*'nin neden olduğu solgunluk hastalığına karşı endofitik bakterilerin biyolojik mücadele de kullanımına yönelik ilk olan bu çalışma ile söz konusu bakterilerle hastalığın kontrolü konusunda ümitvar sonuçlar elde edilmiştir. Sera koşullarında etkili bulunan bu izolatlarla tarla denemelerinin yapılarak etkinliklerin araştırılması uygun olacaktır. Ayrıca izole edilen endofitik bakterilerin tür düzeyinde tanımlanması, farklı pamuk çeşitlerinde kolonizasyonu, hastalığa karşı tolerant çeşitlerle birlikte kullanımı, etki mekanizmalarının belirlenmesi ve bitki gelişimi ile aralarındaki korelasyon olup olmadığının saptanması gibi daha detaylı çalışmaların yapılması gerekir.

Bu çalışma ile elde edilen önemli bulgulardan biri de son yıllarda biyolojik kontrolde yeni bir etki mekanizması olarak ortaya çıkan uçucu bileşiklerin varlığıdır. Çalışmamızda izole edilen endofitik bakterilerin oluşturduğu uçucu bileşikler sayesinde *V. dahliae* miseliyal gelişiminin engellenebildiği ve de bitki gelişimi teşvik edebileceği sonuçları elde edilmiştir. Ancak kesin kanıya varabilmek için bu konuda da ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır.

ÖZET

Bu çalışma, 2004 (Temmuz – Kasım) ve 2005 (Eylül) yılları arasında Aydın İli ve ilçelerinde pamuk yetiştirilen alanlardaki yabancı ot ve pamuk bitkilerinden endofitik bakteri izole etmek ve izole edilen bu bakterilerin *Verticillium Solgunluğu* hastalığına karşı *in-vivo* ve *in-vitro* etkinliklerini ve ayrıca bitki gelişimine olan etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda yabancı ot ve pamuk bitkilerinden toplam 280 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Yürütülen *in-vitro* testlerde pamuk bitkilerinden toplam 12 adet antagonist bakteri izolatu elde edilirken yabancı otlardan endofitik bakteri izole edilememiştir. Ayrıca hastalık belirtilerinin görüldüğü yabancı ot ve pamuk bitkilerinden yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda 1 adet yabancı ot ve 7 adet pamuk bitkisinden olmak üzere toplam 8 adet *Verticillium* spp. izolatu elde edilmiş ve pamuk bitkisinde yapılan patojenisite çalışmaları sonucunda bu izolatların *Verticillium dahliae* olduğu belirlenmiştir. Pamuk bitkisinden izole edilen *in vitro*'da ön eleme testinde etkili bulunan ve bitki patojeni olmadığı tütün testi ile tespit edilen 12 adet endofitik bakteri izolatından *in- vitro*'da *Verticillium dahliae*'nın gelişimine karşı en yüksek etki F2 (% 66,8), F5 (% 61,8) ve B8 (% 48,7) izolatlarında saptanmıştır. *In-vivo* koşullarda ise antagonist bakterilerin *V. dahliae*'a karşı hastalık şiddeti değerlendirmelerinde E21, C5 ve F5 izolatları etkili bulunmuştur. *In-vivo* testlerde etkili bulunan antagonist bakterilerden E21 ve F5 izolatlarından rifampicine dayanıklı mutant ırk elde edilebilmiş ve pamuk fidelerindeki dağılımı incelendiğinde bu ırkların köklerde içsel olarak kolonize olabildiği belirlenmiştir. Mutant antagonist bakteri izolatlarının *V. dahliae*'a karşı etkinliklerinde normal izolatlarla kıyaslandığında yüzde hastalık şiddetleri açısından istatistiki olarak fark olmadığı ve hastalığı kontrol altına alabildiği görülmüştür. Ayrıca izole edilen endofitik bakterilerin doğrudan fungus gelişimine etkilerini incelemek amacıyla bölmesiz petride en yüksek engelleme F5 (%31,43), F2 (% 31,43) ve C5 (% 11,43) izolatlarında kaydedilirken bölmeli petride uçucu bileşiklerin gelişmeyi teşvik etkilerine yönelik en yüksek etki ise E22 (% 20,75), I3 (% 11,32) ve E21 (% 9,43) izolatlarında bulunmuştur. 12 adet Antagonist bakteriden E22, E21, B5, F8, I3 ve H9 izolatlarının fosfat çözebilme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan gram boyama ve biyokimyasal testler sonucunda 2 endofitik bakterinin gram pozitif ve *Bacillus* cinsine ait olduğu 8 adedinin ise floresan *Pseudomonas* cinsine ait olduğu saptanmıştır.

SUMMARY

BIOLOGICAL CONTROL OPTIONS OF VERTICILLIUM WILT (*Verticillium dahliae* KLEB.) OF COTTON BY ENDOPHYTIC BACTERIA

In 2004-2005 growing season, the study was carried out in cotton growing areas of Aydin province and towns with the aim of isolating endophytic bacteria from cotton and weed plants and using the bacteria *in-vitro* and *in-vivo* activity against Verticillium wilt and growth promotion of cotton radicle. Eight fungal isolates (7 from cotton plants and 1 *Amaranthus* sp.) were collected from cotton growing fields in Aydin and identified as *Verticillium dahliae* according to the morphological characteristics and pathogenicity tests. Twelve bacterial strains out of 280 isolates were isolated from weeds and cotton plants showed *in-vitro* antagonistic effect against *V. dahliae*. None of the twelve-endophytic bacterial strains reacted as non-pathogenic in tobacco hypersensitivity test. The most effective isolates against *V. dahliae* were and F2 (% 66,8), F5 (% 61,8) and B8 (% 48,7) *in -vitro* tests while the isolates E21, C5 and F5 were significantly reduced Verticillium wilt symptoms *in vivo* tests. The rifampicin resistant strains of E21, C5 and F5 were also tested for colonization in cotton seedlings and disease reduction ability comparing non-mutant ones. Endophytic strains were further evaluated for the inhibition capacity of mycelial growth of *V. dahliae* and growth promotion effect of cotton seedlings by means of volatile compounds in divided plastic petri dishes. The volatile compounds of F5 (% 31,43), F2 (% 31,43) and C5 (% 11,43) significantly inhibited mycelial growth of *V. dahliae* and E22 (% 20,75), I3 (% 11,32) and E21 (% 9,43) significantly induced radicle growth of cotton. The antagonistic strains were determined for the ability of phosphate solubilization and E22, E21, B5, F8, I3 and H9 were found to solubilize phosphate *in-vitro*. Two endophytic strains were identified as *Bacillus* sp. and eight was fluorescent *Pseudomonas* according to gram staining and biochemical tests.

TEŞEKKÜR

Araştırma konumun seçiminde ve çalışmalarım sırasında büyük katkı ve yardımlarını gördüğüm danışman hocam Sayın Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU'na ve Araştırma Görevlisi Ümit ÖZYILMAZ'a, Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri ZRF-05030 no'lu projeye ve TÜBİTAK 104O181 no'lu projeye, ayrıca çalışmalarımda bana destek sağlayan proje ekibindeki hocalarım Prof. Dr. Seher BENLİOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Ayhan YILDIZ'a ve desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- ADAMS P.D. and J.W. KLOEPPER, 2002. Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant and Soil. 240(1): 181-189.
- AGRIOS G.N., 1997. Plant Pathology. Akademik Press. 635 p. Florida.
- ANONYMOUS 2004a. Pamuk Birliđi/Pamuk Hakkında [<http://www.tariřcom.tr/t-index-t.asp>] Eriřim Tarihi: 26.08.2004.
- ANONYMOUS 2004b. Pamuk alıřma grubu raporu [[http://www.tzob.org.tr / tzob_ana_sayfa. htm](http://www.tzob.org.tr/tzob_ana_sayfa.htm)] Eriřim Tarihi: 26.08.2004.
- ANONYMOUS 2004c. Pamuk [[http://www.gap.gov.tr/ Turkish/ Tarım/ Tarlayt/ pamuk](http://www.gap.gov.tr/Turkish/Tarım/Tarlayt/pamuk)] Eriřim Tarihi: 26.08.2004.
- ANONYMOUS 2006. *Verticillium dahliae* (Verticillium Solgunluğu)'nın sistematitđi [[http://www.tr.wikipedia. Org/wiki/Pamuk htm](http://www.tr.wikipedia.Org/wiki/Pamuk.htm)] Eriřim Tarihi:07.06.2006.
- BRADBURY J. P., 1970. Isolation and Preliminary Study of Bacteria from Plants. Rev. Pl. Path. 49(5): 213-218.
- BERG G., C. KNAEPE, G. BALLIN, and D. SEIDEL, 1994. Biological Control of *Verticillium dahliae* Kleb. By Natural Occuring Rhizosphere Bacteria. Arch. Phytopath. Pflanz. 29:249-262.
- CHEN C., E.M. BAUSKE, G. MUSSON, R. RODRIGUEZ-KÁBANA and J.W. KLOEPPER, 1995. Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. Biological Control. 5:83-91.
- ETİN V. ve A. ATA, 1995. Adana'da bazı pamuk eřitlerinin solgunluk (*Verticillium dahliae* Kleb.) hastalığına duyarlılıklarının belirlenmesi üzerinde alışmalar. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri. 26-29 Eylül 1995, Adana.
- DASS C. and A. TEYEGAGA, 1996. Growth Suppression of Some Wood-Decay and Other Fungi by *Bacillus subtilis*. Australian Journal of Botany. 44(6):705-712.
- DOLAR M.S., 1984. Akdeniz pamuklarında görülen solgunluk hastalığı (*Verticillium dahliae*)'na karşı bazı pamuk çeşitlerinin duyarlılıklarını saptanması üzerinde alışmalar. Bitki Koruma Bülteni. 24(3).

- ESENTEPE M., 1979. Adana ve Antalya illerinde 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.47s.
- FAHY P.C. and A.C. HAYWARD (eds), 1983. Media and methods for isolation and diagnostic tests In: Plant Bacterial Diseases Academic Pres, Sydney.
- FREITAS J.R., M.R. BANERJEE and J.J. GERMIDA, 1997. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). Biol Fertil Soils. 24:358-364.
- HALLMANN J., A. QUADT-HALLMANN, W.F. MAHAFFEE and J.W. KLOEPPER, 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology. 43:895-914.
- HONGLIAN I., X. YUAN-HONG, Y. WANG, L. HUANG-JUN, X. CAI-JUN, W. SHOUZHENG, HL. LI, H.X. YUAN, Y. WANG, J.L. HUANG, J.X. CAI, S. Z. WANG, 1999. Studies on the relationship between diversity of microbes in rhizosphere and resistance of cotton cultivars to *Verticillium dahliae*. II. The fungi flora in the rhizosphere of different cotton cultivars and its inhibition to *V. dahliae*. Acta-Phytopathologica-Sinica. 1999, 29 (3): 242-246.
- İYRİBOZ N., 1941. Mahsul hastalıkları. No:1, Ziraat Vekaleti Neşriyatı, Umum No: 237, Ankara.
- JOHNSON S. and L. MACKINNON, 2002. Plant protection interactions with weeds. University of New England.
- KARACA İ., A. KARCILIOĞLU and S. CEYLAN, 1971. Wilt diseases of cotton in the Ege Region of Turkey. The journal Turkish Phytopathol., İzmir. 1 (1):4-11.
- KARCILIOĞLU A., E. ONAN, H.B. KABADAYI ve İ. NAZA, 1992. Behaviour of Some Cotton Varieties to Cotton Wilt Disease Caused by *Verticillium dahliae* Kleb. J. Turk. Phytopath. 21(1) : 49-53.
- KİNG E.O., M.K. WARD and D.E. RANEY, 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J. Lab. Clin. Med. 44:301-307.
- KLEMENT Z., 1963. Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonas. Nature 199: 299-300.

- KLEMENT Z., 1968. Pathogenicity factors in regard to relationships of phytopathogenic bacteria. *Phytopathology*, 58:1218-1222.
- KLEMENT Z., K. RUDOLPH and D.C. SANDS, 1990. Method in Phytobacteriology. 568p. Akademykiado, Budapest.
- KLOEPPER J.W., R. RODRIGUEZ-UBANA, G.W. ZEHNDER, J.F. MURPHY, E. SIKORA and C. FERNÁNDEZ, 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology*. 28: 21-26.
- KOCATÜRK S.C. ve A. KARCILIOĞLU, 1976. Research on identification of hosts and species of *Verticillium* in the Aegean Region. *Zirai Mücadele Araştırma Yıllığı*. 10 (19-20): 50.
- KOVACS N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature (London)* 178 :703.
- LEBEN S.D., J.A. WADI and G.D. EASTON, 1987. Effects of *Pseudomonas fluorescent* on potato plant growth and control of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 77: 1592-1595.
- LELLIOT, R.A., E. BILLING and A.C. HAYWARD, 1966. A Determinative scheme for the Fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. *Journal of Applied bacteriology*. 29: 470-489.
- MCINROY J.A and J.W. KLOEPPER, 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil* 173:337–342.
- MERCADO-BLANCO J., D. RODRIGUEZ-JURADO, A. HERVES and R.M. JIMENEZ-DIAZ, 2004. Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biological Control* 30:474–486.
- MUSSON G.J., A. MCINROY and J.W. KLOEPPER, 1995. Development of Delivery systems for introducing endophytic bacteria, *Biocontrol Science and Technology* 5:407-416.
- NEJAD P. and P.A. JOHNSON, 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oil seed rape and tomato. *Biological Control* 18(3):208-215.

- ONAN E., 1993. Effect of Soil Solarization on the Viability of *Verticillium dahliae* Kleb. Microsclerotia in Aegean Region of Türkiye. J. Türk. Phytopath. 22(2-3):85-89.
- ONAN E. ve A. KARCILIOĞLU, 1998. Pathotypes *Verticillium dahliae* from cotton in Aegean Region and Review of *Verticillium* Wilt Tolerance in Nazilli 84 Cotton. J. Turkish Phytopath. 27(2-3):113-120.
- ONAN E., A. KARCILIOĞLU ve M. ÇİMEN, 1994. Effect of solarization in controlling *Verticillium* Wilt of cotton in Aegean Region of Türkiye. J. Turkish Phytopath. 23(1):1-7.
- QUADT-HALLMANN A., J. HALLMANN and J.W. KLOEPPER, 1997a. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. Canadian Journal of Microbiology. 43(3):254-259.
- QUADT-HALLMANN A., N. BENHAMOU and J.W. KLOEPPER, 1997b. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant Canadian Journal of Microbiology. 43: 577-582.
- RYU C.M., M.A. FARAG, H.U, C.H. REDDY, M.S. WEI, H.X. PARE P.W. and J.W. KLOEPPER, 2003. Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis Proc Natl Acad Sci U S A. 100(14):8607.
- SAĞIR A. ve F. TATLI, 1995. Pamuk Solgunluk hastalığı etmeni (*V. dahliae* Kleb.)'ne karşı pamuk çeşitlerinin duyarlılıklarının belirlenmesi üzerine araştırmalar. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri. 26-29 Eylül 1995, Adana.
- SAĞIR A., F. TATLI ve 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.
- SAĞIR A. ve S. BAŞBAĞ, 1998. Pamukta solgunluk hastalığı (*Verticillium dahliae* Kleb.) üzerine damla sulama yönteminin etkisi.VIII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri. 21-25 Eylül 1998, Ankara.
- SAYDAM C., M. COPÇU ve E. SEZGİN, 1973. Studies on the inoculation techniques of cotton wilt caused by *Verticillium dahliae* Kleb. J. Turkish Phytopath.2(2): 69-75.

- SCHNATHORST W.C. and D.E. MATHRE, 1966. Host range and differentiation of a severe form of *Verticillium albo-atrum* in cotton. *Phytopathology* 56:1155–1161
- SEZGİN E., 1985. Pamuk solgunluk hastalığı ile savaşta kültürel işlemlerin önemi. Bornova Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü. Yıllık, 3:23-31.
- THANASSOULOPOULOS C.C., D.A. BIRIS and E.C. TJAMOS, 1981. Weed hosts as inoculum sources of *Verticillium* in Olive Orchards. *Phytopath. Medit.* 20:164-168.
- TJAMOS E.C., D.I. TSITSIGIANNIS, S.E. TJAMOS, P.P. ANTONIOU and P. KATINAKIS, 2004. Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts *European Journal of Plant Pathology*. 110: 35–44.
- TURHAN G., L.Y. GÖKOVA ve T. HAYAT, 1995. *Chaetomium jodhpurens*'nin Patlıcanda *Verticillium* Solgunluğuyla Biyolojik Savaşta Etkinliği Üzerinde Araştırmalar. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 26-29 Eylül, 87-90, Adana.
- UÇKAN A., A. KARCILIOĞLU, H. DÜNDAR ve A.G. ÖNGEN, 1998. Pamuk üretiminde kullanılan bazı bitki gelişme düzenleyicilerinin *Verticillium* Solgunluk etmeni (*Verticillium dahliae* Kleb.) hastalığına etkileri üzerinde araştırmalar. VIII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri. 21-25 Eylül 1998, Ankara.
- ULUKUŞ İ., 1988. The antagonistic effect of a *Bacillus* sp. Against some bacterial and fungal plant pathogens and some antagonistic fungi. *The Journal of Turkish Phytopath.* 17 (3).
- ZHENGJUN X., G. BENKANG, W. AIMING and F. ZHEN-GQING, 1997. Isoenzymatic activities involved induced resistance of cotton to *Verticillium dahliae* by endophytic bacteria. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences* 13(2): 99-101.
- ZHENG-QING F., X. ZHENGJUN, W. AIMIN, Y. YONGBIN, Q. ZHENG and G. BENKANG, 1999a. The mechanism for controlling cotton wilt (*Verticillium dahliae*) by endophytic bacteria. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences* 15 (4):211-215.

ZHENG-QING F., X. ZHENGJUN, W. AIMIN, Y. YONGBIN, Q. ZHENG and G. BENKANG, 1999b. Inhibition of mycelial growth and toxin production of *Verticillium dahliae* and growth promotion of cotton by endophytic bacteria. *Acta Phytopathologica Sinica* 29(4):374-375.

ZINNIEL D.K., L. PATLAMBRECHT, N.B. HARRIS, Z. FENG, D. KUCZMARSKI, P. HIGLEY, C. A. ISHIMARU, A. ARUNAKUMARI, R.G. BARLETTA and A.K. VIDAVER, 2002. Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. *Applied And Environmental*.

Ek 1. *In-vitro*'da *V. dahliae*'nın gelişimine karşı antagonistik bakterilerin etkilerinin saptanmasında karakterlere ait varyans analiz tablosu

Kaynak	SD	Kareler Toplamı	Kareler Ort.	F Değeri	Prob > F
Karakterler	12	1231.3974	102.616	22.4204	<.0001
Hata	26	119.0000	4.577		
Toplam	38	1350.3974			

Ek 2. Antagonist bakteri izolatları ile kaplanmış Sayar 314 çeşidi pamuk tohumlarından oluşan bitkilerde *V.dahliae* inokulasyonu sonrası hastalık şiddetleri varyans analiz tablosu

1. Sayım

Kaynak	SD	Kareler Toplamı	Kareler Ort.	F Değeri	Prob > F
İzolatlar	12	1053.4173	87.7848	3.0873	0.0024
Hata	52	1478.5901	28.4344		
Toplam	64	2532.0074			

2. Sayım

Kaynak	SD	Kareler Toplamı	Kareler Ort.	F Değeri	Prob > F
İzolatlar	12	22142.665	1845.22	3.1644	0.0019
Hata	52	30322.173	583.12		
Toplam	64	52464.838			

3. Sayım

Kaynak	SD	Kareler Toplamı	Kareler Ort.	F Değeri	Prob > F
İzolatlar	12	24915.426	2076.29	3.6264	0.0006
Hata	52	29772.623	572.55		
Toplam	64	54688.048			

4. Sayım

Kaynak	SD	Kareler Toplamı	Kareler Ort.	F Değeri	Prob > F
İzolatlar	12	14635.726	1219.64	3.5299	0.0007
Hata	52	17967.034	345.52		
Toplam	64	32602.760			

Ek 3. Beş Antagonist bakteri izolatları ile kaplanmış Sayar 314 çeşidi pamuk tohumlarından oluşan bitkilerin 2 *V. dahliae* izolatı ile inokulasyonu sonrası yüzde hastalık şiddeti istatistik analiz tabloları

Tüm Model Varyans Analiz Taslosu

Kaynak	SD	Kareler Toplamı	Kareler Ort.	F Değeri
Model	11	159997.71	14545.2	50.1642
Hata	108	31314.92	290.0	Prob > F
Toplam	119	191312.63		<0.0001

***V. dahliae* izolatları en küçük kareler ortalama tablosu**

Düzy	En küçük Kareler ort.		Standart Hata	Ort.
PYDV-6	83.082667		2.1983059	83.0827
Vp1a	12.485833		2.1983059	12.4858

Vd Leverage, P<.0001

Antagonist Bakteriler En küçük kareler ortalama tablosu

Düzy	En küçük Kareler ort.		Standart Hata	Ort.
B8	50.846000		3.8075775	50.8460
C5	52.058500		3.8075775	52.0585
E21	48.845500		3.8075775	48.8455
F5	33.268500		3.8075775	33.2685
H9	46.416500		3.8075775	46.4165
Kontrol	55.270500		3.8075775	55.2705

Antagonist Leverage, P=0.0019

Antagonist Bakteriler x *V. dahliae* izolatları en küçük kareler ort. tablosu,

Düzy	En küçük Kareler ort.		Standart Hata
B8, PYDV-6	93.875000		5.3847278
B8, Vp1a	7.817000		5.3847278
C5, PYDV-6	87.417000		5.3847278
C5, Vp1a	16.700000		5.3847278
E21, PYDV-6	81.500000		5.3847278
E21, Vp1a	16.191000		5.3847278
F5, PYDV-6	58.704000		5.3847278
F5, Vp1a	7.833000		5.3847278
H9, PYDV-6	79.000000		5.3847278
H9, Vp1a	13.833000		5.3847278
Kontrol, PYDV-6	98.000000		5.3847278
Kontrol, Vp1a	12.541000		5.3847278

Antagonist x Vd Leverage, P=0.0113

Ek 4. Mutant ve Normal Antagonist bakteri izolatları ile inokule edilen 2 farklı pamuk çeşitinin *V. dahliae*'a (PYDV-6) reaksiyonları istatistiki analiz sonuçlarını gösteren varyans analiz tablosu
Sayar 314 Ort. Hastalık Şiddeti

Kaynak	SD	Kareler Toplamı	Kareler Ort.	F Değeri	Prob > F
İzolatlar	4	3193.109	798.277	1.2644	0.2980
Hata	45	28411.725	631.372		
Toplam	49	31604.833			

Acala Maxa Ort. Hastalık Şiddeti

Kaynak	SD	Kareler Toplamı	Kareler Ort.	F Değeri	Prob > F
İzolatlar	4	2799.715	699.929	0.8642	0.4928
Hata	45	36447.997	809.955		
Toplam	49	39247.712			

Ek 5. Antagonistik bakterilerin *in-vitro*'da *V. dahliae*'nın gelişimine karşı oluşturdukları engelleme zonları ile ilgili istatistiki analiz sonuçlarını gösteren varyans analiz tablosu

Bölmeli petride *V. dahliae* koloni yarıçapları

Kaynak	SD	Kareler Toplamı	Kareler Ort.	F Değeri	Prob > F
İzolatlar	12	0.45431373	0.037859	3.2015	0.0095
Hata	21	0.24833333	0.011825		
Toplam	33	0.70264706			

Bölmesiz petride *V. dahliae* koloni yarıçapları

Kaynak	SD	Kareler Toplamı	Kareler Ort.	F Değeri	Prob > F
İzolatlar	12	1.1696667	0.097472	16.8511	<.0001
Hata	17	0.0983333	0.005784		
Toplam	29	1.2680000			

Ek 6. Antagonist bakteri izolatlarının Sayar 314 pamuk tohumlarının kökçük uzunluğuna olan etkileri ile ilgili istatistiki analiz sonuçlarını gösteren varyans analiz tablosu

Bölmesiz petride kökçük uzunlukları

Kaynak	SD	Kareler Toplamı	Kareler Ort.	F Değeri	Prob > F
İzolatlar	12	321.73813	26.8115	3.9684	0.0016
Hata	26	175.66093	6.7562		
Toplam	38	497.39907			

Bölmeli petride kökçük uzunlukları

Kaynak	SD	Kareler Toplamı	Kareler Ort.	F Değeri	Prob > F
İzolatlar	12	331.69510	27.6413	4.3489	0.0008
Hata	26	165.25353	6.3559		
Toplam	38	496.94864			

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Gümüşhane’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İzmir’de tamamladı. 1997 yılında girdiği Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü’nden 2001 yılında mezun oldu. 2003 yılında Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı.