



Yüzüncü Yıl Üniversitesi  
Tarım Bilimleri Dergisi  
(YYU Journal of Agricultural Science)



<http://dergipark.gov.tr/yyutbd>

Araştırma Makalesi (Research Article)

**Biberde Phytophthora Yanıklığına Karşı Antagonist Bakterilerle Biyolojik Mücadele**

**Ümit ÖZYILMAZ**

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 09100, Aydın, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-posta: uozyilmaz@adu.edu.tr

**Makale Bilgileri**

Geliş: 26.07.2019  
Kabul: 07.10.2019  
Online Yayınlanma 31.12.2019  
DOI: 10.29133/yyutbd.597443

**Anahtar kelimeler**

Biyokontrol,  
İkili kültür,  
Kökçük testi,  
qPCR,  
*Phytophthora capsici*.

**Öz:** Bu çalışma ile biberde *Phytophthora* yanıklığı hastalığına karşı antagonist bakteriler ile biyolojik mücadele olanakları araştırılmıştır. Biyolojik mücadele çalışmalarında kullanılmak üzere biber köklerinden antagonist bakteri adayları izole edilmiştir. Daha sonra antagonistlerin hastalık etmenine karşı olan antimikrobiyal etkileri ikili kültür, kökçük testi, saksı ve tarla denemeleri ile değerlendirilmiştir. Çalışmalar sırasında toplam 95 adet antagonist bakteri izolatu elde edilirken, bunlardan 21 tanesi ikili kültür testlerinde hastalık etmeninin misel gelişimini %20-82 oranında engellemiştir. Kullanılan antagonistlerin yapılan kökçük testlerinde hastalık çıkışını %93'e varan bir oranda engellemek suretiyle etkili olduğu saptanmıştır. Yapılan saksı denemelerinde test edilen antagonistlerden bazıları hastalık etmenini engellerken bazılarının da hastalık şiddetini arttırdığı bulunmuştur. Biyolojik mücadelenin değerlendirildiği tarla denemelerinde ise ümitvar sonuçlar elde edilmiştir.

**Biological Control of Phytophthora Blight of Pepper with Antagonistic Bacteria**

**Article Info**

Received: 26.07.2019  
Accepted: 07.10.2019  
Online Published 31.12.2019  
DOI: 10.29133/yyutbd.597443

**Keywords**

Biocontrol,  
Dual culture,  
Radicle assay,  
qPCR,  
*Phytophthora capsici*.

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the possibilities of biological control of *Phytophthora* blight in pepper by using antagonistic bacteria. For biological control studies, antagonist bacteria were isolated from pepper roots. Antimicrobial effects of bacterial antagonists against disease agent was tested by dual culture, radicle assay, potting and field experiments. A total of 95 isolates of antagonists were isolated during the study, of which 21 had mycelial inhibition rates of 20-82% in the dual culture tests. Bacterial antagonists were found to be effective for suppression of disease development up to 93% in radicle assay. Some of the antagonists tested in the pot experiments inhibited the disease, however others were found to increase disease severity. Promising results were obtained in field trials.

**1. Giriş**

Biber (*Capsicum annuum* L.) bitkilerinde *Phytophthora* yanıklığı hastalığına neden olan *Phytophthora capsici* (Leonian), biber üretimi yapılan birçok ülkede ciddi kayıplara neden olan oomycete üyesi bir hastalık etmenidir. Sulama suyunun anahtar rol oynadığı hastalık ile mücadelede temel olarak kültürel önlemler ön plana çıkmakta (Hausbeck ve Lamour, 2004) ancak kimyasallar (Hausbeck ve Lamour, 2004; Zhang ve ark., 2011) ve biyolojik mücadele (Akgül ve Mirik, 2008; Sang ve ark., 2008; Kim ve ark., 2012; Mei ve ark., 2010; Robles-Yerena ve ark., 2010; Sopheareth ve ark., 2013; Özyılmaz ve Benlioğlu, 2013) ile ilgili yapılmış birçok çalışma da bulunmaktadır.

Günümüzde kimyasal pestisitlerin kullanımı ile ilgili katı düzenlemeler yapılmış ve birçok tehlikeli kimyasalın pazardan çekilmesi için dünyada politik baskılar uygulanmaktadır. Bundan dolayı birçok araştırmacı bu sentetik kimyasallara alternatif kontrol yöntemleri üzerine yoğunlaşmıştır (Pal ve Mc Spadden Gardener, 2006). Ayrıca bu tür kimyasallara karşı etmenin dayanıklılık oluşturmaları ve fitotoksitenin meydana gelmesi başka bir handikaptır (Parra ve Ristaino, 2001; Hausbeck ve Lamour, 2004; Qi ve ark., 2012; Pang ve ark., 2013). Biyolojik mücadele; uygulanabilir, doğa dostu bir alternatif olarak kabul görmektedir.

Topraktaki mikroorganizma popülasyonunun araştırılmasında (Fierer ve ark., 2005) ve biyokontrol çalışmalarında (Sanzani ve ark., 2014) kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Quantitative polymerase chain reaction [qPCR]) yöntemi başarıyla kullanılmaktadır. Son yıllarda popüler olan qPCR yönteminden hedef nükleik asitlerin saptanmasında ve miktarının belirlenmesinde hızlı, hassas, basit, yüksek doğrulukta ve ucuz olarak yararlanılmaktadır.

Bu çalışma ile sağlıklı biber bitkileri köklerinden izole edilen antagonist bakterilerin Phytophthora yanıklığı hastalığına olan etkinliği ikili kültür, kökçük testleri, saksı ve tarla denemeleri ile değerlendirilmiş ve ayrıca saksı denemelerinde uygulamalara ait bitki ve toprak örneklerinde etmenin kantitatif olarak qPCR yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

Çalışmada *Phytophthora capsici* izolatu olarak Aydın ili Koçarlı ilçesinden izole edilen, virülensi yüksek, tanısı yapılmış bir izolat olan PcK1 kullanılmıştır. Çalışmanın tüm aşamalarında California Wonder çeşidi biber bitkilerinden yararlanılmıştır. Saksı çalışmaları 16 saat ışık 8 saat karanlık fotoperiyotlu 26°C'ye ayarlı iklim odasında yürütülmüştür.

### 2.1. Antagonist bakteri izolasyonu

Antagonist adayı bakteriler, Aydın'ın Çine, Karpuzlu, Köşk ilçelerinde biber ekimi yapılan tarlalarda, sağlıklı biber bitkisi köklerinin yüzeyinden, 2013 yılı Mayıs-Eylül aylarında izole edilmiştir. Kök örnekleri 3 gram tartılmış ve 27 ml %0.85 NaCl içinde 1 dakika stomacher karıştırıcı (BagMixer®) ile çalkalanmıştır. Çalkalama sıvısından seyreltme serileri hazırlanmış ve 100 ppm cycloheximide içeren King B besi yerine yayılarak ekilmiştir. 25°C'de 4 gün inkubasyonun ardından farklı morfolojiye sahip bakteri kolonilerinden saflaştırma yapılmıştır (Berg ve ark., 2002).

### 2.2. İkili kültür çalışmaları

Antagonist adayı bakterilerin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi amacıyla ikili kültür testleri yapılmıştır. Bunun için PDA besi yerinin merkezinden 2.5 cm uzaklıktaki dört eşit noktaya 10 µl bakteri süspansiyonu damlatılmış ve 24 saat sonra hastalık etmenine (PcK1) ait 1 cm çaplı misel plağı merkeze konulmuştur. Bakteri inokulasyonu yapılmamış sadece hastalık etmenine ait misel plağı bulunan bir besi yeri ise kontrol olarak bırakılmıştır. 25°C sıcaklıkta inkubasyona bırakılan petrilere değerlendirme kontrol petrisindeki miseliyal gelişim 5 cm çapa ulaştığı zaman yapılmıştır. Oluşan engelleme zonları ölçülmüş ve etki oranları hesaplanmıştır (Özyılmaz, 2007). Denemeler 4 tekerrürlü yürütülmüştür. Etki gösteren antagonistler %20 gliserin içeren Nutrient Broth besi yerinde -80°C'de stoklanmıştır.

### 2.3. Kökçük testi

Bitki, patojen ve antagonist bakterinin petri kabında bir araya getirildiği kökçük testi ile antagonist bakterilerin hastalığa olan durdurucu etkisine bakılmıştır. Sağlıklı görülen biber tohumları yıkanmış, yüzey dezenfeksiyonu yapılmış ve durulanmıştır. Tohumlar nemlendirilmiş filtre kağıtları bulunan petrilere üç gün bekletilmiş ve çimlendirilmiştir. Homojen çimlenen tohumlar 10 mM MgSO<sub>4</sub> içindeki 10<sup>9</sup> hücre/ml bakteri süspansiyonunda üç saat bekletilmiş ve daha sonra steril kurutma kağıtları üzerinde bekletilerek nemi alınmıştır. %0.02 glikoz içeren su agarda beş gün gelişen *P. capsici* (PcK1) izolatının kenarına tohumlar 10'ar adet dizilmiş ve petrilere 26°C'de 16 saat ışık 8 saat karanlık fotoperiyotta inkubasyona bırakılmıştır. Üç gün sonra bakteri uygulaması yapılmayan kontrol

petrilerdeki kökçüklerin kararmasıyla değerlendirmeler yapılmıştır (Sang ve ark., 2008). Değerlendirmede sağlıklı kalan tohumların oranı hesaplanmıştır. Testler tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Kontrol olarak; patojen bulunan ve bulunmayan iki ayrı karakterde tohumlar sadece 10 mM MgSO<sub>4</sub> içinde bekletilmiştir.

## 2.4 Tanılama çalışmaları

Çalışmada ikili kültür ve kökçük testlerine göre etkili bulunan antagonist bakteri izolatlarının değerlendirilmesine yardımcı olması için; gram reaksiyonu, KB besi yerinde UV ışık altında ışıma verme, spor oluşumu için sıcaklık testi, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu ve 37°C'de gelişme yetenekleri saptanmıştır (Klement ve ark., 1990; Schaad ve ark., 2001). Bitkilerde bakterilere karşı oluşabilecek bir hassasiyetin belirlenmesi ve bu izolatların elenmesi amacıyla tütünde aşırı duyarlılık testleri yapılmıştır. Ayrıca izolatlarının 16S rRNA gen dizi analizi yapılarak moleküler düzeyde tanılanmaya çalışılmıştır. Bunun için 24 saatlik bakteri kültürlerinden su içine hazırlanan süspansiyonlar steril santrifüj tüpler içinde kaynatılmış ve santrifüj edilmiştir. Süpernatant PCR çalışmasında kalıp olarak kullanılmıştır. Amplifikasyon, 40 µl PCR karışımı içinde 4 µl kalıp DNA olacak şekilde 27F/1492R primer çiftleri (Lane, 1991) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (27F: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3', 1492R: 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). PCR koşulu 35 döngü olacak şekilde; 94°C de 10 sn, 55°C de 15 sn ve 72°C de 20 sn olarak ayarlanmış, ayrıca 94°C de 1 dk başlangıç denatürasyonu ile 72°C de 5 dk son uzama adımları programa eklenmiştir. Amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi amacıyla ürünler jel elektroforez yöntemiyle yürütülerek görüntülenmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin saflaştırılması ve gen dizi analizleri MacroGen firmasına yaptırılmıştır. Elde edilen diziler NCBI (The National Center for Biotechnology Information) web sayfasında bulunan veri tabanından BLASTN 2.2.29 algoritması kullanılarak taranmış ve eşleşen olası bakteri türleri çıkarılmaya çalışılmıştır (Zhang ve ark., 2000).

## 2.5. Saksı denemeleri

Antagonist bakterilerin hastalığa olan etkilerinin araştırıldığı saksı denemelerinde %1 (hacim/hacim) oranında inokulum içeren hastalıklı toprak kullanılmıştır (Kurze ve ark., 2001). Plastik saksılarda (100 ml) steril toprak harcında yetiştirilen 2-3 yapraklı biber fideleri etkinliği test edilecek olan bakterinin 10<sup>9</sup> hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonu ile 25 ml olacak şekilde bir kere sulanmıştır. Üç gün sonra bu bitkiler saksılarından toprakları ile çıkarılmış, tabanında inokulumlu toprak bulunan daha büyük bir saksıya (500 ml) yerleştirilmiş ve boşluklar steril harç ile doldurulmuştur. Ayrıca Bion MX 44 WG ve Ridomil Gold MZ 68 WG adlı ticari ilaçlar ayrı birer karakter olarak denemeye eklenmiştir (sırasıyla 0.2 g/l, 2.5 g/l dozlarda, püskürtme ve içirme olacak şekilde toplam 4 karakter). Değerlendirme uygulamadan 3 hafta sonra Özyılmaz ve Benlioğlu (2013)'da belirtilen skala değiştirilerek yapılmıştır (0: sağlıklı bitki, 1: yaşlı yapraklar solmuş, 2: en üst 2-3 yaprak hariç tüm yapraklar solmuş, 3: tüm yapraklar solmuş, 4: tüm yapraklar dökülmüş, 5: tüm yapraklar dökülmüş ve tüm gövdeyi kaplamış nekroz, tamamen ölü bitki). Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre 5 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

Skala değerlendirmesinin sonunda, toprakta ve bitkide patojen miktarının belirlenmesi için qPCR çalışmaları yapılmıştır. Bunun için kök yüzeyine yapışmış topraklar alınmış, elenmiş ve MOBIO PowerSoil® DNA Isolation Kit kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Daha sonra bitkiler yıkanarak temizlenmiş, kök boğazı kalacak şekilde üst aksam uzaklaştırılmış, kök-kök boğazı homojenize edildikten sonra QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu DNA ekstraktları ile qPCR çalışmaları yürütülmüştür. Bunun için ITS bölgesinden 73 bp'lik bir bölgesi amplifiye eden Pcap-q-1F/R (F: 5'-GGA ACC GTA TCA ACC CTT TTA GTT G-3', R: 5'-CGC CCG GAC CGA AGT C-3') primer çifti kullanılmıştır (Pavón ve ark., 2008). Reaksiyon hazır karışımı olarak EvaGreen (BioRad) kullanılmış ve RealTime PCR cihazı olarak BioRad CFX96'dan yararlanılmıştır. qPCR koşulları 98°C'de 3 dk başlangıç denatürasyonu ile; 95°C'de 10 sn denatürasyon, 65°C'de 5 sn annealing ve 72°C'de 30 sn uzama adımları 40 döngü olacak şekilde ayarlanmıştır. Okuma FAM kanalından uzama bitiminde yapılmıştır. Ayrıca, 65°C'den 95°C'ye 0.5°C adımlarla 5 sn süre beklemeli erime eğrisi adımları protokol sonuna eklenmiştir. İşlem sonunda örneklere ait Ct değerleri belirlenmiştir. qPCR çalışmaları sırasında, pozitif kontrol izolatu

(PcK1) DNA ekstraksiyonu seyreltme serisi yardımıyla hesaplanan standart eğri denklemi kullanılarak (verim[E] = %102,  $r^2 = 0.996$ , eğim = -3.272, y-int = 38.476, threshold = 44.98) örneklerdeki DNA miktarları hesaplanmış ve uygulama yapılmamış hastalıklı kontrol ile karşılaştırılarak antagonist bakterilerin etkinlikleri belirlenmiştir. Bu çalışmalara ayrıca, arazi çıkışları sırasında izole edilen ve patojenisitesi yapılmış altı adet *P. capsici* izolatu (veri sunulmamıştır) pozitif kontrol olarak ve stok kültürlerden temin edilmiş tanısı yapılmış *Verticillium dahliae*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* ve *Phytophthora cactorum* etmenlerinin DNA ekstraktları negatif kontrol olarak dahil edilmiştir.

## 2.6. Tarla denemeleri

Biyolojik korumanın değerlendirildiği tarla denemeleri; önceden biber üretimi yapılmamış bir tarlada (Lat:37.760273, Lon:27.756865), tesadüf blokları deneme desenine göre 5 karakter ve 4 tekerrürlü olacak şekilde, 2014 yılı Mayıs ayı ortasında kurulmuştur. Deneme alanında biberlerin dikilmesi için 70 cm aralıklarla sırtlar oluşturulmuş ve biberler 35 cm ara ile bu sırtlara dikilmiştir. 15 metre uzunluğunda olan sırtların her biri bir karakterin bir tekerrürü olarak düşünülmüş ve toplamda 20 sırt kullanılmıştır. Denemede Pca2 ve Pca12 antagonist bakterileri değerlendirilmiştir. Biri gram pozitif diğeri gram negatif olan bakteriler, tütünde aşırı duyarlılık testi negatif, arazide kullanılabilecek miktarda kitle üretime uygun (veri sunulmamıştır) ve tıp literatüründe doğrudan ya da bağışıklık sistemi zayıflığı hastalığı olarak dolaylı yer almayanlar içinden seçilmeye çalışılmıştır. Sağlıklı kontrol bitkileri hariç diğer tüm fideler şaşırtılmadan önce topraktaki fide dikim deliklerine 5 ml %0.5 patojen inokulumu içeren toprak konulmuş ve üzerine 20 ml temiz toprak eklenmiştir. Bakteri uygulamalarında fideler su içine hazırlanan  $10^9$  hücre/ml yoğunluğundaki bakteri süspansiyonu içinde yarım saat bekletildikten sonra şaşırtılmıştır. İlaçlı kontrol fideleri ise 2.5 g/l su dozunda hazırlanan Ridomil Gold MZ 68 WG ilacında yarım saat bekletildikten sonra dikilmiştir. Hastalıklı kontrol fidelerine sadece su uygulanmıştır. Sulama damla sulama şeklinde yapılmıştır. Haftada bir gözlem yapılarak ölen bitkiler sayılmış, iki ay sonra sayım sonlandırılmış ve uygulamaların hastalığa olan etkileri hesaplanmıştır. Ayrıca deneme boyunca tarlanın 10 cm derinliğindeki toprak sıcaklığı veri kaydedici ile saatlik kaydedilmiştir (Onset Hobo data logger, TMC6-HD sıcaklık algılayıcı).

## İstatistik analizler

Laboratuvar, iklim odası ve tarla çalışmalarında elde edilen verilere tek yönlü varyans analizi yapılmıştır. Ortalama değerler arasında fark çıkması durumunda  $p < 0.05$  düzeyinde asgari önemli fark (LSD) analizleri gerçekleştirilmiştir.

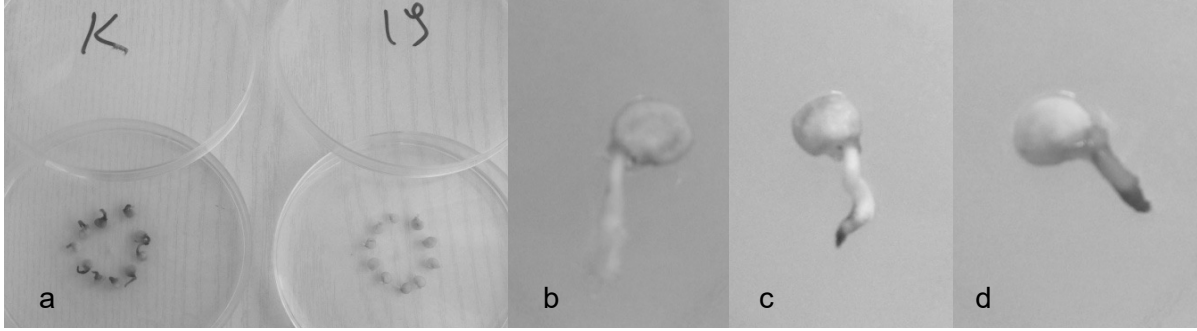
## 3. Bulgular

### 3.1. Antagonist bakteri izolasyonu

Yapılan arazi çıkışlarında toplanan sağlıklı biber bitkilerinin köklerinden toplam 95 adet farklı koloni morfolojisine sahip antagonist adayı bakteri izolatu elde edilmiş ve saflaştırılmıştır. İzolasyon çalışmaları sırasında yapılan seyreltmelerde  $10^{-3}$  ve  $10^{-4}$  seyreltmelerin bakteri kolonilerinin gözlenmesi ve saflaştırılması açısından uygun olduğu belirlenmiştir.

### 3.2. İkili kültür çalışmaları

İkili kültür test sonuçlarına göre 95 adet bakteri izolatından 21 tanesinin hastalık etmenine karşı %20 ile %82 arasında bir engelleme yaptığı saptanmıştır. Bu izolatlarından 10 tanesi %50 nin üzerinde bir engelleme göstermiştir. Pca6 ve Pca2 izolatlarının hastalık etmeninin misel gelişimini engellemesi açısından antagonistik etkisi en yüksek (sırasıyla %82 ve %80) izolatlar olarak belirlenmiştir (Çizelge 1).



Şekil 1. Kökçük testi 3. gün sonuçları (a: Kontrol ve Pca19 uygulaması, b: sağlıklı, c: kökçük ucunun çürümesi, d: kökçüğün tamamının çürümesi).

### 3.3. Kökçük testi

Kökçük testlerinde bazı kökçüklerin sağlıklı kaldığı, bazılarının da tamamen hastalandığı gözlenmiştir. Ancak bazı kökçüklerde ise sadece agara değen uç kısımda lezyon oluştuğu, aynı şartlardaki hastalıklılara göre daha sağlıklı olduğu görülmüştür (Şekil 1). Pca19, Pca20 ve Pca21 antagonist izolatlarının kökçükleri hastalık etmenine karşı %93 oranında koruduğu görülmüştür. Bunu Pca15, Pca1, Pca12, Pca4 izolatları izlemiştir (Çizelge 1).

### 3.4. Tanılama Çalışmaları

Antagonist bakteri izolatlarının tanılama testlerinde; tümünün hücre şekli çubuk olarak saptanırken, bunlardan Pca2 ve Pca13 gram pozitif diğerlerinin gram negatif olduğu, spor testi sonucunda yine bu iki izolatın 80°C sıcaklığa dayanarak spor oluşturduğu saptanmıştır. Pca1, Pca3, Pca12, Pca14, Pca15, Pca16, Pca17, Pca18, Pca19, Pca20 ve Pca21 izolatlarının 37°C de gelişmediği görülürken; Pca6, Pca8, Pca9 ve Pca11 izolatlarının King B besi yerinde ultraviyole ışık altında besi yerine yayılır ışyan bir pigmentasyon oluşturdu görülmüştür. Bunlara ek olarak Pca1 ve Pca3 izolatının tütünde aşırı duyarlılık testi sonucunun pozitif çıktığı saptanmıştır.

16s rRNA sekans analizi sonucu elde edilen DNA dizilerinin veri tabanı eşleşmeleri (NCBI) incelendiğinde, eşleşmenin %95 ve üzeri bir benzerlikle gerçekleştiği görülmüştür. Tarama sonucunda: Pca1, Pca3: *Pseudomonas mediterranea*; Pca4, Pca7, Pca17, Pca18: *Pseudomonas lini*; Pca6, Pca8, Pca9: *Pseudomonas thivervalensis*; Pca11: *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neourantiaca*; Pca5, Pca10, Pca20, Pca21: *Pseudomonas* spp.; Pca2: *Bacillus subtilis*; Pca12: *Lysobacter capsici*; Pca13: *Bacillus tequilensis*; Pca14: *Lysobacter gummosus*; Pca15: *Lysobacter enzymogenes*; Pca16: *Dyella marensis*; Pca19: *Stenotrophomonas maltophilia* olarak belirlenmiştir.

### 3.5. Saksı denemeleri

Saksı denemelerinde bitkiler hastalıklı toprağa şaşırtıldıktan 3 hafta sonra değerlendirme yapılmış ve 0-5 skalası kullanılarak elde edilen veriler kaydedilmiştir. Hastalıklı kontrole göre hastalığı engelleme oranları Çizelge 1'de verilmiştir. Pca18, Pca17, Pca19, Pca20 ve Pca3 en etkili izolatlar olarak bulunmuştur.

Ayrıca ilaç uygulamalarının hem püskürtme hem de içirme yöntemlerinden etkili sonuç alındığı saptanmıştır (Ridomil püskürtme hariç). İklim odası biyolojik mücadele çalışmalarında bazı izolatlar etkisiz olarak saptanırken bunun yanında bazılarının hastalıklı kontrolün üzerinde bir skala değerine sahip olduğu ve hastalığı teşvik ettiği bulunmuştur.

İklim odası koşullarında yapılan biyolojik mücadele denemelerinin ardından alınan toprak ve bitki örnekleri değerlendirilmiş ve uygulamaların hastalık miktarına olan etkileri qPCR testleri ile araştırılmaya çalışılmıştır. Bunun için ilk önce toprak ve bitki örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Pozitif örnek DNA seyreltme serisinden elde edilen formül kullanılarak toprak ve bitki örnekleri içindeki hastalık etmenine ait DNA miktarları hesaplanmıştır. Bitki örneklerinde  $1.6 \times 10^8$  fg/gram\_bitki\_doku ve toprak örneklerinde  $3 \times 10^7$  fg/gram\_toprak miktarına kadar etmene ait DNA

Çizelge 1. Biyolojik kontrol çalışmaları sonuçları

Uygulama	<i>In-vitro</i> ikili kültür (engelleme %)	Kökçük testi (sağlıklı kökçük %)	Saksı denemesi		Bitkide qPCR		Toprakta qPCR	
			Skala	Engelleme %	fg/g bitki	Etmen DNA azalma	fg/g toprak	Etmen DNA azalma
Pca6	82±4a	7±5.8 cd	2.8±2.3efghi	7	7.25x10 <sup>7</sup> e	<-100	1.43x10 <sup>9</sup> hij	6
Pca2	80±2a	0±0.0 d	4±2.2ghi	-33	9.14x10 <sup>3</sup> a	100	2.98x10 <sup>6</sup> abc	80
Pca14	68±2b	0±0.0 d	3.2±2.2fghi	-7	2.06x10 <sup>6</sup> a	54	7.93x10 <sup>6</sup> ef	48
Pca4	67±5bc	27±23.1 bc	4.2±1.8hi	-40	9.59x10 <sup>6</sup> ab	<-100	1.60x10 <sup>6</sup> ab	89
Pca12	66±2bc	30±10 b	3.2±2.5efghi	-7	4.37x10 <sup>5</sup> a	90	1.37x10 <sup>7</sup> ghi	10
Pca15	62±2bc	40±26.5 b	2.2±2.3cdefg	27	9.86x10 <sup>5</sup> a	78	1.43x10 <sup>7</sup> hij	6
Pca9	62±4bc	0±0.0 d	4.4±0.5i	-47	1.70x10 <sup>4</sup> a	100	1.84x10 <sup>6</sup> abc	88
Pca8	61±0c	17±5.8 bc	3.8±1.1fghi	-27	3.10x10 <sup>3</sup> a	100	3.05x10 <sup>7</sup> l	<-100
Pca17	53±4d	3±5.8 d	0±0.0a	100	0.00x10 <sup>0</sup> a	100	2.69x10 <sup>6</sup> abc	82
Pca7	52±3d	10±17.3 cd	2.6±2.4defghi	13	7.23x10 <sup>5</sup> a	84	9.79x10 <sup>6</sup> fg	35
Pca16	47±4de	0±0.0 d	2.4±2.5cdefgh	20	1.48x10 <sup>7</sup> b	<-100	4.14x10 <sup>6</sup> bcde	73
Pca18	45±9ef	0±0.0 d	0±0.0a	100	8.97x10 <sup>4</sup> a	98	2.88x10 <sup>7</sup> kl	-90
Pca21	42±2efg	93±11.5 a	3.6±0.5fghi	-20	5.66x10 <sup>3</sup> a	100	7.53x10 <sup>6</sup> def	50
Pca20	41±2efg	93±11.5 a	0.6±0.9abc	80	5.19x10 <sup>2</sup> a	100	1.06x10 <sup>7</sup> fgh	30
Pca5	40±5efg	0±0.0 d	4.4±0.5i	-47	9.77x10 <sup>4</sup> a	98	2.20x10 <sup>6</sup> abc	86
Pca11	39±0fg	0±0.0 d	2±2.7cdef	33	2.34x10 <sup>5</sup> a	95	1.82x10 <sup>7</sup> j	-20
Pca13	39±3fg	0±0.0 d	4.2±0.8hi	-40	6.38x10 <sup>7</sup> e	<-100	4.69x10 <sup>6</sup> bcde	69
Pca10	37±2g	0±0.0 d	2.4±1.8cdefgh	20	2.82x10 <sup>7</sup> c	<-100	3.72x10 <sup>6</sup> abcd	75
Pca19	37±2g	93±11.5 a	0.4±0.9ab	87	6.46x10 <sup>3</sup> a	100	8.77x10 <sup>4</sup> a	99
Pca3	27±2h	10±10 cd	1.6±0.9abcde	47	1.60x10 <sup>8</sup> g	<-100	4.73x10 <sup>6</sup> bcde	69
Pca1	20±2i	40±10 b	4.4±0.9i	-47	4.80x10 <sup>6</sup> ab	-8	5.60x10 <sup>6</sup> cde	63
Knt (H)	0±0j	0±0.0 d	3±1.4efghi	na	4.43x10 <sup>6</sup> ab	na	1.51x10 <sup>7</sup> ij	na
Knt (S)	nt	100±0.0 a	0±0.0a	100	0.00x10 <sup>0</sup> a	100	0.00x10 <sup>0</sup> a	100
RP	nt	nt	3.6±1.1fghi	-20	1.19x10 <sup>8</sup> f	<-100	2.65x10 <sup>7</sup> kl	-75
RI	nt	nt	0±0.0a	100	1.29x10 <sup>3</sup> a	100	1.09x10 <sup>6</sup> ab	93
BP	nt	nt	0.8±1.1abcd	73	3.88x10 <sup>7</sup> d	<-100	2.55x10 <sup>7</sup> k	-69
BI	nt	nt	0±0.0a	100	2.56x10 <sup>6</sup> a	42	0.00x10 <sup>0</sup> a	100

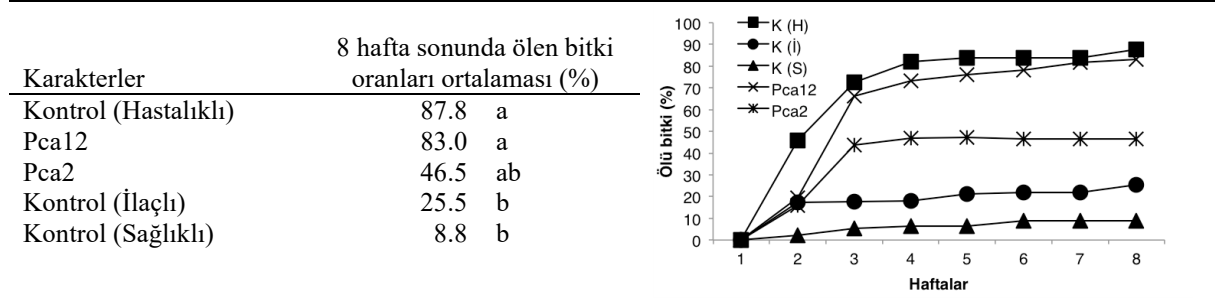
Sıralama ikili kültür test sonucuna göre yapılmıştır. Çizelgedeki değerler en az 3 tekrerrün ortalamasıdır. Aynı harf ile gösterilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur (tek yönlü ANOVA, LSD p < 0.05). Skala değerleri için karekök, oransal değerler için arcsin transformasyonu yapılmıştır. Negatif değerler hastalık artışını göstermektedir. Oransal değerler kontrol karakteri ile karşılaştırılması sonucu elde edilmiştir. Knt (H): Hastalıklı kontrol, Knt (S): Sağlıklı kontrol, RI: Ridomil içirme, RP: Ridomil püskürtme, BI: Bion içirme, BP: Bion püskürtme. nt: Test edilmedi, na: Uygulanabilir değil.

saptanmıştır (Çizelge 1). Bu şekilde antagonist bakteri uygulamalarının etmen üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir. Bitki örneklerinde etmene ait saptanan DNA miktarlarına bakıldığında Pca17, Pca20, Pca8, Pca21, Pca19, Pca2 ve Pca9 un %100 oranında kontrole göre etmene ait DNA miktarında azalma olduğu görülmektedir. Bazı antagonist uygulamalarında hastalık oranının hastalıklı kontrole göre arttığı saptanmıştır. Toprak örneklerindeki DNA miktarlarına bakıldığında ise Pca19, Pca4, Pca9, Pca5, Pca17 ve Pca2 izolatlarının etmene ait DNA miktarını %80 ve üzeri bir oranda azalttığı görülmektedir. İçirme şeklinde yapılan ilaç uygulamalarının ise etmeni toprakta büyük ölçüde temizlediği de bulunmuştur. Bazı antagonist bakteri uygulamalarında kontrole göre daha fazla oranda toprakta etmene ait DNA bulunmuştur. Testlere eklenen diğer pozitif kontroller de uygun birer Ct değeri verirken, negatif kontroller Ct değeri vermemiştir. Ayrıca *P. capsici* DNA'sı içeren örneklerin hepsinde erime eğrisi 79.5°C'de tepe noktası oluşturacak şekilde ve birbirinin identifiği olarak bulunmuştur.

### 3.6. Tarla denemeleri

Tarla denemesinde dikimi takiben 2 ay boyunca her hafta tüm bitkiler incelenmiş ve ölen bitkiler kayıt edilerek bir tekrerrüdeki ölen bitkilerin oranları belirlenmiştir. Bazı ölen bitkiler laboratuvara getirilerek izolasyon yapılmış ve ölüm nedenlerinin *P. capsici* olduğu teyit edilmiştir. Deneme sonunda hastalıklı kontrole ait bitkilerin %88'i ve Pca12 izolatına ait bitkilerin %83'ü ölmüş

ve aynı grupta yer almıştır. Hastaliksız kontrolde ise çeşitli nedenlerden dolayı ölen bitkilerin oranı %9 olarak bulunmuş ve bu bitkilerden yapılan izolasyon çalışmalarından hastalık etmeni izole edilmemiştir. Bunu takiben ilaçlı kontrolde (Ridomil Gold MZ 68 WG) %26 bitki kaybı gerçekleşmiştir. Pca2 izolatında ise %47 oranında ölen bitki saptanırken bunun istatistiki olarak ilaçlı kontrol ile aynı grupta yer aldığı görülmüştür (Şekil 2).



Şekil 2. Arazi denemesinde 8 hafta sonunda ölen bitki oranları ortalaması. Aynı harfle gösterilen değerler arasında istatistiki olarak fark yoktur (LSD,  $P < 0.05$ ).

Tarla denemeleri boyunca alınan 10 cm derinlikteki toprak sıcaklıkları incelendiğinde özellikle Haziran ayının ortasına kadar günlük ortalama toprak sıcaklıklarının 30°C'nin altında seyretmesini takiben, Haziran ayı sonu itibariyle sıcaklıkların arttığı ve bu tarihten itibaren günün en sıcak saatlerinde artık sıcaklığın en az 39 °C olduğu kaydedilmiştir.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada; biberde ciddi ürün kayıplarına neden olan *Phytophthora* yanıklığı hastalığı (*Phytophthora capsici*)'nin kontrolünde yine biber köklerinden izole edilen antagonist bakterilerin kullanılma olanakları araştırılmıştır. Bu kapsamda antagonist bakterilerin izolasyonu, tanılanması ve bunların etmene karşı olan etkileri hem *in-vitro* hem de *in-vivo*'da değerlendirilmiştir.

Çalışmalar sırasında toplam 95 adet antagonist adayı bakteri izole edilmiş, bunlar içinden 21 tanesi (%22) yapılan ikili kültür testleri ile potansiyel antagonist olarak belirlenmiştir. Bu antagonistlerden %20 ile %82 arasında bir etki elde edilmiştir. İkili kültürde en iyi sonuç veren izolatların ise Pca6 ve Pca2 izolatları olduğu (sırasıyla %82 ve %80) bulunmuştur. Mei ve ark. (2010) çalışmalarında 98 antagonist bakteri adayı içinden seçtikleri iki izolatın %68 ve %72 oranlarında etmenin misel gelişimini durdurduğunu bulmuşlar ve bu antagonistleri *Paenibacillus polymyxa* ve *Bacillus pumilus* olarak tanılamışlardır. Çalışmamızda izole edilen antagonist bakterilere bakıldığında çoğunluğun *Pseudomonas* spp. (*P. mediterranea*, *P. lini*, *P. thivervalensis*, *P. brassicacearum* ve diğer tür düzeyinde tanılanamamış *Pseudomonas*lar) olduğu görülmüştür. Bunlara ek olarak *Bacillus* spp. (*B. subtilis*, *B. tequilensis*), *Lysobacter* spp. (*L. gummosus*, *L. capsici*, *L. enzymogenes*), *Dyella marensis* ve *Stenotrophomonas maltophilia* türleri de izole edilmiştir. İzole edilen bu türlere bakıldığında *Stenotrophomonas maltophilia* klinik olarak incelenen patojenler içinde yer almasının yanında biyolojik savaş çalışmalarında da rol aldığı görülmüştür (Messiha ve ark., 2007). *Pseudomonas mediterranea* ise bitki patojenleri içinde yer almaktadır. Buna rağmen çıkan tür isimlerinin literatür tarandığında çok büyük bir çoğunluğunun bitki ile ilişkili ve/veya biyolojik savaşta kullanılan ajanlar olduğu görülmüştür. Örneğin, Park ve ark. (2008), biber köklerinden izole edilen *Lysobacter capsici* izolatının *Pythium ultimum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Botryosphaeria dothidea*, *Sclerotinia sclerotiorum* ve *Aspergillus fumigatus* fungal etmenlerinin gelişimini durduğunu, özellikle *Colletotrichum* spp. ve *Pythium ultimum*'a karşı güçlü durdurucu etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ancak ikili kültür ile değerlendirdikleri *Lysobacter antibioticus*, *L. enzymogenes* ve *L. gummosus*'un *Colletotrichum gloeosporioides* ve *Pythium ultimum*'a ya etki etmediğini ya da bu etkinin çok az olduğunu bulmuşlardır. Buna benzer olarak, Puopolo ve ark. (2010), yaptığı bir çalışmada tütün bitkisinin kökünden izole ettiği bir *Lysobacter capsici* izolatının, içinde *P. capsici*'nin de bulunduğu birçok hastalık etmenine karşı engelleyici etkisinin olduğunu bulmuşlardır. Çalışmamızda *L. gummosus*, *L.*

*capsici* ve *L. enzymogenes* izolatları elde edilmiştir ve Pca2 kodlu *L. capsici* izolatu tarla çalışmalarına değerlendirilmek üzere alınmıştır.

Bilindiği üzere *Pseudomonas* ve *Bacillus* türleri biyolojik savaşta sıklıkla kullanılan ve literatürde karşılaşılan biyolojik kontrol ajanlarını içermektedir. *Pseudomonas*lar; kök bölgesine iyi adapte olmuş, geniş bir biyolojik etki mekanizmasına sahip, aynı zamanda bitki büyümesini teşvik eden (PGPR) üyelerini de içeren bakteri türleridir. Biyolojik mücadelede kullanılan *Pseudomonas*ların en büyük zayıflığı endospor üretmemeleri ve ticari kullanım için formülasyon haline getirilmesinin zor olmasıdır (Weller, 2007). *Bacillus* spp. ise bunların aksine oluşturdukları antibiyotikler ve zor koşullara dayanmasını sağlayan endosporu sayesinde birçok hastalığın kontrolünde kullanılan diğer bir popüler biyolojik kontrol ajanı grubudur (Shafi ve ark., 2017). *Bacillus* spp. endosporları sayesinde hem arazide hem de preparat haline gelmiş biopestisitte diğer türlere göre çevre koşullarına dayanımda daha avantajlıdır. Buna istinaden çalışmanın tarla denemesine *Bacillus subtilis* (Pca2) izolatu dahil edilmiştir. Nitekim tarla denemeleri sonunda toprağın 10 cm derinliğindeki toprak sıcaklığının Haziran ayı sonlarına doğru artık iyice arttığı ve günün en sıcak saatlerinde 39°C'nin altına düşmediği kaydedilmiştir.

Kökçük testleri; bitki, patojen ve antagonist üçlüsünün laboratuvar koşullarında bir araya geldiği bir test olmasından dolayı üzerinde durulması gereken bir çalışma olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda Pca19, Pca21 ve Pca20 izolatları kökçük testlerinde iyi sonuçlar (%93 sağlıklı) vererek öne çıkmıştır. Chang ve ark. (2001) 1400 izolat içinden seçtikleri 64 bakteri izolatında yaptıkları kökçük denemelerinde tür olarak belirtmedikleri 6 bakteri izolatının istatistiki olarak *P. capsici*'ye karşı etkili olduğunu bulmuşlardır. Kökçük testlerini saksı denemelerinden önce yapılan ve antagonistlerin seçiminde kullanılan, zaman ve emekten fayda sağlayan bir ön-test olarak tanımlamışlardır. Kökçük testleri ile iyi bir engelleme yaptığı belirlenen 6 izolattan 2'sini saksı denemeleri ile paralel sonuç verdiğini tespit etmişlerdir. Sang ve ark. (2008) hıyar, biber ve domates bitkilerinden izole ettiği 439 bakteri izolatından 38 tanesini yaptıkları kökçük testlerinde %30'a varan oranlarda *P. capsici*'nin neden olduğu hastalık gelişimi durduğunu bildirmişlerdir.

İklim odasında saksı koşullarında yapılan biyolojik mücadele çalışmalarında inokulasyondan 3 hafta sonunda yapılan değerlendirmede en etkili izolatların Pca18 (%100), Pca17 (%100), Pca19 (%87), Pca20 (%80) ve Pca3 (%47) olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda ayrıca Ridomil Gold MZ 68 WG ve Bion MX 44 WG ilaçlarının içirme şeklinde yapılan uygulamalarının da etkili olduğu bulunmuştur. Mei ve ark. (2010) yaptıkları saksı denemelerinde çalıştıkları iki izolatın %72 ve %83 oranlarında hastalığı engellediklerini bulmuşlardır. Buna benzer olarak Sang ve ark. (2008) 16 potansiyel antagonist ile yaptığı fide denemelerinde, test ettikleri tüm bakteri izolatlarının hastalık şiddetini önemli ölçüde bastırıldığını bulurken, hastalık şiddetini %21-55 arasında hesaplamışlardır.

Bu çalışmada saksı denemelerinde topraktaki ve bitkideki patojen miktarının hesaplanmasında ve dolayısıyla biyolojik korumanın değerlendirilmesinde qPCR yöntemi kullanılmıştır. Topraktaki mikroorganizma popülasyonunun araştırılmasında (Fierer ve ark., 2005) ve biyokontrol çalışmalarında (Sanzani ve ark., 2014) qPCR yöntemi başarıyla kullanılmaktadır. Saksı denemeleri sonunda alınan bitki ve toprak örneklerinin içindeki hastalık etmenine ait DNA miktarı incelendiğinde; bitki örneklerinde Pca17, Pca20, Pca8, Pca21, Pca19, Pca2 ve Pca9'un %100 oranda etmeni kontrol ettiği, toprak örneklerinde ise Pca19, Pca4, Pca9, Pca5, Pca17 ve Pca2 izolatlarının etmeni %80 ve üzeri bir oranda engellediği saptanmıştır. Çalışmada DNA miktarının hesaplanmasında kullanılan standart eğri denkleminin verim değeri (efficiency) %102 olarak bulunurken bu değer kabul edilen sınırlar içinde olduğu görülmüştür (Taylor ve ark., 2010).

Yapılan tarla denemelerinde, ilaçlı kontrolde yaklaşık olarak %26 bitki kaybı görülürken Pca2 izolatu ile yapılan uygulamalarda %47 oranında ölen bitki saptanmış ve istatistiki olarak ilaçlı kontrol ile aynı grupta yer almıştır. Herhangi bir koruyucu uygulama yapılmayan ve sadece hastalıklı bitkilerden oluşan karşılaştırma kontrolünde ise bitkilerin %88'nin öldüğü görülmüştür. Sang ve ark. (2008) yapmış oldukları tarla denemelerinde kullandıkları *Pseudomonas corrugata* (CCR04, CCR80), *Flavobacterium* sp. (GSE09) ve *Chryseobacterium indologenes* (ISE14) izolatlarını değerlendirmiştir. Çalışmamızdakine benzer olarak dikimden önce fide kök daldırması şeklinde yaptıkları uygulamada tüm bakteri uygulamalarını hastalığa karşı etkili bulurken CCR80 ve ISE14 izolatlarının biber verimini de arttırdığını bildirmişlerdir.

Biberin ciddi hastalıklarından biri olan Phytophthora yanıklığı hastalığına karşı antagonist bakterilerin değerlendirildiği bu çalışmada ümitvar sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmalara tüm



izolatların gözden geçirilerek devam edilmesi ve etki mekanizmalarının ortaya konması faydalı olacaktır. Ayrıca etkin antagonistlerin kitle üretim olanaklarının da irdelenmesi ve arazide uygulanabilir formülasyonlar haline getirilmesi çalışılması gereken diğer konular arasındadır.

## Teşekkür

Bu çalışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince ZRF13016 nolu proje ile desteklenmiştir.

## Kaynakça

- Akgül, S. D., & Mirik, M. (2008). Biocontrol of *Phytophthora capsici* on pepper plants by *Bacillus megaterium* strains. *J. Plant Pathol.*, *90*(1), 29–34.
- Berg, G., Roskot, N., Steidle, A., Eberl, L., Zock, A., & Smalla, K. (2002). Plant-Dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different verticillium host plants. *Appl Environ Microbiol*, *68*(7), 3328–3338.
- Chang, S. H., Kwack, M. S., Kim, Y. S., Lee, J. Y., & Kim, K. D. (2001). A Rapid radicle assay for prescreening antagonistic bacteria against *Phytophthora capsici* on pepper. *Mycobiology*, *29*(4), 218–223.
- Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., & Jackson, R. B. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol*, *71*(7), 4117–4120.
- Hausbeck, M. K., & Lamour, K. H. (2004). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Dis.*, *88*(12), 292–1303.
- Kim, H. S., Sang, M. K., Jung, H. W., Jeun, Y. C., Myung, I. S., & Kim, K. D. (2012). Identification and characterization of *Chryseobacterium wanjuae* strain kj9c8 as a biocontrol agent of phytophthora blight of pepper. *Crop Prot*, *32*, 129–137.
- Klement, Z., Rudolph, K., & Sands, D. C. (1990). *Methods in Phytobacteriology*. Budapest, Hungary: Akademiai Kiadó.
- Kurze, S., Bahl, H., Dahl, R., & Berg, G. (2001). Biological control of fungal strawberry diseases by *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Plant Dis*, *85*(5), 529–534.
- Lane, D. J. (1991). *16S/23S rRNA sequencing*. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds.), pp. 115–147. John Wiley and Sons Chichester.
- Mei, X., Zhao, Q., Tan, S., Xu, Y., Shen, B., & Shen, Q. (2010). Screening, identification, and biocontrol effect of antagonistic bacteria against *Phytophthora capsici*. *J Appl Ecol*, *21*(10), 2652–2658.
- Messiha, N. A. S., Diepeningen, A. D., Farag, N. S., Abdallah, S. A., Janse, J. D., & Bruggen, A. H. C. (2007). *Stenotrophomonas maltophilia*: a new potential biocontrol agent of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of potato brown rot. *Eur. J. Plant Pathol*, *118*(3), 211–225.
- Özyılmaz, Ü. (2007). *Biological control of strawberry root diseases by rhizobacteria in Aydın province*. PhD thesis, Adnan Menderes Univ., Turkey.
- Özyılmaz, Ü., & Benlioğlu, K. (2013). Enhanced biological control of phytophthora blight of pepper by biosurfactant-producing pseudomonas. *Plant Pathol J*, *29*(4), 418–426.
- Park, J. H., Kim, R., Aslam, Z., Jeon, C. O., & Chung, Y. R. (2008). *Lysobacter capsici* sp. nov., with antimicrobial activity, isolated from the rhizosphere of pepper, and emended description of the genus *Lysobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol*, *58*(2), 387–392.
- Pal, K. K., & Mc Spadden Gardener, B. (2006). Biological control of plant pathogens, the plant health instructor. <http://dx.doi.org/10.1094/phi-a-2006-1117-02> Erişim tarihi 24.07.2019.
- Pang, Z., Shao, J., Chen, L., Lu, X., Hu, J., Qin, Z., & Liu, X. (2013). Resistance to the novel fungicide pyrimorph in *phytophthora capsici*: risk assessment and detection of point mutations in Cesa3 that confer resistance. *PLoS ONE*, *8*(2), 1–12.
- Parra, G., & Ristaino, J. B. (2001). Resistance to mefenoxam and metalaxil among field isolates of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight of bell pepper. *Plant Dis*, *85*, 1069–1075.

- Pavón, C. F., Babadoost, M., & Lambert, K. N. (2008). Quantification of *Phytophthora capsici* oospores in soil by sieving-centrifugation and real-time polymerase chain reaction. *Plant Dis*, 92(1), 143–149.
- Puopolo, G., Raio, A., & Zoina, A. (2010). Identification and characterization of *Lysobacter capsici* strain PG4: A new plant health-promoting rhizobacterium. *J Plant Pathol*, 92(1), 157–164.
- Qi, R., Wang, T., Zhao, W., Li, P., Ding, J., & Gao, Z. (2012). Activity of ten fungicides against *Phytophthora capsici* isolates resistant to metalaxyl. *J. Phytopathol*, 160(11–12), 717–722.
- Robles-Yerena, L., Rodríguez-Villarreal, R. A., Ortega-Amaro, M. A., Fraire-Velázquez, S., Simpson, J., Rodríguez-Guerra, R., & Jiménez-Bremont, J. F. (2010). Characterization of a new fungal antagonist of *Phytophthora capsici*. *Sci Hort*, 125, 248–255.
- Sang, M. K., Chun, S. C., & Kim, K. D. (2008). Biological control of Phytophthora blight of pepper by antagonistic rhizobacteria selected from a sequential screening procedure. *Biol Control*, 46, 424–433.
- Sanzani, S. M., Li Destri Nicosia, M. G., Faedda, R., Cacciola, S. O., & Schena, L. (2014). Use of quantitative PCR detection methods to study biocontrol agents and phytopathogenic fungi and oomycetes in environmental samples. *J Phytopathol*, 162, 1–13.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd ed. APS Press, St. Paul Minnesota.
- Shafi, J., Tian, H., & Ji, M. (2017). Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 31(3), 446–459.
- Sopheareth, M., Chan, S., Naing, K. W., Lee, Y. S., Hyun, H. N., Kim, Y. C., & Kim, K. Y. (2013). Biocontrol of late blight (*Phytophthora capsici*) disease and growth promotion of pepper by *Burkholderia cepacia* MPC-7. *Plant Pathol J*, 29(1), 67–76.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., & Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50(4), S1-S5.
- Weller, D. M. (2007). Pseudomonas Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years. *Phytopathology*, 97(2), 250–256.
- Zhang, S., Klassen, W., Mo, X., Ji, P., & Gevens, A. J. (2011). Evaluation of Acibenzolar-S-methyl and silicic acid for control of Phytophthora blight caused by *Phytophthora capsici* in squash. *Proc Fla State Hort Soc*, 124, 154–161.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput Biol*, 7(1-2), 203-14.