

**T.C.**  
**RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TOPRAK KÖKENLİ *TRICHODERMA* SPP. İZOLATLARININ  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK  
MÜCADELE ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Arif BOZDEVECİ**

**Tez Danışmanı:**

**Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU**


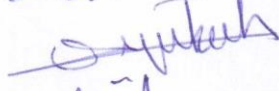
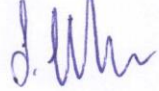
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

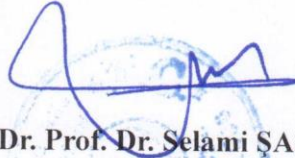
**RİZE 2014**

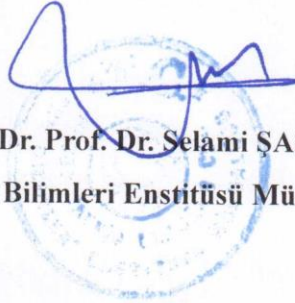
T.C.  
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TOPRAK KÖKENLİ *TRICHODERMA* SPP. İZOLATLARININ  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK  
MÜCADELE ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Bu çalışma, 05./06/2014 tarihinde yapılan sınav ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda  
YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı, Soyadı	İmzası
Tez Danışmanı	: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU	
Jüri Üyesi	: Doç. Dr. Turan YÜKSEK	
Jüri Üyesi	: Yrd. Doç. Dr. Serdar ÜLKER	

  
Prof. Dr. Prof. Dr. Selami SAŞMAZ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## ÖNSÖZ

Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilimdalın'da “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır. Çalışmada Rize ili çay topraklarından izole edilen *Trichoderma* spp. suşlarının geleneksel ve moleküler yöntemlerle tanımlaması, üreme - spor oluşturma şartları ile biyolojik mücadelede etkin bir ajan olarak kullanılabilirliğinin araştırılması hedeflendi ve gerçekleştirildi.

Çalışmamın danışmanlığını üstlenen, tez konumu belirlemede ve çalışmalarım sırasında bütün zorlukları aşmamda, bana yardımcı olan ve çalışmalarım sırasında her türlü desteği sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU'na şükranlarımı sunarım. Çalışmam boyunca yardımlarını eksik etmeyen, her zaman desteğini gördüğüm sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Serdar ÜLKER'e de şükranlarımı bir borç bilirim. Yüksek lisans ve lisans hayatım boyunca bilgi ve deneyimlerini bizlere öğreten RTEÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyelerine teşekkür ederim. Çalışmam sırasında bana yardımlarını eksik etmeyen araştırma görevlisi, doktora ve yüksek lisans arkadaşlarıma ayrıca teşekkür ederim.

Benim bugünlere gelmemde büyük emeği olan, hayatım boyunca her zaman maddi ve manevi yanımda olan, desteğini hiç esirgemeyen Annem “Sultan”, Babam “Ali” ve kardeşim “Aysun” a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hazırlanan bu yüksek lisans tezi 2012.102.03.3 numaralı proje olarak RTEÜ-BAP birimi tarafından desteklenmiştir. RTEÜ-BAP birimine desteklerinden dolayı teşekkür ederim

Arif BOZDEVECİ

Rize 2014

## ÖZET

### Toprak Kökenli *Trichoderma* spp. İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu ve Biyolojik Mücadele Etkinliklerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada Rize İkizdere çay topraklarından izole edilen ve geleneksel yöntemlerle tanımlaması yapılan *Trichoderma* spp. türlerinin farklı sıcaklıklarda üreme, spor oluşturma, sporlarının sıcaklık toleransı, antifungal ve antimikrobiyal aktiviteleri, fungusit dirençliliği, selüloz ve kitinaz üretimleri, farklı katı substratlarda spor üretimi, spor raf ömrünün ve tohum çimlenmesi üzerine etkinliklerin belirlenmesi amaçladık.

Bu izolatların çoğunun *Trichoderma harzianum*'la benzerlik gösterirken biri *T. atroviride*, biri de *T. hamatum* olduğunu ITS sekansına dayalı olarak belirlendi. Suşların tümünde en iyi üreme ve spor oluşturma sıcaklığı 28 °C olduğu ve spor canlılığının 65 °C'ye kadar korunduğu tespit edildi. *Trichoderma* suşlarının etil asetat ekstratlarının antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları, özellikle ID4A, ID4B ve ID6A suşlarının *M. smegmatis*'e etkili olduğunu bulduk. Suşların uçucu metabolit ürettiği, *S. sclerotiorum*'un büyümesini ve sklerot oluşumunu engelledikleri belirlendi. Bitki patojeni olan *B. cinerea* *S. sclerotiorum* ve *R. solani*'ye karşı en etkili ve enzim (kitinaz ve selüloz) aktivitesi en yüksek olan suşlar sırasıyla *T. harzianum* ID11C, ID11D, *T. atroviride* ID20G ve *T. hamatum* ID17E olarak belirlendi. *Trichoderma*'ların Captan, Dikozin ve Cuprenax fungusitlerine karşı 10000 µg/mL düzeylerine kadar dirençli oldukları belirlendi. *T. harzianum* ID11C ve *T. atroviride* ID20G suşlarının, bitki tohumlarının çimlenmesi üzerine ilk 7 gündeki etkinliği, kontrole göre %10-17 oranında daha yüksek olduğu belirlendi.

Yapılan bu çalışmada, *T. harzianum* ID11D ile ID11C suşlarının biyokontrol ve bitki destekleyicisi olarak en uygun suşlar olduğu, *T. atroviride* ID20G ve diğerlerinin de bu amaçla kullanılabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** *Trichoderma*, biyokontrol, antimikrobiyal, fungusit

## SUMMARY

### **Molecular Characterization of Soilborne *Trichoderma* spp. Isolates and Determination of its Biocontrol Activity**

In this study, we aimed to determine the growth at different temperatures, spore-forming, temperature tolerance of spores, antifungal and antimicrobial activity, resistance to fungicides, cellulase and chitinase production, the production of spores at different solid substrates, spores shelf life and the effect to seed germination of *Trichoderma* spp. isolated from tea soil in İkizdere (Rize) and identified with traditional methods.

We identified these isolates mostly as *Trichoderma harzianum*, one as *Trichoderma atroviride* and the other *Trichoderma hamatum* based on ITS sequences. The optimum growth and sporulation temperature of all strains were observed as 28°C and spore viability was determined to be protected up to 65 °C. We found that the ethyl acetate extract of *Trichoderma* strains have antimicrobial activity, especially ID4A, ID4B ve ID6A strains were found to be effective against *M. smegmatis*. It was determined that strains were producing essential metabolites, so minimizing the formation sclerotizing and growth of *S. sclerotiorum*. Strains with the highest enzyme activity and showing strong antifungal activity against plant pathogens (*B. cinerea*, *S. sclerotiorum* and *R. solani*) were determined as *T. harzianum* ID11C, ID11D, *T. atroviride* ID20G and *T. hamatum* ID17E, respectively. It was determined that *Trichoderma* isolates were resistant to Captan, Dikozin ve Cuprenax fungusists up to 10000 µg/mL level. Also it was found that the effect of seed germination by *T. harzianum* ID11C and *T. atroviride* ID20G strains were higher than the control.

In this study, we concluded that *T. harzianum* ID11D and ID11C isolates were the most suitable strains for biocontrol and plant promoter; and also *T. atroviride* ID20G and the others could be used for this purpose.

**Keywords:** *Trichoderma*, biocontrol, antimicrobial, fungicide

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa No

ÖNSÖZ.....	I
ÖZET .....	II
SUMMARY .....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Mantarların Sistematiği .....	3
1.3. Mantarların Genel Özellikleri.....	4
1.4. <i>Trichoderma</i> 'ların Sınıflandırılması .....	7
1.4.1. Takım: Hypocreales.....	8
1.4.2. Aile: Hypocreaceae.....	8
1.4.3. Cins: <i>Hypocrea</i> 'ların Genel Özellikleri.....	9
1.5. Teleomorf ( <i>Hypocrea lixii</i> ) ve Anamorf ( <i>Trichoderma harzianum</i> ).....	13
1.5.1. Teleomorf: <i>Hypocrea lixii</i> .....	13
1.5.2. Anamorf: <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1969).....	14
1.6. <i>Trichoderma</i> Cinslerinin Habitatı.....	15
1.7. <i>Trichoderma harzianum</i> Suşlarının Biyokontrol Etkeni Olarak Kullanılması.....	17
1.8. <i>Trichoderma</i> spp. Fungal Patojenlerin Kontrolünde Etki Mekanizmaları .....	19
1.9. Fungusitler .....	24
1.10. <i>Trichoderma</i> Kaynaklı Biyolojik Kontrol Ürünleri ve Fungusit Dirençliği.....	25
1.11. Literatür Çalışması .....	27
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	33
2.1. Materyal.....	33
2.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar .....	33
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Suşlar .....	34

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri .....	36
2.1.3.1. Malt Ekstrakt Sıvı Besiyeri (ME).....	36
2.1.3.2. Potato Dekstroz Agar (PDA).....	36
2.1.3.3. Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBCA) .....	36
2.1.3.4. Kitin Agar ve Sıvı Besiyerleri .....	36
2.2. Yöntem .....	38
2.2.1. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının Canlandırılması .....	38
2.2.2. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarından Tek Koloni İzolasyonu .....	38
2.2.3. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının DNA İzolasyonu .....	38
2.2.4. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının PCR ve Jel elektroforezi .....	39
2.2.5. Sekans Analizi .....	40
2.2.6. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının Farklı Sıcaklıklarda Üreme Hızı ve Spor Üretimleri ..	40
2.2.7. <i>Trichoderma</i> spp. Sporlarının Farklı Sıcaklıklara Toleranslarının Belirlenmesi .....	41
2.2.8. Farklı Katı Substrat İçeren Ortamlarda <i>Trichoderma harzianum</i> Suşlarının Spor Üretme Kapasiteleri .....	42
2.2.9. <i>T. harzianum</i> Sporlarının Formülasyonu .....	43
2.2.10. <i>Trichoderma</i> spp. Sekonder Metabolitlerinin Etil Asetat Ekstraksiyonları .....	44
2.2.11. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	44
2.2.12. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarında Dual Teknikle Antifungal Aktivite Belirlenmesi .....	45
2.2.13. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının Uçucu Antifungal Madde Üretiminin Belirlenmesi ..	46
2.2.14. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının Fungisitlere Karşı Toleransının Belirlenmesi .....	46
2.2.15. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının Selülaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	47
2.2.16. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının Kitinaz Aktivitesinin Belirlenmesi .....	47
2.2.17. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının Mısır Tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Etkisi ve Köklerde Kolonizasyonunun Belirlenmesi .....	49
2.2.18. Çalışmada Kullanılan İstatistikî Analizler .....	50
3. BULGULAR .....	51
3.1. Suşların Moleküler Karakterizasyonu .....	52
3.2. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının Farklı Sıcaklıklarda Üreme ve Spor Üretimleri .....	56
3.3. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının Farklı Sıcaklıklara Toleransı .....	58
3.4. Katı Substrat Ortamlarında <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının Spor Üretim Kapasiteleri ...	59

3.5. <i>Trichoderma</i> spp. Sporlarının Formulasyonu.....	60
3.6. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	62
3.7. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının Antifungal Aktivitesi .....	64
3.8. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının Uçucu Metabolitlerin Antifungal Aktivitesi .....	71
3.9. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının Fungisitlere Olan Toleransının Belirlenmesi.....	71
3.10. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının Selülaz Aktivitesi ve Glukoz Standartı .....	75
3.11. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının Kitinaz Aktivitesi ve NAGA Standartı .....	77
3.12. <i>Trichoderma</i> spp. Suşlarının Bitki Çimlenmesine ve Büyümesine Olan Etkisi .....	79
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	81
5. ÖNERİLER .....	97
6. KAYNAKLAR.....	98
7. EKLER .....	115
7.1. EK1- <i>Trichoderma harzianum</i> ID4A .....	115
7.2. EK2- <i>Trichoderma harzianum</i> ID4B.....	115
7.3. EK3- <i>Trichoderma harzianum</i> ID6B.....	116
7.4. EK4- <i>Trichoderma harzianum</i> ID7C.....	116
7.5. EK5- <i>Trichoderma harzianum</i> ID9A .....	117
7.6. EK6- <i>Trichoderma harzianum</i> ID11C.....	117
7.7. EK7- <i>Trichoderma harzianum</i> ID11D .....	118
7.8. EK8- <i>Trichoderma hamatum</i> ID17E .....	118
7.9. EK9- <i>Trichoderma atroviride</i> ID20G .....	119
7.10. EK10- <i>T. harzianum</i> KUEN 1585 .....	119
ÖZGEÇMİŞ.....	120



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Mantar hücresi ve organelleri .....	5
Şekil 2. Mantar hücre duvar yapısı .....	7
Şekil 3. Stromata yapısı (peritekiyal askoma).....	9
Şekil 4. <i>Hypocrea lixii</i> kültür ve anamorfı. ....	11
Şekil 5. <i>Hypocrea</i> türlerinin <i>Trichoderma</i> anamorfunun seçilmiş konidiofor tipleri.....	12
Şekil 6. <i>Trichoderma</i> -bitki arasındaki moleküler sinyalizasyon ve bitkide uyarılan etkinliklerin şematik görünümü.....	23
Şekil 7. Neubauer hemositometresi ve spor sayımının yapıldığı alanlar .....	41
Şekil 8. Çalışmada kullanılan mikrofungus suşlarının mikroskopik görüntüleri .....	51
Şekil 9. Çalışmada kullanılan mikrofungus suşlarının mikroskopik görüntüleri .....	52
Şekil 10. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarına ait DNA izolasyonun jel görüntüsü.....	53
Şekil 11. <i>Trichoderma</i> spp. izolatları ve tip suşuna ait ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesi PCR Jel görüntüsü .....	53
Şekil 12. İzolatlarının ITS1-5.8-ITS2 sekans sonuçlarına göre filogenetik ağaç.....	55
Şekil 13. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının 28 °C’de sıcaklıkta 7. günde petri görüntüsü ....	58
Şekil 14. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının 4., 7., ve 15. günde <i>B. cinerea</i> ’ya karşı inhibisyon yüzdesi .....	64
Şekil 15. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının 4.,7. ve 15. gün <i>S. sclerotiorum</i> suşuna karşı inhibisyon yüzdesi .....	65
Şekil 16. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının 4.,7. ve 15. günde <i>R. solani</i> (AG3) suşuna karşı inhibisyon yüzdesi .....	65
Şekil 17. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının 4.,7. ve 15. günler sonunda <i>A. niger</i> RSKK 4017 karşı inhibisyon yüzdesi .....	66
Şekil 18. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının 4., 7. ve 15. gün <i>A. flavus</i> 3321 karşı inhibisyon yüzdesi.....	66
Şekil 19. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının 4., 7. ve 15. günde <i>B. bassiana</i> suşuna karşı inhibisyon yüzdesi .....	67
Şekil 20. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının 4.,7. ve 15. günde <i>M. anisopliae</i> suşuna karşı inhibisyon yüzdesi .....	67

Şekil 21. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının 4.,7. ve 15. günde <i>I. fumosorosea</i> suşuna karşı inhibisyon yüzdesi .....	68
Şekil 22. <i>T. harzianum</i> - <i>I. fumosorosea</i> 7. gün dual kültür petrileri görüntüsü .....	68
Şekil 23. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının farklı patojenlerle 7. gün dual petri görüntüleri. 70	
Şekil 24. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının farklı fungusit içeren petrilerdeki 7. gün görüntüleri. ....	73
Şekil 25. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının Captan içeren PDA besiyerinde 7. gün büyüme grafiği.....	74
Şekil 26. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının Dikozin içeren PDA besiyerinde 7. gün büyüme grafiği.....	74
Şekil 27. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının Cuprenax içeren PDA besiyerinde 7. gün büyüme grafiği.....	75
Şekil 28. DNS metodu ile glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen standart grafiği .....	76
Şekil 29. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının sıvı ortamında selüloz aktivitesinin spektrofotometrik ölçüm grafiği.....	76
Şekil 30. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının kollodial kitin içeren kitin agar petrisinde 4. gün zon çapları.....	77
Şekil 31. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının kitin agar petrisinde 4. gün zon çapı petri görüntüsü .....	77
Şekil 32. DNS metodu ile N-asetil glukoz amin konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen standart grafiği .....	78
Şekil 33. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının kollodial kitin sıvı ortamında ürettiği kitinazın spektrofotometrik ölçüm grafiği.....	78
Şekil 34. <i>Trichoderma</i> spp. uygulanmış olan mısır tohumları ve bitki kökünde <i>Trichoderma</i> kolonizasyonun DRBC’de görüntüsü .....	80

## TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Fungi aleminin sınıflandırılması.....	4
Tablo 2. Bazı mantar gruplarının total hücre duvarı bileşenlerinin kuru ağırlık .....	6
Tablo 3. Farklı fungusit grupları ve özellikleri.....	25
Tablo 4. Dünyada ticari olarak satılan <i>Trichoderma</i> kaynaklı biyokontrol ürünleri .....	26
Tablo 5. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	33
Tablo 6. Çalışmada kullanılan kimyasal sarf maddeler.....	34
Tablo 7. Çalışmada kullanılan <i>Trichoderma</i> spp. suşları.....	35
Tablo 8. ITS1-5.8-ITS2 gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PCR karışımı.....	39
Tablo 9. ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PCR şartları.....	39
Tablo 10. Katı substrat karışım oranları tablosu.....	42
Tablo 11. Çalışmada kullanılan fungus suşlarının önerilen tür tayinleri.....	54
Tablo 12. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının 48 saat sonra farklı sıcaklıklardaki büyüme zon çapları.....	56
Tablo 13. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının farklı sıcaklıkta elde edilen spor sayıları.....	57
Tablo 14. <i>Trichoderma</i> spp. sporlarının farklı sıcaklık değerlerine dayanıklılığı.....	59
Tablo 15. <i>T. harzianum</i> ID11C'nin katı substrat karışımlarında spor üretimi.....	60
Tablo 16. <i>Trichoderma harzianum</i> ID11C'nin spor formülasyonu ve canlı kalma süresi.....	61
Tablo17. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının etil asetat ekstraksiyonlarının bir grup mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi.....	63
Tablo 18. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının dual tekniği ile funguslara karşı inhibisyon yüzdesi.....	68
Tablo 19. <i>Trichoderma harzianum</i> suşlarının uçucu madde üretmi ve etkinliği.....	71
Tablo 20. <i>Trichoderma</i> spp. suşlarının fungusitli PDA besiyerinde 7. gün sonunda büyüme zon çapları .....	72
Tablo 21. <i>Trichoderma</i> spp. uygulanmış mısır tohumlarının çimlenme başarısı deneyi sonuçları .....	79

## SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACC	: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate
BHIA	: Brain Heart Infusion Agar
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
CBS	: Centraalbureau voor Schimmelcultures
CMC	: Karboksi metil selüloz
CMD	: Corn meal dekstroz
CPK	: Collection C.P. Kubicek
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNS	: 3,5-Dinitrosalisilik asit
IAA	: İndol Asetik Asit
ID	: İkizdere
ISR	: İnduced Systemic Resistance
kob	: Koloni oluşturan birim
mg	: Miligram
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
PDA	: Patates Dekstroz Agar
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
SNA	: Slow Nutrient Agar
U	: Unite
V	: Hacim
vd.,	: ve diğerleri
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Mantarlar, genel olarak maya, küf ve şapkaklı mantarlar şeklinde bilinmekte olup doğada oldukça geniş bir varyasyona sahip olan mikroskobik ve makroskobik organizmalardır. Mantarların büyük çoğunluğu tek hücreli (mikroform) filamentöz küfleri (*Ascomycetes*, *Zygomycetes*, *Deuteromycetes*) ve çok hücreli (makroform) saplı ve sapsız mantarları (*Basidiomycetes*) daha az sayıda ise maya (mukoid) mantarlarını (*Candida*, *Saccharomyces*) kapsamaktadır (Webster ve Weber, 2007).

Mantarlar, gerçek hücre çekirdeklerine sahip, ökaryotik organizmalardır. Bünyelerinde klorofil bulundurmazlar, heterotrofturlar. Üreme özellikleri bakımından eşeyli ve eşeysiz olarak üreyebilen mantarlar (fungus), somatik yapıları dallanmış iplikçikler halinde ya da maya formunda olan ve kitin içeren hücre duvarına sahip organizmalardır. Besinlerini absorpsiyonla alırlar. Deacon (2005) tarafından, hücrel organizasyonları ve davranışları bakımından diğer tüm canlılardan farklılık gösteren eşsiz organizma grubu olarak tanımlanan funguslar, çok hücreli organizmaların üç ana evrimsel dalından birini temsil etmektedirler.

Her ne kadar funguslar hemen hemen her ortamda yaşama yeteneğine sahip olsalar da, esas olarak barındıkları ortam topraktır. Topraklar, üzerindeki bitki ve organik katmanda, aktif bir yaşama sahip olan funguslar için hem besin kaynağı, hem de barınak durumundadır. Topraklar, normal olarak çok sayıda bakteri, aktinomiset ve bunlardan daha az sayıda olmasına rağmen çok fazla miktarda mantar (anamorfik(eşeysiz üreyebilen)) (*Mucorales*, *Ascomycota*, *Chytridiomycetes* ve *Oomycetes*) içermektedir (Kirk vd., 2001).

Toprak mantarları, diğer toprak mikroorganizmaları ile birlikte, doğal ve işlenmiş topraklarda, organik maddenin ayrıştırılması, toksin maddelerin ortadan kaldırılması, karbon, azot, fosfor ve kükürt döngülerini sağlamada, toprak yapısının oluşumunda ve fonksiyonlarının muhafaza edilmesinde kritik öneme sahiptirler. Ek olarak, toprak kökenli bitki hastalıklarının kontrol altına alınmasında ve bitki gelişiminin desteklenmesinde de rol alırlar (Garbeva vd., 2004). Toprakların sürdürülebilir ve verimli bir şekilde fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri mikroorganizmaların aktivitelerine ve çeşitliliğine bağlıdır (Haktanır ve Arcak, 1997).

Ingram (2002), bitki patojenlerinin büyük çoğunluğunu mikrofungusların oluşturduğunu, ancak fungi olarak tanımlanan 7730 cinsin yaklaşık %92'sininin saprofitik olduğunu belirtmiştir.

Toprak mantarları doğada saf kültürler halinde yaşamlarını sürdürmezler. Belirli habitatlarda faaliyetlerini sürdürürlerken, karışık bir kültür manzarası gösterirler. Aynı yerde yaşayan mantar populasyonları arasında da sürekli bir etkileşim (interferans ya da interaksiyon) mevcuttur. Bu karışık etkileşimler incelendiğinde, bünyesinde mikroorganizmalar arasında beliren rekabet ve antagonistik etkileşimleri içerdiği görülür.

Toprakta yaşamakta olan çeşitli bireyler veya populasyonlar arasındaki karşılıklı etkileşimler, organizmalardan birinin veya her ikisinin uyarılması (stimulation) veya engellenmesine (inhibisyon) bağlı olarak olumlu veya olumsuz olabilir. Olumsuz etkileşimler; rekabet, zıt etkileşim (antagonizm), mantar gelişiminin engellenmesi (fungistatis), avcılık (predasyon) ve parazitlik ilişkileridir. Olumlu etkileşimler ise; birlikte bulunma (kommensalizm), zorunlu olan veya olmayan karşılıklı yararlanmadır (Haktanır ve Arcak 1997; Öner, 2002). Toprakta süregelen bu etkileşimler doğal ekosistemlerde yani, bozulmamış veya dengesi değiştirilmemiş topraklarda bulunan canlı populasyonlarının dengede tutulmasını sağlar. Biyolojik çeşitliliğin sürekliliğinin sağlanmasında olduğu kadar, zararlı populasyonların baskı altında tutulmasında da bu etkileşimler önemli rol oynar.

Modern tarımda bitki patojenlerinin kontrolünde kimyasal pestisitlerin kullanımı oldukça önemlidir. Fungisit ve fumigantların yaygınlığı, biyotasının üzerine herbisit ve insektisitden daha ciddi etkisinin olduğu bilinmektedir (Fraser, 1994). Bu metodlar atmosferi de kirletmekte ve çevreye, toprağa zararlı kimyasallar karışmaktadır (Nannipieri, 1994). Son yıllarda bitki patojenlerinin kontrolünde mikrobiyal biyoinkulantların kullanımı önemli bir strateji haline gelmiştir. Ayrıca biyokontrol ajanlarının kullanımı bitki patojenlerinin kontrolü için kullanılan kimyasalların kullanım dozunun azaltılmasına da neden olmuştur (Chet ve Inbar, 1994). Günümüzde mantarlar, giderek artan bir şekilde zararlı böceklerle, bitki patojeni (fitopatojen) mantarlarla ve nematodlarla mücadelede kimyasal ilaçlara (pestisitler) alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır. Dünyada bitki patojeni mantarlara karşı bu tür antagonistik mikroorganizmaların kullanıldığı biyopreparat sayısı 40'ın üzerindedir (Yiğit, 2005).

Antagonist mantarlar diğer mantarların gelişimini, salgıladıkları antibiyotik maddeler aracılığıyla engelleyebildikleri gibi doğrudan temasa geçtikleri mantarların hücre duvarlarını salgıladıkları enzimler aracılığıyla eritmek suretiyle baskılayabilmektedirler (Küçük, 2000). Birçok antagonistik mikroorganizma, toprakta doğal olarak bulunur ve insan aktivitesi olmaksızın, bitki hastalıkları üzerinde belirli seviyelerde biyolojik mücadele sağlar. *Trichoderma*, *Penicillium*, *Gliocladium* ve *Sporidesmium* gibi saprofitik karakterli mantar cinsleri ile bitki patojeni olmayan *Fusarium*, *Pythium* gibi cinsler, toprak patojenlerinin antagonistleri olarak tanımlanırlar. Bunların topraktaki varlığı toprakların bitki patojenlerine karşı baskılayıcı özellik kazanmasında rol oynar (Garbeva vd., 2004).

Bu çalışmada Rize İyidere-İkizdere vadisi çay topraklarından izole edilen ve geleneksel yöntemlerle tanımlanan *Trichoderma* spp. türlerinin; moleküler karakterizasyonu, üreme-spor oluşturma şartları ve biyolojik mücadelede etkin bir ajan olarak kullanılabilirliğinin araştırılması hedeflenmiştir. Biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılan birçok bakteriyel ve fungal antagonistlerin, orman topraklarından izole edilerek geliştirildiği düşünülürse bu çalışmada izole edilen ve *in vitro* testlerde etkili bulunan izolatların, toprak ve tohum kökenli patojen mantarlara karşı kullanılabilme potansiyellerinin var olabileceği düşünülerek bu çalışma planlanmıştır.

## 1.2. Mantarların Sistematığı

Mantarlar alemi yaşam formlarının karmaşıklığı ve çok sayıda tür içermeleri nedeniyle sınıflandırılması zor olup halen tam olarak tamamlanamamıştır. En bilinen sınıflandırmalardan biri Alexopolus'a göre olup 8 grupta toplanmıştır (Alexopoulos, vd., 1996). Son yayınlanan kaynaklarda ise biraz daha revize edilerek aşağıdaki gibi (Tablo 1) verilmektedir (Webster ve Weber, 2007).

Ascomycota (Ascomycetes) şubesi mantarlar aleminde içinde 3400 cinsi kapsayan 32 000 binden fazla tür içeren, en geniş grubu oluşturmaktadır. Adı Yunanca'da askos (bir deri şişe, çanta ya da mesane) ve mykes (mantar) terimlerinden türetilmiş kese (saç) mantarlarıdır. Karakteristik özelliği eşeyli üreme sporlarını askospor kese (askus) içinde olmasıdır. Çoğunlukla kese içinde 8 askospor içermektedirler (Kirk vd., 2001).

**Tablo 1.** Fungi aleminin sınıflandırılması.

---

<b>ALEM</b>	<b>: PROTOZOA</b> Myxomycota Plasmodiophoromycota
<b>ALEM</b>	<b>: STRAMINIPILA</b> Hyphochytriomycota Labyrinthulomycota Oomycota
<b>ALEM</b>	<b>: FUNGI (EUMYCOTA)</b> Chytridiomycota Zygomycota Ascomycota Basidiomycota

---

Grup içinde bazıları saprofit, diğer bazıları bitkiler, hayvanlar ve insanlar için nekrotropik veya biyotrofik parazittirler. Tanınmalarında fruting-body'leri veya askokarpları önemlidir.

### 1.3. Mantarların Genel Özellikleri

Küf mantarlarının vejetatif yapısı, yani tallus (tal) tek veya çok hücreli iplik benzeri olup her birine hif (Grekçe'de doku), hiflerin bir araya gelerek oluşturdukları vejetatif yapıya misel (mycelium; Grekçe'de myces: mantar, elos: siğil) adı verilir. Hifler dallanmış ya da dallanmamış olabilecekleri gibi bölmeli (septa) ya da bölmesiz (sönositik) de olabilir (De Hoog vd., 2003). Hifalar, uç kısımlarından büyümekte olup apikal sitoplazmada bol miktarda salgısal veziküller bulunmaktadır (Şekil 1). Yüksek yapıli (Ascomycota ve Basidiomycota) sınıflarında ise apikal cisimcik (spitzenkörper) adı verilen özelleşmiş yapılar bulunmaktadır. Hifaların uç (apikal) kısımlarının biraz gerisinde biyosentetik aktivite ve enerji üretimi oldukça yüksek olup bol miktarda endoplazmik retikulum, mitokondri ve ribozomlar yer almaktadır (De Hoog vd., 2003; Webster ve Weber, 2007).

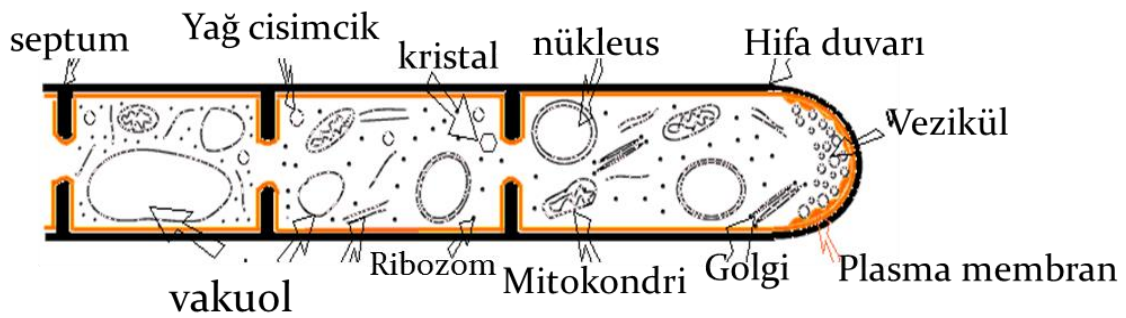
Mantarlar heterotrofik beslenme şekline sahip, vejetatif yapıları hareketsiz, hücre duvar yapıları türe göre değişmekle birlikte başlıca glukan-kitin, nadiren de glukan-selüloz içeren ökaryotik mikroorganizmalardır. Ökaryotik hücrelerin sahip olduğu tüm organellere ilave olarak, hücre duvarı litik enzimlerinin salgılanmasında rol oynayan Spitzenkörper, hücreyi turgor basıncına karşı koruyan sitoskeleton ve tubulin gibi yapılar da bulunmaktadır. Tallusu (vücut hücresi) homokaryotik (tek çekirdekli) ya da heterokaryotik



(genetik olarak farklı iki hifadan köken alan çekirdekler), haploid (n), diploid (2n) veya dikaryotik (iki çekirdekli) çekirdekli, türe göre basitten komplekse değişen yaşam döngüsüne sahip, mikroskopik ya da makroskopik organizmlardır. Genelde renksiz ve klorofilsizdir, ancak bazı türleri hücre çeperinde melanin maddesini biriktirmesi sonucu renkli olabilmektedir (De Hoog vd., 2003).

Üreme şekilleri eşeyli (seksüel; nukleer füzyon veya mayoz), paraseksüel (diploidizasyondan sonra nukleer füzyon) ve/veya aseksüel (eşeysiz; mitoz) şekilde meydana gelebilir. Mantarların üreme yayılma ve neslini devam ettirme işlevi için geliştirdiği oluşumlara 'spor' denir. Eşeysiz üreme sporları bir konidium taşıyıcısı (konidiofor) denilen ve üreme işini üstüne almış olan bir hifin ucunda tek tek (mikro veya makro), küme veya zincirler halinde oluşur ve konidiospor adını alır. Bölmeli hiflerin zarları kalınlaşıp serbest kalarak oidium adı verilen sporları oluşur. Sporlar tek bir hücreden veya birkaç hücreden ibarettir; her spor protoplazma kitlesi içerir ve bir çeperle çevrilidir.

Sporlar uygun ve elverişli şartlarda çimlenerek bir "çimlenme borucuğu" oluşturduktan sonra birincil hifler, daha sonra hifler ve misel meydana gelir. Sporlar renk bakımından; sarı, yeşil, kırmızı, kahverengi, siyah veya renksiz olabilirler. Hücre sayıları ve şekilleri tür ve cinslere göre; oval, küremsi, silindirik, iplik, böbrek, iğ vb. şekiller gösterebilmektedirler (De Hoog vd., 2003; Webster ve Weber, 2007).



**Şekil 1.** Mantar hücresi ve organelleri (URL-1)

Mantarların eşeyli üremesi, diğer canlılarda olduğu gibi, "gamet" denilen eşey hücrelerinin birleşmesi ile yürütülmektedir. Önce plazmogami yani protoplazmaların birleşmesi ve çift çekirdekli (dikaryot) olma, sonra karyogami yani çekirdeklerin

birleşmesiyle çift takım kromozumlu (diploid) olma, daha sonra indirgeme bölünmesi geçirme ile tek takım kromozumlu (haploit) sporlar meydana getirilmesi safhaları gerçekleşmektedir. Genel olarak mantarlar aleminde görülen eşeysiz üreme sporları sporangiospor, konidiospor (makro ve mikro konidium), tallosporlar (blastospor, klamidiospor, artrospor) ve eşeysiz üreme sporları ise oospor, zigospor, askospor ve bazidiospor şeklinde bilinmektedir. Eşeyli sporların oluşmasında izogami, anizogami, oogami, gametangiogami ve somatogami olayları gerçekleşir (De Hoog vd., 2003).

Mantarlar vejetatif yapının (tallus) uzaması, kitesinin artması ve sporlarının oluşmasıyla çevreye yayılırlar. Toprakta ve atmosferde pek çok sayıda mantar sporu bulunmakta olup atmosferde meydana gelen hava hareketleri ile dikey veya yatay yönde çok uzun mesafelere taşınabilirler. Su yolu ile yayılması olayına “hidrokori” denmekte olup zoosporların su damlacıkları veya birikintiler içinde bizzat hareket etmeleri yahut da sporların su akıntılarında taşınmaları ile meydana gelir. Hayvanlar vasıtası ile olan spor yayılmasına “zookori” denir. Ayrıca ulaşım araçları ve insanlar aracılığı ile de (antropolojik etkiyle) Dünya’nın her yerine kısa zamanda spor yayılması söz konusudur.

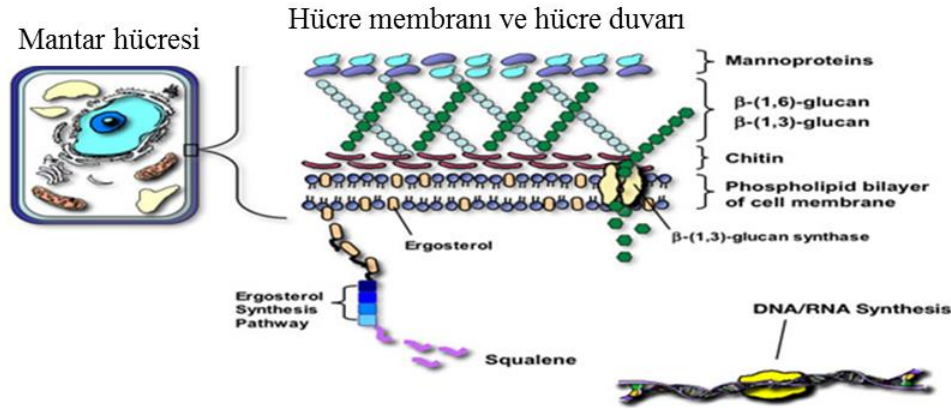
Mantar hücre duvarı temel kimyasal bileşenleri kitin, gluklan, mannan, selüloz ve proteinden oluşmakla birlikte farklı gruplar içinde ve arasında çok önemli değişiklikler de gözlenmektedir (Tablo 2).

**Tablo 2.** Bazı mantar gruplarının total hücre duvarı kimyasal bileşenlerinin kuru ağırlık fraksiyon yüzdesi (Ruiz-Herrera, 1992; Griffin, 1994).

Gruplar	Örnek	Kitin	Selüloz	Glukan	Protein	Lipid
<b>Oomycota</b>	<i>Phytophthora</i>	0	25	65	4	2
<b>Chytridiomycota</b>	<i>Allomyces</i>	58	0	16	10	?
<b>Zygomycota</b>	<i>Mucor</i>	9*	0	44	6	8
<b>Ascomycota</b>	<i>Saccharomyces</i>	1	0	60	13	8
	<i>Fusarium</i>	39	0	29	7	6
<b>Basidiomycota</b>	<i>Schizophyllum</i>	5	0	81	2	?
	<i>Coprinus</i>	33	0	50	10	?

\*Başlıca kitosan

Hücre duvarı iskeleti çapraz bağlı fibrillerden oluşmakta ve aralarında geçirgenliği sağlayan porları kapsayan jel veya kristal benzeri matriks bulunmaktadır. Ana yapısı mannoz olan mannoproteinler ya da mananlar, yapışma veya tanıma gibi fonksiyonları yerine getirmektedirler (Webster ve Weber, 2007). Ascomycota ve Basidiomycota fibrilleri kitin mikrofibrilleridir ve N-asetil glukozamin zincirleri arasında lineer  $\beta$ -(1-4) bağı bulunmaktadır. Bu fibriler yapılar plazma membranında sentez edilir ve membrana taşınarak özellikle hifanın apikal ucun etrafında gelişen hücre duvarının inşasında kullanılır. Hücre duvarı çok sayıda glukozaminin (glukoz polimeri) birbirlerine  $\beta$ -(1-3) ve  $\beta$ -(1-6) glikozit bağlarıyla çapraz bağlanmaları nedeniyle sert yapıya sahiptir (Şekil 2).



Şekil 2. Mantar hücre duvarı yapısı (URL-2)

Hücre duvarı proteinleri, birçok glukolizasyon ile modifiye olmaktadır. Yapısal proteinlerin yanı sıra duvarın sentezinde veya ekstraselüler parçalanmada gerekli çok sayıda enzimleri de içerir. Bu amaçla çok miktarda hidrolitik ve oksidatif enzimleri salgılama yeteneğindedirler (Webster ve Weber, 2007).

#### 1.4. *Trichoderma*'ların Sınıflandırılması

*Trichoderma*'ların sınıflandırılmasında pek çok bilim adamı çalışmalarda bulunmuştur. İlk çalışmalardan biri Persoon (1794) olup *Trichoderma*'ları üç türe ayırmıştır. 1969 yılına kadar sınıflandırma bakımından çok zorluk çekilmiş fakat gerçekçi bir sınıflandırma ilk kez Rifai tarafından yapılmış olup, morfolojilerine göre toplam 9 tür, 27 alt türe ayrılmıştır (Rifai, 1969). Bissett (1991a,b,c) tarafından *Trichoderma* cinsinin sınıflandırılması yeniden gözden geçirilmiş, morfolojik özellikleri bakımından

*Trichoderma*, *Pachybasium*, *Longibrachiatum* ve *Hypocreanum* olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Bitki patojeni funguslara karşı antagonistik özelliği olan *Trichoderma* suşlarının birçoğunun, seksüel üreme evresi bilinmediğinden dolayı Fungi Imperfecti (Deuturomycetes) olarak sınıflandırılmıştır (Monte, 2001). Bununla birlikte bazı *Trichoderma* türleri morfolojik olarak anamorfik *Hypocrea* 'lara benzediği bildirilmektedir (Benitez vd., 2004). Bir çok araştırmacı (Rifai ve Webster, 1966; Doi, 1972; Samuels vd., 2006) sayesinde mikroskopik ve moleküler metotlar kullanılarak yeni türler belirlenmiştir. Küçük mikroskopik değişiklikler ve zayıf tanımlama kriterleri yüzünden *Hypocrea*'nın taksonomisi halen devam etmektedir.

Chaverri ve Samuels (2003) ile Webster ve Weber (2007) yaptıkları çalışmaya göre *Trichoderma* spp. aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır.

Alem	:	Fungi
Şube	:	Ascomycota
Altşube	:	Pezizomycotina
Sınıf	:	Sordariomycetes
Takım	:	Hypocreales
Aile	:	Hypocreaceae
Cins	:	<i>Hypocrea</i> (Teleomorf), <i>Trichoderma</i> (Anamorf)
Tür	:	<i>Hypocrea lixii</i> ( <i>Trichoderma harzianum</i> )
Alt tür	:	<i>Hypocrea lixii</i> ( <i>T. harzianum</i> Rifai 1969)

#### **1.4.1. Takım: Hypocreales**

Pyrenomycetes sınıfı Samuels ve Blackwell (2001) tarafından tanımlanan genellikle kadeh ya da şişe şeklindeki askomata (perithecia) ya da nadir olarak kleistotekium (cleistothecia) oluşturan mantarlardır (Webster ve Weber, 2007).

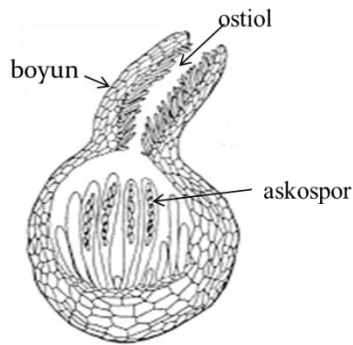
#### **1.4.2. Aile: Hypocreaceae**

*Hypocreaceae* familyası bireyleri *Hypocreae*, *Sphaerostibella* ve *Hypomyces*'den oluşmaktadır. *Hypomyces* diğerlerinden stromatanın yokluğu ve bazı türlerinden subiculum varlığı ile ayrılır (Chaverri ve Samuels, 2003; Webster ve Weber, 2007).

### 1.4.3. Cins: *Hypocrea*' ların Genel Özellikleri

*Hypocrea* cinsi oldukça yaygın bir cinstir. Ağaçların odun kabuklarında ve yaprakların yüzeyinde yastık veya yayık şeklinde stromata bulundurulur. Asci dar silindirik şeklinde tek seri üzerinde sekiz tane ikili hücre içerir. Sporlar septum ile ayrılır. Olgunlaştığında ise 16 spor oluşur. *Trichoderma* ve *Gliocladium*'u kapsayan *Hypocrea* cinsi içinde birçok anamorf tip bulunur.

*Hypocreales* takımının telemorf formlarının tüm tipleri nemli ormanlarda yaygın bulunmaktadır. Bu funguslar, parlak renkli farklı fruktifikasyon yapılarından dolayı kolaylıkla tanımlanabilmektedir. Telemorf formunda peritekiyum denilen yapılar bulunur, ölçüsü ve büyüklüğü türe göre değişmekle birlikte taksonomide çok kullanışlı değildir. Peritekiyumların içinde kese (aski) şeklinde yapılar bulunmakta olup az sayıda askosporlar içerir (Şekil 3). Askosporlar boyutları türe göre farklı olup renkleri genellikle yeşil veya renksizdir. *Trichoderma* telemorflarında korteks tabakasında ostiolar denilen renksiz açıklıklar görünür. İzolasyon ve identifikasyonda bu bölge önem arz etmektedir. Telemorf formunda stromata denilen yapılar mevcuttur. Stromataların yapısı ıslaklığa, kuraklığa ve iklim koşullarına göre değişebilmektedir. Genç stromatalarda soluktan parlağa değişen (yeşil, beyaz veya sarı granüllü) lif şeklinde olup en spesifik özelliği peritekiyal askokarp içerisindedir askospor içermeleridir. Askosporları tek veya çok sayıda, türe göre küresel veya iğne şeklinde gözlenir. İnce az ya da çok kalınlaşmış ovoidden silindire kadar değişen küresel apikal gözenekli aski içerir (Chaverri ve Samuels, 2003).



Şekil 3. Stromata yapısı (peritekiyal askoma)

Anamorf formlarında eşeysiz üreme yapıları olan konidioforlar gözlenir. Konidiaforlar, ağaç şeklinde dallanmış az veya çok piramit şeklinde olup fiyalidlerin ucunda konidialar gelişir. Konidiaforlar enteroblastikten fiyalidik forma kadar değişen tipte konidialar üretmeleridir. En iyi geliştiği besiyeri ortamı olan Patates desktoz agarda (PDA) genellikle sarı, kahverengi, çok azda olsa kırmızımsı renkler gözlenirler. Düşük besinli agarda (SNA) ise genellikle hem anamorf (Şekil 4) hem de telemorf formları gelişir. Hifa yapısı kültür koşullarına göre değişmekte olup primer ve sekonder hifalar gelişir. Bazı türlerde koku sınırlı olarak belirlenebilmekte, özellikle %2 glucose-monohidrat içeren corn meal agar petri içerikli (CMD) ve PDA üzerindeki besiyerinde fındık kokusu benzeri koku tespit edilmiştir. Antifungal antibiyotik özelliği gösteren 6-fenil pironun neden olduğu koku seksiyondaki bazı türler için tipik bir özelliktir (Jaklitsch, 2009).

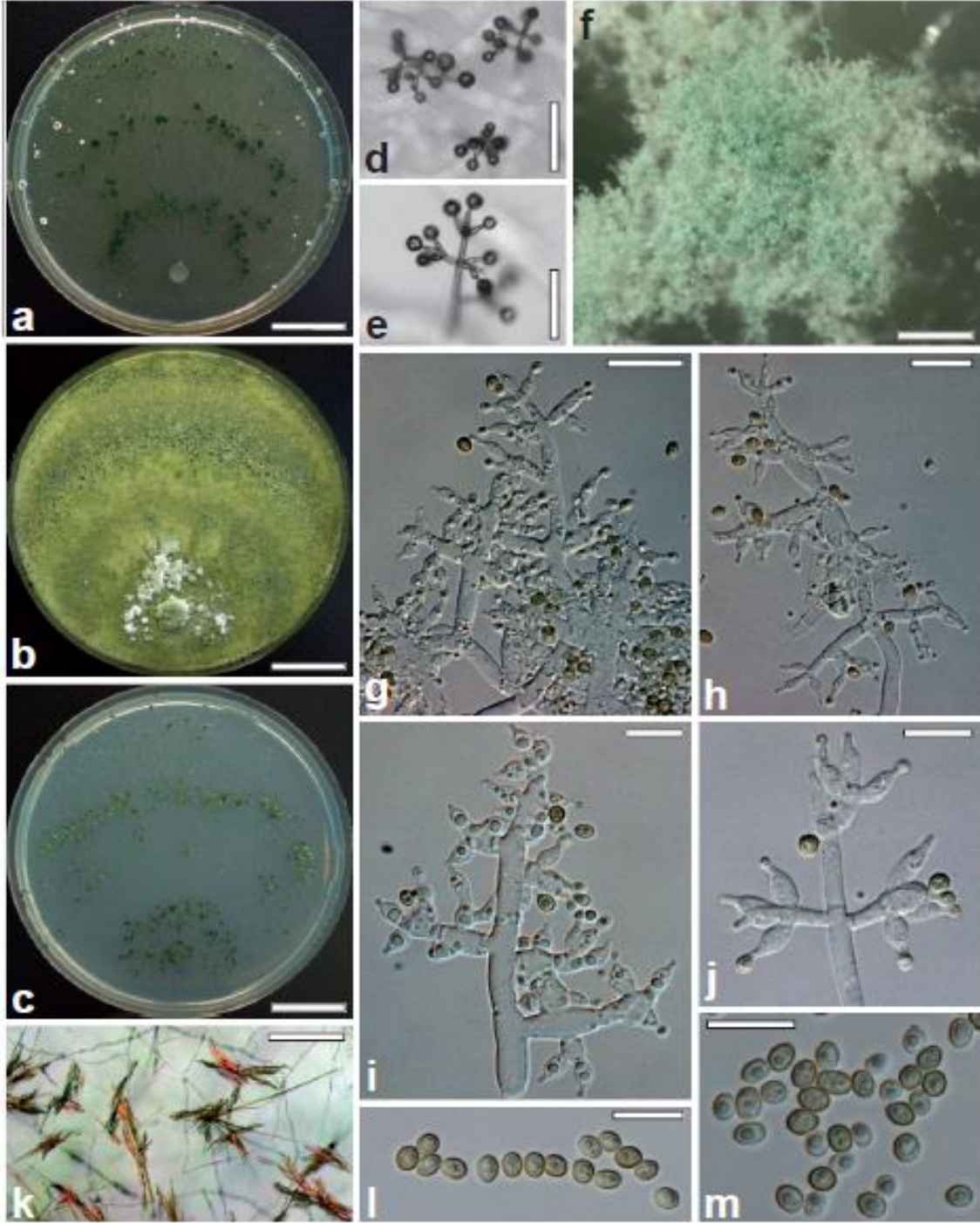
Tüm bilinen *Trichoderma* spp. telemorfu renksiz (hiyalin) askosporlar içerir. *Trichoderma*'ların PDA besiyerinde başlıca üç şekilde konidia oluştururlar. Bunlar Püstülat, Püstülat- effuz ve Effuz konidialardır Konidiaforların yapısına göre genel olarak beş farklı konidiafor yapısı (Şekil 5) mevcut olup bunlar (Jaklitsch, 2009);

**1) *Acremonium* benzeri konidiaforlar:** En az karmaşık olan olup effuz tipi konidiaforlardır. Bir veya birkaç fiyalid kökeni bulunur. Bu *Hypocrea* seksiyonu için tipik bir özelliktir. *Acremonium* benzeri şeklinde başlar sonrasında uzun fiyalidli *Verticillium* benzeri yapılar geliştirirler.

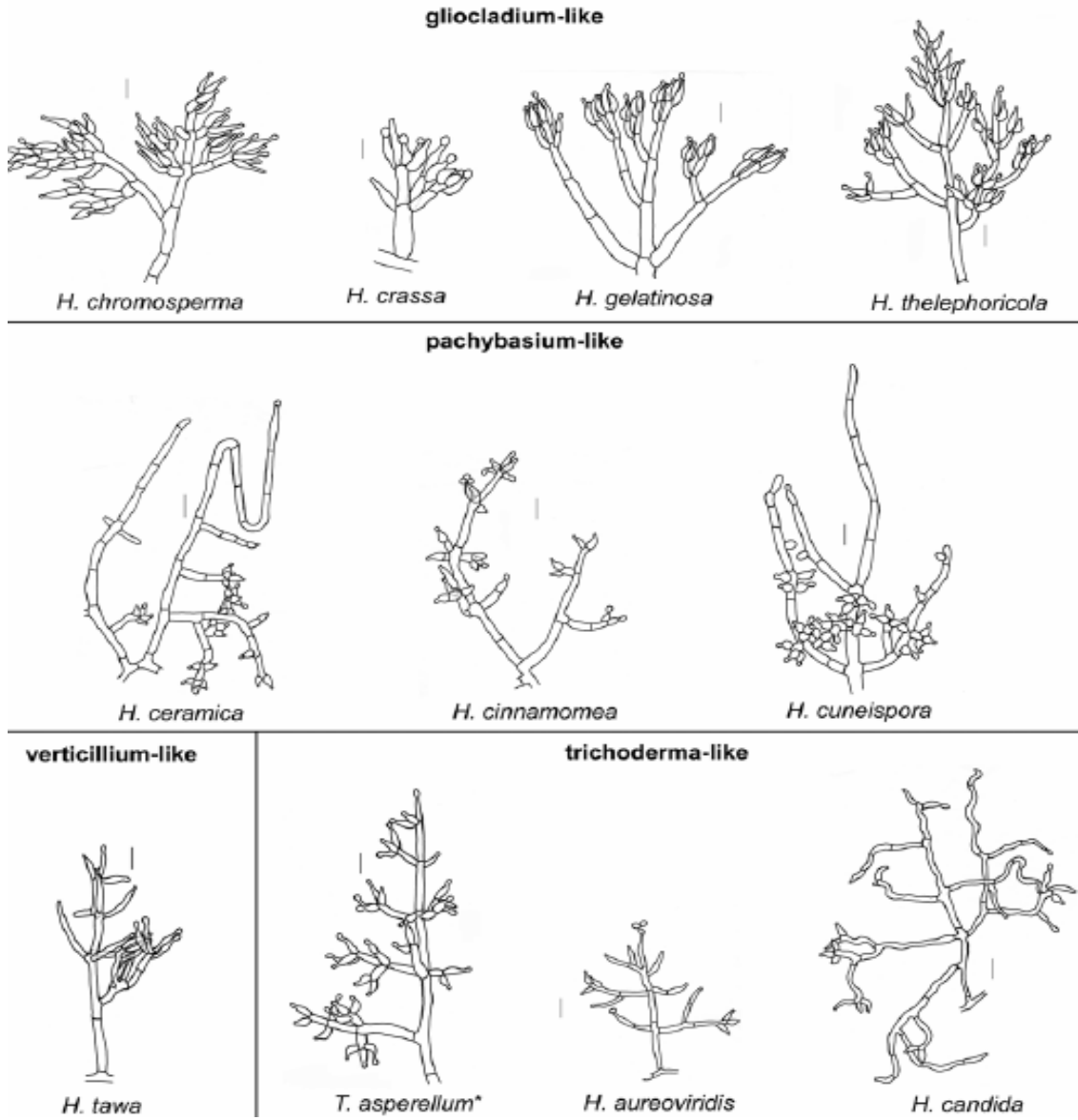
**2) *Verticillium* benzeri yapılar:** Dalsız ya da az dallı dik konidiafor bulundururlar. Verticil veya belirgin farklı fiyalidler meydana getirirler. Fiyalidler bir eksen üzerinde yer alır. Benzer şekilde konidiaforlar sekonder dallanırlar.

**3) *Gliocladium* benzeri yapılar:** Fiyalidler uçta, çok az paralel dallanmamış ya da çok az dallanmış konidiaforların üzerinde fiyalidler gelişir.

**4) *Pachybasidium* benzeri yapılar:** Konidiaforlar çok dallı, şişkin küçük ampul şeklinde fiyalidlerdir. Konidiaforlar basit ya da dallanmış steril veya fertil uzantıları oluşturmaktadır.



**Şekil 4.** *Hypocrea lixii* kültür ve anamorfu. a-c; 7 günlük 25 °C (a. CMD, b. PDA, c. SNA), d; Dallanmış konididasyon (25 °C, 3 gün), f; Kümelenmiş püstül (25 °C, 5 gün), g-j; Konidiafor (25 °C, 5 gün), k; Agar içindeki Kristaller (35 °C, 7 gün), l-m; Konidia (25 °C, 5 gün), d-m; CMD agarda, a-c, f-m; CBS 120630. D; C.P.K. 1599, e; C.P.K. 2389. Bar: a-c = 19 mm, d- e= 40 µm, f- k = 0.3 mm, g- h = 15 µm. İ- m = 10 µm. (Jaklitsch, 2009)



**Şekil 5.** *Hypocrea* türlerinin *Trichoderma* anamorfunun seçilmiş konidiofor tipleri. (Jaklitsch, 2009)

**5) *Trichoderma* benzeri yapılar:** Birçok araştırmacı tarafından verticillium benzeri yapılardan ayrımı zor olan tiptir. Dar esnek ve bol dallanma gösteren konidiaforlar düzensiz, her iki tarafa açılı dallanmaları olan ve her bir dalı sağa ve sola dik dallanmalar yapan konidiforlara sahiptir. Düzensiz tipik tekrarlayan dallanmalar gösterirler. *Verticillium* benzeri yapılar *Trichoderma* benzeri yapılarda da bulunur (Jaklitsch, 2009).



### 1.5. Teleomorf (*Hypocrea lixii*) ve Anamorf (*Trichoderma harzianum*)

Teleomorf: *Hypocrea lixii* Pat., Rev. Mycol. Toulouse 13: 138 (1891).

Anamorf: *Trichoderma harzianum* Rifai, Mycol. Pap.116: 38 (1969).

#### Sinonimleri:

*Hypocrea lentiformis* Rehm, Hedwigia 37: 193 (1898).

*Chromocrea nigricans* Imai, Trans. Sapporo Nat. Hist. Soc. 14: 102 (1935).

*Hypocrea nigricans* (Imai) Yoshim. Doi, Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo 15: 732 (1972).

*Hypocrea nigricans* f. *octospora* Yoshim. Doi, Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo 15: 734 (1972).

*Trichoderma inhamatum* Veerkamp & W. Gams, Calsasia13: 710 (1983).

*Hypocrea lixii* Chaverri ve Samuels (2002) tarafından yeniden isimlendirildi. *Hypocrea lixii*/T. *harzianum* moleküler filogenetik yapısı Chaverri vd. (2003) tarafından yapıldı. Bu türlerin anamorfları fenotipik ve genotipik olarak değişken bulunmuş ve bununla birlikte tür içinde taksonomisinde tanısal karakterleri henüz belirlenememiştir.

#### 1.5.1. Teleomorf: *Hypocrea lixii*

Teleomorf formu eşeyli üreme formunu oluşturmakta olup eşeyli üreme yapısı olarak stromata bulunmaktadır. Teleomorf formunda stroma tek veya küme, yastık şeklinde, hemen hemen yuvarlak bir dış çizgiye sahip, 1–1.1 mm (0.5-5 (-7) mm) çapında, 0.5-1.5 (-2.8) mm kalınlığında ve 0.7–0.8 mm yükseklikte, yüzeyi düzgün, bazen hafif şişkin peritekial (eşeyli üreme yapısı= fruting body), koyu kahve veya yeşil, neredeyse siyah, KOH içinde koyu yeşilden kahveye değişen renklerde gözlenir. KOH muamelesinden sonra stromata koyu kahveye döner, ostiolar açıklık stromanın koyu renginden dolayı görünmez. Stromata anamotisi = ostiol 50-80 µm uzunluğunda apeks kısmı 17-48 µm genişliğinde dar hiyalin silindirik palizata sahiptir. Peritekiyumları (1.45-2.80) x (80-200) µm çaplarında globuler flask ya da elipsoidal olup yeşilimsi renktedir. Eskidikçe düzensiz dairesel, granular ostiolar nokta belirsiz düz veya konveks kahverengimsi yapı oluşturur. Stroma yüzeyi açısız kalın hücre duvarıyla şekillenmiş, kompakt, kahve (KOH-) veya koyu yeşil (KOH+), 7.8–8.5 µm çapındadır. *Trichoderma harzianum* toprakta yaygın olup kozmopolitan bir türdür, fakat teleomorfu yalnızca tropikal bölgelerde bulunur. Stromatadan olgunlaşıp kurduktan sonra misel gelişimi başlar önce beyaz sonra yeşil sporlu miseller gelişir (De Hoog vd., 2003)

Hermosa vd. (2000) tarafından *Trichoderma harzianum* biyokontrol grubunu dört farklı tür altında toplanmış olup bunlar, *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. longibrachiatum* ve *T. asperellum* şeklinde belirtilmiştir.

Taze kültürleri; üst kısmında hafif renkli periteka ile hafif renkli stromadan oluşan, 8 adet uniseriat düzenlenmiş aski içeren, askus içinde iki hücreli askosporlar boğumlanmış (eklemlili, disartikulat) ve her bir askus 16 spor oluşturma özelliğine sahip bir mantar cinsidir.

### **1.5.2. Anamorf: *Trichoderma harzianum* Rifai (1969)**

Anamorf formu eşeysiz üreme formunu oluşturmakta olup eşeysiz üreme yapıları olarak konidiospor (conidium, çoğulu: conidia) ve klamidiospor bulunmaktadır (Gams ve Bissett, 1998). Konidioforları genellikle 2–3 kez dallanmış piramitler şeklinde, tepeden sürekli dallanmalar gösterir. Konidialar, konidiofor adı verilen farklılaşmış hiflerin ucunda oluşurlar, tek veya çok hücrelidirler (Samuels, 2006). Konidialar başlangıçta püstüler (kabarcıklı) ve ıslak yüzeyli kurduğunda < 20 µm çaplıdır. Kabarık demetler bir sap üzerinde dallanmalarla başlar, etrafa doğru 2-3 hücre dallandıktan sonra sıklıkla dik açıyla veya hafif yukarı doğru eğilimle 30-40 µm uzar. Sap ve ana eksen 5-7 µm genişler, yukarı doğru (2.5-4 µm) zayıflar, fiyalidlerin orjini genişler, bazen 6-7 µm kalınlığındaki noktalarda dallanır. Fiyalidler ampul veya lageniform (şişe varil şeklinde veya silindirik metalı) formda, genelde tek olarak bulunur. Tipik sık dallanmış konidioforları, çift dalların birleşmesiyle piramit görünümünü alır. Konidialar yeşil, düzgün, küresele yakın, ovoid 2.7–3.5 × 2.5–3.0 µm boy, 1.0–1.3 µm enindedir. İnkübasyonun 5-14 günlerinden sonra klamidiosporlar fark edilir (De Hoog vd., 2003).

Hiflerin uç veya orta kısımlarındaki hücrelerin çeperleri kalınlaşıp, yuvarlaklaşarak hifden ayrılmasıyla oluşan klamidiosporlar birçok *Trichoderma* türleri tarafından üretilir. Bunlar genellikle fungusların olumsuz koşulları geçirmek için oluşturdukları sporelerdir. Kısa hif sonunda bulunan klamidiosporlar genellikle uniselüler yapıda olmakla birlikte *Trichoderma stromaticum* gibi bazı türleri multiselülerlidir. Klamidiosporlar küresel ya da küresele yakın şekilde, 6.0–9.7 µm çapında, hifanın ucunda ya da ucuna yakın yerlerde gözlenir (De Hoog vd., 2003).

Koloniler yoğun sıkı primer yüzeyel hifa gelişir, bir süre sonra misel daha da sıkılaşıp yünümsü bir örgü görünümü kazanır ve sarıdan yeşile dönen renklerde konsantrik zonlar gözlemlenir. Aerial hifalar fark edilmez, kısa, düzensiz dağılmış veya uzamış fertil hifalardır. Koloni şekli PDA üzerinde 25 °C’de 1 haftada pamuksu, her tarafı eşit şekilde kaplamış bol sayıda, püstülsüz ve yeşil renkte konidialar gözlenir. Koloni tabanı renksiz, portakalimsı, ten rengi veya sarımsıdır (Rifai, 1969). Koloni çapı PDA’da 3 gün 15°C’de 5–17 mm, 20 °C’de 12–44 mm, 25 °C’de 33–72 mm, 30°C’de 41–72 mm şeklinde oluşur.

Otolitik aktivite 25°C’de not edilmemiş fakat yüksek sıcaklıklarda gözlenmiştir. Farklı besiyerlerinde koloni morfolojisinde küçük değişiklikler gözlenebilir. Mısır-dekstroz agar besiyeri üzerinde şeffaf, daha zengin içerikli PDA besiyeri üzerinde ise beyaz renkli koloniler gözlenir. Özellikler PDA besiyeri üzerinde yetiştirilen kültürlerin konidleri içindeki sarı pigment agar içine salınabilir (Persoon, 1794; Rifai, 1969; De Hoog, vd., 2003).

#### **1.6. *Trichoderma* Cinslerinin Habitatı**

*Trichoderma* cinsi çok hızlı üreyen filamentöz bir mantar olup (Samuels, 1998), dünyada geniş bir yayılıma sahiptir (Domsch vd., 1980; Gams ve Bissett; 1998; Klein ve Eveleigh, 1998). Yaşam ortamları çok geniş olup karada, tatlı suda ve daha az oranda deniz suyunda yaşayan türleri bulunmaktadır. *Trichoderma* türleri, orman humus tabakası, nemli odunda, sudan zarar görmüş binalarda şapkalı ve raf mantarı yetiştirilen odalarda, tarım toprakları ve üzerinde meyve ağacı yetişen topraklar dahil olmak üzere tüm topraklardaki mikrofloranın baskın bir bileşenidir (Roiger vd., 1991; Killham, 1994).

*Trichoderma* anamorfları daha çok baharın başlarında görülmektedir. Daha sonra stromata gelişmekte, sıcaklığın artmasıyla teleomorf formu oluşmaya başlar. Doğada yüksek verimli ortamlarda *Hypocrea* teleomorflarını karakterize etmek zordur. Orman ürünleriyle zengin karışımlarda (odun ve parçaları) daha kolay gelişmektedir. Stromata oluşumu uzun süreli nemli ortamlarda sağlanmaktadır. *Hypocrea* teleomorfları doğada çok ıslak veya çok kurak ortamlara dayanıklı oldukları, anamorf formlarının ise rahatlıkla bu ortamlarda gelişebildikleri bildirilmektedir (Carvajal ve Bisset., 2011). Ortam sıcaklığı fruting body oluşturmada etkilidir. Genel olarak üremeleri sıcaklıkla pozitif ilişkili olmakla birlikte 30 °C üzerindeki bir sıcaklık, stromata sayısının azalmasına neden olmaktadır.

*Hypocrea lixii* ılık mevsimlerde daha iyi gelişirken, bazı türleri de (örneğin; *Hypocrea minutispora*) stromata oluşturup gelişebilmektedir. Bazı türleri yüksek rakımlarda düşük sıcaklıklarda gelişirken diğer bazı türleride deniz seviyesini tercih etmektedir (Wuczowski vd., 2003; Joshi vd., 2012). *Trichoderma* spp. türleri sıklıkla ormanlardan ve tarımsal topraklardan izole edilirler (Domsch vd., 1980). Ayrıca çoğu küf mantarı gibi çürümekte olan organik materyal üzerinde yaşayan bitki patojenleri içerisinde de birinci sırada yer alır (Volk, 2004).

*Trichoderma* spp. hızlı gelişmeleri çeşitli substratları metabolize edebilmeleri açısından farklı ekosisteme (örneğin tarım alanlarında, ormanlarda, kırlarda veya farklı iklim zonlarında sahip çok geniş alanlarda) sahip topraklarda baskın flora olmalarını sağlamaktadır. Optimum koşullarda tam bir anamorf-teleomorf-anamorf yaşam döngüsünün meydana gelebileceği bildirilmektedir. Bazen aynı materyal üzerinde iki veya daha fazla *Trichoderma* türünün teleomorf formu birlikte bulunabilmektedir. Bir seri olarak biyotik ve abiyotik çevresel parametreler *Trichoderma*'nın biyokontrol özelliği üzerine etkilidir. Belirlenen bazı önemli parametreler sıcaklığın etkisi, su potansiyeli, pH, topraktaki antagonistik bakteri varlığı, metal iyonu ve pestisit varlığıdır. *Trichoderma*'ların çoğu mezofildir. Düşük sıcaklıklar biyokontrol etmen olarak kullanımını etkilediği gibi kurak koşulları da tolere edilemeyebilir.

Toprakta yaşayan mikroorganizma komunitelerinin biyolojik aktiviteleri, biyokütleleri ve kompozisyonları toprağın kimyasal ve fiziksel faktörlerine bağlıdır (Killham, 1994; Lavelle ve Spain, 2001; Garbeva vd., 2004). Sıcaklık, nem ve pH bütün mantar türlerinde olduğu gibi *Trichoderma* spp. suşlarının kolonizasyonu açısından da önemli bir yere sahiptir (Widden ve Abitbol, 1980; Eastburn ve Butler, 1991; Carreiro ve Koske, 1992). Yapılan araştırmalar pH açısından *Trichoderma* cinsi mantarların gelişimi ve spor germinasyonlarının (Danielson ve Davey, 1973) asidik substratlı ortamlardan pozitif yönde etkilendiğini ve optimal pH 3.5-5.6 aralığının olduğu bildirilmektedir (Domsch vd., 1980). *Trichoderma* spp. türleri sıcak tropikal topraklardan izole edilebildiği gibi soğuk topraklarda da gelişebilir (Klein ve Eveleigh, 1998), 0 °C'den 40 °C'e kadar geniş bir sıcaklık aralığında varlıklarını sürdürebilirler, fakat gelişimleri için gereken optimum sıcaklık 22-30 °C arasında gözlenir (Domsch vd., 1980). Bazı türlerin (*Hypocrea schwetinitzii* vb.) 35 °C'de gelişim gösterdiği görülmüştür (Jaklitsch, 2011).

Toprak nemi, topraktaki diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi *Trichoderma* spp. populusyonlarının yayılımında da önemli bir faktördür (Lavelle ve Spain, 2001). Çok yüksek toprak nemi hif gelişimi, spor üretimi ve germinasyonunu negatif düzeyde etkilerken (Clarkson vd., 2004); orta düzeydeki toprak nemi optimum gelişimi ve populusyonun yayılışı açısından sıcaklıktan daha önemli bir faktör olduğu gözlenmiştir (Danielson ve Davey, 1973).

### **1.7. *Trichoderma harzianum* Suşlarının Biyokontrol Etkeni Olarak Kullanılması**

Saprofitler, epifitler, endofitler, patojenler ve yararlı mikroorganizmalar rizosferdeki mikrobiyal komunitiyi oluştururlar. Toprakta denge halinde bulunan bu mikroorganizma populusyonlarının değişimiyle, yararlı mikroorganizma populusyonunun azalması, bitki patojenlerinin toprakta baskın hale gelmesi sonucu bitki üretimi, dolayısıyla bitki verimi olumsuz etkilenmektedir. Yararlı rizosfer mikroorganizmaları iki ana sınıfta gruplandırılmıştır (Kucharski vd., 1996).

a) Bitki gelişimini direkt olarak etkileyen (teşvik eden)

b) Bitki gelişimini dolaylı olarak etkileyen biyolojik kontrol etkenleri, bitki patojenlerini kontrol etmesiyle

Bu mikroorganizmaların bitki sağlığı ve verimleri üzerindeki önemleri son yıllarda yapılan çalışmalarla gösterilmiştir ki *Trichoderma* spp. bitki hastalık etmenlerine karşı etkili olmaktadır. Bitki kök yüzeylerine kolonize olarak bitki metabolizmasında değişikliklere neden oldukları yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Bitki patojenlerinin gelişimlerini engelleyerek hastalığı azaltması, hormon benzeri metabolitler üretmesi, toprak veya organik maddeden besinleri çözebilmesiyle bitki gelişiminde önemli rol oynamaktadırlar. *Trichoderma* türleri en çok çalışılan biyokontrol mikroorganizmalar olmakla birlikte, biyokontrolde etkili olan mekanizmalarının mikoparazitizm, antibiyosis, rekabetlilik olduğu rapor edilmiştir.

Bazı izolatların bitkiyi hastalıklara karşı dirençli hale getirdiği ve bitki gelişimini teşvik ederek, ürün verimini arttırdığı bildirilmektedir (Hermosa vd., 2012).

Birçok ülkede temiz çevre ve sağlıklı üretim sistemi için biyolojik gübre formulusyonları elde edilmesi amacıyla çalışmalar yapılmaktadır (Aksoy ve Altındişli, 1998).

Bu amaçlarla genellikle *Bacillus* spp., *Azotobacter* spp., *Trichoderma* spp., *Rhizobium* spp., *Azospirillum* spp. ve *Saccharomyces* spp. gibi mikroorganizmalar seçilmektedir. Bunlar arasında *Trichoderma* spp. özellikle fungal kaynaklı biyolojik mücadele ajanı ve aynı zamanda mikrobiyal gübre olarak kullanılan, üzerinde en çok araştırma yapılan mikroorganizmadır.

Pestisitlerin oransal olarak iyileştirici düzeyde kullanımlarının teşviki; bitkileri zararlılara, patojenlere ve yabancı otlara karşı korumakta, tüketici ve çevre sağlığını önemli ölçüde korunması sağlanmaktadır. Mikrobiyal pestisitler ürün koruması için oluşturulmuş olup yeni generasyonları geliştirilmektedir. Mikrobiyal pestisitlerin geliştirilmesi işleminde birçok basamak olup bunlar saf kültür izolasyonu, tanımlanması, karakterizasyonu, invitro ve ex-novo şartlarda biyoyararlılıklarının belirlenmesi ve arazi şartlarında uygulama sonuçlarının belirlenmesi aşamalarını içerir. Öncelikle birçok mikrobiyal pestisit ticari olarak dağıtımı için biyokontrol ajanının endüstriyel skalada üretimi, depolama şartlarının belirlenmesi ve canlılığını koruması ve uygulama ürünün geliştirilmesi ve de biyokontrol ajanının formüle edilmesi gerekmektedir. Ayrıca son ürünün stabilitesi önemli olup biyokontrol ajanının toksik kimyasal ara ürün oluşturmaması da önemlidir (Alexopoulos vd., 1996).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda *Trichoderma harzianum* KUEN 1585 gibi biyolojik mücadele etmenlerinin bitki gelişimini teşvik ettikleri ortaya konmuştur. Tarımsal ürünleri hastalıklara karşı korumak ve gelişimlerini arttırmak için, bu mikroorganizmaların uygun zamanda ve miktarlarda kullanımları sonucu kimyasal gübrelerin kullanımlarıyla oluşan problemlerin çözülmesine katkı sağladığı düşünülmektedir (Kucharski vd., 1996).

*Trichoderma* T-22 ile bulaştırılmış mısır kökleri, kontrol ile kıyaslandığında, %40 daha az azot içeren gübrede gelişim gösterdiği bildirilmektedir (Altomare vd., 1999; Harman, 2000). Yapılan çalışmalarda *Trichoderma* cinsinin, derin köklerin sayısını arttırdığı ve bu sayede bitkilerin kuraklığa daha dirençli hale geldiği gözlenmiştir. Biyokontrol mikroorganizmalarında biyokontrolü sağlayan bileşikleri kodlayan çok sayıda geni içerdiği bildirilmektedir (Harman ve Kubicek, 1998). Bu genlerden biri olan endokitinaz genleri, tütün ve patates bitkilerine transgenik olarak sokularak, tütün bitkisinde *Alternaria alternata*'ya ve patates bitkisinde *Rhizoctonia solani*'ye karşı direnç gösteren bitkilerin gelişmesi sağlanmıştır (Lorito vd., 1998).

### **1.8. *Trichoderma* spp. Fungal Patojenlerin Kontrolünde Etki Mekanizmaları**

*Trichoderma* spp.'nin toprakta yaygın olarak bulunduğu, fırsatçı avirulant bitki simbiyontu ve bazı bitki patojeni funguslara karşı antagonistik etki gösterdiği belirlenmiştir (Cook ve Baker, 1983). Antagonistik mikroorganizmaların başlıca üç önemli etki mekanizmaları bilinmektedir. Bunlar;

#### **a) Antibiyosiz**

Fungus tarafından üretilen uçucu ve uçucu olmayan antibiyotiklerle oluşan etkinliktir. *Trichoderma harzianum*'un canlı bitki dokularına zarar vermediği, patojenlerin gelişimini önlediği ve en önemlisi bitki gelişimini arttırdığı tespit edilmiştir (Chet, 1990). *Trichoderma* spp.'nin en önemli antagonistik özelliği hiperparazitizm olmakla beraber bazı türleri biyoaktif maddeler üreterek antagonistik özelliklerini arttırmaları (Howell, 2003, 2006; Harman, 2006). *Trichoderma* spp. türleri tarafından salgılanan sekonder metabolitlerin büyük bir kısmı antimikrobiyal aktiviteden ziyade melanin ve karetenoid gibi pigment (Griffin, 1994) ve bitki gelişme düzenleyicileri (cyclonerodiol gibi) veya mannitol gibi (Windham vd., 1986; Sivasithamparam ve Ghisalberti, 1998) antikanser etkili bileşikler ihtiva ederler. *Trichoderma* türleri spesifik olarak birçok sekonder metabolik salgılamalarına rağmen ikincil metaboolitlerin fonksiyonu tam olarak belirlenememiştir. Bu sekonder metabolitlerin ekolojik önemi tam olarak anlaşılmamış olsa da daha fazla araştırmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

*Trichoderma* türleri tarafından üretilen antibiyotikler; gliotoksin, harzianik asit, trikhoviridin, viridin, viridiol ve almetisin vb. şeklinde bildirilmektedir. Bu antibiyotikler, hücre duvarı degrade edici enzimlerle kombine edildiğinde sinerjik etki gösterip birçok bitki patojenine karşı güçlü bir inhibitör olarak ortaya çıkmaktadır (Benítez vd., 2004; Navazio vd., 2007; Vinale vd., 2008).

#### **b) Yer ve besin (karbon, azot, mikro elementler) için rekabet**

*Trichoderma* spp. tarım yapılan bütün topraklarda ve diğer çevre şartlarında bulunan bir mikrofungus türü olup patojen ya da hedef funguslara doğru gelişerek, onları saran ve hücre duvarlarını bozarak gelişmelerini engelleyen bir antagonist mikroorganizmadır. Bu antagonist etkinlik ya da mikoparazit aktivite, bitki patojeni fungusların gelişmesini ve faaliyetini sınırlar. Bazı ırklar mikoparazitizm ile birlikte antibiyotik maddeler de üretebilir. Yabani ırkların fizyolojik özellikleri ve sayıları, bitki

hastalıkları ile etkili mücadele için yeterli olmamasına rağmen, bu faydalı organizmaların antifungal özellikleri 1930'lardan beri bilinmekte ve o zamandan beri bitki hastalıkları ile mücadelede kullanılmaları için yoğun çabalar harcanmaktadır.

*Hypocrea/Trichoderma* genellikle hem doğal hem de ksenobiyotik organik materyalleri parçalayan saprofit bir cins olarak tanımlanmaktadır (Rossman 1996; Klein ve Eveleigh 1998). *Hypocrea*'lar beslenme stratejilerine göre biyotrofikten neotrofiğe kadar değişen alanlarda etkinlik göstermesi nedeniyle dikkat çekicidir. Neotrofikler; öncelikle salgıladıkları ekstraselüler enzim ve toksinlerin yardımıyla patojen fungusa yapışan, hücreyi öldüren etkinlik gösterdikleri bilinmekte ve kolonizasyon daha sonra gerçekleşmektedir; (Carvajal ve Bisset., 2011). Biyotrofikler ise; konak hücrenin metabolizması üzerine etkilidirler ve öncelikle dokuyu sararlar. Bazı biyotrof konaklar hücrenin ölümünü üremesini tamamlayana kadar geciktirirken, diğerleri basitçe saprofitik olarak konak hücrenin ölümünden sonra bozumasına neden olurlar. Eğer biyotrofikler konak hücreyi öldürmüyorsa değişik streslere maruz bırakarak metabolik olarak hassas duruma düşmesine neden olurlar. Patojenin ölümü ortamda oluşan atık ürünlerin yoğunluğu ve besinleri azalmasıyla biyotrofik enfeksiyon boyunca devam eder (Prell ve Day, 2001). Bunlar endofit olup hayvanlar, bitkiler ve funguslar için parazitirler. Bazı türleri ise odun ve gübre içerisinde saprofitirler (Alexopolus vd., 1996).

Katayama ve Matsumura (1991) tarafından yapılan çalışmada, rizosfer fungusu olan *Trichoderma*'nın birçok sentetik boyalar, pentaklorofenol, endosulfan ve diklorodifenil trikloroetan (DDT)'a karşı parçalayıcı etkinliğinin varlığını belirlemişlerdir. Böylece *Trichoderma* spp. herbisit/pestisit uygulanmış toprakların biyoremediasyonunda da salgıladıkları hidrolazlar, peroksidazlar, laktazlar ve diğer parçalayıcı enzimler aracılığıyla bu kontaminantların temizlenmesinde başarılı bir şekilde uygulandığı bildirilmektedir.

Biyokontrol ajanı olarak başarılı bir şekilde kullanılan *Trichoderma* suşlarının üreme ve uygun olmayan koşullarda canlı kalabilme, besinlerden yararlanabilme, rizosferde modifiye olabilme, bitki gelişme ve savunma mekanizmalarını güçlendirebilme ve patojenik mantarlara karşı direnç gösterebilme yetenekleri oldukça iyi olduğu bildirilmektedir. Bazı *Trichoderma* biyokontrol ajanları yüksek etkinlikte siderofor üreterek demir şelatları oluşturur ve diğer fungusların gelişimini durdurur veya ortamdaki



demirden yararlanamadığı için besin kıtlığına maruz kalan patojenlerin ölümüne neden olur (Eisendle vd., 2004).

*Trichoderma* genusuna ait suşların büyük çoğunluğu rizosferde görevli olup tarımda kullanılan hidrokarbonları, klorofenolik bileşikleri, polisakkaritleri ve ksenobiyotik pestisitleri parçalayabilirler (Harman vd., 2004; Harman ve Kubicek, 1998). Tüm bu özellikler *Trichoderma*'ya herhangi bir ortamda bulunabilme ve popülasyondaki yoğunluğunu yüksek tutabilme yeteneğini sağlamaktadır (Chet vd., 1997).

### c) Mikoparazitizm

Bir fungusun başka bir fungusa (patojen) karşı salgıladıkları enzimlerle miselini delerek beslenmesi ve bu şekilde ölümüne sebebiyet vermesidir. Mantar türleri arasında birbirini parazitize eden mantarlar bilinmekte olup bunlardan en çok bilineni *Trichoderma* türleridir. *Trichoderma* cinsi altındaki funguslar biyokontrol aktivitesi göstermektedir ki bu cinsi içinde en çok bilinen biyokontrol fungusu (BCA<sub>s</sub>) türleri *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma flavofuscum* ve *Trichoderma viride*'dir. *Trichoderma* ve bitki patojeni funguslar arasındaki etkileşimi ilk kez Dennis ve Webster (1971) tarafından incelenmiştir. *Trichoderma* hidrolitik enzimleri fungal bitki patojenlerine karşı mikoparazitik fonksiyonu sağlayan kritik elementlerden biridir (Shwet vd., 2000). *Trichoderma*'nın mikoparazitizmi, hedef aldığı fungal patojenin hücre duvarının parçalanmasında anahtar rol oynamaktadır.

Bazı mikolitik enzimlerin aktiviteleri *Trichoderma*-bitki patojeni birlikte kültürlerinde çokça araştırma yapılmıştır (Dutta ve Chattergede, 2004). Yapılan çalışmalar sonucunda *Trichoderma*'lar, kitinaz, glukanaaz, proteaz ve selülaz gibi litik enzimleri ile patojen fungusların hücre duvarının degradasyonuna neden olan çok sayıda enzimleri sentez edebildikleri belirlenmiştir (Cook ve Baker, 1983; Elad vd., 1983; Chet, 1990). Bu enzimlerin önemi, rolleri ve açığa çıkış şekilleri araştırılmaktadır (Shwet vd., 2000; Küçük vd., 2002).

Funguslarda kitinazın biyolojik ve fizyolojik rolleri, otolitik, besinsel, morfogenetik ve parazitlik açısından önemlidir (Haran vd., 1996a). Farklı *Trichoderma* suşları tarafından üretilen ve antimikrobiyal aktivitesi iyi bilinen çok sayıda, ekstraselüler protein bilinmekte olup özellikle selülaz ve kitinaz gibi parçalayıcı enzimleri en önemlilerdendir. Kitinaz,  $\beta$ -1,3 glukonaz, selülaz ve proteazlar gibi litik enzimler salgılayarak bitki patojenlerine yapışarak kontrol etmeye çalışırlar (Haran vd., 1996a; Balasubramanian, 2003).

Bu enzimler kitin, glukon, selüloz ve proteinazlar gibi patojenin hücre duvarı bileşenlerini hidroliz eden enzimler olup patojen fungal ajanların gelişmesini başarılı şekilde engellerler (Lorito, 1994; Carsolio vd., 1999). *Trichoderma harzianum*'da birçok kitinolitik enzimler rapor edilmiştir (De La Cruz vd., 1992).

*Trichoderma reesei* gibi selüloolitik mikroorganizmalar, kristal selülozu parçalayan ve sinerjik olarak aksiyon gösteren enzim serisi üretebilir. Çoğu durumlarda prokaryotik  $\beta$  1,4-glukanazlar, selülozun sadece çözünebilir formlarına (Karboksi metil selüloz ve hidroksi metil selüloz) ait glikozidik bağların hidrolizini katalizlemektedir.

Fungusların hücre duvarlarında majör yapı olarak laminarin ( $\beta$ -1,3- glukon) ve kitin (Pitson vd., 1993) minör hücre duvarı komponentleri olarak da diğer protein ve lipidleri içermektedir. Laminarin,  $\beta$ -1,3 konfügürasyonunda D-glukoz polimeri olup fungal hücre duvarında komponentlerinin %60'lık kısmını oluşturmaktadır. Laminarin,  $\beta$ -1,3-glukanaz tarafından hidrolize edilmektedir ve bu enzim ekzo ve endo  $\beta$ -1,3-glukanaz olarak sınıflandırılmaktadır. Her iki enzimin de laminarini sindirdiği saptanmış ve funguslarda hücre duvarı yapısında bulunduğundan fungusun beslenmesinde de rol oynadığı ortaya konmuştur (Pitson vd., 1993).

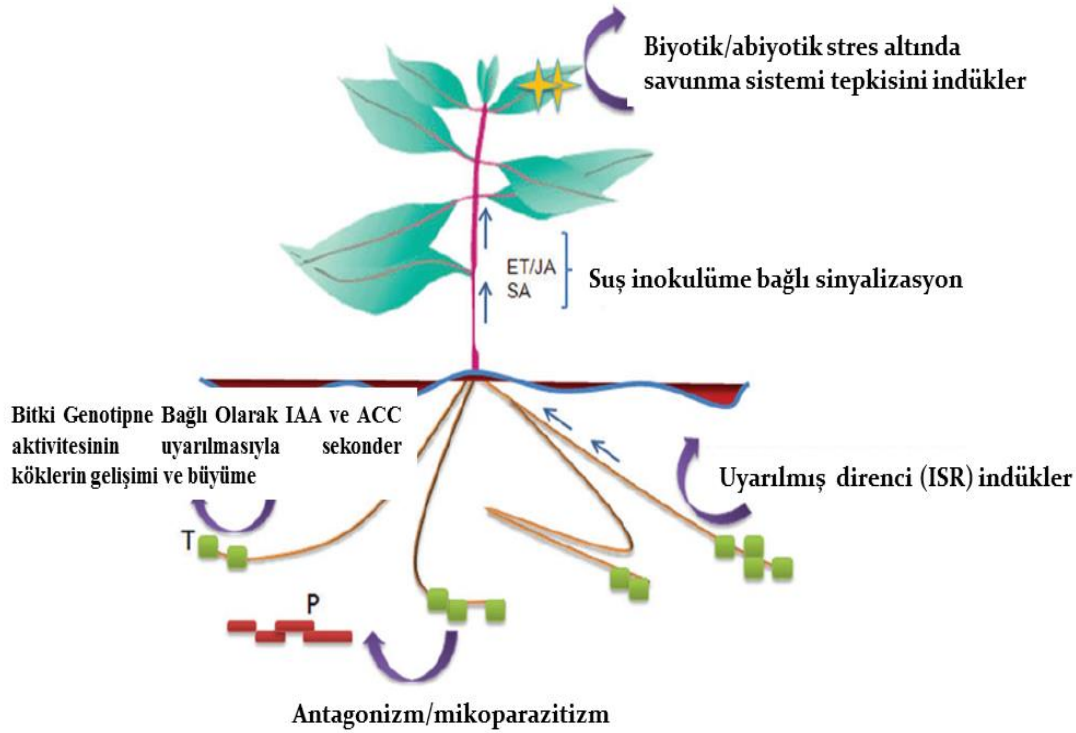
*Trichoderma harzianum* hedef fungal organizma ile kemotropik-mikoparazitik ilişki sayesinde birçok bitki patojenini başarılı şekilde ekarte etmektedir. Bunu mikolitik hücre duvarı degradasyon enzimlerinin salınımıyla (Yang vd., 2009), atpeninlerin salınımıyla, parazitin mitokondriyal metabolizmasını güçlü ve spesifik olarak inhibe etmesiyle gerçekleştirir (Miyadera vd., 2003). *Trichoderma* ve patojenik funguslar arasında tanıma ve spesifiklikte lektinlerin önemli rol oynadığını gözlenmektedir. Lektinler, protein veya şekerlere bağlı glikoproteinlerdir. *Rhizoctonia solani* ve *Sclerotium rolfsii* gibi bazı toprak kökenli bitki patojeni funguslar tarafından üretilmektedir (Elad vd., 1983; Barak vd., 1985). Lektinler, *Trichoderma*'daki parazitik etkiyi tahrik eden sinyal olarak görev aldıkları bildirilmektedir (Elad vd., 1983).

#### **d) Mikorizosfer / Bitki ile *Trichoderma harzianum* arasındaki etkileşim**

*Trichoderma* suşlarının bitki kök sisteminde oluşturduğu mikorizosfer (miko: fungus, rizos: kök), ürün verimini, kökün gelişimini ve havalandırma sistemini destekleyerek bitkiye yarar sağlar (Harman ve Kubicek, 1998). *Trichoderma* spp. suşları rizosfere ilave edildiğinde bitkiyi atmosfer kaynaklı enfeksiyon oluşturan viral, bakteriyal

ve fungal patojenlere karşı koruyucu mekanizma geliştirir, bitkide aşırı duyarlılık (HR), sistemik kazanılmış direnç (SAR) ve uyarılmış sistemik direnç (ISR) mekanizmalarına benzer mekanizmaların tetiklenmesine neden olur (Şekil 6).

*Trichoderma* biyokontrol suşu, patojen funguslarla etkileşmenin yanı sıra bitki ve kökün gelişimini arttırıcı mekanizmalara sahiptir (Harman, 2000). Bazı *Trichoderma* suşları bitki köklerine uzun ömürlü kolonizasyon oluşturur ve epidermis içine penetre olur. Böylece bölgesel veya sistemik bitki direncinden sorumlu olan maddeler salgılamaya başlar (Howell, 2000; Hoitink vd., 2006). *Trichoderma*'nın bir çok türü fungal antagonizm için çoklu stratejiye ve bitki sağlığı (bitki büyümesine pozitif etki etme ve fertilitayı teşvik etmek gibi) üzerine dolaylı etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Benitez vd., 2004). *Trichoderma* yaprak yeşillenmesinin artmasına, fotosentez etkinliğinin artmasına, CO<sub>2</sub> alınımına veya abiyotik stresin iyileşmesine yaptığı bildirilmektedir (Hermosa vd., 2011).



**Şekil 6.** *Trichoderma*-bitki arasındaki moleküler sinyalizasyon ve bitkide uyarılan etkinliklerin şematik görünümü. T; *Trichoderma*, P; Patojen, ET; etilen, JA; jasmonik asit, SA; salisilik asit (Hermosa vd., 2012)

Fungus tarafından nispeten geniş sayıda kimyasal haberci (effektörler/uyarıcı) molekuller salınırlar. Bunlar sinyal düzenleyeci olarak bilinmekte olup küçük proteinleri, peptidleri ve uçucu metabolitleri kapsamaktadır (Harman, 2004; Lorito, 2010; Shoresh, 2010). *Trichoderma* kolonizasyonunun veya salınan metabolitlerinin neticesinde bitkilerde proteom ve transkriptomlar değişir (Alfano, 2007; Segarra, vd., 2007; Shoresh ve Harman, 2008; Bae, 2011). Böylece funguslar bitki gen ekspresyonunu yeniden programlar, sonucunda ise bitkinin çevresinde olan değişimlere adaptasyonu sağlanmış olur.

Vinale vd., (2008) *Trichoderma*-bitki arasındaki etkileşimde, oksin benzeri sekonder metabolitlerin veya oksin uyarıcı maddelerin salındığını, bu maddelerinde büyüme için önemli etken olduğu varsayılmaktadır. Bununla ilişkili olarak patojen ile enfekte edilmiş bitkilere göre, *Trichoderma* ile tedavi edilen bitkilerin kök sisteminin daha iyi geliştiği bildirilmiştir. Kök sistemindeki bu büyüme, sürgün ve meyve veriminde artış olarak yansımaktadır. Patojenle enfekte bitkiler aynı zamanda hava kaynaklı enfeksiyonlara (yaprakta solma, sarı lekeler) maruz kalmakta, *Trichoderma* ile muamele edilmesi bu enfeksiyonlara karşı direncinide indüklemektedir (Harman vd., 2004).

Fungusların bir kısmı bitki köklerine kolonize oldukları ancak hastalık yapmadıkları bilinmektedir. Konak bitki, fungusa karşı fitoaleksinleri, flavonoidleri, terpenoidleri, fenolik bileşikler, aglikonları ve diğer antimikrobiyal bileşikler sentez ve biriktirme suretiyle karşı koyar. *Trichoderma* türleri bu bileşiklere çoğu türlerden daha dirençlidir. Bu da bitkinin patojenlere karşı direncinin artmasına yol açmaktadır (Harman vd., 2004).

## 1.9. Fungusitler

Mantar ve mantar sporlarının öldürülmesinde ve kontrol altına alınmasında kullanılan kimyasallara fungusit adı verilir. Etki mekanizmasına göre, etki yeri özelleşmiş fungusitler ve etki yeri özelleşmemiş fungusitler olmak üzere iki gruba ayrılır. Etki yeri özelleşmemiş fungusitler (çok yer engelleyici fungusitler) içerisinde elementel kükürt, bakırlı fungusitler dithiocarbamate'ler gibi klasik fungusitleri içermektedir. Bu fungusitler fungal organizmada birden fazla metabolik olayı, değişik enzimlerle ve biyolojik açıdan bileşiklerle engellemektedir. Bu etkileri fungusun hücre membranını değişik enzimlerini ve diğer makromoleküllerini etkileyerek gerçekleştirmektedirler.

Etki yeri özelleşmiş fungusitler (Tek yer engelleyici fungusitler) bitki koruma amacıyla kullanılan en modern fungusitleri ihtiva ederler. Bu grup fungusitlerin tümü bitkilere penetre olabilmekte, önemli bir bölümü ise benzimidazole, phenylamide, triazole gibi sistemik bileşiklerdir. Sistemik bileşikler bitki tarafından alınabilmekte, taşınabilmekte kısacası buldukları her yerde fungitoksik özellik gösterebilmektedir. Bazı önemli fungusit grupları Tablo 3.'te verilmiştir.

**Tablo 3.** Farklı fungusit grupları ve özellikleri (URL-3).

<b>Grup</b>	<b>Etkili madde</b>	<b>Etki</b>
Aromatik Hidrokarbonlar	Dichloran	Koruyucu
Benzimidazole'ler	Benomyl	Sistemik
Carboximide'ler	Carboxin	Sistemik
Dicarboximide'ler	İprodione	Koruyucu
Dithiocarbamate'lar	Mancozeb	Koruyucu
İnorganikler	Bakır Sülfat	Koruyucu
Phenylamide'ler	Metalaxyl	Sistemik
Sterol Engelleyicileri	Tebuconazole	Sistemik
Phthalimide	Captan	Koruyucu

Bakırlı bileşikler en çok kullanılan koruyucu fungusit gruplarından birini oluşturmaktadırlar. Fungal hücrede farklı enzimleri (sistein, glutatyon gibi yapısında sülfidril grubu bulunan bileşiklere) etkileyerek fungusit etkisi gösterir. Mancozeb gibi fungusitler ise fungus metabolizmasında işlevi olan enzimlerin ve aminoasitlerin kimyasal yapılarını bozmak suretiyle etkili olmaktadır. Captan kimyasal yapısı karışık; fakat en çok kullanılan ve en etkili fungusitlerden biridir. Bunlar da aromatik bileşikler gibi enzim ve aminoasitlerdeki -NH<sub>2</sub> ve -SH grupları üzerinde etkili olurlar (Delen, 2008).

#### **1.10. *Trichoderma* Kaynaklı Biyolojik Kontrol Ürünleri ve Fungusit Direnci**

Toprak kökenli hastalıkların kontrolünde fungusit kullanımı pahalı bir yöntemdir. İnsan ve çevre sağlığı için sorun teşkil eder, hatta yararlı mikroorganizmaları olumsuz

şekilde etkilenmesine sebebiyet verir (Dluzniewska, 2003). Dünyada en çok kullanılan bazı ticari *Trichoderma* kaynaklı biyokontrol ürünler Tablo 4'te verilmiştir. Fungisitlerin azaltılmış miktarlarının kullanımı stres yaratabilir, patojeni zayıflatabilir ve antagonist etki aracılığı ile sonraki ataçmanlara karşı daha hassas kılabilir (Hjeljord ve Tronsmo, 1998).

**Tablo 4.** Dünyada ticari olarak satılan *Trichoderma* kaynaklı biyokontrol ürünleri (Butt ve Copping, 2000).

Ürün	Fungus	Hedef	Üretici
<i>Trichoderma</i> 2000	<i>T. harzianum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Pythium</i>	Mycontrol (EfA1)Ltd İsrail
Trichopel	<i>T. harzianum</i>	Fungal hastalıklar	Agrimm teknoloji Ltd. Yeni Zelanda
T-22 ve T-22HB Bio-trek, Rootshield	<i>T. harzianum</i>	<i>Phytium</i> , <i>Rhizoctonia</i> <i>Fusarium</i> ve <i>Sclerotinia</i>	BioWorks (TGT Inc) Geneva, ABD
Supresivit	<i>T. harzianum</i>	Çeşitli funguslar	Borregaard ve Reitzel, Danimarka
Trichodowels, Trichoject, Trichoseal	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i>	<i>Chondrostereum</i> <i>purpureum</i> ve diğer toprak ve yaprak patojenleri	Agrimm, Yeni Zelanda
Binab T	<i>T. harzianum</i> , <i>T. polysporum</i>		Bio-Innovation, İsveç
Trichodex	<i>T. harzianum</i>	Mantar hastalıkları <i>B. cinerea</i>	Makhteshim-Agan, İsrail, Avrupa ülkeleri

Fungisitler çoğu zaman hedef olmayan organizmalar üzerinede istenmeyen etkiler oluşturduklarından dolayı, bitki patojeni fungusa karşı antagonist mikroorganizma kullanılması bir çok açıdan avantaj sağlamaktadır (Benitez, 2004). Bununla birlikte fungisitlerin azaltılmış düzeyi ile fungusite tolerant biyolojik kontrol ajanlarının kombinasyonu, integre kontrol stratejilerinde; tam doz fungisitlerin baskıladığı duruma

benzer şekilde hastalığı bastırması sağlanmış olacağı düşünülmektedir (Monte, 2001). Bu ve benzeri nedenlerle birçok mikroorganizma biyokontrol etken olarak kullanılmaktadır.

### 1.11. Literatür Çalışması

*Trichoderma* spp., *Hypocrea* Fr. genusu, *Hypocreales* takımının *Hypocreaceae* ailesinde yer almakta olup, ilk olarak Fries tarafından tanımlanmıştır. *Trichoderma* türlerinin biyokontrol ajanı olarak kullanımı 70 yıldır araştırılmakta fakat suşların ticari kullanımı son yıllarda önem kazanmıştır. Biyokontrol ajanı olarak *Trichoderma* spp.'ler özellikle toprak kökenli hatta hava kaynaklı patojenleri ihtiva eden Ascomycetes, Deuteromycetes ve Basidiomycetes grubu mantarlara karşı etkilidir. *T. harzianum*, *T. viride*, *T. virens* (*Gliocladium virens*) başta olmak üzere *T. aureoviride*, *T. pseudokoningii*, *T. koningii* ve *T. longibrachiatum* gibi birçok suş potansiyel biyokontrol ajanı olarak kullanımı için tanımlanmış ve etki ettikleri funguslar belirlenmiştir. Bunlar; *Armillaria*, *Botrytis*, *Chondrostereum*, *Colletotrichum*, *Dematophora*, *Diaporthe*, *Endothia*, *Fulvia*, *Fusarium*, *Fusicladium*, *Helminthosporium*, *Macrophomina*, *Monillia*, *Nectria*, *Phoma*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Pseudoperonospora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Venturia*, *Verticillium* ve odun hastalığı mantarları olarak bildirilmiştir (Howell vd., 1993; Monte, 2001).

*Trichoderma* türlerinin sıcaklık aralığı oldukça geniş olup, genellikle *T. harzianum* gibi türler sıcak tropikal topraklarda izole edilirken *T. polysporum* türü en düşük 0°C, *T. koningii* için ise 40°C en yüksek sıcaklıklarda büyüyebilmektedir (Tronsmo ve Dennis, 1978; Domsch vd., 1980). Sıcaklık sadece türlerinin büyümesine değil, aynı zamanda uçucu antibiyotik (Tronsmo ve Dennis, 1978) ve enzimlerin üretimine, özellikle bu enzimlerin metabolik aktivitelerini de etkilemektedir (Burmeister, 2008).

*Trichoderma* spp. antimikrobiyal madde ürettiği ve bakterilere karşı antibakteriyel etkinliği sınırlı olduğu bilinmektedir. Kenya'da ekonomik önemi büyük olan çay bitkisinde, *Armillaria mellea* fungusunun neden olduğu armillaria kök hastalığı oldukça yaygın olduğu bildirilmektedir. *T. harzianum* ve *T. longibrachiatum* mikrofunguslarının sıvı kültürlerinde ürettikleri maddeler (2-Phenylethanol, 2-(hydroxyphenyl) ethanol, tyrosol, 6-n-pentyl- $\alpha$ -pyrone, sorbicillin ve ergosterol) antimikrobiyal açıdan test edilmiştir. 6-n-fenil- $\alpha$ -piron'un test edilen bir dizi bakteri (*Bacillus brevis*, *B. subtilis*, *Sarcina lutea* ve *Enterobacter dissolvens*) ve fungusa (*Paecilomyces variotii*, *Penicillium*

*notatum*, *Nematospora corylii*, *Mucor miehei*) karşı antimikrobiyal etkili olduğu ve de *Armillaria mellea* üzerinde güçlü inhibisyon etkisinin varlığı bildirilmektedir (Tarus vd., 2003).

Küçük ve Kıvanç (2003) tarafından yapılan çalışmada, Eskişehir ve çevresinden izole edilen *Trichoderma harzianum* (T9, T10, T15, T19) suşlarının filtratları bitki patojenlerinden *Fusarium culmonoum*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfii*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* ve *Drehslera sorokiniana* karşı denenmiş ve etkili olduğu bildirilmiştir. *Trichoderma harzianum* T19, birden fazla bitki patojenini inhibe etmiş, *Fusarium oxysporum* ise filtratlara en dirençli patojen olarak bulunmuş, en yüksek inhibisyonu T3 suşu *Sclerotium rolfii*'ye, T10 suşu *R. solani*'ye karşı %88 inhibisyon sağladığı bildirilmiştir.

Kamala ve Indira, (2011) Kuzeydoğu Hindistan'da yaptıkları çalışmada 110 *Trichoderma* izolatını, *Pythium aphanidermatum*'un gelişmesini inhibe etme özellikleri açısından incelemiş, izolatların %32'sinin *P. aphanidermatum*'a karşı antagonistik etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

John vd. (2010) tarafından soya bitkisinde yapılan bir çalışmada *Trichoderma*'nın bitki gelişmesinin on ikinci haftasından sonra alınan verilere göre sürgün ve kök sistemlerinin gelişmesinde, meyve veriminde bir artma olduğu gözlenmiştir. *Pythium* ve *Fusarium* ile enfekte bitkiler *Trichoderma* ile muamele edildiğinde tek başına patojenli bitkiyle kıyaslandığında meyve veriminin %43 ve %53 daha fazla olduğu bildirilmiştir.

Lone vd. (2012) tarafından ceviz (*Juglans regia* L.) ağacının rizosferinden bir grup fungus (*T. harzianum*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium sphaerospermum* ve *Fusarium oxysporum*) izole etmiş ve *T. harzianum* izolatlarının diğer fungal izolatlar üzerine etkinliğini dual kültür tekniği ile test etmiştir.

Farklı *Trichoderma* spp. hidrolitik enzimleri; endo- $\beta$ -glukonaz,  $\beta$ -1-3 glukonaz,  $\alpha$  ve  $\beta$ -galaktozidaz, ksilinaz, alkalın fosfataz, mannaz, lipaz ve proteaz ürettiği (Aziz vd., 1993), bu enzimlerinde *Trichoderma*'nın fungal patojenleri liziz etmesinde mikoparazitizmde anahtar rol oynadığı bildirilmiştir (Griffin, 1994; Worasatit vd., 1994; Lorito vd., 1996; Steyaert vd., 2003). El-Katatny vd. (2000) tarafından yapılan çalışmada 24 *Trichoderma* spp. izolatının kitinaz ve  $\beta$ -1-3 glukonaz enzim aktiviteleri araştırılmış ve karbon kaynağı olarak kitinaz için kitin, glukonaz için laminarin kullanılmış,



*Trichoderma* spp. konak hifaya kıvrım, kanca veya appasoriyum gibi yapılarla yapışır ve hücre duvarına salgıladığı bazik proteinaz,  $\beta$ -1-3-glukanaz ve kitinaz gibi hidrolitik enzimler salgılayarak dokuyu girer ve tahribata neden olur (Elad vd., 1983).

Lo ve Lin (2002) tarafından yapılan bir çalışmada, Tayvan'da zirai ürünlerin rizosfer toprağından ve rizoplanından izole edilen *Trichoderma* türlerinin salatalık ve kabaklarda kök gelişimi üzerine etkileri incelemiş, bazı *Trichoderma* türlerinin salatagillerin kök gelişimini önemli şekilde etkilediği gözlemlenmiştir.

*Trichoderma* spp. (*T. harzianum* ve *T. viride*) konak genişliğine ve biyokontrol aktivitelerinde konak suşlar arasında önemli bir biyoçeşitlilik göstermekte olup yeni izole suşların endüstriyel potansiyeli daha yüksek olabileceği varsayılmaktadır. Bu nedenle yeni suşların araştırılması önem arz etmektedir (Sivan ve Chet, 1992).

*T. harzianum* bitkinin abiyotik strese karşı bitkinin direncinde stomaların açılıp kapanmasında önemli bir destek sağladığı ayrıca, bitkinin strese olan toleransının artmasını sağlayan proteinlerin kodlandığı genlerin aşırı ekspresyonunu tetiklediği bildirilmektedir (Zhao vd., 2008). Örneğin, transgenik olan tütün ve patates bitkilerinde *Trichoderma harzianum* kitinazının aşırı ekspresyonu, *F. solani*, *R. solani*, *B. cinerea*, *A. alternata* gibi birçok bitki patojenine karşı tolerans sağlamaktadır. *Fusarium* ve *Phytophthora* sp. bitkinin gelişmesinin tüm safhalarında ve çimlenmenin büyümesinde soya fasulyesinde şiddetli enfeksiyonlara, sonucunda da bitki üretimlerinde büyük bir ekonomik kayba neden olmaktadır (Zhang ve Yang, 2000).

Bazı *Trichoderma* türleri patojenik mantarlara saldırarak patojenin lizis olmasına yol açar. *Trichoderma* spp. mikoparaziti, *Rhizoctonia* ve *Sclerotium* patojenleri tarafından neden olunan hastalıklara karşı başarılı şekilde kullanılmaktadır. *Sclerotium rolfsii* toprakta sklerotlar oluşturarak uygun olmayan dönemleri yaşayan ve birçok bitkisel ürünlere saldıran bir patojendir.  $\beta$ -1,3- glukanaz, kitinaz ve proteazlara sahip *T. harzianum* suşları patojen hücreleri istila eder ve hif ya da sklerotları gelişmelerini engeller (URL-4).

Menendez ve Godeas (1998) tarafından yapılan bir çalışmada soya fasulyesi gibi ekonomik önemi olan birçok ürüne karşı toprak kökenli bitki patojeni olan *Sclerotinia sclerotiorum* karşı *Trichoderma harzianum* biyokontrol ajanı olarak kullanmışlar, benzer çalışmalarda olduğu gibi antibiyotik etkinlik gösterdiği bildirmişlerdir.

*Trichoderma harzianum* suşlarının ticari olarak kullanılan bazı preparatları sırasıyla; Trichopel (Yeni Zelanda), T-22 ve T-22HB (USA), *Trichoderma* 2000 (İsrail), Binab T (İsviçre) ve Trichodex (Belçika) şeklinde bilinmekte ve özellikle Avrupa ülkelerinde çiçekçilikte, ABD ve Asya ülkelerinde sebzeçilikte yoğun olarak kullanılmaktadır (Butt ve Copping, 2000).

Radwan vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada serada domates fideleriyle yaptıkları deneylerde, kök uru hastalığına neden olan *Meloidogyne incognita*'ya karşı nematisidal etkiye sahip dört ticari (*Bacillus megaterium* (Bioarc), *Trichoderma album* (Biozeid), *Trichoderma harzianum* (Plant Gard) ve *Ascophyllum nodosum* (Algaefol)) ürün test ederek aktivitelerini carbofuran ve oxamille karşılaştırmıştır. Bu biyolojik ürünler arasında en yüksek etki *Bacillus megaterium* ile (89.20%) azalma sağlanırken bunu *T. album* (87.77%), *A. nodosum* (86.96%) ve *T. harzianum* (69.79%) takip ettiğini bildirmektedirler.

Celar ve Valic (2005) tarafından yapılan çalışmada *Gliocladium roseum*, *Trichoderma harzianum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. viride* türlerinin *in-vitro* koşullarda bitki büyüme düzenleyici maddeleri üretilip üretilmediği araştırılmış, *T. harzianum* ve *T. koningii*'nin ıspanak, kırmızı pancar, domates ve çikori tohumlarında çimlenmeyi teşvik ettiği belirlenmiştir.

Dunlop vd. (1988) yaptıkları çalışmada *Trichoderma koningi*'ni birçok toprak kökenli patojenleri (*G.graminis* var. *tritici*, *R. solani*, *Phytophthora cinnamoni*, *Phytium middletonii*, *F. oxysporum* ve *Bipolaris sorokiana*) *in vitro* ortamda büyümeyle inhibe ettiği belirlenmiştir. Çalışmalarda (Xiao-Yan vd., 2006; Zivkovic vd., 2010) *Trichoderma* izolatları tarafından üretilen antimikrobiyal metabolitlerin *F. oxysporum* ve *R. solani*, *P. aphanidermatum*, *Curvularia lunata*, *Bipolaris sorokiana* ve *Colletotrichum gloeosporioides* gibi fungal patojenlere karşı etkili olduğu belirlenmiştir.

Ganesan vd. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada *Trichoderma harzianum* (ITCC-457) ile *Rhizobium* bakterisinin beraber uygulanmasıyla yer fıstığının gelişiminin arttığı, bu uygulamanın *Sclerotium rolfsii*'nin neden olduğu kök çürüklüğünü azalttığı saptanmıştır.

Asmada *Botrytis cinerea* çürüklüğüne karşı yapılan bir çalışmada, *Trichoderma harzianum*'un  $10^8$  kob/mL süspansiyonu çiçeklenmeden hasata bir kaç hafta kala

püskürtme yöntemiyle denenmiş ve patojenin gelişimi %70 başarıyla engellendiği bildirilmiştir (Dubos vd., 1982).

Chakravarthy vd. (2011) tarafından yapıları çalışmada izole edilen 26 adet *Trichoderma* spp. izolatının *Rhizoctonia* patojenini ve üç fungusite (organik yapıyı parçalayıcı olan monocrotofos, klorinat insektisit olan endosulfan ve bitkisel pestisit olan azadirahtin) karşı test edilmiştir.

*Basidiomycetes*'e ait *Sclerotium rolfsii*'nin 500 farklı bitki türlerini enfekte edebilen, özellikle Avrupa ve Amerika'da kestane, fındık, ayçiçeği gibi bitkilerde oluşturduğu enfeksiyonlar fungusitler yoluyla çözümlenmeye çalışılmaktadır (Belisario ve Corozza, 1996; Infantino vd., 1997). McLean vd. (2001) tarafından yapılan çalışmada *T. harzianum* C52 suşunu, soğanlarda beyaz kök çürükçül etkeni olan *Sclerotium cepivorum*'a biyokontrol amacıyla kullanımını araştırmışlar. Bu amaçla *T. harzianum*'un bu patojen için en sıklıkla kullanılan sekiz fungusit (benomil, proksimidon, triadimenol, captan, diklofluanid, tebukonazol, triam ve mancozeb) ile olan etkileşimi in vitro şartlarda soğan bitkileri üzerinde test etmişlerdir.

*Trichoderma* türüne ait dört farklı suşta (*T. harzianum*, *T. pseudokoningii*, *T. viride* ve *T. longibrachiatum*) yapılan bir çalışmada, dört farklı fungusit (Benomil, Topsin-M, Carbendazim ve Cuprocaffro) çalışılmıştır. *Trichoderma* türlerinin büyümesi ve gelişmesi üzerine en etkili olan fungusitlerin Carbendazim ve Topsin-M olduğu, özellikle Topsin M'in 10 ppm'i tamamen üremeyi baskıladığı bildirilmiştir (Khan ve Shahzad, 2007).

Küçük (2000) tarafından Eskişehir çevresinden izole edilen *T. harzianum* T8 ve T20, *Fusarium moniliforme* ve *F. oxysporum* üzerine etkili olduğu, ayrıca domates ve fasulye bitkisinin gelişmesini arttırdığı gözlenmiştir.

Javaid ve Ali (2011) tarafından yapılan çalışmada buğday tarlalarında problem olan *Phalaris minor* L. ve *Rumex dentatus* L. adlı yabancı bitkilerine karşı *Trichoderma* spp. (*T. reesei* ve *Trichoderma viride*'nin n-hekzan fraksiyonları, *T. harzianum* ve *T. pseudokoningii* etil asetat fraksiyonları *R. dentatus*'a karşı toksik olduğu, kültür filtratlarının bu yabancı otlara karşı etkili olduğu bulunmuştur. Özellikle *T. pseudokoningii* suşunun bu potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada 6 *Trichoderma* izolatının birçok bitki patojenine karşı (*F. oxysporum*, *R. solani*, *Sclerotia rolfsii*, *S. sclerotiorum*, *Colletotrichum casici*,

*Helminthosporium oryzae*, *Alternaria brassicicola*) uçucu metabolit üretimi özellikleri incelenmiştir. *Trichoderma* türlerinin yayılabilir uçucu antibiyotikler üretmek suretiyle fungal bitki patojenlerine karşı *in-vitro* etkinlik gösterdiği belirlenmiştir (Claydon vd., 1987; Amin vd., 2010). *Trichoderma harzianum* tarafından üretilen uçucu bileşiklerin (alkil pironaz) antifungal özellikleri kaydedilmiştir. Benzer şekilde *Trichoderma viride*'nin *F. solani*'ye karşı uçucu aktivitesi ile ilgili yaptığı çalışmada patojenin hifasında kontrole göre vakuol oluşumunun arttığını rapor etmişlerdir.

Trichotoksin A50, *T. harzianum* PC01 tarafından üretilmekte ve *Phytophthora palmivora* misel büyümesinin ve sporangial üretimi inhibe ettiği bildirilmektedir (Rathore vd., 1992; Suwan vd., 2000).

Birçok *Trichoderma* spp. suşu böceklerle karşı antagonistik özelliğe sahip olduğu, kütikulyayı parçalayabilen ekstrasellüler enzimlerin (proteazlara ve kitinazlara) varlığı bildirilmektedir. Yapılan bir çalışmada, tavuk gübresi ve çavdar atıklarından oluşan kompost toprakta *T. virens*, viridol ve herbisit etkili molekülleri ürettiği belirlenmiştir (Heraux, vd., 2005).

Bitki köklerinde bulunan Trematod'lara karşı antagonistik (parazitizm ve antibiyotizm) etkinliğe sahip oldukları, özellikle selüler yapıları üzerine parçalayıcı etkiye sahip oldukları bildirilmektedir (Sharon vd., 2001). *Trichoderma virens* ile yapılan bir çalışmada bitki kök düğümlerinde bulunan, nematod yumrularına afinitesi olduğu, sarmaladığı delik açarak hasara uğrattığı bildirilmektedir (Eapen vd., 2005).

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 5’de ve kimyasal sarf maddeler Tablo 6’da verilmiştir.

**Tablo 5.** Çalışmada kullanılan cihazlar.

<b>Cihaz adı</b>	<b>Model</b>	<b>Firma</b>
Uv-Vis Spektrometre	SPECTRAMAX M5	Molecular Devices
Soğutmalı Santrifüj	2-16PK	SİGMA
pH metre	HI3220	HANNA
Çalkalayıcı	3005	GFL
Thermoblok	MS-100	NOSHENG
İnkübatör	Model 600	MEMMERT
İnkübatör		BİNDER
Jel Görüntüleme Sistemi	Digi-Doc It	UVP
Mikrosantrifüj	Sartorius	SİGMA
İklimlendirme Kabini	WGC-P4	DAIHAN
Bidistile Su Cihazı	2108	GFL
Güvenlik kabineti	MN-20	NÜVE
Işık mikroskobu	E100	NIKON
Güç kaynağı	OSP-500	OWL
Pastör fırını	FN-500	NÜVE
Otoklav	OT-40L	NÜVE
Evaporator	SSI-1	BUCHI
Hassas Terazi	PL-214	DENVER
Vorteks	REAX TOP	HEİDOLPH

Çalışmada kullanılan Nucleospin Plant kit (50 preps) (Clontech), DNA polimeraz enzimi, sıvı azot ve dNTP kimyasal sarf malzemeleri ticari olarak Sigma’dan temin edilmiştir. Mısır tohumu (Hibrit-RX9292) MayAgro Tohumculuk’tan A.Ş.’den, melas ise

Elbistan şeker fabrikasından, malt ve malt çimi Türk Tuborg Bira ve Malt Sanayi A.Ş.'den, pirinç kabuğu, talk pudra, zeolit ve bentonit yerli ticari firmalardan temin edilmiştir.

**Tablo 6.** Çalışmada kullanılan kimyasal sarf maddeler.

<b>Kimyasal Adı</b>	<b>Firma</b>	<b>Katalog No</b>
Agar	FLUKA	05039
PDA	MERCK	1.10130
Maya Eksratı	MERCK	1.03753
Müller Hilton Agar	MERCK	1.05437
Müller Hilton Broth	MERCK	1.10293
Pepton	FLUKA	68971
Corn Meal	SİGMA	C6304
Malt Eksrat Agar	MERCK	1.05398
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	SİGMA	M7506
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	MERCK	8.22286
NaCl	MERCK	1.06404
Sodyum Potasyum Tartarat	SİGMA	S2377
Sodyum asetat	KİMETSAN	KIM-SAT/01CP
Asetik asit	SİGMA	27225
NaOH	MERCK	1.06494
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	MERCK	1.12040
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MERCK	1.05101
Glukoz	MERCK	1.08342
DRBC	MERCK	1.00466
HCl	FLUKA	84434
Gliserol	MERCK	1.04092
Bromocresol Purple	MERCK	1.03025
Karboksi Metil Selüloz	SİGMA	C1909
Kitin	SİGMA	C7170
Amonyum sülfat	SİGMA	11225
Tween 20	MERCK	S6386784
Tween 80	MERCK	S6256482
Etanol	Merko Kimya	-----
Etil asetat	SİGMA	27227
Captan	Safa Tarım	-----
Dikozin	Agrofarm	-----
Cuprenax	Agrofarm	-----

### 2.1.2. Çalışmada Kullanılan Suşlar

Çalışmada kullanılan mikrofunguslar, Rize-İkizdere vadisi çay bahçesi topraklarından izole edilen (Karaoğlu ve Ülker, 2006) ve Recep Tayyip Erdoğan

Üniversitesi Biyoloji Bölümü Kültür Koleksiyonu'nda saklanan İkizdere (ID) çay toprağı izolatu olan *Trichoderma* spp. suşlarıdır (Tablo 7).

Kontrol suş olarak kullanılan; *T. harzianum* KUEN 1585 ticari olarak, *Rhizoctonia solani* (AG3) Abant İzzet Baysal (Özer, G.), *Botrytis cinerea* Ankara Üniversitesi'nden (Karakaya, A.), *Sclerotinia sclerotiorum* Gazi Osman Paşa (Yanar, Y.) Üniversitesi'nden, *Aspergillus niger* RSKK4017 ve *Aspergillus flavus* 3321 Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü'nden, *Beauveria bassiana* ARSEF 8664, *Isaria fumosorosea* ARSEF 8333 ve *Metarhizium anisopliae* ARSEF 8433 (Metchnikoff) Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi'nden (Sevim, A.) temin edilmiştir.

*Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris*, *Salmonella* sp., *Vibrio* sp., *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883, *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 43288, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* ATCC 43251, *Bacillus cereus* 709 ROMA, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Candida albicans* ATCC 60193, *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Saccharomyces cerevisiae* RSKK 251, *Mycobacterium smegmatis* ATCC607 ve *Aspergillus niger* RSKK4017 suşlarının bir kısmı klinik örneklerden ve ATCC tip suşları ise Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü'nden (Ankara) temin edilmiştir.

**Tablo 7.** Çalışmada kullanılan *Trichoderma* spp. suşları.

No	Suş No	Şuş adı
1	ID 4A	<i>Trichoderma</i> spp.
2	ID 4B	<i>Trichoderma</i> spp.
3	ID 6B	<i>Trichoderma</i> spp.
4	ID 7C	<i>Trichoderma</i> spp.
5	ID 9A	<i>Trichoderma</i> spp.
6	ID 11C	<i>Trichoderma</i> spp.
7	ID 11D	<i>Trichoderma</i> spp.
8	ID 17E	<i>Trichoderma</i> spp.
9	ID 20G	<i>Trichoderma</i> spp.
10	KUEN 1585	<i>Trichoderma</i> spp.

### **2.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri**

#### **2.1.3.1. Malt Ekstrakt Sıvı Besiyeri (ME)**

Malt Eksrakt	6.0 g
Maltoz	1.8 g
Glukoz	6.0 g
Maya Ekstrak	1.2 g
ddH <sub>2</sub> O	1000 mL, pH 4.7 ± 0.2

Besiyeri ticari olarak temin edilen maddelerin yukarı verilen oranlarda karıştırılarak hazırlandı ve DNA izolasyonu için kullanıldı. Bu besiyeri 250 mL miktarında şişelere tevzi edildi ve 121 °C'de 1.1 atmosfer basıncında 20 dakika otoklavlandı, +4 °C'de muhafaza edildi.

#### **2.1.3.2. Potato Dekstroz Agar (PDA)**

Üretici firmanın önerisi doğrultusunda litrede 39 gram tartılarak otoklavda 121 °C'de 20 dakika steril edildikten sonra steril petrilere tevzi edildi. Kullanılan süreye kadar +4 °C'de bekletildi. Genel üretim besiyeri olarak kullanıldı.

#### **2.1.3.3. Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBCA)**

Üretici firmanın önerisi doğrultusunda litrede 31.6 gram tartılarak otoklavda 121 °C'de 20 dakika steril edildikten sonra steril petrilere tevzi edildi. Kullanılınca kadar +4 °C'de bekletildi. Spor canlılığı ve spor sayımı için kullanıldı.

#### **2.1.3.4. Kitin Agar ve Sıvı Besiyerleri**

Kitinaz enzimi üreten suşların belirlenmesi için hazırlanan kitin agar besiyeri aşağıdaki maddeler belirtilen miktarda tartılarak steril suda çözülerek hazırlandı ve kitinaz aktivitelerinin belirlenmesinde kullanıldı.

Kolloidal kitin	4.5 g,
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.3 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,	2.0 g
Sitrik asit monohidrat	1 g



Agar	15 g
Bromocresol purple	0.15 g
Tween-80,	200 µL
ddH <sub>2</sub> O	1000 mL, pH 4.7± 0.2

Daha sonra pH 4.7± 0.2 ayarlanarak, 121°C’de 20 dakika otoklavlandı ve steril petrilere tevzi edildi. Aynı miktardaki karışımdan agar ilave edilmeden hazırlanan sıvı besiyerinde ise kitin aktivitesinin spektrofotometrik olarak ölçümde kullanıldı. Sıvı besiyeri steril erlenlere 50 mL olarak tevzi edildi, 121°C’de 20 dakika otoklavlandıktan sonra kullanıldı (Kamala ve Indara, 2011).

#### **2.1.3.5. Selüloz Agar ve Sıvı Besiyeri**

KNO <sub>3</sub>	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,	1 g
CMC	5 g
Pepton	2 g
NaCl	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
ddH <sub>2</sub> O	1000 mL, pH 6.5

Yukarıda verilen maddeler belirtilen miktarda tartılarak distile suda karıştırıcı yardımı ile çözüldü. 121°C’de 20 dakika otoklavlandı, 90 mm’lik petrilere 20 mL olacak şekilde tevzi edildi. Aynı miktardaki karışımdan agar ilave edilmeden hazırlanan sıvı besiyerinde selülaz aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçümde kullanıldı. Steril sıvı besiyeri erlenlere 50 mL olarak dağıtıldı. Suşların selülaz enzimi üretme yetenekleri araştırıldı (Cianchetta vd., 2010).

#### **2.1.3.6. Müller Hilton Agar (MHA) ve Sıvı Besiyerleri (MHB)**

Üretici firmanın önerisi doğrultusunda litrede 34 gram tartılarak otoklavda 121 °C’de 20 dakika steril edildikten sonra agarlar steril petrilere, sıvı besiyeri ise steril vida kapaklı tüplere tevzi edildi. Kullanılan süreye kadar +4 °C’de bekletildi. Bakteri kültürlerinin üretiminde kullanıldı.

### **2.1.3.7. Brain Heart Infusion Agar Besiyeri (BHIA)**

Üretici firmanın önerisi doğrultusunda litrede 34 gram tartılarak otoklavda 121 °C’de 20 dakika steril edildikten sonra steril petrilere tevzi edildi. Kullanılan süreye kadar +4 °C’de bekletildi. Antimikrobiyal aktivite bakılmasında kullanıldı.

## **2.2. Yöntem**

### **2.2.1. *Trichoderma* spp. Suşlarının Canlandırılması**

Çalışmada 2004 yılında izole edilip tanımlanan ve -20 °C’de %20 gliserol ile saklanan *Trichoderma* spp. suşları kullanıldı (Karaoğlu ve Ülker, 2006). Öncelikle derin dondurucudan çıkarılan suş PDA besiyerine ekim yapılarak 25 °C’ de bir hafta inkübe edilerek canlandırıldı. Standart suş *T. harzianum* KUEN 1585 ise ticari olarak (SİMDERMA) temin edildi ve canlandırıldı.

### **2.2.2. *Trichoderma* spp. Suşlarından Tek Koloni İzolasyonu**

*Trichoderma* spp. suşlarının saf kültüründen DNA izolasyonu için PDA besiyerinde canlandırılan 3 günlük kültürden öze ile alınıp tekrar PDA besiyerine tek koloni düşürme tekniğiyle ekim yapıldı. Petriler 3 gün 25 °C’de inkübe edildikten sonra oluşan tek bir spor kolonisi alınıp yeni bir PDA besiyerinde saf kültür olarak çoğaltıldı. Bu kültürden bol miktarda spor alınıp %10 gliserol içeren ME sıvı besiyeri içinde saklama yapıldı ve -20 °C’de daha sonraki çalışmalar için stoklandı.

### **2.2.3. *Trichoderma* spp. Suşlarının DNA İzolasyonu**

Tek koloni düşürme tekniği ile elde edilen saf kültürden DNA izolasyonu yapmak için 50 mL ME sıvı besiyerine (sıvı besiyeri) yaklaşık  $1 \times 10^6$  kob/mL spor ekim yapıldı. *Trichoderma* spp. suşları ME sıvı besiyerinde 7 gün 25 °C’de 150 rpm’de çalkalamalı inkübatörde yeterince misel oluşana kadar üretildi. Daha sonra miselleri, besiyerinden ayırmak için iki kat olarak kesilen steril temiz tülbent yardımıyla süzme işlemi gerçekleştirildi. Tülbentte kalan *Trichoderma* spp. misellerini tamamen sıvı besiyerinden süzdükten sonra nemi kağıt havluyla hafifçe bastırılarak uzaklaştırıldı. Elde edilen miseller havan içerisine alındı ve üzerine sıvı azot eklenerek ezme işlemi uygulandı. Sıvı azotla ezme işlemi en az üç defa tekrarlandı. Sıvı azot işlemiyle toz haline getirilen misellerin bir kısmını -20°C’de ependorf tüpler içinde daha sonradan tekrar kullanmak üzere stoklandı.

Kalan kısmı ise Nucleospin Plant kiti (50 preps) (Clontech) (ALMANYA), kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda DNA izolasyonu yapıldı.

#### 2.2.4. *Trichoderma* spp. Suşlarının PCR ve Jel elektroforezi

*Trichoderma* spp. suşlarından izole edilen DNA'ların ITS1-5.8S-ITS2 intragenik gen bölgelerinin sekans analizleri için PCR karışımı (Master mix) hazırlandı (Tablo 8). Oligoprimere baz dizileri QT3: 5'- ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG – 3' ve QT4: 5'-CCA ATG CTT AAT CAG TGA GG – 3' şeklinde olup ticari olarak temin edildi. *Trichoderma* spp. suşlarından izole edilen DNA'lardan 1 µL'si 49 µL PCR reaksiyon karışımına ilave edilerek Tablo 9'de verilen PCR şartlarında çoğaltıldı.

**Tablo 8.** ITS1-5.8-ITS2 gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PCR karışımı.

PCR karışımı	1X (µL)	10x (µL)
10X PCR Buffer	5	50
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3	30
2.5 mM dNTP mix	4	40
P1 10 pmol/ µL	1	10
P2 10 pmol/ µL	1	10
DNA polimeraz	0.4	4
DNA	1	10
ddH <sub>2</sub> O	34.6	346
<b>Toplam</b>	<b>50</b>	<b>500</b>

**Tablo 9.** ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PCR şartları.

Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyon	95	2	1
Denatürasyon	95	1	
Bağlanma (Annealing)	42-55	1	35
Uzama (Extention)	72	1	
Son uzama	72	5	1
Tamamlanma	4	Net ürün	1

PCR ürünü kontrollerle birlikte %1'lik agaroz jelde, 100 baz çiftlik moleküler ağırlık (Vivantis) markırı kullanılarak 60 voltta jel elektroforezinde yürütüldü. UV transiluminatör ve jel görüntüleme sistemi kullanılarak fotoğraflandı.

### **2.2.5. Sekans Analizi**

*Trichoderma* spp. suşlarından elde edilen ITS1-5.8-ITS2 gen bölgelerini içeren PCR ürünleri ticari olarak sekans analizi için MACROGEN (Kore)'e gönderildi. Elde edilen bütün ITS1-5.8-ITS2 gen bölgesi verileri BioEdit (Hall, 1999, version 7.09) programı ile düzenlendi ve NCBI GenBank'ta BLAST'lanarak, GenBank'ta yer alan diğer ITS1-5.8-ITS2 gen dizileri ile yüzde benzerlikleri belirlendi. Buradan elde edilen veriler, izolatların morfolojik tanımlamalarını doğrulanması için kullanıldı. ITS1-5.8-ITS2 gen dizileri Cluster analizi aynı şekilde BioEdit programını kullanarak ClustalW programı ile yapıldı ve buradan elde edilen veriler MEGA (Tamura vd., 2011, version 5) filogenetik programı yardımıyla Neighbor-joining (NJ) analizinde kullanıldı. Aligment boşlukları kayıp veri olarak değerlendirildi. Oluşturulan dendrogramların güvenilirliği MEGA 5.0 programı kullanarak seç-bağla (bootstrap) analizi ile 1.000 tekrarlı olacak şekilde test edildi.

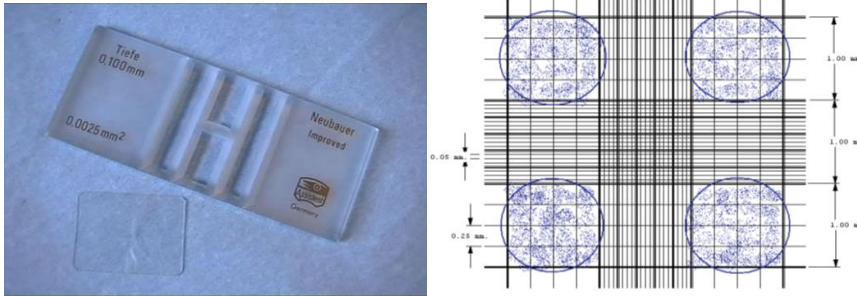
### **2.2.6. *Trichoderma* spp. Suşlarının Farklı Sıcaklıklarda Üreme Hızı ve Spor Üretimleri**

Her bir izolatın farklı sıcaklıklarda üreme hızları ve spor oluşturma kapasitesinin hesaplanması amacıyla tek koloniden elde edilen kültürler kullanılarak 3 günlük suşlardan 5 mm disk kesildi ve PDA besiyerinin ortasına yerleştirildi. Ekilen örneklerden her birinden iki tekrarlı olarak 4, 15, 20, 24 28, 37 ve 42 °C'de sıcaklıklarda üremeye bırakıldı. Farklı sıcaklıkta üreme ve üreme hızlarını belirlemek için kültürlerin 48 saat sonra üreme zon çapları ölçüldü.

Çalışmada iki tekrarlı yapılan testlerde petrilerden biri üremenin 7. gününde diğeri ise 15. gününde spor hasatı yapıldı. Bu amaçla 15 mL hacimli steril tüplerin içine 5 ml steril su kullanılarak "spor yıkama metodu"yla spor hasatı yapıldı. Spor sayımı 1/10 makro dilüsyon tekniğiyle (1 mL spor solusyonu + 9 mL distile steril su) sayım yapılabilecek yoğunluğa kadar sulandırıldı.(Abebe, 2002).

Süspansiyondaki konidiyal konsantrasyon Neubauer lamı (Şekil 7) kullanılarak ışık mikroskopu altında sayım yapıldı. Neubauer lamı üzerine 0.1 mL spor solüsyonu konuldu. Lamda her biri 1 mm<sup>2</sup> büyüklüğünde olan dört adet büyük kare bulunur. Bu dört kare alanındaki sporların sayımı sonucu bulunan rakam (A), ortalama almak amacıyla 4'e bölünerek 1 mm<sup>3</sup>'teki spor sayısı saptandı. Daha sonra bu sayı 10<sup>3</sup> ile çarpılarak 1 mL'deki spor sayısına ulaşıldı.

Sonucun sulandırma faktörü ile çarpılmasıyla spor sayısı bulundu. 1 mL' deki spor sayısı:  $A/4 \times [(25 \times 50 \times 10^3 \times \text{sulandırma faktörü})]$  formülü kullanılarak hesaplandı (Goettel and Inglis, 1997).



Şekil 7. Neubauer hemositometresi ve spor sayımının yapıldığı alanlar

### 2.2.7. *Trichoderma* spp. Sporlarının Farklı Sıcaklıklara Toleranslarının Belirlenmesi

*Trichoderma* spp. sporlarının farklı sıcaklıklara olan toleransını belirlemek amacıyla yapılan bu deneyde 1 mL ( $1 \times 10^7$  kob/mL) spor süspansiyonu, steril ependorflara alındı ve her bir ependorf 45, 55, 65 ve 75 °C'de 15 dakika sulu ısıtıcıda bekletildi.

Isıtılan bu spor solüsyonundan 50 µL alınarak DRBC agarın yüzeyine bağıt yardımıyla yayma ekimleri yapıldı ve 28 °C'de 3 gün inkübasyona bırakıldı (Küçük ve Kıvanç, 2002). İnkübasyon sonrası DRBC agar üzerinde üreyen koloniler sayılarak farklı sıcaklıklarda sporların canlı kalma yetenekleri belirlendi. Kontrol olarak ise ısı muamelesi öncesi spor solüsyonları 50 µL alınarak DRBC agarın ekimleri yapılarak canlı spor sayısı belirlendi.

## 2.2.8. Farklı Katı Subrast İçeren Ortamlarda *Trichoderma harzianum* Suşlarının Spor Üretme Kapasiteleri

*Trichoderma harzianum* suşlarının en ekonomik ve en uygun koşullarda üretim şartlarının belirlenmesi ve bol miktarda spor oluşturması amacıyla Singh ve Nautiyal (2012) tarafından yapılan çalışma koşulları modifiye edildi. Bu amaçla 12 farklı katı atık substratların, farklı oranlarında karışımları hazırlanarak 5 gramda test edildi. Katı atık karışımları (Tablo 10) 15 cm'lik petrilere 45 dakika, iki kez steril edildi.

**Tablo 10.** Katı substrat karışım oranları tablosu (n=5 g).

No	Karışımlar	Miktarları (g)
1	Buğday Kepeği+Malt Çimi (BK+MÇ)	3+2
2	Buğday Kepeği +Çay Atığı (BK+ÇA)	2.5+2.5
3	Üzüm Kabuğu + Malt Çimi (ÜK+MÇ)	2+3
4	(Salatalık + Patlıcan + Üzüm) Kabukları (SPÜK)	1+1+3
5	Turp Atığı + Çay Atığı (TA+ÇA)	2.5+2.5
6	Turp Atığı+ Buğday Kepeği (T+BK)	2.5+2.5
7	Üzüm Kabuğu + Salatalık Kabuğu+Buğday Kepeği (ÜK+SK+BK)	2+1+2
8	Üzüm Kabuğu+Salatalık Kabuğu+Pirinç Kavusu (ÜK+SK+PK)	1+1+3
9	Buğday Kepeği+ Üzüm Kabuğu+ Pirinç Kavusu (BK+ÜK+PK)	3+1+1
10	Pirinç Kavusu+ Malt Çimi+ Çay Atığı (PK+MÇ+ÇA)	2+1+2
11	Malt Tanesi+Üzüm Kabuğu+ Fasulye Kabuğu (MT+ÜK+FK)	2+1+2
12	Mısır Tanesi (MT)	5

Bu amaçla en iyi üreyen ve spor oluşturan *Trichoderma harzianum* ID11C suşu seçildi ve spor solüsyonu, 7 günlük inkübasyondan sonra elde edilen sporelerden 1 mL'de  $2 \times 10^7$  kob/mL olacak şekilde süspansiyon hazırlandı. *T. harzianum* spor solüsyonunun 1 mL'si ile 15 mL %2'lik melas karıştırılarak homojenizasyon sağlandı ve her bir katı substrat üzerine ilave edildi. Karışımın homojenizasyonu sağlandıktan sonra 28 °C'de etüvde bırakıldı.

Spor sayımları ise 7.-30. günlerde katı substratdan steril koşullarda fizyolojik suyla makrodilüsyon (1/9 w/v) yapılarak hemositometrede sayımları yapıldı (Martinez-Medina vd., 2009; Singh ve Nautiyal, 2012).

### **2.2.9. *T. harzianum* Sporlarının Formülasyonu**

Çalışmada 5 farklı substrat karışımında üretilen *T. harzianum* suşu üç farklı dolgu maddesi içeren saklama ortamında oda sıcaklığı ve +4°C'de canlı kalma sürelerinin araştırılması için planlandı. Aynı zamanda spor canlılığının korunması amacıyla ortama gliserol, yapıştırıcı madde olarak karboksimetil selüloz ve her ikisinin birlikte olmak üzere üç farklı birleşim test edildi.

Çalışmada üç farklı katı substrat içeren ortamda üretilen sporlar üç farklı dolgu maddesi kullanılarak formüle edildi. Bu amaçla Tablo 10'da verilen ortamlardan beşinde (3, 4, 5, 7 ve 8 no'lu kültürler) 28°C'de 7 gün üretilen sporların herbiri, ayrı ayrı test için kullanıldı. Dolgu maddeleri olarak talk pudrası, bentonit ve zeolit kullanıldı. Talk pudrası kullanılmadan önce 500 °C'de 1 saat kül fırınında yakıldı ve katkı maddeleri uzaklaştırıldı.

Bu amaçla öncelikle kültürler 5'er gram steril şartlarda steril petri kaplarında tartıldı, her üç dolgu maddesinden 2:1 oranında (dolgu maddesi/spor) karıştırıldı. Sonra bu karışımların herbiri üç gruba ayrıldı. Birinci gruba 3 mL olacak şekilde koruyucu amaçlı gliserol (%80'lik), ikinci gruba ise 3 mL (%2) karboksi metil selüloz (CMC) ilave edildi. Üçüncü gruba ise 3 mL olacak şekilde 1:1 oranında CMC ve Gliserol ilave edildi. Karışımlar steril kaşık yardımıyla, steril şartlarda homojen karıştırıldı ve 40 °C'de bir gece etüvde kapaklar yarı açık şekilde kurumaya bırakıldı. Nem oranı yaklaşık % 6 civarına düşürüldükten sonra steril vida kapaklı falkon tüplerine alındı. Bir grubu 4 °C'de bir grubu ise oda ısısında saklamaya bırakıldı. Karışımlar hazırlandıktan sonra spor canlılığını kontrol için yapıldığı gün, oda sıcaklığında bekletilenler 3. ayında, 4 °C'de bekletilenler ise 5. ayında, kültür yapılarak spor canlı sayısı sayıldı. Bu amaçla 0.1 gram steril şartlarda tartılarak, steril fizyolojik suda homojenize edilerek makro dilüsyon yöntemiyle sulandırıldı ve 0.1 mL'si DRBC agar besiyerine ekim yapıldı. İnkübasyondan 28 °C'de 3 gün sonra canlı spor sayıları belirlendi.

### **2.2.10. *Trichoderma* spp. Sekonder Metabolitlerinin Etil Asetat Ekstraksiyonları**

*Trichoderma* spp. suşlarının sekonder metabolitlerinin eldesi ve antimikrobiyal aktivite özelliklerinin araştırılması için patates dekstroz sıvı besiyeri kullanıldı. Her biri için 100 mL erlene 50 mL olacak şekilde besiyeri hazırlanıp steril şartlarda dağıtıldı. Her bir suşun spor solüsyonu  $1 \times 10^7$  kob/mL olacak şekilde ayarlanarak, sıvı besiyerilerine 1 mL inokulasyon yapıldı ve 28 °C'de 14 gün, 150 rpm'de kuru çalkayıcıda inkübe edildi (Vizcaíno vd., 2005).

İnkübasyondan sonra sıvı besiyerleri filtre kağıdı yardımıyla süzülüp miselleri uzaklaştırıldı. Fermantasyon sıvısı falkon tüplere alınarak 9000 rpm'de +4°C 15 dakika santrifüj edilerek sporları uzaklaştırıldı. Supernatant kısmı ayrı bir falkona aktarıldı. Etil asetat ekstraksiyonu işlemi için fermantasyon sıvısı miktarları mezür yardımıyla belirlendi.

Ekstrat ve etil asetatın (1:1 v/v) eşit hacimleri 250 mL'lik balon joje içinde manyetik karıştırıcıyla oda ısısında 1 saat karıştırıldı. Karışım ayırma hunisine alınarak 15 dakika dinlendirilerek iki faza ayrılması için bekletildi. Ayırma hunisinde alt fazda kalan kısım atıldı, üst faz ise erlene aktararak berraklaşana kadar Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edildi. Berraklaşma oluştuğundan sonra filtre kâğıdıyla süzüldü. Süzüntü balonlara aktarıldı ve 42 °C'de su sıcaklığında evaporator cihazıyla evopore edildi. Balonda kalan ekstrat 1 mL DMSO yardımıyla çözüldü. Ependorflara koyulup -20°C'de test edileceği süreye kadar saklandı (Vizcaíno vd., 2005).

### **2.2.11. *Trichoderma* spp. Suşlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi**

*Trichoderma*'ların sıvı besiyerinde 28 °C'de 14 günlük inkübasyondan elde edilen ve daha sonra etil asetat ekstratları hazırlanan numuneler agar kuyucuk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal etkinlik yönünden çeşitli mikroorganizmalara karşı test edildi (Perez vd., 1992; Vizcaíno vd., 2005). Bu amaçla antibakteriyel etkinliklerinin belirlenmesinde *E. coli*, *P. vulgaris*, *Salmonella* sp., *Vibrio* sp., *S. marcescens*, *K. pneumonia*, *Y. pseudotuberculosis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *B. subtilis* ve *M. smegmatis* kullanıldı. Ekstratların antifungal aktivitelerinin belirlenmesinde *C. albicans*, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae*, *A. niger*, *B. cinerea*, *R. solani* kullanıldı.



Çalışmada bakterilerin test edilmesinde Mueller Hinton agar-sıvı, *M. smegmatis* için Brain Heart Infusion agar-sıvı besiyerleri, funguslar için ise PDA ve ME sıvı besiyerleri kullanıldı.

Test edilecek bakterilerin bir gecelik kültürlerinden MHB besiyeri içinde yaklaşık olarak  $10^6$  kob/mL (koloni oluşturan birim) şeklinde dilüsyonları hazırlandı ve önceden hazırlanmış MHA besiyeri üzerine steril eküvyon çubuğu ile yayma ekimleri yapıldı. Maya ve küf mantarları için ME sıvı besiyeri kullanılarak  $10^7$  kob/mL şeklinde dilüsyonları yapılarak PDA besiyerleri yüzeyine steril eküvyonla yayma ekim yapıldı.

Ekimleri tamamlanan besiyerleri üzerinde, steril cam boru yardımıyla 2 cm aralıklarda, 5 mm çapında kuyucuklar açıldı. Her bir kuyucuğa kontrolleriyle birlikte etil asetat ekstraksiyonlardan 50 µL damlatıldı. Bakteri ihtiva eden petriler 24 saat, maya ve *M. smegmatis* ihtiva eden petriler 48 saat 35 °C'de, küf mantarlarını ihtiva eden petriler ise 3 gün 28 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bir cetvel yardımıyla inhibisyon zon çapları ölçülerek kaydedildi.

Standard kontrol ilaç olarak bakteriler için Ampisilin (10 µg), Streptomisin (10 µg) ve mantarlar için flukonazol (5 µg) kullanıldı. Çözücü kontrolü için etil asetat ve DMSO kullanıldı (Vizcaíno vd., 2005).

#### **2.2.12. *Trichoderma* spp. Suşlarında Dual Teknikle Antifungal Aktivite Belirlenmesi**

Dual teknik *Trichoderma* spp. ile bitki patojeni fungusların birbirlerine olan etkinliklerini belirlenmesi amacıyla yapıldı. Steril koşullarda hazırlanmış PDA besiyerlerinde 4 cm uzaklıklarda iki köşeye karşılıklı olarak, 5 mm çapında 2 ayrı disk kesildi. Karşılıklı 2 tane kuyucuk açılarak, kuyucuklardan birine 4 günlük olan *Trichoderma* spp., diğer kuyucuğa ise 4 günlük olan patojen izolat yerleştirildi. Kültürler 28 °C'de inkübasyona 4., 7. ve 15. günlerde, antagonist ve patojenlerin büyüme zon çapları ölçüldü. Aşağıdaki formüle göre inhibisyon yüzdesi hesaplandı (Royse ve Ries, 1978).

$$(\%)PIRG = (RI) = \frac{(R1-R2) \times 100}{(R1)} \quad 1$$

RI; Engelleme oranı

R1; Patojenin büyüme yarıçapı

R2; Patojenin antagonist yönündeki büyüme yarıçapı

### **2.2.13. *Trichoderma* spp. Suşlarının Uçucu Antifungal Madde Üretimini Belirlenmesi**

Bu test *Trichoderma* spp. suşlarının uçucu antimikrobiyal madde üretip üretmediklerinin test edilmesi amacıyla yapıldı. Dual kültür için ME agar besiyerinde 2-3 gün 28°C'de üretilen kültürlerden steril şartlarda (*T. harzianum* suşları ve patojen suşlar) 5 mm çaplı bloklar kesildi. MEA besiyerinin ortasında da aynı büyüklükte blok kesilip çıkarıldı ve yerine kültürden kesilen disk yerleştirildi. Petri kabının alt kısmına *Trichoderma* spp. suşu, üst kapak kısmına *S. sclerotonia* suşun ekildiği ME agar besiyerinden 5 mm'lik kesit gelecek şekilde yerleştirildi ve etrafı hava almayacak şekilde parafilm ile kapatıldı. Petriler *S. sclerotonia* üste, *Trichoderma* spp. suşu alta gelecek şekilde 7 gün 28 °C'de inkübasyona bırakıldı. Kontrol olarak sadece *S. sclerotonia* suşu içeren petri kullanıldı.

Petriler 7 gün inkübasyon sonrasında kapakları açılarak; gelişme hızları, üreme yoğunlukları spor ve sklerotia oluşumu açısından kontrole göre farklılıklar gözlemlendi (Siddiquee, 2009). Testler 3 tekerrürlü olarak yapıldı.

### **2.2.14. *Trichoderma* spp. Suşlarının Fungisitlere Karşı Toleransının Belirlenmesi**

Çalışmamızda *Trichoderma* suşlarının fungusitlere karşı toleransları belirlenmesi hedeflendi. Bu amaçla kullanılan fungusitlerin (Captan, Dikozin ve Cuprenax) koruyucu özellikli olması, çoklu etki mekanizmasına sahip olması ve üç farklı kimyasal grubundan olması fungusitlerin mümkün mertebede temsil etmesi amaçlanmıştır. Captan'ın önerilen kullanım dozu 200 g / 100 L (2000 µg/mL), Cuprenax'ın 300 g / 100 L (3000 µg/mL) ve Dikozin'in ise 200 g /100L (2000 µg/mL) şeklinde bildirilmektedir. Test amacıyla belirlenen üç adet fungusitin (Captan, Dikozin ve Cupranex) steril distile suda stok solüsyonları hazırlandı. Taze hazırlanmış ve 48 °C'de bekletilen PDA besiyerine her fungusitten son konsantrasyonları 1000, 2500, 5000 ve 10000 µg/mL olacak şekilde ilave edildi. Daha sonra besiyeri homojen karıştırılarak donmadan petrilere dağıtıldı. *Trichoderma* spp. suşları PDA petrilerinde etüvde 28 °C'de 7 gün inkübe edildi. Üreyen *Trichoderma* spp. suşlarından 5 mm disk kesilerek fungusit içeren PDA'lı petrilerin merkezine yerleştirildi. Etüvde 28 °C'de 7. gün büyüme zon çapları ölçüldü (Papavizas vd., 1982).

## **2.2.15. *Trichoderma* spp. Suşlarının Selülaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi**

### **2.2.15.1. Glukoz Standartının Hazırlanışı**

Enzim çözeltisi asetat tamponunda (0.05M, pH 5.0) olacak şekilde hazırlandı. Asetat tamponunda %2'lik CMC (karboksi metil selüloz) hazırlandı. DNS renk reaktifi çözeltisi; 10.6 g 3,5-Dinitrosalisilik asit: 19.8 g NaOH tartılarak 1416 ml distile suda karıştırıcı yardımıyla çözüldü ve üzerine 306 g Na-K-tartarat, ilave edilerek iyice çözünmesi sağlandı. Glukoz standart çözeltisi için steril distile suda konsantrasyonu 2 mg/mL olacak şekilde glukoz (D-Glukoz) hazırlandı. Cam tüplerde 9 mL asetat tamponu, 500 µL (%2) CMC ilave edildi. Su banyosunda 30 dakika 37 °C'de inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrasında 3 mL DNS çözeltisi ilave edildi ve 100 °C'de kaynamakta olan su banyosunda 15 dakika bekletildi. Standart aralığı 0.02-0.22 değerleri arasında UV-Vis spektrofotometrede 540 nm'deki absorbansı kör'e karşı okundu (Ghose, 1987).

### **2.2.15.2. Selülaz Enzimin Aktivite Ölçümü**

Selüloz sıvı besiyerine *Trichoderma* spp. suşlarının taze kültürlerinden  $1 \times 10^7$  kob/mL olacak şekilde spor süspansiyonu hazırlandı. Spor süspansiyonundan 1 mL alınarak 50 mL %2'lik CMC besiyerine inoküle edildi ve 28 °C'de inkubasyona bırakıldı. İnokülantlardan 5., 7. ve 9., günlerde örnekler alınarak santrifüjlendi. Süpernatantlar enzim aktivitesi bakılınca kadar 4°C'de saklamaya alındı. Enzim aktivitesi, ölçümünde substrat olarak selüloz (%2 CMC) kullanıldı. Reaksiyon karışımı sırasıyla 400 µL asetat tamponu (0.05 M pH 5 ) 500 µL CMC ve 100 µL supernatant ependorfa koyuldu. Isıtıcılı su banyosunda 37 °C'de yarım saat inkübe edildikten sonra eliza platelere her kuyucuğa 100 µL koyularak 540 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü (Cianchetta vd., 2010). Ölçümler üç tekrarlı yapıldı.

## **2.2.16. *Trichoderma* spp. Suşlarının Kitinaz Aktivitesinin Belirlenmesi**

### **2.2.16.1. Kollodial Kitin Hazırlanışı**

Beş gram ticari kitin, 60 mL HCl (%33'lük) içinde çözüldü. Bir gece 4°C'de manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Son hacmi 60 mL olan kitin+HCl karışımı, 2 litre %96'lık etanol üzerine ilave edildi. Tekrar bir gece 4°C'de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Sonra pH 6.5 olana kadar musluk suyu ile yıkandı.

Son hacimde %2 kolloidal kitin olacak şekilde ayarlanarak kullanılacağı süreye kadar 4°C'de saklandı (Kamala ve Indara, 2011).

#### **2.2.16.2. N-asetil Glukoz Amin (NAGA) Standartının Hazırlanması**

Kitinaz enziminin kolloidal kitini hidrolizleyerek oluşturduğu N-asetil glukoz amin miktarını tespit etmek için, standart olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan N-asetil glukoz amin kullanıldı. Standart aralığı 0.1–2.0 değerleri arasında alınarak UV-Vis spektrofotometrede, 540 nm'deki absorbansı kör'e karşı okundu (Ghose, 1987). Konsantrasyon absorbans grafiği çizilerek doğrunun eğimi hesaplandı.

#### **2.2.16.3. *Trichoderma* spp. Suşlarının Agar Plak Metoduyla Kitinaz Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Kitinaz üreten suşların belirlenmesi için önceden hazırlanan kitin agar besiyerinin merkezine 7 günlük büyütülmüş *Trichoderma* spp. suşlarından 5 mm disk kesilerek yerleştirildi. *Trichoderma* besiyerindeki kolloidal kitinden kitini koparır ve kitinolitik enzimlerle kitini, N-asetil glukozamine çevirerek aynen doğadaki formuna dönüştürür. Böylece asidik pH değişir ve besiyeri rengi sarıdan mora dönüşür (Agrawal ve Kotasthane, 2012). Besiyerinde meydana gelen renk değişimine göre kitinaz aktivesi varlığı ve oluşan zonun çapına göre belirlenmeye çalışıldı. Besiyerinde *Trichoderma* spp.'lerin kitinaz üretimi, indikatör olan bromokresol ayırıcı aracılığıyla belirlendi. Bunun için asidik pH'da sarı, bazik pH'da mor renge dönüşmesi, kitinaz varlığını gösterdi. 4. günde oluşan renk değişiminin zon çapı ölçülerek kalitatif olarak varlığı belirlendi (Kamala ve Indara, 2011).

#### **2.2.16.4. *Trichoderma* spp. Suşlarının Sıvı Ortamda Kitinaz Üretimi ve Aktivitesini Belirlenmesi**

*Trichoderma* spp. suşlarının 7 günlük büyütülmüş taze kültürlerinden  $1 \times 10^7$  kob/mL olacak şekilde spor süspansiyonu hazırlandı. Erlen içerisindeki 50 mL %1'lik kitin besiyerine 1 mL süspansiyon inokule edilerek 28 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnokülantlardan 5.,7. ve 9. günler arası örnekler alınarak santrifüjlendi ve süpernatantlar enzim aktivitesi bakılıncaya kadar 4°C'de saklandı. Enzim aktivitesi deneyinde %1'lik kolloidal kitin substrat kullanıldı.

Reaksiyon karışımı 400 µL asetat tamponu (0.05 M pH 5), 500 µL kollodial kitin ve 100 µL ise süpernatant ependorfa koyuldu. Isıtıcı su banyosunda 50 °C'de yarım saat inkübe edildikten sonra eliza platelere her kuyucuğa 100 µL koyularak 540 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü (Kamala ve Indara, 2011).

### **2.2.17. *Trichoderma* spp. Suşlarının Mısır Tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Etkisi ve Köklerde Kolonizasyonunun Belirlenmesi**

*Trichoderma* spp.'nin bitki gelişimine olan etkinliğini ölçmek amacıyla saksı denemesi yapıldı. Deneme 25°C'de, %70 nem içeren ve 16 saat aydınlık, 8 saat karanlığa ayarlı iklim kabininde (DAIHAN, Güney Kore) yürütüldü. Denemede kullanılan bitkileri yetiştirmek amacıyla kullanılan toprak ticari olarak temin edilerek bir gün arayla 2 kez 121°C'de 30 dakika steril edildi. Steril edilen toprak plastik saksılara (750 mL) dolduruldu. Bitki tohumları %1'lik sodyum hipoklorit içinde 30 dakika bekletilerek yüzeyi dezenfekte edildikten sonra iki kez steril distile suyla yıkandı.

PDA ortamında 28°C'de 7 gün geliştirilen, *Trichoderma* spp. kültürlerinden steril erlen içerisinde 25 mL,  $1 \times 10^7$  kob/mL yoğunlukta spor süspansiyonu hazırlandı. Bu solüsyondan 25 mL, sporların tohuma yapışması için 1:1 oranında %2'lik CMC ile karıştırıldı. Karışımın içerisinde sporların homojen dağılımını sağlamak için %1'lik Tween 20'den 1 mL ilave edildi. Tohumlar solüsyonun içerisinde 1 saat bekletilerek sporla kaplanması sağlandı. Kontrolde ise tohumlar sadece steril saf su ile nemlendirildi (Mihuta-Grimm ve Rowe, 1986). İlk sulama işleminde 200 mL musluk suyu kullanıldı, daha sonraları ise fideler iki gün arayla 100 mL musluk suyu ile sulandı (Yıldız ve Benlioğlu, 2008). İnkubasyon süresi 5-6. yaprak oluşumundan sonra sonlandırıldı. Kök kısımları steril distile su ile yıkandı. Kök yaş ağırlığı tartılarak, 60 °C'de 24 saat sonra kuru ağırlıkları belirlemek için tartıldı. Aynı denemede *Trichoderma*'ların çimlenme başarısına etkisini belirlemek için 70 x 50 cm olan plastik kasalara 45 adet mısır tohumu dikildi. Bu amaçla 4., 7., 10., 14., 21., ve 28. günlerde çimlenen mısır tohumları sayıldı. Aşağıda verilen formül kullanılarak çimlenme yüzdesi hesaplandı.

$$\text{Çimlenme Yüzdesi (\%)} = \frac{\text{Çimlenen tohum sayısı} \times 100}{\text{Ekilen tohum sayısı}}$$

2

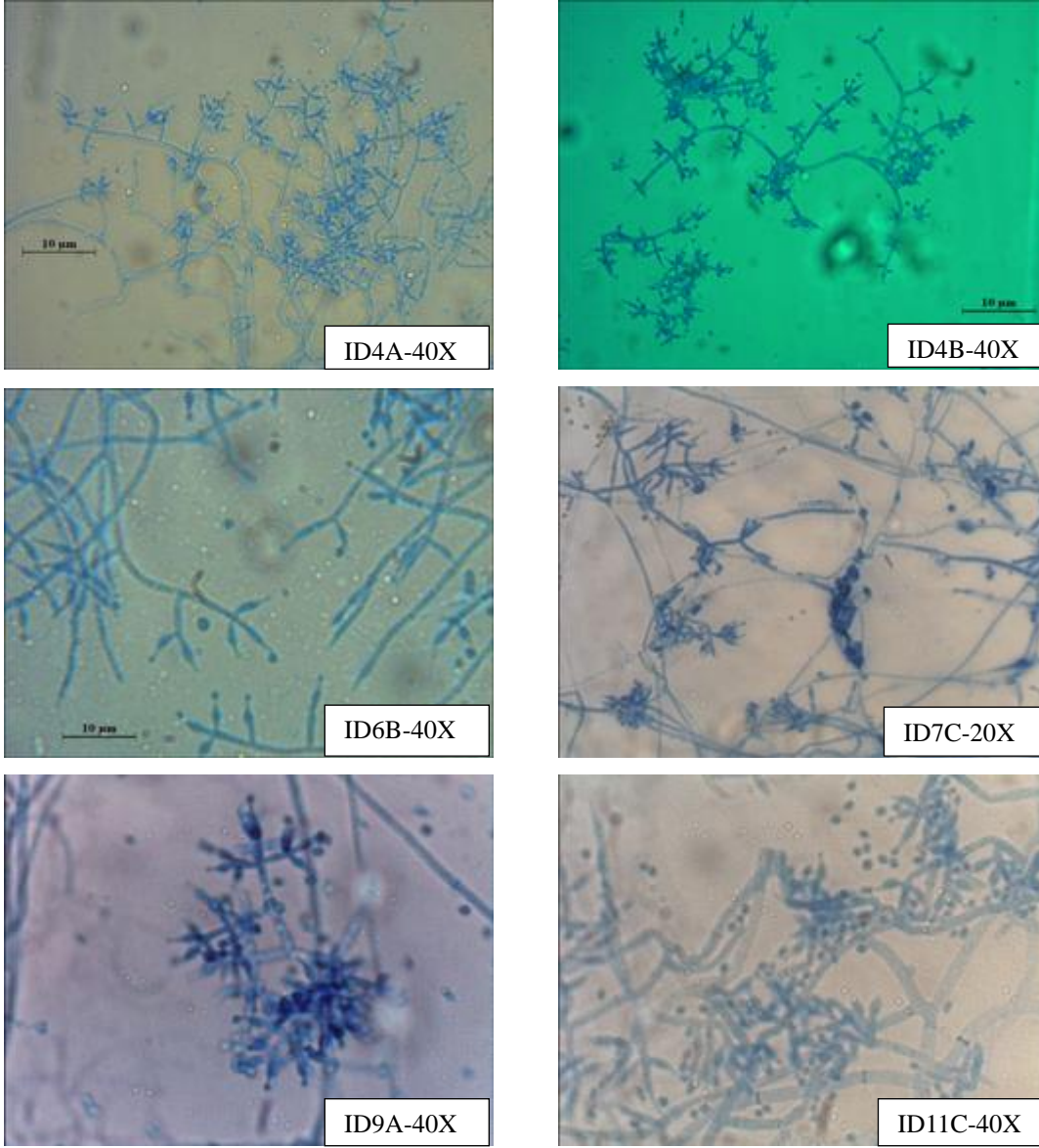
Fideler steril suyla partiküllerin giderilmesi için yıkandı. Kökten 1 cm'lik küçük parçacıklar kesilerek ve çamaşır suyuyla dezenfekte edildikten sonra DRBC agara petri başına 3 parça olacak şekilde ekim yapıldı. İnkübe (28 °C'de 4 gün) edildikten sonra *T. harzianum* üremesi; kök içine kolonizasyonun varlığının, ürememesi ise kolonize olmadığı şeklinde değerlendirildi (Lo ve Lin, 2002).

#### **2.2.18. Çalışmada Kullanılan İstatistik Analizler**

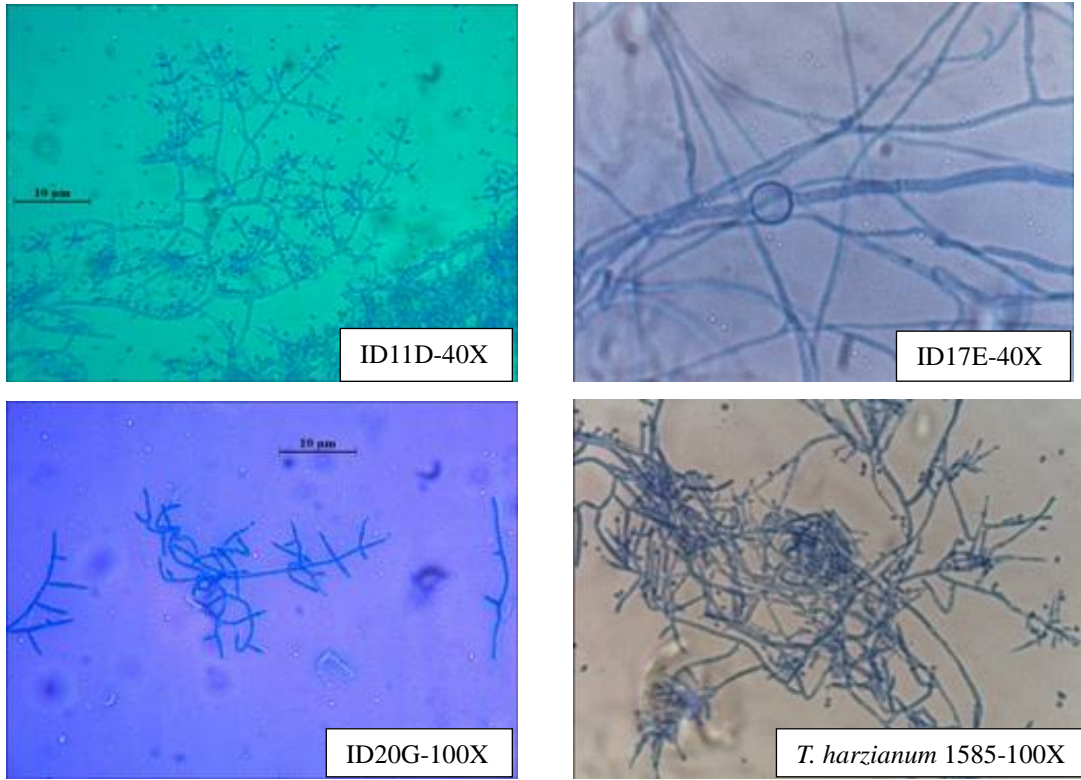
Veriler normal dağılıp dağılmadığı Kolmogorov smirnov testine göre yapılmıştır. Normal dağılan verilerde gruplar arası farklılıkları belirlemek için Student t ve ANOVA testi, normal dağılmayan veriler için Kruskal wallis testi kullanıldı. Değişkenler arası ilişki olup olmadığı korelasyon testi ile ilişkinin matematiksel ifadesi ise regresyon analizi ile belirlenmiştir.

### 3. BULGULAR

*Trichoderma* suşları PDA besiyerinde 28 °C'de inkübe edildikten 2-3 gün sonra görünür koloni oluşturdıkları, 7 günde plakları kapladıkları, makroskopik ve mikroskopik incelemelerine göre de kontrol suşa benzer özellikler gösterdikleri belirlendi (Şekil 8-9).



Şekil 8. Çalışmada kullanılan mikrofungus suşlarının mikroskopik görüntüleri



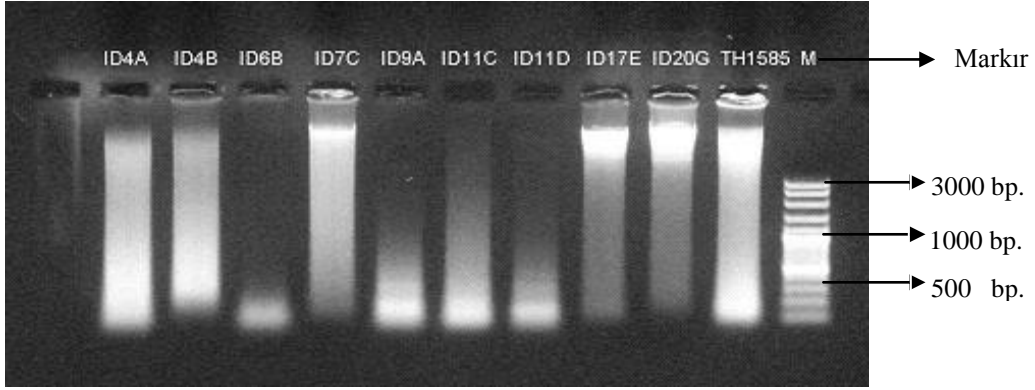
Şekil 9. Çalışmada kullanılan mikrofungus suşlarının mikroskopik görüntüleri

### 3.1. Suşların Moleküler Karakterizasyonu

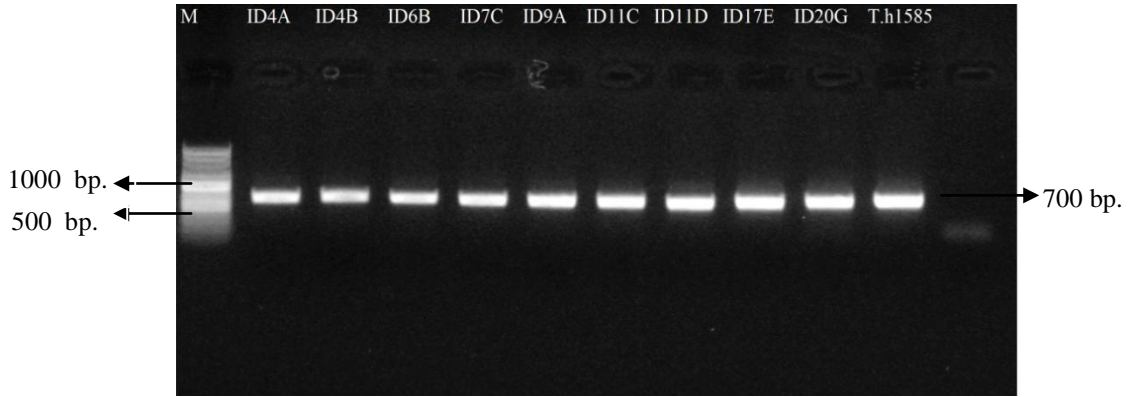
Çalışmada kullanılan *Trichoderma* spp. suşları ve bir adet kontrol suşunun moleküler karakterizasyonlarını yapmak için kit kullanılarak DNA'ları izole edildi ve %8'lik agaroz jelde yürütülerek UV-transilüminatörde görüntülendi (Şekil 10). Sekans analizlerini yapmak amacıyla ITS4 ve ITS5 primerleri kullanılarak DNA'larından PCR yapıldı ve PCR ürünü jel elektroforezde 1000 bp. DNA markır kullanılarak yürütüldü (Şekil 11). Sekans sonuçlar NCBI GenBank'ta BLAST'lanarak yüzde benzerlikleri belirlendi ve soy ağacı oluşturuldu (Tablo 11 ve Şekil 12).

Çalışmada 18S rRNA intragenik (ITS1-5.8S-ITS2) gen bölgesinin çoğaltılarak yapılan sekans analizine göre tür tanımlamasında kontrol suşu dahil toplam 10 örnekten 7'sinin yaklaşık %99 oranında *T. harzianum*, ID20G'nin ise %97 *T. atroviride* ve ID17E'nin %94 *T. hamatum* oldukları belirlendi ve MEGA programı kullanılarak filogenetik soy ağacı oluşturuldu





Şekil 10. *Trichoderma* spp. suşlarına ait DNA izolasyonun jel görüntüsü



Şekil 11. *Trichoderma* spp. izolatları ve tip suşuna ait ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesi PCR Jel görüntüsü

**Tablo 11.** Çalışmada kullanılan fungus suşlarının önerilen tür tayinleri.

<b>Izolat</b>	<b>ITS 1- 5.8- ITS 2</b>	<b>Coavarage (%)</b>	<b>Benzerlik (%)</b>	<b>GenBankNo</b>
ID4A	<i>Hypocrea lixii</i> BHU 221	100%	100%	<a href="#">JN604833.1</a>
	<i>Trichoderma harzianum</i> A12	100%	99%	<a href="#">KC139308.1</a>
	<i>Hypocrea lixii</i> BHU18	100%	99%	<a href="#">JN604835.1</a>
	<i>Hypocrea lixii</i> BHU110	100%	99%	<a href="#">JN604836.1</a>
	<i>Hypocrea lixii</i> BHU226	100%	99%	<a href="#">JN604834.1</a>
ID4B	<i>T. harzianum</i> NBAIL-Th13	100%	99%	<a href="#">JX644593.1</a>
	<i>Trichoderma harzianum</i> T12	100%	99%	<a href="#">KC609759.1</a>
	<i>Trichoderma harzianum</i> IBSD-T47	100%	99%	<a href="#">JX518904.1</a>
ID6B	<i>Trichoderma harzianum</i> IBSD-T11	100%	99%	<a href="#">JX518894.1</a>
	<i>Trichoderma harzianum</i> FUE15	100%	99%	<a href="#">KC200074.1</a>
	<i>Trichoderma harzianum</i> T65-NI	100%	99%	<a href="#">U78881.1</a>
	<i>Hypocrea lixii</i> BHU51	100%	99%	<a href="#">JN618343.1</a>
ID7C	<i>Hypocrea lixii</i> BHU159	100%	99%	<a href="#">JN618342.1</a>
	<i>Hypocrea lixii</i> BHU166	100%	99%	<a href="#">JN618339.1</a>
	<i>Trichoderma harzianum</i> NR6929	100%	98%	<a href="#">AF194011.1</a>
	<i>Trichoderma harzianum</i> 2930	100%	98%	<a href="#">AJ224016.1</a>
ID9A	<i>Trichoderma harzianum</i> A14	100%	98%	<a href="#">KC139307.1</a>
	<i>Hypocrea lixii</i> ATCC 20847	100%	98%	<a href="#">FJ545255.1</a>
	<i>Hypocrea lixii</i> IB32E1	100%	98%	<a href="#">FN598939.1</a>
	<i>Trichoderma aureoviride</i> T77	100%	100%	<a href="#">HQ596945.1</a>
	<i>Hypocrea lixii</i> JBSERB241	100%	100%	<a href="#">EF191311.1</a>
ID11C	<i>Hypocrea lixii</i> NMMX3008	100%	99%	<a href="#">JQ040357.1</a>
	<i>Trichoderma harzianum</i> GJS 05-93	100%	99%	<a href="#">FJ442645.1</a>
	<i>Hypocrea lixii</i> DAOM 222136	100%	100%	<a href="#">JN942884.1</a>
	<i>Trichoderma citrinoviride</i> T200	100%	99%	<a href="#">HQ596983.1</a>
ID11D	<i>Trichoderma harzianum</i> TR040	100%	99%	<a href="#">AF443925.1</a>
	<i>Trichoderma harzianum</i> GJS 92-61	100%	99%	<a href="#">HQ608080.1</a>
	<i>Hypocrea lixii</i> GJS 04-227	100%	100%	<a href="#">FJ442266.1</a>
	<i>Hypocrea lixii</i> GJS 91-138	100%	100%	<a href="#">AF443917.1</a>
	<i>Hypocrea lixii</i> DAOM231402	100%	99%	<a href="#">AY605732.1</a>
ID17E	<i>Hypocrea lixii</i> JBT1244	100%	99%	<a href="#">AY605741.1</a>
	<i>Trichoderma harzianum</i> P134	100%	99%	<a href="#">JF311950.1</a>
	<i>T. hamatum</i> HBJZ1001	100%	94%	<a href="#">JQ040347.1</a>
	<i>T. hamatum</i> CQJB2001	100%	94%	<a href="#">JQ040344.1</a>
	<i>T. hamatum</i> T090	100%	94%	<a href="#">HQ608116.1</a>
ID20G	<i>T. hamatum</i> DAOM237553	100%	94%	<a href="#">EU280136.1</a>
	<i>T. hamatum</i> GHJ-5	100%	94%	<a href="#">GQ331987.1</a>
	<i>Trichoderma atroviride</i> DR19	100%	97%	<a href="#">KC311841.1</a>
	<i>Trichoderma atroviride</i> EGE-K-65	100%	97%	<a href="#">JX119037.1</a>
	<i>Trichoderma atroviride</i> ATCC20476	100%	97%	<a href="#">JQ745258.1</a>
Th1585	<i>Trichoderma atroviride</i> T39	100%	97%	<a href="#">FJ975597.1</a>
	<i>Trichoderma atroviride</i> KUC5026	100%	97%	<a href="#">GQ241294.1</a>
	<i>Hypocrea lixii</i> T 22	100%	99%	<a href="#">GU570562.1</a>
	<i>Hypocrea lixii</i> BHU162	100%	99%	<a href="#">JN604838.1</a>
	<i>Hypocrea lixii</i> DLY1202	100%	99%	<a href="#">HQ259304.1</a>
	<i>Hypocrea lixii</i> T18-1	100%	99%	<a href="#">EU744189.1</a>



Şekil 12. İzolatlarının ITS1-5.8-ITS2 sekans sonuçlarına göre filogenetik ağaç

### 3.2. *Trichoderma* spp. Suşlarının Farklı Sıcaklıklarda Üreme ve Spor Üretimleri

Moleküler metodlarla da *Trichoderma* spp. oldukları doğrulanan suşların farklı sıcaklıklarda (4, 15, 20, 24, 28, 37 ve 42 °C) üreme özellikleri incelendi. Suşların 4, 37 ve 42 °C'de üreme göstermedikleri (üreme olmadığından tabloda gösterilmedi) ancak bu ortamlarda canlılıklarını korudukları tespit edildi. Testlerde 15°C'de ve 37 °C'de üremelerinin çok yavaş olduğu fakat 20-28 °C aralığında iyi üredikleri gözlemlendi. İncelemede 20°C'de, 24°C'de ve 28°C'de ise suşların tümü 3 günde petriyi kapladıkları belirlendi. Kültürlerin zon çapları 48. saat sonra ölçüldüğünde ise 24-28 °C'nin optimum üreme sıcaklığı olduğu görülmektedir (Tablo 12). Farklı sıcaklıklarda zon çapları 3.5-8.5 aralığında değişirken en yüksek zon çapına 9 cm ile 28 °C'de ID11C ve ID11D suşunda gözlenmiştir.

**Tablo 12.** *Trichoderma* spp. suşlarının 48 saat sonra farklı sıcaklıklardaki büyüme zon çapları.

<i>Trichoderma</i> spp. Suş No	İnkübasyon sıcaklığı ve büyüme zon çapları (cm)					
	15 °C	20 °C	24 °C	28 °C	37°C	42°C
ID4A	3.5	4.2	7.5	7.3	-*	-*
ID4B	2.5	3.7	5.2	6	-*	-*
ID6B	3.7	4.1	6.2	7	-*	-*
ID7C	3.5	4.5	5.5	4	-*	-*
ID9A	3.5	4.2	6.8	7	-*	-*
ID11C	4.0	5.1	7.0	9	-*	-*
ID11D	4.0	5.3	8.5	9	-*	-*
ID17E	4.0	5.1	5.5	7	-*	-*
ID20G	3.9	5.5	8.5	6	-*	-*
KUEN 1585	3.5	3	8	6	-*	-*

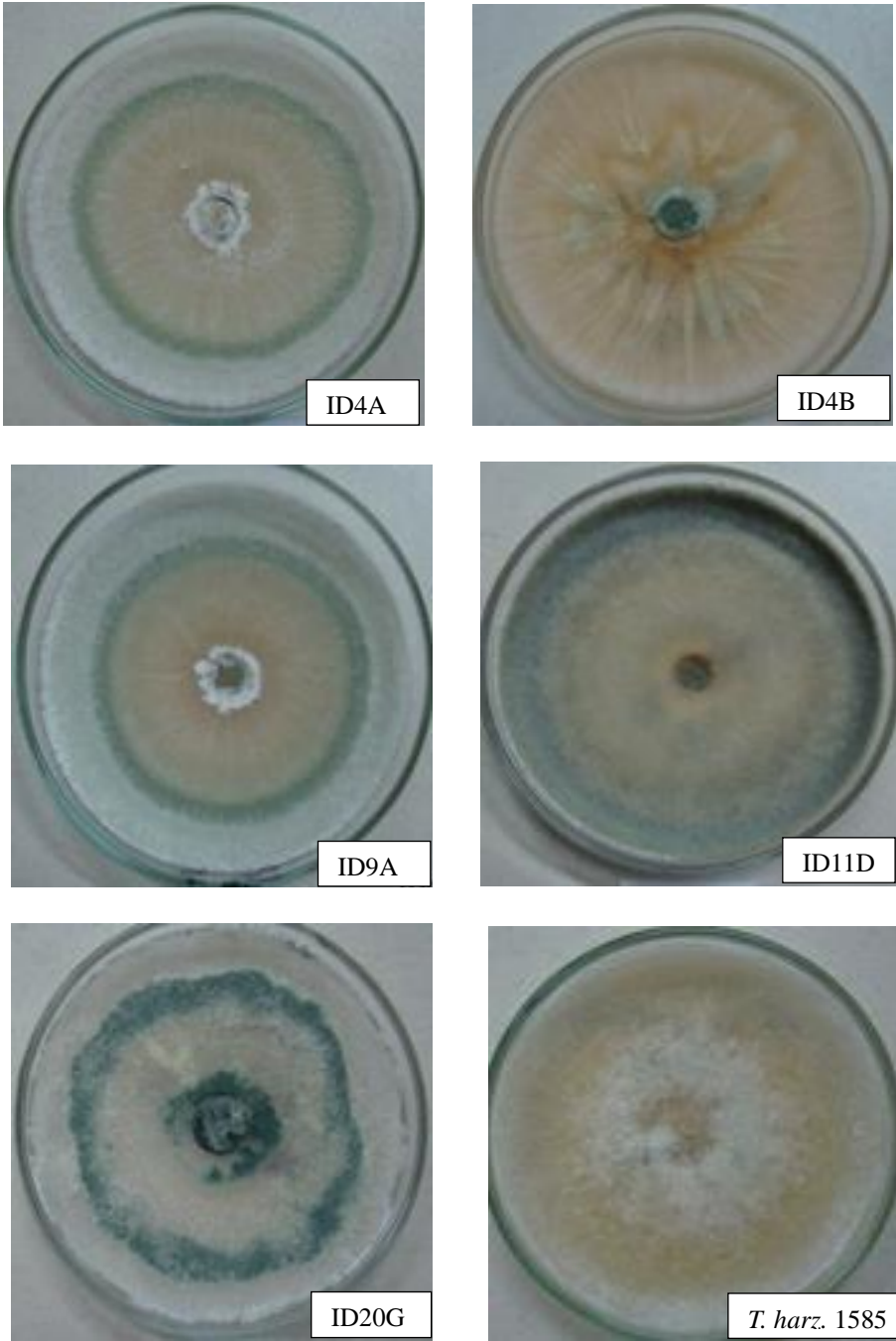
-: Ekim yapılan 5 mm'lik zon çapı, \*:büyüme zonu genişlemiyor ancak sporlar canlılığı koruyor

Doğal ortam sıcaklıklarında üreme ve spor oluşumunun nasıl olduğunun belirlenmesi amacıyla 15, 20, 24 ve 28 °C'lerde 7. ve 15. günlerde üreme ve spor oluşumu test edildi. En iyi spor oluşturma sıcaklığı izolata göre değişmekle birlikte 24°C ve 28 °C'de olduğu gözlemlendi. ID17E izolatu PDA ortamında ve herhangi bir sıcaklıkta spor

oluşturmadığı, kontrol suşun 20°C’de 7. günde hiç, 15. günde ise çok az spor oluşturduğu tespit edildi. En yüksek spor sayısı ID4A’da 28°C’de, ID9A’da 24 °C’de ve ID11D’de 28 °C’de 15. günde saptandı (Tablo 13). Suşların PDA’da farklı sıcaklıklarda üreme ve spor oluşturma şekilleri Şekil 13’de verilmiştir. Two Way ANOVA testine göre 15, 20 ve 24 °C’de spor üretimi açısından benzerlik, 28 °C’de ise önemli bir farklılık gösterdiği gözlenmiştir (P<0,05). Dolayısıyla 28 °C hem üreme ısısı hem de spor oluşturma sıcaklığı olarak optimum sıcaklık değeri olduğu belirlendi.

**Tablo 13.** *Trichoderma* spp. suşlarının farklı sıcaklıkta elde edilen spor sayıları (kob/mL).

Suş Numaraları	Gün	İnkübasyon Sıcaklıkları			
		15 °C	20 °C	24 °C	28 °C
ID4A	7	0	8.60x10 <sup>7</sup>	1.79 x10 <sup>8</sup>	3.01 x10 <sup>8</sup>
	15	1.81x10 <sup>7</sup>	2.73 x10 <sup>8</sup>	2.78 x10 <sup>8</sup>	5.73 x10 <sup>8</sup>
ID4B	7	0	1.00 x10 <sup>8</sup>	1.22 x10 <sup>8</sup>	1.95 x10 <sup>8</sup>
	15	2.53x10 <sup>7</sup>	2.63x10 <sup>8</sup>	1.63 x10 <sup>8</sup>	3.59 x10 <sup>8</sup>
ID6B	7	0	3.91x10 <sup>7</sup>	1.70 x10 <sup>8</sup>	7.53 x10 <sup>7</sup>
	15	2.31x10 <sup>7</sup>	2.06x10 <sup>8</sup>	3.65 x10 <sup>8</sup>	6.78 x10 <sup>8</sup>
ID7C	7	0	6.00 x10 <sup>7</sup>	4.3 x10 <sup>6</sup>	8.5 x10 <sup>8</sup>
	15	2.75x10 <sup>7</sup>	6.1 x10 <sup>8</sup>	1.2 x10 <sup>8</sup>	3.2 x10 <sup>8</sup>
ID9A	7	0	1.30x10 <sup>8</sup>	2.49 x10 <sup>8</sup>	3.28 x10 <sup>8</sup>
	15	2.13x10 <sup>7</sup>	1.81x10 <sup>8</sup>	5.77 x10 <sup>8</sup>	3.36 x10 <sup>9</sup>
ID11C	7	0	2.32x10 <sup>8</sup>	5.6 x10 <sup>6</sup>	1.1 x10 <sup>8</sup>
	15	1.63x10 <sup>7</sup>	6.1 x10 <sup>8</sup>	6.5 x10 <sup>8</sup>	7.7 x10 <sup>8</sup>
ID11D	7	0	3.41 x10 <sup>8</sup>	2.01 x10 <sup>8</sup>	3.59 x10 <sup>8</sup>
	15	1.63x10 <sup>8</sup>	4.06 x10 <sup>8</sup>	4.53 x10 <sup>8</sup>	5.37 x10 <sup>8</sup>
ID17E	7	0	0	0	0
	15	0	0	0	0
ID20G	7	0	2.68 x10 <sup>8</sup>	1.76 x10 <sup>8</sup>	2.95 x10 <sup>8</sup>
	15	1.41x10 <sup>7</sup>	2.82 x10 <sup>8</sup>	1.41 x10 <sup>8</sup>	2.94 x10 <sup>7</sup>
<i>T. harz.</i> 1585	7	0	0	1.78 x10 <sup>7</sup>	1.26 x10 <sup>7</sup>
	15	4.06 x10 <sup>6</sup>	4.94 x10 <sup>8</sup>	5.03 x10 <sup>8</sup>	2.43 x10 <sup>8</sup>



**Şekil 13.** *Trichoderma* spp. suşlarının 28 °C’de sıcaklıkta 7. günde petri görüntüsü

### 3.3. *Trichoderma* spp. Suşlarının Farklı Sıcaklıklara Toleransı

*Trichoderma* spp. sporlarının, ısı toleransını ölçmek için farklı sıcaklıklarda (45, 55, 65 ve 75°C) 15 dakika muamele edildikten sonra canlı kalan spor sayısı araştırıldı. Tüm suşların 45-65 °C’de spor canlılıklarını korudukları gözlemlendi (Tablo 14).

Çalışmada 45 °C'ye muamele edilen sporların canlılığının, ısıya muamele edilmeyen kontrol ile aynı yoğunlukta (yaklaşık %95'i canlı) olduğu, 55 °C'de % 60-70 oranında, 65 °C'de yaklaşık %30-40 oranlarında canlılıklarını korudukları belirlendi. ID17E, spor oluşturmadığı için hifa formu test edildi. *Trichoderma* spp. suşlarından ID11D, ID4A ve ID4B'nin sporları, 75 °C'de 100-300 kob/mL miktarı canlılıklarını korudukları (spor sayısı tabloda gösterilmedi) tespit edilirken diğer suşlara ait sporların çimlenmedikleri gözlemlendi.

**Tablo 14.** *Trichoderma* spp. sporlarının farklı sıcaklık değerlerine dayanıklılığı.

°C	ID4A	ID4B	ID6B	ID7C	ID9A	ID11C	ID11D	ID17E*	ID20G	T.harz
45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
75	+ <sup>b</sup>	+ <sup>c</sup>	-	-	-	-	+ <sup>a</sup>	-	-	-

\*: Hifa ekimi yapıldı, +; Üreme var, -; Üreme yok, a;100, b; 200 ve c; 300 kob/mL

### 3.4. Katı Substrat Ortamlarında *Trichoderma* spp. Suşlarının Spor Üretim Kapasiteleri

Bu deneyde *Trichoderma harzianum* ID11C suşu kullanılarak, sporlarının büyük hacimde ve en ucuz materyaller kullanılarak üretebilmek amacıyla, farklı atık ürünlerin belirli oranlarda karışımıyla hazırlanan kültür ortamları test edildi. Bu amaçla ilk etapta Tablo 10'da verilen 12 farklı karışım test edildi (Tablo 15).

Hifaların 3. günden itibaren tüm yüzeyi sardığı ve spor oluşumunun başladığı, 7. günde ise en iyi seviyelere ulaştığı, 15. günde biraz daha arttığı (veri gösterilmedi), ancak 30. gün süren inkubasyonda spor canlılığının azaldığı gözlemlendi. Yapılan t- testine göre istatistik analize göre hammadde bakımından anlamlı bir fark olmadığı ( $P>0,05$ ) inkubasyon süresi bakımından ise anlamlı bir fark olduğu belirlendi ( $P<0,05$ ). Spor bakımından ortalama olarak 7. gün sayısının  $1,4 \times 10^9$ , 30. günden  $6,177 \times 10^8$  daha fazla olduğu bulundu. Verilere göre inkubasyon süresi uzadıkça spor canlılığı azaldığı belirlendi. Substrat karışımları incelendiğinde sırasıyla en iyi 3, 4, 5, 7 ve 8 nolu karışımlar olduğu,

spor sayısının  $1 \times 10^9$  kob/mL'nin üzerine çıktığı belirlendi. Ortamlar arasında spor üretimi bakımından anlamlı bir fark olmadığı istatistiki olarak belirlendi ( $P > 0,05$ ,  $\chi^2: 4,308$ ).

**Tablo 15.** *T. harzianum* ID11C'nin katı substrat karışımlarında spor üretimi.

Substrat No	Substrat Karışımlar	Spor Sayısı	
		7. Gün	30. Gün
1	BK-MÇ	$6.88 \times 10^7$	$1.22 \times 10^7$
2	BK-ÇA	$1.25 \times 10^9$	$8.75 \times 10^8$
3*	ÜK-MÇ	$2.91 \times 10^9$	$7.38 \times 10^8$
4*	SPÜK	$1.67 \times 10^9$	$6.50 \times 10^8$
5*	TA-ÇA	$2.36 \times 10^9$	$1.02 \times 10^9$
6	T-BK	$8.75 \times 10^8$	$9.16 \times 10^7$
7*	ÜK-SK-BK	$2.78 \times 10^9$	$1.76 \times 10^9$
8*	ÜK-SK-PK	$1.68 \times 10^9$	$3.88 \times 10^8$
9	BK-ÜK-PK	$1.11 \times 10^9$	$7.78 \times 10^8$
10	PK-MÇ-ÇA	$7.66 \times 10^8$	$6.78 \times 10^8$
11	MT-ÜK-FK	$1.50 \times 10^9$	$2.44 \times 10^8$
12	MT	$1.44 \times 10^8$	$1.78 \times 10^8$

BK-MÇ; Buğday Kepeği-Malt Çimi, BK-ÇA; Buğday Kepeği-Çay Atığı, ÜK-MÇ; Üzüm Kabuğu-Malt Çimi, SPÜK; Salatalık-Patlıcan-Üzüm Kabukları, TA-ÇA: Turp Atığı-Çay Atığı, T-BK; Turp Atığı- Buğday Kepeği, ÜK-SK-BK; Üzüm Kabuğu-Salatalık Kabuğu-Buğday Kepeği, ÜK-SK-PK; Üzüm Kabuğu-Salatalık Kabuğu-Pirinç Kavusu, BK-ÜK-PK; Buğday Kepeği-Üzüm Kabuğu-Pirinç Kavusu, PK-MÇ-ÇA; Pirinç Kavusu-Malt Çimi-Çay Atığı, MT-ÜK-FK; Malt Tanesi-Üzüm Kabuğu-Fasulye Kabuğu, MT; Mısır Tanesi, ND; Sayılmadı

### 3.5. *Trichoderma* spp. Sporlarının Formülasyonu

Üreme ve spor oluşturması açısından en iyi olduğu gözlenen 5 farklı karışımdan hasat edilen kültürler 3 farklı dolgu maddesi kullanılarak (Talk pudrası, bentonit ve zeolit) oda ısısında ( $24 \text{ }^\circ\text{C}$ ) ve buzdolabı ( $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) şartlarında spor canlılığının muhafaza edilme süreleri araştırıldı (Tablo 16). Bu üç dolgu maddesine üç farklı koruyucu madde ilave edildi ve birinci gruba yalnızca gliserol, ikinci grubuna CMC ve üçüncü grupta gliserol-CMC ilave edildi. Çalışmada katı ortam olarak kullanılan karışımlarda spor sayısı bakımından Kruskal-Vallis testine göre fark olduğu ( $P < 0,05$   $\chi^2: 11.654$ ), ortalamalarına göre bakıldığında en iyi ortamın 3 (ort 80.74) ve 4 (ort 75.77) ortamlar olduğu belirlendi.



**Tablo 16.** *Trichoderma harzianum* ID11C'nin spor formülasyonu ve canlı kalma süresi.

Kati	Dolgu Maddeleri								
	Zeolit			Bentonit			Talk pudrası		
Subs	0. Ay	20 °C, 3. Ay	4 °C, 5. Ay	0. Ay	20 °C, 3. Ay	4 °C, 5. Ay	0. Ay	20 °C, 3. Ay	4 °C, 5. Ay
No									
3.I	2 x10 <sup>9</sup>	2.00 x10 <sup>9</sup>	5.60 x10 <sup>8</sup>	1.19 x10 <sup>9</sup>	2.12 x10 <sup>8</sup>	3.70 x10 <sup>8</sup>	2.80x10 <sup>9</sup>	1.50 x10 <sup>8</sup>	4.50 x10 <sup>8</sup>
3.II	2.6 x10 <sup>9</sup>	2.00 x10 <sup>8</sup>	6.50 x10 <sup>8</sup>	1.00 x10 <sup>9</sup>	2.40 x10 <sup>8</sup>	6.10 x10 <sup>8</sup>	1.74x10 <sup>9</sup>	2.00 x10 <sup>8</sup>	4.30 x10 <sup>8</sup>
3.III	2.5 x10 <sup>9</sup>	3.00 x10 <sup>8</sup>	1.15 x10 <sup>8</sup>	2.60 x10 <sup>9</sup>	2.20 x10 <sup>8</sup>	1.85 x10 <sup>9</sup>	1.46x10 <sup>9</sup>	2.00 x10 <sup>8</sup>	2.35 x10 <sup>8</sup>
4.I	1.1 x10 <sup>9</sup>	3.00 x10 <sup>8</sup>	4.30 x10 <sup>8</sup>	1.80 x10 <sup>9</sup>	1.70 x10 <sup>8</sup>	5.35 x10 <sup>8</sup>	2.20x10 <sup>9</sup>	2.50 x10 <sup>8</sup>	2.85 x10 <sup>8</sup>
4.II	1.0 x10 <sup>9</sup>	2.00 x10 <sup>8</sup>	1.30 x10 <sup>8</sup>	1.76 x10 <sup>9</sup>	2.00 x10 <sup>8</sup>	2.40 x10 <sup>8</sup>	1.6 x10 <sup>9</sup>	2.00 x10 <sup>8</sup>	5.70 x10 <sup>8</sup>
4.III	1.5 x10 <sup>9</sup>	2.60 x10 <sup>8</sup>	4.00 x10 <sup>8</sup>	2.40 x10 <sup>9</sup>	2.50 x10 <sup>8</sup>	3.45 x10 <sup>8</sup>	1.7 x10 <sup>9</sup>	2.60 x10 <sup>7</sup>	ND
5.I	3.7 x10 <sup>8</sup>	8.40 x10 <sup>7</sup>	1.60 x10 <sup>8</sup>	6.00 x10 <sup>8</sup>	1.00 x10 <sup>8</sup>	3.40 x10 <sup>8</sup>	2.80x10 <sup>8</sup>	9.00 x10 <sup>7</sup>	ND
5.II	2 x10 <sup>9</sup>	6.70 x10 <sup>7</sup>	2.65 x10 <sup>8</sup>	1.50 x10 <sup>9</sup>	2.80 x10 <sup>7</sup>	2.50 x10 <sup>8</sup>	2.30x10 <sup>8</sup>	1.20 x10 <sup>7</sup>	3.45 x10 <sup>7</sup>
5.III	5.7 x10 <sup>8</sup>	3.10 x10 <sup>7</sup>	1.75 x10 <sup>8</sup>	4.20 x10 <sup>8</sup>	6.30 x10 <sup>7</sup>	7.00 x10 <sup>7</sup>	1.18x10 <sup>9</sup>	1.50 x10 <sup>8</sup>	3.30 x10 <sup>8</sup>
7.I	1.4 x10 <sup>9</sup>	1.60 x10 <sup>8</sup>	3.15 x10 <sup>8</sup>	2.72 x10 <sup>9</sup>	2.50 x10 <sup>8</sup>	1.30 x10 <sup>9</sup>	3.00x10 <sup>9</sup>	5.00 x10 <sup>7</sup>	1.65 x10 <sup>8</sup>
7.II	1.6 x10 <sup>9</sup>	3.00 x10 <sup>8</sup>	3.80 x10 <sup>8</sup>	7.30 x10 <sup>8</sup>	1.00 x10 <sup>7</sup>	8.00 x10 <sup>7</sup>	9.20x10 <sup>8</sup>	1.30 x10 <sup>7</sup>	1.35 x10 <sup>8</sup>
7.III	6.4 x10 <sup>8</sup>	3.50 x10 <sup>8</sup>	8.95 x10 <sup>8</sup>	7.30 x10 <sup>8</sup>	1.20 x10 <sup>8</sup>	1.00 x10 <sup>8</sup>	0.00	0.00	ND
8.I	1.2 x10 <sup>9</sup>	1.50 x10 <sup>8</sup>	1.35 x10 <sup>8</sup>	4.60 x10 <sup>8</sup>	6.00 x10 <sup>7</sup>	8.50 x10 <sup>7</sup>	1.50x10 <sup>9</sup>	2.00 x10 <sup>8</sup>	9.50 x10 <sup>8</sup>
8.II	2.5 x10 <sup>8</sup>	2.20 x10 <sup>8</sup>	ND	4.30 x10 <sup>8</sup>	4.80 x10 <sup>7</sup>	4.00 x10 <sup>8</sup>	2.40x10 <sup>9</sup>	2.50 x10 <sup>8</sup>	5.55 x10 <sup>8</sup>
8.III	6 x10 <sup>8</sup>	1.00 x10 <sup>8</sup>	2.63 x10 <sup>8</sup>	4.10 x10 <sup>8</sup>	2.20 x10 <sup>8</sup>	1.35 x10 <sup>8</sup>	2.00x10 <sup>9</sup>	3.50 x10 <sup>8</sup>	3.10 x10 <sup>8</sup>

I:CMC,II:Gliserol,III:CMC+GLİ,3(ÜK+MÇ),4:(SPÜK)5:(TA+ÇA),7:(ÜK+SK+BK),8:(ÜK+SK+PK)

Tüm numunelerde canlı spor sayısının  $10^1$  oranında azaldığı, ancak 4 °C’de muhafazanın spor canlılığının daha fazla olduğu gözlemlendi. Kruskal-Vallis istatistik testine göre sıcaklık arasında ( $P < 0,01$   $\chi^2: 73.178$  ) fark olduğu, oda ısısında spor canlılığının daha fazla azaldığı gözlemlendi. Kruskal-Vallis testine göre istatistiksel olarak dolgular arasında fark olmadığı ( $P = 0,0874$   $\chi^2: 0.270$ ) koruyucular arasında da fark bulunmadığı ( $P: 0.799$   $\chi^2: 0.450$ ) tespit edildi.

### **3.6. *Trichoderma* spp. Suşlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Çalışmada *Trichoderma* spp. suşlarının sıvı kültürde ürettiği ekstraselüler metabolitlerin etil asetat ekstraksiyonları, bir dizi bakteri ve mantara karşı etkinliği test edildi. *Trichoderma* spp. suşlarının ekstraselüler metabolitlerinin antibakteriyel etkinliklerinin var olduğu, ancak antifungal etkinliklerinin olmadığı gözlemlendi (Tablo 17). Suşlardan ID17E ve ID20G hariç tüm suşların metabolitlerinin *Vibrio* sp., *Serratia marcescens*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* ve *B. subtilis* suşlarına düşük düzeyde antibakteriyel etkinliklerinin var olduğu belirlendi. *T. harzianum* ID4A, ID4B ve ID6B izolatlarının ekstratlarının insan patojeni *M. smegmatis* diğerlerine oranla oldukça yüksek etkinlik göstermesi ilginç bulunmuştur.

**Tablo 17.** *Trichoderma* spp. suşlarının etil asetat ekstraksiyonlarının bir grup mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi (mm).

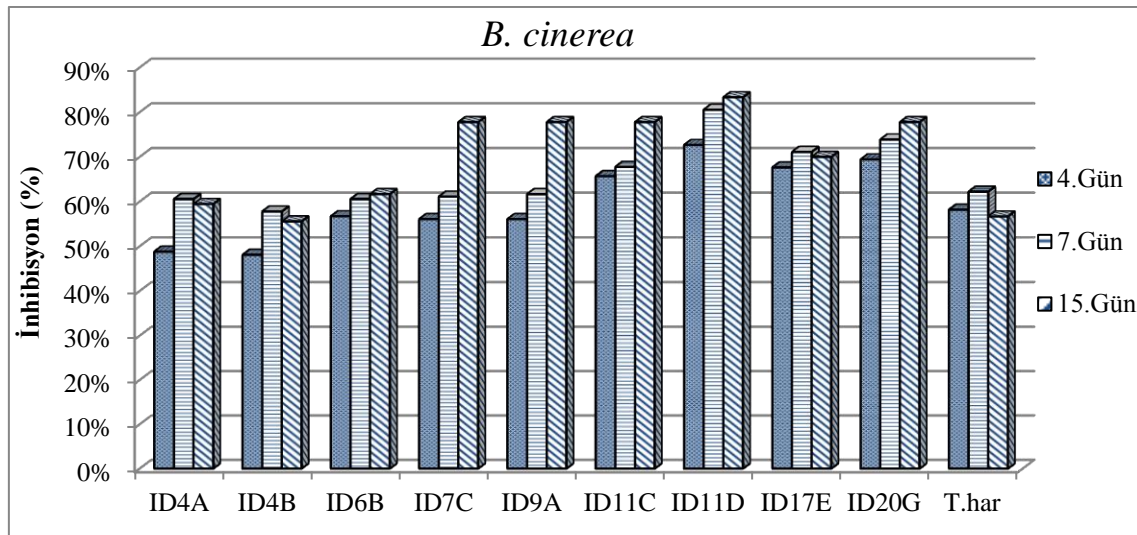
	ID4A	ID4B	ID6B	ID7C	ID9A	ID11C	ID11D	ID17E	ID20G	Tharz	ET.AS	DMSO
<b>Eco</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Pvu</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Ssp</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Vsp</b>	12	12	10	10	10	11	10	6	7	8	8	-
<b>Sma</b>	12	12	11	10	10	11	10	-	6	7	7	-
<b>Kpn</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Yps</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Sau</b>	-	-	6	-	-	-	6	15	-	-	-	-
<b>Efe</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Lmo</b>	8	7	6,5	-	6	6	6	-	6	6	-	-
<b>Bce</b>	10	9	6	-	6	7	6	7	-	-	-	-
<b>Bsu</b>	8	7	-	-	6	6	-	9	-	-	-	-
<b>Cal</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Ctr</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Sce</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Msm</b>	17	14	10	-	-	-	-	-	-	-	8	6
<b>Ani</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Bci</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Rso</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Eco; *Escherichia coli* ATCC 25922, Pvu; *Proteus vulgaris*, Ssp; *Salmonella* sp., Vsp; *Vibrio* sp., Sma; *Serratia marcescens*, Kpn; *Klepsiella pneumonia* ATCC 13883, Yps; *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, Sau; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Efe; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, Lmo; *Listeria monocytogenes* ATCC 43251, Bce; *Bacillus cereus* 709 ROMA, Bsu: *Bacillus subtilis* ATCC6633, Cal; *Candida albicans* ATCC 60193, Ctr; *Candida tropicalis* ATCC 13803, Sce; *Saccharomyces cerevisiae* RSKK 251, Msm; *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, Ani; *Aspergillus niger* RSKK 4017, Bci; *Botrytis cinerea*, Rso; *Rhizoctonia solani* AG3, (-); Etkinlik yok, ET-AS: Etil asetat kontrol, Tharz; *T. harzianum* KUEN1585, DMSO; Dimetil sulfoksit,

### 3.7. *Trichoderma* spp. Suşlarının Antifungal Aktivitesi

Çalışmada *Trichoderma* suşlarının bitki patojeni, saprofit ve böcek patojeni olarak bilinen funguslara karşı dual tekniği kullanılarak antagonist etkinlikleri araştırıldı. Bitki patojeni olan *B. cinerea*, *S. sclerotiorum* ve *R. solani* (AG3) suşlarına karşı olan etkinlikleri yüksek olduğu (Tablo 18, Şekil 23) gözlemlendi.

*Botrytis cinerea* kontrol petrisinde suşun tüm petriyi kapladığı, ancak *T. harzianum*–*B. cinerea* dual petride 4., 7., ve 15. günlerde ölçülen büyüme zon çaplarına göre hesaplanan inhibisyon aralığı % 56-83 olarak belirlendi (Tablo 18, Şekil 14 ve 23). En yüksek inhibisyon etkinliği 15. günde % 83 olarak ID11D’de gözlenirken, ID20G, ID11C, ID7C ve ID9A suşları sırasıyla %78 oranında, *T. harzianum* 1585 suşu ise % 57 oranında oluşturduğu tespit edildi.

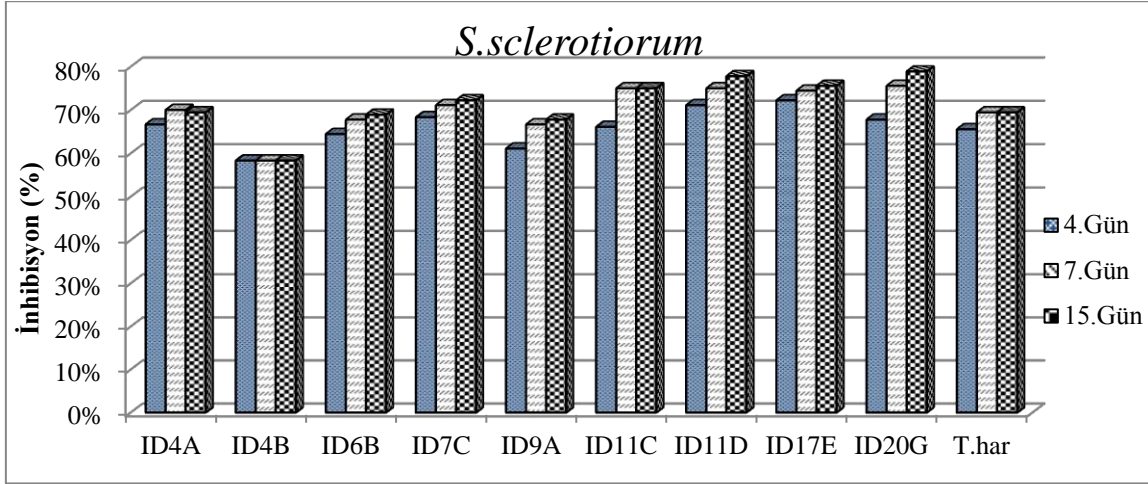


Şekil 14. *Trichoderma* spp. suşlarının 4., 7., ve 15. günde *B. cinerea*'ya karşı inhibisyon yüzdesi

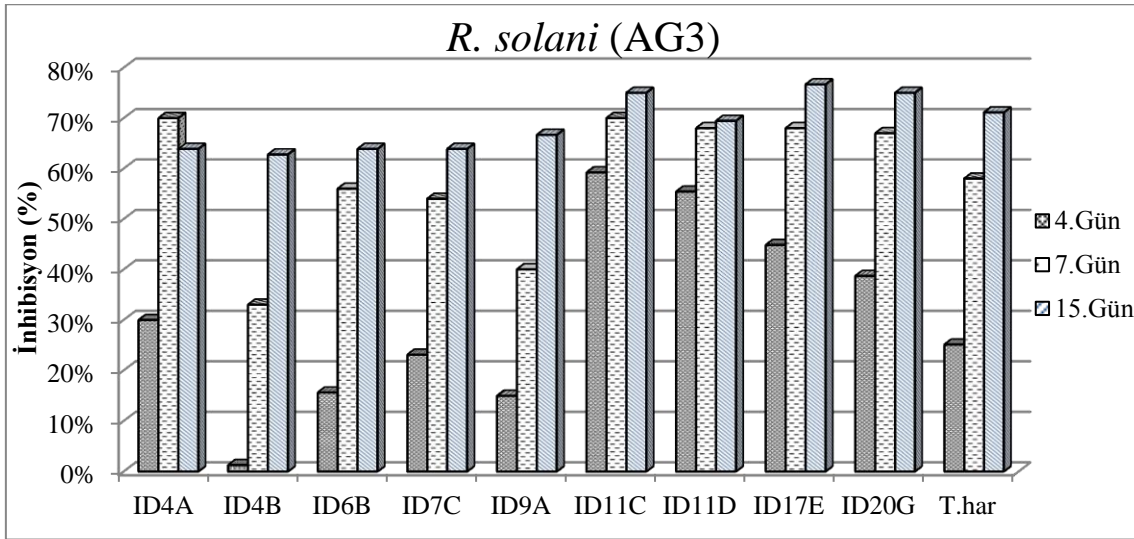
*S. sclerotium* kontrol petrisinde 15. günde tüm petriyi kapladığı, *Trichoderma* spp.–*S. sclerotium* dual petrisinde 4., 7., 15. günlerde ölçülen zon çaplarına göre inhibisyon aralığı %58-79 şeklinde gözlemlendi (Tablo 18, Şekil 15 ve 23). En yüksek inhibisyonu sağlayan suşlar ise sırasıyla ID20G (%79), ID11D (%78), ID17E (%76) ve ID11C (%75) olarak gözlemlendi. *T. harzianum* 1585 suşu ise %66 oranında inhibisyon gözlemlendi.

*Trichoderma* spp.- *R. solani* dual petrilere 4., 7. ve 15. günlerdeki zon çaplarına göre hesaplanan inhibisyon değerleri %63-77 aralığında olduğu, *R. solani* suşunun kontrol

petrisi tüm yüzeyi kaplamıştır. (Tablo 18, Şekil 16 ve 23). En yüksek inhibisyonu sağlayan suşlar sırasıyla ID17E (%77), ID20G (%75), ID11C (%75) ve 11D (%69) olarak belirlendi. *T. harzianum* 1585 suşu ise %71 oranında inhibisyon yüzdesi sağladığı gözlemlendi.



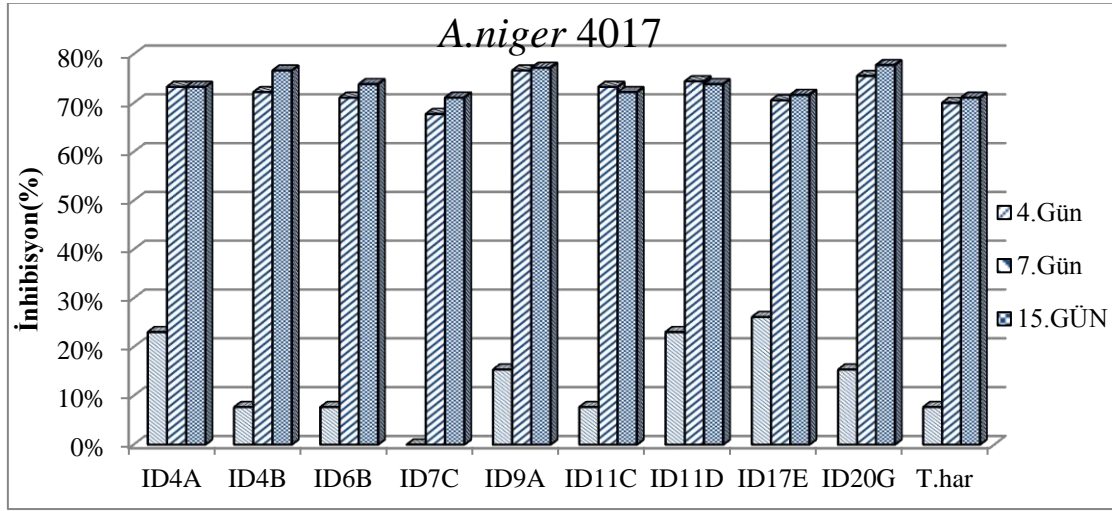
Şekil 15. *Trichoderma* spp. suşlarının 4.,7. ve 15. gün *S. sclerotiorum* suşuna karşı inhibisyon yüzdesi



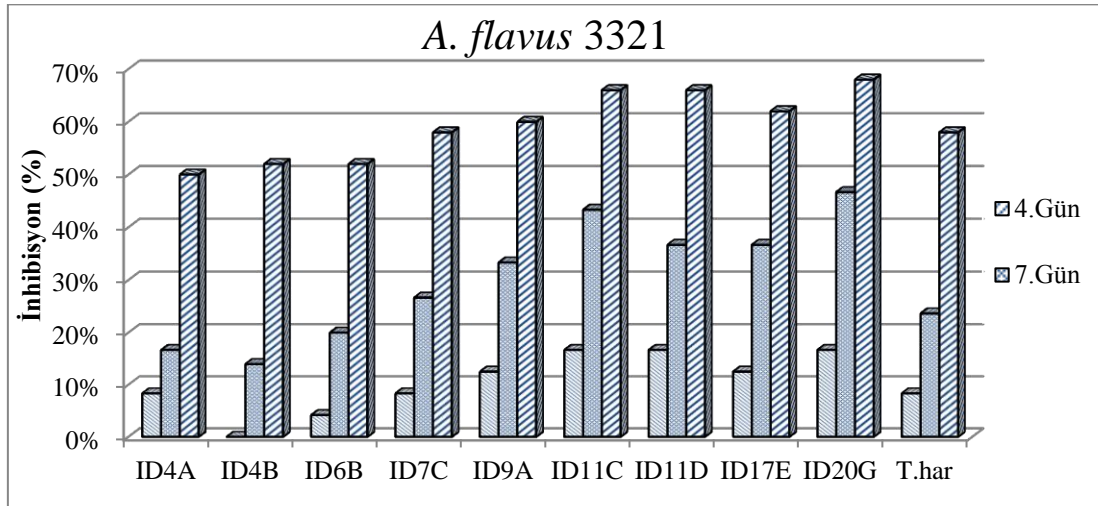
Şekil 16. *Trichoderma* spp. suşlarının 4.,7. ve 15. günde *R. solani* (AG3) suşuna karşı inhibisyon yüzdesi

Çalışmada *Trichoderma* spp. suşları, fırsatçı patojen mantarlar olarak bilinen *A. niger* RSKK4017 ve *A. flavus* 3321 suşlarına karşı etkili oldukları gözlemlendi. Her iki suşun kontrol petrilerinde üremenin tüm yüzeyi kapladığı belirlendi. *Trichoderma* spp.–*A. niger*

dual petrilerinde 4., 7. ve 15. günlerde ölçülen zon çaplarına göre inhibisyonları %68-78 aralığında oldukları izlendi (Tablo 18, Şekil 17 ve 23). En yüksek inhibisyonu sağlayan suşlar ise sırasıyla ID20G (%78), ID9A (%77), ID11D (%74), ID4A (%73), ID11C (%72) ve *T. harzianum* 1585 (%71) tespit edildi.



Şekil 17. *Trichoderma* spp. suşlarının 4., 7. ve 15. günler sonunda *A. niger* RSKK 4017 karşı inhibisyon yüzdesi



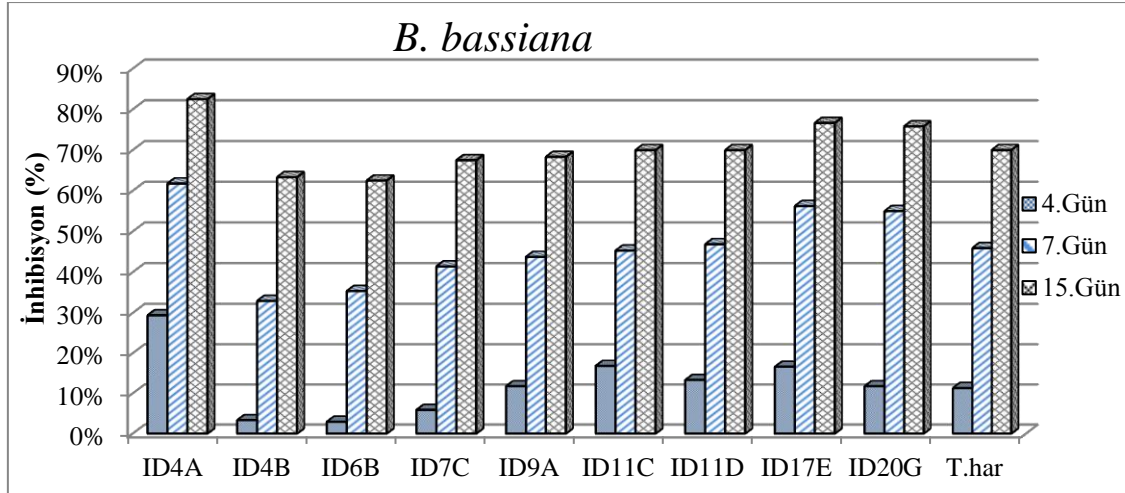
Şekil 18. *Trichoderma* spp. suşlarının 4., 7. ve 15. gün *A. flavus* 3321 karşı inhibisyon yüzdesi

*Trichoderma* spp – *A. flavus* dual petrisinde 4., 7. ve 15. günlerdeki zon çaplarına göre hesaplanan inhibisyon aralığı % 50-68 olarak belirlendi (Tablo 18, Şekil 18 ve 23).

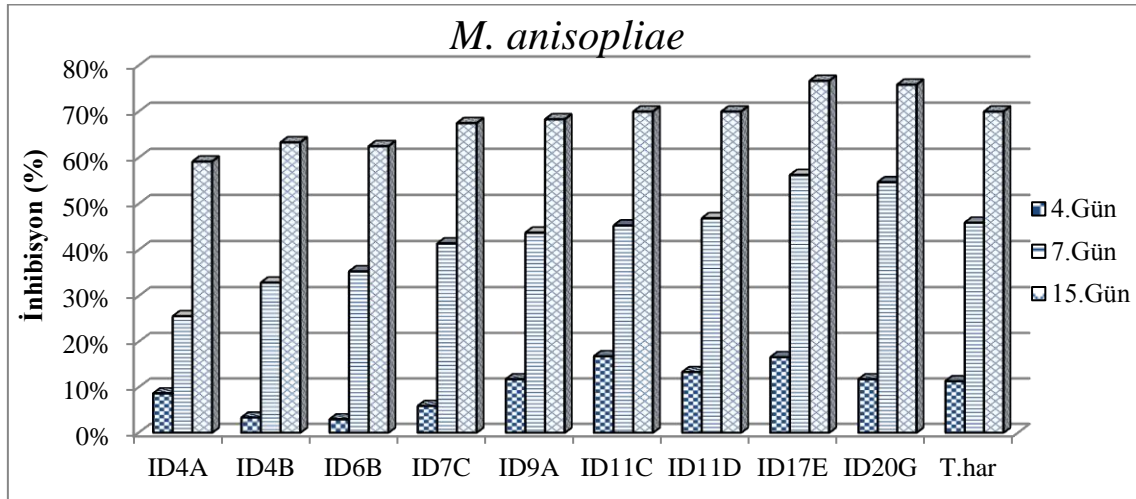


En yüksek inhibisyonu sağlayan suşlar sırasıyla ID20G (%68), ID11C ve ID11D (%66), ID17E (%62) ve *T. harzianum* 1585 (%58) olarak gözlendi.

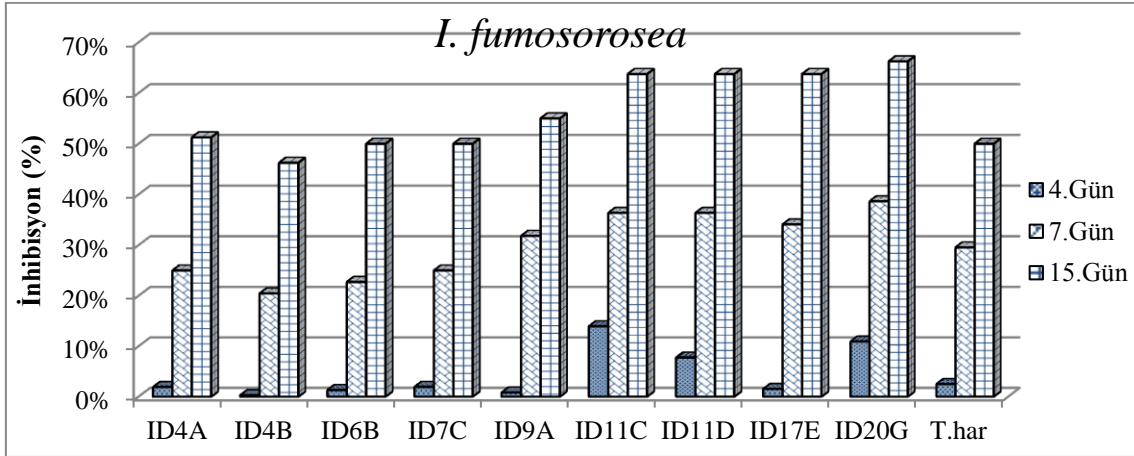
Çalışmada test edilen *Trichoderma* spp. suşları, böcek patojeni ve biyokontrol suşları olarak bilinen (*Beauveria bassiana* ARSEF 8664, *Isaria fumosorosea* ARSEF 8333 ve *Metarhizium anisopliae* ARSEF 8433 ) üç suşa karşı test edildi (Tablo 18, Şekil 19-22).



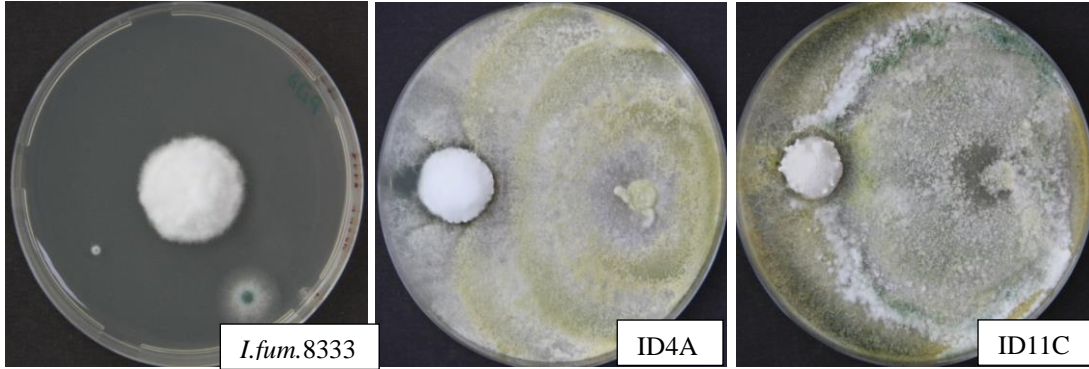
Şekil 19. *Trichoderma* spp. suşlarının 4., 7. ve 15. günde *B. bassiana* suşuna karşı inhibisyon yüzdesi



Şekil 20. *Trichoderma* spp. suşlarının 4.,7. ve 15. günde *M. anisopliae* suşuna karşı inhibisyon yüzdesi



Şekil 21. *Trichoderma* spp.suşlarının 4.,7. ve 15. günde *I. fumosorosea* suşuna karşı inhibisyon yüzdesi



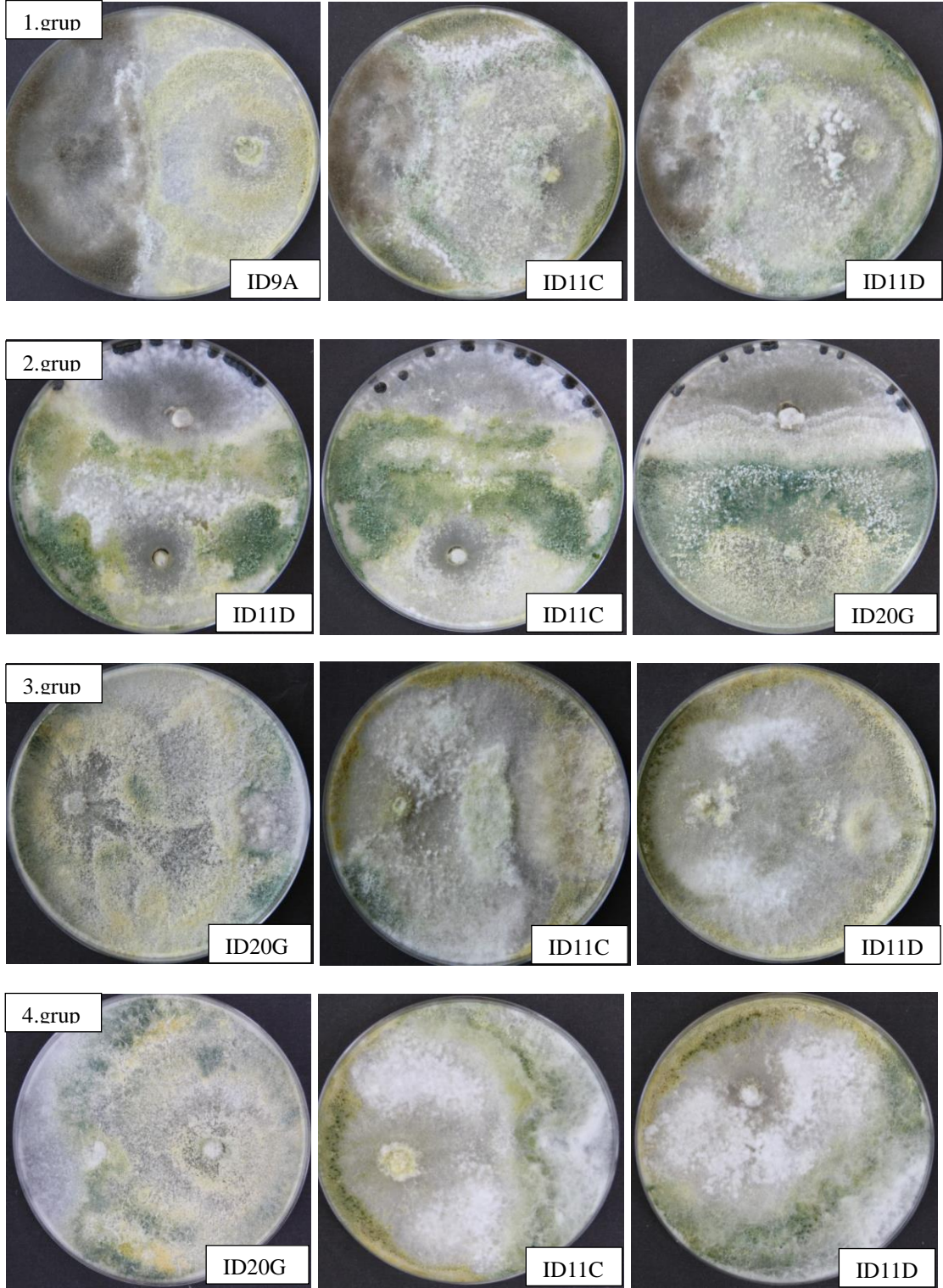
Şekil 22. *T. harzianum*-*I. fumosorosea* 7. gün dual kültür petrileri görüntüsü

Entomopatojen fungusların *Trichoderma* spp. ile olan etkileşimlerinde, test edilen suşlardan daha hızlı geliştiğinden dolayı entomopatojenlerin etrafını sardığı belirlendi. Ancak hifalarını etkilemediği ve entomopatojen suşların yukarı doğru gelişmesini devam ettirdiği, büyüme alanının sınırlandığı gözlemlendi (Şekil 22).



**Tablo 18.** *Trichoderma* spp. suşlarının dual tekniğiyle funguslara karşı inhibisyon yüzdesi.

<i>Trichoderma</i>	Test edilen saprofit ve patojen funguslar (%)							
	Suş no/gün	<i>R.sol</i>	<i>B.cin</i>	<i>S.scl</i>	<i>A.nig</i>	<i>A fla</i>	<i>B. bas</i>	<i>I.fum</i>
<b>ID4A-4</b>	30	49	67	23	8	29	2	9
7	70	61	70	73	17	62	25	26
15	64	59	69	73	50	83	51	59
<b>ID4B-4</b>	1	48	58	8	0	3	0	3
7	33	58	58	72	14	33	20	33
15	63	56	58	77	52	63	46	63
<b>ID6B-4</b>	16	57	64	8	4	3	1	3
7	56	61	68	71	20	35	23	35
15	64	62	69	74	52	63	50	63
<b>ID7C-4</b>	23	56	68	0	8	6	2	6
7	54	61	71	68	27	41	25	41
15	64	78	72	71	58	68	50	68
<b>ID9A-4</b>	15	56	61	15	13	12	1	12
7	40	62	67	77	33	44	32	44
15	67	78	68	77	60	68	55	68
<b>ID11C-4</b>	59	66	66	8	17	17	14	17
7	70	68	75	73	43	45	36	45
15	75	78	75	72	66	70	64	70
<b>IDIID-4</b>	55	73	71	23	17	13	8	13
7	68	81	75	74	37	47	36	47
15	69	83	78	74	66	70	64	70
<b>ID17E-4</b>	45	68	72	26	13	17	2	17
7	68	71	74	71	37	56	34	56
15	77	70	76	72	62	77	64	77
<b>ID20G-4</b>	39	69	68	15	17	12	11	12
7	67	74	76	76	47	55	39	55
15	75	78	79	78	68	76	66	76
<b>T.harz-4</b>	25	58	66	8	8	11	2	11
7	58	63	69	70	24	46	30	46
15	71	57	69	71	58	70	50	70



**Şekil 23.** *Trichoderma* spp. suşlarının farklı patojenlerle 7. gün dual petri görüntüleri  
1. grup; *B. cinerea*, 2. grup; *S. sclerotonia*, 3. grup; *R. solani*, 4. grup: *A. flavus*

### 3.8. *Trichoderma* spp. Suşlarının Uçucu Metabolitlerin Antifungal Aktivitesi

Çalışmada *Trichoderma* spp. suşlarının bitki patojenlerinin gelişmesini inhibe edip etmediğini ve bu inhibisyonda uçucu madde üretiminin rolü olup olmadığı belirlemek için uçucu madde etkinlik testi *S. sclerotiorum*'ya karşı yapıldı. Çalışmada *S. sclerotiorum* ve *Trichoderma* spp. birlikteliği bulunan petrielerde ölçüm değerleri, 7. günün sonunda alınmış olup gelişme yoğunluklarına ve spor/sklerotia oluşturma durumlarına göre belirlendi. Test sonucunda *Trichoderma* spp. suşlarının hem üreme (ID4B, ID17E ve *T. harzianum* 1585 hariç), hem de spor oluşturma özelliklerinin (ID4B, ID11D ve ID20G hiç spor oluşturmadılar) etkilendiği gözlemlendi (Tablo 19). *S. sclerotiorum* suşu *Trichoderma* spp. suşlarının ürettiği metabolitlerden etkilendiği belirlenmiştir.

**Tablo 19.** *Trichoderma harzianum* suşlarının uçucu madde üretimi ve etkinliği.

<i>Trichoderma</i> spp. Suş No	<i>Trichoderma</i> spp.		<i>Sclerotonia sclerotium</i>	
	Üreme	Spor oluşturma	Üreme	Spor oluşturma
ID4A	+++	++	++	-
ID4B	++	-	++	-
ID6B	+++	+	+	-
ID7C	+++	++	++	-
ID9A	+++	++	++	-
ID11C	+++	++	+	-
ID11D	+++	-	+	-
ID17E	++	-	++	-
ID20G	+++	-	+	-
<i>T.harz.1585</i>	++	-	+	-
<i>S. sclerotium</i>			+++	+++

(+) az, (++) iyi, (+++) çok iyi, (-) negatif.

### 3.9. *Trichoderma* spp. Suşlarının Fungisitlere Olan Toleransının Belirlenmesi

Çalışmada *Trichoderma* spp. suşlarının bitki patojeni fungal etkenlere karşı kullanılan üç farklı fungusitin Captan (Phthalimide grubu), Dikozin (dithiocarbamate grubu) ve Cupranex (inorganik grubu) farklı dozlarına karşı olan toleransları araştırıldı.

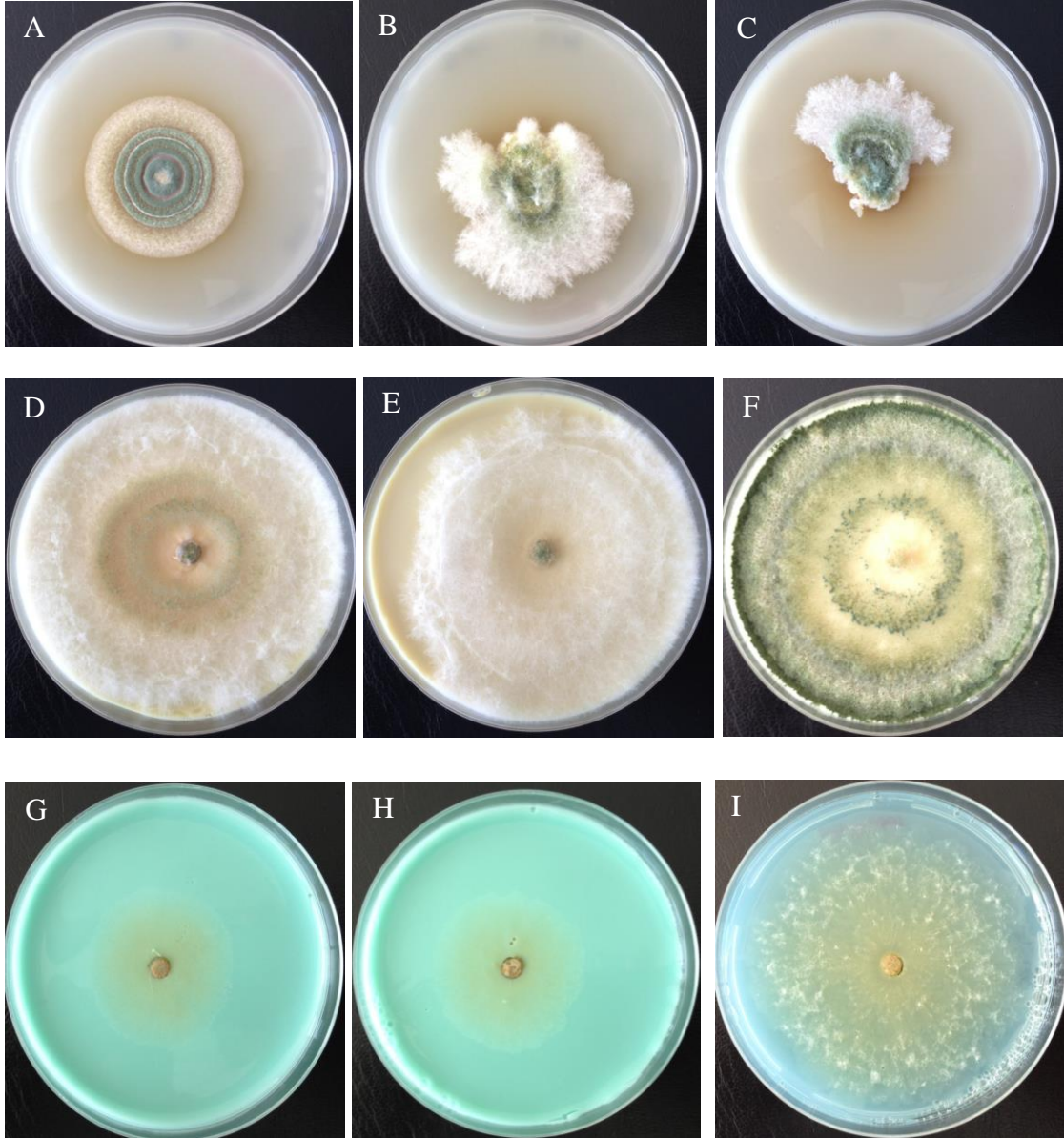
Üç fungusitin özelliği koruyucu ve çoklu etki mekanizmalarına sahip olmalarından dolayı, çeşitli bitki patojenlerine karşı kullanılabilir olmalarıdır. (URL-3). Fungusit içeren besiyerinde *Trichoderma* spp. suşlarının üreme ve spor oluşturmaları günlük takip edilerek 7. gün üreme zon çapları ölçüldü (Tablo 20). *Trichoderma* spp. suşlarının üreme ve spor oluşturma üzerine, fungusitlerin 1000 µg/mL dozunda etkisi gözlenmediği için sonuçlara tabloda yer verilmemiştir. Bu sonuçlara göre her üç fungusit için önerilen ticari kullanım dozunda ve üst dozlarda suşların gelişebildikleri, spor oluşturabildikleri gözlemlendi.

**Tablo 20.** *Trichoderma* spp. suşlarının fungusitli PDA besiyerinde 7. gün sonunda büyüme zon çapları (mm).

Suş No	CAPTAN (µg/mL)			DİKOZİN (µg/mL)			CUPRENAX (µg/mL)		
	2500	5000	10000	2500	5000	10000	2500	5000	10000
ID4A	40	20	14	85	85	39	35	35	40
ID4B	40	20	14	85	85	40	35	34	38
ID6B	38	21	19	85	85	35	36	30	29
ID7C	38	20	18	85	85	20	30	30	29
ID9A	28	22	18	85	85	30	34	30	30
ID11C	48	20	19	85	85	80	50	45	40
ID11D	35	35	19	85	85	85	42	40	40
ID17E	28	15	5	85	60	50	39	34	30
ID20G	20	12	9	85	70	40	20	17	15
<i>T.harzi</i> 1585	75	35	25	85	85	20	35	35	30

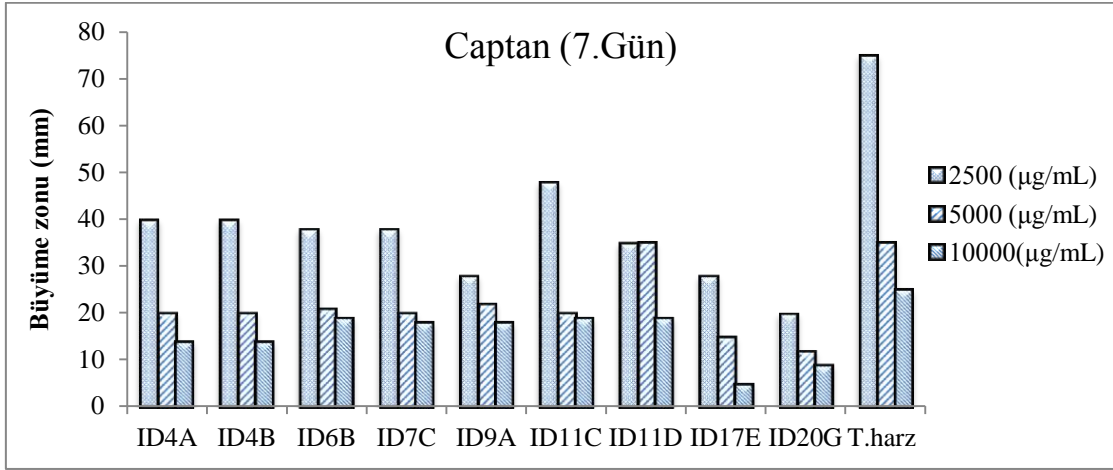
Captan'a karşı elde edilen sonuçlara bakıldığında, 2500 µg/mL'de tüm suşların oldukça iyi ürediği, genel olarak zon çaplarının 7. gününde 15-48 mm aralığında olduğu belirlendi. En az etkilenen suş *T. harzianum* KUEN 1585 suşundan sonra ID11C (48 mm) iken, en çok etkilenen suş ID20G (15 mm) olduğu gözlemlendi (Tablo 20, Şekil 24-27). Captan'ın 5000 µg/mL dozunda tüm suşların ürediği, ancak 2500 µg/mL doza göre daha kısıtlı ürediği belirlendi. ID20G ve ID17E sırasıyla 12 ve 15 mm ile en az üreme gösteren suşlar olduğu, ID11D'nin ise en iyi (30 mm) üreyen ve de kontrol suşu ile aynı üreme zon çapına sahip olduğu belirlendi.

Suşlardan ID20G ve ID17E, Captan'ın 10000 µg/mL dozunda üremediği, ID4A ve 4B ise çok zorlandığı, diğerlerinin ise birbirine benzer (13-14 mm) şekilde üredikleri gözlemlendi. Captan'ın kullanım dozu 2500 µg/mL olup, 10000 µg/mL'de suşların canlı kalmaları ve de üreme göstermeleri fungusit ile birlikte kullanımlarında kolaylık sağlayacağı düşünölmektedir.



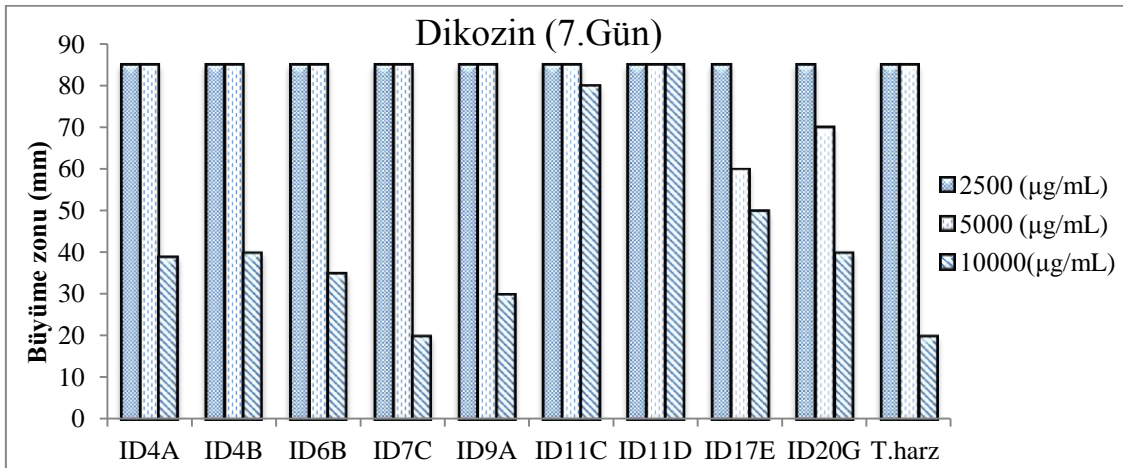
**şekil 24.** *Trichoderma* spp. suşlarının farklı fungusit iğereren petrilerdeki 7. gün görüntöleri. Captan; A-B-C, Dikozin: D-E-F, Cuprenax; G-H-I; 1000 µg/mL; A-B; 2500 µg/mL; C: 5000 µg/mL; A-B-D-E: 10000 µg/mL, A; ID4A, B-C-G; ID11C, C-E-F-H: ID11D





**Şekil 25.** *Trichoderma* spp. suşlarının Captan içeren PDA besiyerinde 7. gün büyüme grafiği

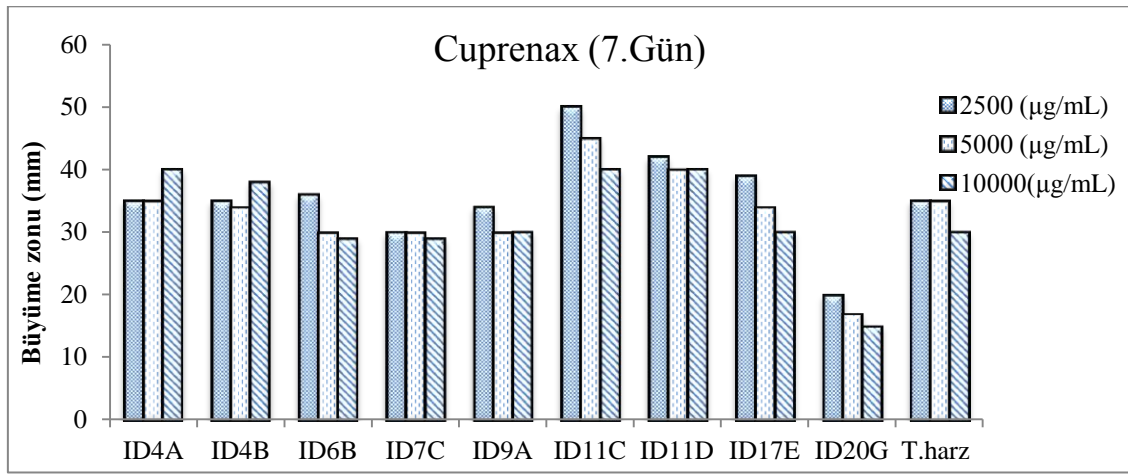
Çalışmada kullanılan Dikozin'in 1000 ve 2500 µg/mL konsantrasyonlarda test edilen suşların pek etkilenmediği, 7. günde tüm örneklerin petriyi kapladığı (85 mm) gözlenmiştir (Tablo 20, Şekil 24 ve 25). Dikozinin 5000 µg/mL dozunda suşların tümünün çok iyi ürediği, en düşük üreme zonu ID17E ve ID20G de sırasıyla 60 ve 70 mm şeklindeyken, *T. harzianum* kontrol suşu dahil olmak üzere diğerlerinde (85 mm) etkilenmedikleri gözlemlendi (Tablo 20, Şekil 24 ve 26). Dikozin'in 10.000 µg/mL dozu uygulandığında ise ID11C (85 mm) ve ID11D (80 mm)'nin etkilenmediği, tüm test edilen dozlara karşı yüksek bir dirence sahip olduğu belirlendi.



**Şekil 26.** *Trichoderma* spp. suşlarının Dikozin içeren PDA besiyerinde 7. gün büyüme grafiği

Dikozin'in yüksek dozunda en çok etkilenen suşlar, kontrol suşu ve ID7C olarak gözlenirken, diğerlerinin üreme zon çapları 30-50 mm aralığında gözlemlendi.

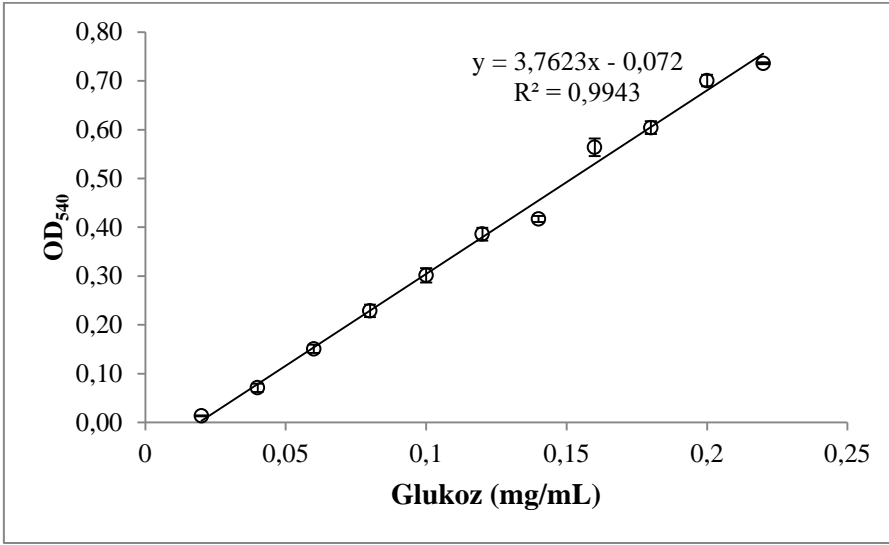
Çalışmada inorganik fungusit grubundan olan Cuprenax'in, test edilen 1000 µg/mL dozunda en iyi geliştikleri, 2500, 5000 ve 10000 µg/mL dozlarda tüm suşların bir miktar etkilendikleri ancak bu üç konsantrasyon arasında önemli bir farklılığın olmadığı gözlemlendi (Tablo 20, Şekil 24 ve 27). Cuprenax'e en dirençli suş 10000 µg/mL'de sırasıyla ID11C, ID11D, ID4A ve ID4B şeklinde (38-40 mm) iken, en duyarlı suş olarak ID20G olduğu gözlemlendi.



Şekil 27. *Trichoderma* spp. suşlarının Cuprenax içeren PDA besiyerinde 7. gün büyüme grafiği

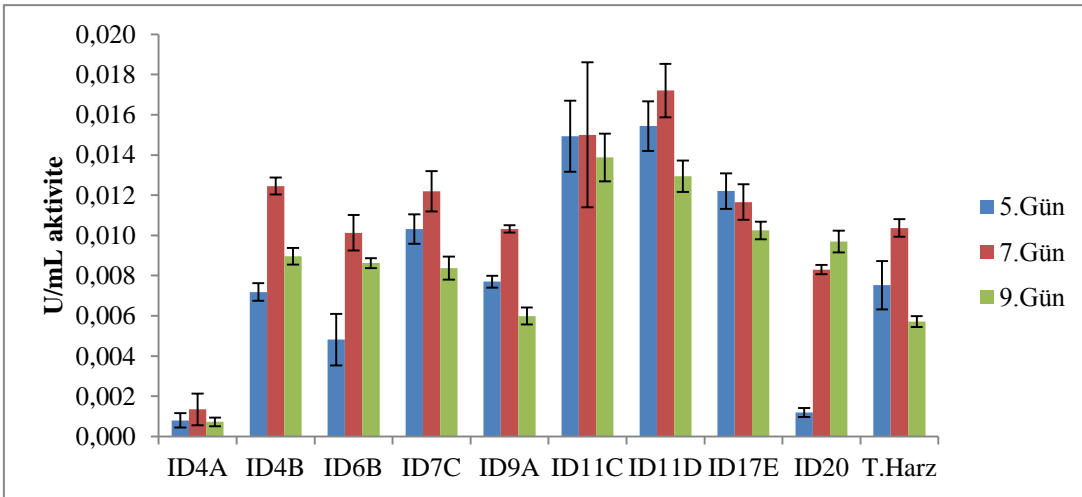
### 3.10. *Trichoderma* spp. Suşlarının Selüloz Aktivitesi ve Glukoz Standartı

Selülazın selülozu hidrolizleyerek oluşturduğu glukozu tespit etmek için standartlar olarak farklı konsantrasyonlarda glukoz kullanılmıştır. Konsantrasyona karşı absorbans grafiği alınarak doğrunun eğimi hesaplanmıştır. Aktivite değerleri hesaplanmasında kullanılan lineer doğrunun denklemi  $y=3,7623x-0,072$ , regresyon katsayısı  $R^2=0,9943$ 'dir (Şekil 28). Çalışmada *Trichoderma* spp. suşlarının selüloz üretme özellikleri agar plak yöntemi ve sıvı kültür yöntemleriyle araştırıldı. *Trichoderma* spp. suşlarının CMC agar üzerinde 9. günlerde (40-72 mm) gelişme zon çapları incelendi. Suşların CMC agar üzerindeki iyi üredikleri, ancak taze hifaların aktivite zon çapı alanını kapladıklarından dolayı kongo red boyasıyla boyanma yapılamadı. Bu nedenle sıvı kültür yöntemi yapıldı.



Şekil 28. DNS metodu ile glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen standart grafiği.  $y = 3,7623x - 0,072$ ,  $R^2 = 0,9943$

Sıvı kültürde selülaz aktivitesi bakıldığında, inkübasyon süresinin uzatılmasıyla paralel artışı, çoğu suşta 7. gün ideal olduğu, 9. günde azalmanın başladığı belirlendi. En düşük aktivite ID4A'da gözlenirken diğer suşlarda ise birbirlerine benzer görüldü. Ancak ID11D'nin en yüksek aktivitesi 7. günde 0.017 U/mL, ID11C'de 0.015 U/mL belirlendi (Şekil 29).

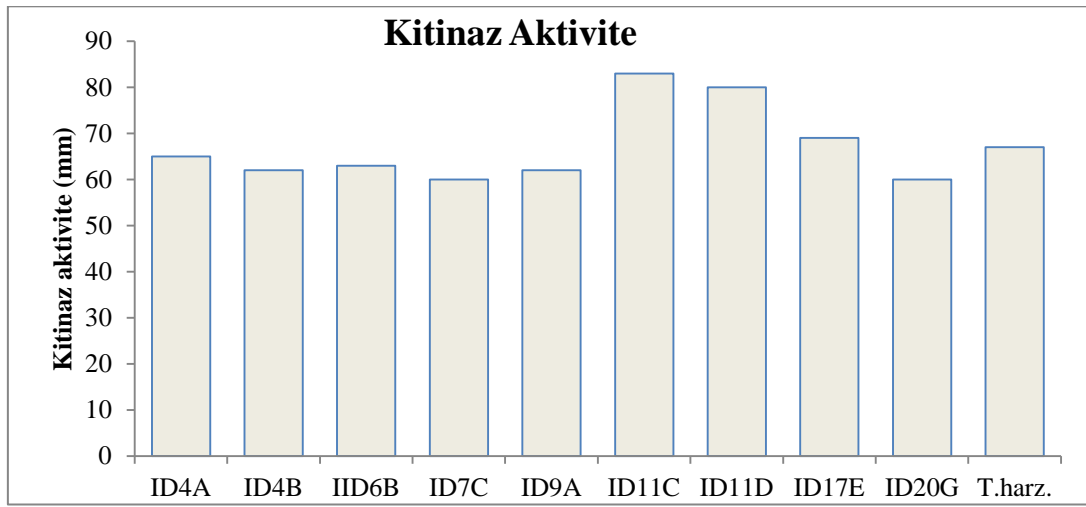


Şekil 29. *Trichoderma* spp. suşlarının sıvı ortamında selülaz aktivitesinin spektrofotometrik ölçüm grafiği

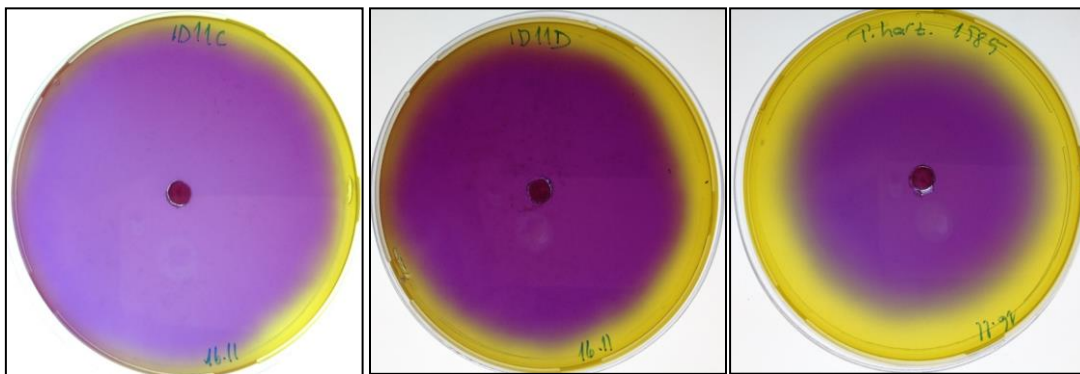


### 3.11. *Trichoderma* spp. Suşlarının Kitinaz Aktivitesi ve NAGA Standartı

Kitinaz aktivitesine %2 kollodial kitin içeren besiyerinde, agar plak yöntemi kullanılarak ön tarama yapıldı. Test sonucunda besiyerinin sarı olan rengin mor renge dönüşmesi ve oluşan mor bölgenin zon çapı ölçülerek kitinaz enzimi üretimi kalitatif olarak belirlendi. Tüm suşlarda kitinaz aktivitesi belirlenmiş olup en iyi aktivite 96 saat sonraki zon çapı değerleri olduğu ve bunların da ID11C ve ID11D suşlarında en iyi olduğu görülürken, sırasıyla ID17E ve *T. harzianum* 1585 kontrol suşunun aktivitelerinin diğerleriyle benzer olduğu (60-70 mm) tespit edildi (Şekil 30 ve 31).



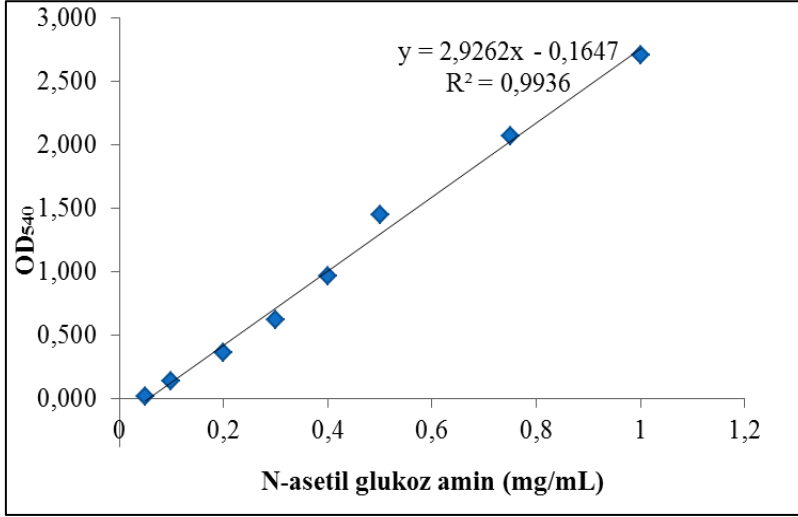
Şekil 30. *Trichoderma* spp. suşlarının kollodial kitin içeren kitin agar petrisinde 4. gün zon çapları



Şekil 31. *Trichoderma* spp. suşlarının kitin agar petrisinde 4. gün zon çapı petri görüntüsü

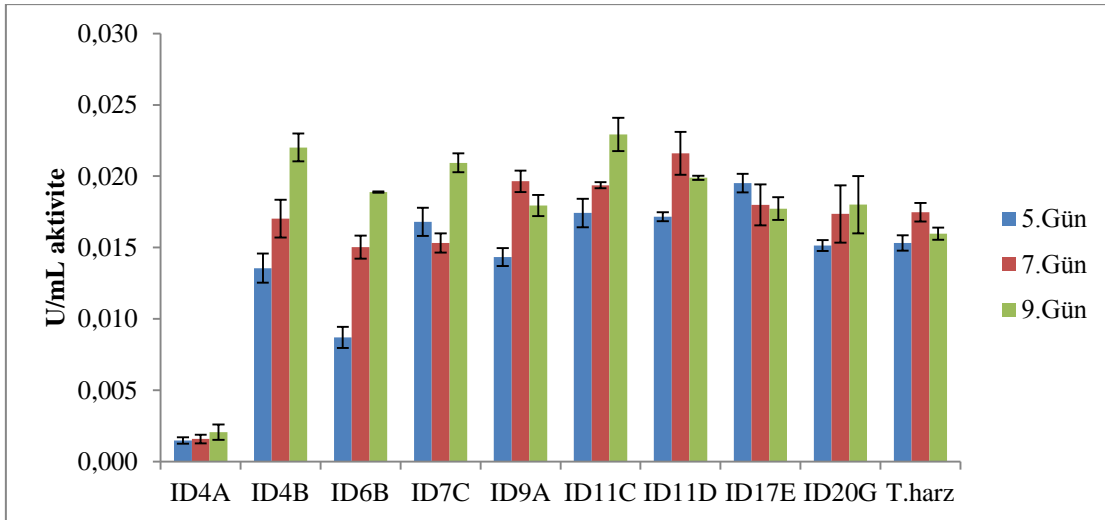
Kitinazın kitini hidrolizleyerek oluşturduğu N-asetil glukoz amini tespit etmek için standartlar olarak farklı konsantrasyonlarda N-asetil glukoz amin kullanılmıştır.

Konsantrasyona karşı absorbans grafiği alınarak doğrunun eğimi hesaplanmıştır. Aktivite değerleri hesaplanmasında kullanılan lineer doğrunun denklemi  $y=2.9262x-0.1647$ , regresyon katsayısı  $R^2=0.9936$ 'dir (Şekil 32).



**Şekil 32.** DNS metodu ile N-asetil glukoz amin konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen standart grafiği  $y= 2.9262x - 0.072$ ,  $R^2= 0.9936$

ID4A hariç tüm suşların kitinolitik aktiviteleri yüksek tespit edildi. En yüksek aktivite 7. günde ID11D'de 0.022 U/mL ve 9. günde ID11C'de 0.023 U/mL olarak ölçüldü (Şekil 33).



**Şekil 33.** *Trichoderma* spp. suşlarının kollodial kitin sıvı ortamında ürettiği kitinazın spektrofotometrik ölçüm grafiği

Genel olarak aktivite 5. günden sonra aktivitenin yükseldiği belirlendi. ID17E'nin ise en yüksek aktivitesi 5. günde 0.020 U/mL belirlenmiş, ilerleyen günlerde aktivite azaldığı görülmüştür.

### 3.12. *Trichoderma* spp. Suşlarının Bitki Çimlenmesine ve Büyümesine Olan Etkisi

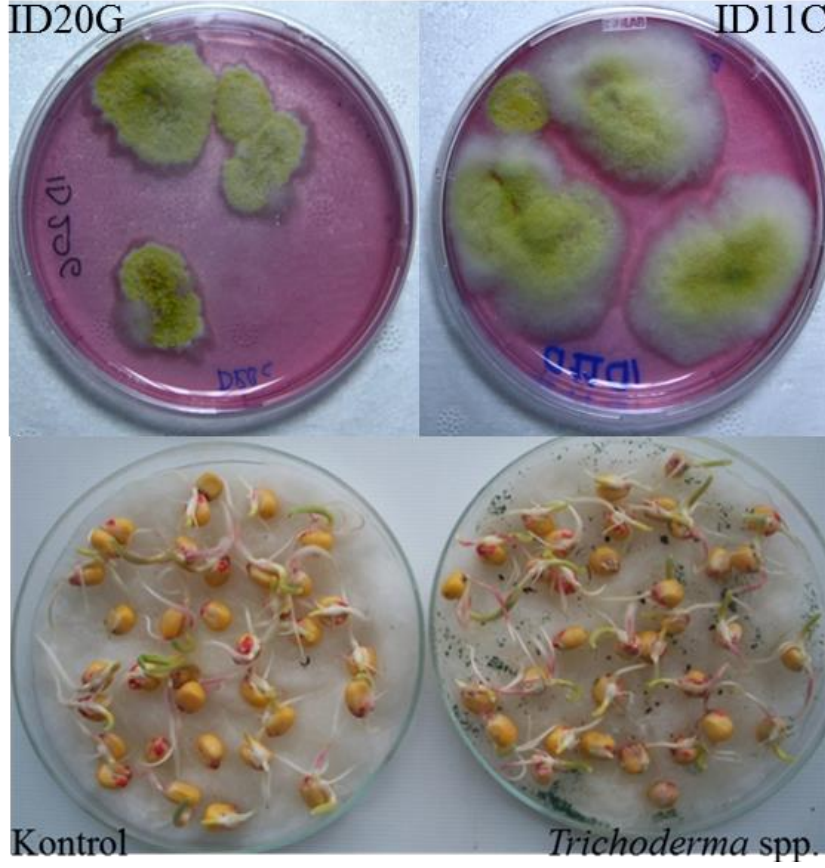
*Trichoderma harzianum* ID11C ve *T. atroviride* ID20G suşlarının bitki tohumlarının çimlenmesine olan etkinliği, lisanslı mısır bitkisi (MayAgro RX9292) üzerinde, petri kaplarında ve sera koşullarında (topraklı) test edildi. *Trichoderma*'lar petri kaplarında yapılan çimlenme deneyinde %98-100 oranında çimlendiği, kontrole göre başarısının daha yüksek olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Serada topraklı köpük kasalar kullanarak 45 adet mısır tohumu ekilmiş, 4., 7., 10., 14., 21. ve 28. günlerinde çimlenme yüzdeleri hesaplanmıştır (Tablo 23, Şekil 34). Elde edilen sonuçlara bakıldığında ilk 4. ve 7. günlerde çimlenme başarısı kontrole göre her iki suşun da iyi olduğu, mısırdaki ID11C suşunun daha etkili olduğu belirlendi. Mısır fideleri, gelişmelerinin 4. haftasında sonlandırılarak, kök yaş ve kuru ağırlıkları hesaplandı. Ortalama kök yaş ağırlıkları kontrole (329.1 g) göre sırasıyla ID20G %60 (526.6 g) ve ID11D %14 (375.5) oranında daha iyi gelişme gösterdiği, kuru ağırlıkta ise kontrolün 79.1 g, ID11D'nin 87.5 g ve ID20G'nin ise 86.2 g ağırlığa sahip olduğu gözlemlendi.

**Tablo 21.** *Trichoderma* spp. uygulanmış mısır tohumlarının çimlenme başarısı deneyi sonuçları (n= 45).

Sayım Günler	Kontrol		ID11C		ID20G	
	Sayı (n)	Başarı (%)	Sayı (n)	Başarı (%)	Sayı (n)	Başarı (%)
4	9	20	22	49	16	36
7	21	67	16	84	18	76
10	7	82	4	93	5	86
14	2	86	1	96	1	89
21	1	89	1	98	3	96
28	2	93	1	100	1	98
<b>Toplam</b>	42	93	45	100	44	98

*Trichoderma* spp. saksı ve sera denemelerinde kök ve toprağa *Trichoderma*'ların adaptasyonu çok iyi olduğu, saksı toprağında *Trichoderma*'ların ürediği ve spor oluşturduğu gözlemlendi.

Kök uçlarından alınan ve dezenfekte edilen parçalardan DRBC agar plaklarına yapılan üç nokta ekiminde sadece *Trichoderma*'ların ürediği gözlemlendi (Şekil 34).



Şekil 34. *Trichoderma* spp. uygulanmış olan mısır tohumları ve bitki kökünde *Trichoderma* kolonizasyonunun DRBC'de görüntüsü (ID11D ve ID20G'nin 4. gün petri görüntüsü)

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Çalışmada İkizdere vadisi çay bahçesi topraklarından izole edilen ve ID olarak kodlanan toplamda kontrol ile birlikte 10 adet mikrofungusun moleküler tanımlanması yapılarak bir dizi özellikleri araştırıldı. Mikrofungusların tümü, mikroskobik (Şekil 8-9) ve makroskobik görünümleri (Şekil 13) geleneksel yöntemlerle incelenerek *Trichoderma harzianum* olarak tanımlandı. Moleküler identifikasyonda (Şekil 10 ve 11) geleneksel yöntemle cins düzeyinde tanımlamanın %100 doğru olduğu, ancak tür düzeyinde ise 2 izolatin (ID17E'nin %94 *T. hamatum* ve ID20G'nin ise %97 *T. atroviride* oldukları) farklı bir tür olduğu tespit edildi (Tablo 11 ve Şekil 12). İzolatlardan ID4B ve ID6B %99-100, ID7C %98, ID11C ve ID11D suşları ise %100, ID9A %100 *Hypocrea lixii* ve *Trichoderma aureoviride*, *H. lixii* ve *T. harzianum* suşlarına benzerlik gösterdiği belirlendi. Moleküler olarak analizde suşların *T. harzianum*, *T. hamatum* ve *T. atroviride* şeklinde tanımlamaları yapıldı.

Birçok araştırmacı tarafından çeşitli topraklardan veya kaynaklardan *Trichoderma* türlerinin izolasyonu yapılmıştır. Hermosa vd. (2004) tarafından yapılan çalışmada farklı bölgelerden elde edilen 69 *Trichoderma* biyokontrol izolatu, sekans analizine göre test edilmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre izolatların %50'den fazlası *Trichoderma sect. Pachybasium* olup bunlarında %81'i *T. harzianum* ve *T. inhamatum*, geri kalanı *T. virens* olduğu bildirilmektedir. İzolatların %36 *Trichoderma sect. Trichoderma* grubu içine alınmış olup bunların da %56'sı *T. asperellum*, %24'ü *T. atroviride*, *T. viride* ve *T. koningii* olduğu, geri kalanların (%10) ise *Trichoderma sect. Longibrachiatum* grubunda yer aldığı bildirilmektedir. Suşlarımızın %77'si *Trichoderma sect. Pachybasium* (*T. harzianum* ve *T. hamatum*), geri kalanın ise *Trichoderma sect. Trichoderma* (*T. atroviride*) grubuna girdiği gözlenmektedir.

Wuczkowski vd. (2003) tarafından yapılan çalışmada orman alanlarından izole edilen 46 suşun morfolojik karakterleri ve ITS1- ITS2 sekans analizi sonucuna göre yapılan identifikasyonda 21 suşun *T. harzianum*, 13 suşun *T. cerinum*, 2 suşun *T. hamatum* ve birer adette *T. atroviride* ve *T. koningii* izole edildiği bildirilmiştir. Çalışmada aynı florada farklı *Trichoderma* türlerinin veya haplotiplerinin birlikteliği de bildirilmektedir. Bu sonuç çalışmamızda aynı topraktan izole edilen ve *T. harzianum*

olarak tanımlanan ID11C ve ID11D suşlarının farklı haplotip olduğunu doğruladığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda izole ve identifiye edilen *Trichoderma* spp. suşları, bir dizi karakterizasyon çalışması yapılması planlandı. Bu kapsamda ilk olarak farklı sıcaklıklarda üreme özellikleri incelendi. *Trichoderma* suşlarının 4 ile 42°C arasında, 7 farklı sıcaklıkta üreme yetenekleri ile 48 saatte gelişme hızları araştırıldı. İzolatların tamamının 4 ve 42°C'de üreme göstermedikleri, ancak aynı sıcaklıklarda ortamın nemi korunduğu takdirde fungusların uzun süre canlılıklarını kaybetmedikleri gözlemlendi. Suşların 15 ve 37 °C'lerde üremelerinin yavaş olduğu, diğer test edilen sıcaklıklarda (20, 24 ve 28 °C) ise suşların tümünün iyi gelişme gösterdikleri, 3. günde 9 cm'lik petri kabını kapladıkları tespit edildi (Tablo 12). Optimum gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla üremenin iyi olduğu, 20, 24 ve 28 °C sıcaklıklarda ilk 48 saat sonraki zon çapları ölçüldü. Sonuçlara göre tüm suşlarda, 20°C de gelişme hızı yavaş olarak kaydedilirken, 24°C ve 28 °C'de daha hızlı gelişmenin olduğu belirlendi. Yapılan istatistiksel analizde sıcaklıklar arasında önemli bir farklılığın var olduğu gözlemlendi (ANOVA testi,  $F=18.949$ ,  $p<0.01$ ). Duncan testine göre 24 °C (ort = 7.242) ve 28 °C (ort =6.9) arasında istatistiksel olarak fark olmadığı, 20°C'nin (ort.=4.129) ise daha düşük üreme ortalaması ile diğerlerinden farklı olduğu belirlendi. Suşlardan ID4A, ID20G ve KUEN 1585, 24 °C'de, diğerleri ise 28 °C'de en hızlı üreme gösterdikleri belirlendi. Burmeister'in (2008) yaptığı çalışmada *Trichoderma* sp. suşlarının en iyi gelişme sıcaklığı 24 ve 28 °C olarak bildirmekte olup çalışma sonuçlarımıza benzerlik göstermektedir. Üreme sıcaklığı birçok canlıda olduğu gibi *Trichoderma* suşlarının gelişmesinde de önemli faktörlerden biridir. Optimum üreme sıcaklığını belirlemede elde edilen sonuçlar, bize *Trichoderma* arazi uygulaması yapılacak bölgelerin sıcaklığının, gelişme hızına ve suşların ortama adaptasyonundaki etkinliğinin belirlenmesi açısından önem arz etmektedir. Joshi vd. (2012) Himalaya dağlarında (2500-3000 m yükseklikten) *T. harzianum* ve *T. viride* izolasyonu yaptıkları, elde edilen sonuçlara göre her iki suşunda optimum büyüme sıcaklığının 30°C olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuç ise *Trichoderma*'nın izole edilen bölgenin coğrafik özelliğine göre optimum üreme ısısının değişebileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda test edilen *Trichoderma* spp. türlerinin hiçbir izolatın 15°C'de 7. günde spor oluşturmadığı, ID17E'nin test edilen tüm sıcaklıklarda (4, 37 ve 42°C hariç)

iyi üremesine rağmen, spor oluşturmadığı gözlemlendi. Kontrol suşda ise (*T. harzianum* 1585) 7. günde 15 ve 20 °C’de spor oluşumu gözlemlenmedi. Çalışmamızda 15°C sıcaklık *Trichoderma*’ların üreme hızını etkileyen önemli bir etken olmakla birlikte spor oluşturma sürecini yavaşlattığı, inkübasyon süresi uzadıkça bazı suşların düşük oranda spor oluşturabildikleri belirlendi. 15°C’de, en iyi spor oluşturan suş olarak  $1.6 \times 10^8$  kob/mL olarak ID11D suşu belirlendi. Diğer suşlarda üremenin hızlı olduğu, 20, 24 ve 28 °C’de, 4. günden sonra yeşil sporların belirdiği, 15. gününde en iyi üreme ve spor oluşumunun gerçekleştiği, ortalama spor sayısının  $10^8$  kob/mL olduğu gözlemlendi (Tablo 12). En yüksek Spor sayısı ID11C ve ID11D suşlarında 28 °C’de 15. günde sırasıyla  $7,7 \times 10^8$  ve  $5,37 \times 10^8$  şeklinde gözlemlendi (Tablo 13). Two Way ANOVA testine göre 15, 20 ve 24 °C’de spor üretimi açısından benzerlik, 28 °C’de ise önemli bir farklılık gösterdiği belirlenmiştir ( $P < 0,05$ ). Dolayısıyla 28 °C hem üreme sıcaklığı hem de spor oluşturma sıcaklığı olarak optimum sıcaklık değeri olarak belirlenmiştir. Burmeister’in (2008) çalışmasında *Trichoderma* spp. suşları üzerine sıcaklığın etkinliğinin yanısıra inkübasyon süresinin de spor sayısı üzerine etkili olduğunu bildirmiştir. Optimum spor sayısı bazı suşlarda 7., bazılarında ise 14. günde tespit edilmiştir. Çalışmamızda da benzer sonuçlar gözlemlenmiş olup (ID17E) bütün suşlarda test edilen tüm sıcaklıklarda 15. günde spor sayısı en iyi olarak belirlendi.

*Trichoderma* spp. biyokontrol etkinliği üzerine bir dizi biyotik ve abiyotik faktörler etki etmektedir. Kabul edilen bazı önemli parametreler sıcaklık, su aktivitesi ve pH dır (Kredics vd., 2003). Çalışmamızda *Trichoderma* spp. suşlarında en iyi üreme sıcaklığının, en yüksek spor oluşturma sıcaklığı ve sporların farklı sıcaklıklarda canlılıklarını koruyabilme özellikleri araştırıldı. Çalışmamızda *Trichoderma* spp. türlerinin sporları üzerinde sıcaklık etkisi test edildi. Bu amaçla 45-75 °C arasında 4 farklı sıcaklık belirlendi. Spor solüsyonları ( $1 \times 10^7$  kob/mL) 15 dakika belirlenen bu sıcaklıklarda sıcaklıkla muamele edildiğinde tümünün canlılıklarını 45 °C’de %98, 55 - 65 °C’de ise %30-70 oranında korudukları gözlemlendi. Yalnızca ID11D, ID4A ve ID4B suşları 75 °C’de az sayıda (%3-5 oranında) da olsa canlılıklarını kaybetmedikleri ve sporların tekrar üreyebildikleri belirlendi (Tablo 14).

Küçük ve Kıvanç (2003) tarafından yapılan çalışmada, 7 adet *Trichoderma* sp. suşları 75 °C’de 5 dakika sıcaklık uygulandığında muamele edilmiş, sonuçta yalnızca

6'sında üreme olduğu gözlenmiş olup, çalışmamızla uyumlu bulunmuştur. Biyokontrol suşların uygulama alanlarındaki sıcaklık adaptasyonu ve adapte olmuş suşların devamlılığı için bu veri önem arz etmektedir. Ayrıca suşların sıcaklık toleransının olması formülasyondaki spor canlılığının azalmasında minimuma indirilmesi bakımından önemli olduğu düşünülmektedir.

Meteoroloji genel müdürlüğü raporuna göre Türkiye'de son 43 yılın ortalama toprak sıcaklığı 5 cm'de 16.8 °C, 20 cm ise 15.4 °C olduğu bildirilmektedir. 1996-2013 tarihleri arasında yapılan ölçümlerde 5 cm'de 16.1-16.8 °C, 20 cm ise 15.8-16.1 °C olduğu bildirilmekte olup her yıl toprak sıcaklığının kademeli olarak arttığı gözlenmektedir (URL-5). Toprak mikroorganizmalarının bu artan toprak sıcaklığına adaptasyonlarının belirlenmesi ekolojik süreçte önemli görülmektedir. Dolayısıyla *Trichoderma* gibi biyokontrol amaçlı kullanılacak olan suşların farklı sıcaklıklarda üreme ve spor oluşturma özelliklerinin araştırılması, farklı bölgelerde ve iklim koşullarında biyokontrol suşu olarak kullanılabilme potansiyelini arttırmaktadır. Özellikle yurdumuzun Ege ve Akdeniz bölgeleri gibi yüksek toprak sıcaklığına sahip (örnek; Haziran ayında Manisa'da uzun yıllar ortalaması maksimum 65 °C'de sıcaklık olarak bildirilmiştir (URL-5)) bölgelerimizde bu suşların kullanımında avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Çalışmada izole edilen suşların tümünün 4-65 °C'de, hatta bazılarının 75 °C'de spor canlılıklarını korumuş olmaları, 15-30 °C'de üreyebilmeleri, hem ılık hem de sıcak bölgelerde potansiyel biyokontrol ajan olarak kullanımlarının sağlanması açısından önemlidir. Suşlardan özellikle ID11D (75 °C'de) ve ID11C'nin spor sayılarının iyi olması, hızlı üremeleri ve sporların yüksek sıcaklığa toleranslı olması gibi özellikleri dikkate alındığında biyokontrol suş olma potansiyeline sahip oldukları düşünülmektedir.

Bhat (2009) tarafından yapılan çalışmada, *T. harzianum* formülasyonunda oksijenli koşullarda 90. günde spor sayısı  $1.2 \times 10^7$  olduğu, 180 gün sonra canlılığının ( $5 \times 10^6$ ) koruyabildiği bildirilmektedir. Ramanujam vd. (2010) *Trichoderma*'ların kitlesel üretiminde katı, sıvı ve yarı katı fermantasyon şeklinde farklı metodlar kullanmışlardır. Katı metod yüksek iş yoğunluğu olan bir uygulamadır ve endüstriyel uygulamalar için uygundur. Sıvı fermantasyon pahalı olmayan melas ve maya ekstreli besiyerlerinde derin tank yöntemiyle büyük hacimlerde kullanılan yöntemlerdir. Birçok çalışmada spor üretimi için çeşitli materyaller kullanılmış, bunlar arasında malt, atık çay lifi, pirinç samanı ve



kepeği, süpürge tanesi ve buğday kepeği gibi atık maddelerin başarılı şekilde uygulandığı bildirilmektedir (Mukhopadhyay vd., 1986; Bhai vd., 1994; Gopalakrishnan vd., 2003).

*Trichoderma* spp. suşlarının en uygun ve ekonomik koşullarda üretim şartlarının belirlenmesi ve bol miktarda spor elde edilmesi amacıyla yapılan çalışmada 12 farklı katı substrat ortamı (Tablo 10) test edildi.

Çalışmada katı substrat olarak seçilen materyaller kolay bulunabilecek, atık ürün olarak değerlendirilebilecek materyallerin seçilmesine dikkat edildi. Bu amaçla kullanılabilir birçok materyal olduğunda önemli bir husus olarak gözlemlendi. Buğday kepeği ticari olarak misel üretiminde kullanılan önemli bir karbon kaynağıdır. Malt çimi ise bu karbon kaynağını zenginleştirmek ve mineral bakımından desteklemek adına önemlidir. Yine aynı özelliğe sahip üzüm ve turp gibi atık materyaller hem karbon hem de mineral maddesi içermesi bakımından önemlidir. Hazırlanan karışımların tümünde ID11C suşunun genel olarak iyi ürettiği 7. günde spor sayısı bakımından gramda  $1 \times 10^8$  kob/mL geçtiği gözlenmektedir. Yalnızca 1 no'lu karışımda (buğday kepeği-malt çimi) oluşan bulamaçta yeterli oksijen için gözenek oluşmaması olarak değerlendirildi. Diğer materyallerin tümünde kaba partiküller bulunmakta olup, üremenin her noktasında oksijen yetersizliği yaşanmadığı düşünülmektedir. Test edilen tüm katı substrat ortamlarında *T. harzianum* ID11C'nin iyi ürettiği, spor sayısının 7. ve 15. günler arasında çok fazla değişmediği (15. gün değerleri tabloda verilmedi), optimum spor sayısına 7. günde  $10^7$ - $10^9$  aralığına ulaştığı belirlendi. Değerler birbirine yakın olmakla birlikte en iyi spor oluşturma ortamı 7. karışım (ÜK-SK-BK), olduğu bunu sırasıyla 5. (TA-ÇA), 4. (SPÜK), 3. (ÜK-MÇ), 8. (ÜK-SK-PK), 11(MT-UK-FK) ve 2 (BKÇA) karışımların takip ettiği gözlemlendi (Tablo 15). Katı substrat üzerinde inkübe süresi uzadığında üreme ve spor sayısının belirlenmesi görmek amacıyla 30. günde spor sayımı yapıldı. Ortamların 11'inde de spor sayısının en az  $10^{-1}$  oranında azaldığı, ancak mısır tanesinde ise bu süre zarfında sayı çok az da olsa azalmayıp arttığı gözlenmektedir. Kültür hacminin ise yeterince havalandırmanın sağlanması (oksijen) ve nem oranının korunması şartıyla önemli olmadığı gözlenmektedir. Spor üretimi için seçilecek karışımda buğday kepeği, çay atığı, üzüm kabuğu, salatalık kabuğu ve pirinç kabuğu diğer iyi seçenekler arasında gözlemlendi.

Çalışmada hazırlanan karışımın gözenek miktarı yani partikül büyüklüğü fazla olan kültürlerde daha iyi üreme olduğu, nedeni olarak ise sürekli ve homojen karışımın

olmadığı kültür koşullarında, her noktada fungus gelişebilmesi için gerekli oksijeni sağlayan boşlukların bulunmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Mısır tanesi gibi yapılar hem gözenek oluşturması, hem de uzun sürede metabolize olan karbon kaynağı içermeleri açısından önemli bulunmuştur. Tablo 15’de görüldüğü gibi mısır tanesi tek başına kullanıldığında bile uzun süre karbon kaynağı sağladığı, spor sayısını uzun süre stabil kalmasını sağladığı, dolayısıyla yapılacak çalışmalarda önemli bir hammadde olabileceği belirlenmiştir.

Yapılan istatistiksel analizde ( $P>0,005$ ,  $\chi^2$ : 4.308) ortamlar arasında spor üretimi açısından önemli bir fark olmadığı gözlemlendi. Salatalık kabukları özellikle zengin mineral madde içerikleri açısından besi ortamına önemli katkı sağladığı düşünüldü. Kombinasyonlara genel olarak bakıldığında *T. harzianum* ID11C suşunun üreme ve spor oluşumu süresi, PDA besiyerine göre daha hızlı olduğu gözlemlendi.

Çalışmamızda en iyi üremenin gözlemlendiği beş karışım, 3 farklı dolgu maddesi ve 3 ayrı spor koruyucu ortam kullanılarak toplam 15 farklı parametrede spor canlılığı, oda ısısında ve buzdolabı koşullarında izlendi (Tablo 16). Sonuçlar incelendiğinde üretim ortamlarının spor oluşturmada anlamlı bir fark olmadığı ancak spor canlılığını korumada Kruskal-Wallis testine göre anlamlı bir fark olduğu ( $P<0,05$ ,  $\chi^2$ : 11.654) belirlendi. Çalışmada 3 no’lu (ÜK-MÇ) ortamında (ort 80.74) ve 4 no’lu (SK-PK-ÜK) ortamlarında (ort 75.77) saklama koşullarının en iyi olduğu belirlendi. Çalışmada kullanılan dolgu maddeleri ve koruyucu ortamlarında spor canlılığını korumada anlamlı bir fark olmadığı, ancak oda ısısında ve buzdolabında saklama arasında önemli bir farkın olduğu belirlenmiştir.

Birçok araştırmacı çeşitli substratları kullanarak formulasyon denemeleri yapmıştır. *Trichoderma* formulasyonunda standartlar, minimum spor sayısı  $2 \times 10^6$  kob/mL olması, patojenlerin (*Salmonella*, *Vibrio* veya *Shigella* gibi) kontaminasyonunun olmaması, diğer mikroorganizmaların miktarı  $1 \times 10^4$  kob/mL geçmemesi önerilmektedir. Vermiculit-buğday kepeği formulasyonu (Lewis vd., 1991), buğday unu-kaolin (Prasad ve Rangeswaran, 1998), alginat-buğday unu (Fravel vd., 1985) ve sıkıştırılmış çamur (Jeyarajan, 2006) bunlardan bazılarıdır. Panahian vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada 6 organik substratı test edilmiş, maksimum sayıda spor oluşturan ortam olarak dövülmüş mısır tohumu ile melas ortamı önerilmekte ve sporların iki kat daha fazla olduğu bildirilmektedir.

Jeyarajan vd. (1994) tarafından yapılan *Trichoderma* formulasyonunda, talk pudrasını 1:2 (w/w) oranında ve %8 nemde kullanmış, spor canlılığını 3-4 ay korunduğunu gözlemlemiştir. Jayaraj vd. (2006) tarafından yapılan formulasyon çalışmasında talk pudrası ve bentonit içeren 6 farklı ortamı saklama koşulları olarak test edilmiştir. Tüm karışımların oda ısısında *Trichoderma* sporlarını 9 ay sakladığını, ancak 6. ayın sonunda sporlarının %50'sinin azaldığını bildirmektedir.

Dolgu maddeleri fungal sporların muhafazasında önemli rol oynamakla birlikte en sık kullanılan bentonit, zeolit ve talk pudrası arasında spor canlılığını koruma açısından anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Dolgu maddesi seçiminde ekonomik olarak uygun olanın seçilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

*Trichoderma* suşlarının ekstrasellüler metabolitlerinin etil asetat ekstraksiyonları, antimikrobiyal aktiviteleri açısından test edildi (Tablo 17). Tüm ekstraktların Gram negatif bakteri olan *Serratia marcescens* ile *Vibrio* sp.'ye nispeten daha yüksek, Gram pozitif basil olan *Listeria monocytogenes*, Gram pozitif sporlu basil olan *Bacillus cereus* ve *B. subtilis*'e daha düşük düzeyde antibakteriyel etkinliğe sahip oldukları belirlendi. ID17E suşu tarafından üretilen metabolit insan patojeni olan *Staphylococcus aureus*'a karşı, ID4A, ID4B ve ID6B suşlarının ürettiği metabolitlerin ise fırsatçı patojen olan *Mycobacterium smegmatis*'e karşı daha yüksek etkili olduğu gözlemlendi. Çalışmada etil asetat ekstraktlarının maya mantarlarına ve fungal patojenlere karşı etkinlikleri gözlenmedi. Yapılan bazı çalışmalarda antimikrobiyal madde eldesinde kullanılan besiyeri ve çözücülerin önemli olduğu, metanol ekstraksiyonunun hegzan ve etil asetat (Febles vd., 1995), kloroform ekstraksiyonunun metanol ve benzenden (Sastri ve Rao, 1994) daha etkili olduğu bildirilmektedir. Bu durumda suşların ekstrasellüler maddelerinin antifungal etkiye sahip olup olmadığını belirlemek için farklı besi ortamları ve farklı çözücüler (metanol, kloroform) kullanılarak da ekstraktların test edilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir. Çalışmamızda etil asetat ekstraksiyonu kullanılmış olup farklı çözücülerle tekrar edildiğinde antimikrobiyal etkinliğinin farklı olabileceği düşünülmektedir. *Trichoderma* sect. *Trichoderma* içinde yer alan *T. asperellum* genel olarak *T. atroviride*'den daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermesine rağmen, biyokontrol olarak kullanılan *T. atroviride* hücre duvarı parçalayan enzim salgılaması ve patojenlerin sporulasyonuna karşı daha etkili oldukları bilinmektedir (Sanz vd., 2002; Hermosa vd., 2000).

Yapılan bir başka çalışmada 317 Bazidiomycetes izolatu 9 farklı mikroorganizmaya karşı etkinlikleri test edilmiş ve benzer sonuçlar alınmış, en duyarlı mikroorganizma olarak *B. subtilis* bildirilmiştir (Suay vd., 2000). Keszler vd. (2000) ve Kiss vd. (2000)'in yaptıkları çalışmalarda *T. harzianum* ve *T. atroviride* suşlarının antibiyotik ürettikleri bildirilmektedir. Vizcaino vd., (2005)'nin çalışmasında biyokontrol ajan olarak seçilen 24 *Trichoderma* izolatının (*T. sect. Trichoderma*, *T. sect. Pachybasium* ve *T. sect. Longibrachiatum*) metanol ekstraksiyonları antimikrobiyal aktivitesi bir dizi mikroorganizmaya (7 bakteri, 7 maya ve 6 filamentöz fungusu karşı) karşı, her üç seksiyonunda antimikrobiyal aktivitesi var olduğu belirlenmiştir.

Çalışmalarında PDA ve CYS80 (Corn yeast sucrose) olmak üzere iki farklı besiyerini kullanmış, ancak aralarında anlamlı bir farkın olmadığı gösterilmiştir. *T. sect. Pachybasium* (*T. harzianum*) seksiyonun antibakteriyel ve antifungal, *T. sect. Longibrachiatum* seksiyonunda maya mantarlarına etkili suş sayısı daha fazla olduğu bildirilmektedir. Çalışmada en az duyarlı bakteri *P. aeruginosa*, en duyarlı bakteri *B. subtilis*, en duyarlı maya mantarı *Candida rugosa*, en duyarlı küf mantarı *Aspergillus fumigatus* ve *B. cinerea* olarak belirtilmektedir (Vizcaino vd., 2005). Liouane vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada *Trichoderma* sp. metanol ekstraktının *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* karşı antibakteriyel aktivitesi olduğu ancak antifungal aktivite taşımadıkları bildirmişlerdir. Tarus vd. (2003) tarafından yapılan çalışmada, Kenya'da çay bitkisinde patojen olan *A. mella*, maya ve *Mucor*'un da dahil olduğu funguslara karşı *Trichoderma*'nın etkisi üzerine çalışmalar yapmışlar, etken madde olarak fenil etanol, trisol, 6-fenil prion ve sorbisilin bildirmişlerdir. Test edilen 6-fenil prion'un bir dizi mikroorganizmalara (*Paecilomyces vericoti*, *Penicilium notatum*, *Nematospora coryli* gibi fungusları ve *Bacillus brevis*, *B. subtilis*, *Sarcinia lutea* ve *Enterobacter dissolvens* gibi bakterilere) karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Çalışmada etil asetat ekstraktlarının bitki patojeni funguslara etkili bulunmaması, bu patojenlerin inhibisyonunda fenolik bileşiklerle değil, başka etki mekanizmaları yoluyla olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada dual tekniği kullanılarak saprofit ve patojen bir dizi fungal etkenlere karşı *Trichoderma*'ların etkinliği test edildi (Tablo 18). *Trichoderma* suşlarının test edilen saprofit ve patojenlere etkili olduğu, bu etkinliğin türlere göre değiştiği belirlendi. Bitki patojeni türlere olan etkinliği oldukça iyi bulunmuş olup en yüksek inhibisyon *Botrytis*

*cinerea*'ya karşı gözlendi (Şekil 14 ve 23). Etkinlikleri %70-83 arasında belirlenen sırasıyla ID17E, ID9A, ID7C, ID11C, ID11D, ID20G suşlarının *B. cinerea*'ya karşı biyokontrol ajan olabileceği düşünüldü (Tablo 18). *Sclerotonia sclerotium*'a karşı tüm suşların %50'nin üzerinde inhibisyon oluşturduğu, en yüksek etkinliğin %75-79 aralığında sırasıyla ID11C, ID17E, ID11D ve ID20G suşlarında olduğu dolayısıyla *S. sclerotium*'a karşı kullanılabilmesi belirlenmiştir (Şekil 15 ve 23). *Trichoderma* suşlarının tamamının *S. sclerotium* ve *B. cinerea* karşı inhibisyon etkinliği 4. günden itibaren maksimum değerlerde göstermesi, 7. ve 15. gün fazla değişmemesi dikkat çekici olduğu düşünülmektedir. *Trichoderma* suşlarının *R. solani*'ye inhibisyon etkinliği 7. ve 15. günlerde en yüksek olmakta, etkinlik %69-77 aralığında sırasıyla en yüksek inhibisyon sırasıyla ID17E, ID11D, ID11C ve ID20G gözlenmiş ve *R. solani*'ye karşı kullanılabilmesi düşünülmektedir (Şekil 16 ve 23). Bitki patojeni funguslara karşı kullanılabilme potansiyeli yüksek olan suşların ID11D, ID11C, ID20G ve ID17E'nin olduğu görülmektedir.

İnsanlar için fırsatçı patojen olabilen *A. niger*'in 4. gün etkinliklerinin pek önemli olmadığı ancak zamanla arttığı 7. ve 15. günde benzer olarak tüm suşların istilaya uğradığı gözlemlendi. Depolarda fırsatçı patojen olabilen *A. flavus* suşlarına karşı ise 4. günde %15'in altında 7. günde ise maksimum %45'lerde olduğu, inkübasyon süresi arttıkça etkinliğin arttığı, özellikle ID20G, ID11C, ID11D ve ID17E'nin kullanılabilmesi gözlemlendi (Şekil 18 ve 23).

Antal vd. (2000) yaptıkları çalışmada 360 *Trichoderma* suşu izole edilmiş, 4'ü *T. atroviride*, *T. harzianum* ve *T. viride* olarak tanımlanmıştır. Bu suşların 5°C'de minimal sıvı medyum ve yeast ekstrakt agar da iyi geliştiği, dual kültürde 10 °C'de *R. solani* ile *Fusarium oxysporum*'a karşı etkili oldukları bildirildi. Lone vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada, ceviz (*Juglans regia* L.) ağacının rizosferinden bir grup fungus (*T. harzianum*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium sphaerospermum* ve *Fusarium oxysporum*) izole etmişler ve *T. harzianum* izolatlarının diğer funguslar üzerine etkinliğini dual kültür tekniği ile test etmişlerdir. Fungusların misel büyümesini *Aspergillus niger*'de %75, *Cladosporium sphaerospermum*'da %72.2 ve *Fusarium oxysporum*'da %25 oranlarında inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Biyokontrol çalışmalarında kullanılan entomopatojen (*Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* ve *Metarhizium anisopliae*) suşlara karşı olan etkinliğe bakıldığında ise önemli olabilecek düzeyde inhibe etmedikleri belirlendi. İlginç olarak da suşların miselleri birbirine karışmadıkları, muhtemelen entomopatojen suşlar tarafından salgılanan toksinler nedeniyle *Trichoderma* suşlarının teması engellendiği görüldü. Böcek patojeni suşlar petride yayılma yerine yukarı doğru büyüdükleri, dolayısıyla tabloda görünen değerlerden daha az etkilendiği resimlerde de görülmektedir (Tablo 18, Şekil 19-22).

Bu çalışmada dual tekniği sonucunda *Trichoderma* spp. suşları muhtemelen besin rekabeti, salgıladıkları bazı kimyasallar ve özellikle istilacı özellikleriyle konak patojenin üremesini engelledikleri düşünülmektedir.

Çalışmada hem saprofit hemde bitki patojeni olan bir dizi patojene karşı inhibisyonuna bakıldığında tüm suşların önemli derecede etkinliğinin olduğu gözlemlendi. Tüm patojenleri %70'lerde inhibe etmesi bakımından ID11C, ID11D, ID20G potansiyel kontrol ajanı olarak seçilebilir. Belirtilen bu suşların böcek patojeni fungusları yayılmasını engellemesine rağmen istila edememeleri, yararlı fungusların korunması açısından önemli bulunmuştur.

Çalışmada *Trichoderma* suşlarının bitki patojenlerinin gelişmesini inhibe eden etkenin uçucu madde olup olmadığının belirlenmesi için yapılan denemede *S. sclerotiorum* kullanılmıştır (Tablo 19). Suşlardan ID17E normal şartlarda da spor oluşturmamaktadır, dolayısıyla bu ortamda da oluşturmamıştır. *S. sclerotiorum* suşu ise test edilen tüm *Trichoderma* suşlarının ürettiği uçucu maddelerden hem üremeleri, hem de sklerotia oluşturmaları açısından etkilendikleri, kontrolde ise bolca sklerotia oluşturduğu belirlendi. ID4B, ID17E ve *T. harzianum* 1585 hariç tümünde üremeleri kontrole göre daha az olduğu, dolayısıyla ortamda oluşan metabolitlerin hem *Trichoderma* hemde *S. sclerotiorum* gelişimini etkilenmiş olduğu bildirilmiştir. ID4B, ID11D, ID20G ve kontrol suşlarının 7. günde spor oluşturmadıkları, ancak üremelerinin iyi olduğu belirlendi. *Trichoderma* ID6B, ID11C, ID11D ve ID20G suşları *S. sclerotiorum* gelişmesini en çok etkileyen suşlar olmasından dolayı uçucu madde üretimi açısından en güçlü suşlar olduğu kabul edildi. Sonuç olarak *Trichoderma*'ların antifungal uçucu madde ürettikleri, patojenlerin üreme hızlarını ve sklerotia oluşturmalarını engellediği sonucuna varıldı.

Amin vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada 6 *Trichoderma* izolatının *F. oxysporum*, *R. solani*, *Sclerotia rolfsii*, *S. sclerotiorum*, *Colletotrichum casici*, *Helminthosporium oryzae*, *Alternaria brassicicola* türlerine karşı uçucu metabolit üretimi özellikleri incelenmiştir. Çalışmada *T. viride* (Tv-1) suşu, *F. oxysporum*'un misel gelişmesinin etkileyen en iyi suş olduğu, oluşturduğu uçucu metabolitlerin test edilen tüm patojenlerin misel gelişimini etkilediği, özellikle *S. sclerotium* ile *S. rolfsii*'nin sclerotium gelişimini maksimum etkilediği bildirilmiştir. *Trichoderma* türleri uçucu bileşikler üreterek patojenlerin yayılmasını, canlılığını, sklerotia oluşumunu ve misel büyümesini önemli ölçüde engellemektedir.

Saprotik bir fungus olan *Trichoderma*, biyokontrol ajan olarak en iyi adaylar arasında yer alır. Vey vd. (2001) tarafından yaptıkları çalışmada *Trichoderma*'lar etilen, hidrojen siyanit, aldehitler ve ketonlar gibi uçucu sekonder metabolitlerin geniş bir çeşidini üreterek bitki patojenlerine karşı etkinlik gösterdikleri bildirildi. Kamala ve Indira (2011) yaptıkları çalışmada, *Trichoderma* izolatları tarafından üretilen uçucu ve uçucu olmayan bileşiklerin *Phytophthora aphanidermatum* üremesini engellediği, misel gelişimini baskıladığı bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda *Trichoderma* ürettiği antimikrobiyal metabolitlerin fungal patojenin geniş bir grubuna (*Fusarium oxysporum*, *R. solani*, *P. aphanidermatum*, *Curvularia lunata*, *Bipolaris sorokiniana*, *Colletotrichum gloeosporoides*) karşı etkili olduğu bildirilmektedir (Xiao-Yan vd., 2006; Zivkovic vd., 2010). Calistru vd. (1997) tarafından yapılan çalışmada, *Trichoderma*'nın *A. flavus* ve *Fusarium moniliforme*'nin morfolojik özelliğini değiştirdiği makroskopik ve mikroskopik olarak gözlemlenmiştir. Kamala ve Indira (2011), yaptığı çalışmada inkübasyonun 7. gününden sonra 4 izolatta (T11, T73, T89 ve T105) sekonder uçucu bileşikleri maksimum düzeyde ürettiği, 5 izolatın (T70, T73, T83, T89 ve T105) ise uçucu olmayan madde üreterek patojenin gelişmesini engellediği bildirilmiştir.

Chakravarthy vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada izole edilen 26 adet *Trichoderma* spp. izolatının *Rhizoctonia* patojenini %62-78 oranında büyümesini inhibe ettiği, *T. atroviride* (TA1), *T. harzianum* (M10P) ve *Trichoderma reesei* (TK) suşlarının patojene karşı %77.7 oranla en yüksek inhibisyonu sağladığı bildirildi. Aynı zamanda bu *Trichoderma*'lar üç fungusit (organofosfat insektisit olan Monocrotophos, klorinat insektisit

olan Endosulfan ve bitkisel pestisit olan Azadirachtin) ile 7 pesticide karşı test edilmiş, genel olarak bu etkenlere karşı dirençli oldukları bildirilmiştir.

Ürün verimini ve ekonomik kazancı maksimuma çekmek amacıyla tarımda çeşitli fungusitler kullanılmaktadır. Bu fungusitlerin bitki patojeni funguslara etkili olması, diğer yararlı mikroorganizmaları etkilememesi önem arz etmektedir. Bitki patojeni funguslarla kimyasal mücadelede en sık önerilen Captan, Dikozin ve Cuprenax fungusitlerini içeren besiyeri ortamında *Trichoderma* spp.'lerin büyüme ve spor oluşturmaları 7 gün boyunca izlendi (Tablo 20, Şekil 24-27). Suşların ticari kullanım dozunun altında önemli derecede etkilenmedikleri, (2500-10000) µg/mL dozlarında bariz bir etkilenmenin olduğu, en az etkilenen suşların ise ID11C, ID11D, *T. harzianum* 1585 ve ID4A oldukları belirlendi. Suşların üremeye ve spor oluşturma üzerine Cuprenax'ın en fazla, Dikozin'in ise en az etkili olduğu gözlemlendi. Fungisitlerden en az etkilenen suşlar Captan için ID11C, Dikozin ve Cuprenax için ID11C ve ID11D olduğu tespit edildi. En duyarlı suşun ID20G olduğu, fakat test edilen en yüksek fungusit dozunda bile canlılığını kaybetmediği gözlemlendi.

Bu sonuçlar ID11C ve ID11D'nin fungusit toleranslarının yüksek olduğunu, dolayısıyla fungusitlerle birlikte kullanılabileceğini göstermektedir.

Mohiddin ve Khan (2013) yaptıkları çalışmada *Trichoderma harzianum*'un maksimum inhibisyon konsantrasyonu Captan ve Mancozeb için sırasıyla 1000 µg/mL ve 755 µg/mL, *T. virens* üzerine olan inhibisyon konsantrasyonu ise 875 µg/mL ve 675 µg/mL bildirilmektedir. Khan ve Shahzad (2007) yaptıkları çalışmada çeşitli fungusitlerin (Benomly, Topsin-M, Carbendazim ve Cuprocaffro) *Trichoderma* türleri üzerine 1, 10, 100, 1000 ve 10000 ppm düzeylerinde etkilerini çalışmışlar, *T. harzianum*'un fungusitlerin düşük dozunda ürediği, 100-10000 ppm aralığında üremelerinin inhibe olduğu bildirmektedir. *Trichoderma* türlerinin fungusitlere karşı doğal bir dirence sahip oldukları ya da fungusitlerin, direncini indükleyebildikleri bildirilmektedir (Omar, 2006).

Sarkar vd. (2010) yaptıkları çalışmada fungusitlerin, insektisitlerin ve pestisitlerin etkilerini belirlemek için yaptıkları bir çalışmada yedi sistematik fungusit, dört biyopestisit ve iki kontakt pestisiti *T. harzianum*'a karşı test etmişlerdir. Fungisit oranı artışıyla birlikte, mantarların inhibisyonunuda kademeli olarak arttığı görülmüştür. Sistematik fungusitler (Tablo 3) arasında en toksik olan Hexaconazole olduğu, sırasıyla Propiconazole ve Triflumizole bunu izlediği bildirilmiştir.



Kontakt fungusitlerin toksitesi sistemik fungusitlerin etkisinden daha düşük olduğu, bakır hidroksit ve bakır oksiklorid sonuçları birbiriyle uyumlu olup düşük dozlarda inhibisyonun olmadığı bildirilmektedir. Test edilen insektisitlerden Quinalphose ve Dicofol 10 ppm dozun altında bile toksitesi yüksek belirlenmiştir.

McLean vd. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada *T. harzianum* C52 suşunu, soğanlarda beyaz kök çürükçül etkeni olan *Sclerotium cepivorum*'a karşı kullanımını araştırılmıştır. Bu amaçla *T. harzianum*'un bu patojen için en sıklıkla kullanılan sekiz fungusit (benomil, proksimidon, triadimenol, captan, diklofluanid, tebukonazol, triam ve mancozeb) ile olan etkileşimi in vitro şartlarda soğan bitkileri üzerinde test edilmiştir. Sonuçta *Trichoderma harzianum* sporları Thiram, Mancozeb, Tebuconazole aşırı duyarlı olduğu, Pyrocymidone ve Captan'a ise en az duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Yapılan bir çok çalışmada *Trichoderma*'ların antimikrobiyal aktiviteleri düşük belirlenmesine rağmen iyi bir hücre duvarı parçalayıcı (kitinaz, proteaz ve glukonaz enzim türleri) özelliklerinin var olabileceği, hem laboratuvar, hem de arazi şartlarında agresif mikoparazitlere karşı etkili bir biyokontrol suş olarak kullanılabilirler gösterilmiştir (Perez De Algaba vd., 1992; Hermosa vd., 2000; Castillejo vd., 2001; Santorum vd., 2001; Sanz vd., 2004).

1960'larda Mandels ve Reese, *Trichoderma* mutantlarından elde edilen selüloz ile ilgili ilk raporu sunmuşlardır (Mandels ve Reese, 1960). Ali ve Akhand (1992) tarafından yapılan bir çalışmada optimum koşullar altında su sümbülü üzerinde gelişen mezofilik *Trichoderma* izolatları tarafında selüloz üretimi çalışılmıştır. Biyokontrol suşlar, fungal patojenlerin başlıca hücre duvarı bileşenleri olan kitin, selüloz ve protein yapılarını hidroliz ederek gelişmelerini engellenmektedir (Carsolio vd., 1999). Selüloz, birçok proteinden oluşmuş multienzim kompleksidir ve selülozun glikoza dönüşümünü katalizler. Ahmad vd. (2003) yaptıkları çalışmada *Trichoderma harzianum* selüloz üretiminde en uygun karbon kaynağının CMC olduğunu bildirmiştir.

Çalışmamızda *Trichoderma* spp. suşlarında selüloz ve kitinaz aktivite varlığı düzeyi araştırılmıştır. Bu amaçla karboksimetil selüloz (CMC) kullanılarak selüloz aktivitesi test edildi. Agar besiyerinde (CMC) en hızlı gelişen ID11D, ID11C ve en az gelişen ID20G suşları belirlendi. Enzim aktivitesinin hesaplanması için glukoz standart grafiği oluşturuldu (Şekil 28).

Kantitatif ölçüm için yapılan sıvı kültürde (%2 CMC) üretilerek 5.-9. günler arasında her gün örnekleme yapılarak kantitatif aktiviteleri bakıldı. Selüloz aktivitesi kültür süresinin uzatılmasıyla paralel artışı, çoğu suşta 7. gün ideal olduğu, 9. günde azalmanın başladığı belirlendi. Ancak ID11D'nin en yüksek aktivitesi 7. günde 0.017 U/mL tespit edilirken, ID11C'nin 0.015 U/mL olarak belirlendi (Şekil 29).

Cianchetta vd. (2010) yaptıkları çalışmada 300 *Trichoderma* suşu selüloz aktivitesi açısından taranmış çalkalamalı flask yöntemiyle 5 suşun selüloz aktivitesi gösterdiği, RUT-30 suşunun hiper aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir. Hindistan'da yapılan bir çalışmada 42 *Trichoderma* spp. izolatının özellikle 5 tanesi *Sclerotium rolfsii* ve *Fusarium ciceri* üzerine potansiyel antagonistik etkili oldukları, bu etkinliğin özellikle kitinolitik aktivite ile hücre duvarı parçalanmasıyla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Anand ve Reddy, 2009).

Kitinaz, fungusların kitin metabolizmasından sorumlu bir enzimdir. *Trichoderma* türlerinin kitinolitik enzim üretimi, değişik bitki patojeni fungusların sebep olduğu bitki hastalıklarının kontrolünde bir etken olarak uzun zamandır tanımlanmıştır. Kitinaz ve kitinolitik organizmalar gıda bozulma etkeni patojenik funguslara karşı biyokontrolde son yıllarda büyük dikkat çekmektedirler (De la Vega vd., 2006; Choquer vd., 2007).

Kitinolitik aktivitesi güçlü olan suşların patojenlerine karşıda güçlü kitinolitik aktivite göstermesi nedeniyle önemlidir. *Trichoderma* suşlarında, koloidal kitin kullanılarak kitinaz (Şekil 30 ve 31) aktiviteleri test edildi. Hepsinde kitinolitik aktivitenin iyi olduğu, 4. günde (96 saat) zon çaplarının 60-82 mm aralığında ölçüldüğü, en yüksek aktivitenin sırasıyla ID11C, ID11D, ID17E ve *T. harzianum* 1585 suşlarında var olduğu belirlendi. Kamala ve Indira (2011) yaptıkları çalışmalarında, en iyi kitinaz aktivitesi gösteren suşların 22.6-81 mm ve en iyi selüloz aktivitesi gösteren suşların 11-62 mm şeklinde olduğunu bildirmişlerdir. *Trichoderma* endokitinaz *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Botrytis cinerea* ve toprak kaynaklı patojen olan *Rhizoctonia solani*'ye karşı güçlü antifungal aktivite gösterdikleri bildirildi (Lorito vd.,1998). El-Katatny vd. (2000) tarafından yapılan çalışmada 24 *Trichoderma* spp. izolatının kitinaz ve  $\beta$ -1-3 glukanaz enzim aktiviteleri bakılmış, farklı kültür koşulları test edilmiştir. *Trichoderma harzianum*'dan hazırlanan kitinaz ve glukanaz aktivitesine sahip kültür filtratlarının taze ve kurutulmuş *Sclerotium rolfsii* misellerini hidroliz ettiğini, *Sclerotium rolfsii* büyümesini ise

%61.8 oranında engellediği bildirilmiştir. Sharaf vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada bir dizi fungusları kitinolitik aktivite yönünden kalitatif ve kantitatif olarak taramış ve *T. viride*'nin (48 saatte 46 mm zon çapı) diğer funguslardan çok daha güçlü kitinolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda kantitatif kitinaz üretimini belirlemek için sıvı kültürde test edilmiş, Tüm suşların kitinolitik aktiviteleri tespit edildi. En yüksek aktivite 7. günde ID11D'nin 0.022 U/mL ve 9. günde ID11C'nin 0.023 U/mL ölçüldü (Şekil 33). Genel olarak 5. günden sonra aktivitenin yükseldiği belirlendi. ID17E'nin ise en yüksek aktivite 5. günde 0.020 U/mL belirlenmiş ilerleyen günlerde aktivite azaldığı görülmüştür. Tüm bu sonuçlara bakıldığında antagonist etkinliği yüksek ID11C ve ID11D suşlarının, patojen funguslara karşı hücre duvarını degrade edici enzimler salgılayarak etki ettiği düşünülmektedir.

*Trichoderma*'ların mısır tohumu çimlenmesi üzerine olan etkinliği iki suшта test edildiğinde 4. günde çimlenen mısır sayısı *Trichoderma* uygulananlardan daha fazla olduğu ID 11C de 7. günde %84, ID20G'de %76 kontrolde ise %67 olduğu gözlemlendi (Tablo 23). Dördüncü hafta sonunda ise ID11C'de %100, ID20G'de %98, kontrolde ise %93 başarı elde edilmiştir. Bu sonuçlar göstermektedir ki *Trichoderma*'ların tohum çimlenmesi üzerine önemli bir etki oluşturmaktadır.

Şekil 34'te görüldüğü gibi *Trichoderma* uygulanan tohumlarda kök gelişiminin uygulanmayana göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Kontrol ile *Trichoderma* uygulanan tohumların çimlenmesinden sonra alınan kök ağırlıklarına bakıldığında da net olarak ortaya çıkmaktadır.

Özbay vd. (2004) yaptıkları çalışmada domates bitkisinde Plantshield, T22 ve T95 *Trichoderma* suşlarıyla yaptıkları çalışmada, tohumlarının çimlenmesi üzerine kontrole göre Plantshield'in %17 başarıyı arttırdığı, diğer iki suş arasında anlamlı bir fark olmadığı, ancak kök gelişimi üzerine tüm suşların kontrole göre etkili olduğu bildirilmiştir. Lo ve Lin (2002) tarafından Tayvan'da zirai ürünlerin rizosfer toprağından ve rizoplanından, bir dizi *Trichoderma* türleri izole edildi. Salatalık ve kabakların kök gelişimi üzerine yapılan çalışmada, bazı *Trichoderma* türlerinin salatagillerin kök gelişimini önemli şekilde etkilediğini bildirmişlerdir. Seralarda yapılan deneylerde *Trichoderma* türlerinin bazı suşları %21-61 arasında fide uzunluğunu, %85-%209 yaprak alanını, %27-38 ve kök kuru ağırlığını ise %38-62 oranında arttırdığı gözlemlenmiştir. Acı kabak fidelerinde yapılan

uygulamadan 15 gün sonra alınan sonuçlara göre *Trichoderma* türleri ile muamele edilen bitkilerde yaprağın mg/cm<sup>2</sup> alandaki klorofil miktarını arttırdığı bildirilmiştir.

Datnoff ve Pernezny (2001) tarafından sera ve arazi koşullarında domates fideleri ile yapılan çalışmada *Trichoderma* spp.'nin bitki büyüme ve gelişmesini arttırdığı bildirilmiştir. Araştırmada domates fidelerinin gövde kalınlığını %10-13, yaprak alanını %7-21, taze ağırlığı %25-38, kök taze ağırlığını ise %50 oranında arttırdığı bildirilmiştir.

Yapılan bir sera denemesinde Eskişehir çevresinden izole edilmiş *T. harzianum* T8 izolatının 10<sup>7</sup> kob/mL'lik dozu, *Fusarium moniliforme* ile inokule edilmiş mısırdaki %81.3, *T. harzianum* T20 izolatının ise *F. oxysporum* ile inokule edilmiş domates ve fasulyede sırasıyla %52.1 ve %74.3 oranlarında hastalıklar üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. T8 ve T20 izolatlarının artan dozlarının, bitkilerin boy uzunluklarını kontrollere göre daha fazla arttırdığı, kuru ve yaş madde ağırlıkları üzerinde de etkili olduğu gözlenmiştir (Küçük, 2000).

Çalışmada, hızlı gelişen, bolca sporlanan, geniş sıcaklık aralığında üreyebilen, ısı toleransı yüksek olan, kitinaz ve selülaz gibi bazı enzimatik aktiviteleri iyi olan ve de en önemlisi bitki patojenlerine karşı etkili ancak yararlı bakteri ya da funguslara karşı etkisi olmayan *Trichoderma* suşların biyokontrol preparatı olabilme potansiyeli yüksek varsayıldı.

## 5. ÖNERİLER

*Trichoderma* izolatlarının bölge topraklarından daha fazla sayıda izolasyonu, karakterizasyonu ve biyokontrol potansiyellerinin araştırılması gerekmektedir.

Çalışmada dual kültür tekniğinde inhibisyon yüzdesi yüksek olan suşların patojenlere karşı sera ve arazi denemelerinin yapılması gerekmektedir.

Kimyasal fungusite karşı toleranslı bulunan suşların fungusitlerle kombine edilerek etkinlik düzeylerinin belirlenmesi ve bu suşların fungusitlerden morfolojik ve moleküler olarak etkilenme düzeyleri araştırılmalıdır. Ayrıca diğer farklı fungusit gruplarında suşlar üzerine olan etkileri araştırılmalıdır.

Aflatoksin üreten (*Aspergillus flavus* gibi) suşlara karşı etkinliği yüksek bulunan suşların *in vivo/in vitro* şartlarda aflotoksin üretimini engelleme düzeyi detaylı çalışılmalıdır.

*Trichoderma* spp. suşlarının uçucu metabolit ürettikleri yapılan deneylerle belirlenmiş ve bu metabolitler *S. sclerotium* büyümesini ve sklerot oluşumunu engellemiştir. Diğer bitki patojenlerine karşıda test edilmelidir. Uçucu ve uçucu olmayan metabolitlerin karakterizasyonu ve belirlenmesi için yeni çalışmalar yapılmalıdır.

Selülaz ve kitinaz üretiminin katı ve sıvı fermantasyon koşullarında optimize edilmeli ve enzim karakterizasyonu yapılmalıdır. *Trichoderma*'lar üretilen diğer hücre duvarı parçalayıcı enzimlerinde çalışılması gerekmektedir.

*Trichoderma* spp. suşlarının bitkilerde biyotik (patojen fungus ve bakteri) ve abiyotik stres (tuzluluk, sıcaklık, kuraklık vb.) koşullarında meydana getirdiği değişimler fizyolojik parametreler çerçevesinde detaylı olarak çalışılmalıdır.

Biyolojik etkinliği yüksek bulunan suşların farklı katı substrat ortamlarında daha büyük miktarlarda üretimi çalışılmalı ve optimize edilmelidir. Ayrıca kullanılan evsel atıkların çeşidi genişletilerek, atıkların değerlendirilme alanı oluşturulması için çalışmalar yapılmalıdır.

Sporların ticari kullanımını için formulasyon çalışmaları geliştirilmeli ve raf ömürlerinin belirlenmesi üzerine çalışmalar yapılmalıdır.

## 6. KAYNAKLAR

- Abebe, H., 2002.** Potential of entomopathogenic fungi for the control of *Macrotermes subhyalinus* (Isoptera: Termitidae), Ph.D. thesis, Addis Ababa University, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ethiopia, 161p.
- Agrawal. T. and Kotasthane, A.S., 2012.** Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chattisgarh in Central India. Springer Plus, (1), 73.
- Ahmad, S., Qurrat-ul-Ain N., Aslam, S., Naeem, Rahman, S. and Jamil, A., 2003.** Induction of Xylanase and Cellulase genes from *Trichoderma harzianum* with different carbon sources. Pak. Jour. Biol. Sci., 6(22), 1912-1916.
- Aksoy, U., ve Altındışli, A., 1998.** Ekolojik (Organik, Biyolojik) Tarım. Ekolojik Tarım Organizasyonu Derneği, 125s, İzmir.
- Alexopoulos, C. J., Mims C. W. and Blackwell, M., 1996.** Introductory Mycology (4th edition). John Wiley & Sons, New York. 880 pages, ISBN: 978-0-471-52229-4.
- Alfano, G., Ivey M. L. L., Cakir, C., Bos J. I. B., Miller, S. A., Madden, L. V. and Hoitink, H. A. J., 2007.** Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. Phytopathology, 97(4), 429-437. DOI: 10.1094/Phyto-97-4-0429.
- Ali, M.S. and Akhand, A.A., 1992.** Cellulase from *Trichoderma* isolate. Jour. Basic Microbiol., 32(4), 259-268.
- Altomare, C., Norvell, W.A., Bjorkman, T., and Harman, G.E., 1999.** Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Applied and Environmental Microbiology, 65(7), 2926-2933.
- Amin, F., Razdan, V. K., Mohiddin, F. A., Bhat, K. A. and Sheikh, P. A. 2010.** Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens in-vitro. Journal of Phyto 2(10), 34–37.
- Anand, S. and Reddy J., 2009.** Biocontrol potential of *Trichoderma sp.* against plant pathogens. Intl. J. Agri. Sci., 1( 2), 30 – 39 .
- Antal, Z., Manczinger, L., Szakacs, G., Tengerdy, R. P. and Ferenczy, L. 2000.** Colony growth, in vitro antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species. Mycological Research, 104, 545-549. DOI: 10.1017/S0953756299001653.

- Aziz, A. Y., A. H. Foster, C. P., 1993.** Fairhurst: Extracellular enzymes of *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma polysporum* and *Scytalidium lignicola* in relation to biological control of dutch elm disease. *Arboric J.* 17, 159–170.
- Bae, H., Roberts, D. P., Lim, H. S., Strem, M. D., Park, S. C., Ryu, C. M., Bailey, B. A. 2011.** Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(3), 336-351. DOI: 10.1094/Mpmi-09-10-0221.
- Balsubramanian, N., 2003.** Strain improvement of *Trichoderma* spp. by protoplast fusion for enhanced lytic enzymes and biocontrol potential. Ph.D., Thesis, University of Madras, (Haran, Schickler, & Chet, 1996) Chennai, India.
- Barak, R., Elad Y., Mirelman, D. and Chet, I., 1985.** Lectins - a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium-rolfsii*. *Phytopathology*, 75(4), 458-462. DOI: 10.1094/Phyto-75-458.
- Belisario, A. and Corazza, L. 1996.** First report of *Sclerotium rolfsii* on Juglans in Europe. *Plant Disease*, 80(7), 824-824.
- Benitez, T., Rincon, A. M., Limon, M. C., and Codon, A. C., 2004.** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4), 249-260.
- Bhai, R.S., Thomas, J. and Naidu, R., 1994.** Evaluation of carrier media for field application of *Trichoderma* spp. in cardamom growing soils. *Journal of Plantation Crops*, 22(1), 50-52.
- Bhat, K. A., Ali, G. Lone, M., Hussain, K. and Nazir, G. (2009).** shelf life of liquid fermented product of *Trichoderma harzianum* in Talc. *J Mycol Pl Pathol*, 39(2), 263-265.
- Bissett, J. 1991a.** A revision of the genus *Trichoderma*. II. Intrageneric classification. *Can. J. Bot.* 60, 2357-2372.
- Bissett, J. 1991b.** A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Can. J. Bot.* 69, 2373-2417.
- Bissett, J. 1991c.** A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Can. J. Bot.* 69, 2418-2420.
- Burmeister, L., 2008.** The antagonistic mechanisms employed by *Trichoderma harzianum* and their impact on the control of the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus*. *Doktora tezi. Hannover Üniversitesi.* 152
- Butt, T.M. and Copping, L.G. (2000).** Fungal biological control agents. *Pesticide Outlook* 11(5), 186-191.

- Calistru, C., McLean, M. and Berjak, P., 1997.** In vitro studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species - A study of the production of extracellular metabolites by *Trichoderma* species. *Mycopathologia*, 137(2), 115-124. DOI: 10.1023/A:1006802423729
- Calvet, C, Pera, J. and Barea, J.M., 1993.** Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant and Soil*, 148, 1-6.
- Carreiro, M.M. and Koske, R.E., 1992.** Effect of temperature on decomposition and development of microfungal communities in leaf litter microcosms. *Canadian Journal of Botany*, 70, 2177-2183.
- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortes, C., Gutierrez, A., Chet, I. and Herrera-Estrella, A., 1999.** Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 929-935.
- Carvajal LH. and Bissett J., 2011.** The Dynamical Processes of Biodiversity - Case Studies of Evolution and Spatial Distribution. Chapter 13. ISBN 978-953-307-772-7, 376 pages, Publisher: InTech., DOI: 10.5772/1830.
- Castillejo, M. A., Santorum, P., Llobell, A., Monte, E. and García, R.M., 2001.** Chitinase production by *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma inhamatum* on different substrates In *Chitin Enzimology 2001* (R. A. A. Muzzarelli, ed.), 233–240. Atec, Ancona, Italy.
- Celar F. and Valic N., 2005.** Effects of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium roseum* culture filtrates on seed germination of vegetables and maize. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection*, 112(4), 343-350.
- Chakravarthy, S. K. , Nagamani, A., Ratnakumari, R.Y. and Bramarambha, S., 2011** Antagonistic Ability Against *Rhizoctonia solani* And Pesticide Tolerance Of *Trichoderma* Strains. *Advances in Environmental Biology*, 5(9), 2631-2638.
- Chang, Y. C., Chang, Y. C., Baker, R., Kleifeld, O. And Chet, I., 1986.** Increased Growth of Plants in the Presence of the Biological-Control Agent *Trichoderma-Harzianum*. *Plant Disease*, 70(2), 145-148. DOI: 10.1094/Pd-70-145.
- Chaverri, P. and Samuels G. J., 2002.** *Hypocrea lixii*, the teleomorph of *Trichoderma harzianum*. *Mycol. Prog.* 1, 283-286.
- Chaverri, P., Castlebury L. A., Overton B. E. and Samuels G. J., 2003.** *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia*, 95(6), 1100-1140. DOI:10.2307/3761915.



- Chet, I., Inbar, J. and Hadar, I., 1997.** Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow DT, Söderström B (eds) *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer-Verlag, Berlin, pp: 165-184.
- Chet, I., 1990.** Biological control of soil-borne plant pathogens with fungal antagonist in combination with soil treatment. *Biological Control of Soilborne Plant Pathogens*, pp: 15-25.
- Chet, I. and Inbar, J., 1994.** Biological-control of fungal pathogens. *Appl Biochem Biotechnol*, 48(1), 37-43. DOI: 10.1007/Bf02825358.
- Choquer, M, Becker, HF. and Vidal-Cros, A., 2007.** Identification of two groups of chitinase genes in *Botrytis cinerea* which are differentially induced by exogenous chitin. *J. Mycol. Res.*, 111(5), 615-25.
- Cianchetta, S., Galletti, S., Burzi, P. L. and Cerato, C., 2010.** A novel microplate-based screening strategy to assess the cellulolytic potential of *Trichoderma* strains. *Biotechnol Bioeng*, 107(3), 461-468.
- Clarkson J. P., Mead A., Payne T. and Whipps J. M., 2004.** Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*. *Plant Pathology*, 53, 353-362.
- Claydon, N., Allan, M., Hanson, J. R. and Avent, A. G., 1987.** Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 88, 503-513.
- Cook, R.S. and Baker, K.F., 1983.** The nature and practice of biological control of plant pathogen. St Paul, MN; The American Phytopathological Society.
- Danielson, R.M. and Davey, C.B., 1973.** The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 5,485-494.
- Datnoff, L.E. and Pernezny, K.L., 2001.** *Paenibacillus macerans* and *Trichoderma harzianum* enhance transplant growth and suppress Fusarium Crown and root rot in Florida tomato production. 2001 Caribbean Division Meeting Abstracts, June 11– 15, 2001 – La Habana, Cuba. Publication no. P–2002–0025-CRA.
- Deacon, J.W. 2005.** *Fungal Biology*. Blackwell Publishing Professional; 4 Edition, ISBN: 1405130660. pp. 372
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J. and Figuras, M.J., 2003.** *Atlas of Clinical Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht
- De la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J. M., Benitez, T., Pintor-Toro, J. A. and Llobell, A., 1992.** Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry*, 206(3), 859-867

- De la Vega, L.M.J., Corona M.,E.,B., Aguilar, U.G. and Mario, R.L., 2006.** Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi. *Can.J. Microbiol.*, 52(7), 651-700.
- Delen, N., 2008.** Fungisitler. Nobel Yayın Dağıtım, ISBN: 978-605-395-158-2, 8-24 s.
- Dennis, C. and Webster, J., 1971.** Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III: Hyphal interactions. *Trans Br Mycol Soc* 57, 363-369.
- Dłużniewska, J., 2003.** Reaction of fungi of *Trichoderma* genus to selected abiotic factors. *Elec.J.Polish.Agr.Uni.Agron.*,6(2),<http://www.ejpau.media.pl/series/volume6/issue2/agronomy/art-04.html>.
- Doi, Y., 1972.** Revision of the Hypocreales with cultural observations IV. The genus *Hypocrea* and its allies in Japan (2) Enumeration of the species. *Bull. Natl. Sci. Mus.* 15, 649-751
- Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T.H., 1980.** Compendium of soil fungi. London; Newyork: Academic Pres.
- Dubos, B., Jailloux, E and Bult, J., 1982.** Employing antagonistic properties of *Trichoderma* against *Botrytis cinerea* in the protection of vineyards against grey-mold. *Phytoparasitica*, 10, 134.
- Dunlop, R. W., Simon, A., Sivasithamparam, K. and Ghisalberti, E. L., 1989.** An antibiotic from *Trichoderma koningii* active against soilborne plant-pathogens. *J Nat Prod*, 52(1), 67-74. DOI: 10.1021/Np50061a008.
- Dutta, S. and Chatterjee, N. C., 2004.** Raising of carbendazim-tolerant mutants of *Trichoderma* and variations in their hydrolytic enzyme activity in relation to myco-parasitic action against *Rhizopus stolonifer*. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection*, 111(6), 557-565.
- Eastburn, D. M. and Butler E. E., 1991.** Effects of soil moisture and temperature the saprophytic ability of *Trichoderma harzianum*. *Mycologia* 83:257-263.
- Eapen, S. J., Beena, B. and Ramana, K. V., 2005.** Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88(3), 218-225. DOI: 10.1016/j.jip.2005.01.011.
- Eisendle, M., Oberegger, H., Buttinger, R., Illmer, P., and Haas, H., 2004.** Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH Regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*, 3(2), 561-563.

- Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. and Henis, Y., 1983.** Parasitism of *Trichoderma* spp on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* Scanning Electron-Microscopy and Fluorescence Microscopy. *Phytopathology*, 73(1), 85-88. DOI: 10.1094/Phyto-73-85.
- El-Katatny, M. H., Somitsch, W., Robra, K. H., El-Katatny, M. S. and Gubitz, G. M. 2000.** Production of chitinase and beta-1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food Technology and Biotechnology*, 38(3), 173-180.
- Febles, C. I., Arias, A., Gil Rodríguez, M. C., Hardisson, A. and Sierra López, A.1995.** In vitro study of antimicrobial activity in algae (Chlorophyta, Phaeophyta and Rhodophyta) collected from the coast of Tenerife. *Anuario del Instituto de Estudios Canarios* 34: 181–192.
- Fraser P.,M., 1994.** The impact of soil and crop management practices on soil macrofauna. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR, Grace PR (eds) *Soil biota-management in sustainable farming systems*. CSIRO, Australia, pp 125–132
- Fravel, D. R., Marois, J. J., Lumsden, R. D. and Connick, W. J., 1985.** Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. *Phytopathology*, 75(7), 774-777. DOI: 10.1094/Phyto-75-774.
- Gams, W. and Bissett, J., 1998.** Morphology and identification. In *Trichoderma and Gliocladium*, I: Basic Biology, Taxonomy and Genetics, ed. C. P. Kubicek & G. F. Harman. London: Taylor & Francis, pp. 3-34.
- Ganesan, S., Kuppusamy, R. G., and Sekar, R., 2007.** Integrated management of stem rot disease (*Sclerotium rolfsii*) of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) using rhizobium and *Trichoderma harzianum* (ITCC-4572). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31(2), 103-108.
- Garbeva, P., Van veen J. A. and Van Elsas, J. D., 2004.** Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 243-270.185.
- Ghose, T.K., 1987.** Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem.*, 59, 257-268.
- Goettel, M.S. and Inglis, D.G., 1997.** Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey L.A. (ed.) *Manual of techniques in insectpathology*. Academic Press, London, UK. Pp. 213-249.
- Gopalakrishnan, C., Ramanujam, B., Prasad, R.,D., Rao, N.,S. and Rabindra., R.J., 2003.** Use of brewer's yeast amended spent malt as substrate for mass production of *Trichoderma*. *Journal of Biological Control*, 17, 167-70.
- Griffin, D. H. 1994.** *Fungal Physiology*, 2nd edn. New York: Wiley-Liss.

- Haktanır, K. ve Arcak, S. 1997.** Toprak Biyolojisi (Toprak Ekosistemine Giriş). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü, Ankara 409s.,.
- Hall, T., A., 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/ 98/NT. Nucleic Acids Symp., 41, 95-98.
- Haran, S., Schickler, H. and Chet, I.,1996a.** Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology 142, 2321-2331.
- Haran, S., Schickler, H. and Chet, I., 1996.** Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology-Uk, 142, 2321-2331.
- Harman, G.E. and Kubicek, P.K., 1998.** *Trichoderma* and *Gliocladium*. Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor and Francis, London, Vol 2 Pp.1-393.
- Harman, G. E., 2000.** Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease, 84(4), 377-393. DOI: 10.1094/Pdis.2000.84.4.377.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M., 2004.** *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology, 2(1), 43-56. DOI: 10.1038/Nrmicro797
- Harman, G.E. 2006.** Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96, 190-194.
- Heraux, F. M. G., Hallett, S. G., Ragothama, K. G. and Weller, S. C., 2005.** Composted chicken manure as a medium for the production and delivery of *Trichoderma virens* for weed control. Hortscience, 40(5), 1394-1397.
- Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. A., Diaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte, E. and Garcia-Acha, I., 2000.** Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Applied and Environmental Microbiology, 66(5), 1890-1898. DOI: 10.1128/Aem.66.5.1890-1898.2000.
- Hermosa, R., Botella, L., Montero-Barrientos, M., Alonso-Ramirez, A., Arbona, V., Gomez-Cadenas, A. and Nicolas, C., 2011.** Biotechnological applications of the gene transfer from the beneficial fungus *Trichoderma harzianum* spp. to plants. Plant Signal Behav, 6(8), 1235-1236. DOI: 10.4161/psb.6.8.16362.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. and Monte, E., 2012.** Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology, 158(Pt 1), 17-25. DOI:0.1099/mic.0.052274-0.

- Hjeljord, L. and Tronsmo, A., 1998.** *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In *Trichoderma and Gliocladium*, pp. 131-152. Edited by C. P. Kubicek & G. E. Harman. London; Bristol, PA: Taylor & Francis.
- Hoitink, A. J. F., Hoekstra, P. and Van Maren, D. S., 2006.** Comment on "On the role of diurnal tides in contributing to asymmetries in tidal probability distribution functions in areas of predominantly semi-diurnal tide" by P.L. Woodworth, D.L. Blackman, D.T. Pugh and J.M. Vassie [*Estuarine, Coastal and Shelf Science* 64 (2005) 235-240]. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 67(1-2), 340-341. DOI:10.1016/j.ecss.2005.10.008.
- Howell, C. R., 2003.** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87(1), 4-10. DOI: 10.1094/Pdis.2003.87.1.4.
- Howell, C. R., Hanson, L. E., Stipanovic, R. D. and Puckhaber, L. S., 2000.** Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90(3), 248-252. DOI: 10.1094/Phyto. 2000. 90.3.248.
- Howell, C. R., Stipanovic, R. D. and Lumsden, R. D., 1993.** Antibiotic Production by Strains of *Gliocladium virens* and Its Relation to the Biocontrol of Cotton Seedling Diseases. *Biocontrol Science and Technology*, 3(4), 435-441. DOI: 10.1080/0958315930 9355298.
- Ingram, D.S. 2002.** The Diversity Of Plant Pathogens And Conservation: Bacteria And Fungi Sensu Lato. In Sivasithamparam, K., Dixon, K.W. and Barrett, R.L. *Microorganisms in Plant Conservation And Biodiversity*. Pp 241-267 Kluwer Academic Publishers.
- Infantino, A., DiGiambattista, G. and Socciarelli, S., 1997.** First report of *Sclerotium rolfsii* on sunflower in Italy. *Plant Disease*, 81(8), 960-960. DOI:10.1094/Pdis.1997.81.8. 960b.
- Jaklitsch, W. M., 2009.** European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Studies in Mycology*, 63, 1-91. DOI: 10.3114/sim.2009.63.01
- Jaklitsch, W. M., 2011.** European species of *Hypocrea* Part II. Species with hyaline ascospores. *Fungal Divers.* 2011 May; 48(1), 1–250. DOI: 10.1007/s13225-011-0088-y.
- Javaid A. and Ali S., 2011.** Herbicidal activity of culture filtrates of *Trichoderma* spp. against two problematic weeds of wheat. *Nat Prod Res*, 25(7), 730-740. DOI: Pii 935852576.

- Jayaraj, J., Radhakrishnan, N.V. and Velazhahan, R.,(2006).** Development of formulations of *Trichoderma harzianum* strain M1 for control of damping-off of tomato caused by *Pythium aphanidermatum*. Archives Of Phytopathology And Plant Protection, 39 (1), 1-8 DOI: 10.1080/03235400500094720.
- Jeyarajan, R., Ramakrishnan, G., Dinakaran, D. and Sridar, R., 1994.** Development of products of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* for biocontrol of root rot diseases, pp 25-36. In Biotechnology in India (Ed Dwivedi B.K.) Bioved Research Society, Allahabad
- Jeyarajan, R., 2006.** Prospects of indigenous mass production and formulation of *Trichoderma*, pp:74-80. In *Current Status of Biological Control of Plant diseases using antagonistic organisms in India* (Eds Rabindra RJ Ramanujam B) Project Directorate of Biological Control Bangalore, pp. 445.
- John, R. P., Tyagi, R. D., Prevost, D., Brar, S. K., Pouleur, S. and Surampalli, R. Y., 2010.** Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp adzuki and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. Crop Protection, 29(12), 1452-1459. DOI: 10.1016/j. cropro. 2010. 08. 004.
- Joshi BB., Vishwakarma MP., Bahukhandi D. and Bhatt RP., 2012.** Studies on strains of *Trichoderma* spp. from high altitude of Garhwal Himalayan region. J Environ Biol. 33(5), 843-7.
- Kamala, T. and Indira, S., 2011.** Evaluation of indigenous *Trichoderma* isolates from Manipur as biocontrol agent against *Pythium aphanidermatum* on common beans. 3 Biotech, 1(4), 217-225. DOI: 10.1007/s13205-011-0027-3
- Karaoğlu, S. A. and Ulker, S., 2006.** Isolation, identification and seasonal distribution of soilborne fungi in tea growing areas of Iyidere-Ikizdere vicinity (Rize-Turkey). J Basic Microbiol, 46(3), 208-218. DOI: 10.1002/jobm.200510030.
- Katayama, A. and Matsumura, F., 1991.** Photochemically Enhanced Microbial-Degradation of Environmental-Pollutants. Environ Sci Technol, 25(7), 1329-1333. DOI: 10.1021/ Es000 19a016.
- Keszler, A., Forgács, E., Kótai, L., Vizcaíno, J. A., Monte, E. and García-Acha, I., 2000** Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatographic Science, 38, 421–424.
- Khan, M.O. and Shahzad, S., 2007.** Screening of *Trichoderma* species for tolerance to fungicides. Pakistan Journal of Botany, 39(3), 945-951.
- Killham, K., 1994.** Soil Ecology,1st edn. Cambridge; Newyork: Cambridge University Press.

- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., Stalpers, J.A., (eds.) 2001.** Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 9th Edition. CABI Publishing
- Kiss, G. C., Forgá, E., Cserhá,i T. and Vizcaíno, J. A., 2000.** Colour pigments of *Trichoderma harzianum* Preliminary investigations with thin-layer chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy and high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A., 896, 61–68.
- Klein, D. and Eveleigh, D. E., 1998.** Ecology of *Trichoderma*. Pages 57- 74 in: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. C. P. Kubicek and G. E. Harman, eds. Taylor & Francis, London.
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F. and Nagy, E., 2003.** Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. Food Technology and Biotechnology, 41(1), 37-42.
- Kubicek P. E. M., 1998.** Nutrition, cellular structure and basic metabolic pathways in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In *Trichoderma and Gliocladium*, pp. 95-119. Edited by C. P. Kubicek & G. E. Harman. London; Bristol, PA: Taylor & Francis.
- Kucharski, J., Ciecko, Z., Niewolak, T. and Niklewska-Larska, T., 1996.** Activity of microorganisms in soil of different agricultural usefulness complexes fertilized with mineral nitrogen. Acta Acad. Agric. Tech. 62, 25-35.
- Küçük, Ç., 2000.** *T. harzianum* ile toprak kökenli bazı bitki patojenlerinin kontrolü. Y. Lisans Tezi, A.Ü. Fen Bil. Enst. Eskişehir.
- Küçük, Ç., ve Kıvanç, M., 2003.** Isolation of *Trichoderma* spp. and Determination of Their Antifungal, Biochemical and Physiological Features. Turk J Biol (27 ):247-253.
- Küçük, Ç., Kıvanç, M., Kınacı, E., ve Kınacı, G., 2002.** *Trichoderma harzianum*'un biyokontrol mekanizması. HASAD, 201, 45-46.
- Lavelle, P. and Spain, A.V., 2001.** Soil Ecology. Dordrecht; Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Lewis, J.A., Papavizas G.C. and Lumsden, R.D., 1991.** A new formulation system for the application of biocontrol fungi to the soil. Biocontrol Science and Technology, 1(1), 59-69.
- Liouane, K., Saïdana, D., Ammar, S., Chriaa, J., Chéraif, I., Hadj Khedhr, F.B., Mahjoub, M. A., Said, K. and Mighri, Z.,(2009).** Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Methanolic Extract of *Trichoderma* sp. Growing Wild in Tunisia. Journal of Essential Oil Bearing Plants. Volume 12, Issue 5.

- Lo, C.T. and Lin, C.Y., 2002.** Screening strains of *Trichoderma* spp. for Plant Growth enhancement in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin*, 11, 215-220.
- Lone, M.A., Wani, M.R., Sheikh, S.A., Sahay, S., Suliman and Dar, M., 2012.** Antagonistic potentiality of *Trichoderma harzianum* against *Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biology, Agriculture and Health care*, 2(8), 72-76.
- Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B. and Kubicek, C. P., 1996.** Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J Bacteriol*, 178(21), 6382-6385.
- Lorito, M., Peterbauer, T. C., Hayes, C. K. and Harman, G. E., 1994.** Synergistic interaction between fungal cell-wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology-Uk*, 140, 623-629.
- Lorito, M., Woo S. L., Fernandez, I. G., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A. and Scala, F., 1998.** Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(14), 7860-7865. DOI: 10.1073/pnas.95.14.7860.
- Lorito M., Woo, S. L., Harman, G. E. and Monte, E., 2010.** Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annu Rev Phytopathol*, 48, 395–417.
- Mandels, M. and Reese, E. T., 1960.** Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J. Bacteriol.*, (79):816-826.
- Martinez-Medina, A., Roldán, A. and Pascual, J.A., 2009.** Performance of a *Trichoderma harzianum* bentonite–vermiculite formulation against *Fusarium* wilt in seedling nursery melon plants. *Hort. Science*, 44, 2025–2027.
- McLean, K. L., Hunt, J., and Stewart, A., 2001.** Compatibility of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* C52 with selected fungicides. *New Zealand Plant Protection*, 54(54), 84-88.
- Menendez, A. B. and Godeas, A., 1998.** Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants. Degradation of the cell walls of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC 742) - Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma harzianum*. *Mycopathologia*, 142(3), 153-160. DOI:10.1023/A:1006910707804
- Mihuta-grimm, L. and Rowe, R. C., 1986.** *Trichoderma* spp as biocontrol agents of Rhizoctonia Damping-off of radish in organic soil and comparison of 4 Delivery Systems. *Phytopathology*, 76(3), 306-312.



- Miyadera, H., Shiomi, K., Ui, H., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Tomoda, H. and Omura, S., 2003.** Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase). *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(2), 473-477. DOI: 10.1073/pnas.0237315100.
- Monte, E., 2001.** Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int Microbiol*, 4(1), 1-4. DOI: 10.1007/s101230100001
- Mohiddin, F. A. and Khan, M. R., 2013.** Tolerance of fungal and bacterial biocontrol agents to six pesticides commonly used in the control of soil borne plant pathogens. *Afr. J. Agric. Res.*, 8(43), 5331-5334.
- Mukhopadhyay, A.N., Brahm Bhat, A. and Patel, G.J., 1986.** *Trichoderma harzianum*-a potential biocontrol agent for tobacco damping off. *Tobacco Research*, 12, 26-35.
- Nannipieri, P., 1994.** The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainable farming systems In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta, VVSR, Grace PR (eds.) CSIRO, Australia, pp 238–244.
- Navazio L., Baldan B., Moscatiello R., Zuppini A., Woo S. L., Mariani P., and Lorito M. 2007.** Calcium-mediated perception and defense responses activated in plant cells by metabolite mixtures secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *Bmc Plant Biology*, 7. Artn 41 DOI: 10.1186/1471-2229-7-41.
- Omar, P. Eng. 2006.** Agricultural use of *Trichoderma*. Technical revision by Gonzalo Bernaza, Eng. and Miguel Acosta, Grad. [www.soil-fertility.com/Trichoderma/english/index.shtml](http://www.soil-fertility.com/Trichoderma/english/index.shtml).(lastupdate: June 2006).
- Ozbay, N., Newman, S. E., and Brown, W. M., 2004.** The effect of the *Trichoderma harzianum* strains on the growth of tomato seedlings. *Managing Soil-Borne Pathogens: A Sound Rhizosphere to Improve Productivity in Intensive Horticultural Systems*, (635), 131-135.
- Öner, M., 2002.** Mikrobiyal Ekoloji. 2.Baskı. Ege Üniversitesi Basımevi. 282s., Bornova-İzmir.
- Panahian, G.h., Rahnama, K. and Jafari, M., 2012.** Mass production of *Trichoderma* spp and application. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 3(2), 292-298.
- Papavizas, G. C., Lewis, J. A. and Abdelmoity, T. H., 1982.** Evaluation of New Biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology*, 72(1), 126-132. DOI: 10.1094/Phyto-72-126.

- Pérez de Algaba, A., Grondona, I., Monte, E. and García-Acha, I., 1992.** *Trichoderma* as a biological control agent in sugar beet crops. In *New Approaches in Biological Control of Soil-borne Diseases* (D. F. Jensen, J. Hockenhull & N. J. Fokkema, eds): 36–38. European Foundation for Plant Pathology, Copenhagen
- Persoon, C. H., 1794.** *Disposita methodica fungorum*. Römer's Neues Mag. Bot., 1,81-128.
- Pitson, S.M., Seviour, R.J. and McDougall, B.M., 1993.** Noncellulolytic fungal  $\beta$ -glucanases: their physiology and regulation. *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 178–192.
- Prasad, R.D. and Rangeshwaran, R., 1998.** A modified liquid medium for mass production of *Trichoderma* by fermentation process, pp 26. In *Abstracts of National symposium on Eco-friendly approaches in the management of plant diseases* December 22-24, Shimoga, Karnataka, India.
- Prell, H.H. and Day, P.R., 2001.** *Plant-fungal pathogen interaction - A classical and Molecular view*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. Pp. 214.
- Radwan, M. A., Farrag, S. A. A., Abu-Elamayem, M. M. and Ahmed, N. S., 2012.** Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. *Applied Soil Ecology*, 56, 58-62. DOI: 10.1016/j.apsoil.2012.02.008.
- Ramanujam, B., Prasad, R. D., Sriram, S. and Rangeswaran, R., 2010** Mass production, formulation, quality control and delivery of *Trichoderma* for plant disease management. *The Journal of Plant Protection Sciences*, 2(2), 1-8
- Rathore, V.R.S., Mathur, K. Hodha, B.C. and Mathur, K., 1992.** Activity of volatile and non-volatile substances produced by *Trichoderma viride* on ginger rhizome rot pathogens. *Indian Phytopathology*, 45, 253-254.
- Rifai, M. A., 1969.** A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol Pap* 116: 1-116.
- Rifai, M. A., Webster, J. 1966.** Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma*. III. *H. lactea* (= *H. citrina*) and *H. pulvinata*. *Transactions of the British Mycological Society*, 49, 297-310.
- Roiger, D. J., Jeffers, S. N. and Caldwell, R. W. 1991.** Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. *Soil Biol. Biochem.*, 23, 353-359.
- Rossmann, A. Y., 1996.** Morphological and molecular perspectives on systematics of the Hypocreales. *Mycologia*, 88(1), 1-19. DOI: 10.2307/3760780
- Royse, D.J. and Ries, S.M., 1978.** The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cinota*. *Phytopathology*, 68, 603-607.

- Ruiz-Herrera, J., 1992.** Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis and Assembly. Boca Raton: CRC Press.
- Samuels, G., Petrini, O., Kulhs, J., Lieckfeldt, E. and Kubicek, C. 1998.** The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. Studies in Mycology. Vol. 41, No. 1, (1998), pp. 2-54, ISSN 0166-0616.
- Samuels, G., Suarez, C., Solis, K., Holmes, K., Thomas, S., Ismaiel, A. and Evans, H. 2006.** *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. Mycological Research, 110(4), 381–392. ISSN 0953-7562.
- Samuels, G. J., 2006.** *Trichoderma*: Systematics, the sexual state and ecology. the nature and application of biocontrol microbes II: *Trichoderma* spp.
- Samuels, G. J. and Blackwell, M., 2001.** Pyrenomycetes-fungi with perithecia. In The Mycota VIIA: Systematics and Evolution, ed. D. J. McLaughlin, E. G. McLaughlin & P. A. Lemke. Berlin: Springer- Verlag, pp. 221-55.
- Santorum, P., Castillejo, M. A., Sanz, L., Grondona, I., García Roig, M., González, F. J. Monte, E., 2001.** Enzyme production by a biocontrol strain of *Trichoderma atroviride*. In Biocontrol Agents: mode of action and interaction with other means of control (Y. Elad, S. Freeman & E. Monte, eds): 371–374. European Foundation for Plant Pathology, Seville.
- Sanz, L., Montero, M., Grondona, I., Llobell, A. and Monte, E. 2002.** In vitro antifungal activity of *Trichoderma harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. asperellum* and *T. atroviride* vs *Botrytis cinerea* pathogenic to strawberry. IOBC/wprs Bulletin, 25 (10), 253–256.
- Sarkar, S., Narayanan, P., Divakaran, A., Balamurugan, A. and Premkumar, R., 2010.** The in vitro effect of certain fungicides, insecticides, and biopesticides on mycelial growth in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Turkish Journal of Biology, 34(4), 399-403. DOI: 10.3906/Biy-0812-4.
- Sastry, V. M. V. S., and Rao, G. R. K., 1994.** Antibacterial substances from marine-algae - successive extraction using benzene, chloroform and methanol. Botanica Marina, 37(4), 357-360. DOI:10.1515/botm.1994.37.4.357.
- Segarra, G., Casanova, E., Bellido, D., Odena, M. A., Oliveira, E. and Trillas, I., 2007.** Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. Proteomics, 7(21), 3943-3952. DOI: 10.1002/pmic.200700173.
- Sharaf, E. F., El-Sarrany, A. Q. and El-Deeb, M., 2012.** Biorecycling of shrimp shell by *Trichoderma viride* for production of antifungal chitinase. African Journal of Microbiology Research, 6(21), 4538-4545. DOI:10.5897/Ajmr12.148.

- Sharon, E., Bar-Eyal, M., Chet, I., Herrera-Estrella, A., Kleinfeld, O. and Spiegel, Y., 2001.** Biocontrol of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 91, 687-693.
- Shoresh, M. and Harman, G. E., 2008.** Genome-wide identification, expression and chromosomal location of the genes encoding chitinolytic enzymes in *Zea mays*. *Molecular Genetics and Genomics*, 280(2), 173-185. DOI: 10.1007/s00438-008-0354-1
- Shoresh, M., Harman, G. E. and Mastouri, F., 2010.** Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48(48), 21-43. DOI: 10.1146/annurev-phyto-073009-114450.
- Shwet, K., Verma, R. N. and Sharma, H. S., 2000.** Role of lytic enzymes in yellow mould disease of *Agaricus bisporus*. – *Indian Phytopathology*, 53, 273–278
- Siddiquee, S., Yusuf, U. K., Hossain, K. and Jahan, S., 2009.** In vitro studies on the potential *Trichoderma harzianum* for antagonistic properties against *Ganoderma boninense*. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 7(3-4), 970-976.
- Singh, P.C. and Nautiyal, C.S., 2012.** Anovel method to prepare concentrated conidial biomass formulation of *Trichoderma harzianum* for seed application. *Journal of Applied Microbiology*. 113(6), 1442–1450.
- Sivan, A. and Chet, I., 1992.** Microbial Control of Plant Diseases. In: *Environmental Microbiology*, R. Mitchell Wiley-Liss (Ed.), New York, pp. 335–354.
- Sivasithamparam, K. and Ghisalberti, E. L., 1998.** Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. *Basic Biology, Taxonomy and Genetics* (C. P. Kubicek & G. E. Harman, eds), 139-191. Taylor & Francis, London
- Steyaert, J. M., Ridgway, H. J., Elad, Y. and Stewart, A., 2003.** Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 31(4), 281-291.
- Suay, I., Arenal, F., Asensio, F. J., Basilio, A., Cabello, M. A., Diez, M. T. and Vicente, M. F., 2000.** Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78(2), 129-139.
- Suwan, S., Isobe, M., Kanokmedhakul, S., Lourit, N., Kanokmedhakul, K., Soyong, K., and Koga, K., 2000.** Elucidation of high micro-heterogeneity of an acidic-neutral trichotoxin mixture from *Trichoderma harzianum* by electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 35(12), 1438-1451. DOI: 10.1002/1096-9888(200012)

- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M and Kumar S. 2011.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.*, 28, 2731-2739.
- Tarus, P. K., Lang'at-Thoruwa, C. C., Wanyonyi, A. W., and Chhabra, S. C. 2003.** Bioactive metabolites from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachiatum*. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 17(2), 185-190.
- Tronsmo, A. and Dennis, C., 1978.** Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species. *Transactions of the British Mycological Society*, 71, 469-474.
- Vey, A., Hoagland, R.E. and Butt, T.M., 2001.** Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. In: Butt TM, Jackson CN (eds) CAB International, Bristol, Pp. 311–346.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L. and Lorito, M., 2008.** *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology Biochemistry*, 40(1), 1-10. DOI: 10.1016/j.soilbio.2007.07.002.
- Vizcaíno, J. A., Sanz, L., Basilio, A., Vicente, F., Gutierrez, S., Hermosa, M. R. and Monte, E., 2005.** Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three trichoderma sections. *Mycological Research*, 109(12), 1397-1406.
- Volk, T., 2004.** Fungus of the Month for November.
- Webster, J. and Weber, R., W., S., 2007.** *Introduction to Fungi*. United States of America, Cambridge University Press, New York.
- Widden, P. and Abitbol, J.J., 1980.** Seasonality of *Trichoderma* species in aspruce forest soil. *Mycologia* 72: 775-784.
- Windham, M. T., Elad, Y. and Baker, R., 1986.** A Mechanism for Increased Plant-Growth Induced by *Trichoderma* Spp. *Phytopathology*, 76(5), 518-521. DOI: 10.1094/Phyto-76-518
- Wuczowski M, Druzhinina I, Gherbawy Y, Klug B, Prillinger H and Kubicek CP (2003)** Species pattern and genetic diversity of *Trichoderma* in a mid-European, primeval floodplain-forest. *Microbiol. Res.*, 158, 125–133.
- Worasatit, N., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., and Rowland, C., 1994.** Variation in Pyrone Production, Lytic Enzymes and Control of Rhizoctonia Root-Rot of Wheat among Single-Spore Isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycological Research*, 98, 1357-1363.

- Xiao-Yan, S., Qing-Tao, S., Shu-Tao, X., Xiu-Lan, C., Cai-Yun, S. and Yu-Zhong, Z., 2006.** Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. *FEMS Microbiol Lett*, 260(1), 119-125. DOI 10.1111/j.1574-6968.2006.00316.x.
- Yang, H-H, Yang, SL., Peng, K-C., Lo CT. and Liu S-Y., 2009.** Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. *Mycol Res.*, 113, 924–932.
- Yıldız, A., ve Benlioğlu S., 2008.** *Trichoderma harzianum*'un pamuklarda çökerten (*Rhizoctonia solani* kühn.) ve Verticillium solgunluğu hastalığı (*Verticillium dahlia* kleb.)'na etkisinin in-vivo koşullarda saptanması. *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6(1), 3-7.
- Yiğit, F., 2005.** Bitki Patojenlerinin Kontrolünde Kullanılan Biyokontrol Ürünler ve Özellikleri. *S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19 (36), 70-77.
- Yurtsever, N. 1984.** Deneysel istatistik metodları. Tarım Orman ve Köy Hizmetleri Genel Müdürlüğü Yayın No: 121, 623 sayfa, Ankara.
- Zhang, B. Q. and Yang, X. B., 2000.** Pathogenicity of *Pythium* populations from corn-soybean rotation fields. *Plant Disease*, 84(1), 94-99. DOI:10.1094/Pdis.2000.84.1.94.
- Zhao, Z. X., Zhang, W., Stanley B. A. and Assmann S. M., 2008.** Functional proteomics of *Arabidopsis thaliana* guard cells uncovers new stomatal signaling pathways. *Plant Cell*, 20(12), 3210-3226. DOI: 10.1105/tpc.108.063263.
- Zivkovic, S., Stojanovic, S., Ivanovic, Z., Gavrilovic, V., Popovic, T., and Balaz, J., 2010.** Screening of Antagonistic Activity of Microorganisms against *Colletotrichum Acutatum* and *Colletotrichum Gloeosporioides*. *Archives of Biological Sciences*, 62(3), 611-623.
- URL-1.** [http://www.fungionline.org.uk/3hyphae/1hypha\\_ultra.html](http://www.fungionline.org.uk/3hyphae/1hypha_ultra.html), 03.2014
- URL-2.** [http://www.doctorfungus.org/thedrugs/antif\\_pharm.php](http://www.doctorfungus.org/thedrugs/antif_pharm.php), 04.2014
- URL-3.** <http://www.frac.info/>. Pathogen Risk List. Fungicide Resistance Action Committee.
- URL-4.** <http://www.apsnet.org>. DOI: 10.2298/Abs1003611z, 03.2014
- URL-5.** <http://www.mgm.gov.tr/FILES/resmi-istatistikler/turkiye-5cm-toprak-sicakliklari-9.pdf>, 05.2014

## 7. EKLER

### 7.1. EK1- *Trichoderma harzianum* ID4A

TCCTCCCGGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCCTACCTGATCCGAG  
GTCAACATTTTCAGAAGTTGGGTGTTTAAACGGCTGTGGACGCGCCGCGCTCCCGA  
TGCGAGTGTGCAAACACTACTGCGCAGGAGAGGCTGCGGGCGAGACCGCCACTGTA  
TTTCGGAGACGGCCACCGCCAAGGCAGGGCCGATCCCCAACGCCGACCCCCCG  
GAGGGGTTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCGCCAGAATACT  
GGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA  
CATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCG  
TTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTCGAAACGCCTACGAGAGGCGCCGAGAAGGC  
TCAGATTATAAAAAAACCCGCGAGGGGGTATAACAATAAGAGTTTTGGTTGGTCC  
TCCGGCGGGCGCCTTGGTCCGGGGCTGCGACGCACCCGGGGCAGAGATCCCGC  
CGAGGCAACAGTTTTGGTAACGTTACATTGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTA

### 7.2. EK2- *Trichoderma harzianum* ID4B

TGGGTGTTTAAACGGCTGTGGACGCGCCGCGCTCCCGATGCGAGTGTGCAAAC  
ACTGCGCAGGAGAGGCTGCGGGCGAGACCGCCACTGTATTTTCGGAGACGGCCAC  
CGCCAAGGCAGGGCCGATCCCCAACGCCGACCCCCCGGAGGGGTTTCGAGGGTT  
GAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGC  
GTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTATGCAATTCACATTACTTATCGCATTTC  
GCTGCGTTTTTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATT  
CATTTTCGAAACGCCTACGAGAGGCGCCGAGAAGGCTCAGATTATAAAAAAAC  
CCGCGAGGGGGTATAACAATAAGAGTTTTGGTTGGTCCTCCGGCGGGCGCCTTGG  
TCCGGGGCTGCGACGCACCCGGGGCAGAGATCCCGCCGAGGCAAC

**7.3. EK3- *Trichoderma harzianum* ID6B**

ACCTGATCCGAGGTCAACATTTTCAGAAAGTTGGGTGTTTAAACGGCTGTGGACGCG  
CCGCGCTCCCGATGCGAGTGTGCAA ACTACTGCGCAGGAGAGGCTGCGGGCGAG  
ACCGCCACTGTATTTTCGGAGACGGCCACCGCCAAGGCAGGGCCGATCCCCAAC  
GCCGACCCCCCGGAGGGGTTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCC  
CGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAA  
TTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCAT

**7.4. EK4- *Trichoderma harzianum* ID7C**

CTGATCGAGGTCACATTTCACTAAGTTGGGTGTTGAACGGCTGTGGACGCGCCG  
CGCTCCCGATGCGAGTGTGCAA ACTACTGCGCACGACAGGCTGCGGGCGAGACC  
GCCACTGTATTTTCGGAGACGGCCACCGCCAAGGCAGGGCCGATCCCCAACGCC  
GACCCCCCGGAGGGGTTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCG  
CAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTC AATGATTCACTGAATTC  
TGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCA  
AGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTCGAAACGCCTACTAGAGGCGC  
CGAGAAGGCTCAGATTATAAAAAA ACCCGCGAGGGGGTATACAGTAAGAGTTTT  
GGTTGGTCCTCCGGCGGGCGCCTTGGTCCGGGGCTGCGACGCACCCGGGGCAG  
AGATCCCGCCGAGGCAACAGTTTGGTAACGTTTCACATTGGGTTTGGGAGTTGTA  
AACTCGGTAATGATCC



**7.5. EK5- *Trichoderma harzianum* ID9A**

TGATCCGAGGTCAACATTTTCAGAAAGTTGGGTGTTTAAACGGCTGTGGACGCGCCG  
CGCTCCCGATGCGAGTGTGCAAACACTACTGCGCAGGAGAGGCTGCGGGCGAGACC  
GCCACTGTATTTTCGGAGACGGCCACCGCCAAGGCAGGGCCGATCCCCAACGCC  
GACCCCCCGGAGGGGTTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCG  
CAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTC  
TGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCA  
AGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTCGAAACGCCTACGAGAGGGCGC  
CGAGAAGGCTCAGATTATAAAAAAACC CGCGAGGGGGTATAACAATAAGAGTTTT  
GGTTGGTCCTCCGGCGGGCGCCTTGGTCCGGGGCTGCGACGCACCCGGGGCAG  
AGATCCCGCCGAGGCAACAGTTTGGTAACGTTACATTGGGTTTGGGAGTTGTA  
AACTCGGTAATGATCCCTCCGC

**7.6. EK6- *Trichoderma harzianum* ID11C**

ACCTGATCCGAGGTCAACATTTTCAGAAAGTTGGGTGTTTAAACGGCTGTGGACGCG  
CCGCGCTCCCGATGCGAGTGTGCAAACACTACTGCGCAGGAGAGGCTGCGGGCGAG  
ACCGCCACTGTATTTTCGGAGACGGCCACCCCGCTAAGGGAGGGCCGATCCCCA  
ACGCCGACCCCCCGGAGGGGTTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATG  
CCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTG  
AATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGA  
ACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTCGAAACGCCTACGAGAG  
GCGCCGAGAAGGCTCAGATTATAAAAAAACC CGCGAGGGGGTATAACAATAAGA  
GTTTTGGTTGGTCCTCCGGCGGGCGCCTTGGTCCGGGGCTGCGACGCACCCGG  
GGCAGAGATCCCGCCGAGGCAACAGTTTGGTAACGTTACATTGGGTTTGGGA  
GTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGC

**7.7. EK7- *Trichoderma harzianum* ID11D**

ACCTGATCCGAGGTCAACATTTCAAGAAAGTTGGGTGTTTAAACGGCTGTGGACGCG  
CCGCGCTCCCGATGCGAGTGTGCAAACACTACTGCGCAGGAGAGGCTGCGGGCGAG  
ACCGCCACTGTATTTGCGAGACGGCCACCCCGCTAAGGGAGGGCCGATCCCCA  
ACGCCGACCCCCCGGAGGGGTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATG  
CCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCATG  
AATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGA  
ACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTCGAAACGCCTACGAGAG  
GCGCCGAGAAGGCTCAGATTATAAAAAAACCCGCGAGGGGGTATACAATAAGA  
GTTTTGGTTGGTCCTCCGGCGGGCGCCTTGGTCCGGGGCTGCGACGCACCCGG  
GGCAGAGATCCCGCCGAGGCAACAGTTTGGTAACGTTACATTGGGTTTGGGA  
GTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGC

**7.8. EK8- *Trichoderma hamatum* ID17E**

CATTTACTGAACTTGGGTGTTGTACGGACGTGGACGCTGGCGCGCTCCCGGTGC  
GAGTTGTGCTGGCTACTGCGCAGGAGAGGATGCGGCGAGACCGCCAATGAATT  
TCAGGGCCGGCACCCGGTGAGGGGTCCCGATCCCCAACGCCGATCCCCCGGAG  
GGGTTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGC  
GGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCTATGATTCGCTGAATTCTGGAATTTACAT  
TACTTATCATCTTTTCACTGCGTTCTTCATCCATGCCAGAACCGTGCAGATCCGTT  
GTTGAAAGTTTTGATTCATTTTGAATTTTGGCTCCGAGCTGTAAGAAATACGTAC  
GCGAGGGGACTACCGAAAGAGTTTGGTTGGTTCCTCCGGCGGGCGCCTGGTTC  
CGGGGCTTTTACGCACCCGGGGCGTGACCCCGCCGAAGCAACAGTTTGGTAAC  
GTTACATTGGGTCTGGGAGTTGTATGCTCAGTAATGATCCCGCCGC

**7.9. EK9- *Trichoderma atroviride* ID20G**

AGGTCTGCATTTCCGAACCTGGGGTGTTTTACGGACGTGGACGCTCCGCGCTCCC  
GGTGCGAGTTGTGCAAACACTACTGCGCAGGAGAGGCTGCGGGCGAGACCGCCACT  
GGATTTGCGGGGCCGGGATCCCGTCTTAGGGGCTCCCGAGGTCCCCAACGCCGA  
CCCCCGGAGGGGTTTCGAGGGTTGAAATGACGCTAGGACAGGCCTGCCCCGCCA  
GAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTG  
CAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCTTTCTTCATCGATGCCTCAACCAAGG  
AGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTGAATTTTGTCTCAGAGCTGTAAGA  
AATAACGTCCGCAAGGGGACTACAGAAAAGAGTTTGGTTGGTCCCTCCGGCGG  
GCGCCTGGTTCCGGGGCTGCGACGCACCCGGGGCGTGACCCCGCCGAAGCAAC  
AGTTTGGTATGGTTCACATTGGGCTTGGGAGTTGTAAGCTCAGTTATGATCC

**7.10. EK10- *T. harzianum* KUEN 1585**

TTAAGTTCAGCGGGTATTCCCTACCTGATCCGAGGTCAACATTTTCAGAAGTTGGG  
TGTTTAACGGCTGTGGACGCGCCGCGCTCCCGATGCGAGTGTGCAAACACTACTGC  
GCAGGAGAGGCTGCGGGCGAGACCGCCACTGTATTTTCGGAGACGGCCACCGCCA  
AGGCAGGGCCGATCCCCAACGCCGACCCCCCGGAGGGGTTTCGAGGGTTGAAAT  
GACGCTCGGACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCA  
AAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGC  
GTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTT  
TCGAAACGCCTACGAGAGGGCGCCGAGAAGGCTCAGATTATAAAAAAACCCGCG  
AGGGGGTATAACAATAAGAGTTTTGGTTGGTCCCTCCGGCGGGCGCCTTGGTCCGG  
GGCTGCGACGCACCCGGGGCAGAGATCCCGCCGAGGCAACAGTTTGGTAACGT  
TCACATTGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAATGTCCCTCCGC

## **ÖZGEÇMİŞ**

Arif BOZDEVECİ, 29 Ekim 1988 tarihinde Denizli’de doğdu. Ortaöğretimini Denizli İli Kale İlçe’sinde tamamladı. 2007 yılında Rize Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandı. 2011 yılında Rize Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nden mezun oldu. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans programında öğrenim görmeye devam etmektedir.