

**MUTANT *TRICHODERMA HARZIANUM*
İZOLATLARININ
ANTİMİKROBİYAL VE FİZYOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

AHMET ÜLKER
Yüksek Lisans Tezi

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
ŞUBAT 2002**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ahmet ÜLKER'in Mutant *Trichoderma harzianum* İzolatlarının Antimikrobiyal ve Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi başlıklı Yüksek Lisans Tezi 18 / 6 / 2002 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye(Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Merih KIVANÇ	
Üye	: Doç. Dr. Kıymet GÜVEN	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Nalan Y. SARIÖZLÜ	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 19.06.2002. tarih ve ...21/4..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Orhan ÖZER
Fen Bilimleri Enstitüsü
MÜDÜRÜ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MUTANT *TRICHODERMA HARZIANUM* İZOLATLARININ ANTİMİKROBİYAL VE FİZYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

AHMET ÜLKER

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr.Merih KIVANÇ

2002, 65 sayfa

Tarımsal ürünlerin 1/3 üne yakın kısmını yok eden bitki fungal patojenleriyle mücadele için kullanılan organik kimyasalların ve pestisidlerin çevre ve canlı sağlığını tehdit ediyor olması; günümüzde biyolojik kontrol ajanlarının önemini arttırmaktadır. *Trichoderma* spp. ve mutant suşları, toprak kökenli bitki fungal patojenlerine etki eden önemli biyolojik kontrol ajanlarıdır. Bu çalışmada Eskişehir bölgesindeki topraklardan izole edilen ve U.V. ile mutant hale getirilen *Trichoderma harzianum* suşlarının, bitki patojenlerine karşı antimikrobiyal ve fizyolojik özellikleri incelenmiştir. Mutant *T.harzianum* izolatlarının bitki fungal patojenleri üzerinde filtrat, uçucu bileşikler ve enzim aktiviteleri yoluyla etkili oldukları tespit edilmiştir.

İnhibisyon deneylerinde *Fusarium oxysporum* ve *Fusarium moniliforme*'e karşı T11, *Fusarium solani* ve *Fusarium culmarum* 2'ye karşı T4A, *Fusarium culmarum* 1'e karşı T21, *Rhizoctonia solani*'ye karşı T10, *Drechslera sorokiniana* ve *Gaeumannomyces graminis var. tritici*'ye karşı T4C ve *Sclerotium rolfsii*'ye karşı T4D mutant suşları etkili olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Trichoderma harzianum*, Antimikrobiyal, Mutant,
Biyolojik Kontrol

ABSTRACT**Master of Science Thesis****DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL AND
PHYSIOLOGICAL FEATURES OF
MUTANT *TRICHODERMA HARZIANUM* ISOLATES****AHMET ÜLKER****Anadolu University****Graduate School of Natural and Applied Sciences****Biology Program****Supervisor :Prof.Dr.Merih KIVANÇ****2002, 65 pages**

Organic compounds and pesticides which are used to inhibit plant pathogens that are harmful to about 1/3 of agricultural products, threat the human and environmental health. This threat increases the importance of biological control agents. *Trichoderma* spp. and mutant strains are very important biological control agents which affect plant fungal pathogens originated from soil. In this study, *Trichoderma harzianum* strains that were isolated from soil samples in Eskişehir region and then were mutated by U.V. light are identified. Antimicrobial and physiological features of these strains against plant pathogens were investigated. In addition, it was detected that mutant *T.harzianum* isolates had effects on plant fungal pathogens by the means of filtrate, volatile compounds and enzymatic activities.

It was found that T11 against *Fusarium oxysporum* and *Fusarium moniliforme*, T4A against *Fusarium solani* and *Fusarium culmarum* 2, T21 against *Fusarium culmarum* 1, T10 against *Rhizoctania solani*, T4C against *Drechslera sorokniana* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and T4D against *Sclerotium rolfsii* had been effective.

Keywords: *Trichoderme harzianum*, Antifungal, Mutant, Biological Control

TEŞEKKÜR

Bitkisel ürünlere bitki fungal patojenlerin verdiği zararın doğal yollardan kontrol edilmesi, sürdürülebilir bir doğal yaşam için son derece önemli ve aynı zamanda büyük bir ekonomik değer taşımaktadır. Bu kapsamda, mutant *Trichoderma harzianum*'un biyolojik kontrolde kullanılabilirliğinin araştırılmasında ve Yüksek Lisans Tezimin hazırlanmasında değerli yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Değerli bilgi birikimleri ve deneyimlerinden faydalandığım Biyoloji Bölümü Doktora Programı öğrencisi Sayın Çiğdem KÜÇÜK'e ve Sayın Uzman Erdoğan ÇAKIR'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında her türlü desteğini gördüğüm Bölge Müdürüm Sayın Ali UZMANOĞLU ve mesai arkadaşlarıma, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen aileme ve yazımdaki desteğinden dolayı eniştem Halil İbrahim KÖSELER'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE YÖNTEM	13
2.1. MATERYAL	13
2.1.1. Kullanılan Mikroorganizmalar	13
2.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler	13
2.1.2.1. Patates Dekstroz Agar (Merck)	13
2.1.2.2. Malt Ekstrakt Agar (Merck)	14
2.1.2.3. Chapex-Dox Agar	14
2.1.2.4. Sukroz İçermeyen Chapek-Dox agar	14
2.1.2.5. Karbon kaynaklarının asimilasyonu için katı ortam	15
2.1.2.6. Karbon kaynaklarının asimilasyonu için sıvı ortam	15
2.1.2.7. Azot kaynaklarının asimilasyonu	16
2.1.2.8. Azot kaynaklarının asimilasyon için sıvı ortam	16
2.1.2.9. Bazal Ortam	17
2.1.2.10. A Ortamı	17
2.1.2.11. B Ortamı	17
2.1.2.12. Farklı pH ortamları	18

2.2. YÖNTEM	19
2.2.1. <i>Trichoderma sp.</i> Mutant Suşlarının Eldesi ve İzolasyonu	19
2.2.2. Mutant <i>Trichoderma harzianum</i> Filtratlarının Antifungal Özelliğinin Araştırılması	19
2.2.3. Agar Ortamında Bitki Patojenlerinin İnhibisyonu	19
2.2.4. Mutant <i>T.harzianum</i> 'un Uçucu Bileşenlerinin Bitki Patojenlerini İnhibisyonu	20
2.2.5. Fungal İnhibisyon testleri	20
2.2.6. <i>Trichoderma harzianum</i> İzolatlarının Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	21
2.2.6.1. Aesculin Hidrolizi	21
2.2.6.2. Nişasta Hidrolizi	21
2.2.6.3. Tween 80 Hidrolizi	21
2.2.6.4. Sellüloz Hidrolizi	22
2.2.6.5. Kazein Hidrolizi	22
2.2.6.6. Jelatin Hidrolizi	22
2.2.6.7. Tellur Hidrolizi	22
2.2.6.8. Polypeptate Hidrolizi	23
2.2.6.9. Tetrazolium İndirgenmesi	23
2.2.7. Koloni Morfoloji	23
2.2.8. Fizyolojik Özellikler	23
2.2.8.1. Preparat Hazırlanması	23
2.2.8.2. Katı Ortamda Gelişme	24
2.2.8.3. Karbon Kaynaklarının Asimilasyon Testleri	24
2.2.8.3.1. Katı Karbon Ortamları	24
2.2.8.3.2. Sıvı Karbon Ortamları	24
2.2.8.4. Azot Kaynaklarının Asimilasyon Testleri	24
2.2.8.4.1. Katı Azot Ortamları	24
2.2.8.4.2. Sıvı azot ortamları	25
2.2.8.5. Farklı sıcaklık değerlerinde gelişme	25
2.2.8.6. Farklı pH değerinde gelişme	25

3. BULGULAR	26
3.1. Mutant <i>T.harzianum</i> 'un Filtratlarındaki Antifungal Özelliklerin Belirlenmesi	26
3.2. Fungal İnhibisyon Testleri	42
3.3. Mutant <i>Trichoderma harzianum</i> İzolatlarının Enzim Aktiviteleri	45
3.4. Koloni Morfolojisi	49
3.5. Fizyolojik Testler	49
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	52
4.1. Mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Antifungal Etkileri	52
4.2. Fungal İnhibisyon	54
4.3. Fizyolojik Özellikler	57
5. KAYNAKLAR	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

3.1. <i>F.oxysporum</i> 'un gelişmesi üzerine mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Filtrattaki Etkisi	27
3.2. <i>F.moniliforme</i> 'nin gelişmesi üzerine mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Filtrattaki Etkisi	27
3.3. <i>F.solani</i> 'nin gelişmesi üzerine mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Filtrattaki Etkisi	28
3.4. <i>F.culmorum</i> 1'in gelişmesi üzerine mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Filtrattaki Etkisi	28
3.5. <i>F.culmorum</i> 2'ningelişmesi üzerine mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Filtrattaki Etkisi	29
3.6. <i>R.solani</i> 'nin gelişmesi üzerine mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Filtrattaki Etkisi	29
3.7. <i>S.rolfsii</i> 'nin gelişmesi üzerine mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Filtrattaki Etkisi	30
3.8. <i>D.sorokiniance</i> 'nin gelişmesi üzerine mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Filtrattaki Etkisi	30
3.9. <i>G.graminis</i> 'in gelişmesi üzerine mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Filtrattaki Etkisi	31
3.10. Katı besiyerinde <i>F.oxysporum</i> 'un gelişmesi üzerine mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Etkisi	32
3.11. Katı besiyerinde <i>F.moniliform</i> 'un gelişmesi üzerine mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Etkisi	32
3.12. Katı besiyerinde <i>F.solani</i> 'nin gelişmesi üzerine mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Etkisi	33
3.13. Katı besiyerinde <i>F.culmorum</i> 1 'in gelişmesi üzerine mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Etkisi	33
3.14. Katı besiyerinde <i>F.culmorum</i> 2'nin gelişmesi üzerine mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Etkisi	34
3.15. Katı besiyerinde <i>R.solani</i> 'nin gelişmesi üzerine mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Etkisi	34

3.16. Katı besiyerinde <i>S.rolfsii</i> 'nin gelişmesi üzerine	
mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Etkisi	35
3.17. Katı besiyerinde <i>D.sorokiniance</i> 'nin gelişmesi üzerine	
mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Etkisi	35
3.18. Katı besiyerinde <i>G.graminis</i> 'in gelişmesi üzerine	
mutant <i>T.harzianum</i> Suşlarının Etkisi	36
3.19. T10 Suşunun Bitki Patojenlerine Karşı Oluşturduğu Uçucu Bileşikler ...	37
3.20. T8D Suşunun Bitki Patojenlerine Karşı Oluşturduğu Uçucu Bileşikler ...	37
3.21. T18 Suşunun Bitki Patojenlerine Karşı Oluşturduğu Uçucu Bileşikler	37
3.22. T11 Suşunun Bitki Patojenlerine Karşı Oluşturduğu Uçucu Bileşikler	38
3.23. T4A Suşunun Bitki Patojenlerine Karşı Oluşturduğu Uçucu Bileşikler ...	38
3.24. T21 Suşunun Bitki Patojenlerine Karşı Oluşturduğu Uçucu Bileşikler	38
3.25. T4C Suşunun Bitki Patojenlerine Karşı Oluşturduğu Uçucu Bileşikler....	39
3.26. T8B Suşunun Bitki Patojenlerine Karşı Oluşturduğu Uçucu Bileşikler	39
3.27. T4D Suşunun Bitki Patojenlerine Karşı Oluşturduğu Uçucu Bileşikler	39
3.28. T2 Suşunun Bitki Patojenlerine Karşı Oluşturduğu Uçucu Bileşikler	40
3.29. T9 Suşunun Bitki Patojenlerine Karşı Oluşturduğu Uçucu Bileşikler	40
3.30. T7 Suşunun Bitki Patojenlerine Karşı Oluşturduğu Uçucu Bileşikler	40
3.31. T20 Suşunun Bitki Patojenlerine Karşı Oluşturduğu Uçucu Bileşikler	41
3.32. Mutant <i>T.harzianum</i> T21 Suşunun <i>S.rolfsii</i> 'ye Karşı İnhibisyonu	44
3.33 Mutant <i>T.harzianum</i> T10 Suşunun <i>R.solanii</i> 'ye Karşı İnhibisyonu	44
3.34. Mutant T18'in Aesculin içeren ortamda gelişimi	47
3.35. Mutant T8B'nin Aesculin içeren ortamda gelişimi	47
3.36. Mutant T4A'nin Tween 80 içeren ortamda gelişimi	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. <i>Trichoderma</i> türlerinin etkilediği toprak kökenli funguslar	3
3.1. <i>T.harzianum</i> suşlarının bitki patojenlerine inhibisyonu	43
3.2. <i>T.harzianum</i> suşlarının enzim aktiviteleri	46
3.3. <i>T.harzianum</i> suşlarının karbon kaynaklarında asimilasyon reaksiyonları .	50
3.4. <i>T.harzianum</i> suşlarının azot kaynaklarında asimilasyon reaksiyonları ...	51
3.5. <i>T.harzianum</i> suşlarının farklı sıcaklık ve pH ortamlarında gelişmesi	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

RI : İnhibisyon değeri

R₁ : Antagonist patojen yönündeki büyüme çapı,

R₂ : Antagonist ile patojenin aşılama durumları arasındaki mesafedir.

1. GİRİŞ

Tarımsal ürünlerin yaklaşık olarak 1/3 üne yakın kısmının, zararlı organizmalar tarafından yok edilmekte olduğu bilinmektedir. Zararlı organizmalar; bitki sağlığı ve verimini olumsuz yönde etkileyen böcekler, akarlar, yabancı otlar, nematodlar, kemirgenler, fitopatogenik funguslar, bakteriler ve virüsler gibi biyolojik canlılardır. Bu patojenler tarafından oluşturulan hastalıkların bitki sağlığını ve verimini olumsuz şekilde etkilediği, bitkilerde hastalık semptomlarının oluşmasına ve ürün kayıplarına neden olduğu bilinmektedir [1].

Tarımsal ürün kayıplarının önlenmesi, çok önceden beri üzerinde büyük önemle çalışılan bir husustur. Bu amaçla birçok yöntem geliştirilmiştir. Bunların başında organik kimyasallar ve pestisidlerin kullanımı gelmektedir. Etkili bir yöntem olmakla birlikte, bu kimyasalların doğada kalıcı ve zor ayrışır olması nedeniyle, çevrede birikmekte ve ciddi bir kirliliğe yol açmaktadır. Bu durumun doğal bir sonucu olarak, bu maddeler besin zinciri yoluyla tarımsal ürünlere geçmekte, dolayısıyla insan ve diğer canlılar için önemli bir toksik tehlike oluşturmaktadır. Ayrıca, canlı bünyesinde kullanılan bu maddelere karşı direnç geliştirmesi sebebiyle, bu kimyasalların etkileri zaman içerisinde göreceli olarak azalmakta ve bunun sonucu olarak ta; ya kullanılan kimyasal maddenin dozu arttırılmak zorunda kalınmakta, yada bu kimyasalların yeni kuşak versiyonları geliştirilmek zorunda kalınmaktadır. Bu durumun çevreyi ve besin kirlenmesini, sürekli ve zincirleme olarak tahrik etmekte olduğu yadsınamaz bir gerçektir. Bu tehlikenin de artarak süregelmesi, bilim adamlarını, zararlı mikroorganizmaların bu önemli ve yıkıcı etkisini, çevreye zarar vermeden bertaraf etmeye yönelik çözümler üretmeye zorlamıştır. Ayrıca son yıllarda üzerinde kimyasal artıklar olmayan zirai ürünlere doğru genel bir tüketici eğiliminin olması görsel açıdan her ne kadar çekici olmasada, biyolojik kontrolü daha cazip hale getirmiştir. Bu kapsamdaki en önemli çalışmalar, biyoteknolojideki gelişmelere paralel olarak, biyolojik kontrol ajanlarının kullanımını gündeme yerleştirmektedir [2, 3].

Biyolojik kontrol; modern tarımın acilen ihtiyaç duyduğu önemli bir unsurdur. Biyolojik kontrol; biyolojik etmenler kullanılarak hastalık ya da

zararlıların kontrol altına alınması olarak tarif edilmektedir. Ayrıca, biyolojik kontrol; bitki genlerinin ya da gen ürünlerinin, zararlı organizmaların popülasyonlarını azaltmak ya da hastalık sürecinin ana adımlarını engellemek için kullanılmasını da içermektedir.

Biyolojik kontrol organizmaları; zararlı organizmaların popülasyonunu azaltan, bitkiyi koruyan yada hastalık gelişimini bastıran, doğal organizmaları ve antagonistleri içermektedir. Bunlar bakteriler, virüsler, funguslar, faydalı böcekler ve yüksek bitkiler olabilmektedir. Bu amaçla biyolojik kontrolde kullanılacak mikroorganizmaların spesifik, güvenilir, stabil ve ekonomik olması gerekmektedir [2].

Bünyelerinde barındırdıkları değişik özellikleri nedeniyle biyolojik kontrolde kullanılan bakteri, fungus gibi mikroorganizmaların, bitki patojenlerinin büyümesine ve/veya yaşamasına engel olma potansiyeli bulunmaktadır. Günümüzde mikroorganizmaların kullanıldığı preparatlar biyolojik kontrolde geniş ölçüde kullanılmaktadır [2].

Biyolojik kontrolde kullanılan fungusların ; türce fazla olmaları, konukçularının iyi bilinmesi, suni besiyerlerinde kolay üretimleri ve ticari üretim için uygun olmaları önemlerini artırmaktadır [2].

Toprakta ve daha az oranda bitkinin toprak üstü organlarında bulunan *Trichoderma*, *Penicillium* ve *Gliocladium* gibi fungusların bitkilerde hastalık oluşturan funguslara karşı etkili oldukları bilinmektedir [4].

Son yıllarda biyolojik kontrol ajanları üzerinde yapılan muhtelif çalışmalar, *Trichoderma* spp. ve bunların mutant suşlarının toprak kökenli bitki fungal patojenleriyle mücadelede kullanılmakta etkili oldukları , önemli bir çözüm alternatifi olabilecekleri ve biyolojik kontrolde gelecek vaad ettiği ortak noktasında birleşmektedir [4, 5]. *Trichoderma* türlerinin etkilediği bazı funguslar Çizelge 1.1 de verilmiştir.

Trichoderma türlerinin çeşitli topraklarda bulunduğu, mikrobiyal inhibitörlere karşı dirençli oldukları, ürettikleri değişik metabolitler ile organik substratları indirgeyebilme yeteneklerinin olduğu bilinmektedir [3]. Ayrıca *Trichoderma* ve mutant suşlarının; patojenlere mikoparazit ajan olabilen,

Çizelge 1.1. *Trichoderma* türlerinin etkilediği toprak kökenli funguslar [2]

Antagonist Fungus	Etkilediği Fungus
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Verticillium dahliae</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Sclerotium rolfsii</i> <i>Phytophthora citrophthora</i> <i>Botrytis allii</i> <i>Pythium ultimum</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Gaeumannomyces graminis</i> <i>Heterobasidion annosum</i> <i>Sclerotinia homeocarpa</i>
<i>Trichoderma lignorum</i>	<i>Colletotrichum spp.</i> <i>F.solani</i>
<i>Trichoderma aureoviride</i>	<i>Rosellinia necatrix</i> <i>Sclerotium cepivorum</i>
<i>Trichoderma polysporum</i>	<i>Heterobasidion annosum</i>
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
<i>Trichoderma viride</i>	<i>Verticillium dahliae</i>

antibiyotik aktivite gösterebilen, metabolit üretebilen, substrat üzerinde hızla gelişebilen izolatlar olduğu da saptanmıştır [4, 6-8].

Trichoderma türleri, yaklaşık 200 yıl önce, topraktan ve çürümüş organik materyallerden izole edilmiştir. İlk kez Weedling tarafından, 1932-1934 yıllarında, *Trichoderma* türlerinin antibiyotik üretimi ve mikoparazitlik aktivitesi belirlenmiştir. *Trichoderma* türlerinin bitki hastalıklarının biyolojik kontrolünde potansiyel bir kullanımı olabileceği bildirilmiştir. Rifaii ; 1969'da tarım topraklarında yaygın olarak bulunan *Trichoderma* türlerini toplayarak incelemiştir [1, 9]. Daha sonra 1971 yılında *Trichoderma* türlerinin antagonistik özellikleri üzerinde geniş bir çalışma yayınlanmıştır. 1972 yılında *Trichoderma*'nın tarla şartları altında ilk biyolojik kontrol deneyleri Weels ve ark. [10] tarafından yapılmıştır.

Bu çalışmadan sonra birçok *Trichoderma* izolatının sera ve tarla şartlarında toprak-kaynaklı hastalıkların kontrolünde başarı ile kullanılabilmesi saptanmıştır [1,13,18,48]. Günümüzde ise bitki hastalıklarının kontrolü için *Trichoderma*'dan elde edilen preparatlar İsrail'de 'Trichoderma 2000' ismiyle biofungisit olarak ziraatte kullanılmaktadır [2].

Trichoderma türlerinin; bitki gelişmesini hızlandırması, bitki savunma mekanizmalarını stimüle ederek bitkileri toprak kaynaklı patojenlere karşı dirençli hale getirmesi ve çeşitli antibiyotik bileşikler üretebilmeleri günümüzde *Trichoderma*'nın, biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılma oranını artırmaktadır [2, 11,15]. *Trichoderma* türleri içerisinde de *Trichoderma harzianum* Rifaii'nin; biyolojik kontrol çalışmalarında üzerinde en fazla durulan ve en etkilisidir [12,13]. Yapılan çalışmalarda *T.harzianum*'un toprak kaynaklı bitki patojenlerinin neden olduğu hastalıklar üzerine etkili olduğu ortaya konmuştur [1,13,48].

Hadar ve ark. [14] , bağ yapraklarının gümüş rengine dönüşmesine neden olan, erik ağaçlarında, fide ve seradaki süs bitkilerinde hastalık oluşturan *Botrytis cinerea*'nın kontrolünde *T.harzianum*'un kullanılabilmesini bildirmişlerdir. *Trichoderma harzianum*' dan hazırlanan 'Trichodex' adı verilen preparatın üzüm bağlarındaki hastalığı %84 oranında azalttığını saptamışlardır.

Toprak solarizasyonu ve *Trichoderma harzianum* kombinasyonu ile, *S.rolfsii* ve *R.solani*'nin neden olduğu hastalıkların kontrolünün yapıldığı saptanmıştır [2].

Ordentlich ve ark. [15], sürülen topraklara *Trichoderma harzianum*'un eklenmesinin, tarlada salatalık ürün çürüklüğüne neden olan *Rhizoctonia solani*'nin kontrolünde etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Phytium, *Fusarium*, *Rhizoctonia* gibi fırsatçı patojenlerin genç bitki tohumlarına saldırılarıyla ortaya çıkan damping-off (çökerten) hastalığının mücadelesinin biyolojik olarak *Trichoderma harzianum* ve *Trichoderma hamatum* ile yapılabileceği bildirilmiştir [16].

R.solani'nin neden olduğu salatalık ve biber fidelerindeki çökerten hastalığına karşı *T.harzianum* ile yapılan hastalık kontrolünün %52, *S.rolfsii*'nin neden olduğu fasulye, pamuk ve domates kök çürüklüğünün kontrolünün ise %60 oranında olduğu bildirilmiştir [17].

Trichoderma preparatlarının buğday-kepek karışımı ile, fasulye, domates, patlıcan ve turp tohumlarındaki *R.solani*'yi kontrol etmede sera şartlarında etkili olduğu saptanmıştır [10]. Tahıllarda kök çürümelerine neden olan *Fusarium spp.*, buğday köklerini enfekte eden *Gaeumannomyces graminis* funguslarına karşı *Trichoderma* ile yapılan biyolojik kontrol çalışmalarının olumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir [10, 18].

Pamuk tohumları ile yapılan deneylerde *P.ultimum*'un neden olduğu fide hastalıklarının kontrolünün de, *Trichoderma spp.* ile sağlanabileceği bildirilmiştir [18].

T.harzianum, domates taç çürüklüğünün etmeni olan *F.oxysporum .sp. radidis lycopersici*'ye karşı biyokontrol ajan olarak kullanıldığında hastalık kontrolünü %48 oranında sağlandı bildirilmiştir [19].

Inbar ve ark.[6] yaptıkları bir çalışmada, *Trichoderma harzianum* ile muamele edilmiş salatalık ve biber fidelerinin hem daha iyi geliştiği ve yüksek klorofil içeriğine sahip olduğu, hem de *Phytium spp.* ve *R.solani*'nin neden olduğu çökerten hastalığına(damping-off) karşı dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Otoklavlanmış topraklara *Trichoderma harzianum* inokule edildiğinde çavdarda hastalık oluşturan *Sclerotium rolfsii*'ye karşı başarı elde edildiği bildirilmiştir [2].

Küçük [48] Eskişehir topraklarından izole ettiği *Trichoderma* T8 izolatının domatesde *F.oxysporum*'un , mısırdaki *F.moniliforme*'nin , fasulyede *R.solani*'nin oluşturduğu hastalık şiddetini düşürdüğünü, yine *T.harzianum* T20 izolatının buğdayda *G.graminis* var. *tiritici*'nin oluşturduğu hastalığın şiddetini sera koşullarında azaltmada etkili olduğunu bildirmiştir.

Altmış yılı aşkın süreden beri yapılmakta olan çalışmalar, toprak kaynaklı bitki patojenlerinin neden olduğu hastalıklar üzerinde, *Trichoderma* türlerinin azaltıcı etkisi olduğunu göstermekle birlikte; bu etkinin hangi mekanizma[lar] ile olduğu tam olarak açıklanamamıştır. Ancak bunun lizis, mikoparazitizm, antibiyozis, rekabet, bitki büyümesinin ve bitki savunma mekanizmalarının teşvik edilmesi veya bunların kombinasyonu şeklinde olabileceği ileri sürülmektedir [6,13,20-25].

Birçok fungus toprak kökenli bitki patojenlerine parazittir. Mikoparazit fungusun konukçuyu dallanmış hifleriyle kuşattığı, sahip oldukları hidrolitik enzimler ile, konukçu hücre duvarının içine nüfuz ederek, hücreyi parçalayarak öldürdüğü bildirilmiştir [19, 26-27].

Barnett ve Binder [28] tarafından mikoparazitizm; biyotrofik ve nekrotrofik olarak iki kısımda incelenmiştir. Araştırmacılar; biyotrofik mikoparazitlerin kısıtlanmış konukçu oranına sahip olduğunu ve konukçudan besin ihtiyaçlarını karşılamak için özel yapılar ürettiğini bildirmişlerdir.

Nekrotik mikoparazitlerin ise daha saldırgan olduğu, daha geniş konukçu oranına ve çeşitliliğine sahip olduğu bildirilmiştir. Doğada yaygın olarak bulunmaları ve saprofitik özellikleri nedeniyle biyokontrolde kullanılan mikoparazitlerin çoğunluğunun nekrotroflar olduğu saptanmıştır [28-30]. *Trichoderma spp*'lerde bu grupta değerlendirilmektedir.

Neethling ve Nevalainen [39], mikoparazitik *Trichoderma* türlerinin miselleri ile ilgili lektinler ürettiklerini bildirmişlerdir.

Trichoderma spp.'nin ürettiği mikolitik enzimlerin konukçu hücrelerini parçalamasında önemli olduğu belirlenmiştir. Fungus hücre duvarının enzimsel

küçülmesinin, hücre duvarından glukonaz ve kitinaz enzimlerinin ayrılmasıyla oluştuğu saptanmıştır. *Trichoderma spp.* izolatının toprak kaynaklı patojenleri kontrol etme özelliğinin yüksek glukonaz ve kitinaz aktiviteleri ile ilgili olabileceği bildirilmiştir [26].

T.harzianum ile konukçu hücre duvarının parçalanması üretilen kitinaz ve β -(1-3)-glukonaz gibi ekstrasellüler enzimlerin aktivitesiyle olmaktadır [32,33]. *T.harzianum*'un ürettiği kitinaz ve β -(1-3)-glukonaz gibi enzimler ile *Pythium spp.*'nin hücre duvarındaki glukani azaltıp, patojeni etkisiz hale getirdiği belirlenmiştir. Kitinaz ve β -(1-3)-glukonaz gibi anahtar enzimlerin sklerotial duvar lizisi ve fungal hücrelerinin herbirinin parçalanmasında etkili olduğu saptanmıştır [37].

Transmission Electron Microscopy (TEM) kullanılarak parazit ile antagonist arasındaki etkileşimler çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Benhamou ve Chet [31], *Trichoderma harzianum*'un hifleri ile konukçuyu çevirerek, konukçu hiflerini sardığı ve appressorium benzeri yapı oluşturarak mikoparazit etki yaptığını bildirmişlerdir. *Trichoderma harzianum*'un hiflerinin, *R.solani*'yi sararak büyümesini sınırlandırdığı ve *R.solani* hiflerinin turgorunun azalarak hızla çöktüğü Chet ve ark. [32], tarafından bildirilmiştir. *T.harzianum*-*R.solani* çift kültürünün etkileşimli alanı TEM'de (Transmission Electron Microscopy) incelenmiş ve etkileşimin en çok *R.solani*'nin dış matriksinde olduğu belirlenmiştir [31-33]. Araştırmacılar, parazitizm aşamasının sadece yüzeyde olmadığı, konukçu hücresi içinde plazma membranının çekilmesi, stoplazmanın toplanması gibi geniş çapta değişikliklerin olduğu saptamışlardır.

T.harzianum'un hifinin *R.solani* hücrelerine adhezyonundan hemen sonra *R.solani* hücre duvarında değişiklik olduğu ve parçalanmaya başladığı saptanmıştır. Ayrıca *R.solani*'nin dış duvar katmanında önemli ölçüde N-asetil glukoz aminin azalmasını, *Trichoderma spp*'nin ürettiği kitinazdan dolayı olduğu bildirilmiştir [34]. Konukçunun iç duvar katmanlarındaki N-glukoz amin miktarının değişikliğinin *Trichoderma spp*'nin ürettiği hidrolitik enzimlerin difüzyonundan dolayı olduğu saptanmıştır [35].

Trichoderma harzianum ve *S.rolfsii*'nin etkileşimli alanlarından alınan örneklerde de *S.rolfsii* hücre duvarının *Trichoderma harzianum* hifleri ile çevrildiği ve hemen penetre olduğu Elad ve ark. [36] tarafından gözlemlenmiştir.

Fusarium oxysporum'un hücre duvarının *R.solani* ve *S.rolfsii*'ye göre daha dirençli olduğu saptanmıştır [10]. Elad ve ark. [34] tarafından yapılan çalışmada *Fusarium spp.*'nin hücre duvarını, parçalanmaya karşı hiflerindeki musilaj tabakasının koruduğu saptanmıştır. *F.oxysporum*'un hücre duvarının diğer funguslara göre daha fazla protein içerdiği de belirlenmiştir [10,34].

Mikroorganizmaların ölüm sebepleri arasında en yaygın olanı açlıktır. Bu yüzden besin faktörlerini sınırlandırmadaki rekabet özellikle karbon, azot, demir, bitki patojenlerinin biyolojik kontrolünü sağlamaktadır. Özellikle demirin bakteriyel biyolojik kontrol üzerine etkisi konusundaki çalışmalarda yoğunlaşmıştır [2].

Funguslarda, antagoniste karşı azalan biyolojik ve kimyasal dirençlilik yeteneğinin, içerdikleri melanin miktarından kaynaklandığı bildirilmiştir [31]. Elad ve ark. [34] tarafından, *Trichoderma* türlerinin miselyumları ile konukçu hücre arasındaki etkileşiminin, osmofilik durumlara neden olduğu saptanmıştır.

Katı besi ortamında hızla gelişen *Trichoderma harzianum* ve *T.polysporum*'dan elde edilen peletlerin arpa, buğday tohumlarına veya torf ve buğday-kepek karışımları ile tarlaya uygulanmasının bitki hastalıklarında önemli düşüşler sağladığı bulunmuştur [3,21]. *Trichoderma harzianum*'un pH 6.5 veya daha altındaki topraklarda oldukça aktif antogonistik özellik gösterdiği saptanmıştır [30,38].

Tarla şartlarında ve laboratuvarında yapılan deneylerde *Trichoderma harzianum* bitki patojenlerine mikoparazit ve antogonist özellik göstermiştir. *Trichoderma harzianum* izolatları, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* ve *Pythium aphanidermatum*'a karşı etkili olduğu bulunmuştur [30]. *Trichoderma harzianum*'un ayrıca lignosellülozların yıkımında da rol oynadığı bildirilmiştir [17, 30].

T.harzianum'daki membranla sıkı bir ilişkiye giren ve iyonofor aktivitesi gösteren bileşiklerin hücre membranının permeabilitesini azaltarak, antogonistik aktiviteyi gerçekleştirdiği ortaya konmuştur [41].

Biyolojik kontrol ajanları ile yapılan çalışmalarda metabolit üretimi geniş ölçüde incelenmiştir. İn vitro çalışmalar *T.harzianum*'un bitki patojenlerine karşı etkisinin antibiosis ile ilişkili olduğu belirlenmiştir [42-45]. *Trichoderma* türlerinin in vitro olarak birçok toksik metabolit ürettiği, ayrıca topraktaki organik materyalde de toksik metabolitler üretebildiği bildirilmiştir [7,46,47].

Trichoderma türlerinin toksik metabolit üretimine ait ilk geniş bilgiler Weindling tarafından ortaya konmuş ve *T.lignorum*'un antifungal metabolit ürettiği kanıtlanmıştır. *Rhizoctonia solani* ye karşı toksik kristal formda organik bir metabolit olan glitoksin izole edilmiştir. Ayrıca *T.viride* tarafından üretilen viridin'in oldukça etkili bir antibiyotik olduğu kanıtlanmıştır . Bununla birlikte daha farklı antibiyotiklerde ürettiği de belirlenmiştir [12].

Trichoderma türleri farklı ışıklarda; viridin, viridiol, gliovirin, heptolidik asit, gliotoksin gibi farklı antibiyotikleri üretmektedir. Özellikle *Trichoderma harzianum* esas uçucu antibiyotik olan 6-penty- α -pyrone (6-PAP) üretmektedir [4].

Trichoderma harzianum'un iki izolatının hindistan cevizi aromalı ürünler ürettiği saptanmıştır. İki izolatında 6-n-pentyl-2H-pyran-2-1 (6PP,1) ve dehidroanalogue ürettiği bulunmuştur [22].

Trichoderma harzianum'un 70 izolatının 1-hidroksi ve 1,8 dihidroksi-3-metilan-trakuinan'ı sıvı ortamda ürettiği ve *G.graminis*'in gelişmesini engellediği belirlenmiştir. *T.harzianum*'un bazı izolatlarının da bu fungusun agarlı ortamda gelişimine az oranda etkili olduğu fakat bu izolatların, patojen yokluğunda veya buğdayda patojen varlığında bitkinin kök uzunluğunu arttırdığı bildirilmiştir [55].

T.hamatum'un trichoviridin, isocyanide, isonitrile antibiyotiklerini ürettiği saptanmıştır. Isonitrile'nin ayrıca *T.harzianum*, *T.koningii*, *T.polysporum* (= *Tolypocladium niveu*) ve *T.viride* Pers ex Gray türleri tarafından da üretildiği belirtilmiştir [12]. *T.hamatum*'un sıvı ortamda üç farklı isonitril ürettiği Ghisalberti ve ark. [12] tarafından saptanmıştır. Isonitril A; gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler, mayalar ve filamentli funguslara karşı oldukça etkili olarak bulunmuştur, diğer iki bileşiğin etki alanının oldukça sınırlı olduğu belirtilmiştir [12].

Dermatin (II) ilk kez *T.viride*'nin izolatlarından üretilmiştir. Ayrıca *T.viride* izolatlarında 6-pentenyl- α -pyrone, 6PP, trichoviridin, heptelik asit, trichodermin üretildiği bildirilmiştir [12].

İlk antibiyotik bileşiklerin *T.koningii*'nin izolatlarında üretildiği bildirilmiştir. *T.koningii*; dermadin ve trichoviridin metabolitlerini üretmektedir. Dermadin'in; gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere, geniş çeşitlilikte funguslara karşı etki gösterdiği, trichoviridin'in ise; *Escherichia coli* Castel ve Chalm *Trichophytom asteroides*'e (= *T.mentagrophytes* (Robin) Blanch.) etkili olduğu bildirilmiştir [12]. Ayrıca *Phytophthora cinnamoni* Rands'ın oosporlarına karşı *T.koningii*'nin bazı izolatlarının uçucu metabolitler ürettiği saptanmıştır. *T.koningii* ve *T.viride* izolatlarının heptelik asit ürettikleri saptanmıştır. Heptelik asidin, *R.solani* ve *Bacteriodes fragilis* gibi anaerob bakterilerde ve fare hücrelerinde etkili olduğu bildirilmiştir [12].

T.koningii'nin ürettiği uçucu antibiyotiklerin *R.solani* ve *Heterobasidion annosum*'a karşı etkili olduğu ve ayrıca birçok izolatının da uçucu olmayan antibiyotik ürettiği saptanmıştır [12].

Trichoderma harzianum'un isonitril antibiyotik üreterek patojenlere etkili olduğu ortaya konmuştur [40]. Yine araştırmacılar U.V. ile mutasyona uğratılan suşların homotallin II ürettiğini ve bu mutant suşların *Pythium ultimum*, *R.solani*, *F.oxysporum*' a etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Son yıllarda fungal teknolojisinde endüstriyel ürün ve metabolitlerin üretilmesinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Sera ve laboratuvar çalışmalarında kullanılacak *Trichoderma* türlerinin katı besi ortamında çabuk geliştiği belirlenmiştir. *Trichoderma polysporum* ve *Trichoderma harzianum*'dan elde edilen peletler arpa ve buğday tohumlarına uygulanarak yada buğday-kepek karışımları ile beraber tarlada biyolojik kontrol amacı ile uygulanmaktadır. [4,39].

Çevre koşulları altında, doğadaki mevcut hemen tüm organizmalar, sürekli bir değişim sürecindedirler. Özellikle, genetik yapıdaki değişiklikler, sürekli ve kalıcı olmaktadır. Bu nedenle organizmaların ürettikleri veya salgıladıkları enzim veya diğer metabolitleri de farklılık göstermektedir. Mutasyona uğramış *Trichoderma harzianum*'un değişik antibiyotikler ve

metabolitler ürettiği saptanmıştır [5]. Mutant *Trichoderma* türlerinin bitki patojenlerine karşı farklı etkinlikler gösterebileceği beklenmektedir.

Günümüzde organik kimyasallar ve pestisidlerin kullanımını mümkün olduğu kadar azaltarak, çevre kirliliğine ve besin toksisitesine neden olmadan verimli bitki yetiştiriciliği amaçlanmaktadır. Bir yanda bitki hastalıklarını kontrol etmek için yıkıcı küflerin kullanılmasına dair artan ilgi, diğer yanda biyoteknolojideki büyüleyici gelişmeler bitki korumasının amaçlandığı tarım biyoteknolojisindeki yoğun araştırmalara neden olmuştur. Meyva ve sebzelerin hastalık harici klonlanması, süs mahsulleri, böcek ve mikrobik patojenlere karşı bitkilerin korunması, yabancı otlar ve biyolojik öldürücü ilaçlar bu konunun kapsamı içerisinde yer almaktadır.

Bitki hastalıklarının biyokontrolü açısından tabii, yararlı karşı koruyucu küfün kullanımını en azından 20 yıldır üzerinde çalışılan bir konudur. Bazı durumlarda biyokontrol türleri çevreye zarar vermeksizin kimyasal küflere uygun alternatif olarak hizmet edebilirler. Bununla beraber modern tarımın entegre bir parçası olabilmesi için biyolojik kontrolle ilgili daha fazla araştırmaya gerek vardır. Zaten elde edilen başarılarla rağmen ve bunlar önemli olduğu halde sayıları az ve birbirinden uzaktır. Onun potansiyel olarak gerçekleştirilebilmesi için, daha temel ve uygulanmış araştırmalar gereklidir. Biyoteknolojinin iç disiplinli tabiatı yüzünden; geniş ölçekteki bilim adamı, çiftçi ve uzman grubu arasındaki yardımlaşmaya da ihtiyaç bulunmaktadır. Biyolojik kontrol ; kimyasal mücadelenin mümkün olmadığı birçok durumda da başvurulabilecek etkili bir yol olarak gözükmektedir. Ayrıca fazla masraf gerektirmemektedir. Önceki yıllarda biyoteknoloji, önemli mahsullerin ekonomik anlamda iyileşmesinin pratik katkılarıyla hızla gelişmiştir. Küf üzerine yapılan sahalarda test edilebilen ürün prototiplerini ürün olarak verdi. Şu anda biyolojik kontrolün hızla yükselen ilerleme aşamalarını geliştirebileceği, yeni bir çağın başlangıcındayız.

Trichoderma'nın bilinen özellikleri dikkate alınarak, ekolojik faktörlere göre özelliklerinin değişebilecek olması nedeniyle, daha önce Eskişehir ve çevresindeki toprak örneklerinden izole edilen ve mutant hale getirilen *Trichoderma* suşlarının antifungal etkisi araştırılmaya çalışılmış ve bitki patojenlerinden ; *Sclerotium rolfsii*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*,

Rhizoctonia solani, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmarum* 1, *Drechslera sorokiniancea*, *Fusarium culmarum* 2, *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme*'ye etkili olan 13 *Trichoderma harzianum* mutant suşunun morfolojik ve fizyolojik özellikleri karşılaştırılarak aralarındaki farklılıklar belirlenmeye çalışılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. MATERYAL

2.1.1. Kullanılan Mikroorganizmalar

Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarlarından sağlanan *Trichoderma harzianum* T1, T3, T4, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T14, T15, T18, T19, T20, T21 ve T22 suşlarının, Ultra Viyole lamba ışığı etkisi altında mutasyona uğratılmasıyla elde edilen T2, T4A, T4C, T4D, T7, T8B, T8D, T9, T10, T11, T18, T20 ve T21 mutant suşları kullanılmıştır.

Bitki patojenlerinden *Sclerotium rolfsii*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmarum* 1 suşları Çukurova Üniversitesi'nden *Drechslera sorokiniana*, *Fusarium culmarum* 2, *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme* suşları ise Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden sağlanarak kullanılmıştır. Mikroorganizma kültürleri kullanılıncaya kadar +4°C de saklanmıştır.

2.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler

2.1.2.1. Patates Dekstroz Agar [Merck]

Patates	4.0 g/l
D [+]glukoz	20.0 g/l
Agar	15.0 g/l

Patates Dekstroz Agar 39 g/l olacak şekilde distile suda eritilerek 121⁰C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır.

2.1.2.2. Malt Ekstrakt Agar [Merck]

Malt Extract	30.0 g/l
Mycological pepton	5.0 g/l
Agar	15.0 g/l

Malt Ekstrakt Agar 50 g/l olacak şekilde distile suda eritilerek 121⁰C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır.

2.1.2.3. Chapex-Dox Agar

Sukroz	30.0 g/l
NaNO ₃	3.0 g/l
K ₂ HPO ₄	1.0 g/l
MgSO ₄	05 g/l
KCl	0.5 g/l
Ferrous sülfat	0.01 g/l
Agar	15.0 g/l
Disitile su	1000 ml

Besiyeri içeriği disitile suda çözülerek pH 7.3'e ayarlanıp, 121⁰C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır.

2.1.2.4. Sukroz İçermeyen Chapek-Dox agar

Chapek-dox agar içine sukroz yerine ayrı ayrı laktoz, sukroz, eriyebilir nişasta, amanyum okzalat 30 g/l olacak şekilde ilave edilip, 121⁰C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır.

2.1.2.5. Karbon kaynaklarının asimilasyonu için katı ortam

Chapek-Dox agara ayrı ayarı ilave edilen %0.05'lik CuSO_4 , %0.001'lik CuSO_4 , %0.05'lik kristal viyole, %0.001'lik kristal viyole ve Malt Ekstrakt agara (MEA) ayrı ayrı %0.05'lik CuSO_4 , %0.001'lik CuSO_4 , % 0.05'lik kristal viyole, %0.001'lik kristal viyole ilave edilip hazırlanmıştır. Ortamların pH'sı 4.5'a ayarlanıp, 121°C 'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır [50].

2.1.2.6. Karbon kaynaklarının asimilasyonu için sıvı ortam

NaNO_3	2.0 g/l
KH_2PO_4	1.0 g/l
MgSO_4	0.5 g/l
KCl	0.5 g/l
CaCl_2	0.5 g/l
FeSO_4	0.01 g/l
ZnSO_4	0.01 g/l
CuSO_4	0.05 g/l
Bromkrezol moru	0.05 g/l
Sukroz	20.0 g/l
Disitile su	1 litre

Besiyeri içeriğine ayrı ayrı 30 g/l glukoz, aesculin, jelatin, etanol, 10 g/l amonyum okzalit, 10 g/l sitrik asit, 10 g/l laktik asit ilave edilerek farklı besi ortamları elde edilmiştir. Ortam pH'ları 4.5'a ayarlanmıştır. Glukoz içeren sıvı besi ortamı 121°C 'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır. Aesculin, jelatin, amonyum okzalit, laktik asit, sitrikasit içeren ortamlar ise 110°C 'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır. Etanol ise filtrasyon yoluyla steril edilerek kullanılmıştır [50].

2.1.2.7. Azot kaynaklarının asimilasyonu

Sukroz	30.0 g/l
K ₂ HPO ₄	1.0 g/l
MgSO ₄	0.5 g/l
KCl	0.5 g/l
Ferrous sülfat	0.01 g/l
Agar	15.0 g/l
Disitile su	1 litre

Besiyerine ayrı ayrı 3.0 g/l amonyum okzalat ve 3.0 g/l NaNO₃ ilave edilip iki ayrı ortam elde edilmiştir. Ortam pH'sı 4.2-4.8'e ayarlanıp 121⁰C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır [50].

2.1.2.8. Azot kaynaklarının asimilasyon için sıvı ortam

KH ₂ PO ₄	1.0 g/l
MgSO ₄	0.5 g/l
KCl	0.5 g/l
FeSO ₄	0.01 g/l
CaCl ₂	0.5 g/l
ZnSO ₄	0.01 g/l
CuSO ₄	0.01 g/l
Glukoz	10.0 g/l
Bromkrezol moru	0.05 g/l
Disitile su	1 litre

Besiyeri içeriğine ayrı ayrı 2 g/l NaNO₂, 2 g/l amonyum okzalat, 2 g/l keratin, 2 g/l glisin ilave edilerek farklı ortamlar elde edilmiştir. Ortamların pH'ları 4.2-4.8'e ayarlanıp, 110⁰C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır. 2 g/l üre içeren ortam, filtrasyon yoluyla sterilize edilerek kullanılmıştır [50].

2.1.2.9. Bazal Ortam

Mikolojik pepton	10.0 g/l
NaCl	5.0 g/l
Ca Cl ₂ .2H ₂ O	0.1 g/l
Bromkrezol moru	0.05 g/l
Agar	15.0 g/l
Disitile su	1000 ml

Besi yeri içeriği pH 5,6 olacak şekilde 1M NaOH ile ayarlanarak, 121⁰C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır [50].

2.1.2.10. A Ortamı

KH ₂ PO ₄	1.0 g/l
KCl	0.5 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g/l
CaCl ₂	0.1 g/l
Thiamin. HCl	0.001 g/l
[NH] ₂ .SO ₄	0.5 g/l
Agar	12.0 g/l
Disitile su	1000 ml

Besi yeri içeriği pH 5,6 olacak şekilde 1M NaOH ile ayarlanarak 121⁰C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır [50].

2.1.2.11. B Ortamı

NH ₄ H ₂ PO ₄	1.0 g/l
KCl	0.2 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g/l
Agar	12.0 g/l
Disitile su	1000 ml

Besi yeri içeriği pH 5,6 olacak şekilde 1M NaOH ile ayarlanarak 121⁰C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır [50].

2.1.2.12. Farklı pH ortamları

NaNO ₃	2.0 g/l
KH ₂ PO ₄	1.0 g/l
MgSO ₄	0.5 g/l
KCl	0.5 g/l
CaCl ₂	0.5 g/l
FeSO ₄	0.01 g/l
ZnSO ₄	0.01 g/l
CuSO ₄	0.01 g/l
Sukroz	20.0 g/l
Bromkrezol moru	0.05 g/l
Disitile su	1 litre

Besiyeri içeriğine; pH 2 ortamı elde edebilmek için 10 g/l sitrik asit ilave edilip otoklavlanır, pH 10 ortamı elde edebilmek için KH₂PO₄ yerine 3.75 g/l glisin ve pH 12 ortamı elde edebilmek için ise KH₂PO₄ yerine 0.2 g/l KH₂PO₄ ilave edilir. Ortamların pH'ları 1M HCl ve 1M NaOH ile ayarlanıp, 121⁰C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra kullanılmıştır [50].

2.2. YÖNTEM

2.2.1. *Trichoderma sp.* Mutant Suşlarının Eldesi ve İzolasyonu

Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarlarından sağlanan *Trichoderma harzianum* suşları, 12 cm. mesafeden 12 saat süreyle U.V. lamba (254 nm) ışığı etkisinde bırakılmıştır. Bu süre sonunda, farklı gelişim gösteren suşlar izole edilmiştir [5]. Mutasyona uğratılan ve izole edilen suşlar, Patates dekstroz agar, Malt ekstrat agar, Rose bengal agar ve yulaf unu agara ekim yapılarak, 28⁰C'de 5 gün süre ile inkübe edilmiştir.

2.2.2. Mutant *Trichoderma harzianum* Filtratlarının Antifungal Özelliğinin Araştırılması

Trichoderma harzianum'un mutant izolatları, ayrı ayrı 100 ml Patates dekstroz broth'a 20⁰C de 10 gün süre ile inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda 0.22 µm filtereden geçirilen filtratlar 2şer ml olarak petri kutularına dağıtılmış ve üzerine 25 ml ¼ Patates dekstroz agar (PDA) dökülerek karşılaştırılmıştır. Agar katılaştıktan sonra orta kısmına daha önceden ekilerek hazırlanmış olan patojen küflerin 7mm çapındaki diski yerleştirilmiştir. Petri kutuları 20⁰C de inkübe edilerek, patojenin büyüme miktarı, zon çapının her gün ölçülmesi suretiyle tespit edilmiştir [5,9]. Her bir deney 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

2.2.3. Agar Ortamında Bitki Patojenlerinin İnhibisyonu

PDA içeren petri kutularının içine steril sellofan yerleştirdikten sonra, merkeze, PDA üzerinde geliştirilen *Trichoderma harzianum*'dan steril bir mantar delici ile alınan 7 mm çapındaki disk yerleştirilmiştir. 20⁰C de 4 gün süreyle inkübe edildikten sonra, sellofan kaldırılarak uzaklaştırılmıştır. Petri kutusunun merkezine 7 mm çapında daha önceden geliştirilmiş bitki patojenleri ekilerek 20⁰C de 6 gün inkübe edilmiştir [5]. Her gün patojenin büyüme miktarı, zon çapı ölçülmek suretiyle tespit edilmiştir. Her bir deney 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

2.2.4. Mutant *T.harzianum*'un Uçucu Bileşenlerinin Bitki Patojenlerini İnhibisyonu

Petri kutularının kapağına 35 ml. PDA besiyeri dökülmüştür. Petri kutularının PDA içeren kapağına, 5mm çaplı *T.harzianum* suşlarının herbiri ayrı ayrı inokule edilmiştir. *T.harzianum* suşları gelişmeye başladıktan 2 gün sonra PDA içeren diğer petri kutularının her birine de farklı bitki patojenleri inokule edilerek, her iki petri kutuları (alt kapaklar) kenarları birbirine değecek şekilde bantlanmıştır. 6 gün boyunca *T.harzianum* suşları ve bitki patojenleri 28°C'de inkübe edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir [9]. Her bir deney 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

2.2.5. Fungal İnhibisyon testleri

Mutant *T. harzianum* (T2, T4A, T4C, T4D, T7, T8B, T8D, T9, T10, T11, T18, T20, T21) 13 suşu ile toprak kökenli bitki patojenleri (*S.rolfisii*, *F.culmarum* 1, *F.maniliforme*, *F.culmarum* 2, *F.oxysporum*, *F.solani*, *D.sorokiniana*, *R.solani* ve *G.graminis*) 7 gün boyunca PDA içeren steril petri kutularında geliştirilmiştir. Daha sonra her bir mutant *T. harzianum* suşunun bulunduğu petri kutularından alınan 7mm çapındaki disk farklı bitki patojenlerini içeren petri kutularından alınan 7 mm çapındaki disklerle aralarında 5 cm boşluk olacak şekilde PDA içeren steril petri kutularına ekilmiştir. 25°C'de 7 gün inkübasyon süresince patojen ve antagonistin büyüme miktarı zon çapları ölçülerek büyümenin antagonist tarafından engellenmesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır [49]. Her bir deney 3 kez tekrarlanmıştır.

$$RI = (R_1 - R_2) \times 100 / R_1 \quad (1-1)$$

Burada ;

RI: Büyümenin antagonist tarafından engellenmesi

R₁ : Antagonist patojen yönündeki büyüme çapı,

R₂ : Antagonist ile patojenin aşılama durumları arasındaki mesafedir.

2.2.6. *Trichoderma harzianum* İzolatlarının Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

2.2.6.1. Aesculin Hidrolizi

Chapek-Dox agara 5 g/l sukroz, 3 g/l aesculin, 0,2 g/l ferrik sitrat ilave edilerek hazırlanan ortamı içeren petri kutularının her birinin merkezine mutant *Trichoderma harzianum* izolatlarının her birinin 7 mm çapındaki diskleri inokule edilmiştir. Yirmibir gün boyunca gelişmeleri ve renk oluşumları incelenmiştir [50].

2.2.6.2. Nişasta Hidrolizi

Chapex-Dox agara sukroz yerine 10 g/l eriyebilir nişasta ilave edilerek hazırlanan ortamı içeren petri kutularının her birinin merkezine mutant *Trichoderma harzianum* izolatlarının her birinin 7 mm çapındaki diskleri inkole edilmiştir. Yirmibir gün boyunca izolatların gelişmeleri ve renk oluşumları incelenmiştir [50].

2.2.6.3. Tween 80 Hidrolizi

Bazal ortam ve sıvı Tween 80 (v/v %10) ayrı ayrı otoklavlanmıştır. Ortamlar sırasıyla 9:1 oranında karıştırılıp petri kutularına dökülmüştür. Petri kutularının her birinin merkezine mutant *Tichoderma harzianum* izolatlarının herbirinin 7 mm çapındaki diskleri inokule edilmiştir. Yirmibir gün boyunca izolatların gelişmeleri ve renk oluşumları incelenmiştir [50].

2.2.6.4. Sellüloz Hidrolizi

B Ortamına 10 g/l sellüloz ilave edilerek hazırlanan ortamı içeren petri kutularının her birinin merkezine mutant *Trichoderma harzianum* izolatlarının her birinin 7 mm çapındaki diskleri inokule edilmiştir. Yirmibir gün boyunca izolatların gelişmeleri ve renk oluşumları incelenmiştir [51].

2.2.6.5. Kazein Hidrolizi

A Ortamına 10g/l glukoz, 25ml (w/v) %15 skim milk edilerek hazırlanan ortamı içeren petri kutularının her birinin merkezine mutant *Trichoderma harzianum* izolatlarının her birinin 7 mm çapındaki diskleri inkule edilmiştir. Yirmibir gün boyunca izolatların gelişmeleri ve renk oluşumları incelenmiştir [50].

2.2.6.6. Jelatin Hidrolizi

Chapek-Dox'a jelatin 120 g/l olacak şekilde ilave edilmiştir. Otoklavlanıp, petri kutularına döküldükten sonra 1 saat 4⁰C'de soğutulmuştur. Hazırlanan ortamı içeren petri kutularının her birinin merkezine mutant *Trichoderma harzianum* inokule edilmiştir. Yirmibir gün boyunca izolatların gelişmeleri ve renk oluşumları incelenmiştir [50].

2.2.6.7. Tellur Hidrolizi

Chapex- Dox agara 0,032 g/l potasyum tellur ilave edilerek hazırlanan ortamı içeren petri kutularının her birinin merkezine mutant *Trichoderma harzianum* izolatlarının her birinin 7 mm çapındaki diskleri inokule edilmiştir. Yirmibir gün boyunca izolatların gelişmeleri ve renk oluşumları incelenmiştir [50].

2.2.6.8. Polypeptate Hidrolizi

B Ortamına 6 ml (w/v) %10 CaCl₂.2H₂O ve 0,05 g/l bromthymol mavisi ilave edilmiştir. PH 6-8'e 1M NaOH ile ayarlanmıştır. Daha sonra 35 g/l polygalactronic asit eklenerek 121⁰C'de 15 dakika otoklavlanarak hazırlanan ortamı içeren petri kutularının her birinin merkezine mutant *Trichoderma harzianum* izolatlarının her birinin 7 mm çapındaki diskleri inokule edilmiştir. Yirmibir gün boyunca izolatların gelişmeleri ve renk oluşumları incelenmiştir [50].

2.2.6.9. Tetrazolium İndirgenmesi

Chapek –Dox agara 0,064 g/l tetrazolim blue klorur eklenerek hazırlanan ortamı içeren petri kutularının her birinin merkezine mutant *Trichoderma harzianum* izolatlarının her birinin 7 mm çapındaki dikleri inokule edilmiştir. Yirmibir gün boyunca izolatların gelişmeleri ve renk oluşumları incelenmiştir [50].

2.2.7. Koloni Morfolojisi

Mutant *T. harzianum* suşlarının koloni ve spor büyüklüğü Malt Ekstrakt agarda (MEA) 25⁰C'de 14 gün boyunca incelenmiştir.

2.2.8. Fizyolojik Özellikler

2.2.8.1. Preparat Hazırlanması

Her bir suş PDA içeren steril petri kutularında 7 gün 25⁰C'de geliştirilmiştir. Sporlar %0.2'lik Tween 80 ile toplanmıştır. Sporlar iki kez Tween solusyonu ile yıkanarak 15.000 g de 5 dakika santrifüjlenmiştir [50]. 2x10⁶ spor/ml'lik spor solosyonu hazırlanmıştır.

2.2.8.2. Katı Ortamda Gelişme

Laktoz, sukroz, eriyebilir nişasta ve amonyum okzalatın ayrı ayrı ilave edildiği sukrozsuz Chapek-Dox agar içeren steril petri kutularına spor solüsyonlarından 0,5 ml inokule edilmiştir [50].

2.2.8.3. Karbon Kaynaklarının Asimilasyon Testleri

2.2.8.3.1. Katı Karbon Ortamları

Katı ortam olarak Chapek-Dox agara ayrı ayrı ilave edilen %0.05'lik CuSO_4 , %0.001'lik CuSO_4 , %0.05'lik kristal viyole %0.001 kristal viyole ve Malt Ekstrakt agara ayrı ayrı %0.05'lik CuSO_4 , %0.001'lik CuSO_4 , %0.05'lik ve %0.001'lik kristal viyole ilave edilip hazırlanan karbon kaynaklarını içeren petrilerin ortasına suşların 2×10^6 'lık spor solüsyonlarından 0,5 ml inokule edilmiştir [50]. Ondört gün boyunca misel, spor oluşumları incelenmiştir.

2.2.8.3.2. Sıvı Karbon Ortamları

Sıvı besiyeri içeriğine ayrı ayrı 30g/l glukoz, aesculin, jelatin, etanol, 10 g/l amonyum okzalat, 10 g/l laktik asit ilave edilerek hazırlanan farklı ortamlarının bulunduğu steril tüplere inkole edilen mutant *T. harzianum* suşlarını spor solüsyonları 14 gün boyunca 25°C 'de inkübe edilmiştir [50]. İnkübasyondan sonra suşların misel, spor ve renk oluşumları incelenmiştir.

2.2.8.4. Azot Kaynaklarının Asimilasyon Testleri

2.2.8.4.1. Katı Azot Ortamları

Amonyum okzalat ve sodyum nitrit, katı ortamın azot kaynağı olarak kullanılmıştır [50]. Suşların, hazırlanan spor solüsyonları, bu ortamlara inkole edilerek 14 gün boyunca misel ve spor oluşumları gözlenmiştir.

2.2.8.4.2. Sıvı azot ortamları

Sodyum nitrit, amonyum okzalat, keratain ve glisin, sıvı ortamın azot kaynakları olarak kullanılmıştır. Suşların hazırlanan 2×10^6 'lık spor solüsyonları, bu ortamlara 0,5 ml. inokule edilmiştir [50]. Ondört gün süreyle, 25°C de spor, misel ve renk oluşumları incelenmiştir.

Bütün asimilasyon testleri, pozitif ve negatif kontrollerle karşılaştırılmıştır. Negatif kontroller hem karbon hemde azot kaynaklarını içermemektedir. Pozitif kontrollerin katı ortamında sukroz, sıvı ortamında glukoz ilave edilmiştir. Azot testleri için ise, katı ve sıvı ortam sukroz ve NaNO_3 içermemektedir. Her bir deney 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

2.2.8.5. Farklı sıcaklık değerlerinde gelişme

Suşlar, Chapek-Dox agar içeren petrilere inokule edilmiştir. Suşların 4°C , 37°C ve 40°C 'de 14 gün boyunca gelişmeleri gözlenmiştir [50].

2.2.8.6. Farklı pH değerinde gelişme

Test suşlarının; pH2, pH10 ve pH12 olan ve 0,05 g/l bromkrezol moru içeren sıvı ortamdaki gelişmeleri incelenmiştir. pH2 ortamı; 10,5g/l sitrik asit ve 1M HCl eklenmesiyle elde edilmiştir. pH10 olan ortam, K_2HPO_4 yerine 3,75 g/l glisin ve pH 12 olan ortam ise 0,2 g/l K_2HPO_4 içerir ve pH'lar 1M NaOH kullanılarak sağlanmıştır [50].

2.2.8.7. Sporun sıcaklığa dayanıklılığı

Spor solüsyonları 5 dakika 75°C 'lik su banyosunda tutulup, Chapek-Dox agar içeren petrilere 0,5 ml konularak 7 gün boyunca inkübe edilmiştir [50].

3. BULGULAR

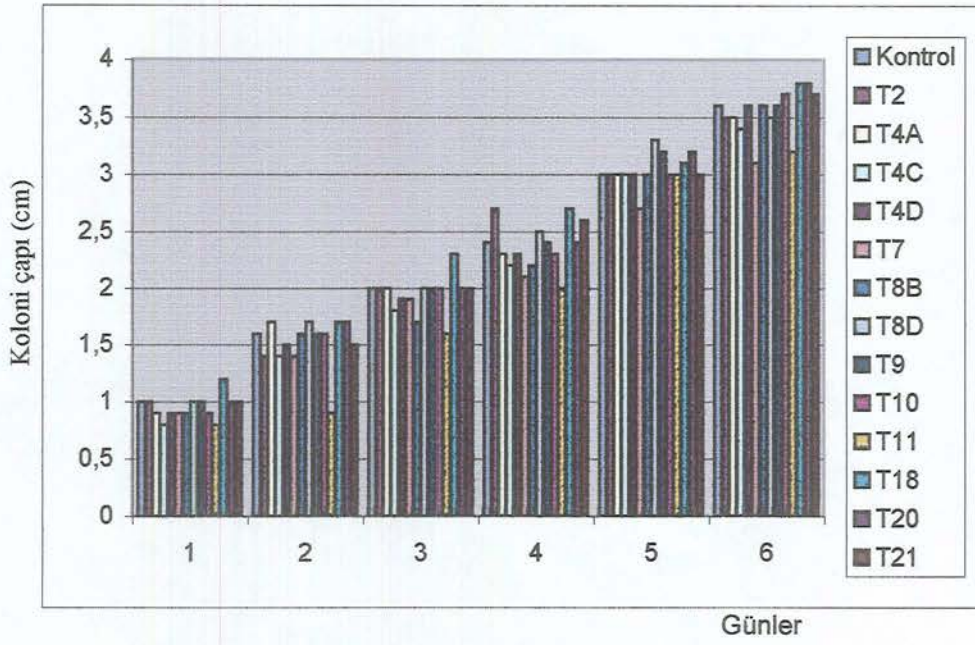
3.1. Mutant *T.harzianum* Suşlarına Ait Filtratlardaki Antifungal Özellikler

Filtrat ile yapılan deneylerde *F.oxysporum*'a mutant *T.harzianum*'un T7 suşu, *F.moniliforme*'ye sırasıyla T4C ve T11, *F.solani*'ye sırasıyla T4C ve T18, *F.culmorum* 1'e sırasıyla T7, T8D ve T18, *F.culmorum* 2'ye sırasıyla T8B, T4A ve T18, *R.solani*'ye T8D, *S.rolfsii*'ye sırasıyla T20 ve T18, *D.sorokiniana*'ya T8D ve T11, *G.graminis* var. *tritici*'ye sırasıyla T18 ve T8D suşlarının etkili olduğu saptanmıştır (Şekil 3.1-3.9). Bütün patojenlere karşı etkili tek bir mutant *T.harzianum* suşu olmamakla birlikte, *T.harzianum*'un T18 mutant suşunun filtratı diğer mutant suşların filtratlarına göre daha fazla patojene etkili bulunmuştur. Patojenler içinde filtratlara en dirençli olanının *F.oxysporum* olduğu saptanmıştır.

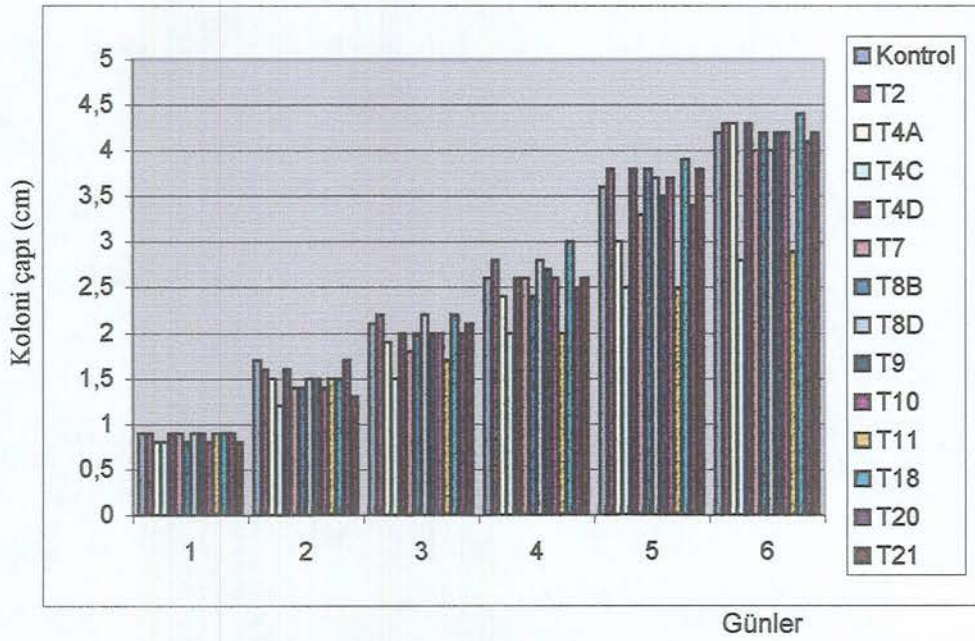
Katı besi yerinde selofan ile yapılan deneylerde mutant *T.harzianum* suşlarının tamamına yakınının patojenlere karşı oldukça etkili olduğu saptanmıştır. *F.solani* ve *G.graminis* var. *tritici*'ye, mutant *T.harzianum* suşlarının etkisi düşük olmuştur. Mutant *T.harzianum* suşlarının en etkili olduğu patojenlerin *F.moniliforme*, *R.solani* ve *S.rolfsii* olduğu saptanmıştır. *F.oxysporum*'u mutant *T.harzianum*'un T7 suşu, *F.molliforme*'yi sırasıyla T4A ve T8D, *F.solani*'yi T4C, *F.culmorum* 1'i T21, *F.culmorum* 2'yi sırasıyla T7 ve T20, *R.solani*'yi sırasıyla T4D ve T8D, *S.rolfsii*'yi sırasıyla T9 ve T4C, *D.sorokiniana*'yı T4D, *G.graminis* var. *tritici*'yi T18 suşu %100 inhibe ederken, T9 ve T4C en yüksek inhibisyonu göstermiştir (Şekil 3.10-3.18).

Mutant *T.harzianum* suşlarının bitki patojenlerinin gelişmesini uçucu metabolitler üreterek engelledikleri belirlenmiştir. Uçucu metaboliti en etkili mutant *T.harzianum* suşlarının sırasıyla T18, T20 ve T21 olduğu saptanmıştır. Mutant *T.harzianum* T18 ve T21 suşları *S.rolfsii* ve *R.solani*'nin gelişmesini, T20 suşu *S.rolfsii*'nin gelişmesini ürettikleri uçucu metabolitlerle en yüksek oranda engellemişlerdir.

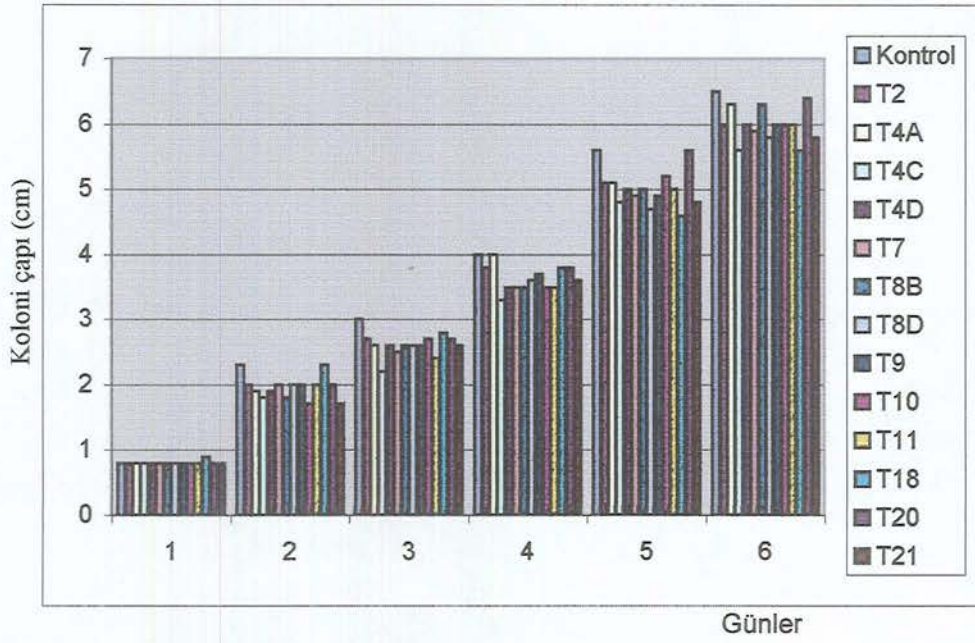
Mutant *T.harzianum*'un T4D, T11 T18, T20 ve T21 suşları *F.oxysporum*, *F.molliforme*, *F.culmorum* 2, *R.solani*, *G.graminis* var. *tritici* ve *D.sorokiniana*'nın gelişmesini engellemişlerdir (Şekil 3.19-3.31).



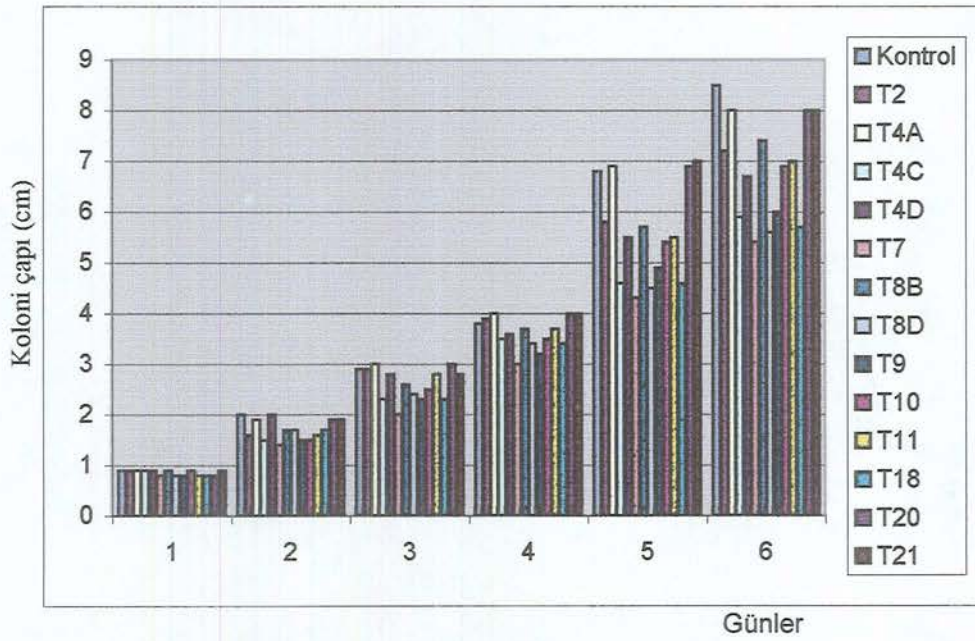
Şekil 3.1. *F.oxysporum* un gelişmesi üzerine *Trichoderma harzianum* suşlarının filtrattaki etkisi



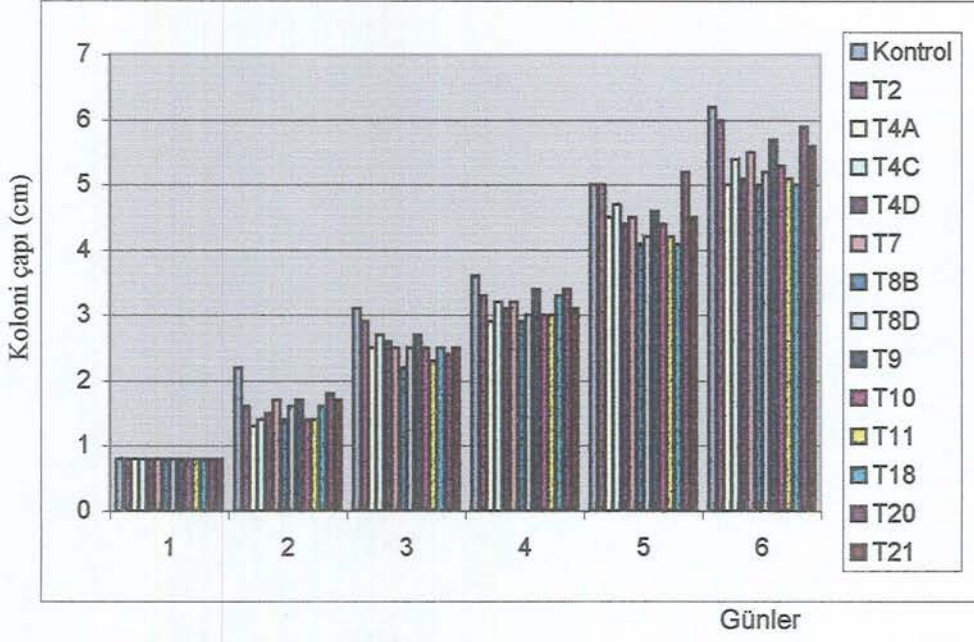
Şekil 3.2. *F. moniliform* un gelişmesi üzerine *Trichoderma harzianum* suşlarının filtrattaki etkisi



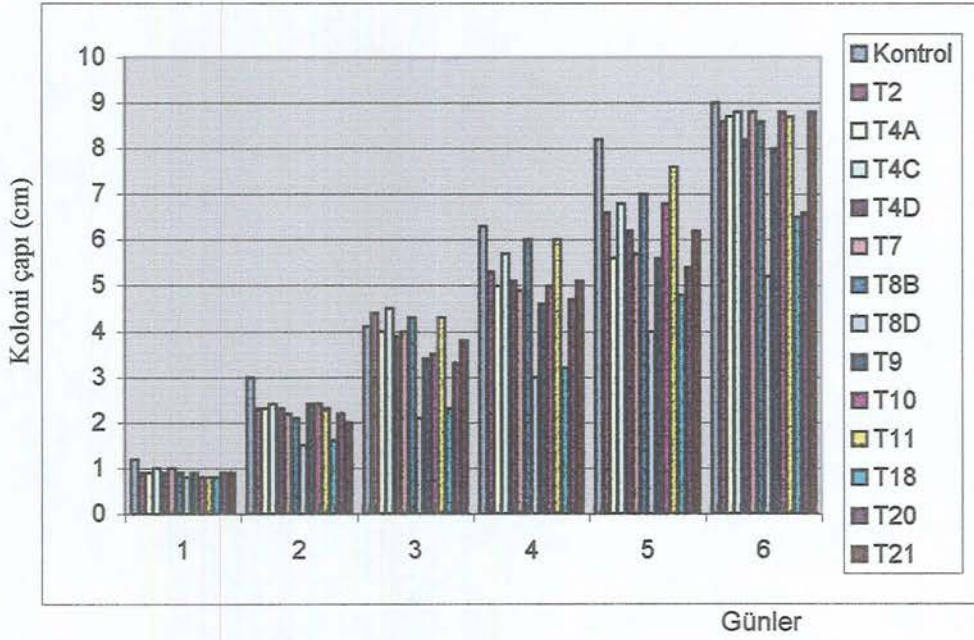
Şekil 3.3. *F.solani* nin gelişmesi üzerine *Trichoderma harzianum* suşlarının filtrattaki etkisi



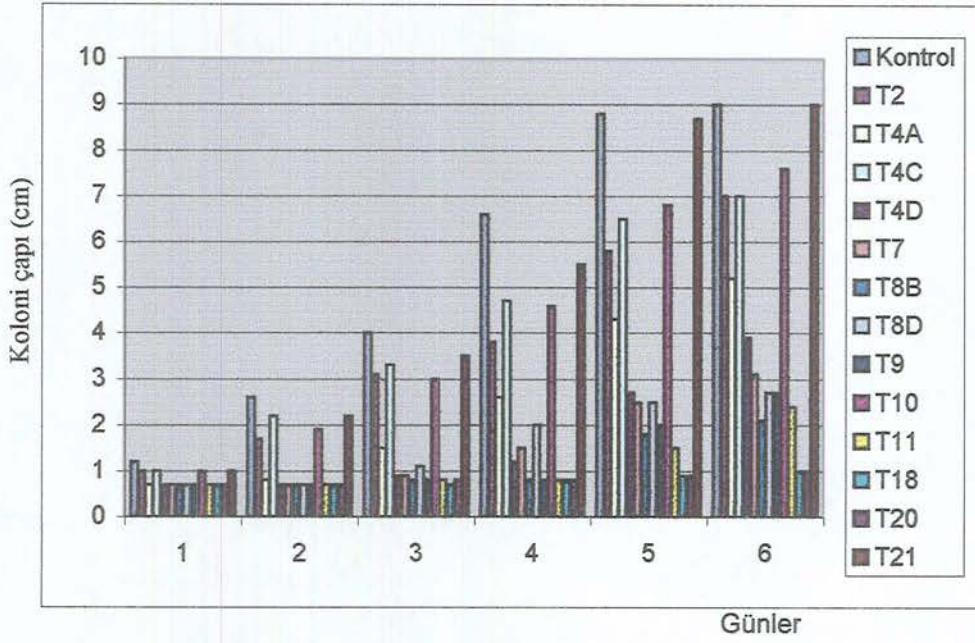
Şekil 3.4. *F.culmorum* un gelişmesi üzerine *Trichoderma harzianum* suşlarının filtrattaki etkisi



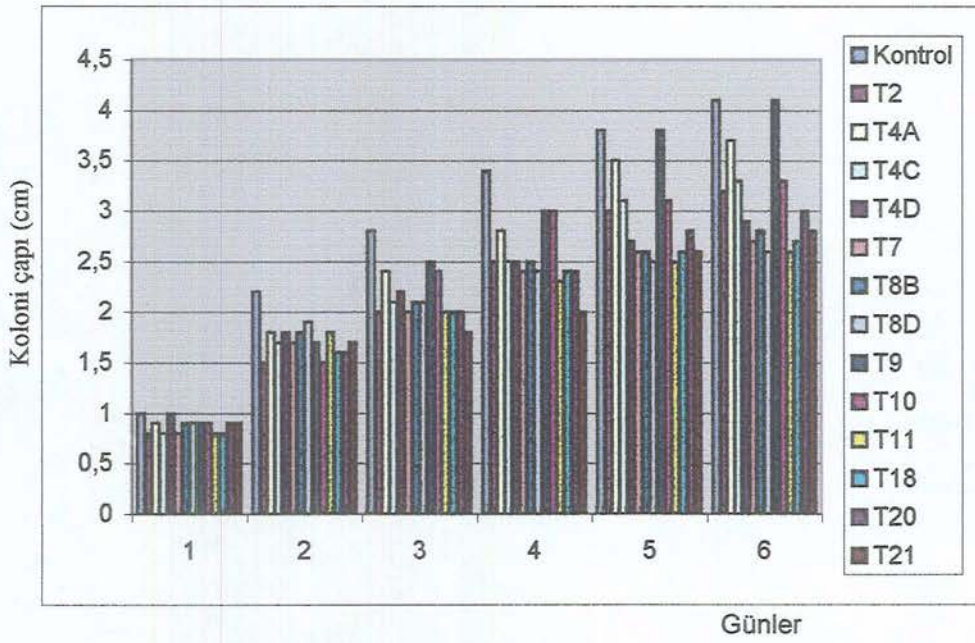
Şekil 3.5. *F.culmorum* 2'nin gelişmesi üzerine *Trichoderma harzianum* suşlarının filtrattaki etkisi



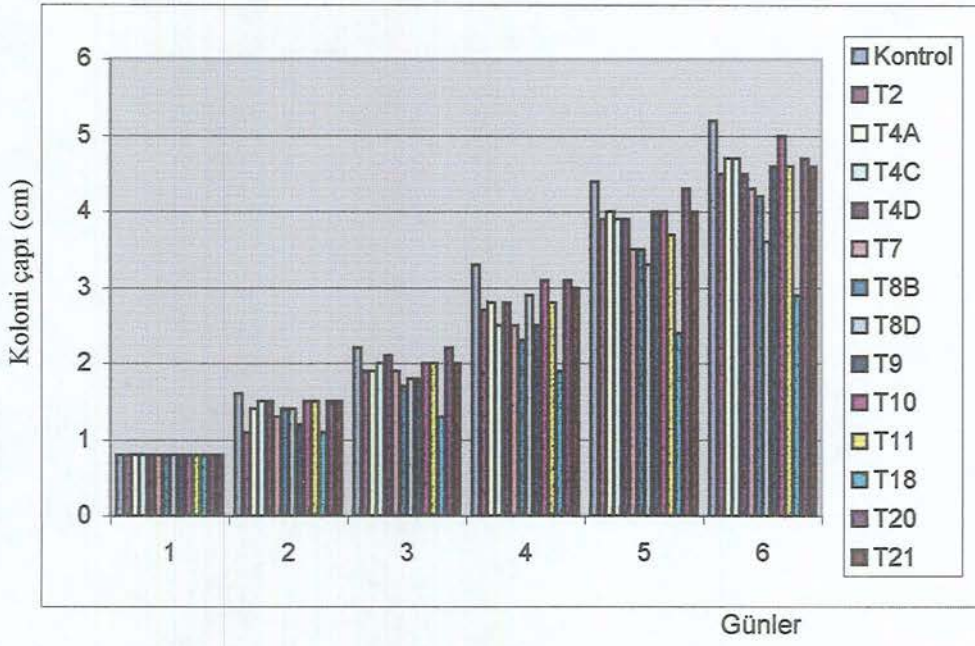
Şekil 3.6. *R.solani* nin gelişmesi üzerine *Trichoderma harzianum* suşlarının filtrattaki etkisi



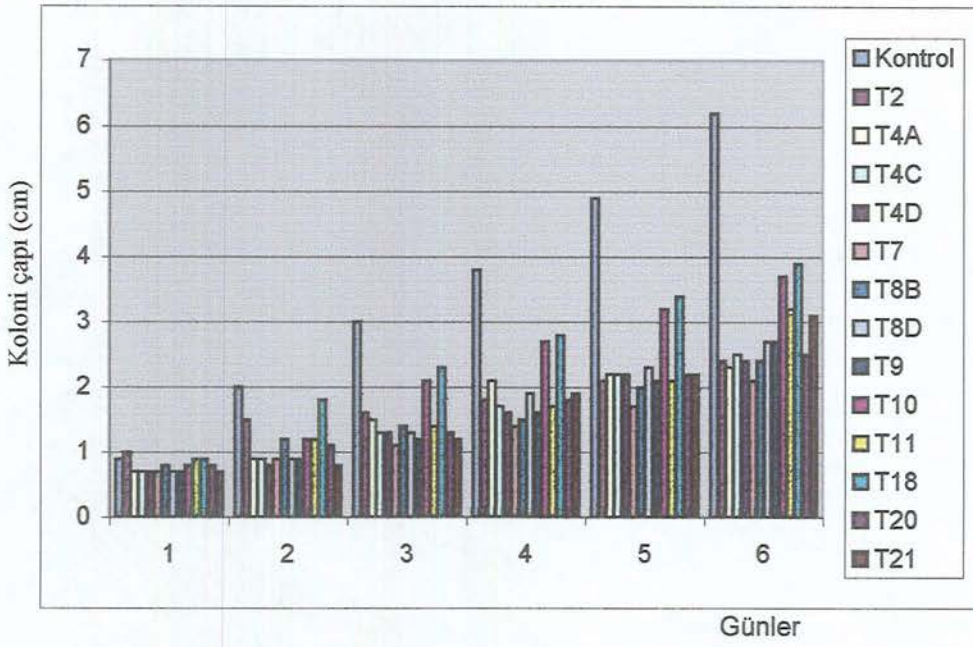
Şekil 3.7. *S.rolfsii* nin gelişmesi üzerine *Trichoderma harzianum* suşlarının filtrattaki etkisi



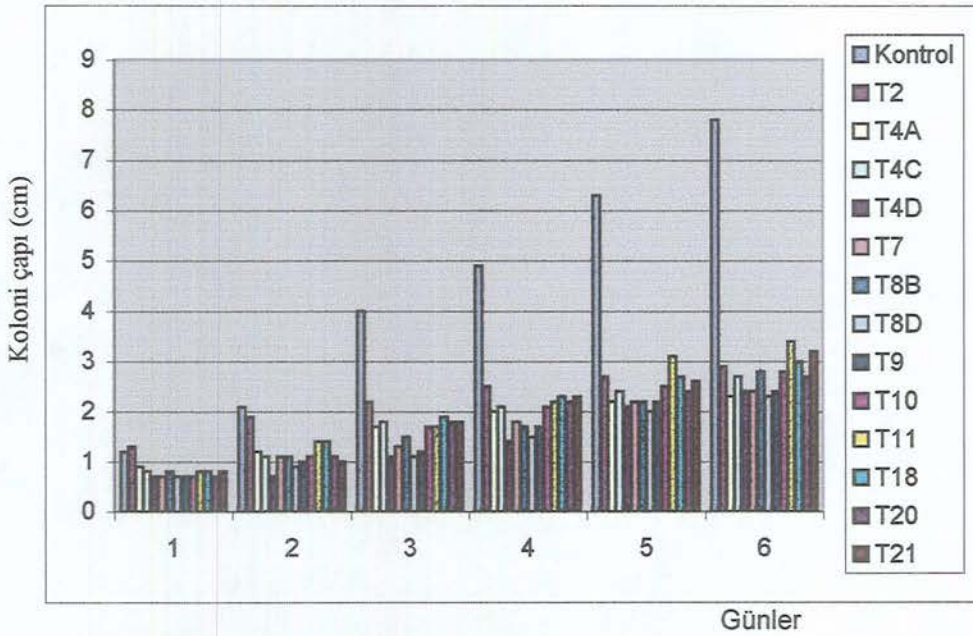
Şekil 3.8. *D.sorakinianace* nin gelişmesi üzerine *Trichoderma harzianum* suşlarının filtrattaki etkisi



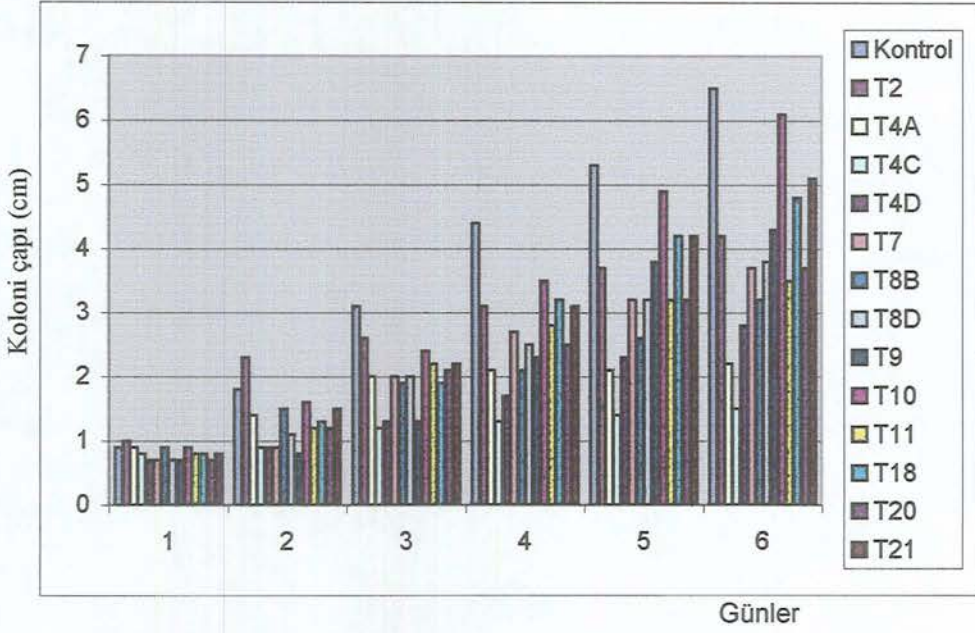
Şekil 3.9. *G.graminis* var. *tritici*'nin gelişmesi üzerine *Trichoderma harzianum* suşlarının filtrattaki etkisi



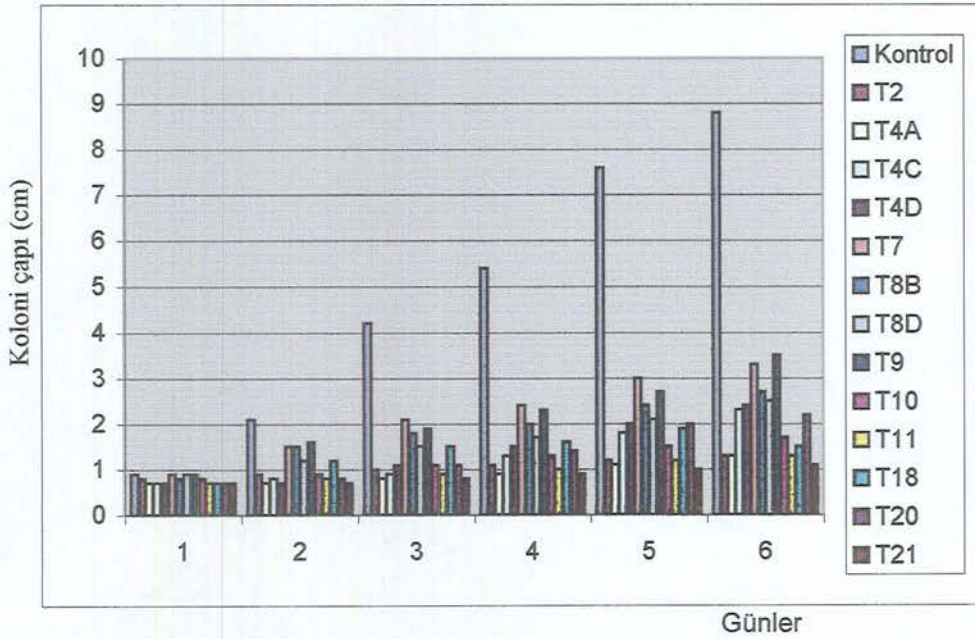
Şekil 3.10. Katı besiyerinde *F. oxysporum* un gelişmesi üzerine *Trichoderma harzianum* suşlarının etkisi



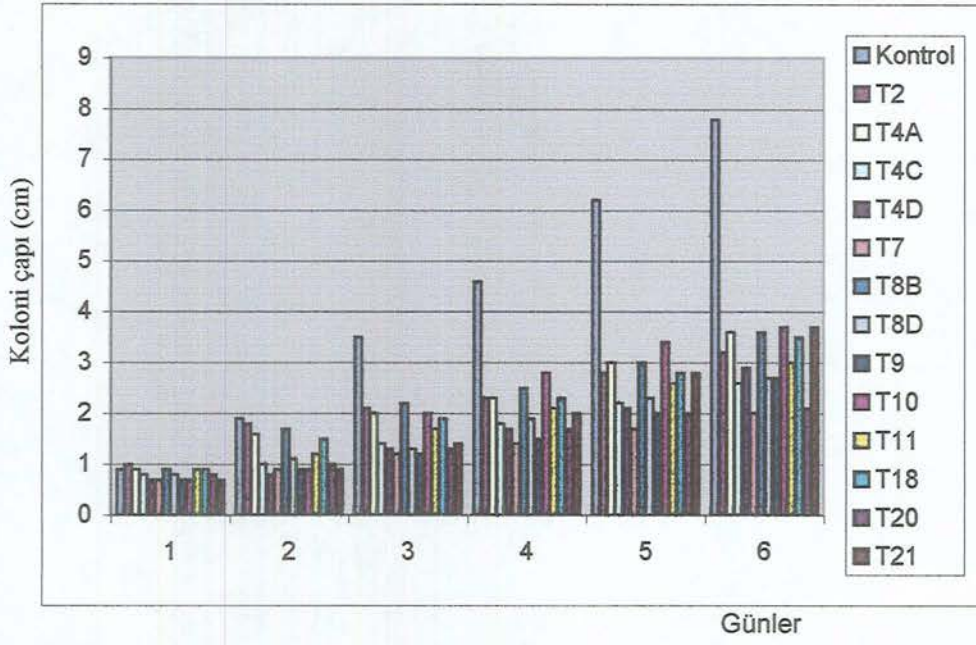
Şekil 3.11. Katı besiyerinde *F. moniliform* un gelişmesi üzerine *Trichoderma harzianum* suşlarının etkisi



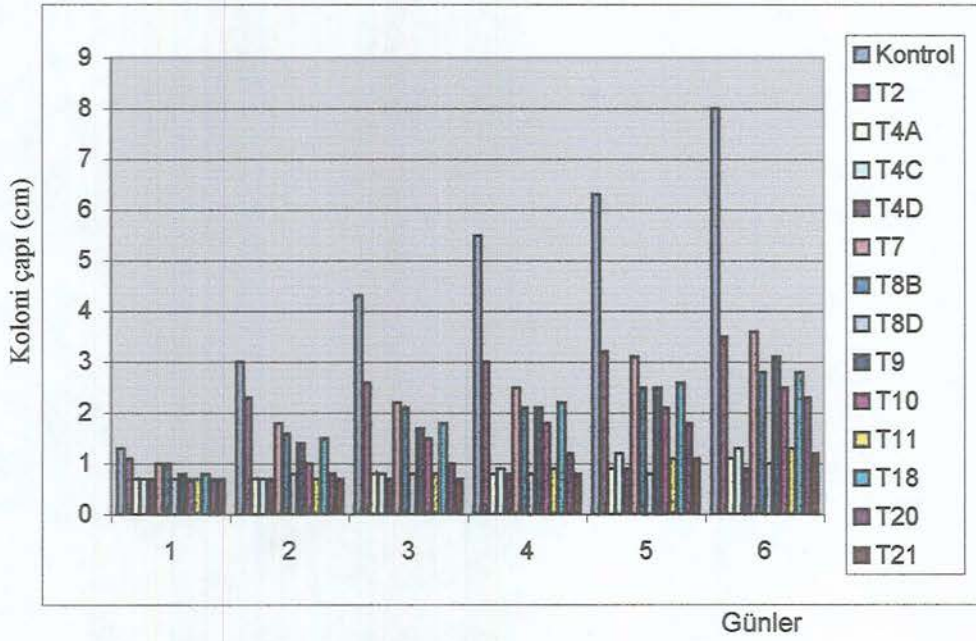
Şekil 3.12. Katı besiyerinde *F. solani* nin gelişmesi üzerine *Trichoderma harzianum* suşlarının etkisi



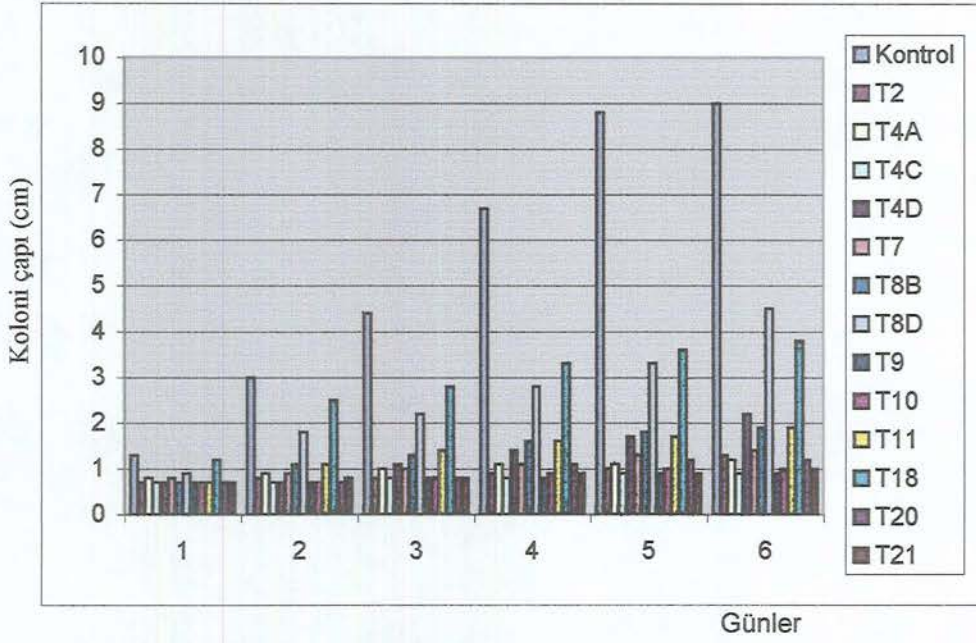
Şekil 3.13. Katı besiyerinde *F. culmorum* un gelişmesi üzerine *Trichoderma harzianum* suşlarının etkisi



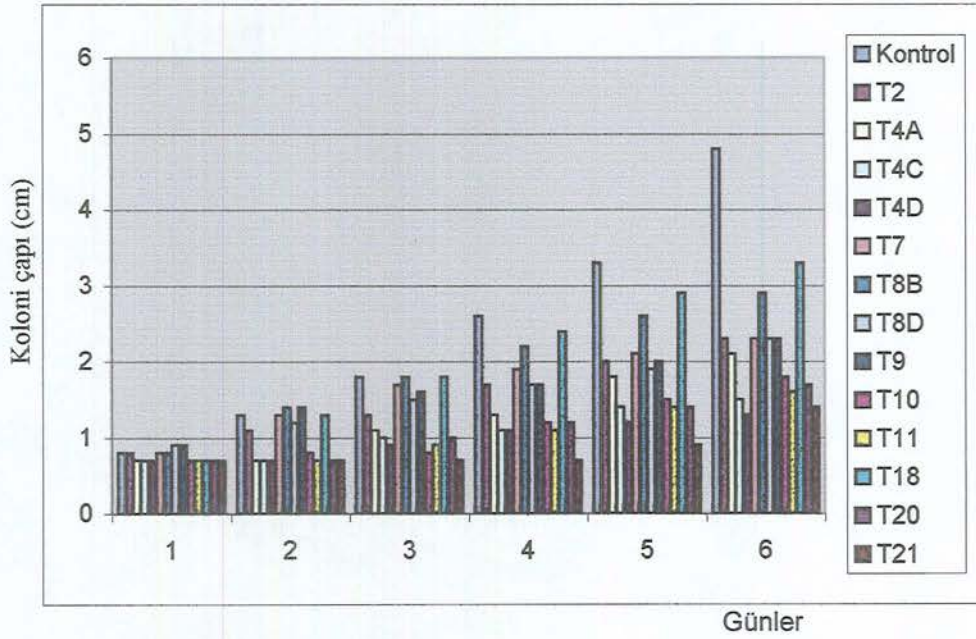
Şekil 3.14. Katı besiyerinde *F. culmonare* nin gelişmesi üzerine *Trichoderma harzianum* suşlarının etkisi



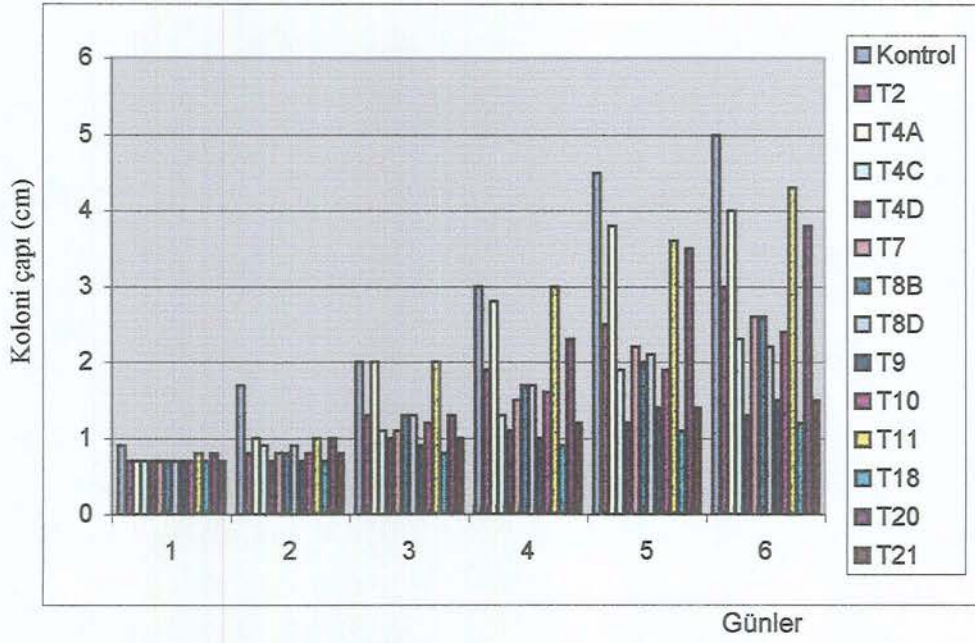
Şekil 3.15. Katı besiyerinde *R. solani* nin gelişmesi üzerine *Trichoderma harzianum* suşlarının etkisi



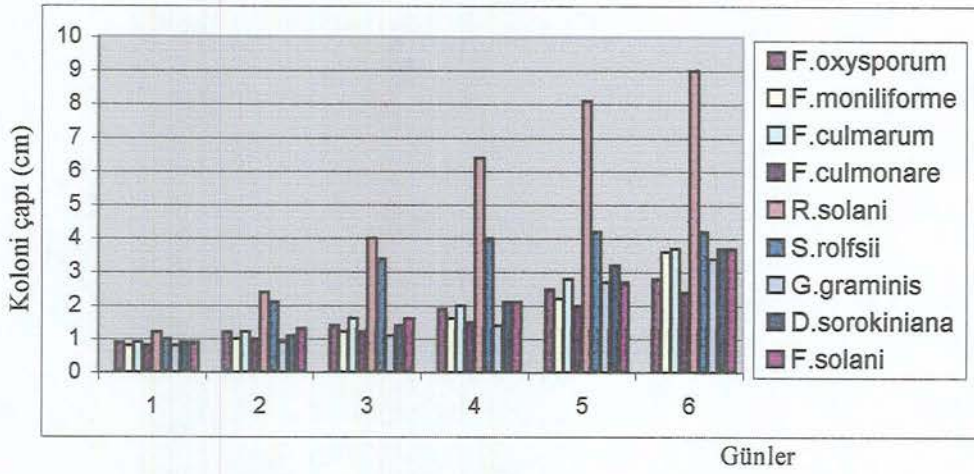
Şekil 3.16. Katı besiyerinde *S.rolfsii* nin gelişmesi üzerine *Trichoderma harzianum* suşlarının etkisi



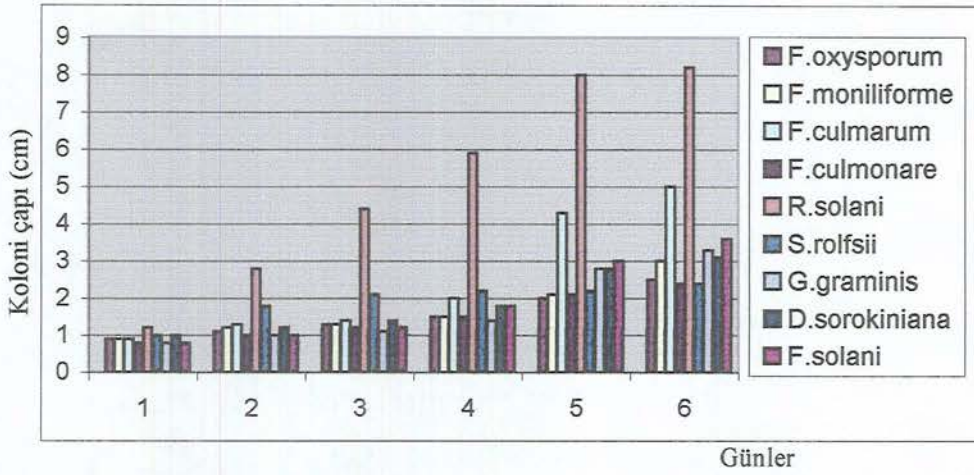
Şekil 3.17. Katı besiyerinde *D.sorokinianae* nin gelişmesi üzerine *Trichoderma harzianum* suşlarının etkisi



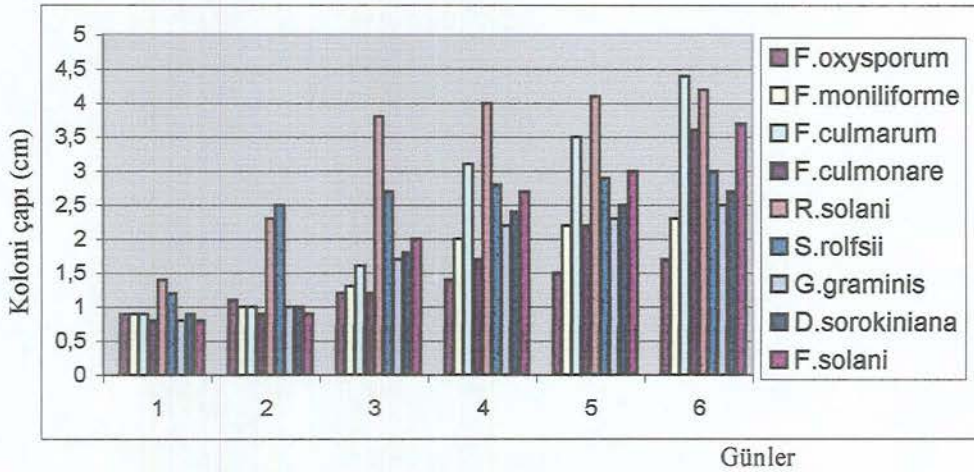
Şekil 3.18. Katı besiyerinde *G.graminis* in gelişmesi üzerine *Trichoderma harzianum* suşlarının etkisi



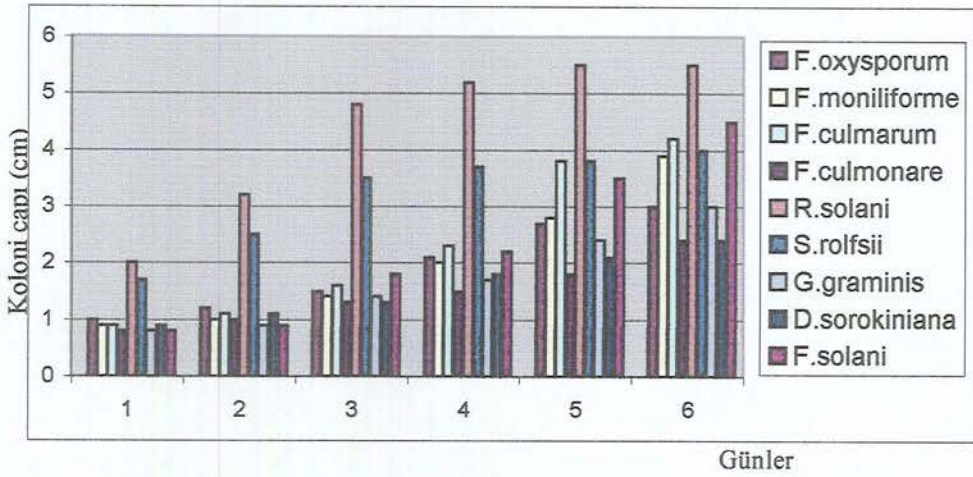
Şekil 3.19. T10 Suşunun bitki patojenlerine karşı oluşturduğu uçucu bileşikler



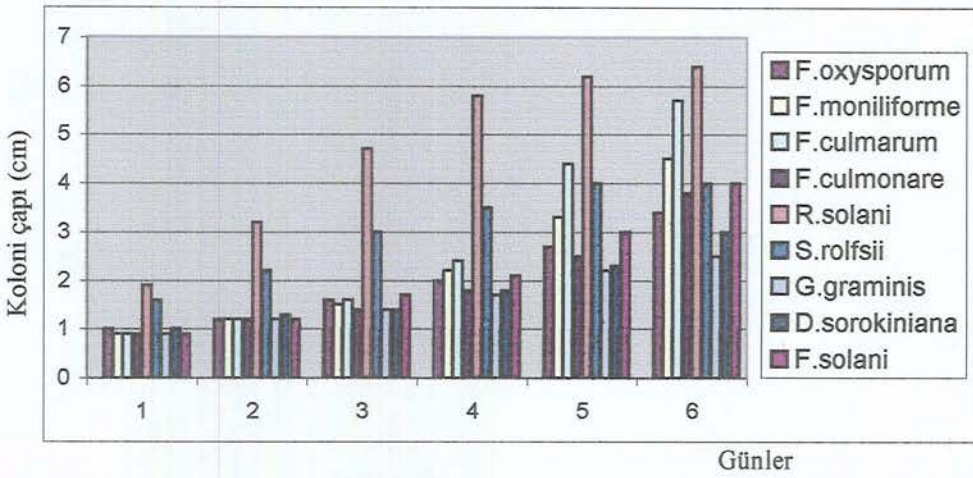
Şekil 3.20. T8D Suşunun bitki patojenlerine karşı oluşturduğu uçucu bileşikler



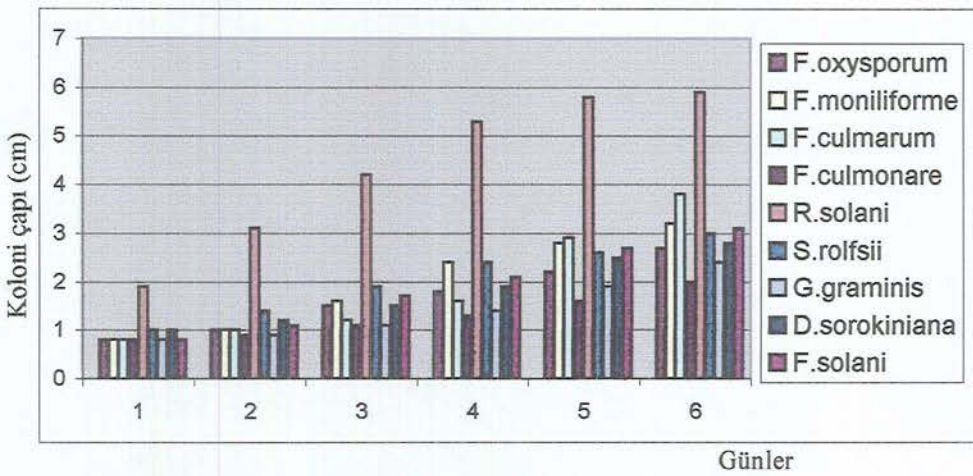
Şekil 3.21. T18 Suşunun bitki patojenlerine karşı oluşturduğu uçucu bileşikler



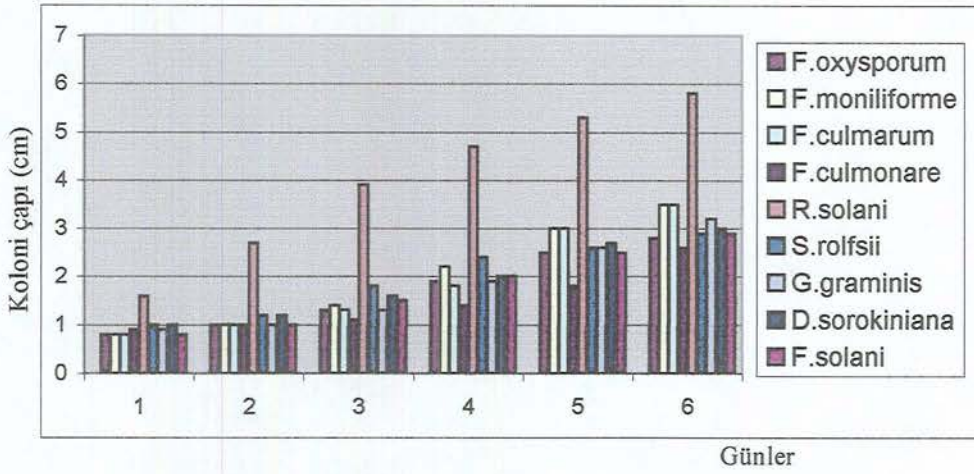
Şekil 3.22. T11 Suşunun bitki patojenlerine karşı oluşturduğu uçucu bileşikler



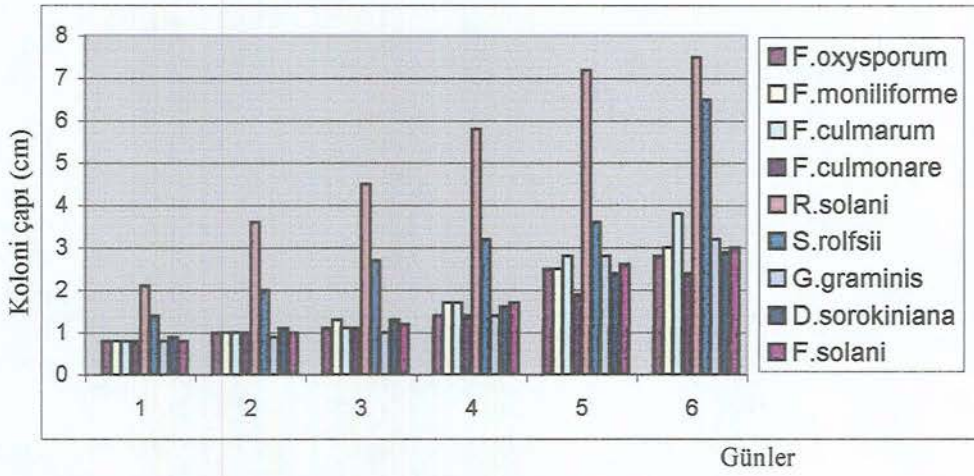
Şekil 3.23. T4A Suşunun bitki patojenlerine karşı oluşturduğu uçucu bileşikler



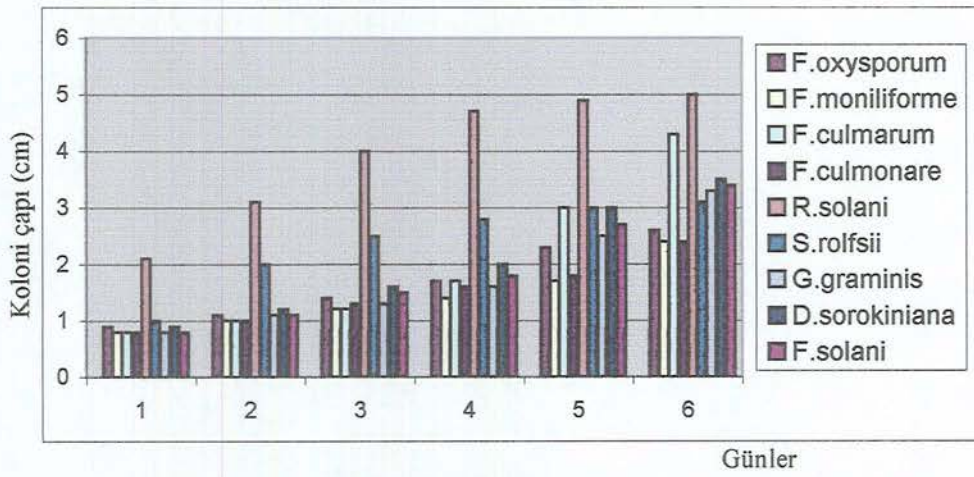
Şekil 3.24. T21 Suşunun bitki patojenlerine karşı oluşturduğu uçucu bileşikler



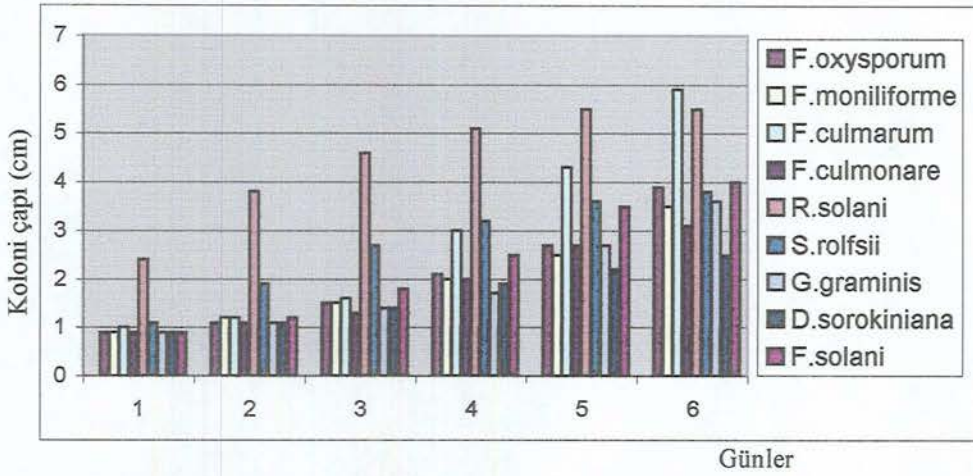
Şekil 3.25. T4C Suşunun bitki patojenlerine karşı oluşturduğu uçucu bileşikler



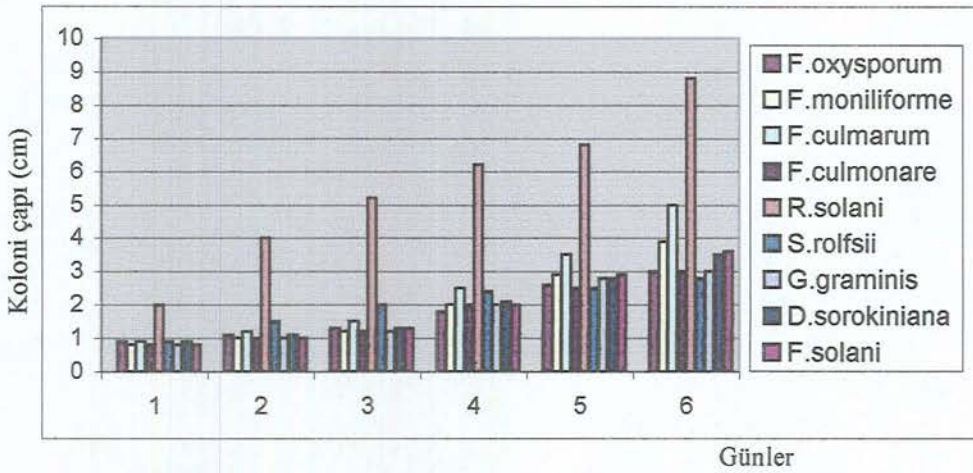
Şekil 3.26. T8B Suşunun bitki patojenlerine karşı oluşturduğu uçucu bileşikler



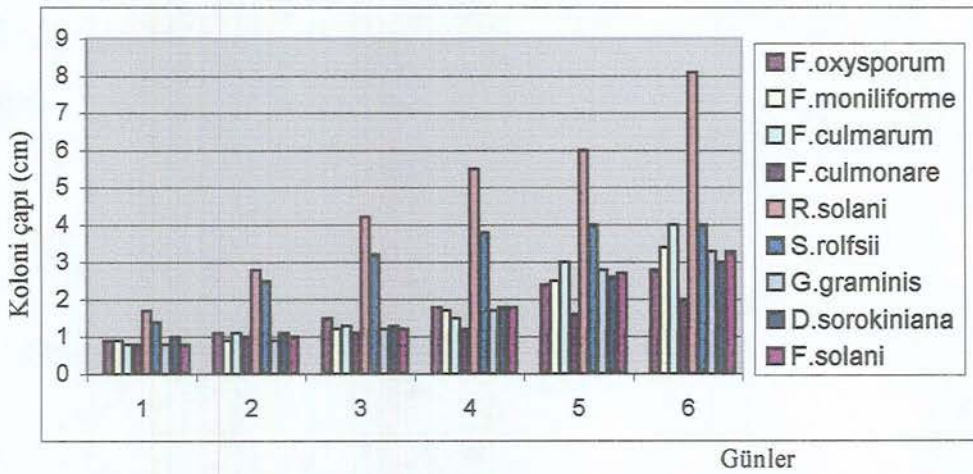
Şekil 3.27. T4D Suşunun bitki patojenlerine karşı oluşturduğu uçucu bileşikler



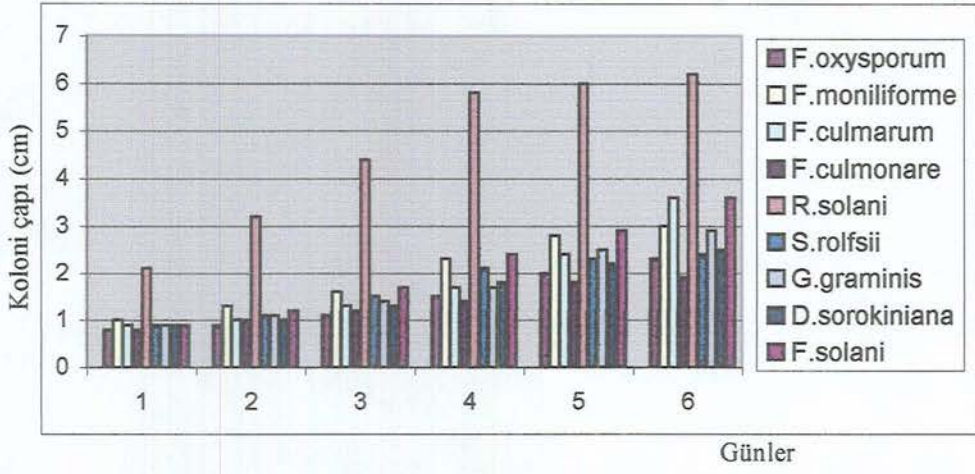
Şekil 3.28. T2 Suşunun bitki patojenlerine karşı oluşturduğu uçucu bileşikler



Şekil 3.29. T9 Suşunun bitki patojenlerine karşı oluşturduğu uçucu bileşikler



Şekil 3.30. T7 Suşunun bitki patojenlerine karşı oluşturduğu uçucu bileşikler



Şekil 3.31. T20 Suşunun bitki patojenlerine karşı oluşturduğu uçucu bileşikler

3.2. Fungal İnhibisyon Testleri

Laboratuvarda geliştirilen mutant *T.harzianum*'un 13 suşunun(T2, T4A, T4C, T4D, T7, T8B, T8D, T9, T10, T11, T18, T20 ve T21), 9 fitopatojenik fungiye(*Sclerotium rolfsii*, *Gaeumannomyces graminis var. tritici* *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmarum 1*, *Drechslera sorokiniana*, *Fusarium culmarum 2*, *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme*) karşı inhibisyon sonuçları karşılaştırılmıştır. Fitopatojenler ve mutant *T.harzianum* suşları aynı anda inkübe edilmiş ve mutant *T.harzianum* suşlarının hepsi inkübasyondan 2 gün sonra radyal olarak gelişmeye başlamıştır.

İnhibisyon deneylerinde, *Fusarium oxysporum*'a karşı % 57,8 RI değeri ile T11, *Fusarium moniliforme*'e karşı % 46,2 RI değeri ile T11, *Fusarium solani*'ye karşı % 48,8 RI değeri ile T4A, *Fusarium culmarum 1*'e karşı % 68,3 RI değeri ile T21, *Fusarium culmarum 2*'ye karşı % 42,9 RI değeri ile T4A, *Rhizoctonia solani*'ye karşı % 97,7 RI değeri ile T10, *Drechslera sorokiniana*'ya karşı % 51,5 RI değeri ile T4C, *Gaeumannomyces graminis var. tritici*'ye karşı % 53,1 RI değeri ile T4C, *Sclerotium rolfsii*'ye karşı % 88 RI değeri ile T4D etkili bulunmuştur (Çizelge 3.1).

T.harzianum'un mutant T21 suşunun *Sclerotium rolfsii*'yi inhibisyonu Şekil 3.32'de görülmektedir. En yüksek inhibisyon değerini (RI) % 97,7 ile *Rhizoctonia solani*'ye karşı T10 suşu göstermiştir (Şekil 3.33).

Çizelge 3.1. *T.harzianum*'un bitki patojenlerine inhibisyonu

Fitopatojenler	<i>T.harzianum</i> izolatlarının %RI değerleri												
	T10	T8D	T18	T11	T4A	T21	T4C	T8B	T4D	T2	T9	T20	T7
<i>F.oxysporum</i>	33,3	30	28,8	57,8	44,4	32,5	51,9	30	31,5	38,7	38,7	31,4	28
<i>F.moniliforme</i>	37,5	26,3	32,6	46,2	44	40,4	50	31,3	32,3	29,6	37,1	40,4	44,7
<i>F.solani</i>	34,2	31,3	43,8	41,6	48,8	33,3	33,3	31,3	39,4	40	34,2	33,3	34,8
<i>F.culmorum 1</i>	50	36	36,2	40,3	47,8	68,3	44,1	25	30	46,8	36,1	41,6	35
<i>F.culmorum 2</i>	25	22,5	38,6	41,8	42,9	29,2	36,4	23,2	30,3	42,8	30,5	37,5	14,3
<i>R.solani</i>	97,7	60	87,5	59,1	95,5	87,5	91,1	95,6	87,5	85,7	95,7	75	87,5
<i>D.sorakiniance</i>	44,4	29,5	35,7	33,3	41,1	34,8	51,5	30,9	33,3	35	36,1	19,2	35,3
<i>G.graminis</i>	36,3	31,9	22,4	36,2	33,3	34,1	53,1	26,4	30	31,3	27,7	30,9	29,4
<i>S.rolfsii</i>	66,6	60	60,7	66,6	73	80	73,2	65,5	88	73,1	73,1	69,2	80



Şekil 3.32. Mutant *T.harzianum* T21 suşunun *S.rolfsii*'ye karşı inhibisyonu



Şekil 3.33. Mutant *T.harzianum* T10 suşunun *R.solani*'ye karşı inhibisyonu

3.3. Mutant *Trichoderma harzianum* İzolatlarının Enzim Aktiviteleri

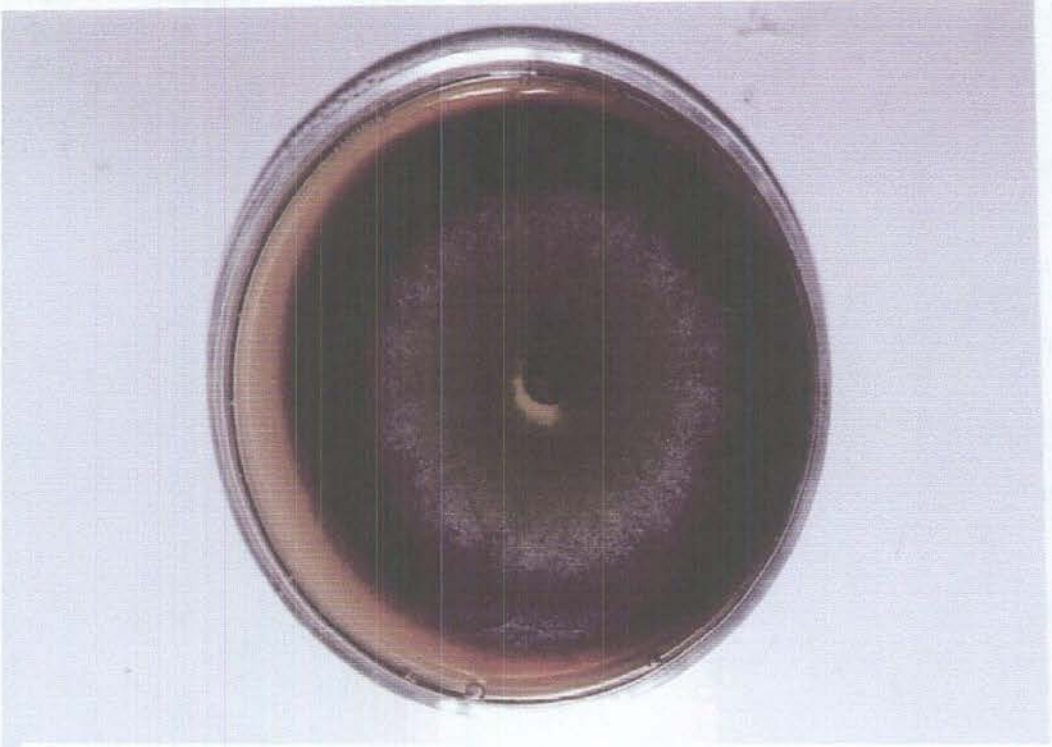
Mutant *T.harzianum*'un T2, T4A, T4C, T4D, T7, T8B, T8D, T9, T10, T11, T18, T20 ve T21 izolatlarının enzim aktiviteleri farklı besi yerlerinde incelenmiştir (Çizelge 3.2).

Mutant *T.harzianum* izolatlarının farklı ortamlarda farklı gelişmeler gösterdikleri saptanmıştır. T4D, T2, T4A, T9, T8B, T10, T7, T8D ve T20 izolatları ortamların tümünde misel ve spor oluşturmuşlardır. Aesculin ile hazırlanan ortamın rengini tüm izolatlar koyu kırmızıya dönüştürmüşlerdir. Mutant T18'in aesculin içeren ortamdaki gelişimi Şekil 3.34 de, T8B'nin aesculin içeren ortamdaki gelişimi Şekil 3.35 de verilmiştir.

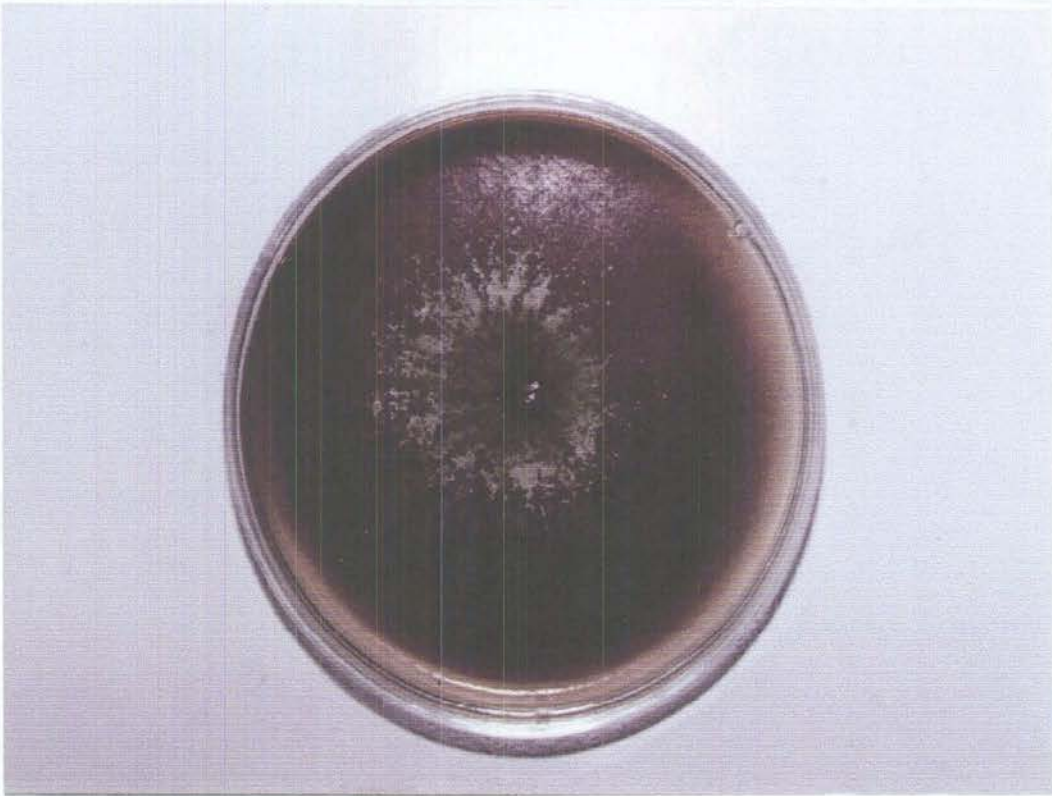
Tween 80 hidrolizinde izolatlar ortamda mor pigment oluşturarak hızla gelişmişlerdir. Mutant T4A'nın tween 80 içeren ortamdaki gelişimi Şekil 3.36 da gösterilmektedir. Polygalaktronik asit içeren ortamda T21 dışındaki tüm izolatlar misel ve spor üretmiştir.

Çizelge 3.2 Mutant *T.harzianum* izolatlarının enzim aktiviteleri

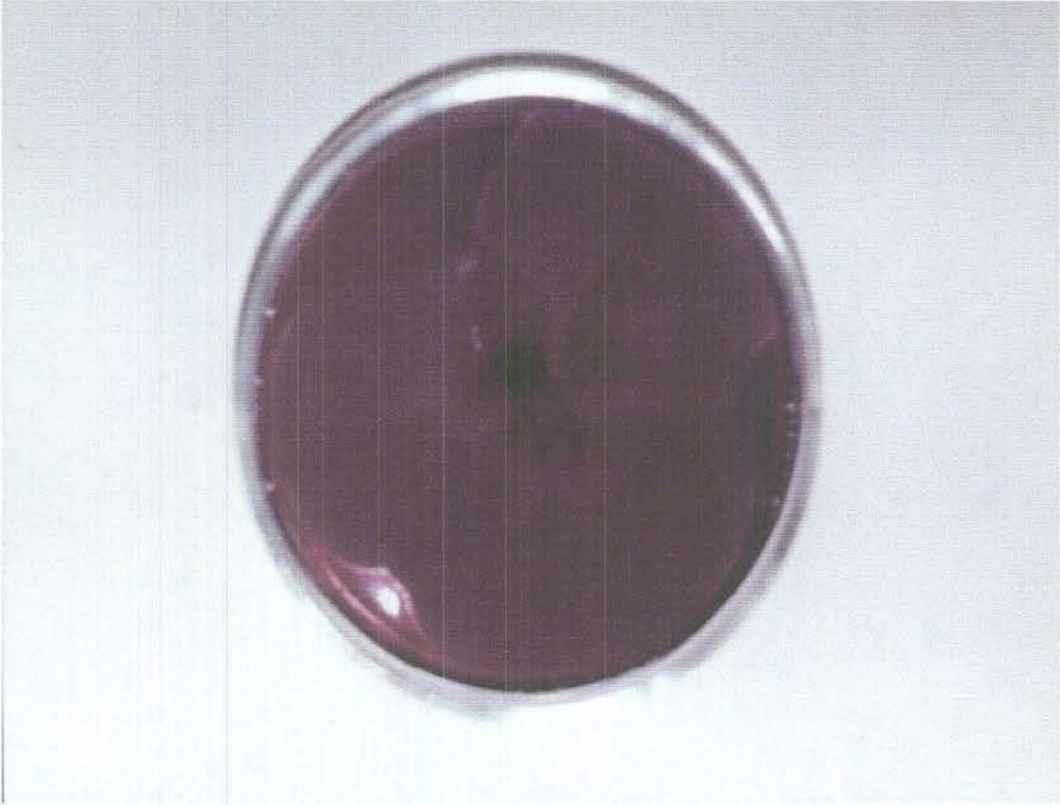
	Mutant <i>T.harzianum</i> izolatları												
	T10	T8D	T18	T11	T4A	T21	T4C	T8B	T4D	T2	T9	T20	T7
Aesculin Hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nişasta Hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80 Hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Jelatin Hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tellur İndirgenmesi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sellüloz Hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kazein Hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Polypektat Hidrolizi	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Tetrazolium İndirgenmesi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



Şekil 3.34. Mutant *T.harzianum* T18 suşunun Aesculin içeren ortamda gelişimi



Şekil 3.35. Mutant *T.harzianum* T8B suşunun Aesculin içeren ortamda gelişimi



Şekil 3.36. Mutant *T.harzianum* T4A suşunun Tween 80 içeren ortamda gelişimi

3.4. Koloni Morfolojisi

Suşların spor büyüklükleri değişiklik göstermekle birlikte T2, T7, T8B, T8D, T11, T20 ve T21 suşlarının oluşturduğu sporların çapları 2,4 µm. T4A, T4C, T4D ve T18 suşlarının oluşturduğu sporların çapları 2,8 µm. T10 suşunun oluşturduğu sporların çapı 2,3 µm. olarak belirlenmiştir. Suşlardan T9 klamidospore oluşturmuştur. Bu T9 un oluşturduğu klamidosporeun çapı 7 µm. olarak belirlenmiştir.

3.5. Fizyolojik Testler

Sukrozuz-Cz agara ayrı ayrı ilave edilen laktoz, eriyebilir nişasta, amonyum oksalat içeren katı ortamda iyi gelişme gösteren ve yüksek RI değerlerine sahip mutant *T.harzianum*'un T4C, T21, T11, T4A, T10, T8B, T9, T18, T2, T4D, T7 suşları ile düşük RI değerlerine sahip T8D ve T20 suşlarının fizyolojik özellikleri incelenmiştir.

Katı karbon kaynakları ile yapılan deneylerde, ortama kristal viyolenin eklenmesiyle mutant *T.harzianum* suşlarının hiçbirinde gelişme görülmemiştir. Karbon kaynakları bulunan sıvı ortamda, mutant *T.harzianum* suşları renk değişimine neden olmuşlardır. Sitrik asit içeren ortamda T2 ve T20, etanol içeren ortamda mutant *T.harzianum* suşlarının hepsi, amonyum oksalat içeren ortamda ise T4A ve T4D mutant suşları mor pigment oluşturmuşlardır. Suşların hiçbirisi laktik asit içeren ortamın rengini değiştirmemiştir (Çizelge 3.3).

Jelatin içeren ortamda mutant *T.harzianum* suşlarının turuncu pigment oluşturdukları saptanmıştır. Bakır sülfat içeren ortamda mutant *T.harzianum* suşlarının çok iyi gelişmediği ve sadece misel ürettikleri saptanmıştır. Sıvı karbon kaynaklarından amonyum oksalat ve glikoz içeren besi ortamlarına inoküle edilen suşların diğer sıvı karbon kaynaklarına göre misel ve spor oluşturmaları geç olmuştur.

Glukoz içeren ortamda mutant *T.harzianum* suşlarından T10, T4C, T2 ve T20 mor pigment üretmişlerdir. T8D, T18, T11, T4A, T21, T8B, T4D, T9 ve T7 besi ortamının rengini değiştirmemişlerdir. Mutant *T.harzianum*'un bütün suşları jelatini hidrolize etmişlerdir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Mutant *T.harzianum* suşlarının karbon kaynaklarında asimilasyon reaksiyonları

	T10	T8D	T18	T11	T4A	T21	T4C	T8B	T4D	T2	T9	T7	T20
Glikozda gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glikozda mor renk	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Sitrik asitte gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sitrik asitte spor	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
Sitrik asitte mor renk	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Etanolde gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanolde sporlanma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanolde mor renk	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktik asitte gelişme	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Laktik asitte sporlanma	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Laktik asitte mor renk	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amonyum okzalatta gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amonyum okzalatta sporlanma	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Amonyum okzalatta mor renk	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Kristal viyolede sporlanma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bakırlı MEAda > 3,1cm çaplı koloni oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bakırlı MEAda 2,5-3,1 çaplı koloni oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MEAda > 8cm çaplı koloni	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MEAda 6,5-8 çaplı koloni	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MEAda < 6,5cm çaplı koloni	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MEAda sarı pigment	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Jelatin hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Jelatinde sporlanma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculinde sporlanma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bakırlı Cz agarda >3,1cm Çaplı koloni oluşumu	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Bakırlı Cz agarda 2,5-3,1cm çaplı koloni oluşumu	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-

Tek azot kaynağı olarak kullanılan amonyum okzalat ve sodyum nitrit içeren katı ortamda tüm suşlar gelişmiştir. Sıvı tek azot kaynağı olan keratinde suşların hiç biri gelişme göstermemiştir. Tek azot kaynağı olan glisin ve üre de ise tüm suşlar gelişmiş ve kırmızı pigment oluşturmuşlardır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Mutant *T.harzianum* suşlarının azot kaynaklarındaki asimilasyon reaksiyonları

	T10	T8D	T18	T11	T4A	T21	T4C	T8B	T4D	T2	T9	T7	T20
Ürede gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ürede miselyum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ürede sporlanma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ürede mor renk oluşumu	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Keratinde sporlanma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glisinde misel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Nitrik agarda gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sodyum selenit içeren Chapex-Dox ve MEAda gelişme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Mutant *T.harzianum* suşlarının farklı sıcaklık derecelerinde ve farklı pH ortamlarında da farklı gelişme gösterdikleri bulunmuştur. Suşların hepsi 4°C ve 40°C de gelişmemiş ve pH 2, pH 10 ve pH 12 olan sıvı ortamlarda misel ve spor oluşturmuşlardır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 Mutant *T.harzianum* suşlarının farklı sıcaklık ve pH ortamlarında gelişmesi

	T10	T8D	T18	T11	T4A	T21	T4C	T8B	T4D	T2	T9	T7	T20
Sporların ısıya dayanıklılığı (75 C de 5dk.)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
4 C de gelişme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37 C de gelişme	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
40 C de gelişme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 2 de gelişme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 10 da gelişme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 12 de gelişme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

4.1. Mutant *T.harzianum* Suşlarının Antifungal Etkileri

Trichoderma harzianum suşlarının mutasyona uğratılmasıyla elde edilen 13 mutant suşun fungal bitki patojenlerine karşı etkinlikleri araştırılmıştır.

Filtrat ile yapılan deneylerde *F.oxysporum*'a mutant *T.harzianum*'un T7 suşu, *F.molliforme*'ye sırasıyla T4C ve T11, *F.solani*'ye sırasıyla T4C ve T18, *F.culmorum* 1'e sırasıyla T7, T8D ve T18, *F.culmorum* 2'ye sırasıyla T8B, T4A ve T18, *R.solani*'ye T8D, *S.rolfsii*'ye sırasıyla T20 ve T18, *D.sorokiniana*'ya T8D ve T11, *G.graminis* var. *tritici*'ye sırasıyla T18 ve T8D suşlarının etkili olduğu saptanmıştır (Şekil 3.1-3.9). Test edilen bütün patojenlere karşı etkili tek bir mutant *T.harzianum* suşu olmamakla birlikte, *T.harzianum*'un T18 mutant suşunun filtratı diğer mutant suşların filtratlarına göre daha fazla patojene etkili bulunmuştur. Patojenler içinde filtratlara en dirençli olanının *F.oxysporum* olduğu saptanmıştır.

Katı besi yerinde selofan ile yapılan deneylerde mutant *T.harzianum* suşlarının tamamına yakınının patojenlere karşı oldukça etkili olduğu saptanmıştır. *F.oxysporum*, *F.solani* ve *G.graminis* var. *tritici*'ye, mutant *T.harzianum* suşlarının etkisi düşük olmuştur (Şekil 3.10-3.18). Benzer olarak Watts ve ark. [52] tarafından yapılan çalışmada, *F.oxysporum*'un en dirençli fungus olduğu bildirilmiştir. Katı besiyerinde mutant *T.harzianum* suşlarının patojenlere karşı daha etkili olduğu görülmüştür. Dunlop ve ark. [53] katı besi ortamında *T.koningii*'nin bir izolatının *Gaeumannomyces graminis* (Sacc) Arx and Oliver var. *tritici* Walker, *R.solani*, *Phytophthora cinnamoni*, *Phytium middletonii*, *Fusarium oxysporum* ve *Bipolaris sorokiniana*'nın saprofidik gelişmesini engellediğini bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar, sıvı kültürde modifiye metabolitlerin üretilebileceğini de saptamışlardır [12].

Trichoderma türleri tarafından üretilen antimikrobiyal metabolitler üç sınıf altında değerlendirilmektedir. Bunlar; uçucu bileşikler (birçoğu izosiyamid sınıfından), suda çözülebilir bileşikler ve membranla sıkı bir ilişkiye giren ve iyonofor aktivitesi gösteren bileşikler (peptaibols) olmak üzere gruplandırılmıştır

[12]. Bizim çalışmamızda mutant *T.harzianum* suşlarının uçucu ve uçucu olmayan metabolitlerinin patojenlerin gelişimini inhibe ettiği saptanmıştır (Şekil 3.19-3.31). Yapılan çalışmalarda, *Trichoderma* spp.nin uçucu ve uçucu olmayan metabolitler ürettiği ve bu metabolitlerin çeşitli patojenleri inhibe ettiği gösterilmiştir [3]. *T.harzianum* suşlarının yaşlı kültürlerinin daha fazla metabolit ürettiği belirlenmiştir [12].

Çeşitli araştırmacılar *T.harzianum*'un etkin maddesini tanımlamaya çalışmışlardır. Dickinson ve ark. [54] tarafından yapılan çalışma da *Botrytis cinerea* ve *R.solani*'ye karşı önemli ölçüde aktivite gösteren maddenin pyridone olduğunu göstermişlerdir.

Trichoderma türlerinin metabolit üretimine ait ilk bilgiler Weindling tarafından verilmiştir. Weindling; *T.lignorum*'un antimikrobiyal metabolit ürettiğini kanıtlamıştır [55]. *Trichoderma* türlerinin uçucu metabolitler ürettiği saptanmıştır [52, 55, 56]. *Trichoderma harzianum*'un çeşitli suşlarının esas uçucu antimikrobiyal bileşik olan 6-penty- α -pyrone(6 PAP) ürettiği bildirilmiştir [40,55-56]. Bizim çalışmamızda da, mutant *T.harzianum*'un T4D, T11, T18, T20 ve T21 suşlarının bitki patojenlerine karşı uçucu bileşikler üreterek, patojenlerin gelişmelerini sınırladıkları belirlenmiştir. Ancak uçucu bileşen tanımlanamamıştır. Antagonizmde antifungal bileşiklerin rollerinin de önemli olduğu bildirilmiştir. *T.harzianum* suşlarının 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6PP, 1) ve dehidroanalogue-6-n-pentyl-2H-pyran-2-one ürettikleri saptanmıştır [12]. *T.harzianum*'un ürettiği bu bileşikler, *Ceratocystis (Ophiostoma) ulmi* (Buism) Nanf. ve *Botrytis cinerea*'nın gelişmesini engellediği yapılan çalışmalarda belirlenmiştir [12]. Bu bileşiklerin *G.graminis* var. *tritici*'ye karşı oldukça etkili olduğu bulunmuştur. *T.harzianum* suşlarının ürettiği metabolitler bitki hastalıklarının kontrolünde de kullanılmıştır [55]. Bizim çalışmamızda da mutant *T.harzianum* suşlarının aynı etkiyi gösterdiği saptanmıştır. Ancak etkili bileşikler saptanamamıştır.

Yine araştırmacılar farklı ortamlarda *Trichoderma* türlerinin viridiol, gliovirin, heptolitik asit gibi farklı antimikrobiyal bileşikler ürettikleri belirlemişlerdir [4].

İlk antimikrobiyal bileşiklerin *T.koningii*'nin suşlarından üretildiği bildirilmiştir. *T.koningii* ve *T.harzianum*'un uçucu ve uçucu olmayan bileşikler ürettiği, uçucu bileşiklerin *R.solani* ve *Heterobasidion annosum*'a karşı etkili olduğu saptanmıştır [53]. Bizim çalışmamızda da, mutant T18 ve T21 suşları ürettikleri uçucu bileşiklerle *R.solani*'nin gelişmesini engellemişlerdir.

4.2. Fungal İnhibisyon

Eskişehir bölgesi topraklarından izole edildikten sonra mutant hale getirilen *Trichoderma harzianum* izolatları toprak kaynaklı bitki patojenlerinin neden olduğu hastalıkları azaltmada farklı etkiler göstermişlerdir (Bkz. Çizelge 3.1). İnhibisyon deneylerinde, *Fusarium oxysporum*'a karşı % 57,8 RI değeri ile T11, *Fusarium moniliforme*'e karşı % 46,2 RI değeri ile T11, *Fusarium solani*'ye karşı % 48,8 RI değeri ile T4A, *Fusarium culmarum* 1'e karşı % 68,3 RI değeri ile T21, *Fusarium culmarum* 2'ye karşı % 42,9 RI değeri ile T4A, *Rhizoctonia solani*'ye karşı % 97,7 RI değeri ile T10, *Drechslera sorokiniana*'ya karşı % 51,5 RI değeri ile T4C, *Gaeumannomyces graminis var. tritici*'ye karşı % 53,1 RI değeri ile T4C, *Sclerotium rolfsii*'ye karşı % 88 RI değeri ile T4D etkili bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.1). Mutant *Trichoderma harzianum* izolatlarında ortaya çıkan bu farklılıklar, patojenlerin farklı dirençlere sahip olmalarından ileri gelebileceği gibi, *Trichoderma harzianum* izolatlarının farklı kimyasal üretimlerinden de kaynaklanmış olabilir. Ghisalberti ve ark. [12] da *Trichoderma harzianum* izolatlarının farklı kimyasallar ürettiklerini, mikoparazit olarak besin ve çevre şartlarından etkilendiklerini, patojenlerin *Trichoderma harzianum* izolatlarına farklı direnç gösterdiklerini bildirmişlerdir. Yapılan benzer çalışmalarda bitki patojenlerine karşı *Trichoderma harzianum*'un etkili olduğu saptanmıştır [4, 9, 57].

Wells ve ark. [10] tarafından; kumlu killi topraklardan izole edilen *Trichoderma harzianum*'un T35 ve T203 izolatlarının *Fusarium oxysporum* ve *Sclerotium rolfsii*'ye etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışmaya göre; T35 izolatının *Fusarium oxysporum*'un gelişimini sınırlandırdığı, T203 izolatının ise *Sclerotium rolfsii*'ye karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda *Rhizoctonia*

solani'ye karşı en etkili mutant *Trichoderma harzianum* izolatının T10, *Sclerotium rolfsii*'ye karşı en etkili izolatın ise T4D olduğu bulunmuştur.

Hadar ve ark. [14] tarafından yapılan bir çalışmada *Trichoderma harzianum* izolatının *Rhizoctonia solani* ve *P.abhanidermatum*'un gelişmesini engellediği, fakat *S.sclerotium* ve *Fusarium oxysporum*'un gelişmesine etkili olmadığı gösterilmiştir. *Trichoderma harzianum* izolatlarının bitki patojenlerine karşı gösterdikleri farklı inhibisyon oranlarının, izolatların patojenlere karşı seçici olduğu ve farklı patojenlere farklı etki göstermelerinden kaynaklandığı bildirilmiştir [14].

Bizim çalışmamıza dahil ettiğimiz patojenlerin hepsine etkili olan tek bir mutant *Trichoderma harzianum* suşu bulunmamakla birlikte, mutant *Trichoderma harzianum*'un T4A ve T21 suşları diğer suşlara göre daha fazla etkili olmuştur, bunları T4C, T10 ve T11 izlemiştir. Chet ve Inbar [4] tarafından yapılan çalışmada da, seçilen bitki patojenlerine karşı etkili olan tek bir *Trichoderma harzianum* izolatı bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda da, mutant *Trichoderma harzianum*'un T8D ve T8B suşlarının patojenlere karşı etkisi, diğer suşlara göre daha az olmuştur.

Çalışmamızda mutant *Trichoderma harzianum* izolatlarının enzim aktivitelerini belirlemek amacıyla deneyler yapılmıştır. İzolatların β -glukosidaz aktivitelerini belirlemek amacıyla yapılan aesculin deneylerinde mutant T10, T8D, T18, T11, T4A, T21, T4C, T8B, T4D, T2, T9, T20 ve T7 suşları misel ve spor oluşturarak aesculin içeren ortamda geliştikleri saptanmıştır (Bkz. Çizelge 3.2). Esteraz aktivitelerin belirlenmesi için yapılan Tween 80 hidrolizi deneylerinde tüm izolatlar ortamda gelişmiş ve besi ortamının rengini mavi-mor'a dönüştürmüşlerdir. Gondona ve ark. [7] tarafından yapılan deneylerde de, *Trichoderma harzianum* izolatlarının Tween 80 içeren ortamın rengini mavi-mor'a dönüştürdükleri bildirilmiştir. Sellüloz üretiminin belirlenmesi için Sellüloz hidrolizi deneyi yapılmıştır. Sellüloz içeren ortamda tüm *Trichoderma harzianum* izolatları gelişmiştir.

İzolatların ortamda gelişme göstermelerinin enzim aktivitesine bağlı olduğu Lynch ve ark. [51] tarafından yapılan çalışmada saptanmıştır. Sellülozun, *Trichoderma* türlerinin endüstriyel kullanımlarında da etkili olduğu bildirilmiştir

[51]. Proteaz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan jelatin ve kazein hidroliz deneylerinde mutant suşların gelişmeleri gözlenmiştir. Tüm mutant suşlar jelatini hidrolize etmişlerdir. Kazein hidrolizinin mikroorganizmaların ürettiği asit ile ilgili olduğu ve gelişen kolonilerin etrafında beyaz bir zonun olduğu Bridge ve ark. [50] tarafından bildirilmiştir. Çalışmamızda kazein içeren ortamda tüm mutant suşların geliştiği belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 3.2).

Trichoderma türlerinin, bitki patojenlerinin hücre yapılarını ürettikleri sellüloz, kitinaz, glukonaz gibi enzimler ile parçaladıkları bildirilmiştir [51]. Litik enzimler içinde, pektik maddeleri depolimerize eden enzimlerin önemli olduğu saptanmıştır [50]. Çalışmamızdaki polygalaktronik asit içeren polypektat hidrolizi deneyinde; mutant *Trichoderma harzianum* izolatlarından T21 suşu hariç tümünün misel ve spor oluşturduğu görülmüştür. İzolatların polypektat hidrolizi deneyinde gelişme göstermelerinin ürettikleri polygalaktronazdan dolayı olduğu bildirilmiştir [50]. Çalışmamızda, bazı mutant *Trichoderma harzianum* suşlarının bitki patojenlerine karşı düşük etki göstermelerinin sebebi, enzim aktiviteleri ile ilgili olabilir.

Çalışmamızda mutant *Trichoderma harzianum* suşlarından T8D ve T8B suşlarının gösterdikleri düşük RI değerleri nedeniyle, biyolojik kontrolde kullanılmasının pratik bir fayda sağlamayacağı ortaya çıkmıştır. Bu izolatların düşük ekstrasellüler aktivite gösterdiği, bu yüzden bitki patojenlerinin gelişmesini engelleyemedikleri düşünülmektedir [7]. Benzer olarak yapılan bir çalışmada, RI değeri düşük olan suşların, diğer suşlara göre düşük düzeyde litik enzimatik aktivite gösterdiği ve eksik protein sağladığı bildirilmiştir [7]. Yapılan çalışmalarda bitki patojenlerine karşı *Trichoderma harzianum*'un etkili olduğu ortaya konmuştur [3, 4, 9, 19].

Biyokimyasal ve fizyolojik çalışmalar için morfolojik özelliklerin önceden incelenmesinin gerekli olduğu bildirilmiştir [7]. Daha önce *Trichoderma harzianum* suşları ile yapılan çalışmalarda klamidospore çapları 4-12 µm., konidia çapı 2-3 µm. veya 1,5-2,5 µm. olarak belirlenmiştir [12]. Bizim çalışmamızda tüm mutant suşların spor ürettiği saptanmış, spor ve klamidospore büyüklüklerinin daha önce yapılan çalışmalarla benzer olduğu saptanmıştır.

4.3. Fizyolojik Özellikler

Trichoderma harzianum'un çeşitli besi ortamlarında değişik pigment ürettiği belirlenmiştir [24]. Mutant suşların sodyum selenit ve keratin içeren ortamda (Bkz. Çizelge 3.4) gelişme göstermedikleri, benzer çalışmalarda da tespit edilmiştir . Yaptığımız deneylerde suşların en çok azot kaynaklarında gelişme gösterdikleri belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 3.3-3.4). Tek azot veya bileşimlerini içeren ortamlarda mutant *Trichoderma* türlerinin gelişme gösterdikleri saptanmıştır. Karbon ve enerji kaynakları olarak monosakkaritler, disakkaritler, kompleks polisakkaritler, organik asitler, uzun zincirli yağ asidi partiküllerinde metanol, metil aminde ve azot kaynağı olarak amonyumu kullanmakla birlikte aminoasit, üre, nitrat, nitritde *Trichoderma* türlerinin çoğunun gelişme gösterdiği belirlenmiştir [21]. *Trichoderma harzianum* suşlarının her birinin farklı azot ve karbon kaynakları içeren ortamlardaki gelişmelerinin farklı olduğu belirlenmiştir. Bridge [58] tarafından yapılan çalışmada da, *Trichoderma harzianum* suşlarının farklı azot ve karbon kaynakları içeren ortamlardaki gelişmelerinin farklı olduğu bildirilmiştir.

Genetik manüplasyon teknikleri ile *Trichoderma harzianum*'un biyokontrol aktivitesinin artırılabilceği bildirilmiştir [59]. Biyolojik kontrolde kullanılan *Trichoderma harzianum*'un antibiyotik üretmeyen suşları, UV ile mutasyona uğratıldıkları takdirde, antibiyotik üretir hale gelerek bazı patojenlere etkili olabileceği saptanmıştır [40]. Bizim çalışmamızda UV ile mutasyona uğratılan *Trichoderma harzianum* suşlarının etkinliklerinin değiştiği, toprak kökenli bitki patojenleri üzerinde önemli oranda biyolojik kontrol sağladığı saptanmıştır.

Sonuç olarak, Eskişehir ve civarındaki topraklardan izole edildikten sonra mutasyona uğratılan *Trichoderma harzianum* suşlarının antifungal etkiye sahip olduğu ancak; bu suşların hiçbiri bitki patojenlerini tamamen inhibe edememiştir.

Bitki patojeni funguslara karşı mutant *Trichoderma harzianum* izolatlarının bu konuda ümit vaadettiği çalışmamızda ortaya konmuştur. Bununla birlikte, bu suşların yaygın olarak kullanılabilmesi için ilave birçok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Değişen ekolojik şartlar, biyolojik kontrol organizmalarının hayatta kalması ve popülasyonlarının gelişebilmesi için genellikle uygun olmamaktadır. Zorunlu olarak tek bir türle yapılan biyolojik kontrol, çoğu ortamda değişik mikroorganizmaların bulunması sebebiyle, genellikle yeterli sonuç vermemektedir [3, 7]. Bununla birlikte, biyolojik kontrol; kimyasal mücadelenin mümkün olmadığı birçok durumda da başvurulabilecek etkili bir yoldur. Biyokontrol ajanları olarak kullanılan mikroorganizmalar, kimyasal ilaçlar gibi ortamda birikip toksisite oluşturmazlar. Aynı zamanda da, fazla masraf gerektirmemektedir. Bir çoğu da, insanlar üzerinde patojen olmadığı için insanlara zarar vermez ve herşeyden önemlisi çevreyi kirletmezler.

Doğanın kendi kontrol gücünün kullanılması temel yöntemdir. Bu, aynı zamanda sürdürülebilir yaşamın da temel anahtarıdır. Bu yöntemle, doğa dengesinde bulunan doğal düşmanlarının antogonistler tarafından popülasyonlarının sınırlandırılması ile ürün gelişmesinin teşvik edilmesi veya hastalıklara duyarlı ürünlerin kullanılmaması yoluyla zararlı popülasyonların azaltılmasını amaçlamaktadır.

Biyokontrolün, çevresel ve ekonomik anlamda çok büyük öneme sahip olduğu yadsınamaz bir gerçektir. Bu amaçla kullanılmasının etkili olacağı düşünülen *Trichoderma harzianum* suşları ile bunların mutant suşlarının etkilerinin karşılaştırılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca, *Trichoderma harzianum* izolatlarının bitki patojenlerine karşı gösterdikleri farklı inhibisyon oranlarının, izolatların patojenlere karşı seçici olduğu ve farklı patojenlere farklı etki göstermelerinden kaynaklandığı göz önüne alındığında, *Trichoderma harzianum* suşları ile bunların mutant suşlarının kombine kullanımları sonucunda oluşabilecek sinerjik etki artışı/azalışının da incelenmeye değer olduğu düşünülmektedir.

Mutant *Trichoderma harzianum* suşları, bitki patojenlerinin gelişmesini değişik mekanizmalarla engellemektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre; *Fusarium oxysporum* ve *Fusarium moniliforme*'e karşı T11, *Fusarium solani* ve *Fusarium culmarum* 2'ye karşı T4A, *Fusarium culmarum* 1'e karşı T21, *Rhizoctonia solani*'ye karşı T10, *Drechslera sorokiniana* ve *Gaeumannomyces graminis var. tritici*'ye karşı T4C ve *Sclerotium rolfsii*'ye karşı T4D mutant

suşları etkili olarak bulunmuştur. Bu mutant suşların biyolojik kontrol çalışmalarında kullanılabileceği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. PAPAIVIZAS, G.C., *Trichoderma and Gliocladium: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol*, Ann. Rev. Phytopathol., **23**, 23-54, (1985).
2. ANKE, T., *Fungal Biotechnology*, Chapman and Hall, London, 65-76, (1997).
3. COOK, R. J. ve BAKER, K.F., *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens* St. Paul, Minn: Am. Phytopathology. Soc, 256-261, (1983).
4. CHET, I. ve INBAR, J., *Biological Control of Fungal Pathogens*, Applied Biochemistry and Biotechnology, **48**, 37-43, (1994).
5. GRAEME-COOK, K.A. ve FAULL, J.L., *Effect of ultraviolet-induced mutants of Trichoderma harzianum with altered antibiotic production on selected pathogens in vitro*. Can. J. Microbiol, **37**, 659-664, (1991).
6. INBAR, J., ABRAMSKY, M., COHEN, D. ve CHET, I., *Growth Enhancement and Disease Control by Trichoderma harzianum in Vegetable Seedling Grown under Commercial Conditions*. European Journal of Plant Pathology, **100**, 337-346, (1994).
7. GRONDONA, I., HERMOSA, R., TEJEDA, M., GOMIS, M.D., MATEOS, P.F., BRIDGE, P.D., MONTE, E. ve GARCIA-ACHA, I., *Physiological and Biochemical Characterization of Trichoderma harzianum a Biological Control agent against Soilborne Fungal Plant Pathogens*. Applied and Environmental Microbiology, **63**, 3189-3198, (1997).
8. HARAN, G.E., CHET, I. ve BAKER, R., *Factors Affecting T. harzianum and T. hamatum Applied to seeds as a Biocontrol agent*. Phytopathology, **62**, 442-447, (1981).
9. WHIPPS, M.J., *Effect of Media on Growth and Interactions between a Range of Soil-borne Glasshouse Pathogens and Antagonistic Fungi*. New Phytopathol, **107**, 127-142, (1987).
10. WELLS, H.D., BELL, D.K. ve AJAWORSKI, C., *Efficacy of T.harzianum a Biocontrol Agent for Sclerotium rolfsii*. Phytopathology, **62**, 442-447, (1972).
11. MUGNAI, L., BRIDGE, P.D. ve EVANS, H.C., *A Chemotaxonomic Evaluation of the genus Beauveria*. Mycol. Res, **92**, 199-200, (1989).

12. GHISALBERTI, E.L. ve SIVASITHAMPARAM, K., *Antifungal Antibiotics Produced by Trichoderma spp.*, *Soil Biol. Biochem.*, **23**, 1011-1020, (1991).
13. CHET, I., *Trichoderma-application, Mode of Action and Potential as a Biocontrol Agent of Soilborne Plant Pathogenic Fungi. In Innovative Approaches to Plant Disease Control* (I.Chet, ed.) Wiley, New York, **62**, 137-160, (1987).
14. HADAR, Y., CHET, I. ve KATAN, I., *Trichoderma harzianum a Biocontrol Agent Effective Against S. rolfsii and R. solani Damping-Off with Wheatbran Culture of T.harzianum.* *Phytopathology*, **9**, 64-68, (1979).
15. ORDENTLICH, A., WEISMAN, Z. ve GOTTLIEB, H.E., *New Inhibitory Natural Product Prduced by the Biocontrol Agent. T.harzianum.* In *Phytochemistry*, **31**, 485-486, (1982).
16. LIFSHITZ, R., WINDHAM, M.T. ve BAKER, R., *Mechanism of Biocontrol Control of Preemergence Damping-Off of Pea by Seed Treatment with Trichoderma spp.*, *Phytopathology*, **76**, 720-725, (1986).
17. ZAZZERINI, A. ve TOSI, L., *Antogonistic Activity of Fungi Isolates from Sclerotia of sclerotinia sclerotiarum.* *Plant Phology*, **34**, 415-421, (1985).
18. SIVAN, A. ve CHET, I., *Biological Control of Fusarium spp. in Cotton, Weat and Muskmelon by T. harzianum.* *Phytopathology*, **116**, 39-47, (1986).
19. BAKER, K.F., *Evolving Concepts of Biological Control of Plant Pathogens.* *Annu. Rev. Phytopathol*, **25**, 67-85, (1987).
20. HENIS, Y., *Biological Control. In Currents Perspectives in Microbial Ecology.* American Society of Microbiology Washington, 353-361, (1984).
21. PAPAIVIZAS, G.C., *Trichoderma and Gliocladium: Biology, Ecology and Potential for Biocontrol.* *Ann. Rev. Phytopathol*, **23**, 23-54, (1985).
22. .CLAYDON, N., ALLAN, M., HANSON, J.R. ve AVENT, A.G., *Antifungal alkly pyrones of Trichoderma harzianum.* *Transactions of the British Mycological Society* **88**, 503-513, (1987).
23. LYNCH, J.M., *Fungi as antagonists. In New Directions in Biological control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pest and Diseases.* New York, 243-253, (1990).

24. BAKER, K.F., *Trichoderma* spp. As a Plant Growth Regulators. CRC Critical Reviews in Biotechnology, 7, 97-106, (1988).
25. HENIS, Y., GHAFFER, A. ve BAKER, R., *Integrated Control of Rhizoctonia solani Damping-Off of Radish: Effect of Succesive Plantings, PCNB, and Trichoderma harzianum on Pathogen and Disease*, Phtopathology, 68, 900-907, (1978).
26. BACKMAN, P.A. ve RODRIGUEZ-KABANA, R., *A System for the Growth and Delivery of Biological Control Agents to the Soil*, Phytopathology, 65, 819-821, (1975).
27. AHMAD, J.S. ve BAKER, R., *Rhizosphere Competence of Trichoderma harzianum*, Phytopathology, 77, 182-189, (1987).
28. BARNETT, H.L. ve BINDER, F.L., *The Fungal Hostparasite Relationship*, Phytopathology, 28, 273-292, (1973).
29. ADAMS, P.B., *The Potential of Mycoparasites for Biological Control of Plant Diseases*, Phytopathology, 28, 59-72, (1990).
30. SIVAN, A., ELAD, Y. ve CHET, I., *Biological Control Effects of a New Isolate of T. harzianum on P. aphanidermatum*. Phytopathology, 74, 498-501, (1984).
31. BENHAMOU, N. ve CHET, I., *Hyphal Interactions between T.harzianum and R.solani: Ultrastructure and Gold Chytochemistry of the Mycoparasitic Process*, Phytopathology, 83, 1062-1071, (1993).
32. SIVAN, A. ve CHET, I., *Degradation of Fungal Cell Walls by Lytic Enzymes of Trichoderma harzianum*, J. Gen. Microbiology, 135, 675-682, (1989).
33. BENHAMOU, N. ve CHET, I., *Parasitism of Sclerotia rolfsii by T.harzianum: Ultrastructural and Cytochemical Aspects of the Interaction*, Phytopathology, 86, 405-416, (1996).
34. ELAD, Y., CHET, I. ve HENIS, Y., *Degradation of Plant Pathogenic Fungi by T. harzianum*. Can J. Microbiol, 28, 719-725, (1982).
35. WELLS, H.D. ve BELL, D.K., *Variable Antagonistic Rection In Vitro of Trichoderma harzianum against Several Plant Pathogens*, Phytopathology, 69, 1048-1049, (1979).

36. BARAK, R., ELAD, Y., MIRELMAN, D. ve CHET, I., *Lectins; A Possible Basis for Specific Recognition in the Interaction of Trichoderma and Sclerotium rolfisii*, *Phytopathology*, **75**, 458-462, (1985).
37. VAZQES-GARCIDUENAS, S., LEAD-MORALES, C.A. ve HERRERA-ESTRELLA, A., *Analysis of the β -1,3- Glucanolytic system of the Biocontrol agent Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 1442-1446, (1998).
38. WINDAM, M.T., ELAD, Y. ve BAKER, R., *A Mechanism for Increased Plant Growth Induced by Trichoderma spp.* *Phytopathology*, **76**, 498-501, (1985).
39. NEETHLING, D. ve NEVALAINEN, H., *Mycoparasitic Species of Trichoderma Produce Lectins*. *Can J. Microbiol*, **42**, 141-146, (1995).
40. FAULL, J. L., GRAME-COOK, K.A ve PILKINGTON, B.L., *Production of an Isonitrile Antibiotics by an UV- Induced Mutand of T. harzianum*. *Phytochemistry*, **36(5)**, 1273-1276, (1994).
41. CASTLE, A., SPERAZINI, D., RGHEL, N., ALM, G., RINGER, D. ve BISSET, J., *Morphological and Molecular Identification of Trichoderma Isolates on North american Mushroom Farms*. *App. and Environmental Microbiology*, **64**, 133-137, (1998).
42. HARAN, S., SCHICKER, H., OPENHEIM, A. ve CHET, I., *Differential Expression of Trichoderma harzianum Chitinases During Mycoparasitism*, *Phytopathology*, **86**, 980-985, (1996).
43. BRUDGE, S.P. ve WHIPPS, D.M., *Glasshouse Trials of Coniothyrium minitans and Trichoderma Species for the Biological Control of Sclerotiora sclerotiorum in Celery and Lettuce*, *Phytopathology*, **40**, 59-60, (1991).
44. LEWIS, J.A. ve PAPAVIDAS, G.C., *Characteristics of Alginate Pellets Formulated with Trichoderma , Gliocladium and Their Effect on the Proliferation of the Fungi in Soil*, *Plant Pathology*, **34**, 571-577, (1985).
45. ONIONS, A.H.S., ALLOPS, D. ve EGGINS, W.H.O., *Smith's Introduction to Industrial Mycology*, 7.ed Edward Arnold (Publishers) Ltd., 41 Bedford Square London London, 157-158, (1981).

46. MAROIS, J.J. ve LOCKE, J.C., *Population Dynamics of Trichoderma viride in Steamed Plant Growth Medium*, Phytopathology, **75**, 115-118, (1985).
47. LEWIS, J.A. ve PAPAIVIZAS, G.C., *Effect of Mycelial Preparation of Trichoderma and Gliocladium on Populations of Rhizoctonia solani and the Incidence of Damping-Off*, Phytopathology, **75**, 812-817, (1985).
48. KUÇUK, Ç., *Trichoderma harzianum ile Toprak Kaynaklı Bazı Bitki Patojenlerinin Kontrolü*, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2000.
49. ROYSE, D.J. ve RIES, S.M., *The Influence of Fungi Isolated from Peach Twigs on the Pathogenicity of Cytospora Cincta*. Phytopathology, **68**, 603-607, (1978).
50. BRIDGE, P.D., *An Evaluation of Some Physiological and Biochemical Methods as an Aid to the Characterization of Species of Penicillium Subsection Fasciculata*. Journal of General Microbiology, **131**, 1887-1895, (1985).
51. LYNCH, M.J., SLATER, J.H., BENNETT, J.A. ve HARPER, S.H.T., *Cellulase Activities of Some Aerobic Microorganisms Isolated from Soil*, Journal of General Microbiology, **127**, 231-236, (1981).
52. WATTS, R., DAHIYA, J., CHAUDHARY, K. ve TAURO, P., *Isolation and Characterization of a New Antifungal Metabolite of T. reesei*. Plant and Soil, **107**, 81-87, (1988).
53. DUNLOP, R.W., SIMON, A., GHISALBAERTIE, L. ve SIVASITHAMPARAM, K., *An Antibiotic from T. koningii active against Soilborne Plant Pathogens*. Journal of Natural Products, **52 (1)**, 67-74, (1989).
54. DICKINSON, J.M., HANSON, J.R. HITCHOOK, P.B. ve CLYDON, N., *Structure and Biosynthesis of harzianopyridone an Antifungal metabolite of T. harzianum*. Journal of the Chemical society Perkin Transactions, **1**, 1185-1887, (1989).
55. ALMASSI, F., GHISALBAERTIE, E.L., NARBAY, M.J. ve SIVASITHAMPARAM, K., *New antibiotics from strains of T. harzianum*. J. Naturel Products, **54(2)**, 396-402, (1991).

56. BREWER, D., MASSON, F.G. ve TAYLOR, A., *The Production of alamethicins by Trichoderma spp.* Can. J. Microbiol, **33**, 619-625, (1987).
57. HARMAN, G.E., CHET, I. ve BAKER, R., *Factors Affecting Trichoderma hamatum Applied to Seeds as a Biocontrol Agent.* Phytopathology, **71**, 569-572, (1981).
58. BRIDGE, P.D., *An Evaluation of some Physiological and Biochemical Methods as a Aid to the Characterization of Species Penicillium Subsection Fasciculata.* J. Gen. Microbiol, **131**, 1887-1895, (1985).
59. HARAN, S., SCHICKLER, H. ve CHET, I., *Molecular Mechanisms of Lytic Enzymes Involved in the Biocontrol Activity of T. harzianum.* Microbiology. **142**, 2321-2331, (1996).