

## DERLEME/REVIEW

# FUNGAL BİTKİ PATOJENLERİNİN BİYOKONTROLÜNDE *Trichoderma harzianum* VE MİKOPARAZİTİZM<sup>1</sup>

Çiğdem KÜÇÜK<sup>2</sup>, Merih KIVANÇ<sup>3</sup>, Engin KINACI<sup>4</sup>, Gülcan KINACI<sup>4</sup>

### ÖZ

Toprak kökenli bitki patojenlerinin biyolojik kontrolü, kimyasal pestisidlerin kullanımına alternatiftir. *Trichoderma*'nın bazı izolatlarının sera ve tarla koşullarında çeşitli toprak kökenli bitki patojeni funguslara karşı etkili bir biyokontrol ajan olduğu bulunmuştur. *Trichoderma*'nın biyokontrolde etkili mekanizmalarının belirlenmesi için biyokimyasal ve moleküler biyoloji çalışmaları yürütülmüş ve *Pseudomonas* spp. ve *Rhizobium* gibi diğer biyokontrol ajanlarda olduğu gibi *Trichoderma* spp.'nin biyokontrol etkinliğini artırmada da genetik mühendisliği teknikleri kullanılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Trichoderma harzianum*, Litik enzimler, Mikoparazitizm

## BIOCONTROL OF PLANT PATHOGENIC FUNGI BY *Trichoderma harzianum* AND MYCOPARASITISM

### ABSTRACT

Biological control of soilborne plant pathogens is a potential alternative to the use of chemical pesticides. Some isolates of the fungus *Trichoderma* have been found to be effective biocontrol agents of various soilborne plant pathogenic fungi under greenhouse and field conditions. Biochemical and molecular biology studies were carried out to explore the mechanisms involved in biocontrol. Genetic engineering techniques were employed in order to increase the biocontrol effectiveness of *Trichoderma* spp. as well as other biocontrol agents such as *Pseudomonas* spp. and *Rhizobium*.

**Key Words:** *Trichoderma harzianum*, Lytic enzymes, Mycoparasitism

## 1. GİRİŞ

Tarımsal üretimde bitki hastalıkları nedenli kayıplar içinde fungusların payı oldukça fazladır. Bunun azaltılması ya da mümkünse tümüyle engellenebilmesi için çeşitli önlemler alınmaktadır. Bu uygulamalar içinde, dayanıklı çeşitlerin üretilmesi, kültürel uygulamalar (ekim nöbeti, polikültür tarım yapılması, gübreleme ve sulama oranlarının ayarlanması vb.) ve pestisidlerin kullanımı en yaygın olanlardır.

Bitki hastalıklarının kontrolünde; fungusidler oldukça fazla kullanılmaktadır (Waard vd, 1993). Güntü-

müzde ise, çevreye verilen öneme paralel olarak, çevre dostu önlemler almaya olanak verecek çalışmalara daha fazla önem verilmeye başlanmıştır (Basım vd, 1999; Küçük ve Kıvanç, 2001).

Bitki patojenlerine karşı antagonistik aktivitenin gösterilmesinde, biyokontrolde kullanılacak potansiyel ajanlar; rizoferdeki fungus ve bakterilerdir. Toprakta bulunan *Trichoderma* spp. genusunun üyeleri bitki patojeni funguslara karşı antagonistik etki gösterme özelliği 70 yıl kadar önce ilk kez Weidling tarafından belirlenmiştir (Cook, 1983). Daha sonra bu konudaki çalışmalar

<sup>1</sup> Bu çalışma Anadolu Üniv. Araştırma Fonunca (Proje No: 00 1042) desteklenmiştir.

<sup>2</sup> Osmangazi Üniv. Fen Bil. Enst. Eskişehir.

<sup>3</sup> Anadolu Üniv. Fen Fak. Biyoloji Eskişehir, **E-posta:** mkivanc@anadolu.edu.tr.

<sup>4</sup> Osmangazi Üniv. Ziraat Fak. Eskişehir.

artmıştır. Bir çok *Trichoderma* izolatının sera ve tarla koşullarında toprak kaynaklı hastalıkları kontrol etmede başarılı olduğu gösterilmiştir (Chet, 1990; Sivan ve Chet, 1986; Basım vd, 1999; Küçük, 2000; Küçük ve Kıvanç, 2001). Son yıllarda tarımda fungus öldürücü olarak *Trichoderma* izolatlarından hazırlanan preparatlar ticari ürün olarak özellikle Avrupa'da oldukça yaygın satılmaya başlanmıştır. Aktif materyal olarak *Trichoderma*'nın yaygın kullanıldığı bazı ticari ürünler Tablo 1'de verilmiştir (Whipps ve Davies, 2000).

*T. harzianum*'un T35 izolatu Sivan ve Chet (1986) tarafından, *Fusarium* ile infekteli tarla topraklarında yetişen pamuk bitkilerinin rizosferinden izole edilmiştir. Bu izolat, domates ve kavun fidelerinin köklerine uygulanmış ve kavunda *Fusarium* solgunluğunun %33; domates taç çürüklüğünün %18 oranında azaldığı gözlemlenmiştir.

Inbar vd (1994) tarafından yapılan bir çalışmada; *Fusarium oxysporum* ile inokuleli tohumlar metil bromid (500 kg/ha) uygulanmış topraklara ekilmiştir. Sonuçlar *Trichoderma*'ya tabi tutulmuş bitkilerin hastalığa karşı daha dirençli olduklarını göstermiştir. *T. harzianum*'un T39 izolatu ile yapılan *Trichodex* isimli ürün *Botrytis cinerea*'nin kontrolünde başarılı olarak bulunmuştur (Anke, 1997). *Trichodex*'in uzun süre etkili olduğu, seralarda sebze yetiştiriciliği ve üzüm bağlarında başarılı bir şekilde kullanıldığı saptanmıştır. *T. harzianum*'dan hazırlanan *Trichodex* ürünü üzüm bağlarında tek başına uygulandığında hastalığın %84 oranında azaldığı tesbit edilmiştir. Kimyasal fungusid olan Iprodion ve *Trichodex*'in beraber kullanılmasının, bu ürünlerin her birinin tek başına kullanılmasından daha etkili olduğu belirlenmiştir (Anke, 1997).

Elad (2000); *Trichoderma harzianum* T39 izolatının, ticari seralarda, salatalıkta biyotrof ve nekrotrof birçok patojen kontrolünde etkili olarak bulunmuştur. Bu patojenler; *Botrytis cinerea*, Pers., Fr., *Pseuoperonospora cubensis* (B&C) Rostow, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.)

Bory ve *Sphaerotheca fusca* (Fr.) Blummer (*S. fuliginea*)'ı içine almaktadır. Kış mevsiminde polietilen kaplı serada yetiştirilen salatalık bitkilerinde (*Cucumis sativus* L. Cv. Muhasan) doğal epidemilerin geliştiği araştırmacı tarafından gözlemlenmiştir. *TRICHODEX*'in 0.2-0.8 g/l'lik dozları ile gri küfte meyvede %35-44, gövde de ise %43-64 oranında azalma sağlamıştır. Serada, salatalık bitkisinde *T. harzianum* T39 ve fungusidin etkileri de tarafından karşılaştırılmıştır, meyve ve saplarda T39 ve fungusid beyaz küfe (*Sclerotinia sclerotiorum*) sırasıyla %35 ve %64 oranında etkili olarak bulunmuştur. Yapraklarda ise; *Pseuoperonospora cubensis*'e karşı T39'un etkisi, karşılaştırıldığı fungusidten daha fazla bulunmuş olup, patojen kontrolü yapraklara T39'un püskürtülmesi ile sağlanmıştır (Elad, 2000). Toprak kökenli patojenlerin kontrolünde, ajan olarak kullanılan *T. harzianum*, brokoli'de *Alternaria brassicicola*'ya karşı yapraklara püskürtülerek uygulanmış ve patojenin biyokontrolünde %58 oranında başarı sağlanmıştır (Mora ve Earle, 2001).

Bu derlemede, bitki patojenik fungusinin biyolojik kontrolünde *Trichoderma* spp.'nin etki mekanizmalarından en önemlisi olan mikoparazitizm ile ilgili çalışmalar özetlenmiştir.

## 2. *T. harzianum*'un FUNGAL PATOJENLERİN KONTROLÜNDE ETKİLİ OLAN MEKANİZMALAR

*Trichoderma* spp.'nin toprakta yaygın olarak bulunduğu ve bazı bitki patojeni funguslara karşı antagonistik etki gösterdiği belirlenmiştir (Cook ve Baker, 1983). Antagonistik mikroorganizmaların etki mekanizmalarının;

- Antibiosis (fungus tarafından üretilen uçucu ve uçucu olmayan antibiyotikler),
- Yer ve besin (karbon, azot, mikro elementler) için rekabet,
- Mikoparazitizm şeklinde olduğu bildirilmiştir.

Tablo 1. *Trichoderma* spp. içeren bazı ticari ürünler (Whipps ve Davies, 2000)

Aktif materyal	Patojenler	Ürünler	Ticari ismi
Trichoderma spp.	Pythium spp., Sclerotinia spp., Verticillium spp.	Çeşitli meyve ve sebzeler	Trichodermin (Bulgaristan)
	Pythium spp., R. solani, ve diğer toprak kökenli patojenler	Çiçekler, çilek, ağaçlar, sebzeler	Bio-Fungus (Belçika)
	Fusarium spp., P. ultimum, Rhizoctonia solani	Süs bitkileri, orman ağaçları, bezelye	Tri002 ve Tri003 (Almanya)
	S. homeocarpa Armillia mellea	Ağaçlar	Fransa, Belçika, Bulgaristan) Harzian 20 ve Harzian 10 (Fransa)
T. harzianum	Toprak kökenli patojenler	Çeşitli tarımsal ürünler	Binab-T WP (İsveç)
T. polysporum	Botrytis cinerea	Çilek	Binab-T WP (İsveç)
T. viride	Phytophthora spp.	Süs bitkileri	Bip T (Polonya)

Mikroorganizmaların; Trichoderma, proteaz, glukonaz ve kitinaz gibi litik enzimleri ile patojen fungusların hücre duvarının degradasyonuna neden olmaktadır (Chet, 1990; Cook ve Baker, 1983; Elad vd, 1983). Bu mekanizmalar yolu ile toprak kökenli bitki hastalıklarına karşı potansiyel biyokontrol ajanı olarak Trichoderma harzianum'un kullanımı son yıllarda önem kazanmıştır (Küçük vd, 2002).

Trichoderma parazitizmi kompleks bir aşamadır ve patojenin hifi, büyüme yönünde Trichoderma ile kaplanarak sarılır. Trichoderma, kitinaz ve  $\beta$ -1,3-glukanaz litik enzimleri ile patojen hücre duvarını etkileyerek patojeni kontrol altına almaktadır (Anke, 1997).

Fungusların hücre duvarları laminarin ( $\beta$ -1,3- glukan) ve kitin içermektedir (Pitson vd, 1993). Diğer minor hücre duvarı bileşenleri; proteinler ve lipidlerdir. Laminarin, bir D- glukoz polimeridir.  $\beta$ -1,3- konfügurasyonunda; fungal hücre duvarı %60'dan fazla laminarin içermektedir. Laminarin  $\beta$ -1,3-glukanaz tarafından hidrolize edilmektedir ve bu enzim ekzo ve endo  $\beta$ -1,3-glukanaz olarak sınıflandırılmaktadır. Her iki enzimin de laminarini sindirdiği saptanmış ve funguslarda hücre duvarı yapısında bulunduğundan fungusun beslenmesinde de rol oynadığı ortaya konmuştur (Pitson vd. 1993). T. harzianum'un sahip olduğu N-acetyl- $\beta$ -glukozaminidaz ve glukan 1,3-glukosidaz enzimleri ile B. cinerea'nın sporlarının çimlenmesini ve çimlenme tüplerini etkilediği saptanmıştır (Cohen-Kupiec vd. 1999; Lorito vd. 1994). Ayrıca T. harzianum'un endokitinaz ve ekzokitinaz (Chitobiosidase)'ın Enterobacter cloacae'nın biyokontrol bir izolatu ile kombine edildiğinde antifungal aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Lorito vd, 1994).

Lektinler, protein veya şekerlere bağlı glikoproteinlerdir. Rhizoctonia solani ve Sclerotinia rolfsii gibi bazı toprak kökenli bitki patojeni funguslar tarafından üretilmektedir (Barak vd, 1985; Elad vd, 1983). Araştırmaların tümü, lektinlerin Trichoderma ve patojenik funguslar arasında tanıma ve spesifiktir. Lektinler, Trichoderma'daki parazitik etkiyi tahrik eden sinyal olarak görev yapmaktadır (Elad vd, 1983). Trichoderma ve bitki patojeni funguslar arasındaki etkileşim ilk kez Dennis ve Webster (1971) tarafından incelenmiştir. Bundan sonraki adım; Trichoderma tarafından biyolojik kontrolün mekanizmasında, kitinazın önemi ve rolünü anlamak ve açığa çıkarmaktır.

Kitinaz, glukonaz, proteaz gibi hücre duvarını hidrolize edici enzimlerin mikoparazitizm'de önemli olduğu bildirilmiştir ve ajanın hifleriyle konukçuyu sarmal olarak çevrelemesi ve apressorium formlar oluşturmasının, sahip olduğu enzim sistemleriyle ilişkili olduğu belirlenmiştir (Chet, 1990; Kıvanç ve Küçük, 2001).

Mikoparazitik etkileşimde, T. harzianum'un konukçu fungus hücre duvarını parçalayarak hücre duvarını penetre ettiği kitinaz enziminin rolü araştırılmıştır (Broglie vd, 1991; Jach vd, 1995). Araştırmalar, iki farklı yönde ilerlemiştir. Bunlardan birincisi; toprak kökenli bitki patojeni funguslar ile Trichoderma arasındaki hücresel etkileşimin moleküler esasını ve tanımasını anlamak ve yapısını açıklamak yönünde olmuştur (Küçük vd, 2002).

Kitinazlar; kitin parçalayıcı enzimlerdir (Jach vd, 1995). Kitin 1-4- $\beta$  bağ lı N-D-glukozamin (GlcNAc)'in dallanmış bir polimerdir, sellülozdan sonra, doğada en fazla olan ikinci polimer olarak bulunmaktadır (Broglie vd, 1991; Jach vd, 1995). Kitinaz; bitkilerde, omurgalılarda ve prokaryotlarda yoktur, tarımsal zararlılarda, böcek ve birçok fungusta polimer bir yapı olarak bulunmaktadır (Havukla, 1991). Kitin, bir çok bitki patojenik fungusun hücre duvarını oluşturan ana bileşendir. Bakteriyel ve fungal ajanların her ikisi tarafından bitki patojeni olan fungusların kontrolünde kitinazın rolü çok büyük önem taşımaktadır (Broglie vd, 1991). Aeromonas caviae'nin bir kitinolitik izolatu, S. rolfsii ile suni olarak infekteli toprakta gelişen sağlıklı fasulye bitki köklerinden izole edilmiştir (Inbar ve Chet, 1995). A. caviae, sera koşulları altında; pamukta R. solani ve F. oxysporum f. sp. vasinfectum'u sırasıyla %78 ve %57 ve fasulyede S. rolfsii'yi %60 oranında kontrol ettiği saptanmıştır (Inbar ve Chet, 1995). A. caviae, sıvı ortamda tek karbon kaynağı olarak R. solani, S. rolfsii ve F. oxysporum f. sp. vasinfectum patojenlerinin canlı misellerini lize edebilmiştir. En yüksek kitinolitik aktivitesi ise, tek karbon kaynağı olarak ortamda kitin kullanıldığında elde edilmiştir. A. caviae tarafından  $\beta$ -1,3-glukanaz üretilmediği belirlenmiştir (Inbar ve Chet, 1995).

Trichoderma'nın kitinolitik enzimleri incelenmiş ve Trichoderma tek karbon kaynağı olarak kitin içeren sentetik kültürde geliştirildiğinde kitinolitik aktivite gösteren altı farklı enzim bulunmuştur. Bunlar ikisi  $\beta$ -1-4-N-asetil glukozamidazları (CHIT 102 ve CHIT 73) ve dördü ise endokitinazları (CHIT 52, CHIT 42, CHIT 33, CHIT 31) içerdiği ortaya konmuştur (Haran vd, 1995, Lorito vd, 1993).

Trichoderma harzianum izolatlarınınca üretilen enzimlerin çoğunun ısıya karşı oldukça duyarlı olduğu ve düşük pH düzeylerinde aktif oldukları belirlenmiştir (De La Cruz vd. 1995). T. harzianum P1'den saflaştırılan 1,4- $\beta$ -N-asetilglukanamidaz, 72 kDa olarak tespit edilmiştir (De La Cruz vd, 1995). 73 kDa'luk glukozamidaz (CHIT73)'in ise, T. harzianum TM izolatu salgılandığı ve CHIT73'ün ısıya karşı oldukça duyarlı olduğu bulunmuştur (Haran vd, 1995). T. harzianum izolatından saflaştırılan endokitinazın, pl değeri yaklaşık olarak 3.9 olarak bulunmuş ve 4 pH'da optimum aktivite gösterdiği Harman vd, (1995) tarafından belirlenmiştir.

Tek karbon kaynağı olarak kitinde geliştiği inde iki endokitinaz ise; 37 kDa ve 33 kDa'da belirlenmiştir ve pl değ erleri sırasıyla 4.6 ve 7.8 olarak bulunmuştur (De La Cruz vd. 1995). *T. harzianum* TM izolatinca 33 kDa (CHIT33) ve 31 kDa (CHIT 31)'da benzer iki endokitinaz saptanmıştır (Haran vd, 1995).

*T. harzianum* TM izolatinin kitin içeren ortamda gelişimiyle, ortamda kitinolitik enzimlerin oluştuğu u, glukoz içeren ortamda ise bu enzim sistemine rastlanmadığı belirlenmiştir (Harman vd, 1993; Haran vd, 1995). *Botrytis cinerea*'nın hücre duvarının bulunduğu ortamda *T. harzianum* CECT 2413 geliştirildiği inde, ortamda kitinaz enzimi saptanmıştır. *T. harzianum*'un *S. rolfsii*'nin karışık kültüründe CHIT 102 aktivitesi bulunurken 24 saat inkübasyondan sonra bu aktiviteye rastlanılmamış fakat *T. harzianum*'un CHIT 73 aktivitesi artmıştır (Inbar ve Chet, 1995). CHIT 73 aktivitesi 120 saatlik inkübasyon süresinde saptanmıştır. *T. harzianum* 1,3-β- ve 1,6-β- glukonaz aktiviteleri; karbon kaynağı olan nigeran (1,3-α-glukan, 1,4-α- glukan) ve pustulan (1,6-β- glukan) kullanıldığı nda artmıştır. Ayrıca *B. cinerea* ve *Saccaromyces cerevisiae*'nin hücre duvarları gelişme ortamına eklendiği inde de *T. harzianum*'un aktivitelerinin arttığı gözlemlenmiştir (De La Cruz vd, 1995). Cohen-Kupiec ve ark., (1999) tarafından yapılan bir çalışmada; *Trichoderma*'nın sahip olduğu u kitinolitik enzimlerin hedef organizmayı zayıflattığı ve in vitroda sinerjizmde rol oynadığı belirlenmiştir. Bu enzimler, sadece kitin veya fungal hücre duvarı ile hazırlanan preparatlarda, otoklavlanmış misel solusyonunda bulunmuştur (Lorito vd, 1993).

Mikoparazitizm'de *Trichoderma harzianum*'un *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, *Sclerotinia rolfsii* ve *Rhizoctonia solani*'ye olan etkisi belirlenmiştir (Küçük, 2000).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda *B. cinerea*, *Fusarium solani*, *F. graminearum*, *Ustilago avenae* ve *Ustilago necator* gibi birçok bitki patojenin, hifsel gelişimini ve spor çimlenmesini inhibe eden kitinolitik ve glukanolitik enzimler *Trichoderma harzianum* izolatlarından izole edilmiştir (Lorito vd. 1993; Cohen-Kubiec vd, 1999; Yedida vd, 1999).

Hidrolitik enzim grubunun üyesi olan proteazın da mikoparazitizm de önemli rol oynadığı belirlenmiş ve proteaz ile patojenin lizizi mümkün olabildiği gibi membrandan proteinlerin serbest bırakılmasını ve patojen hücre duvarının parçalanmasını sağ layarak mikoparazit için gerekli besin maddelerini sağ layabildiği i bildirilmiştir (Schirmböck vd, 1994; Geremia vd, 1993).

Ayrıca *T. harzianum* 39.1 izolatu tarafından iki 1,4-β-N-asetilglukozaminidaz'ın pürifikasyonu belirlenmiştir. SDS-PAGE'de moleküler ağı rlık 66 kDa olarak be-

lirlenirken, jel filtrasyonunda 118 kDa olarak tesbit edilmiştir (Ulhoa ve Peberdy, 1991).

*Trichoderma harzianum*'un etkinliğini arttırmak için, *Serratia marcescens*'den ChiA geni, plasmid DNA kullanılarak protoplast transformasyonu yolu ile *Trichoderma harzianum*'a transfer edilmiştir ve transformasyon sonunda *Trichoderma harzianum*'un kitinaz aktivitesi atasal kültüre göre yaklaşık olarak 10 kat göstermiştir (Haran vd, 1995). Yonca kök nodüllerinde kolonize olan, bitki simbiyanti *Rhizobium meliloti*'ye *S. marcescens*'den kitinaz geni aktarılmıştır. Elde edilen sonuçlardan nodüllerin hücre ekstratları *R. solani*'nin hiflerinin lizisine neden olduğu u belirlenmiştir (Sitrit vd, 1993).

Sellüolitik enzimlerin, *Trichoderma spp.*'den özellikle; *T. reesei* tarafından üretildiği bilinmektedir (Montenecourt, 1983; Beguin, 1990). *Trichoderma*'nın 2 farklı sellobihibitaz ürettiği belirlenmiştir. Sellüloz üretiminin; sellüloz içeren ortamda, *Trichoderma*'ya gliserol veya glukoz gibi kolay metabolize edilebilen karbon kaynağı sağ landığı nda olduğu u saptanmıştır (Beguin, 1990).

*Trichoderma* izolatları, çok çeşitli materyallerde gelişebildiği inden endüstride sellüloz üretiminde kullanılmaktadır. Hiper üretimi izolatlar, endüstriyel derecede sellüloz üretiminde de kullanılmaktadır (Montenecourt, 1983).

Kullanılan yöntemlerle, *Trichoderma* izolatlarında sadece bir veya iki sellüolitik enzim bulunabilmiştir. *Trichoderma* enzim preparatları, arpa ve yulaf gibi tahıllarda biyoteknik proseslerde kullanılmıştır. Ayrıca enzim preparatları olan CBHI veya CBHII (sellulobiyohidrolazlar) kağı t, meyve-sebze endüstrisinde, kullanılmaktadır. *Trichoderma*'nın endüstriyel izolatlarının kültür ortamlarında sellüloz salgıladıkları ve *cbh1*, *cb2*, *egl1* ve *egl2* sellüloz genlerinden *cbh1*'in yüksek enzim ürünlerini sağ layan çok etkili olduğu u belirlenmiştir (Durand vd, 1997).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda; katı faz fermentasyonun (SSF), fungal biyokontrol ajanlarının üretiminde tercih edildiği i bilinmektedir. SSF ile özellikle sekonder metabolitlerin ve enzimlerin üretimi sağ lanmaktadır. *Trichoderma*, *Metarhizium* ve *Beauveria* gibi birçok biyokontrol fungusun, fungal sporlarının kütle üretimi için SSF, kullanılabilir bir teknoloji olarak önerilmiştir (De Vrije vd, 2001).

*Trichoderma harzianum*'un pentachloropenol, pentachloronitrobenzene, endosulfan, dieldrin, DDT gibi organoklorin pestisidleri parçalayabildiği ve bioremediasyon için potansiyel uygulamalara sahip olduğu u Katayama ve Matsumura'nın (1993) yaptıkları bir çalışma ile ortaya konmuştur.

*Trichoderma harzianum*'un canlı bitki dokularına zarar vermediği, patojenlerin gelişimini önlediği ve en önemlisi bitki gelişimini artırdığı tesbit edilmiştir (Chet, 1990). Yapılan bir sera denemesinde *F. moniliforme* ile inokule edilmiş mısırdaki Eskişehir çevresinden izole edilmiş *T. harzianum* T8 izolatının  $10^7$  spor/ml lik dozunun % 81,3 ve *F. oxysporum* ile inokuleli domates ve fasulyede T20 izolatının  $10^7$  spor/ml lik dozunun sırasıyla % 52,1 ve % 74,3 ile hastalıklar üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. T8 ve T20 izolatlarının artan dozlarının bitkilerin boy uzunluklarını çalışmada kontrolle göze arttırdığı, kuru ve yaş madde ağırlıkları üzerinde de etkili olduğu belirlenmiştir (Küçük, 2000).

### 3. SONUÇ

*Trichoderma* genusuna ait fungusların mikoparazitlik aktivitesinin, fitopatolojik funguslara karşı antagonistik aktivitede etkili olan en önemli mekanizmalardan biri olduğu gösterilmiştir. *T. harzianum*'dan purifiye edilen enzimlerin antifungal etkileri yapılan çeşitli çalışmalarda açıklanmıştır.

*Trichoderma harzianum* preparatları son yıllarda ticari olarak üretilmiş ve bazı formulasyonları seralarda saksılara karışım olarak; tohum kaplama şeklinde topraklara uygulayarak veya yapraklara püskürterek denenmiştir. Ancak tarımda uygulamaları yaygın değildir. Günümüzde doğal ürünlere doğru artan ilgi, bitki hastalıklarının biyolojik kontrolünü gündeme getirmiştir. Ayrıca biyoteknolojideki hızlı gelişmeler tarım biyoteknolojisinde yoğun araştırmalara neden olmaktadır. Bitki hastalıklarının biyokontrolü ile ilgili çalışmalar uzun yıllardır yapılmaktadır. Çevreye zarar vermeden biyokontrol ajanları kimyasallara alternatif olarak kullanılmaktadır. Ancak daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu gösterilmiştir. Özellikle bu konudaki çalışmalar Türkiye'de yok denecek kadar az ve birbirinden uzaktır. Ülkemizin yerli izolatları ile yapılmış bir çalışma neredeyse bulunmamaktadır.

Biyokontrol ajanlarının daha yaygın olarak kullanılabilmesi için daha geniş çaplı ve uygulanmış araştırmalar yapılmalıdır. Ülkemiz içinde çok önem taşıyan bu tip çalışmalar; bilim adamı, çiftçi ve uzmanların ortak çalışmaları ile mümkün olacaktır.

Kullanılacak genetik manipulasyon teknikleri ile oluşturulacak transgenik *Trichoderma harzianum* izolatlarınınca üretilecek, yüksek sinerjetik etkili enzim kombinasyonları elde edilip ve bir izolattan izole edilen diğer fungus veya bakterilere aktararak birden fazla bitki patojenine etkili olması sağlanarak, daha etkili biyokontrol ajanlarının potansiyelinin artırılması tarımsal biyoteknoloji de önemli katkılar sağlayabilecektir.

### KAYNAKÇA

- Anke, T. (1997). *Fungal Biotechnology*, Chapman and Hall, London, pp. 65-76.
- Basım, H., Öztürk, Ş.B. ve Yegen, O. (1999). Biyolojik bir fungusit (*Planter Box T. harzianum* Rifaii T-22)'in pamuk fide kök çürüklüğü etmenlerine (*R. solani*, *Fusarium* spp.) karşı etkinliğinin araştırılması. GAP I. Tarım kongresi, Şanlıurfa, 137-144.
- Barak, R., Elad, Y. ve Chet, I. (1985). Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *S. rolfsii*. *Phytopathol.* 75, 458-462.
- Beguın, P. (1990). Molecular biology of cellulose degradation. *Ann. Rev. Microbiol.* 44, 219-248.
- Brogie, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, J.C. ve Broglie, R. (1991). Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254, 1194-1197.
- Chet, I. (1990). Biological control of soil-borne plant pathogens with fungal antagonist in combination with soil treatment. *Biological Control of Soilborne Plant Pathogens*, pp. 15-25
- Cohen-Kupiec, R., Broglie, K., Friesem, D., Broglie, R., and Chet, I. (1999). Molecular characterization of a novel b-1,3-exoglucanase related to mycoparasitism of *T. harzianum*. *Gene*. 226, 147-154.
- Cook, R.S. ve Baker, K.F., (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogen. St Paul, MN; The American Phytopathological Society.
- De La Cruz, J., Pintor-Toro, J.A., Benitez, T. ve Llobell, A. (1995). Carbon source control on  $\beta$ -glucanases, chitinase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Arch Microbiol.* 159, 316-322.
- Dennis, C. ve Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. I. Production of non volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57, 25-39.
- De Vrije, T., Antonia, N., Buitelaar, R.M., Bruckner, S., Dissevelt, M. ve Whipps, J.M. (2001). The fungal biocontrol agent *Coniothrium minitans*: production by solid-state fermentation, application and marketing. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 56, 58-68.
- Durand, A., Alman, S., Renaud, R., Maratary, J. (1997). Solid-state fermentation: an attractive alternative to submerged-liquid fermentations. *Agro-Food Ind. Hi-Tech.* 6, 39-42.

- Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. ve Henis, Y. (1983). Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathol.* 52, 456-462.
- Elad, Y. (2000). Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection.* 19, 709-714.
- Geremia, R., Goldman, G.H., Jacobs, D., Ardiles, W., Vila, S.B., Van Montagu, M. ve Herrera-Estrella, A. (1993). Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb 1*, related to mycoparasitism by *T.harzianum*. *Mol-Microbiol.* 8, 603-613.
- Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A. ve Chet, I. (1995). New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Mycol Res.* 99, 441-446.
- Harman, G.E., Hayes, C.K., Lorito, M., Broadway, R.M., Di Petro, A. ve Transmo, A. (1993). Chitinolytic enzymes of *T. harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathol.* 83, 313-318.
- Havukla, I. (1991). Chitinolytic enzymes and plant pests. In *Biotechnology in the Philippines Towards the year 2000. Proceeding of the Second Asia-Pacific Biotechnology Congress*, Eds: L.L Ilag ve A.K. Raymundo. Los Banos: SEARCA, University of the Philippines. ss.127-140.
- Inbar, J., Abramsky, D.C. ve Chet, I. (1994). Plant growth enhancement and disease control by *T. harzianum* in vegetable seedling growth under commercial conditions. *Plant Pathol.* 100, 337-346.
- Inbar, J. ve Chet, I. (1995). The role of the recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiol.* 141, 2823-2829.
- Jach, G., Gornhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J. ve Mass, C. (1995). Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* 8, 97-109.
- Katayama, A. ve Matsumura, F. (1993). Degradation of organo chlorine pesticides, particularly endosulfan, by *Trichoderma harzianum*. *Environ.Toxicol. Chem.* 12, 1059-1065.
- Kıvanç, M. ve Küçük, Ç. (2001). Biyolojik savaşım ajanı *Trichoderma* spp. *Biyoteknoloji.* 1, 83-88.
- Küçük, Ç. (2000). *T.harzianum* ile toprak kökenli bazı bitki patojenlerinin kontrolü. Y. Lisans Tezi (yayınlanmamış) A.Ü. Fen Bil. Enst. Eskişehir
- Küçük, Ç., ve Kıvanç, M. (2001). Sera ve laboratuvar koşullarında *Trichoderma harzianum*'un toprak kökenli bazı fungal bitki patojenleri üzerine etkisi. *Biyoteknoloji.* 25(2), 85-92
- Küçük, Ç, Kıvanç, M., Kınacı, E., ve Kınacı, G. (2002). *Trichoderma harzianum*'un biyokontrol mekanizması. *HASAD*, 201, 45-46.
- Lorito, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway, R.M., Woo, S.L. ve Di Petro, A. (1993). Chitinolytic enzymes produced by *T. harzianum*. II. Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathol.* 83, 302-307.
- Lorito, M., Hayes, C.K., Di Petro, A., Woo, S.L. ve Harman, G.E. (1994). Purification, characterization and synergistic activity of a glucan 1,3- $\beta$ -glucosidase and an N-acetylglucosamidase from *T. harzianum*. *Phytopathol.* 84, 398-405.
- Montenecourt, B.S. (1983). *Trichoderma reesei* cellulases. *Trends in Biotechnology.* 1, 156-161.
- Mora, A. ve Earle E.D. (2001). Combination of *Trichoderma harzianum* endochitinase and a membrane affecting fungicide on control of *Alternaria* leaf spot in transgenic broccoli plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 306-310.
- Pitson, S.M., Seviour, R.J. ve McDougall, B.N. (1993). Noncellulolytic fungal  $\beta$ -glucanases: their physiology and regulation. *Enzyme Microb. Technol.* 15.178-192.
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y.L., Hayes, C.K., Arslan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E., ve Kubicek, C.P. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonist action of *T. harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ. Microbiol.* 60, 4364-4370.
- Sivan, A. ve Chet, I. (1986). Biological control of *Fusarium* spp. in cotton, wheat and muskmelon by *T. harzianum*. *Phytopathol.* 116, 39-47.
- Sitrit, Y., Barak, Z., Kapulnik, Y., Oppenheim, A. ve Chet, I. (1993). Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Mol. Plant Microb. Inter.* 6, 293-298.
- Ulhoa, C.J. ve Peberdy, J.F. (1991). Purification and characterization of an extracellular chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Curr Microbiol.* 23, 285-289.

Waard, M.A.D., Georgopoulos, S.G., Hollomon, D.W., Ishii, H., Leroux, P., Ragsdale, N.N. ve Schwinn, F.J. (1993), Chemical control of plant diseases: problems and prospect. *Annu Rev Phytopathol.* 31. 403-421.

Whipps, J.M., Davies, KG. (2000). Biocontrol of plant pathogens and nematods by microorganisms Gurr G, Wratten, SD Eds: Measures of success in biological control. Kluwer, Dordrecht, pp 231-269.

Yedida, I., Benhamou, N., Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1061-1070.



**Çiğdem Küçük**, Eskişehir doğumlu. 1995'te Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü'nden mezun oldu. 2000 yılında yüksek lisansını tamamladı. Halen Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde doktorasına devam etmektedir.



**Merih Kıvanç**, Akşehir doğumlu. 1977'de Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü'nden mezun oldu. 1983'de Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Ürünleri Teknolojisi Bölümü'nde doktorasını tamamladı. 1990'da Doçent, 1995'de 2004'te Profesör oldu. Halen Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda görev yapmaktadır.



**Engin Kınacı**, Bolu doğumlu. 1972'de Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nden mezun oldu. 1982'de yüksek lisansını, 1991'de doktorasını bitirdi. 1994'te Doçent ve 2004'te Profesör oldu. Halen Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde görev yapmaktadır.



**Gülcan Kınacı**, Afyon doğumlu. 1985'te Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nden mezun oldu. 1986'da aynı fakülteye araştırma görevlisi olarak atandı. Yüksek lisansını 1987'de, doktorasını 1992'de bitirdi. 1999'da Doçent oldu. Halen Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde görev yapmaktadır.