

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEMEL VE ENDÜSTRİYEL MİKROBİYOLOJİ BİLİM DALI**

**ORMAN KÖKENLİ *TRICHODERMA* İZOLATLARINDAN
BİYOAKTİF METABOLİTLERİN VE İNHİBİTÖR ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Hazal KUPLAY CİTTAN

**Danışman
Prof. Dr. Evrim ÖZKALE KAYA**



MANİSA-2021

TEZ ADI

**ORMAN KÖKENLİ *TRICHODERMA* İZOLATLARINDAN BİYOAKTİF
METABOLİTLERİN VE İNİHİTÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

2021

Tez Sırtı Örneği

TEZ ONAYI

Hazal KUPLAY CİTTAN tarafından hazırlanan "**Orman Kökenli *Trichoderma* İzolatlarından Biyoaktif Metabolitlerin ve İnhibitör Etkilerinin Araştırılması**" adlı tez çalışması 01/09/2021 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak savunulmuş ve **oyçokluğu / oybirliği** ile başarılı olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Prof. Dr. Evrim ÖZKALE KAYA
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Fatih KALYONCU
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR
Ege Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Hazal KUPLAY CİTTAN



İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	II
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	III
TABLO DİZİNİ	IV
TEŞEKKÜR.....	V
ÖZET.....	VI
ABSTRACT	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Fungusların Genel Özellikleri	2
2.2. Fungusların Sistematığı	5
2.3. <i>Trichoderma</i>	7
2.3.1. Hypocreales	8
2.3.2. Hypocreaceae	8
2.3.3. Hypocrea.....	8
2.4. <i>Trichoderma</i> Türlerinin Biyokontrol Etkeni Olarak Kullanılması.....	9
2.5. Literatür Çalışmaları.....	9
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	13
3.1. Materyal.....	13
3.2. Yöntem	13
3.2.1. Besiyerlerinin Hazırlanması	13
3.2.2. <i>Trichoderma</i> İzolatlarının İzolasyonu	14
3.2.3. <i>Trichoderma</i> İzolatlarının Morfolojik ve Moleküler Tanılamaları	15
3.2.4. Fermantasyon Ortamı	17
3.2.5. <i>Trichoderma</i> Türlerinden Elde Edilen Filtratların in vitro Koşullarda Çeşitli Test Bakterileri Üzerinde İnhibitör Etkilerinin Belirlenmesi.....	17
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	19
4.1. <i>Trichoderma</i> İzolatlarının İzolasyonu ve Morfolojik Tanılamaları	19
4.2. <i>Trichoderma</i> İzolatlarının Moleküler Tanılaması	23
4.3. Fermantasyon Ortamı	23
4.3.1. <i>Trichoderma</i> Türlerinden Elde Edilen Filtratların Bakteriler Üzerinde Oluşturdıkları İnhibitör Etkinin Belirlenmesi.....	24
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	26

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CMD	Cornmeal Dekstroz Agar
DNA	Deoksiribonükleik asit
LBA	Luria Bertani Agar
LBB	Luria Bertani Broth
PDA	Patates Dekstroz Agar
PDB	Patates Dekstroz Broth
SNA	Synthetic Low Nutrient Agar
TEF1-α	Translation elongation factor 1-alpha
g	Gram
μm	Mikrometre
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
L	Litre
rpb2	DNA-directed RNA polymerase II subunit
V	Hacim
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Adaptasyon biyolojik çeşitliliği şekillendirir.....	3
Şekil 4.1. <i>Trichoderma</i> türlerinin CMD ve SNA'daki gelişimleri	21
Şekil 4.2. <i>Trichoderma</i> türlerinin mikroskopik görüntüleri.....	22
Şekil 4.3. <i>Trichoderma</i> filtratlarının test bakterileri ve kontrol antibiyotiklere karşı oluşturdukları inhibitör etkinin görüntüleri.....	24



TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Funguslarda belgelenmiş adaptasyon örnekleri	4
Tablo 3.1. CMD besiyeri içeriği.....	13
Tablo 3.2. SNA besiyeri içeriği.....	14
Tablo 3.3. LBB besiyeri içeriği	14
Tablo 3.4. LBA besiyeri içeriği.....	14
Tablo 3.5. Hypocrea/Trichoderma cinsinin genel filogenetik ağacında numaralandırılmış türlerin rpb2 ve tef1 dizileri için izolatlar ve erişim numaraları	16
Tablo 3.6. PCR için hazırlanan karışımın içeriği	17
Tablo 4.1. <i>Trichoderma</i> İzolatlarının 5 Gün İnkübasyon Sonunda Makroskopik ve Mikroskopik Değerlendirmeleri.....	23
Tablo 4.2. <i>Trichoderma</i> filtratları ve antibiyotiklerin test bakteri üzerinde kuyucuk boyutu hariç mm cinsinden inhibisyon bölgesinin çapı ..	25

Tablo 3.5.

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Evrim ÖZKALE KAYA'ya, lisansüstü öğrenimim boyunca tecrübelerini ve manevi desteğini hiç esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Fatih KALYONCU'a, çalışmam boyunca manevi gücünü her zaman yanımda hissettiğim canım oğlum Ege CİTTAN'a ve öğrenim hayatım boyunca beni destekleyen eşim Araş. Gör. Dr. Mustafa CİTTAN'a yürekten teşekkür ederim.

Hazal KUPLAY CİTTAN
Manisa, 2021

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Hazal KUPLAY CİTTAN

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Evrim ÖZKALE KAYA

Günümüzde yapılan biyoçeşitlilik çalışmalarına bakıldığında izole edilen *Trichoderma* genusu üyelerinin sayıca arttığı görülmektedir. Bu çalışmada toprak ve çam ağacı orman örtüsüne sahip bölgelerden seçilen örneklerden spesifik olarak *Trichoderma* genusu üyelerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Biyokontrol ajanı olarak *Trichoderma* türleri kullanımının, artan potansiyelleri göz önünde bulundurularak izole edilen *Trichoderma* türlerinin inhibitör etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

İlk olarak seçilen bölge içerisinde zig-zag bir çizgi üzerinde 15-20 adımda bir ve 8-10 noktadan alınan örnekleme metodu kullanılarak toprak örneklerinin alınması gerçekleştirilmiştir. Alınan toprak örneklerinden *Trichoderma* türlerine ait izolatları, seyreltme dilüsyon yöntemi ile uygun dilüsyon oranları kullanılarak izolasyon ortamında gerçekleştirilmiştir. Kültür gelişimi için inkübasyon koşullarına bırakılmış ve koloniler gelişim süreci boyunca günlük olarak izlenmiştir. *Trichoderma* görünümüne sahip olan kolonilerden saflaştırma işlemi için, izolasyon gerçekleştirilmiştir. Tespit edilen *Trichoderma* izolatları literatürde belirtilen tanılama besiyerlerine aktarılarak uygun inkübasyon koşullarında çoğaltılmıştır.

İzole edilen *Trichoderma* genusu üyeleri tanılama besiyeri gelişimi, gelişim süreçleri boyunca gözlemlenmiştir. Kültürel gözlem ve mikroskopik gözlem ile türleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu şekilde 38 saf kültürden 4 farklı *Trichoderma* izolatı belirlenmiştir.

Farklı habitat varlığında tespit edilen türlerin toprak verimliliği, bitki büyüme ve gelişimi üzerine yapılan çalışmalarda *Trichoderma*'ya ait metabolitlerin önemine vurgu yapıldığı görülmektedir. Bu amaçla tespit ettiğimiz ve aynı zamanda literatürde biyokontrol amaçlı olduğu belirlenen türlerimizle inhibitör aktivitenin araştırılması aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada öncelikle *Trichoderma* izolatları sıvı besi ortamında 15 gün inkübasyona bırakılmış, süre sonunda miseller sıvı besi ortamından ayrılarak, elde ettiğimiz sıvı kısmı da ise filtre edilerek ortamdan sporlar uzaklaştırılmış, oluşabilecek metabolitlerin ortamda kalmaları sağlanmıştır. Ardından inhibitör etkilerinin belirlenmesinde, ilk olarak test bakteri kültürleri aktiveleştirilmiştir. İnhibitör etkinin belirlenmesinde kuyucuk yöntemi kullanılmıştır ve inkübasyon sonrası gelişimi engelleyici zon oluşturması inhibitör etkinin varlığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Trichoderma*, inhibitör aktivite, biyokontrol, fungal metabolit.
2021, 34 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Hazal KUPLAY CİTTAN

Manisa Celal Bayar University
Faculty of Science and Letters
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Evrim ÖZKALE KAYA

Considering the biodiversity studies carried out today, it is known that the isolated members of the *Trichoderma* genus have increased in number. In this study, members of the genus *Trichoderma* were isolated from samples collected from the areas covered with soil and pine forest. Considering their increased potential as biocontrol agents, It was aimed to investigate the inhibitory effects of the isolated *Trichoderma* species in the study.

Initially, soil samples were collected by using the sampling method taken from 8-10 points and every 15-20 steps on a zigzag line in the selected region. *Trichoderma* spp. isolation from the collected soil samples were carried via dilution method by using the appropriate dilution rates. The culture was incubated for growth and the colonies were monitored daily throughout the development process. Isolation was performed for purification from the colonies with *Trichoderma* appearance. The detected *Trichoderma* isolates were transferred to the diagnostic media stated in the literature and reproduced under appropriate incubation conditions.

Isolated members of the *Trichoderma* genus were observed throughout their growth process. The species were attempted to be determined by cultural and microscopic observation. In this way, 4 different *Trichoderma* isolates from 38 pure cultures were determined.

It is observed that the importance of metabolites of *Trichoderma* is emphasized in studies on soil fertility, plant growth and development of species detected in different habitats. For this purpose, the inhibitory activity was investigated with our species that we identified and also determined in the literature for biocontrol purposes. Initially, *Trichoderma* isolates were incubated in liquid nutrient medium for 15 days, at the end of the period, the micelles were separated from the liquid medium, and the liquid part we obtained was filtered to remove the spores from the medium. Thus, it was ensured that the formed metabolites remained in the medium. Then, the test bacterial cultures were activated to determine their inhibitory effects. The agar well diffusion method was used to determine the inhibitory effect and the formation of an inhibitory zone after incubation indicated the inhibitory effect.

Keywords: *Trichoderma*, inhibitory activity, biocontrol, fungal metabolite.

2021, 34 pages

1. GİRİŞ

Trichoderma genusunun çeşitliliğinin yüksek olmasından dolayı onlarca tür biyokontrol formülasyonunda efektör olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte bazı türlerin mantarlar ve immün yetmezliğe sahip insanlarda patojen olabildikleri belirtilmiştir. Bu nedenle yeni güvenilir biyoefektörlere ihtiyaç duyulmaktadır. İnsan eli değmemiş ekosistemlerin, düşük girdili aynı zamanda fonksiyonel ve yenilenebilir mikrobiyal biyoefektörlerin doğal kaynaklar olduğu belirtilmektedir. Tarım yapılan alanlarda toprakta bulunan kominiteler sulama kültivasyon, farklı ksenobiyotikler kullanımı ve iklimsel koşullar sebebi ile büyük ölçüde bozulmaya uğramaktadır. Örneğin monokültür ekim yapılan topraklarda mikrobiyom dengesi bozulmakta bitki patojeni, omurgasız, fungus çoğalmaktadır. Ekositemin tarımsal alanlarda büyük ölçüde etkilenmesi bitkiler üzerinde de olumsuz etkilere yol açmaktadır.

Bitkilerin büyüme ve gelişiminde çeşitli organik bileşikler yardımcı olmaktadır. Metabolit olarak adlandırılan bu bileşikler bitkileri aynı zamanda patojenlere karşı koruduğu da bilinmektedir. Bitki patojenleri bitkinin gelişiminde önemli sorunlara yol açması sebebiyle, son yıllarda bitki patojenlerine karşı potansiyel biyokontrol ajanı olarak *Trichoderma* türlerinin kullanımı önem kazanmıştır.

Trichoderma türleri günümüzde mikoparazitik olarak güçlü bir etki göstermesi ve ürettiği metabolitler sebebiyle bitki gelişiminde önemli derecede yarar sağladığı bilinmektedir.

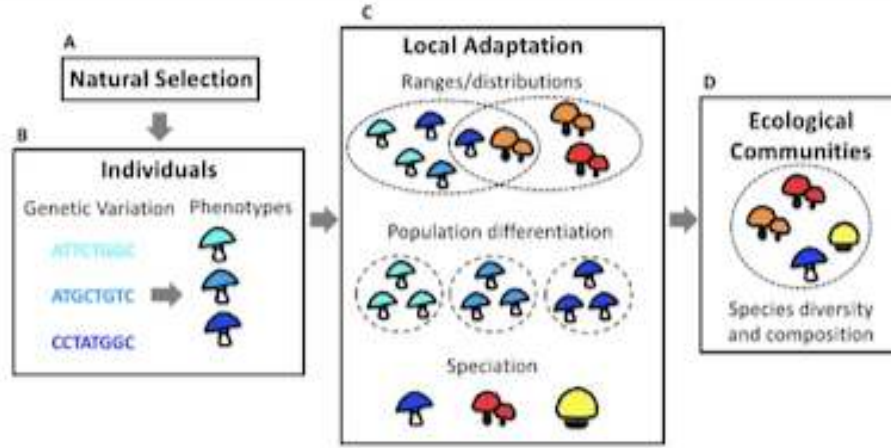
Bu çalışmada, orman kökenli izole edilerek tanımlanmış olan *Trichoderma* türlerinin fermantasyon koşullarında inkübasyonu sonrasında ürettiği düşünülen metabolitlerin test mikroorganizmalarına karşı inhibitör etkilerinin incelenmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar doğrultusunda *Trichoderma* türlerinin biyokontrol ajanı olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Çalışmamın devamında izolasyon koşullarının farklı olduğu farklı ortamlardan biyoçeşitliliğin belirlenmesi ve yeni metabolitlerin keşfedilmesi açısından yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fungusların Genel Özellikleri

Funguslar son tahminlere göre doğada 3.8 milyon türe varabilecek dikkat çekici bir çeşitliliğe sahiptir [1]. Bu organizmalar oldukça farklı kominitelerde yer almakta, yüksek seviyelerde tür zenginliği ve tür dönüşüm seviyesine sahip ve büyük ölçüde de endemizm göstermektedir [2,3]. Günümüzün gelişmiş dizileme teknolojileri ile elde edilen son ilerlemelere rağmen fungal çeşitliliğin şekillendiren ve devamını sağlayan mekanizma ve proseslerin çevresel bağlamda tam olarak anlaşılamadığı belirtilmektedir [4]. Fungal komiteler farklı uzamsal ölçeklerde etki eden ekolojik ve evrimsel faktörlerin iş görmesiyle şekillenmektedir. Fungal çeşitlilik ve kompozisyonda habitat seviyesinde iş gören başlıca çevresel abiyotik etkenler nem ve besin kaynağı elde edilebilmektedir. Ayrıca kompozisyon - kolonizasyon etkileride fungal kominite çeşitliliğini belirleyen önemli fenomenler arasında yer almaktadır [5–7]. Büyük miktarda propagül üretimine rağmen birçok fungus çok uzağa hareket edemez ve bölgeler arasında popülasyon gen akışı bulunmaz bu nedenle endemizm patenleri gözlemlenmektedir [3,8]. Bu dağılımdaki sınırlandırma ve lokal adaptasyon tür aralığı ve dağılımını belirlemede önemli rol oynar, sonuç olarakta ekolojik kominite birliklerini lokal bölgesel ve karasal ölçekte şekillendirir [4].



Şekil 2.1. Adaptasyon biyolojik çeşitliliği şekillendirir. Doğal seçim (A), fenotipler (B) üzerinde etkilidir ve bireylerin ev ortamlarında (C) daha yüksek uygunluk gösterdiği yerel adaptasyona yol açabilir. Yerel adaptasyon, bireylerin hayatta kalma sınırlarını belirler, aralıkları ve dağılımları etkiler, popülasyon farklılaşmasını belirler ve hatta türleşmeye yol açar. Ayrıca yerel, bölgesel ve kıtasal ölçeklerde tür çeşitliliğini ve bileşimini etkileyerek ekolojik toplulukları (D) doğrudan etkiler.

Adaptasyon fungal türlerin aralık ve çeşitliliğinin şekillenmesinde önemli bir prosesdir. Fungal komite oluşturulmasında bireysel türlerin işgal ettikleri habitatı kolonize edebilmelerini belirleyen spesifik bir evrimsel geçmişleri vardır. Habitatı kolonize edebilme, bir takım biyotik ve abiyotik faktörlerle karakterize edilen spesifik çevresel koşullar altında yerleşmelerini ve burada dağılabilme becerilerini vurgular. Lokal kalıcı genotipler avantajlı özelliklerin evrimi ile habitatı daha yüksek oranda uyumluluk göstermeye yol açar. Dayanıklılık ve doğal seleksiyonun yanı sıra dağılabilme yeteneği popülasyon çeşitliliği ve türleşmeye yol açar [9–11].

Tablo 2.1. Funguslarda belgelenmiş adaptasyon örnekleri

Selective force	Fungus	Lifestyle	Target of adaptation	Reference
Chemistry	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saprobe	Copper transporter	Hull et al., (2017)
	<i>Suillus brevipes</i>	Ectomycorrhizal	Membrane proton exchanger	Branco et al., (2015)
	<i>Suillus luteus</i>	Ectomycorrhizal	Zinc transporters	Ruytinx et al. (2017)
Climate	<i>Neurospora crassa</i>	Saprobe	Helicase, pre-fold chaperone	Coninx et al., (2017)
	<i>Suillus brevipes</i>	Ectomycorrhizal	Transmembrane transporters and helicases	Ellison et al., (2011)
Competition	<i>Metschnikowia reukafii</i>	Nectar yeast	Nitrogen scavenging	Branco et al., (2017)
Fungicides	<i>Candida</i> spp.	Human pathogen	Ergosterol synthesis	Dhami et al., (2016)
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Human pathogen	Sterol synthesis	Whaley et al., (2017)
				Kelly et al., (1994)
	<i>Rhynchosporium commune</i>	Plant pathogen	Calcium transporters, transcription activator, and saccharopine dehydrogenase	May et al., (2015)
	<i>Zymoseptoria tritici</i>	Plant pathogen	Ergosterol synthesis	Mohd-Assad et al., (2016)
Host				McDonald et al. (2019)
	<i>Entomophthora muscae</i>	Insect pathogen	Genes involved in utilization of host lipids and toxin secretion	Estep et al., (2015)
	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Plant pathogen	Effector molecules	Licht et al., (2016)
	<i>Melampsora lini</i>	Plant pathogen	Effector molecules	Liao et al., (2016)
	<i>Microbotryum</i> spp.	Plant pathogen	Effector molecules	Barrett et al., (2009)
	<i>Nectria haematococca</i>	Plant pathogen	Pathogenicity	Badouin et al., (2017)
	<i>Zymoseptoria tritici</i>	Plant pathogen	Effector molecules	Miao et al., (1991)
				Poppe et al., (2015)

Fungusları bir grup olarak diğer ökaryotlara karşı sınırlamak oldukça zordur ve belirli grupların dahil edilmesi veya çıkarılmasıyla ilgili tartışmalar uzun yıllardır devam etmektedir. Son yıllarda, ana tartışmalar, konuya biyolojik bir yaklaşım getiren ve mantarları birçok temel ekolojik ve fizyolojik özelliği paylaşan organizmalar olarak gören taksonomistler ile, özellikle ilgili DNA dizilerinin benzerliğine dayanarak filogenetik olarak tanımlamaya çalışan taksonomistler arasında olmuştur [12] ve genel olarak ilk yaklaşım kabul görmüştür.

Yaşam tarzlarına bağlı olarak, mantarlar aşağıdaki özelliklerle sınırlandırılabilir [13]:

1. Beslenme. Heterotrofik (fotosentezden yoksun), yutma yerine absorpsiyonla beslenme.
2. Bitkisel hayat. Alt tabaka üzerinde veya içinde, tipik olarak dahili protoplazmik akış gösteren hareketli olmayan bir hif miselyumu olarak. Hareketli üreme durumları ortaya çıkabilir.
3. Hücre çeperi. Tipik, genellikle glukanlar ve kitin bazında, nadiren glukanlar ve selüloz bazında bulunur.
4. Çekirdek. Ökaryotik, tek veya çok çekirdekli, thallus homo veya heterokaryotik, haploid, dikaryotik veya diploid.
5. Yaşam döngüsü. Basit ya da genel olarak karmaşık.

6. Üreme. Takip eden üreme olayları meydana gelebilir: cinsel (yani nükleer füzyon ve mayoz) ve/veya paraseksüel (yani nükleer füzyon ve ardından kademeli de-diploidizasyon) ve/veya aseksüel (yani tamamen mitotik nükleer bölünme).
7. Propagüller. Bunlar tipik olarak çok sayıda üretilen mikroskobik olarak küçük sporlardır. Hareketli sporlar belirli gruplarla sınırlıdır.
8. Sporokarplar. Mikroskopik veya makroskopik ve karakteristik şekiller gösteren, ancak yalnızca sınırlı doku farklılaşması.
9. Habitat. Karasal ve tatlı su habitatlarında her yerde bulunur, deniz ortamında daha az bulunur.
10. Ekoloji. Saprotroflar, mutualistler, parazitler veya hiperparazitler gibi önemli ekolojik roller.
11. Dağılım. Evrensel.

Fotosentetik pigmentleri bulunmadığından, fungusların heterotrofik bir beslenme şekli vardır. Tipik olarak yutma yoluyla beslenen hayvanların aksine, funguslar besinlerini salgılanan enzimlerin aktivitesi nedeniyle hücre dışı sindirim ve ardından çözünmüş parçalanma ürünlerinin emilmesi yoluyla elde ederler. Bu nedenle, hücre dışı sindirim ve emilim kombinasyonu, fungus yaşam tarzının nihai belirleyicisi olarak görülebilir. Bu yönleriyle fotosentez yaparak kendi besinlerini üreten bitkilerden ayrılırlar. Bununla birlikte, aynen bitki hücrelerinde olduğu gibi fungus hücrelerinde de hücre duvarı bulunmaktadır. Ancak hücre duvarı yapı maddesi olarak selülöz yerine kitin bulunmaktadır. Kitin hayvanlara has bir karbonhidrat olup kabukluların ve böceklerin dış iskeletlerinde yapı maddesi olarak kullanılır.

Funguslar eşeysiz ve eşeyli üreme yöntemlerini kullanarak spor oluşturma yoluyla çoğalırlar. Hem eşeysiz hem de eşeyli üreme aşamalarını içeren tüm yaşam döngüsü "holomorf" adıyla bilinir.

2.2. Fungusların Sistematiği

Fungus sistematiği, van Leeuwenhoek tarafından bileşik mikroskobun geliştirilmesi ile 17. yüzyıla kadar uzanır. Pier Antonio Micheli'nin 1729 tarihli *Nova Plantarum Genera* yayını bu alandaki öncü çalışma olarak kabul edilir [14]. Geleneksel taksonomide, mantarlar esas olarak gözlemlenebilir morfolojik ve diğer fenotipik

karakterlerine göre sınıflandırılmıştır. Mantarları yalnızca morfolojiye dayalı olarak sınıflandıran çok sayıda monograf ve başka literatür vardır, örneğin, Dematiaceous Hyphomycetes [15], A Reevaluation of the Bitunicate Ascomycetes with Keys to Families and Genera [16], More Dematiaceous Hyphomycetes [15], Genera of Hyphomycetes [17], The Coelomycetes [18], Prodromus to Class Loculoascomycetes [19] ve Illustrated Genera of Imperfect Fungi [20].

Son yıllarda elektronik mikroskopi tekniklerinin gelişmesiyle, iğ kutup gövdesi, hücre duvarı, septa ve septal gözenekler gibi fungal yapılar fungus sistematğinde kullanılmıştır [21]. Fungal yapılara ilişkin bilgiler, mantar evrimine ışık tutmuş ve mantar sistematğı çalışmasına katkıda bulunmuştur [22].

Diğer taraftan, metabolitlerin sistematik olarak bilgilendirici olduğu ve bütünleştirici taksonominin bir bileşeni olarak hizmet ettiği tespit edilmiştir. Örneğin, Xylariaceae ve Penicillium sistematğında kemotaksonomik karakterizasyon kullanılmıştır [23]. Ubikinon bileşikleri, hücresel yağ asitleri, hücre duvarı bileşimi ve izoenzimler ve allozimler dahil protein kalıpları gibi diğer karakterlerin de bu açıdan değerli olduğu bulunmuştur. Tüm fizyolojik ve biyokimyasal karakterler daha sonra mantar sistematğı ve filogeni için önemli tamamlayıcı bilgiler olarak kullanılmış, bu da geleneksel morfolojiye dayalı mantar taksonomisinin bütünleştirici mantar sistematğı çağına adım atmasına yardımcı olmuştur [23].

İlk fungus genomu (*Saccharomyces cerevisiae*) 1996'da yayınlanmıştır [24]. *Schizosaccharomyces pombe* 2002'de [25] ve *Neurospora crassa* 2003'te [26] dizilenmiştir. Ardından, beyaz-çürük *Phanerochaete chrysosporium*'un ilk Basidiomycota genomu 2004'te rapor edilmiştir [27]. Daha sonraları yeni nesil dizileme teknolojisindeki ilerlemeler, mantar genom dizilemesinde çarpıcı ilerlemeler sağlamıştır. Yeni nesil dizileme teknolojisi hızlı ve yüksek verimlidir ve Roche 454, AB SOLiD, Illumina GA/HiSeq System ve PacBio RS [28] dahil olmak üzere bir dizi farklı sıralama platformuyla temsil edilir. Ayrı DNA sentezi ve saptama adımlarına sahip Sanger dizilemesinden farklı olarak, yeni nesil dizileme teknolojisi, büyük ölçekli genomik çalışmayı her zamankinden daha hızlı ve daha uygun maliyetli hale getiren, yüksek verimli ve düşük maliyetli toplu paralel analize göre üstündür. Mevcut mantar genomlarının sayısı, özellikle son yıllarda, Joint Genome Enstitüsündeki 1000

Fungal Genomes Projesi [29] gibi genom konsorsiyumlarının çabalarıyla katlanarak artmıştır. TIGR ve Genoscope dizileme projeleri. 1000 Fungal Genome projesi, yaklaşık 500 tanınmış fungus familyasının her birinden en az iki tür genomunun dizilenmesine sahip olmayı amaçlamaktadır (<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/1000fungalgenomes.jsf>). Bugüne kadar, yaklaşık 800 mantar genomu (Eurotiomycetes'ten (%14), Dothideomycetes (%14), Sordariomycetes (%14) ve Agariomycetes (%25)) belirlenmiş ve yayınlanmıştır (<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>).

2.3. *Trichoderma*

Trichoderma ilk olarak Almanya'da genus düzeyinde Persoon tarafından 1794'te teşhis edilmiştir. 1974 yılında teşhis edilmesine rağmen, taksonomisi ve tür tanımlaması 1969 yılına kadar belirsizdi [30]. Rifai, *Trichoderma*'lar üzerinde yaptığı çalışmalarda *T. harzianum* da yer aldığı toplam dokuz tür belirlemiştir. Bissett ise 1984-1992 yılları arasında dokuz yeni tür daha belirlemiştir [31]. Druzhinina ve Kubicek, *Trichoderma* funguslarındaki tür kavramlarını ve biyolojik çeşitliliği kapsamlı bir şekilde gözden geçirmiştir. Yazarlar, *Trichoderma* funguslarının morfolojik olarak ayırt edilmesinin zor olduğunu, ancak filogenetik sınıflandırmanın hızla 100'e ulaştığını belirtmişlerdir [32,33].

Trichoderma türlerin kuvvetli mikoparazitik etki göstermeleri ve oluşturdıkları antibiyotiklerin de verimli olması son yıllarda araştırmacıların *Trichoderma*'lar üzerinde yoğun çalışmalar yürütmelerine yol açmıştır. Diğer taraftan, *Trichoderma*'ların antifungal etkileri ortaya konulmuş, böylece günümüze kadar potansiyel biyokontrol etmeni olarak çeşitli yönleriyle incelenmiştir. Günümüzde, *Trichoderma* türlerinin, mantarları, omurgasızları ve bakterileri içeren çeşitli toprak fitopatojenlerine karşı antagonizmaları iyi bilinmektedir. Sonuç olarak, biyolojik aktiviteleri, agresif büyüme ve fizyolojilerine ek olarak, ürettikleri çeşitli anti-mikrobiyal/antagonistik bileşiklere atfedilmektedir. *Trichoderma* türlerinin biyokontrol potansiyellerinden tam olarak yararlanılması, yerli bitkilerin, sera bitkilerinin ve tarımsal ürünlerin büyümesini kolaylıkla sağlayabilmektedir[34].

Trichoderma'lar Ascomycota alt bölümü, Hypocreales takımı ve Hypocaceae familyası ve Hypocrea genusunda yer almaktadırlar. Türler, hızlı gelişen kolonileriyle

başlangıçta saydam, şeffaf, daha sonra yeşile dönmesiyle karakterize edilirler. *Trichoderma* türü genellikle serbest olarak toprakta gelişebilen bir fungus olarak düşünülmesine rağmen, birtakım veriler *Trichoderma* türlerinin diğer patojen funguslar gibi fırsatçı, bazı bitkiler ile ortak yaşayabilen bir organizma olduğunu göstermektedir [31].

2.3.1. Hypocreales

Hypocreales kısaca parlak renkli sphaeriaceous mantarları olarak tanımlanabilmektedir. Parlak renk bu takımın en göze çarpan karakteridir. Erken tanımlanan ilk üyeleri *Sphaeria* cinsine dahil edilmiştir. Renge ek olarak, takımın bitkileri membranlı perithecia ve etli stromata ile karakterize edilir. Bu karakterlerden hiçbirisi tek başına yeterli olmasa da birlikte ele alındığında, belirgin bir doğal grup gibi görünen takım için oldukça belirleyicidirler [35].

2.3.2. Hypocreaceae

Hypocreaceae, Nectriaceae'ye benzeyen, ancak daha geniş stromalara sahip olması bakımından farklılık gösteren bir ailedir. Çoğu, diğer mantarların parazitleri gibi görünmektedir. Hypocreaceae, Sordariomycetes sınıfındaki bir ailedir. Hypocreaceae türleri genellikle parlak renkli, tipik olarak sarı, turuncu veya kırmızı ile tanınır. Aile, 1844'te Giuseppe De Notaris tarafından önerilmiştir [36].

2.3.3. Hypocrea

Hypocrea, Hypocreaceae familyasından bir fungus cinsidir. Yaygın cinsin, çürümüş ağaç üzerinde yetişen ve genellikle diğer mantarlarla ilişkilendirilen 171 tür içerdiği tahmin edilmektedir [37]. *Hypocrea* ile ilişkili anamorfik cinsler arasında *Acremonium*, *Gliocladium*, *Trichoderma* ve *Verticillium* bulunur [37]. *Hypocrea*, 1825'te mikolog Elias Fries tarafından sınırlandırılmıştır [38]. Adlandırma kodundaki değişiklikler nedeniyle, *Trichoderma* cinsi teleomorf *Hypocrea* üzerinde koruma için önerilmiştir. Bu hem *Hypocrea* hem de *Trichoderma* adına sahip tüm türlerin resmi olarak *Trichoderma* adlarıyla bilineceği ve yalnızca *Hypocrea* olarak tanımlanan tüm türlerin *Trichoderma*'ya aktarılacağı anlamına gelmektedir [39].

2.4. *Trichoderma* Türlerinin Biyokontrol Etkeni Olarak Kullanılması

Son çalışmalar *Trichoderma* türünün bitki hastalık etmenlerine karşı etkili olduğunu göstermektedir. Bitki kök yüzeylerine kolonize olarak bitki metabolizmalarında değişiklik meydana getirmeleri, bitki patojenlerinin gelişimini engelleyerek hastalığı azaltmaları, topraktan besinleri çözebilmesiyle bitki gelişiminde önemli rol oynamaları yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur.

Trichoderma türleri, selülozik atıkların geri dönüştürülmesinde kullanılan değerli ticari enzim kaynaklarıdır. Çevre dostu tarımda bitki hastalıklarını kontrol etmek için çeşitli *Trichoderma* türleri ticari olarak mevcuttur [40].

Ekinlerde ve orman ağaçlarında ekonomik öneme sahip çeşitli hastalıkları önlemek için bir takım ticari formülasyonlar geliştirilmiştir. İspanya'da, çeşitli mahsullerde yaprak dökülmesi hastalığından sorumlu patojen toprak kaynaklı mantarların büyümesini önlemek için *T. harzianum* ve *T. viride* kültürlerinden yapılan TUSAL adı altında pazarlanan bir formülasyon hazırlanmıştır. [41]. Ayrıca, *Trichoderma* türleri biyolojik çeşitlilikleri nedeniyle, geniş bir metabolit yelpazesi için kolaylıkla kullanılabilir kaynaklardır.

Bu konulardaki araştırmalar ile, bu fungusların biyolojisi, biyokimyası ve uygulamaları ile ilgili çok sayıda yayından toplanan geniş bir bilgi tabanı oluşturulmuştur [42]. *Trichoderma*'nın biyokontrol ajanı olarak potansiyeli kapsamlı bir şekilde gözden geçirilmiştir [43].

2.5. Literatür Çalışmaları

Trichoderma türlerinin yaşamsal faaliyetlerini sürdürdüğü sıcaklık aralığının kayda değer miktarda geniş olduğu, *T. harzianum* türünün genellikle sıcak tropikal topraklardan izole edildiği, diğer taraftan *T. polysporum* türünün en düşük 0°C, *T. koningii* türünün ise en fazla 40°C sıcaklıklarda büyüebildiği belirtilmiştir [44].

Ülkemizde gerçekleştirilen bir çalışmada, değişik coğrafik bölgelerden alınan toprak numunelerinden 14 farklı *Trichoderma* türü izole edilmiştir. Bu türler, *T. croceum* Bissett, *T. harzianum* Rifai, *T. hamatum* (Bonard.) Bainer, *T. atroviride* Bissett., *T. strigosum* Bissett, *T. spirale* Bissett, *T. tomentosum* Bissett, *T. inhamatum*

Veerkamp & W. Gams, *T. gamsii* Samuels & Druzhin, *T. asperellum* Samuels, *T. neokoningii* Samuels & Soberanis, *T. crassum* Bissett., Lieckf & Nirenberg, *T. virens* J.H., Mill., Giddens & A.A Foster ve *T. viride* Pers. olarak tanılanmıştır [45].

Diğer taraftan, *Trichoderma* cinsi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip metabolitlerin iyi bilinen üreticilerindendir [41,46].

Antrakınonlar, *Trichoderma* türlerinin iyi bilinen metabolitlerindendir. 1967 yılında, topraktan izole edilen vahşi bir *T. viride* türünün pachybasin, chrysophanol ve emodin ürettiği tespit edilmiştir [47]. Daha sonra, bir basidiomycete mantarı *Fomes annosus* ile beraber büyütülen *T. Polysporum*'dan, aynı üç bileşiği izole edilmiştir [48]. *Trichoderma* türlerinin bir izolatu ile *Fusarium oxysporum* veya *F. solani*'nin kombine kültüründen yine başka bir antrakınon türeği trichodermaol izole edilmiştir [49]. İzole edilen bir diğer antrakınon chrysophanol, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes* ve *Aspergillus fumigatus*'a karşı antifungal aktivite sergilemiştir [50].

Piron 6-pentil-2H-piran-2-on, *Trichoderma* cinsi için ortak olan temsili metabolittir. Söz konusu metabolit üç ayrı çalışmada *Trichoderma* cinsinde tespit edilmiştir [51–53].

Bazı *Trichoderma* türlerinde koninginin A–E ve G adlı bir dizi karmaşık piran keşfedilmiştir. Diffenbachia türünün köklerinden ve toprak hattından izole edilen *T. koningii* türünden koninginin A ve B izole edilmiştir [54,55]. Koninginin D, topraktan izole edilen bir *T. koningii* izolatının kültüründe ana metabolit olarak tespit edilmiştir [56].

Deniz ortamlarından izole edilen *T. virens* kültürlerinden trikodermamit A ve B olarak adlandırılan iki modifiye edilmiş dipeptit izole edilmiştir. Trikodermamit B, HCT-116 insan kolon kanserine karşı önemli in vitro sitotoksikite sergilerken, trikodermamit A'nın üç kanser hücre dizisi P388, A-549 ve HL-60 üzerinde zayıf bir sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur [57,58].

Viridin serisinin steroidal antibiyotikleri, hücre sinyalleşme sürecindeki belirli adımlarda seçici antifungal aktivite ve spesifik inhibitör etki göstermektedir. Viridin ilk olarak 1945 yılında *Gliocladium virens* (*Trichoderma virens*) fungusunun bir antifungal metaboliti olarak tanımlanmıştır [59]. Demethoxyviridin ve demethoxyviridiol, bilinmeyen bir mantar türünden fungisidal metabolitler olarak izole edilmiştir [60].

Viridiofunginler, *Candida*, *Cryptococcus* ve *Aspergillus* türlerine karşı güçlü geniş spektrumlu fungisidal bileşiklerdir [61] İlerleyen araştırmalar, bu bileşiklerin, farnesil transferazın inhibitörleri ve onkojenik Ras proteininin farnesilasyonunun önleyicileri olarak hareket ettiğini ve bu da kanser tedavi etme potansiyelleri olduğunu göstermiştir [62].

1989 yılında *T. Harzianum*'dan harzianopyridon izole edilmiştir [63]. Harzianopyridon'un rasemik formunun *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* ve *Pythium ultimum*'a karşı önemli antifungal aktivite gösterdiği bildirilmiştir [63,64].

Funguslardan doğal olarak oluşan birkaç dizi siklopentenon tanımlanmıştır. Trichodenones A–C, Japonya'da toplanan sünger *Halichondria okadai*'den izole edilen bir *T. harzianum* izolatından elde edilmiştir [65]. Bu bileşikler, kültürlenmiş P388 hücrelerine karşı önemli sitotoksikite sergilemişlerdir.

Azofilonlar, yüksek oranda oksijenlenmiş bir bisiklik çekirdek ve bir kiral kuaterner merkez içeren, yapısal olarak çeşitli bir doğal ürün ailesi oluştururlar. İki azafilon tipi bileşik, harziphilon ve Flephilon, *T. harzianum*'un bütanol-metanol (1:1) ekstraktından izole edilmiştir [66].

Harzialactone A ve B olarak adlandırılan iki yeni hidroksi-lakton ve bilinen R-mevalonolactone, orijinal olarak *Halichondria okadai* süngerinden ayrılmış olan *T. harzianum*'un OUPS-N115 izolatından izole edilmiştir[65].

Bazı funguslarda butenolid halka sistemine sahip biyoaktif metabolitler tanımlanmıştır. Bunlardan harzianolide, *T. harzianum*'un üç farklı izolatından izole

edilmiştir [67,68]. Diğer tarftan söz konusu molekülün ayrıca bir de-hidro türevinin tespit edildiğini bildirilmiştir [67]. Bu moleküller, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* fungusunun büyümesine karşı karşı antagonizma göstermişlerdir [64,67].

Trichodermin ilk olarak 1964'te önerilen bir *T. viride* izolatından izole edilmiştir [69]. Daha sonra bu bileşik *T. polysporum*, *T. sporulosum* [70] ve *T. reesei*'de [71] de tespit edilmiştir. Trichodermol, trichodermin'in deasetil türevi, trichodermin'in hidrolizi ile elde edilmiş [69] ve daha sonraları *T. polysporum* ve *T. sporulosum*'dan doğal bir ürün olarak izole edilmiştir [70]. Trichodermin'in protein sentezindeki uzama ve sonlandırma adımlarının bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir [72]. Bu bileşik ayrıca birkaç hücre hattına karşı sitotoksik aktivite göstermiştir [73].

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

Çalışmanın materyali Manisa Celal Bayar Üniversitesi kampüs çevresinde ve Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi kampüs çevresinde yer alan ormanlık bölgeden özellikle ağaç kabukları ve ağaç kök çevresinden alınan toprak örnekleri ve o örneklerden saf şekilde izole edilen *Trichoderma* izolatlarıdır. Çalışmada Cornmeal Dekstroz Agar (CMD), Synthetic Low Nutrient Agar (SNA), Potato Dekstroz Agar (PDA), Luria Bertani Broth (LBB) ve Luria Bertani Agar (LBA) besiyerleri kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Besiyerlerinin Hazırlanması

CMD hazırlarken besi ortamına Corn Meal Agar 500 g'lık orijinal ambalajlarda 1 litreye 40 gram olacak şekilde tartılmıştır ardından, 1 litreye 0,2 gram Dekstroz (Glucose) eklenerek besiyeri hazırlanmıştır. Besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra steril petrilere aktarılmıştır. Kullanılan süreye kadar +4 °C'de bekletilmiştir.

Tablo 3.1. CMD besiyeri içeriği

Besiyeri	Bileşenler	Miktar (g/L)
Cornmeal Dekstroz Agar (CMD)	Corn Meal Agar	40
	Dextrose (Glucose)	0,2

SNA besiyeri 1 litreye aşağıdaki tabloda belirtilen miktarda eklenen bileşiklerle hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra steril petrilere aktarılmıştır. Kullanıma kadar +4°C'de bekletilmiştir.

Tablo 3.2. SNA besiyeri içeriği

Besiyerleri	Bileşenler	Miktar (g/L)
Synthetic Low Nutrient Agar (SNA)	KH ₂ PO ₄	1
	KNO ₃	1
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
	KCl	0,5
	Glukoz	0,2
	Sukroz	0,2
	Agar	20

Tablo 3.3. LBB besiyeri içeriği

Besiyerleri	Bileşenler	Miktar (g/L)
Luria Bertani Broth (LBB)	Tryptone	10
	Yeast Extract	5
	NaCl	5

Tablo 3.4. LBA besiyeri içeriği

Besiyerleri	Bileşenler	Miktar (g/L)
Luria Bertani Agar (LBA)	Tryptone	10
	Yeast Extract	5
	NaCl	5
	Agar	15

PDA besiyeri için ürün 500 g'lık orijinal ambalajlarda 1 litreye 39 gram tartılarak otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra steril petrilere aktarılmıştır. Kullanılan süreye kadar +4 °C'de bekletildi. Genel üretim besiyeri olarak kullanılmıştır.

PDB besiyeri için ürün 500 g'lık orijinal ambalajlarda 1 litreye 24 gram tartılarak otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra steril petrilere aktarılmıştır. Kullanılan süreye kadar +4 °C'de bekletildi. Genel üretim besiyeri olarak kullanılmıştır.

3.2.2. *Trichoderma* İzolatlarının İzolasyonu

Örnekleme için Manisa Celal Bayar Üniversitesi kampüs çevresinde ve Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi kampüs çevresinde yer alan orman topraklarından, özellikle ağaç kökleri çevresi ve kabuklarından, bunun yanı sıra kesilmiş ağaç kütüklerinden (mevcut ise) örnekler alınarak, laboratuara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen toprak örnekleri 250 ml erlen içersine 25 g olacak şekilde, üzerine 225 ml saf su eklenerek

hazırlanan karışım, 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla homojenize olacak şekilde karıştırılmıştır. Elde edilen karışım 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} oranlarda seyreltilerek her bir karışımdan 1 ml olacak şekilde ortama aktarılmıştır. Genel ve *Trichoderma* için geliştirilen Cornmeal Dekstroz Agar (CMD), Patates Dekstroz Agar (PDA), Synthetic Low Nutrient Agar (SNA) besiyerlerine seyrelterek elde edilen 10 ml'lik karışımların her birinden 1 ml olacak şekilde bu besiyerlerine dökme plaka yöntemi ile aktarılmıştır. Ekim sonrası besiyerleri farklı inkübasyon koşullarında izolasyonları yapılmıştır. Farklı sıcaklık (20 °C'de ve 30 °C'de) koşullarında karışık olarak elde edilen izolatların *Trichoderma* izolatına ait olanları tanılanıp saf kültür elde etmek amacıyla PDA besiyerine aktararak, 27 °C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen saf kültürler PDA yatık besiyerine stok kültür amaçlı -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. *Trichoderma* İzolatlarının Morfolojik ve Moleküler Tanılamaları

İzole edilen izolatların tanılamaları morfolojik, kültürel ve mikroskopik yöntemler ile gerçekleşmiş olup, moleküler tanılama yöntemi ile doğrulanmıştır. Morfolojik ve kültürel karakteristiklerin belirlenmesi için; Cornmeal Dekstroz Agar (CMD: 40 g cornmeal, %2 dekstroz ve %2 agar), Patates Dekstroz Agar (PDA ticari) ve Synthetic Low Nutrient Agarda yapılarak, inkübasyon sonrasında tanılamaları gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın bu basamağında saf izolatlar öncelikle SNA (Synthetic Low Nutrient Agar) besiyeri ve CMD (Cornmeal Dekstroz Agar) besiyerinde 27 °C de 12 saat ışıklı, 12 saat karanlık ortamlarda inkübasyona bırakılmış olup, gelişen kültürlerin 7. ve 14. günleri morfolojik özellikleri (conidium uzunlukları ve genişlikleri, phialid uzunlukları) bakımından mikroskopik açıdan değerlendirilmiştir. SNA (Synthetic Low Nutrient Agar) ve CMD (Cornmeal Dekstroz Agar) besi ortamında gelişen kültürlerden 1 cm çapında plaklar alınarak PDA (Patates Dekstroz Agar) besiyerine altararak, 27 °C de 12 saat ışıklı, 12 saat karanlık ortamlarda inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kültürlerin 7. ve 14. günleri morfolojik özellikleri (conidium uzunlukları ve genişlikleri, phialid uzunlukları) bakımından mikroskopik açıdan değerlendirilmiştir.

Moleküler tanılamalar için seçilmiş türlerin öncelikle genomik DNA ekstraksiyonları gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyon basamağında Gene Mark Genomic DNA kiti kullanılmıştır. Ardından nanodrop ölçümleri yapılan örneklerin DNA yoğunlukları ölçülmüş, 260 - 400 nm arası dalga boyuna sahip örneklerle PCR aşamasına geçilmiştir. Bu çalışmada PCR aşamasında tef1 ve rpb2 primerleri kullanılmıştır. Jaklitsch WM (2009) yaptığı çalışmasında rpb2 ve tef1 dizileri için, Hypocrea/Trichoderma cinsinin genel filogenetik ağacında erişim numaraları tablo 3.5. de belirtilmiştir. PCR için türler arasındaki filogenetik ilişki hakkında daha fazla bilgi edinmek için tef1 ve rpb2 (RNA Polymerasesecond Largest Subunit) gen bölgeleri seçilmektedir. Bu aşamada tablo 3.6. da belirtildiği şekilde her örnek için PCR tüplerine hazırlanan 48 µL karışıma 2 µL DNA içeriği ekleyerek toplamda 50 µL olan karışım hazırlanmıştır. Bu karışım örnekleri Applied Biosystems Veriti 96 Well Termal Cycler marka PCR cihazındaki kuyucuklara yerleştirilerek uygun sıcaklık periyotlarında amplifikasyonları yapılmıştır. PZR ürünlerinin saflaştırılmaları ve dizi analizlerinin elde edilmesi gerçekleştirilmiştir. Dizi analizlerinin işlemlerinin yapılmasında BioEdit programı ve filogenetik analizlerini yapılmasında MEGA software (V 7.0) kullanılmıştır.

Tablo 3.5. Hypocrea/Trichoderma cinsinin genel filogenetik ağacında numaralandırılmış türlerin rpb2 ve tef1 dizileri için izolatlar ve erişim numaraları [74]

Taxon	Name in part I	Strain	Accession rpb2	Accession tef1
<i>Hypocrea albolutescens</i>	H. sp. 1	CBS 119286	FJ860517	FJ860609
<i>H. atlantica</i>	H. sp. 11	C.P.K. 1896	FJ860545	
<i>H. atlantica</i>	H. sp. 11	CBS 120632		FJ860649
<i>H. auranteffusa</i>	H. sp. 2	CBS 119284	FJ860520	FJ860613
<i>H. austriaca</i>	H. sp. 3	CBS 122494	FJ860525	FJ860619
<i>H. bavarica</i>	H. sp. 4	C.P.K. 2021	FJ860526	FJ860620
<i>H. calamagrostidis</i>	H. sp. 5	CBS 121133	FJ860528	FJ860622
<i>H. margaretensis</i>	H. sp. 6	C.P.K. 3127	FJ860529	FJ860625
<i>H. junci</i>	H. sp. 9	CBS 120926	FJ860540	FJ860641
<i>H. luteffusa</i>	H. sp. 10	CBS 120537	FJ860543	FJ860645
<i>H. luteocrySTALLINA</i>	H. sp. 8	CBS 123828	FJ860544	FJ860646
<i>H. neorufoides</i>	H. sp. 12	C.P.K. 1900	FJ860553	
<i>H. neorufoides</i>	H. sp. 12	CBS 119506		FJ860657
<i>H. pachypallida</i>	H. sp. 13	CBS 120533	FJ860559	
<i>H. pachypallida</i>	H. sp. 13	CBS 122126		FJ860662
<i>H. phellinicola</i>	H. sp. 14	CBS 119283	FJ860569	FJ860672
<i>H. rhododendri</i>	H. sp. 15	CBS 119288	FJ860578	FJ860685
<i>H. sambuci</i>	H. sp. 16	WU 29467	FJ860585	FJ860693
<i>H. silvae-virgineae</i>	H. sp. 7	CBS 120922	FJ860587	FJ860696
<i>H. subeffusa</i>	H. sp. 17	CBS 120929	FJ860597	FJ860707
<i>H. valdunensis</i>	H. sp. 18	CBS 120923	FJ860605	FJ860717

Tablo 3.6. PCR için hazırlanan karışımın içeriği

KARIŞIMIN İÇERİĞİ	ÖRNEKTEKİ MİKTARI (µL)
DNA	2
TEF1-α	2,5
rpb2	2,5
Master mix	8
d H ₂ O	35

3.2.4. Fermantasyon Ortamı

Trichoderma izolatları PDB ortamında (sıvı) 15 günde 27 °C’de büyütülmüştür. Süre sonunda misel ve fermantasyon brothları birbirinden filtre kâğıdı yardımıyla sıvı besi ortamından ayırarak, elde ettiğimiz sıvı kısmı da 0.45 µm’lik şırınga filtresi kullanılarak ortamdan sporlar uzaklaştırılmıştır. Filtrelerden geçirilen filtrat, test bakterileri/kültürleri üzerinde denenmiştir. Fermantasyon sıvısının filtrasyonu yapılmıştır.

3.2.5. *Trichoderma* Türlerinden Elde Edilen Filtratların in vitro Koşullarda Çeşitli Test Bakterileri Üzerinde İnhibitör Etkilerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada in vitro koşullarda *Trichoderma* izolatlarının ürettiği metabolitlerin test bakterileri üzerindeki inhibitör etkilerinin belirlenmesinde 2 farklı yöntem kullanılmıştır. İlk olarak çalışmanın başlangıcında bakteri kültürleri LBB besi ortamına 0.5 McFarland bulanıklığında ayarlanarak, 37 °C’de 18 saat inkübasyon sürecinde aktifleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Ardından petri kabına 1mL test bakterisi aktarılmış, üzerine LBA besiyeri eklenerek katı bir ortam oluşturulmuştur. Ortam oda sıcaklığına geldiğinde ve katılaştıktan sonra petri ortamında 5 mm çapında kuyucuklar açılarak, kuyucukların içersine 50 µL filtrat aktarılmıştır. İnhibitör etkiyi doğrulamak amaçlı her besi ortamına ampicillin, penicillin, vancomycin ve tetracycline antibiyotik diskleri yerleştirilmiş, 37 °C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Diğer yöntem ise petrilere ½ LBA besiyeri + ½ filtrat olacak şekilde ortama aktararak ve ortam katılaştıktan sonra 0.5 mL test bakterisi yayma plaka yöntemi ile ekim yapılarak 37 °C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi boyunca belirli periyotlarda zon oluşumu ölçülüp zon çapı bakımından değerlendirilmiştir.



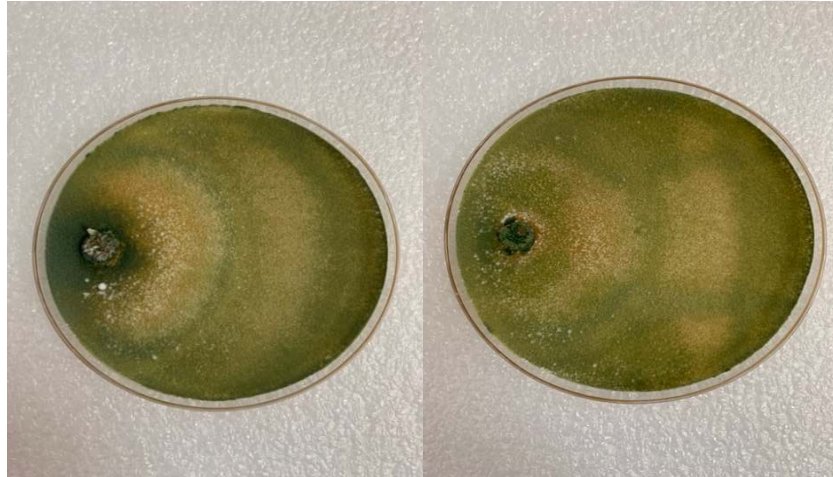
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

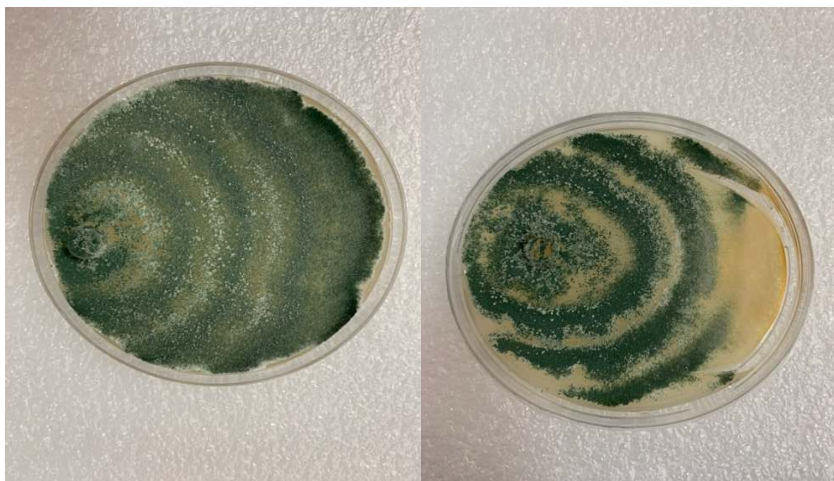
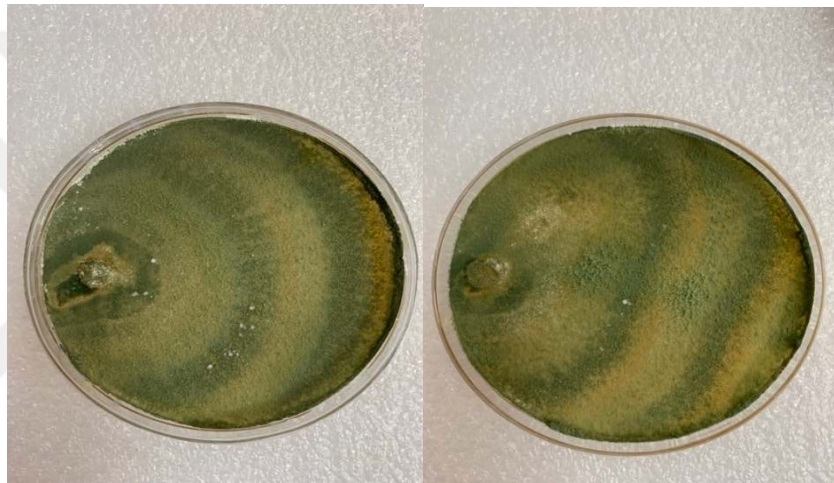
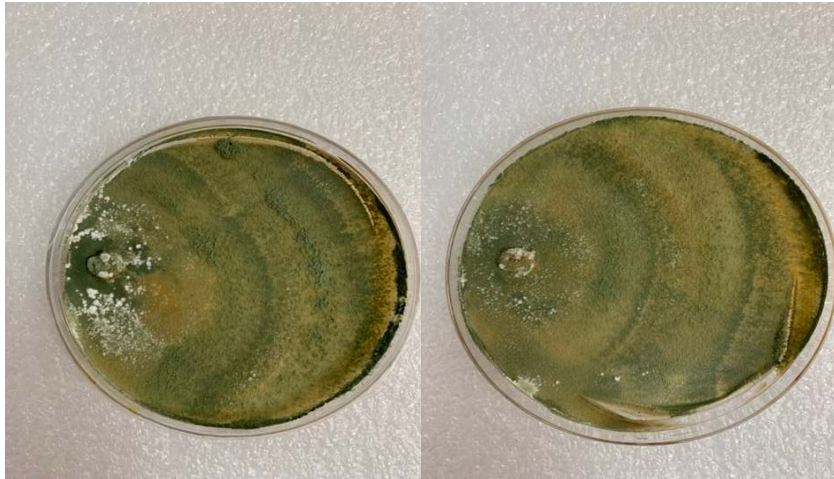
4.1. *Trichoderma* İzolatlarının İzolasyonu ve Morfolojik Tanılamaları

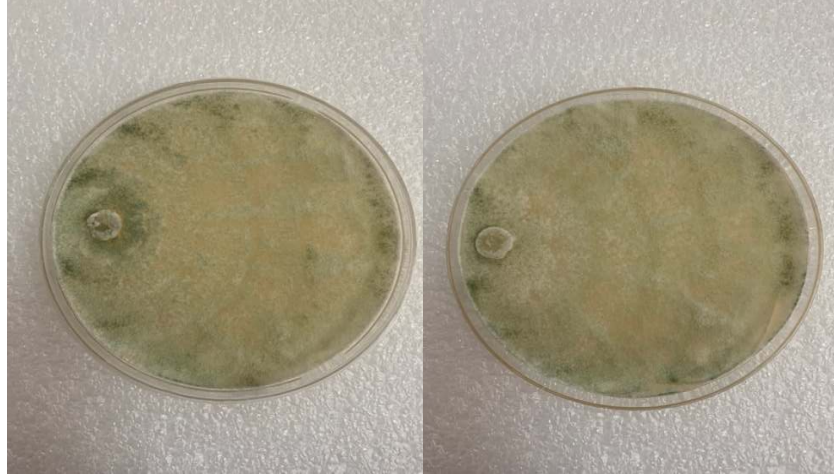
Örnekleme için Manisa Celal Bayar Üniversitesi kampüs çevresinde ve Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi kampüs çevresinde yer alan orman topraklarından, özellikle ağaç kökleri çevresi ve kabuklarından, bunun yanı sıra kesilmiş ağaç kütüklerinden örnekler alınarak, laboratuara getirilmiştir. Manisa Celal Bayar Üniversitesi kampüs çevresinden alınan toprak örneklerinden 20 *Trichoderma* izolatı elde edilmiştir. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi kampüs çevresinde ormanlık alandan alınan toprak örneklerinden ise 18 *Trichoderma* izolatı elde edilmiştir. Saf kültür olarak izole edilen *Trichoderma* suşları SNA ve CMD besiyerinde 27 °C’de 12 saat ışıklı, 12 saat karanlık ortamdaki inkübasyon sonucunda 3-4 gün sonrasında görünür koloni oluşturdıkları, 7 günden sonra ise petri plaklarını kapladıkları, makroskopik ve mikroskopik incelemelerine göre de kontrol suşa benzer özellikler gösterdikleri görülmüştür (Şekil 4.1).

CMD

SNA

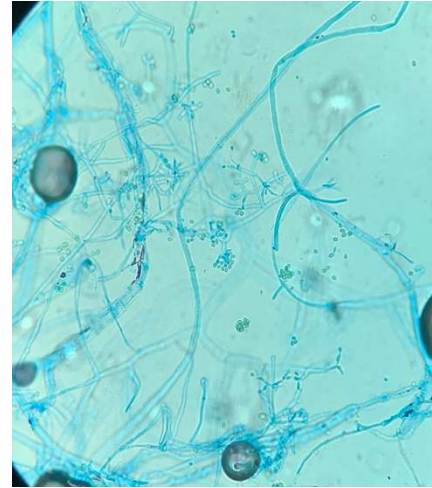
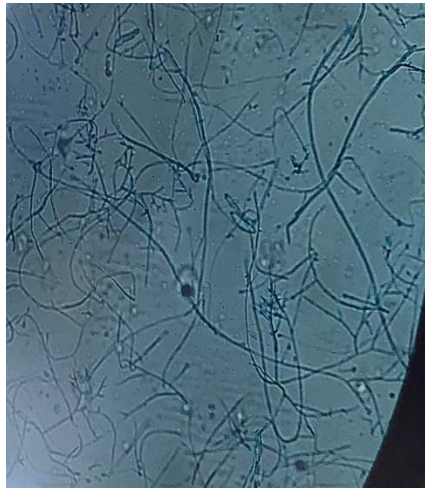
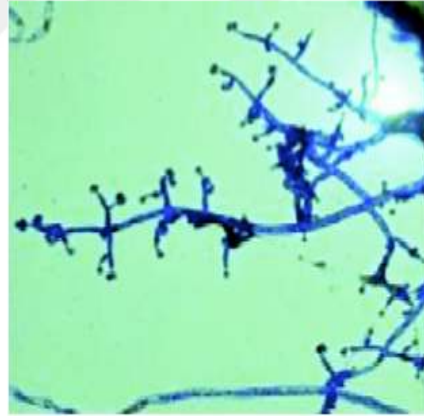
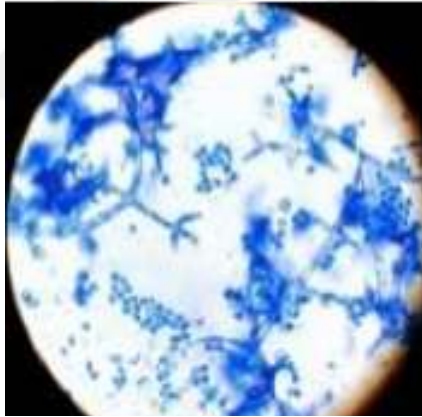


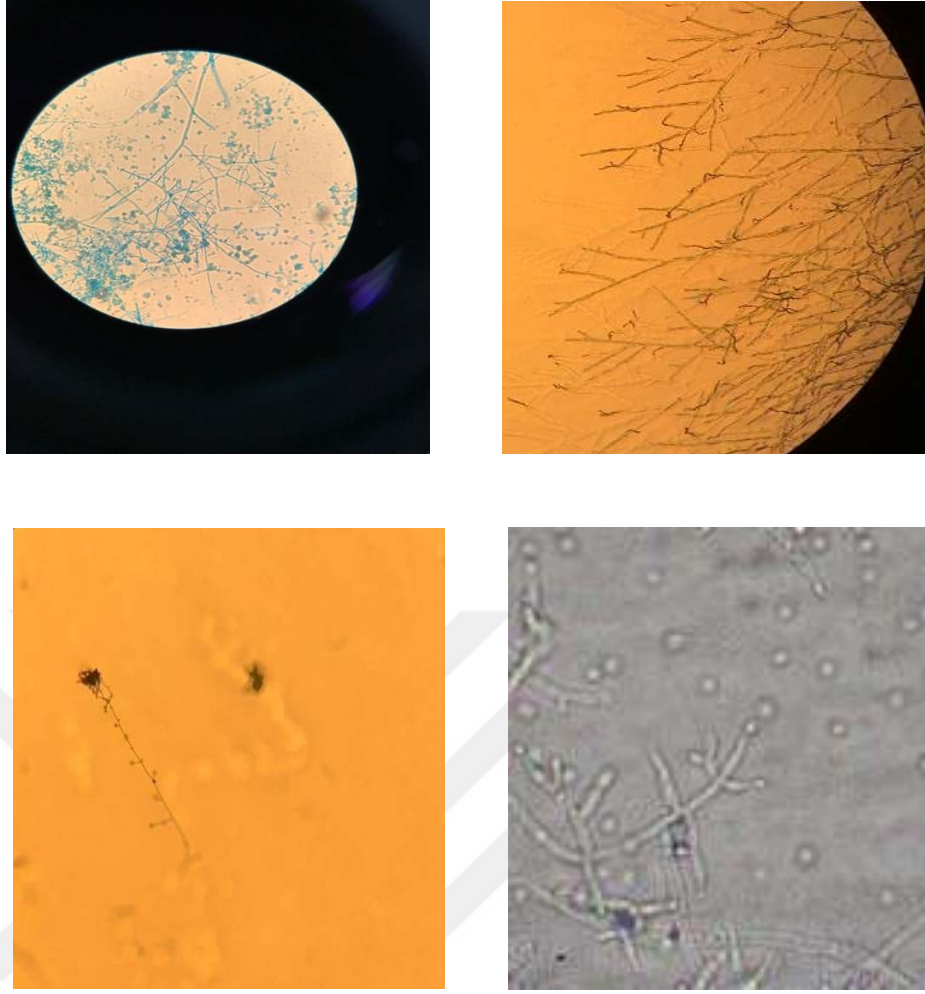




Şekil 4.1. *Trichoderma* türlerinin CMD ve SNA'daki gelişimleri

Trichoderma suşları CMD ve SNA besiyerinde sınırları belirgin koloni oluşturdıkları, farklı renk tonlarında büyüme gösterdiği belirlenmesi üzerine mikroskopik olarak benzerlik ve farklılıkları incelenmiştir.





Şekil 4.2. *Trichoderma* türlerinin mikroskopik görüntüleri

Genel olarak *Trichoderma* izolatlarının mikroskopik görüntülerinde ise yuvarlak yapıda konidia, bölmeli miselyum ve çatallı, ağaç şeklinde konidiofor yapıları görülmektedir. Ayrıca fialid yapılarında spor kütleleri görülmekte olup, konidyum diye adlandırdığımız bu yapıların eliptik ve tek hücreli oldukları görülmektedir. Hif diye adlandırdığımız uzun yapıların ise septaları olduğu görülmektedir.

Makroskopik olarak petrilerde görülen farklılıklar, mikroskopik açıdan da görülmüştür. Bazı *Trichoderma* türlerinin konidia yapıları yuvarlak, bazılarının ise eliptik şekil gösterdiği görülmüştür. Ayrıca fialid yapılarının oval, yuvarlak ve hafif ince bir tabanı olan bir şişe şeklinde farklı yapılar gösterdiği görülmüştür (Tablo4.1).

Tablo 4.1. *Trichoderma* izolatlarının 5 gün inkübasyon sonunda makroskobik ve mikroskobik değerlendirmeleri

Örnek Numarası	PDA Koloni Çapı	CMD Koloni Çapı	SNA koloni Çapı	Petrideki Koloni Rengi	Konidiofor	Fialid Yapıları	Spor Yapıları	Tür Adı
K3-1	≥ 7 cm	≥ 5 cm	≥ 6 cm	Yeşil - Sarı	Dallanmış	2-3 lü	Yuvarlak	<i>T. harzianum</i>
MA1-7	≥ 7 cm	≥ 5 cm	≥ 6 cm	Yeşil - Sarı	Dallanmış	2-3 lü	Yuvarlak	<i>T. harzianum</i>
MA3-2	≥ 7 cm	≥ 5 cm	≥ 6 cm	Yeşil	Dallanmış	2-3 lü	Yuvarlak	<i>T. harzianum</i>
MA3-6	≥ 7 cm	≥ 5 cm	≥ 6 cm	Yeşil - Sarı	Dallanmış	2-3 lü	Yuvarlak	<i>T. harzianum</i>
MA3-4	≥ 7 cm	≥ 5 cm	≥ 6 cm	Koyu Yeşil	Kısa	Virgül	Yuvarlak	<i>T. virens</i>
MA1-4	≥ 7 cm	≥ 5 cm	≥ 6 cm	Açık yeşil beyaz (pamuksu)	Dallı ince	İnce	Oval	<i>T. neokoningii</i>
MA3-9	≥ 7 cm	≥ 5 cm	≥ 6 cm	Beyaz	Dallanmış	2-3 lü	Yuvarlak	<i>T. atroviride</i>
M1-2	≥ 7 cm	≥ 5 cm	≥ 6 cm	Koyu Yeşil	Az dallanma	2 li	Yuvarlak	<i>T. asperellum</i>

4.2. *Trichoderma* İzolatlarının Moleküler Tanılaması

Makroskobik ve mikroskobik farklılıklara bağlı olarak seçilen izolatların tanılaması için moleküler tanılama yöntemi kullanılmıştır. Moleküler tanılamalar için seçilen izolatların öncelikle kit kullanılarak DNA ekstraksiyonları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra sekans analizlerini yapmak amacıyla TEF1- α ve rpb2 primerleri kullanılarak DNA'larından PCR yapılmıştır. PCR ürünü jel elektroforezde 1000 bp. DNA markır kullanılarak yürütüldü olup PCR yöntemi ile primerleri kullanılarak gen çoğaltılması yapılmıştır. Çoğaltılan bu genlerin dizi analizleri yapılmıştır. Sekans sonuçlar NCBI GenBank'ta BLAST'lanarak yüzde benzerlikleri bakımında değerlendirilmiştir.

4.3. Fermantasyon Ortamı

Trichoderma izolatları PDB ortamında (sıvı) 15 günde 27 °C'de büyütülmüştür. Süre sonunda misel ve fermantasyon brothları birbirinden filtre kâğıdı yardımıyla sıvı besi ortamından ayırarak, elde ettiğimiz sıvı kısmı da 0.45 μ m'lik şırınga filtresi kullanılarak ortamdan sporlar uzaklaştırılmış, metabolitlerin ortamda kalmaları sağlanmıştır. Filtrelerden geçirilen filtrat, *E. aerogenes*, *B. subtilis*, *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* ve *Y. enterocolitica* bakterileri/kültürleri üzerinde denenmiştir. Fermantasyon sıvısının ortamın filtrasyonu paralel yapılmıştır.

4.3.1. *Trichoderma* Türlerinden Elde Edilen Filtratların Bakteriler Üzerinde Oluşturdukları İnhibitör Etkinin Belirlenmesi

Çalışmada elde edilen metabolitlerin, *E. aerogenes*, *B. subtilis*, *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* bakterileri üzerindeki inhibitör etkileri gözlemlenmiştir. *Y. enterocolitica* ise zon oluşumu gözlemlenmemiştir. *Trichoderma* filtratlarının test bakterileri ve kontrol antibiyotiklere karşı oluşturdukları inhibitör etkilerinin bazı görüntüleri Şekil 4.3’de, zon çapları(mm) ise Tablo 4.2.’de görülmektedir.



Şekil 4.3. *Trichoderma* filtratlarının test bakterileri ve kontrol antibiyotiklere karşı oluşturdukları inhibitör etkinin görüntüleri

Tablo 4.2. *Trichoderma* filtratları ve antibiyotiklerin test bakteri üzerinde kuyucuk boyutu hariç mm cinsinden inhibisyon bölgesinin çapı

Test Bakterisi	<i>T.</i> <i>harzianum</i> Filtratı	<i>T.</i> <i>atroviride</i> Filtratı	<i>T.</i> <i>virens</i> Filtratı	Ampicillin (10 µg) Zon çapı	Penicillin (10 µg) Zon çapı	Vancomycin (30 µg) Zon çapı	Tetracycline (30 µg) Zon çapı
<i>B. cereus</i>	15 mm	13 mm	-	26 mm	24 mm	18 mm	16 mm
<i>B. subtilis</i>	18 mm	10 mm	-	25 mm	27 mm	14 mm	15 mm
<i>E. aerogenes</i>	15 mm	12 mm	-	11 mm	13 mm	10 mm	11 mm
<i>E. coli</i>	12 mm	10 mm	-	16 mm	17 mm	13 mm	14 mm
<i>S. aureus</i>	22 mm	12 mm	-	32 mm	29 mm	18 mm	19 mm
<i>Y.</i> <i>enterocolitica</i>	-	-	-	16 mm	18 mm	16 mm	15 mm

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada Manisa kampüs çevresinden ve Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi kampüs bölgesinden alınan topraklardan izole edilen ve MA - M - K olarak kodlanan toplamda 38 adet mikrofungusun saf kültür şekliyle izole edilmiştir. Elde edilen bu izolatlar SNA, CMD ve PDA besiyerlerinde 27 °C 12 saat ışıklı ve 12 saat karanlık ortamda büyümeleri izlenmiş bir sıra açık bir sıra koyu renkli koloni oluşturduğu tespit edilmiştir. Farklı türlerin büyüme ve dalgalı yapı oluşturmaları ve farklı renklerde koloni oluşturdıkları belirlenmiştir. İzolatların CMD besi ortamında koyu ve açık renkli daha sınırları belirgin büyüme gösterdiği, SNA besiyerinde ise bu sınırların olduğu fakat CMD de ki kadar keskin hatlarla olmadığı gözlemlenmiştir.

Bazı kolonilerin petride sarı bazılarının ise yeşilin açık ve koyu tonlarıyla büyüme gösterdiği görülmüştür. Farklı renk tonlarında olmaları ve farklı büyüme göstermeleri farklı türlere ait olabileceği bağlı olarak mikroskopik değerlendirme yapılmıştır. Mikroskopik açıdan *Trichoderma* izolatlarının yuvarlak yapıda konidia, bölmeli miselyum ve çatallı, ağaç şeklinde konidiofor yapıları görülmektedir. *Trichoderma* türlerinde genel olarak konidyum yapıları eliptik ve tek hücreli oldukları görülmektedir. Hif yapıları ise çoğunlukla septalı olduğu görülmektedir. Makroskopik ve mikroskopik farklılıklar sebebiyle aralarından seçilen 8 izolatin moleküler tanımlanması yapılmıştır. Moleküler tanılama sonucunda *T. harzianum*, *T. neokoningii*, *T. virens* ve *T. atroviride* türlerinin yaygın türler olduğu belirlenmiştir.

Trichoderma harzianum ve *T. atroviride* 'den elde edilen filtratın, *E. aerogenes*, *B. subtilis*, *E. coli*, *B. cereus*, ve *S. aureus* üzerindeki inhibitör etkilerinin olduğu, *Y. enterocolitica* bakterisinin gelişimi üzerine ise herhangi bir inhibitör etkisinin olmadığı belirlenmiştir. *T. virens* kültüründen elde edilen filtratta ise hiçbir bakteriye karşı inhibitör aktiviteyle karşılaşılmasıdır.

Bu çalışmada elde ettiğimiz *Trichoderma* izolatlarının ülkemizde izole edilmiş olmaları çalışmamıza özgünlük kazandırmaktadır. *Trichoderma* türlerinin antagonist etkileri bakımından, bakteriler üzerinde inhibitör etkisinin belirlenmiş olması literatüre yeni bir bilgi kazandırmak açısından yarar sağlayacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Hawksworth, D., Lücking, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology spectrum*. 2017, 5.
2. Taylor, JW., Turner, E., Townsend, JP., Dettman, JR., Jacobson, D. Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: Examples from the kingdom Fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2006, 361: 1947–63.
3. Talbot, JM., Bruns, TD., Taylor, JW et al. Endemism and functional convergence across the North American soil mycobiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014, 111: 6341–6.
4. Branco, S. Fungal diversity from communities to genes. *Fungal Biology Reviews*. 2019, 33: 225–37.
5. Lindahl, BD., Ihrmark, K., Boberg, J et al. Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. *New Phytologist*. 2007, 173: 611–20.
6. Livingston, G., Matias, M., Calcagno, V et al. Competition–colonization dynamics in experimental bacterial metacommunities. *Nature Communications*. 2012, 3: 1–8.
7. Crowther, TW., Maynard, DS., Crowther, TR., Peccia, J., Smith, JR., Bradford, MA. Untangling the fungal niche: the trait-based approach. *Frontiers in Microbiology*. 2014.
8. Branco, S., Gladieux, P., Ellison, CE et al. Genetic isolation between two recently diverged populations of a symbiotic fungus. *Molecular Ecology*. 2015, 24: 2747–58.
9. Savolainen, O., Lascoux, M., Merilä, J. Ecological genomics of local adaptation. *Nature Reviews Genetics*. 2013, 14: 807–20.
10. Taylor, JW., Branco, S., Gao, C et al. Sources of Fungal Genetic Variation and Associating It with Phenotypic Diversity. *Microbiology Spectrum*. 2017, 5.
11. Branco, S., Bi, K., Liao, HL et al. Continental-level population differentiation and environmental adaptation in the mushroom *Suillus brevipes*. *Molecular Ecology*. 2017, 26: 2063–76.
12. Barr, D. Evolution and Kingdoms of Organisms from the Perspective of a Mycologist. *Mycologia*. 1992, 84: 1.

13. Webster, J., Weber, R. Introduction to Fungi. Cambridge University Press. 2007.
14. Alexopoulos, CJ. Introductory mycology. Introductory mycology. 1962.
15. Ellis, MB. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. 1971.
16. Arx, JA von., Muller, E. A re-evaluation of the bitunicate ascomycetes with keys to families and genera. CBS Studies in Mycology. 1950, 9: 136–42.
17. Carmichael, J., Kendrick, W., Connors, I., Sigler, L. Genera of Hyphomycetes. Canada: University of Alberta Press. 1980.
18. Sutton, B. The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute. 1980.
19. Barr, M. Prodrum to Class Loculoascomycetes. MA, USA: Department of Botany, University of Massachusetts. 2004.
20. Barnett, HL., Hunter, BB. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society. 1972.
21. Guarro, J., Gené, J., Stchigel, AM. Developments in fungal taxonomy. Clinical Microbiology Reviews. 1999, 12: 454–500.
22. Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, CJ et al. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. American Journal of Botany. 2004, 91: 1446–80.
23. Frisvad, JC., Filtenborg, O. Secondary Metabolites as Consistent Criteria in *Penicillium* Taxonomy and a Synoptic Key to *Penicillium* Subgenus *Penicillium*. Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. 1990, 373–84.
24. Goffeau, A., Barrell, BG., Bussey, H et al. Life with 6000 Genes. Science. 1996, 274: 546–67.
25. Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M-A et al. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. Nature. 2002, 415:6874 2002; 415: 871–80.
26. Galagan, JE., Calvo, SE., Borkovich, KA et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Nature. 2003, 422:6934 2003; 422: 859–68.
27. Martinez, D., Larrondo, LF., Putnam, N et al. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. Nature Biotechnology. 2004, 22:6 2004; 22: 695–700.

28. Goodwin, S., McPherson, JD., McCombie, WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*. 2016, 17:6 2016; 17: 333–51.
29. Grigoriev, I V., Cullen, D., Goodwin, SB et al. Fueling the future with fungal genomics. *Mycology*. 2011, 2: 192–209.
30. Rifai, M. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*. 1969, 116: 1–56.
31. Aydın, MH. Bitki Fungal Hastalıklarıyla Biyolojik Savaşta *Trichoderma*'lar. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*. 2015, 2: 135–48.
32. Druzhinina, I., Kubicek, C. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *Journal of Zhejiang University Science B*. 2005, 6: 100–12.
33. Druzhinina, I., Kopchinskiy, A., Kubicek, C. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*. 2006, 47: 55–64.
34. Verma, M., Brar, SK., Tyagi, RD., Surampalli, RY., Valéro, JR. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*. 2007, 37: 1–20.
35. Seaver, FJ. The *Hypocreales* of North America—I. *Mycologia*. 2018, 1: 41–76.
36. De, Notaris. G. Osservazione su alcuni generi e specie della tribu dei *Pirenomiceti sferiacei*. *Giornale botanico Italiano*. 1844, 2: 38–55.
37. Kirk, P., Cannon, P., Minter, D., Stalpers, J. *Dictionary of the Fungi*. Wallingford, UK: CAB International. 2008.
38. Fries, E. *Systema Orbis Vegetabilis*. Lundin, Sweden: Typographia academica. 1825.
39. Rossman, A., Seifert, K., Samuels, G. Genera in *Bionectriaceae*, *Hypocreaceae*, and *Nectriaceae* (*Hypocreales*) proposed for acceptance or rejection. *IMA Fungus*. 2013, 4: 41–51.
40. Cutler, HG., Cutler, SJ. *Biologically Active Natural Products : Agrochemicals*. New York: CRC Press. 1999.
41. Reino, JL., Guerrero, RF., Hernández-Galán, R., Collado, IG. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*. 2007, 7: 89–123.
42. Kubicek, C., Harman, G. *Trichoderma And Gliocladium, Volume 2: Enzymes, Biological Control And*. London: Taylor & Francis Ltd. 1998.

43. Papavizas, GC. Trichoderma and Gliocladium: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. Annual Review of Phytopathology. 2003, 23: 23–54.
44. Tronsmo, A., Dennis, C. Effect of temperature on antagonistic properties of Trichoderma species. Transactions of the British Mycological Society. 1978, 71: 469–74.
45. Turhan, MHAG., Turhan, G. Rhizoctonia solani'nin fungal antagonistlerinin belirlenmesi üzerinde araştırmalar. ANADOLU Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi. 2009, 19: 49–72.
46. Ghisalberti, E. Anti-infective Agents Produced by the Hyphomycetes Genera Trichoderma and Gliocladium. Current Medicinal Chemistry -Anti-Infective Agents. 2005, 1: 343–74.
47. Slater, GP., Haskins, RH., Hogge, LR., Nesbitt, LR. Metabolic products from a Trichoderma viride Pers. ex Fries . Canadian Journal of Chemistry. 1967, 45: 92–6.
48. Donnelly, DMX., Sheridan, MH. Anthraquinones from Trichoderma polysporum. Phytochemistry. 1986, 25: 2303–4.
49. Adachi, T., Aoki, H., Osawa, T., Namiki, M., Yamane, T., Ashida, T. Structure of trichodermaol, antibacterial substance produced in combined culture of Trichoderma sp. with Fusarium oxysporum or Fusarium solani. Chemistry Letters. 1983, 923–6.
50. Agarwal, SK., Singh, SS., Verma, S., Kumar, S. Antifungal activity of anthraquinone derivatives from Rheum emodi. Journal of Ethnopharmacology. 2000, 72: 43–6.
51. Claydon, N., Allan, M., Hanson, JR., Avent, AG. Antifungal alkyl pyrones of Trichoderma harzianum. Transactions of the British Mycological Society. 1987, 88: 503–13.
52. Simon, A., Dunlop, RW., Ghisalberti, EL., Sivasithamparam, K. Trichoderma koningii produces a pyrone compound with antibiotic properties. Soil Biology and Biochemistry. 1988, 20: 263–4.
53. Collins, RP., Halim, AF. Characterization of the major aroma constituent of the fungus Trichoderma viride. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002, 20: 437–8.
54. Cutler, HG., Himmelsbach, DS., Yagen, B et al. Koninginin B: a biologically active congener of koniginin A from Trichoderma koningii. Journal of

- Agricultural and Food Chemistry. 2002, 39: 977–80.
55. Cutler, HG., Himmelsbach, DS., Arrendale, RF., Cole, PD., Cox, RH. Koninginin A: A Novel Plant Growth Regulator from *Trichoderma koningii*. Agricultural and Biological Chemistry. 2014, 53: 2605–11.
 56. Dunlop, RW., Simon, A., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, EL. An Antibiotic from *Trichoderma Koningii* Active Against Soilborne Plant Pathogens. Journal of Natural Products. 2004, 52: 67–74.
 57. Garo, E., Starks, CM., Jensen, PR., Fenical, W., Lobkovsky, E., Clardy, J. Trichodermamides A and B, cytotoxic modified dipeptides from the marine-derived fungus *Trichoderma virens*. Journal of Natural Products. 2003, 66: 423–6.
 58. Liu, R., Gu, Q-Q., Zhu, W-M., Cui, C-B., Fan, G-T. Trichodermamide A and aspergillazine A, two cytotoxic modified dipeptides from a marine-derived fungus *Spicaria elegans*. Archives of Pharmacal Research. 2005, 28: 1042–6.
 59. Brian, PW., McGowan, JG. Viridin: a Highly Fungistatic Substance Produced by *Trichoderma viride*. Nature. 1945, 156: 144–5.
 60. Aldridge, DC., Turner, WB., Geddes, AJ., Sheldrick, B. Demethoxyviridin and demethoxyviridiol: new fungal metabolites. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1. 1975, 943–5.
 61. Harris, GH., Turner, Jones ET., Mainz, MS et al. Isolation and structure elucidation of viridifungins A, B and C. Tetrahedron Letters. 1993, 34: 5235–8.
 62. Mainz, M., Pelaez, F., Omstead, M et al. Cholesterol-lowering agents, their manufacture with *Trichoderma*, and their use as fungicides or as medicines. Eur. Pat. Appl. 1993, 526936.
 63. Dickinson, JM., Hanson, JR., Hitchcock, PB., Claydon, N. Structure and biosynthesis of harzianopyridone, an antifungal metabolite of *Trichoderma harzianum*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1. 1989, 1885–7.
 64. Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, EL., Lorito, M., Sivasithamparam, K. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. Letters in Applied Microbiology. 2006, 43: 143–8.
 65. Amagata, T., Usami, Y., Minoura, K., Ito, T., Numata, A. Cytotoxic substances

- produced by a fungal strain from a sponge: Physico-chemical properties and structures. *Journal of Antibiotics*. 1998, 51: 33–40.
66. Qian-Cutrone, J., Huang, S., Chang, L-P et al. Harziphilone and Fleepphilone, Two New HIV REV/RRE Binding Inhibitors Produced by *Trichoderma harzianum*. *The Journal of Antibiotics*. 1996, 49: 990–7.
 67. Almassi, F., Ghisalberti, EL., Narbey, MJ., Sivasithamparam, K. New Antibiotics from Strains of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*. 1991, 54: 396–402.
 68. Claydon, N., Hanson, JR., Truneh, A., Avent, AG. Harzianolide, a butenolide metabolite from cultures of *Trichoderma harzianum*. *Phytochemistry*. 1991, 30: 3802–3.
 69. Godtfredsen, W., Vangedal, S. Trichodermin, a new antibiotic related to trichothecin - Google Akademik. *Royal Soc Chemistry*. 1964, 188–9.
 70. Adams, P., Hanson, J. Sesquiterpenoid metabolites of *Trichoderma polysporum* and *Trichoderma sporulosum*. *Phytochemistry*. 1972, 11: 423.
 71. Watts, R., Dahiya, J., Chaudhary, K., Tauro, P. Isolation and characterization of a new antifungal metabolite of *Trichoderma reesei*. *Plant and Soil*. 1988, 107: 81–4.
 72. Westerberg, U., Bolcsfoldi, G., Eliasson, E. Control of transfer RNA synthesis in the presence of inhibitors of protein synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1976, 447: 203–13.
 73. Choi, SU., Choi, EJ., Kim, KH et al. Cytotoxicity of trichothecenes to human solid tumor cells in vitro. *Archives of Pharmacal Research*. 1996, 19: 6–11.
 74. Jaklitsch, WM., European species of *Hypocrea*. Part I. The green-spored species. *Studies in Mycology*. 2009, 63: 1-9.