



T.C.
NIĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

BEAUVERIA BASSIANA'NİN ÇEŞİTLİ FUNGUSLARA KARŞI ANTAGONİST
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YUNUS BOZKURT

HAZİRAN 2024

T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

BEAUVERIA BASSIANA'NİN ÇEŞİTLİ FUNGUSLARA KARŞI ANTAGONİST
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YUNUS BOZKURT

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. AYTEN ÖZTÜRK

HAZİRAN 2024

Yunus BOZKURT tarafından **Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK** danışmanlığında hazırlanan ***Beauveria bassiana***'nın **Çeşitli Funguslara Karşı Antagonist Özelliklerinin Belirlenmesi** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoteknoloji** Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Gökçen YUVALI (Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Eczacılık Teknolojisi Bölümü, Kayseri)

Üye : Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK (Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Fen
Edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Niğde)

Üye : Prof. Dr. Gazi GÖRÜR (Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Fen Edebiyat
Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Niğde)

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/....../2021 tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/....../2021 tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Prof. Dr. Mustafa KARATEPE
MÜDÜR

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Yunus BOZKURT

ÖZET

BEAUVERIA BASSIANA’NIN ÇEŞİTLİ FUNGUSLARA KARŞI ANTAGONİST ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

BOZKURT, Yunus

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman

: Prof. Dr. Ayten Öztürk

Haziran 2024, 108 sayfa

Bu çalışmada, entomopatojenik fungus türü olan *Beauveria bassiana* 01YA suşunun çeşitli fitopatojenik funguslara karşı antagonistik etkileri araştırılmıştır. İkili kültür testleri, *B. bassiana*'nın *Fusarium oxysporum*, *F. equiseti*, *F. redolens*, *F. solani*, *Sclerotinia minor*, *S. sclerotiorum*, *Verticillium dahliae* ve *Phytophthora cryptogea* gibi test edilen fitopatojenik fungusların misel gelişimini engellediği, bunlara karşı yüksek inhibitör etkisi gösterdiği ve hücre duvarını parçalayan kitinaz ve proteaz enzimlerini üreterek büyümelerini engellediğini gözlemlenmiştir. Ayrıca, *B. bassiana* 01YA suşu yüksek proteinaz ve amilaz aktivitelerini gösterirken, selüloz aktivitesi diğer türler ile istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. *B. bassiana* 01YA'nın, *T. pleuroticola* 51YA ve *Clonostachys rosea* 51YAG izolatlarına belirgin antagonist sınırlar oluştururken, diğer *Trichoderma* türlerinin ise daha düşük seviyelerde antagonist sınırlar oluşturduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, *B. bassiana* ve *Trichoderma* türlerinin kombinasyonu, tarımda biyolojik mücadeleyi geliştirip sürdürülebilir uygulamaları teşvik edebilir. Bu kombinasyonun anlaşılması, biyolojik kontrol stratejilerinin etkinliğini artırabilir ve kimyasal yöntemlere olan bağımlılığı azaltabilir.

Anahtar sözcükler: *B. bassiana*, *Trichoderma* spp., mikrobiyal biyolojik kontrol stratejileri

SUMMARY

DETERMINATION OF *BEAUVERIA BASSIANA*'S ANTAGONIST PROPERTIES AGAINST VARIOUS FUNGI

BOZKURT, Yunus

Nigde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biotechnology

Supervisor : Prof. Dr. Ayten Öztürk

June 2024, 108 pages

In this study, the antagonistic effects of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* 01YA strain against various phytopathogenic fungi were investigated. Dual culture tests showed that *B. bassiana* inhibited mycelial growth of the tested phytopathogenic fungi such as *Fusarium oxysporum*, *F. equiseti*, *F. redolens*, *F. solani*, *Sclerotinia minor*, *S. sclerotiorum*, *Verticillium dahliae* and *Phytophthora cryptogea*, showed high inhibitory effect against them and inhibited their growth by producing cell wall degrading chitinase and protease enzymes. In addition, *B. bassiana* 01YA strain showed high proteinase and amylase activities, while cellulase activity. It was found that *B. bassiana* 01YA formed significant antagonist borders to *T. pleurotica* 51YA and *Clonostachys rosea* 51YAG isolates, while other *Trichoderma* species formed antagonist borders at lower levels. In conclusion, the combined use of *B. bassiana* and *Trichoderma* species can improve biological control and promote sustainable practices by reducing chemical use in agriculture.

Keywords: *Beauveria bassiana*, *Trichoderma* spp., microbial biological control strategies

ÖN SÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam esnasında, çalışmalarına ve araştırmalarına rehberlik eden, bilgisini, birikimini ve her türlü konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen, ufkumu açan ve bakış açımı genişleten çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ayten ÖZTÜRK'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca çalışmam sırasında bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan ve yardımlarda bulunan değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Fulya SAYGILI YİĞİT'e, Sayın Prof. Dr. Osman SEYYAR'a, Sayın Prof. Dr. Tuncay TÜRKEŞ'e, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Cihan DÜŞGÜN'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif YÜRÜMEZ CANPOLAT'a teşekkür ederim. Çalışmalarımı gerçekleştirdiğim zamanlarda bana birçok konuda yardımcı olan Arş. Gör. Bilge Şevval YILDIRIM'a, Arş. Gör. İbrahim UZ'a, Öğr. Gör. Rümeysa Hilal ÇELİK'e ve değerli hocam Zeynep DÜZELTEN BALLI ve Özge ÇETİN YELKUVAN'a teşekkürlerimi borç bilirim. DOAVİTA A.Ş.'den Ziraat Mühendisi Sayın Özgür KILIÇ'a da mikroorganizmanın hizmet alımındaki desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tezimi, tüm hayatım boyunca her daim yanımda bulunan ve bana her konuda sonsuz güvenen ağabeyim Müslüm BOZKURT'a ithaf ediyorum.

Bu çalışma, LÜTEP FMT 2022/15- numaralı “*Beauveria bassiana*’nın Çeşitli Funguslara Karşı Antagonist Özelliklerinin Belirlenmesi” isimli BAP projesinden üretilmiş olup, projeye destek sağlayan Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
BÖLÜM I	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM II	2
GENEL BİLGİLER	2
2.1 Fitopatojenik Funguslar	2
2.1.1 Fusarium	3
2.1.1.1 <i>Fusarium</i> spp.	3
2.1.1.2 <i>Fusarium</i> morfolojisi	3
2.1.1.3 <i>Fusarium</i> taksonomisi ve forma özel ürünleri	4
2.1.1.4 <i>Fusarium oxysporum</i> morfolojisi ve tanımlaması	4
2.1.1.5 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> (Forl)	5
2.1.1.6 <i>Fusarium equiseti</i>	6
2.1.1.7 <i>Fusarium redolens</i>	6
2.1.1.8 <i>Fusarium solani</i>	7
2.1.2 <i>Phytophthora cryptogea</i>	7
2.1.3 <i>Sclerotinia</i>	7
2.1.3.1 <i>Sclerotinia</i> spp.	7
2.1.3.1 <i>Sclerotinia</i> <i>minör</i>	8
2.1.3.2 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	8
2.1.4 <i>Verticillium dahliae</i>	9
2.2 Mikrobiyal Biyolojik Kontrol Ajanları	9
2.2.1 <i>Trichoderma</i> spp.	11
2.2.1.1 <i>Trichoderma</i> spp. etki mekanizmaları	12
2.2.1.2 Antibiyoz ve sekonder metabolitler	13

2.2.1.3 Mikoparazitizm	13
2.2.1.4 İndüklenmiş direnç.....	14
2.2.1.5 Besin rekabeti.....	14
2.2.1.6 Alan için rekabet	15
2.2.1.7 Bitki büyümenin teşvik Edilmesi	16
2.2.2 Entomopatojenler.....	16
2.2.3 <i>Beauveria bassiana</i>	18
2.2.3.1 <i>Beauveria bassiana</i> 'nın taksonomik ve morfolojik olarak tanımlanması	19
2.2.3.2 <i>Beauveria bassiana</i> biyokontrol ajanı olarak kullanımı.....	21
2.2.3.3 Entomopatojen olarak <i>Beauveria bassiana</i>	22
2.2.3.4 <i>Beauveria bassiana</i> toksinleri.....	25
2.2.3.5 <i>Beauveria bassiana</i> 'nın bitki kolonizasyonu.....	25
2.2.4 <i>Clonostachys rosea</i>	27
2.3 Türlerin Moleküler Düzeyde Tanımlanması.....	27
2.4 Tezin Amacı.....	28
BÖLÜM III.....	29
MATERYAL VE METOT.....	29
3.1 Materyal	29
3.1.1 Kullanılan besiyeri ve diğer çözeltilerin içeriği	29
3.2 Metot.....	32
3.2.1 <i>Trichoderma</i> spp. izolasyonu ve saflaştırılması	32
3.2.2 Fitopatojenik fungusların izolasyonu ve saflaştırılması	33
3.2.3 <i>Beauveria bassiana</i> izolasyonu ve saflaştırılması	33
3.2.4 Morfolojik analizler	34
3.2.5 Moleküler tanımlama.....	34
3.2.6 Filogenetik analizler	36
3.2.7 Enzim analizleri.....	36
3.2.8 <i>Beauveria bassiana</i> 'nın mikrobiyal biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılan funguslara ve farklı fitopatojenik funguslara karşı antagonistik etkinliği gözlemlemesi ve hesaplanması	39
BÖLÜM IV.....	41
BULGULAR VE TARTIŞMA	41
4.1 Fungusların Morfolojik Tanımlanması.....	41

4.1.1 Fitopatojenik fungusların morfolojik tanımlaması	41
4.1.2 Mikrobiyal biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılan fungus izolatlarının morfolojik tanımlaması.....	44
4.2 Filogenetik Analizleri	58
4.3 Antagonizma Potansiyeli Olan Fungus Türlerinin Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	59
4.4 <i>Beauveria bassiana</i> 'nın Antagonist Aktiviteleri.....	73
4.4.1 Mikrobiyal biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılan funguslara karşı antagonist aktivitesinin belirlenmesi	74
4.4.2 Fitopatojenik funguslar üzerindeki antagonistik aktivitesinin belirlenmesi	76
BÖLÜM V	78
SONUÇ.....	78
KAYNAKLAR	79
EKLER	107
ÖZ GEÇMİŞ	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. CLA tarafından yetiştirilen <i>Fusarium oxysporum</i> makrokonidia (A-B), mikrokonidia (C-D), klamidospor (E) ve monofialidlerin uçlarında gelişimin çeşitli aşamalarındaki mikrokonidiler (F). Ölçek çubuğu A-D = 25 µm ve E-F = 50 µm. (Leslie ve Summerell, 2008)	5
Şekil 2.2. <i>B. bassiana</i> 'nın böcekler üzerindeki fiziksel görünümü	20
Şekil 2.3. <i>B. bassiana</i> 'nın morfolojisi	21
Şekil 2.4. Illustrator programı kullanılarak <i>B. bassiana</i> 'nın sporları yoluyla eklem bacaklı konakçıları nasıl enfekte ettiğinin, çoğaldığının ve dağıldığının gösterimi yapılmıştır.....	23
Şekil 3.1. Ribozomal DNA genomik dizilerini içeren ITS dizileri ITS1, ITS2	36
Şekil 3.2. Enzimatik indeks tayini için koloni çapı ve berrak zon çapının ölçümü	39
Şekil 3.3. İkili kültür yöntemi ile misel inhibisyon oranının belirlenmesi	40
Şekil 4.1. <i>Fusarium equisite</i> , PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), monofialidlerin uçlarında gelişimin çeşitli aşamalarındaki mikrokonidiler (G), klamidosporlar (H), makrokonidia ve mikrokonidia (I) gösterilmiştir.....	42
Şekil 4.2. <i>Fusarium redolens</i> , PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), monofialidlerin uçlarında gelişimin çeşitli aşamalarındaki mikrokonidiler (G), klamidosporlar (H), makrokonidia ve mikrokonidia (I), gösterilmiştir.....	43
Şekil 4.3. <i>Fusarium soloni</i> , PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), mikrokonidiaların üretildiği ve biriktiği fialidler (G), monofialidlerin uçlarında gelişimin çeşitli aşamalarındaki mikrokonidiler (H), makrokonidialar (I) gösterilmiştir.....	44
Şekil 4.4. <i>B. bassiana</i> , PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), miselyum ve hiflerin detayları (G),	

- konidioforların ve fialidlerin detayları (H) klamidospor (I), konidioforlar üzerinde kümelenmiş konidialar (J) gösterilmiştir.....46
- Şekil 4.5. *Clonostachys rosea*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloniler (D, E, F), miselyumun detayları (G), hiflerin detayları (H), klamidosporlar (I), konidia (J) gösterilmiştir.....47
- Şekil 4.6. *Trichoderma asperellum*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), klamidosporlar (G), konidioforların ve fialidlerin detayları (H), fialidlerin üzerinde kümelenmiş konidialar (I), konidia (J) gösterilmiştir.....48
- Şekil 4.7. *Trichoderma citrinoviride*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), miselyum ve hiflerin detayları (G), klamidospor (H), konidioforların ve fialidlerin detayları (I), konidioforlar üzerinde kümelenmiş konidialar (J) gösterilmiştir.....49
- Şekil 4.8. *Trichoderma harzianum*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), miselyum ve hiflerin detayları (G), klamidospor (H), konidioforların ve fialidlerin detayları (I), konidialar (J) gösterilmiştir 51
- Şekil 4.9. *Trichoderma koningopsis*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), miselyum ve hiflerin detayları (G), klamidospor (H), konidiofor (I), konidialar (J) gösterilmiştir 52
- Şekil 4.10. *Trichoderma longibrachiatum*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), miselyum ve hiflerin detayları (G), klamidospor (H), konidioforların ve fialidlerin detayları (I), konidialar (J) gösterilmiştir 53
- Şekil 4.11. *Trichoderma pleuroticola*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), miselyum ve hiflerin detayları (G),

- konidioforların ve fialidlerin detayları (H), fialidlerin üzerinde kümelenmiş konidialar (I), konidialar (J) gösterilmiştir 55
- Şekil 4.12. *Trichoderma saturnisporum*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), miselyum ve hiflerin detayları (G), klamidospor (H), konidioforların ve fialidlerin detayları (I), konidioforlar üzerinde kümelenmiş konidialar (J) gösterilmiştir.....56
- Şekil 4.13. *Trichoderma virens*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), miselyum ve hiflerin detayları (G), klamidospor (H), konidioforların ve fialidlerin detayları (I), konidioforlar üzerinde kümelenmiş konidialar (J) gösterilmiştir.....57
- Şekil 4.14. *B. bassiana*, *C. rosea*, *Trichoderma* izolatları ve *Fusarium* izolatlarının internal transcribed spacer (ITS) dizilerine dayanarak bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Ağaç, *B. bassiana*, *C. rosea*, *Trichoderma* izolatları ve *Fusarium* izolatlarının ITS dizilerinden MEGA10 kullanılarak neighbor-joining yöntemi ile oluşturulmuştur 59
- Şekil 4.15. Test edilen fungusların α -amilaz enzim üretimi; *B. bassiana* 01YA (A), *C. rosea* 51YAG (B), *T. asperellum* 51YAG (C), *T. citrinoviride* 51YA (D), *T. harzianum* 51YA (E), *T. koningiopsis* 01YA (F), *T. longibrachiatum* 51YAG (G), *T. pleuroticola* 51 YA (H), *T. saturnisporum* 01YA (I), *T. virens* 51YA (J) 62
- Şekil 4.16. Test edilen izolatlar tarafından hücre dışı α -amilaz enzim üretiminin enzimatik indeksi. "a", "b", "c" vb. istatistiksel gruplamaları temsil etmektedir (Tukey HSD testi ile tek yönlü ANOVA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 62
- Şekil 4.17. Test edilen fungusların selülaz enzim üretimi; *B. bassiana* 01YA (A), *C. rosea* 51YAG (B), *T. asperellum* 51YAG (C), *T. citrinoviride* 51YA (D), *T. harzianum* 51YA (E), *T. koningiopsis* 01YA (F), *T. longibrachiatum* 51YAG (G), *T. pleuroticola* 51 YA (H), *T. saturnisporum* 01YA (I), *T. virens* 51YA (J).....64
- Şekil 4.18. Gram iyodun CMC agar plaklarındaki selülitik zon üzerine etkisi; *B. bassiana* 01YA (A), *C. rosea* 51YAG (B), *T. asperellum* 51YAG (C), *T. citrinoviride* 51YA (D), *T. harzianum* 51YA (E), *T. koningiopsis* 01YA

- (F), *T. longibrachiatum* 51YAG (G), *T. pleurotica* 51 YA (H), *T. saturnisporum* 01YA (I), *T. virens* 51YA (J) 65
- Şekil 4.19. Test edilen izolatlar tarafından hücre dışı selüloz enzim üretiminin enzimatik indeksi. "a", "b", "c" vb. istatistiksel gruplamaları temsil etmektedir (Tukey HSD testi ile tek yönlü ANOVA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 66
- Şekil 4.20. Test edilen fungusların protaz enzim üretimi; *B. bassiana* 01YA (A), *C. rosea* 51YAG (B), *T. asperellum* 51YAG (C), *T. citrinoviride* 51YA (D), *T. harzianum* 51YA (E), *T. koningiopsis* 01YA (F), *T. longibrachiatum* 51YAG (G), *T. pleurotica* 51 YA (H), *T. saturnisporum* 01YA (I), *T. virens* 51YA (J).....69
- Şekil 4.21. Test edilen izolatlar tarafından hücre dışı proteaz enzim üretiminin enzimatik indeksi. "a", "b", "c" vb. istatistiksel gruplamaları temsil etmektedir (Tukey HSD testi ile tek yönlü ANOVA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 69
- Şekil 4.22. Test edilen fungusların kitinaz enzim üretimi; *B. bassiana* 01YA (A), *C. rosea* 51YAG (B), *T. asperellum* 51YAG (C), *T. citrinoviride* 51YA (D), *T. harzianum* 51YA (E), *T. koningiopsis* 01YA (F), *T. longibrachiatum* 51YAG (G), *T. pleurotica* 51 YA (H), *T. saturnisporum* 01YA (I), *T. virens* 51YA (J).....72
- Şekil 4.23. Test edilen izolatlar tarafından hücre dışı kitinaz enzim üretiminin enzimatik indeksi. "a", "b", "c" vb. istatistiksel gruplamaları temsil etmektedir (Tukey HSD testi ile tek yönlü ANOVA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 72
- Şekil 4.24. Test edilen fungus türlerinin enzimatik indeksinin türler arası karşılaştırmaları.....73
- Şekil 4.25. *B. bassiana* 01YA'nın mikrobiyal biyolojik kontrol ajanlarına karşı in vitro mikoparazitik ve antagonistik aktivitesini gösteren ikili kültür deneyi; *T. asperellum* 51YAG (A), *T. citrinoviride* 51YA (B), *T. harzianum* 51YA (C), *T. koningiopsis* 01YA (D), *T. longibrachiatum* 51YAG (E), *T. pleurotica* 51YA (F), *T. saturnisporum* 01YA (G), *T. virens* 51YA (H), *C. rosea* 51YAG (I).....75
- Şekil 4.26. *B. bassiana* 01YA'nın mikrobiyal biyolojik kontrol ajanları üzerindeki antagonisti aktivitesi; *T. asperellum* 51YAG, *T. citrinoviride* 51YA,

T.harzianum 51YA, *T.koningiopsis* 01YA, *T. longibrachiatum* 51YAG, *T. pleuroticola* 51YA, *T. saturnisporum* 01YA, *T. virens* 51YA, *C. rosea* 51YAG 75

Şekil 4.27. *B. bassiana* 01YA'nın farklı fitopatojenik funguslara karşı in vitro mikoparazitik ve antagonistik aktivitesini gösteren ikili kültür deneyi; *F.O.R.L* (A), *F. equiseti* 51YAG (B), *F. redolens* 51YAG (C), *F. soloni* 51YA (D), *P. cryptogea* (E), *S. minör* (F), *S. sclerotiorum* (G), *V. dahliae* (H) 77

Şekil 4.28. *B. bassiana* 01YA'nın farklı fitopatojenik funguslara karşı antagonistik aktivitesi; *F.O.R.L*, *F. equiseti* 51YAG, *F. redolens* 51YAG, *F. soloni* 51YA, *P. cryptogea*, *S. minör*, *S. sclerotiorum*, *V. dahliae* 77

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
M	Molar
%	Yüzde
g/L	Gram/litre
g	Gram
L	Litre
°C	Santigrat derece
pH	Asitlik ve alkalilik faktörü
µL	Mikrolitre
mM	Milimolar
mL	Mililitre
mg	Miligram
Kısaltmalar	Açıklama
<i>F.o.s.c</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> tür kompleksi
<i>F.o.r.l</i>	<i>Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici</i>
<i>F.s.s.c</i>	<i>Fusarium solani</i> tür kompleksi
CLA	Carnation Leaf-Piece Agar
EPF	Entomopatojen fungus
CMC	Karboksimetilselüloz
PI	Doğrusal Büyümenin İnhibisyon Yüzdesi
EI	Enzimatik İndeks

BÖLÜM I

GİRİŞ

Tarım alanında, böcek zararlıları ve fitopatogenik fungusların tarımsal üretim için önemli bir sorun teşkil etmekte ve bu durum genellikle önemli ürün kayıplarına yol açmaktadır. Bu zararlıların mücadelede sentetik fungusitler ve insektisit yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, bu tür kimyasalların aşırı kullanımı, toprağın bozulması, doğal flora ve faunanın bozulması, bitki zararlılarının ve patojenlerinin direnç gelişmesi ve çevre kirliliği de dahil olmak üzere bir dizi önemli dezavantaj oluşturmaktadır. Dolayısıyla hem zararlı böcekler hem de fitopatogenik fungusların yönetimi için çevre dostu ve sürdürülebilir alternatiflerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu bağlamda, biyokontrol ajanlarının, özellikle *B. bassiana*'nın *Trichoderma* türleri ile kombinasyonun kullanımı gelecek vadede ve çevre dostu bir çözümü oluşturmaktadır. *B. bassiana*'nın ekolojik rolleri, sadece böcek patojenleri olarak değil, aynı zamanda bitkilerde endofitik olarak kolonize olması ve rizosferde de etkili bir şekilde kolonize olarak işlev görmektedir. *B. bassiana* tarafından endofitik kolonizasyon, bitki savunma mekanizmalarını geliştirebilir, bitki büyümesini teşvik ederek ve bitkinin patojenlere karşı dayanıklılığını artırabilir, patojenlere karşı bitki direncini artırdığı gösterilmiştir.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1 Fitopatojenik Funguslar

Funguslar, bitki patojenleri arasında ekolojik ve ekonomik açıdan tehdit oluşturan en çeşitli grubu temsil etmektedir. Bitki hastalıkları nedeniyle her yıl dünyadaki ticari öneme sahip tarım ürünlerin %10 ila %15'inin kaybedildiği ve doğrudan mali kayıpların yüz milyarlarca dolara ulaştığı tahmin edilmektedir (Chatterjee vd., 2016). Bu hastalıkların %70-80'i patojenik funguslardan kaynaklanmaktadır. Bitki patojenik funguslar mahsul üretimini ve büyümesini olumsuz yönde etkilemektedir (Li vd., 2017). Son yıllarda mahsul verimini ve kalitesini olumsuz etkiledikleri için, mahsullerdeki fungal enfeksiyonlar daha ciddi hale gelmiş ve sürdürülebilir tarım uygulamalarının geliştirilmesinin önünde önemli bir engel oluşturmıştır (Marín Menguiño vd., 2019). Fungal enfeksiyonlar çok geniş bir yelpazede hastalık semptomlarına neden olmaktadır. Bazı hastalıklar, sadece tek bir enfeksiyonun neden olmasından ziyade, birçok enfeksiyonun birleşik etkilerinden kaynaklanmaktadır (Chatterjee vd., 2016). Fungal kaynaklı bitki hastalıkları genel olarak iki ana grupta sınıflandırılır: besin elde etmek için dokuyu öldüren nekrotrofik enfeksiyonlar ve bitkilerle yakın ilişki içinde canlı dokularda kalabilen ve bunları kullanabilen biyotrofik patojenlerdir (Peng vd., 2021). Bitkilerin ve patojenik fungusların uzun evrimsel geçmişi boyunca, son derece özelleşmiş ve karmaşık ilişkiler oluşmuş, bu da karşılıklı seçim ve birlikte evrim modeliyle sonuçlanmıştır. Bu süre zarfında, zararlı funguslar yeni formlarda ve varyantlarda ortaya çıkmaya devam ettikçe, bitkilerle olan ilişkileri de değişmiştir (Quintanilha Peixoto vd., 2019). Bitki patojen metabolizması, fitopatojenik toksinler olarak bilinen ve bitkiler için toksik olan enzimatik olmayan maddeler üretmektedir (Thynne vd., 2017). Bu toksinler, çok düşük konsantrasyonlarda bitkilerin normal fizyolojik işlevlerini tahrip edebilmektedir. Fitopatojenik funguslar tarafından üretilen toksinler, bitki hastalıklarının ortaya çıkmasında önemli bir etkiye sahip olabilir ve sonuç olarak konakçı bitkiler üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabilmektedir (Soyer vd., 2015). Fitopatojenik toksinlerin çoğu bitkilerde, solgunluk, büyüme inhibisyonu, kloroz, nekroz ve yaprak lekelenmesi gibi belirli spesifik semptomlara neden olabilmektedir (Yin vd., 2016). Fitopatojenik toksinlerin etki mekanizması oldukça komplekstir. Esas olarak konakçı bitkilerin hücre

zarı, mitokondri ve kloroplastları üzerinde etkilidir, böylece bitkiyi tahrip eder veya metabolizmasına etkileyebilmektedir (Shang vd., 2016). Buna ek olarak, konakçı bitkinin protein ve nükleik asit sentezlemesini engelleyerek fizyolojik bozukluklara, hücre ölümüne ve nihayetinde bitkinin ölümüne neden olmaktadır (Zeilinger vd., 2016). Bu bitki patojeni funguslar arasında *Fusarium* türleri bilinen en önemli toprak kaynaklı bitki patojenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Bockus vd., 2010). *Fusarium* türleri, enfekteli bitkilerin kalıntılarında klamidosporeler halinde yaklaşık 30 yıl canlı kalabilme veya alternatif konukçu köklerinde yaşayabilir ve domates, bezelye, patates, fasulye, buğday, mısır ve pirinç dahil olmak üzere çeşitli ürünlere ciddi zarar verebilir ve %30-70'e varan verim kayıplarına neden olabilirler (Saremi vd., 2010).

2.1.1 *Fusarium*

2.1.1.1 *Fusarium* spp.

Fusarium, Ascomycota şubesine ait hem patojenik hem de patojenik olmayan türleride içeren kompleks ve uyarlanabilen bir fungus cinsidir (Abdenaceur vd., 2022; Gordon ve Martyn, 1997; Mandeel ve Baker, 1991). Bu nedenle, patojenlerin doğru tanımlanmasını sağlamak için türlerin açık bir taksonomisine ihtiyaç vardır. *Fusarium* içinde mevcut olan türlerin çoğunun morfolojik olarak ayırt edilememektedir. Ancak genetik benzerlik, farklı seviyelerde toksin üretimi ve farklı fenotipik karakterlere sahip olmalarından dolayı türler tanımlanmaktadır (O'Donnell vd., 2018; Summerell, 2019). Son zamanlarda, cins için iki taksonomik yapı önerilmiştir. Birincisi, moleküler verilere ek olarak aseksüel sporların mikromorfolojisini ve morfolojisini vurgular (Crous vd., 2021)

2.1.1.2 *Fusarium* morfolojisi

Fusarium cins ve türleri ilk olarak 1809 yılında tanımlanmıştır. Karakteristik özelliği hafif kavisli muz veya kano şeklindeki konidia olmak üzere karakterize edilmiştir. Bununla birlikte, türleri tanımlamak için kullanılabilecek nispeten az sayıda morfolojik karakter bulunmaktadır. Ayrıca, morfolojik özelliklerin ifadesi değişkendir ve çevresel koşullara bağlı olarak değişebilmektedir (Leslie ve Summerell, 2008).

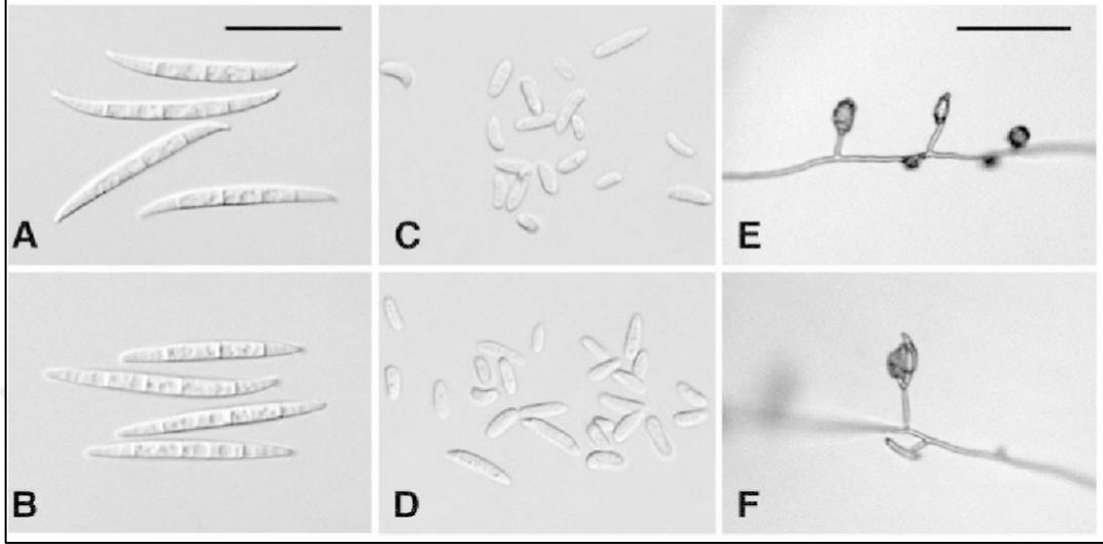
2.1.1.3 *Fusarium* taksonomisi ve forma özel ürünleri

Özel formların sınıflandırılması en yaygın olarak belirli bir konakçıya veya konak grubuna yönelik patojeniteye dayanır. Genellikle belirli konakçı çeşitlerine veya varyantlarına yönelik patojeniteye dayalı olarak ırklara ayrılırlar (Leslie ve Summerell, 2008). Bu sınıflandırma tarzıyla ilgili bir sorun, belirli bir konakçı için patojenitenin atadan kalma bir karakter olmamasıdır. Bu nedenle, bir *Fusarium. sp.*'deki suşlar, belirli bir konakçıdan bağımsız olarak patojende ortaya çıkarsa, konukçu ve patojen birbirleriyle yakından ilişkili olmayabilir. Bu, sınıflandırmaların monofiletik olarak ele alınması durumunda sorunların ortaya çıkabileceği monofiletik olmayan bir taksonomik sistem oluşturur (Leslie ve Summerell, 2008). Güncel bir çalışmada, önceki filogeni altında sinapomorfi olmayan bir cins olarak var olan *Fusarium* taksonomisini yeniden tanımlamaktadır ve 29 türü kapsayan FOOSC içindeki farklı türlere birçok *F. oxysporum f. sp.*'yi tanıtmıştır (Crous vd., 2021).

2.1.1.4 *Fusarium oxysporum* morfolojisi ve tanımlaması

Fusarium'un en yaygın izole edilen türü olan *Fusarium oxysporum*, tipik olarak toprak kaynaklıdır ve ekonomik açıdan en önemli türdür. *Fusarium oxysporum*, bilinen cinsel yapıları olmayan, aseksüel olarak üreyen bir anamorftur (Gordon ve Martyn, 1997). *Fusarium oxysporum*'un tanımlanması için kritik özellikler, mikrokonia ve makrokonia morfolojisi (Şekil 2.1) ve klamidospore üretilmesidir. Carnation leaf-piece agar (CLA) üzerinde yetiştirildiğinde, *F. oxysporum*'un makrokonia'ları kısa ve orta uzunlukta genellikle 3-septalıdır. İnce ve nispeten ince duvarlı ve genellikle çengelli apikal hücrelerle düz veya hafif kavislidirler (Leslie ve Summerell, 2008). Makrokonia, uzun, orak şeklinde, ince duvarlı, birkaç septalı sporlar olarak üretilir. Klamidosporeler düz veya pürüzlü duvarlıdır ve tek tek veya çiftler halinde oluşur ancak kümeler veya kısa zincirler halinde de büyüyebilirler. Mikrokonyumlar bol miktarda bulunur ve daha küçük tek hücreli, oval şekilli sporlardır (Leslie ve Summerell, 2008). Kısa monofialitler üzerinde mikro-konia üretimi, ayırt edici bir özelliktir. Patates dekstroza agar (PDA) üzerinde yetiştirildiğinde, morfoloji çok daha değişken olmaktadır (Crous vd., 2021; Leslie ve Summerell, 2008). Miselyum, seyrek veya bol olabilir, floküz olabilir veya olmayabilir ve pembe, turuncu, kırmızı, mavi ve mor pigmentasyonlu kadar değişen renklerde olabilirken, bazı izolatlar hiç pigment üretmeyebilir. Ayrıca, bazıları sarıdan

turuncuya değişen bir renkle pionnotal forma mutasyona uğrayabilmektedir. Ek olarak, koyu renkli mavi veya kahverengi sklerotlar üretilebilmektedir (Leslie ve Summerell, 2008).



şekil 2.1. CLA tarafından yetiştirilen *Fusarium oxysporum* makrokonidia (A-B), mikrokonidia (C-D), klamidospor (E) ve monofialidlerin uçlarındaki gelişimin çeşitli aşamalarındaki mikrokonidiler (F). Ölçek çubuğu A-D = 25 µm ve E-F = 50 µm. (Leslie ve Summerell, 2008)

Fusarium oxysporum'un bitkilerde solgunluk ve tomurcuk, taç ve kök çürüklerine neden olduğu rapor edilmiştir; semptomlar arasında kloroz, bodurluk ve bitki doku ölümü yer almaktadır. Ayrıca *F. oxysporum* bir endofit olarak tanımlanmıştır (Punja vd., 2019).

2.1.1.5 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl)

F. oxysporum f. sp. *radicis-lycopersici*, taç ve kök çürüklüğüne (FCRR) neden olan ajandır ve morfolojik olarak *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* veya başka bir *F. oxysporum* f. sp.'sinden tanımlanmasında zorluklarla karşılaşılmaktadır. Tanımlama, bu nedenle, konak aralığı ve optimum sıcaklık gibi semptomlara ve biyolojik özelliklere dayanmaktadır. Ortaya çıkan ikincil bölgelerdeki doğal açıklıklar (yaralardan veya doğrudan epidermis) yoluyla bitki köklerini istila eder, burada kortikal dokuları kolonize eder ve kahverengi lezyonlar oluşurmaktadır. Oradan vasküler dokuya uzanır, gövde boyunca 10 cm'ye kadar yayılır, ancak genellikle daha fazla ve dallara yayılmamaktadır (Brayford, 1996). Forl, seralarda %90'a varan mahsul kaybı raporlarıyla en zararlı toprak

kaynaklı domates hastalıklarından birini oluşturmaktadır (Hibar vd., 2007). Bulaşma, kirlenmiş tohumların, toprağın ve bitki materyalinin hareketi ile büyük mesafelerde gerçekleşir. Lokal bulaşma, konidiayı yayan su akışıyla ve enfekte olmamış bir bitkinin köklerinin enfekte olmuş bir bitkinin kökleriyle doğrudan teması yoluyla gerçekleşmektedir. Seralarda da mikrokonidyanın hava yoluyla yayılımı tespit edilmiştir (Brayford, 1996).

2.1.1.6 *Fusarium equiseti*

Fusarium equiseti, geniş bir konukçu yelpazesine sahip toprak kaynaklı patojenlerdendir. *F. equiseti* kök çürüklüğü, kök boğazı çürüklüğü ve gövde lekesi gibi hastalıklara neden olmakta ve özellikle stres altındaki bitkilerde daha belirgin semptomlar göstermektedir (Leslie ve Summerell, 2008). Farklı ekosistemlerde doğal olarak oluşan bir endofit olan *F. equiseti*, çeşitli konakçıların köklerinde kolonize olabilmektedir (Leslie ve Summerell, 2008). Tahıllarda zayıf bir patojen olarak kabul edilmekte ve *Fusarium* baş yanıklığı ile enfekte olmuş çekirdeklerle ilişkili olduğu bulunmuştur. Çeşitli kültür bitkilerinin tohumlarını, köklerini, yumrularını ve meyvelerini enfekte edebilmekte ve *Fusarium* türleri arasında *F. equiseti* karpuz, üzüm, salatalık, domates, börülce, fasulye, şeker pancarı ve patates gibi çeşitli bitki konakçıları üzerinde kök çürüklüğüne ve solgunluk hastalıklarına neden olabilmektedir (Han vd., 2022; Stojšin vd., 2001). Ayrıca, *F. equiseti*'nin bazı suşları, genellikle trikotesenler ve fumonisinler gibi diğer fusariotoksinlerle birlikte tespit edilen Zearalenone gibi mikotoksinler üretebilmektedir. Hepsi de canlılar için tehlikeli toksinlerdir (Bryła vd., 2022).

2.1.1.7 *Fusarium redolens*

Fusarium redolens, çeşitli bitkilerde hastalığa neden olan toprak kaynaklı fungal bir patojendir. Özellikle seralarda ve tarımsal alanlarda yaygın olarak görülmektedir. *F. redolens* bitkilerde solgunluk, kök çürüklüğü ve gövde lekesi gibi çeşitli semptomlara neden olabilmekte ve bitkilerin kök sistemine veya iletim demetlerine girerek su ve besin taşıma sistemlerini bozmaktadır (Leslie ve Summerell, 2008). *F. redolens*'in tahıllarda ilk olarak Saskatchewan, Kanada'da makarnalık buğdayda bildirilmiştir (Esmaeili Taheri vd., 2011).

2.1.1.8 *Fusarium solani*

Fusarium solani, morfolojik özelliğe dayalı olarak diğer *Fusarium* türlerinden ayırt edilebilmekte ve bu ayırt edilme kültürdeki büyüme koşullarına, klamidosporelerin oluşumuna, uzun monofialidlerin ve makrokonidilerin boyutundaki varyasyona dayanmaktadır (Burgess, 1994; Leslie ve Summerell, 2008; Matuo ve Snyder, 1973). *F. solani* hem hayvanları hem de bitkileri etkileyen bir patojendir (O'Donnell vd., 2008). *F. solani*'nin bazı suşları, antimikrobiyal ve antifungal aktiviteye sahip immünosupresif peptitler olan siklosporinler üretmekte ve *F. oxysporum* ve *F. solani*'nin ticari öneme sahip fidelerin %80'in de solgunluk belirtileri geliştirdiği ve fidelerde ürün kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Jerushalmi vd., 2020).

2.1.2 *Phytophthora cryptogea*

Phytophthora türleri, biyolojik ve fizyolojik özellikleri ve diğer cinslerde bilinmeyen patojenite süreci sırasında dışsal etkilere verdikleri yanıt açısından en spesifik bitki patojenleri arasında yer almaktadır. *P. cryptogea* kök ve kök boğazı çürüklüğüne neden olan oomycete ailesinin bir üyesidir ve *Phytophthora* cinsindeki karmaşık "patojen-bitki" etkileşimi henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Nakova ve Milieva, 2017).

2.1.3 *Sclerotinia*

2.1.3.1 *Sclerotinia* spp.

Sclerotiniaceae familyası, Helotiales takımı ve Ascomycota şubesine ait, *Sclerotinia*'nın türleri, bitkilerin, özellikle dikotların çok sayıda nekrotrofik patojenlerindendir (Purdy, 1979). *Sclerotinia* türlerinin, genellikle "sclerotia" olarak adlandırılan hayatta kalma yapıları üretme konusunda yüksek bir kapasiteye sahip olduğu bilinmektedir. Bunlar, koyu renkli koruyucu bir tabaka ile çevrili, yüksek melanin içeriğine sahip hif kümelerinden oluşur; yuvarlak, uzun veya düzensiz bir şekle sahiptirler. Bu tür yapıların toprakta 10 yıla kadar canlı kalabildiği gözlemlenmiştir (Smolińska ve Kowalska, 2018). İlk aşamada, su ile ıslatılmış sclerotia yapraklarda gelişir, hızla aşağı doğru genişler ve yaprak sapından gövdeye doğru girmektedir. Daha sonra, sclerotia yavaş yavaş nekrotik hale gelir ve beyaz miselyum kütleleri oluşturmaktadır. Enfeksiyon ilerledikçe damar

dokusuna zarar verir ve sonunda bitkinin solmasına neden olmaktadır. Sclerotlar, gövde, meyve ve diğer dokuların içinde ve dışında üretilmek, beyaz toplara benzeyen miseller ortalama dört günlük bir gelişimin ardından dinlenme yapıları halinde bir araya toplanır, buradan itibaren miseller olgunlaşarak melanize olmuş küçük, olgun siyah sclerotilere dönüşmektedir (Bolton vd., 2006). İki türün, *S. sclerotiorum* ve *S. minor*'un yüzlerce bitki türünü enfekte ettiği kaydedilmiştir. *Sclerotinia* türleri discomycetes olup konakçı dokunun kolonizasyonu sırasında üretilen sclerotinin karpogenik çimlenmesi sırasında apothecia üretirler. *S. sclerotiorum* ve *S. minor* genellikle sclerotianın boyutuna göre ayırt edilir; *S. minor*'de 0,5-2 mm ve *S. sclerotiorum*'da 3-10+ mm çapındadır. Bu türlerin ayrılması diğer morfolojik, ontogenetik, sitolojik çalışmalar ve moleküler teknikler ile de desteklenmiştir (Kohn vd., 1988; Tariq vd., 1985; Willetts ve Wong, 1980). *Sclerotinia* hastalıklarının kimyasal kontrolü kolay olmamakla birlikte, fungusitlere dirençli türlerin ortaya çıkması ile çevresel etki ve insan sağlığı konusunda artan endişeler, araştırmacıları etkili biyokontrol ajanlarının potansiyelini keşfetmeye sevk etmiştir (Hu vd., 2016; Wang vd., 2015).

2.1.3.1 *Sclerotinia minor*

S. minor, duyarlı bitki dokularını istila eden ve kolonize olabilen, miselyumun patlamalı büyümesi ile çimlenen toprak kaynaklı bir nekrotrofik bir patojendir (Dillard ve Grogan, 1985). *S. minor*, serin ve nemli koşullarda toprağa temas eden üst kökler, taşlar ve diğer kısımlar yoluyla bitki dokularını hızla enfekte etmektedir. Beyaz misel, bitki dokularında büyür ve solgunluğa, çökmeye ve parçalanmış bitki dokusunda küçük siyah sclerotia oluşumuna neden olur. *S. minor*, bitkiden bitkiye temas yoluyla, uygulanabilir tarla koşullarında herhangi bir büyüme aşamasında duyarlı bitkileri istila edebilir (Subbarao, 1998).

2.1.3.2 *Sclerotinia sclerotiorum*

S. sclerotiorum ilk olarak Libert Libert (1837) tarafından tanımlanmıştır. *S. sclerotiorum*, konaktan konakçıya değişen semptomlara neden olan geniş bir konak aralığına sahip nekrotrofik bir patojendir. *S. sclerotiorum* 400'den fazla bitki türünü enfekte etmektedir (Boland ve Hall, 1994). Ayçiçeği, soya fasulyesi, yağlı tohumlar, nohut, yer fıstığı,

mercimek ve sebzeler gibi dikot bitkilerle soğan ve lale gibi monokotlar için tehdit oluşturmaktadır (Boland ve Hall, 1994).

2.1.4 *Verticillium dahliae*

Nees von Essenbeck, *Verticillium* cinsini 1816'da tanımlamıştır. *Verticillium*, Ascomycota şubesine ait bir cinstir ve solgunluk hastalıklarına neden olan dünya çapında önemli bitki patojenlerinden biridir (Brown ve Brotzman, 1979; Pegg ve Brady, 2002). *Verticillium sp.*, cinsin adından sorumlu olan “verticillate” adı verilen konidioforların etrafında spiral bir şekle sahip, uzun phialidlerde üretilen oval ila uzun konidialara sahip hem basit hem de dallı, septatlı ve çok çekirdekli miselyum hiflerine sahip olabilir. Toprak kaynaklı hemi-biyotrofik fitopatogenik fungus *Verticillium dahliae*, agresif patojenitesi ve toprakta birkaç yıl yaşayabilen ve ekonomik kayıplara neden olan mikrosklerotia adı verilen melanize dormant yapıların üretimi nedeniyle dünya çapında çok çeşitli ürünlerde vasküler *Verticillium* solgunluğuna neden olabilmektedir (Wang vd., 2014). Hastalık belirtilerine neden olan hücre duvarını parçalayan enzimler ve fitotoksinler üretmektedir. *V. dahliae*, 200'den fazla dikotiledon bitki türünü enfekte etmektedir. Genellikle yaprak solgunluğuna, vasküler demetlerin sararmasına ve kahverengileşmesine neden olur ve sonunda bazı bitkilerde erken ölüme yol açmaktadır. Şu anda, enfekteli bitkileri kontrol etmek için mevcut hiçbir fungusit bulunmamaktadır (Fradin ve Thomma, 2006). *V. dahliae* pamuk, tütün, domates, *Arabidopsis* ve diğerleri dâhil olmak üzere çeşitli dikotiledon türleri enfekte edebilir. Genellikle bitkilerin köklerini istila ederek kolonileştirmekte ve daha sonra bitki boyunca yayılmaktadır (Zhang vd., 2014). *V. dahliae* toprak yoluyla bitkinin köklerini enfekte etmeye başlar ve hifler vasküler demetleri kolonize etmek için bitki köklerinin yüzeyine nüfuz ederek bitki ölümüne yol açmaktadır (Prieto vd., 2009; Zhao vd., 2014).

2.2 Mikrobiyal Biyolojik Kontrol Ajanları

Bitki zararlılarının ve hastalıklarının biyolojik kontrolü için mikroorganizmaların kullanımı, sentetik pestisitlerin kullanımına alternatif olarak umut vaat etmektedir. Mikrobiyal biyolojik kontrol ajanları bakteri, fungus veya virüslerden oluşur ve bazen bakterilerin veya fungusların ürettiği metabolitleri de kapsamaktadır. Farklı türlerdeki bitki zararlılarını kontrol etmek için aktif olarak kullanılmaktadır (Montesinos ve

Bonatterra, 2009). Mikrobiyal pestisitlerin çevreye karşı genellikle düşük risk oluşturduğu ve sentetik pestisitlere kıyasla çok az toksik kalıntı ürettiği veya hiç üretmediği değerlendirilmektedir. Ayrıca konvansiyonel pestisitlere kıyasla daha düşük üretim maliyetlerinin yanı sıra yüksek seviyede seçiciliğe de sahip olabilmektedirler. Bu olumlu özelliklerinden dolayı biyolojik mücadele şu anda politikacılar, perakendeciler, tüketiciler, yetiştiriciler ve yetiştirici kuruluşları tarafından büyük ilgi ve destek görmektedir (van Lenteren vd., 2018).

Avrupa Birliği (AB), Pestisitlerin Sürdürülebilir Kullanımı Direktifi ile 2009 yılından itibaren biyolojik kontrolün kullanılmasını tavsiye etmektedir. Yapılan çeşitli araştırmalar mikrobiyal ajanların kullanımı konusunda umut verici sonuçlar ortaya koysa da biyolojik kontrol ajanı olarak sadece çok az sayıda antagonistik mikroorganizma tescil edilmiştir (Fravel, 2005). Sınırlayıcı faktörlerden en önemlisi, özellikle saha araştırmalarında düzensiz etkinlik göstermeleridir (Alabouvette vd., 2006; Lacey vd., 2015). Mikroorganizmaların büyümesi, hayatta kalması ve patojenitesi biyotik ve abiyotik çevresel koşullardan önemli ölçüde etkilenebilir ve bu da ajanların biyolojik kontrol ajanları olarak faaliyetlerine ve etkinliklerine öngörülemezlik ve belirsizlik katabilmektedir. Mikrobiyal biyolojik kontrol ajanları tarafından sağlanan korumanın temelinde yer alan mekanizmalar, etki şekillerinde ayırt edici faktörler olarak işlev görebilmektedir. Bitki hastalıklarının yönetiminde rekabet, mikoparazitizm, antibiyozis ve indüklenmiş direnç gibi çeşitli etki şekilleri söz konusu olabilmektedir (Alabouvette vd., 2006; Jaber ve Ownley, 2018).

Bir mikroorganizma diğer mikroorganizmaları inhibe eden sekonder metabolitler ürettiğinde, bu bir tür doğrudan etkileşim olan antibiyoz olarak bilinir. Etki mekanizmasının enzimler, biyoaktif uçucu organik bileşikler (VOC'ler) veya antibiyotikler gibi sekonder metabolitleri içerdiği düşünülmektedir (Ownley vd., 2010). Antibiyozis, çeşitli biyolojik kontrol ajanlarının aktivitesinden sorumlu olan ve iyi tanımlanmış bir olgudur (Alabouvette vd., 2006). Doğrudan antagonistik ilişkilerin bir başka mekanizması da mikoparazitizmdir. Antagonistin ve hedef patojenin birbirini özellikle tanımasını gerektirmektedir. Parazit, hücre duvarı bileşenlerini parçalayan litik enzimler ürettiği için hücre duvarını aşabilir ve patojenin hücrelerine nüfuz edebilmektedir. Antibiyozis ve bitki patojenlerinin mikoparazitizminde yer alan enzimler belirgin şekilde farklılaşmaktadır (Fravel, 1988). Besin ve alan için aralarında rekabet olan üçüncü

doğrudan etkileşimin gerçekleşmesi için hem bir antagonist hem de bir patojen, kaynakların kısıtlı olduğu bir süre zarfında aynı ekolojik nişi paylaşmak durumundadır. Antagonistin bitki dokularına daha hızlı nüfuz etmesinin bir sonucu olarak patojen için azalan besin mevcudiyeti ve alanı, spor çimlenmesinin ve büyümesinin engellenmesine neden olmaktadır.

Bitkinin doğal savunma mekanizması aktive edildiğinde ortaya çıkan indüklenmiş direnç (ISR), fitopatojen ile biyokontrol ajanı arasında doğrudan fiziksel temasın olmadığı dolaylı bir biyolojik mücadele yöntemidir. İndüklenmiş direnç, konukçu bitkinin fiziksel veya kimyasal bariyerlerine bağlı olan ve biyotik veya abiyotik ajanlar ile tetiklenen aktif direnç sürecidir. Lokalize (aşırı duyarlı reaksiyon, HR) veya bitki genelinde sistemik olabilmektedir (Kloepper vd., 1992). Sistemik edinilmiş direnç (SAR), genellikle bir patojen tarafından enfekte edildikten sonra bitkide tetiklenen ve patojenik hastalığa bağlı lokalize nekrotik lezyonlarla sonuçlanan veya aşırı reaksiyonun (HR) sonucu olarak ortaya çıkan bir tür uyarılmış direnç türüdür (Ryals vd., 1996). Bunun sonucunda, salisilik asit (SA) lokal olarak birikir ve bitkinin diğer kısımlarına sinyal göndererek başlangıçta enfekte olmayan bölgelerde bile patojenlere karşı dirençli hale gelmesini sağlamaktadır. Bu nedenle, SAR sıklıkla sinyal molekülü SA'yı içerir ve patogeneze (PR) ile ilgili proteinleri ve bunların yan ürünlerini kodlayan genlerin artışı ile ilişkilendirilmektedir (Durrant ve Dong, 2004). SAR ve ISR farklı yollar üzerinden faaliyet gösterirken, konukçu bitki ile etkileşimleri, aldıkları sinyallerin gücüne ve süresine bağlı olarak antagonistik, tamamlayıcı veya sinerjik olabilmektedir (Mur vd., 2006). Birden fazla etki şekline sahip çok sayıda mikrobiyal biyolojik kontrol ajanı bulunmaktadır. Zararlıların ve patojenlerin biyolojik kontrolünün bu stratejilerin bir kombinasyonunu içerdiğini gösteren önemli kanıtlar bulunmaktadır (Hubbard vd., 2014; Ownley vd., 2010).

2.2.1 *Trichoderma* spp.

Trichoderma cinsi (Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales), ekonomik ve ekolojik önemi nedeniyle kapsamlı bir şekilde araştırılmakta ve uygulanmaktadır. *Trichoderma* türleri toprakta ve bitki kök sistemlerinde yaygın olarak bulunur (Harman vd., 2004). Bu yararlı mikroorganizmaların antifungal yetenekleri 1930'larda keşfedilmiştir (Chet vd., 2006; Schubert vd., 2008). Biyokontrol etkinliklerinde önemli farklılıklar gösteren *Trichoderma* türleri başta olmak üzere daha etkili mikoparazitik fungusların

tanımlanmasına yönelik ilgi devam etmektedir. Hücre dışı litik enzimler olan β -1, 3-glukanaz ve kitinaz salgılama kapasitesi yüksek olan izolatları seçerek daha antagonistik etkinlik gösterebilecek *Trichoderma* türlerini ayırmak çok önemlidir. *Trichoderma* türlerinin, toksik ikincil metabolitlerin üretimi, özelleşmiş yapıların oluşumu ve hücre duvarını parçalayan enzimlerin salgılanması yoluyla diğer fungusların miselyumunu veya canlı propagüllerini doğrudan etkilediği gösterilmiştir. Bu durum çok sayıda çalışma ile doğrulanmıştır. Çok sayıda *Trichoderma* türü, fasulye (*Phaseoli vulgaris*), çilek (*Fragaria vesca*), bezelye (*Pisum sativum*), salatalık (*Cucumis sativus*), domates (*Solanum lycopersicum*), turp (*Raphanus sativum*), şeker pancarı (*Beta vulgaris*) ve pamuk (*Gossypium hirsutum*) dâhil olmak üzere çeşitli ürünlerdeki bitki patojenik fungusları için potansiyel biyo-kontrol ajanları olarak tanımlanmıştır (Ozbay ve Newman, 2004). *Trichoderma*, tarımda önemli ürün kayıplarına neden olan toprak ve yaprak kaynaklı birçok bitki patojenini etkilemektedir. Bu patojenlerin bazı örnekleri şunlardır: *Rhizoctonia sp.*, *Botritis sp.*, *Armillaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Sclerotinia sp.*, *Phytophthora sp.*, *Pythium sp.*, *Verticillium sp.* ve *Phoma sp.* Bu türler toprak ve yaprak kaynaklı birçok bitki patojenini etkilemektedir (Monte, 2001).

2.2.1.1 *Trichoderma* spp. etki mekanizmaları

Trichoderma biyokontrol ajanı olarak birden fazla etki mekanizmasına sahiptir. Bunlardan; biri biyokontrol ajanı tarafından salınan ve antibiyoz adı verilen bu tür bir bileşiğin, yakın çevresindeki patojenlerin büyümesini yavaşlatan veya tamamen engelleyen bir bileşik salgılayabilmektedir (Schuhmacher vd., 2007; Vinale vd., 2008). İkincisi, bitki tarafından indüklenmiş direnç adı verilen ve onu hastalıktan koruyan bir maddenin üretimini teşvik edebilmektedir (Vinale vd., 2006). Üçüncüsü, besin rekabeti, daha hızlı büyüyerek veya besin kaynağını daha etkili kullanarak patojeni geride bırakma olasılığını ifade etmektedir (Harman vd., 2004) Dördüncüsü, diğer türlerde endofitik olarak büyüebilir ve bitkilerin büyümesini teşvik edebilmektedirler. Son olarak da parazitizm, bir türün konakçı olarak bilinen başka bir türden beslenmesi veya bu türün içinde yaşamasıdır (Ozbay ve Newman, 2004).

2.2.1.2 Antibiyoz ve sekonder metabolitler

Bir organizmanın diğerinin metabolitleri tarafından inhibe edilmesi antibiyozis olarak tanımlanmaktadır. Toksinler, diğer organizmalar üzerinde engelleyici veya öldürücü etkiye sahip olabilen metabolitlerdir. *Trichoderma* türlerinin çoğu, harzianik asit, trikolin, peptaiboller, alametisinler, antibiyotikler, 6-pentil 1-a-piron, viridian, gliovirin, massoilakton, glisopreninler, heptelidik asit ve koningik asit dahil olmak üzere hem uçucu hem de uçucu olmayan toksik bileşikler üretmektedir (Benítez vd., 2004; Howell, 2003; Kumar vd., 2017). Benitez vd. Benítez vd. (2004) göre *Trichoderma*, spor çimlenmesini engelleyen (fungistasis), toprağı daha asidik hale getirerek rizosferi değiştiren veya hücre hasarına neden olarak patojenleri yok eden metabolitleri salma kapasitesine sahiptir ve bunların tümünün toprak kökenli fungusların büyümesini önlediğini bildirmiştir. Mikrobiyal gelişim ve sporülasyon sırasında oluşan bu sekonder metabolitler, mikrobiyal büyümeyi baskılamak için kullanılan önemli doğal bileşiklerdir (Vinale vd., 2008). Hem uçucu hem de uçucu olmayan antifungal bileşikler, *Trichoderma*'nın salgıladığı çeşitli sekonder metabolitler arasındadır; bu metabolitler türe ve suşa bağlı olarak değişmektedir (Vinale vd., 2009). Biyokontrol ajanı olarak *Trichoderma virens*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* ve *Phytophthora* türlerinin büyümesini kesin bir şekilde azaltan gliovirin ve gliotoksin gibi antibiyotikler ürettiği bildirilmiştir (Howell, 2003). Ayrıca, *Trichoderma harzianum*'un antifungal aktivitesi, enzimlerin (proteaz, β -1,3-glukanaz ve kitinaz) üretimini artırarak *R. solani*'nin miselyum büyümesini engellemiştir (Tariq vd., 2010). *Trichoderma* türleri, farklı kültür ortamlarında patojen büyümesini engelleyen antibiyotikler üretmektedir. *Trichoderma* ve sekonder metabolitlerinin etkisi topraktaki kökler üzerinde görülme de *in vitro* olarak gösterilmiştir (Contreras Cornejo vd., 2016).

2.2.1.3 Mikoparazitizm

Mikoparazitizm, *Trichoderma* tarafından biyokontrol ajanı olarak kullanılan önemli bir mekanizmadır. Bu süreç *Trichoderma*'nın kemotropizm büyümesinin, konağın tanınmasının, hücre dışı enzimlerin salgılanmasının, hiflerin penetrasyonunun ve konağın hücre içeriğinin lizisinin dahil olduğu gösterilen dört aşamadan oluşmaktadır (Steyaert vd., 2003). Bir antagonistin kemotropizmi, tipik olarak şekerlerin ve/veya amino asitlerden oluşan kimyasalın bir gradyan boyunca doğrudan konağa doğru gelişmesidir.

Bu süreç genellikle tanımadan önce gelir ve iki süreç birbiriyle ilişkili olsa da konağa özgü olmayabilir. Tanıma, *Trichoderma* türleri ve konakçı arasında lektin-karbonhidrat bağlanması ile gerçekleşir. Daha sonra, *Trichoderma* tarafından konak hiflerinin etrafına sarılır ve uzantıları (appressoria) yoluyla patojenin hiflerine nüfuz etmektedir (Barak, 1985; Steyaert vd., 2003). *Trichoderma* türleri hücre duvarı litik enzimleri üretme yeteneğine sahiptir. Fungal hücre duvarı proteinler (%3-20) ve polisakkaritler (%80) ile birlikte pigmentler, lipidler ve daha küçük miktarlarda inorganik tuzlardan oluşmaktadır. Konağın hücre duvarı *Trichoderma* tarafından salgılanan glukanazlar, kitinazlar ve proteinazlar tarafından parçalanır ve bunlar antibiyotiklerle kombine edilebilir (Steyaert vd., 2003).

2.2.1.4 İndüklenmiş direnç

İndüklenmiş direnç, bitkilere uygulanan, organizmalar veya kimyasallar kullanılarak bitkiyi patojenlere karşı koruyabilecek bileşiklerin üretiminin lokalize veya sistemik bariyerlerin oluşturulması için bitkinin uyarılmasıdır (Bailey ve Lumsden, 1998). Bitkilerde, *Trichoderma*'nın köklerle birlikte bitkinin savunma sistemini bakteri ve virüsler de dahil olmak üzere fitopatojenlerden gelebilecek potansiyel saldırılara karşı uyarmasıyla gerçekleştirilir (Vinale vd., 2006). *Trichoderma* türleri bitkileri kolonize ettiğinde, bu durum çeşitli bitki patojenlerinin neden olduğu hastalıklarda azalmaya ve aşılama bölgesinde sistemik direncin indüklenmesine yol açabilmektedir (Kumar vd., 2017). *Trichoderma* suşları, köklerde kolonileşmenin ve bitkilerde aşırı duyarlı tepki (HR), indüklenmiş sistemik direnç (ISR) ve sistemik kazanılmış direnç (SAR) benzeri direnci indüklemenin yanı sıra, bitkileri bakteriyel, fungal ve viral patojenler gibi kök toprak kaynaklı patojenlere karşı korumaktadır (Benítez vd., 2004).

2.2.1.5 Besin rekabeti

Organizmalar arasındaki dolaylı bağlantıyı karakterize etmenin bir yolu da besin maddeleri için rekabettir. Azot, karbon, potasyum ya da demir gibi elementlerin ortamda az miktarda bulunduğu ve bir fungusun bu kaynağa yüksek oranda ihtiyacı olduğunda, bu durum özellikle önemli olabilmektedir. *Trichoderma* türleri hızla gelişir, mevcut alanı hızla işgal eder ve serbest besin maddelerini kullanmak için substratları kolonize edebilir ve toprak kaynaklı bitki patojenlerini kontrol etmek veya bastırma aracı olarak besin

maddeleri için rekabetten yararlanmaktadır (Cripps Guazzone, 2014; Vinale vd., 2008). Diğer organizmalarla karşılaştırıldığında, *Trichoderma* türleri topraktaki besin maddelerini mobilize etme ve absorbe etme konusunda büyük bir kapasiteye sahiptir (Chet vd., 1997).

2.2.1.6 Alan için rekabet

Trichoderma'nın biyokontrol ajanı olarak kök sistemini kolonize etme ve toprak kaynaklı patojenlerin bitkiyi enfekte etmesini önleme yeteneğine dayanmaktadır. Bitki köklerinde *Trichoderma* türlerinin kolonizasyonu, beslenme, bitki türleri, habitat ve çevre gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir. *Trichoderma* türleri herhangi bir rizosfer toprağına kolayca yerleşebilir ve bitkiler üzerinde aylarca kalabildiğı belirtilmektedir (Kumar vd., 2017). Bitki hastalıklarına karşı koruma sağlamanın yanı sıra, çeşitli *Trichoderma* türleri bitki köklerine nüfuz etme ve bitki büyümesini teşvik edebilmektedir. Bazı *Trichoderma* türleri bitki köklerinde kolonize olma ve uzun süre canlı kalma yeteneğine sahiptirler. Epidermise nüfuz edebilir ve patojenlere karşı bitki savunmasını artırarak lokalize ve sistemik kazanılmış direnci tetikleyen bileşikler üretebilmektedirler (Benítez vd., 2004). Rizosfer kabiliyeti, mikroorganizmaların bitki kökleriyle simbiyotik ilişkiler kurma ve çeşitli koşullar altında rizosfer toprağına kolonileşme, gelişme ve çoğalma yeteneğidir. Çok sayıda bitki türü, rizosfer yetkinliği gösteren *Trichoderma* türleri tarafından kolonize edilmiştir (Cripps Guazzone, 2014).

Endofitik kolonizasyon, organizmaların bitki organlarında yaşama ve bitki dokularında görünür bir etkiye veya belirgin bir hasara neden olmadan bitkisel dokularda kolonileşme yeteneğini ifade etmektedir (Bailey ve Melnick, 2013). Çeşitli bitki türlerinin köklerinin *Trichoderma* türleri tarafından endofitik kolonizasyon sergilediğı bilinmektedir (Harman vd., 2004). Ayrıca, Chow vd. (Chow vd., 2018) endofitik biyokontrol ajanı (*Trichoderma asperellum*) ve patojen (*Ganoderma boninense*) arasındaki etkileşimi, kantitatif PCR ile kök, gövde ve yaprak dokularında bir arada bulunmalarını belirlemek için yağ palmyesi bitkilerinde etkileşimli ve etkileşimsiz olarak test etmişlerdir. Yağ palmyesi bitkilerinin aşılınması, 100 mL (6 log₁₀ cfu/mL-1) fungal inokulum kullanılarak toprağı damlatma yoluyla gerçekleştirilmiştir. Deneme 7 hafta boyunca yarı kontrollü sera koşullarında yapılmış ve örnekler dikkatlice sterilize edilmiştir. Sonuçlar, *T. asperellum*'un tüm dokulardaki patojen miktarını azalttığını göstermiştir (Chow vd., 2018). Sera toprağı ve

hidroponik çalışmalarda, *T. harzianum*'un iki izolatu (T-E5 ve SQR-T037) tarafından salatalık bitkilerinin (kök ve gövde dokuları) endofitik kolonizasyonu, indoleasetik asit üretimini iyileştirmiş ve bitki büyüme parametrelerini arttırmıştır (Zhang vd., 2013).

2.2.1.7 Bitki büyümenin teşvik Edilmesi

Trichoderma izolatları bitki büyüme parametrelerinin artırılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Hatta bitki büyümesini artırarak (biyofertilizasyon) ve bitki savunma mekanizmalarını uyararak bitkiler üzerinde olumlu bir etkiye sahip olabilirler (Benítez vd., 2004). *T. koningii*, *T. viride*, *T. harzianum*, *T. hamatum* ve *T. reesi* dâhil olmak üzere *Trichoderma* türleri yaygın olarak biyogübre olarak kullanılmaktadır. Ancak, *T. viride* ve *T. harzianum* en yaygın kullanılan türlerdir. Spor süspansiyonlarının veya kepeklerle yetiştirilen *Trichoderma*'nın toprağı işlemek için veya tohum muamelesi veya püskürtme olarak uygulanmasının bitki büyümesini teşvik ettiği gösterilmiştir (Kamal vd., 2018). Bazı *Trichoderma* türlerinin bitki kökleriyle doğrudan etkileşime girerek büyüme potansiyellerini artırabildiğini, abiyotik streslere karşı toleranslarını yükselttiğini ve hastalıklara karşı dirençlerini geliştirdiğini göstermiştir (Hermosa vd., 2012). Genel olarak, *Trichoderma* türlerinin büyüme hormonları, proteolitik enzimler ve endokitinaz salgılama yetenekleriyle tanınmaktadır; bunlar da bitki gelişimini destekler, enfeksiyonları azaltır ve *Trichoderma* türlerinin bitkilerle simbiyotik ilişki kurduğu bilinmektedir.

2.2.2 Entomopatojenler

Entomopatojenik funguslar, çok çeşitli böceklerin ve diğer eklembacaklıların doğal patojenleri olan polifiletik bir fungus grubunu ifade etmektedir (Hegedus ve Khachatourians, 1995). Entomopatojenik funguslar Microsporidia, Chytridiomycota, Entomophthoromycota, Basidiomycota ve Ascomycota filumlarındaki çeşitli taksonlarda yaygın olarak dağılım göstermektedir (Araújo ve Hughes, 2016). En yaygın olanları Hypocreales ve Entomophthorales takımları olmak üzere, yaklaşık 90 cins içinde tahmini 700 entomopatojenik fungus türü bulunmaktadır (Roberts ve Humber, 1981). Bu funguslar, 20 böcek takımı arasında ve tüm gelişim aşamalarında dağılım gösteren çeşitli konakçılara sahiptir (Araújo ve Hughes, 2016). Konakçının entomopatojenik funguslar tarafından enfeksiyonu, diğer böcek patojeni organizmaların çoğunun aksine, esas olarak

kütikülleri yoluyla enfekte edebilmektedir. Buna göre, başarılı bir enfeksiyon için sadece patojenin böcekle teması gerekmektedir ve bu nedenle beslenme yoluyla tüketim zorunlu değildir. Bu özellik onları diğer böcek patojeni organizmalarından ayırmaktadır. Genel olarak, fungal entomopatojenlerin sporlanıp diğer konakçılara yayılabilmesi için tipik olarak konakçıları öldürmeleri gerekmektedir. Entomoftoraller' deki bazı kladlar çok özelleşmiş konak seçimine sahipken, *Beauveria bassiana* nispeten geniş bir konak seçimine sahiptir (Vega vd., 2012). Başarılı bir enfeksiyon sürecinin temel adımları Schmutterer Schmutterer ve Huber (2005) tarafından dört adımda özetlenmiştir;

- i. Fungus sporlarının yapışması ve ardından böceğin kutikulası üzerinde germinasyonu.
- ii. Kütikül tabakalarının mekanik ve enzimatik penetrasyonu.
- iii. Konağın bağışıklık sistemi ile etkileşim, hemolenf kolonizasyonu ve çeşitli faktörlere bağlı olarak konağın tahrip edilmesi (fungal toksinlerin salınımı, organların istilası, su ve besin maddelerinin tükenmesi ve fiziksel engelleme).
- iv. Konak üzerinde fungal misellerin karakteristik büyümesi ve ardından sporülasyon ile fungusun konakçıdan saprofitik olarak yeniden ortaya çıkması.

Enfeksiyon süreci sıcaklık, bağıl nem veya güneş radyasyonunun UV kısmı gibi farklı abiyotik ve biyotik faktörlerin yanı sıra toprakta veya konak böceğin içinde veya dışında bulunan diğer mikroorganizmalardan etkilenmektedir (Schmutterer ve Huber, 2005; Vega, 2018). Enfektif fungus propagüllerinin sporları toprak, rüzgâr ve su yoluyla pasif olarak dağılmaktadır. UV'ye maruz kalma derecesine bağlı olarak, sporlar ya orada kalabilir ya da bitki yüzeylerine düşerek bozulmadan önce haftalarca yaşayabilirler (Sinha vd., 2016; Thompson vd., 2006). Bitkilerin karbonhidrat açısından zengin rizosferinde entomopatojenik mantarlar da gelişebilmektedir (Bruck, 2010). Dolayısıyla, entomopatojenik funguslar patojenik funguslara ek olarak saprofitik faza da sahiplerdir ve bitkilerde kolonize olabilir ve dokularında endofit olarak bulunabilirler (Vega, 2018). Bunlar aynı zamanda fungal izolatin patojenitesine ve virülansına da bağlıdır. Bu bağlamda, patojenite, patojenin bir konağı enfekte etme ve hastalık semptomlarına neden olma temel yeteneğini tanımlarken, virülans ise bu yeteneğin boyutunu tanımlamaktadır. Her iki parametre de fungusun genetik yapısının yanı sıra konağın fizyolojisi ve gelişim evresinden de etkilenmektedir.

Bitki ve hayvan popölasyonlarının doğal düşmanlar tarafından düzenlenmesi olan biyolojik kontrol, sentetik pestisitlerin yerine ya da onlara olan bağımlılığı azaltmak için kullanılmaktadır. Böcek zararlılarının yönetimi için fungal entomopatojenlerin kullanımına ilişkin araştırmalar yüzyılı aşkın bir geçmişe dayanmaktadır (Roberts ve Hajek, 1992). Fungal entomopatojenler çeşitli şekillerde uygulanabilir ve hem toprak üstü hem de toprak altı zararlılarını kontrol etmek için kullanılabilir. Bunlar, konidilerin in vitro olarak üretilmesi ve bir sıvı içinde süspanse edilmesi veya bir toz taşıyıcı ile karıştırılması ve standart sentetik pestisit ekipmanı kullanılarak sis veya toz olarak püskürtülmesi gibi çeşitli şekillerde uygulanabilmektedir.

Entomopatojenik funguslar klasik biyokontrol ajanları olarak kullanılabilse de çalışmaların çoğu zararlı popölasyonunu hızlı bir şekilde azaltmayı amaçlayan inundatif ajanlar olarak kullanımlarına odaklanmıştır (Butt vd., 2001; Hajek vd., 2021). Biyolojik kontrol için bir fungusun uygulanabilirliğindeki önemli faktörler, seri üretim kolaylığı, tutarlı etkinliği, üretim maliyeti ve stabilite gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Birçok entomopatojenik fungus arasında, araştırılan ve ticari olarak üretilen üç türün çoğu *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* ve *Isaria* cinslerindendir (Lacey vd., 2015; Vega vd., 2012).

2.2.3 *Beauveria bassiana*

B. bassiana geniş bir konak aralığına sahiptir ve hem ılıman hem de tropikal iklimlerde *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera* ve diğer böcek takımlarını enfekte etmektedir (Domsch vd., 1980). Entomopatojenik bir fungus olarak, böcek tarafından yenmeye veya diğer entomopatojenler (örneğin nematodlar veya virüsler) gibi doğal bir açıklıktan girme fırsatına bağlı olmak yerine, böceğe doğrudan kütiküladan girebilmektedir. Sporlar rüzgârla taşınabilmekte ya da bulunduğu ortamda hareket ederken böcek tarafından alınabilmektedir.

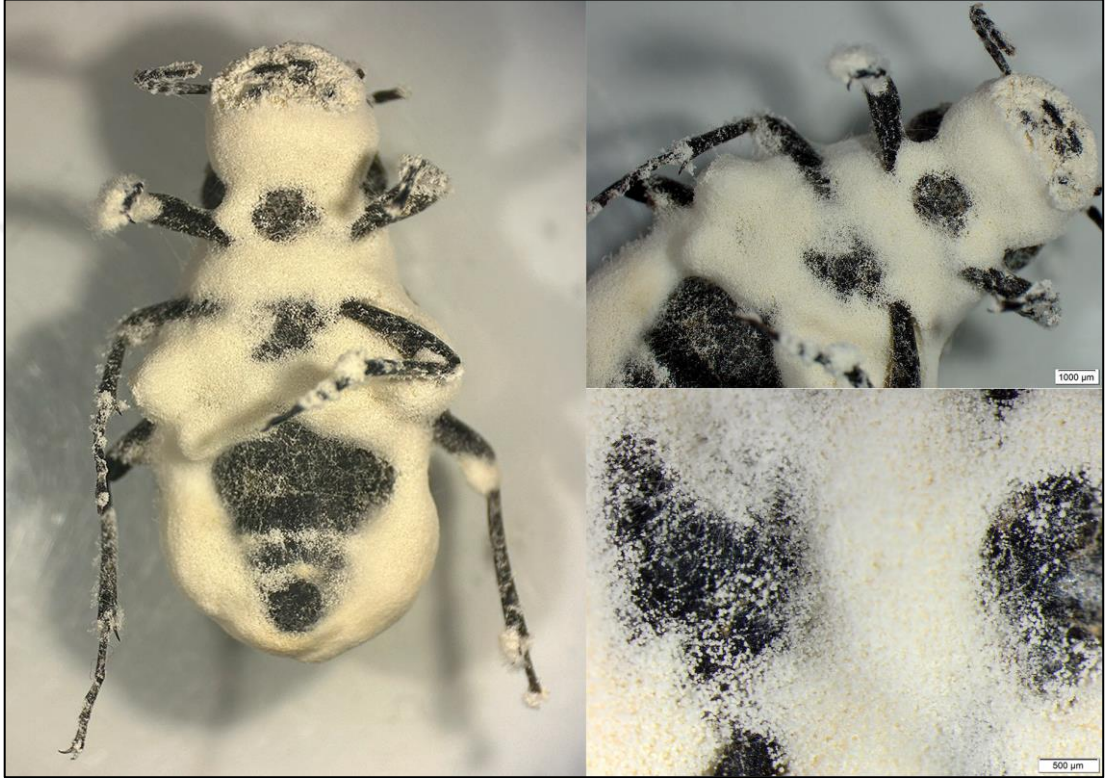
B. bassiana dimorfik bir büyüme biçimine sahiptir ve konakçısının yokluğunda aseksüel vejetatif bir yaşam döngüsünden geçmektedir. Uygun bir konakçı ile temas ettiğinde *B. bassiana* patojenik yaşam döngüsüne geçmektedir. Hif tüpü çimlendikten sonra appressoria gibi özelleşmiş fiziksel yapılarla mekanik basınç uygulayarak konağının kütikülasına doğrudan nüfuz etmektedir. Fungus tarafından enfeksiyon sürecine yardımcı

olabilecek toksik metabolitler salgılanmaktadır. Hemocoel'e girdikten sonra, fungus gelişim morfolojisini blastospor ve/veya hif cisimciklerinin üretimi ile maya benzeri bir faza dönüştürerek hemolenfte dolaşmakta ve tomurcuklanma yoluyla çoğalmaktadır. Konağın ölümü fungusun çoğalması ve dehidrasyon veya besin maddelerinin tükenmesi nedeniyle gerçekleşir. Enfeksiyon süreci sırasında fungus, böcek türlerinin enfeksiyonuna yardımcı olan ancak gerekli olmayan toksik sekonder metabolitler salgılayabilmektedir (Griffin, 2007). Konak öldükten sonra, *B. bassiana* kadavradan dışarı çıkar ve "beyaz muscardine" olarak bilinen karakteristik beyaz örtü şeklinde yeni konidiler oluşturmaktadır.

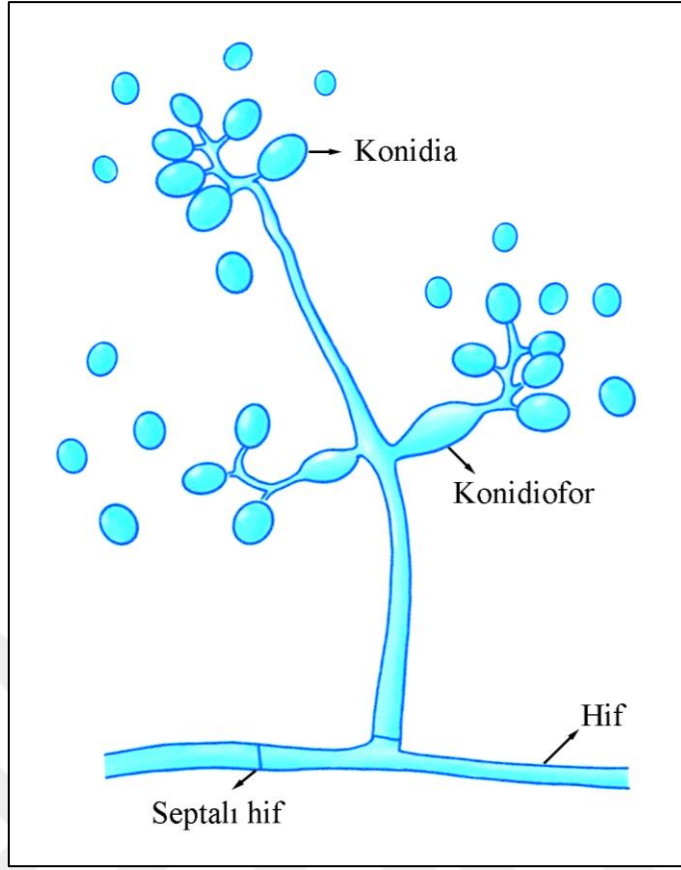
2.2.3.1 *Beauveria bassiana*'nın taksonomik ve morfolojik olarak tanımlanması

B. bassiana (Balsamo-Crivelli), Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales), dünya çapında dağılım göstermesiyle iyi bilinen bir entomopatojenik fungustur. Bu fungus ilk olarak 1835 yılında İtalyan bilim adamı Agostino Bassi tarafından ipekböceklerinde 'Beyaz Muscardine' hastalığının nedeni olarak tanımlanmıştır. *Beauveria* adı altında bağımsız bir cins olarak sınıflandırılmadan önce çeşitli taksonomik isimler verilmiştir. Anamorfik büyüme döngüsü nedeniyle, mantar taksonomik olarak Deuteromycota (Fungi imperfecti) takımına yerleştirilmiştir. Deuteromycetes olarak sınıflandırılan mantarlar, sadece eşeysiz olarak üreyen veya eşeyli çoğalma aşamaları hala bilinmeyen mantar türlerini kapsamaktadır. Rehner'e Rehner (2005) göre, bu taksonomi artık yaygın değildir; bunun yerine çoğu Deuteromycetes, modern moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak eşeyli akrabalarıyla birlikte kategorize edilebilmektedir. *B. bassiana* artık Hypocreales takımı altında Cordycipitaceae familyası altında sınıflandırıldığı için Ascomycota'ya dahil edilmiştir. *B. bassiana*'nın telomerik formu olan *Cordyceps bassiana* sadece Asya'da keşfedilmiş ve kanıtlanmıştır (Li vd., 2001). Ascomycetes'in yaygın olarak gözlemlenen aseksüel çoğalımı, fungusun hızlı yayılmasında büyük ölçüde etkilidir. Yayılma için kullanılan yapılar, konidia olarak da adlandırılan mononükleer konidiosporlardır (Şekil 2.2.). Bunlar tipik olarak konidiofor olarak bilinen spesifik hiflerin ucunda bulunan özelleşmiş konidiyojenik hücreler tarafından oluşturulmaktadır. Bu hücreler genellikle özelleşmiş hiflerin, yani konidioforların uç kısımlarında yer almaktadır. Kısa küremsi ya da şişe şeklinde olan yoğun konidiojenik hücre kümeleri, *B. bassiana*'nın karakteristik olarak beyaz, yünümsü görünen kolonileriyle karakterize edilmesine neden olmaktadır. Hilfler (renksiz) konidialar tek hücreli, haploid ve

hidrofobik yapıdadır ve bir sap benzeri rachis denilen yapının üzerinde zikzak şeklinde dizilmişlerdir (Rehner, 2005). Konidioforlar uzun süreli yapay kültür sonrasında daha ince ve daha az yoğun hale gelme eğiliminde olsa da, fungusun morfolojik olarak kolayca tanımlanması mümkündür. Rehner Rehner (2005), *Beauveria* cinsi içindeki türlerin morfolojik farklılaşmasının, konidilerin kesin şekli ve boyutuna bağlı olduğunu ileri sürmektedir.



Şekil 2.2. *B. bassiana*'nın böcekler üzerindeki fiziksel görünümü



Şekil 2.3. *B. bassiana*'nın morfolojisi

2.2.3.2 *Beauveria bassiana* biyokontrol ajanı olarak kullanımı

B. bassiana, geniş konakçı aralığı, kütiküller enfeksiyon yöntemi, çoğu yaşam evresini enfekte etme kapasitesi ve seri üretim kolaylığı nedeniyle çok sayıda böcek zararlısı türüne karşı bir kontrol ajanı olarak araştırılmaktadır. *B. bassiana*'nın beş türüne ait 21 adet ruhsatlı ürün bulunmaktadır ve bunlar özellikle beyazsinekler, afidler ve tripsler gibi sera zararlılarının biyolojik kontrolü için kullanılmaktadır (Brownbridge ve Buitenhuis, 2019). Herbivor böceklerin diğer doğal düşmanlarıyla karşılaştırıldığında, *B. bassiana* gibi entomopatojenik fungusların kontrol ajanları olarak kullanılmasının hem avantajları hem de dezavantajları bulunmaktadır. Avantajlarından biri, olumsuz çevre koşullarında fungus sporları canlı kalabilmeleridir. Hareketsiz oldukları ve yayılmadan kaynaklanan kaybı en aza indiren pasif geçişe bağlı olduklarından dolayı ultraviyole (UV) bozulmasına karşı hassastırlar. Türüne bağlı olarak *B. bassiana* konidileri yapay güneş ışığı altında dakikalar ya da saatler içinde inaktif hale gelebilmektedir (Krieg vd., 1981; Morley Davies vd., 1996). Bu hassasiyet, mikrobiyal kontrol ajanlarında konidileri UV'den korumak için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Bunlar arasında güneş koruyucuların

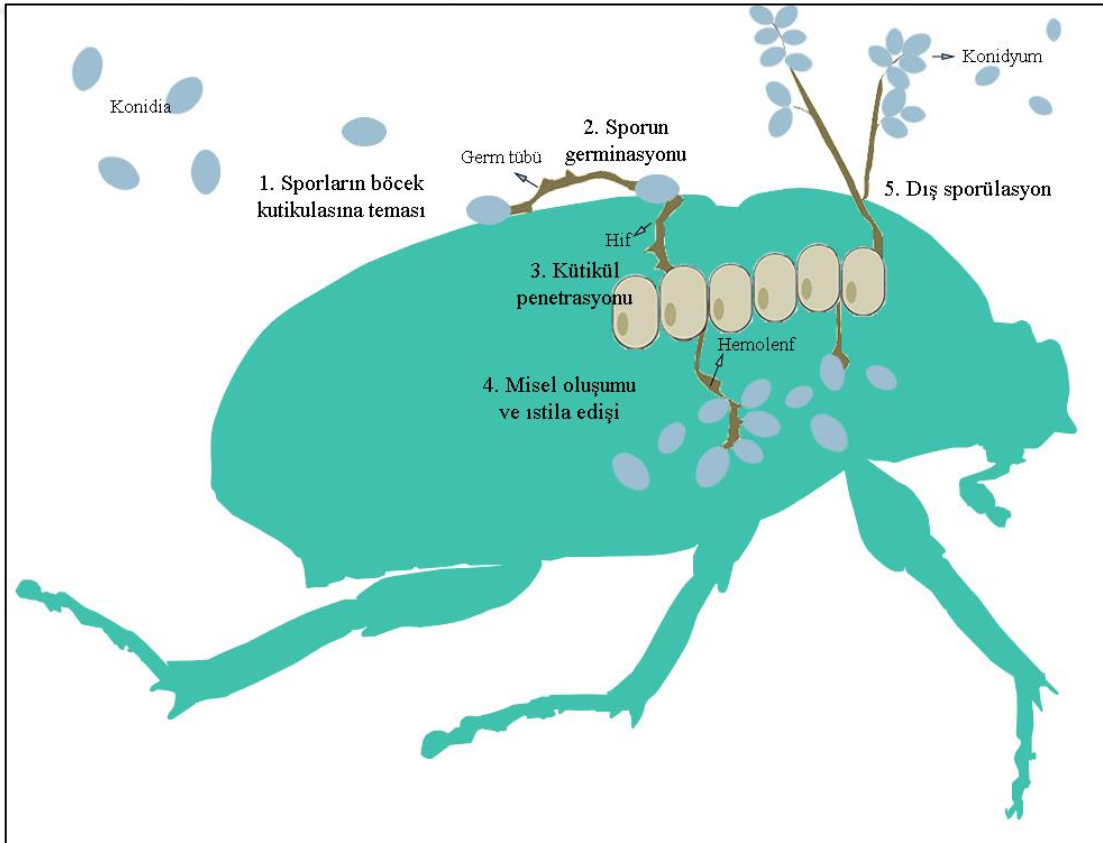
formülasyonlara dahil edilmesi ve lignin kaplamaların kullanılması yer almaktadır (Ingliš vd., 1995; Leland ve Behle, 2005). Fungal entomopatojenler de düşük nem koşullarına karşı hassastır ve germinasyona için optimum neme ihtiyaç duymaktadır. Bu kısıtlamanın üstesinden gelmek için biyoinsektisitlerin formülasyonuna nem tutucu maddelerin dâhil edilmesi gibi stratejiler kullanılmaktadır.

Her insektisit gibi entomopatojenik funguslar da hedefleri olmayan canlılara zarar verme yeteneğine sahiptir. *B. bassiana*, laboratuvar ortamlarında yararlı böcekler de dahil olmak üzere hedef olmayan eklembacaklıları enfekte edebilirken, bu durum doğal ortamlarda görülmemektedir (Goettel vd., 2021; Zimmermann, 2007). *B. bassiana*'nın omurgalı hayvanlar için toksik olduğuna dair herhangi bir kanıt bulunmamaktadır. İnsanlarda, yüksek seviyelerde *B. bassiana* sporlarına maruz kalmak alerjik reaksiyonları tetikleyebilir, ancak insanlarda *B. bassiana* enfeksiyonları çok nadirdir ve endişe verici boyutta değildir (Wang vd., 2004). Hedef olmayan mikroorganizmaların potansiyel yer değiştirmesi de dâhil olmak üzere, çevresel mikrobiyotaya müdahalenin etkisi yeterince anlaşılamamıştır. Wang vd., Wang vd. (2004), için *B. bassiana*'nın egzotik bir türünün kullanılmasına rağmen, *B. bassiana*'nın yerli türlerinin baskın kaldığını keşfetmişlerdir. Castrillo vd., Castrillo vd. (2004), yerli ve egzotik *B. bassiana* suşları arasında genetik değişim riskinin, çok sayıda vejetatif uyumluluk grubu nedeniyle olası olmadığını ortaya koymuşlardır. Wang vd. Wang vd. (2004), istilacı bir böceği kontrol altına almak için egzotik bir türün kullanılmaya başlanmasının ardından dahi *B. bassiana*'nın yerel türlerinin baskın olmaya devam ettiğini tespit etmişlerdir. Yerel ve egzotik *B. bassiana* suşları arasında genetik değişim riski de bulunmaktadır, ancak Castrillo vd. Castrillo vd. (2004) çok sayıda vejetatif uyumluluk grubu nedeniyle bunun olası olmadığını belirtmişlerdir.

2.2.3.3 Entomopatojen olarak *Beauveria bassiana*

B. bassiana'nın çoğalabilmesi, eklem bacaklı konakları istila etme yeteneğine bağlıdır. Konidiler konakçı ile temas ettiğinde, hidrofobik kuvvetler aracılığıyla konakçı kütikulasına bağlanır ve bağlanma fungal enzimler aracılığıyla güçlendirilir (Boucias ve Pendland, 1991). Bağlanmanın ardından *B. bassiana* germinasyon gerçekleştirir ve türüne bağlı olarak lipazlar, kitinazlar ve proteazlar gibi çeşitli kütikül parçalayıcı enzimler salgılamaktadır (Boucias vd., 1998). Germinasyon genellikle tutunmadan 10 saat sonra

başlar ve 20-25°C'de 20 saat içinde tamamlanmaktadır. Daha sonra, *B. bassiana* kütikula ve epidermise nüfuz ettikten sonra hemocoel'e doğru büyür, tipik olarak eklemlere yakın, segmentler arasında veya ağız parçalarının etrafındadır (Zimmermann, 2007). Şekil 2.3.'de *B. bassiana*'nın eklem bacaklı konakçıları nasıl enfekte ettiğini, çoğaldığını ve dağıldığını gösterilmiştir. Konakçı kütikülündeki proteinler, nem, sıcaklık ve UV radyasyonu gibi çevresel unsurların tümü kütikülün yapışması, germinasyonu ve penetrasyonunda rol oynamaktadır. Konağın yaşı ve yaşam evresi de başarıyı etkilemektedir; genç böcek larvaları tipik olarak yaşlı olanlardan daha hassastır ve farklı türlerin yetişkinleri veya deri değiştiren böcekleri enfekte etme kapasiteleri birbirinden farklılık göstermektedir (Boucias vd., 1998).



Şekil 2.4. Illustrator programı kullanılarak *B. bassiana*'nın sporları yoluyla eklem bacaklı konakçıları nasıl enfekte ettiğinin, çoğaldığının ve dağıldığının gösterimi yapılmıştır

1. Adım: konidyum, germinasyonu indüklemek için böcek konağına tutunur
2. Adım: sporun germinasyonu ve germ tüpü oluşumu takip eder.
3. Adım: kütikülayı delmek için mekanik basınç ve enzim salgılanması kullanılır.
4. Adım: Blastosporlar veya hifal gelişim yoluyla fungus konakçının hemocoel'ini işgal eder ve hemolenf içindeki şekerlerle beslenir.

5. Adım: toksinlerin salgılanması, konağın ölümünü kolaylaştırır. Konak öldükten sonra, fungus kütikulayı içeriden tekrar delerek kadavra üzerinde spor oluşturur. Böcekler, fungal enfeksiyona karşı humoral ve hücrel bağışıklık gibi doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin yanı sıra fiziksel bir bariyer de dâhil olmak üzere çeşitli savunma mekanizmalarına sahiplerdir (Qu ve Wang, 2018). Fungal enfeksiyona karşı en etkili bariyer proteinler ve kitinden oluşan böcek kütikulası olmasına rağmen, kütikulanın hidrofobik yapısı fungal konidiaların tutunmasını kolaylaştırır. Yağ amidleri, lipidler, aldehytler ve uçucu glandüler salgılar fungusun tutunmasına yönelik adaptasyonların örnekleridir (Sinha vd., 2016). Bir fungus hemolenf içine girdiğinde, böceğin doğuştan gelen savunma mekanizması devreye girmektedir. Hemositler nodülasyon, kapsülleme ve fagositozu içeren hücrel bağışıklık tepkisine aracılık etmektedir (Lu vd., 2015; Sinha vd., 2016). Proteaz inhibitörleri, antifungal maddeler ve antimikrobiyal peptitler, humoral immün yanıtta çeşitli efektör moleküller tarafından tetiklenen fenoloksidaz (PO) kaskadı tarafından üretilmektedir (Tsakas ve Marmaras, 2010). Bu yolak *B. bassiana* enfeksiyonuna yanıt olarak yukarı doğru düzenlenir, ancak genellikle çok az etkisi vardır (Lu vd., 2015).

Başarılı hemolenf penetrasyonunun ardından fungus, daha fazla konak dokuyu enfekte etmek için hemolenf boyunca pasif olarak dağılan blastosporlar oluşturur (Vertyporokh vd., 2020). Blastosporlar enfeksiyondan 48 saat sonra ortaya çıkmaktadır. Fungusun ürettiği mikotoksinleri (beauvericin, cyclodepsipeptide, destruxin ve desmethyldestruxin), dehidrasyon ve besin yoksunluğu konağın ölmesine neden olmaktadır (Boucias vd., 1998). Fungusun gelişme süresi konakçıya, fungusun türüne ve çevredeki koşullara bağlı olarak günler ya da haftalar sürebilmektedir. Konakçı öldüğünde ve uygun çevresel koşullar sağlandığında, *B. bassiana* konakçı vücudundan püskürecek ve beyaz bir spor bulutu olarak ortaya çıkacak konidya üretecektir. Daha sonra, böcek vektörleri ya da pasif çevresel süreçler yoluyla bu sporlar diğer konakçılara bulaşabilmektedir (Dromph, 2003; Kreutz vd., 2004). Buna karşın, *B. bassiana* gibi fungal entomopatojenlere karşı direnç gelişmesi olası görülmemektedir çünkü bunlar çeşitli virülans faktörleri kullanan türlerdir. Direncin hem humoral hem de hücrel bağışıklığı kapsamı muhtemeldir. Sonuç olarak, böcekler büyük ölçüde uyum sağlama yeteneğine sahiptir ve çok sayıda savunma mekanizması oluşturabilirler. Buna ek olarak, fungal biyoinsektisitler sentetik insektisitlerden tamamen farklı etki mekanizmalarına sahip olduklarından, diğer kontrol stratejileri ile daha sık kullanılabilirler. Bu, aksi

takdirde böcek ilacına tekrar tekrar maruz kalmanın getirdiği direnç gelişimine yol açacak seçim baskısını azaltır. Haşere yönetimi için kullanıldığında böceklerin *B. bassiana*'ya karşı direnç geliştirdiğine dair rapor bulunmamaktadır.

2.2.3.4 *Beauveria bassiana* toksinleri

B. bassiana, konakçıları istila etmesine yardımcı olmak için antibakteriyel, antifungal, sitotoksik ve insektisidal etkilere sahip metabolitler üretmektedir (Boucias vd., 1998; Wang vd., 2021). Bassianin ve tenellin pigmentlerinin yanı sıra beauvericin ve bassianolide siklik peptidleri üretilen ana metabolitlerdir. Beauvericinler lipid çift tabakaları içinde çözünerek hücre zarlarının iyonlara karşı geçirgenliğinin artmasına neden olur ve iyon taşınmasındaki bu değişiklik, hücrelerin ve organellerin işlevlerini yerine getirememesine neden olmaktadır (Wang ve Xu, 2012). Önemli bir virülans faktörü olan bassianolidler böcekler için oldukça zararlıdır (Patocka, 2016). Bassianin ve tenellinin eritrosit membran ATPazlarını inhibe ettiği tespit edilmiştir, ancak işlevleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Fungus tarafından üretilen diğer metabolitler arasında oosporein, oksalik asit ve kültürde ortamında siklosporin A bulunmaktadır. Oosporeinin böcek bağışıklık sistemini bloke ettiği ve konakçının ölümünden sonra bakteriyel büyümeyi baskılayarak fungusun tüm besinleri tamamen kullanmasına izin verdiği gösterilmiştir (Feng vd., 2015). Oksalik asit de spesifik kütiküler proteinleri çözebildiği için oldukça önemlidir (Butt vd., 2001). Siklosporin A immünsupresif özellikler göstermektedir. Yakın geçmişte, *B. bassiana*'da ribotoksin şeklinde yeni bir virülans faktörü keşfedilmiş, reaktif oksijen türlerine verilen yanıtı modüle ederek ve antimikrobiyal peptit üretimini baskılayarak böcek konakçı bağışıklığını engellemektedir. Çeşitli insektisidal özelliklere sahip birkaç yeni *B. bassiana* toksini de keşfedilmiştir (Wang vd., 2021).

2.2.3.5 *Beauveria bassiana*'nın bitki kolonizasyonu

Entomopatojenik funguslar, mikoriza benzeri etkileşimler gibi bitkilerle yakın ilişkiler kurabilirler. Bu tür bir etkileşimde, funguslar rizosferden karbon elde ederken, besin maddelerini parazitlenmiş bir böcek kadavrasından bitkiye taşımaktadır (Vega vd., 2009). Bu ilişkiler rizosferde veya endofitik ilişkiler olarak ortaya çıkabilir. Endofitler, hastalığa neden olmadan bitkisel dokular içinde yaşayan, genellikle bakteri ve funguslardan oluşan

mikroorganizmalardır. Entomopatojenik fungusların doğada endofitizm, rizosfer kolonizasyonu, bitki hastalıkları antagonizması ve bitki büyümesinin desteklenmesi gibi çeşitli ek rolleri olduğunu bildirmiştir. (Vega vd., 2009). Fungal entomopatojenler, bitki savunma sistemlerini harekete geçirerek patojenlere, bitki paraziti nematodlara ve herbivorlara karşı korudukları rapor edilmiştir (Vidal ve Jaber, 2015).

B. bassiana'nın endofitik gelişiminin kaydedilen ilk örneği Lewis ve Cossentine Lewis ve Cossentine (1986) ve Bing ve Lewis Anderson Bing ve Lewis (1992) tarafından *Zea mays* L. (Poaceae) mısır bitkilerinde gözlemlenmiştir. Wagner ve Lewis Wagner ve Lewis (2000), ışık ve elektron mikroskobu kullanarak mısır bitkileri üzerinde yaptıkları çalışmalarda, *B. bassiana*'nın bitkiyi sistemik olarak kolonize edebildiğini gözlemlemişlerdir. Apoplast içindeki parankima hücreleri arasında hiflerin büyümenin gözlemlenmesinin yanı sıra, hifler pasif olarak hareket edebildikleri bitkilerin ksilem damarlarında da tespit edilebilmiştir. Entomopatojenik fungusun enfeksiyonunun klasik yöntemi kutikula ile doğrudan teması içermektedir. Sonuç olarak, bitkideki endofit hif durum ve enfekte bitki dokularının tüketimi, entomopatojenik enfeksiyonların ana kaynakları olarak görülmemektedir (Arnold ve Lewis, 2005). Bununla birlikte, bazı araştırmalar endofitik *B. bassiana*'nın kemiren veya ksilemden beslenen böcekleri enfekte edebileceğini belirtmektedir (Gurulingappa vd., 2010; Lozano Tovar vd., 2017). Bitki savunma ve stres tepkisi ile ilgili proteinlerin *B. bassiana* kolonizasyonu ile indüklendiği gösterilmiştir, bu da entomopatojenik funguslar tarafından endofitik kolonizasyonun büyük olasılıkla, bitki savunma sistemini aktive ederek bitki sistemik direncin indüklenmesine düşündürmektedir (Gómez Vidal vd., 2009). Endofitik *B. bassiana*'nın sadece böcek zararlılarına karşı biyokontrol etkisi göstermekle kalmayıp aynı zamanda potansiyel olarak bitki patojenlerine karşı antagonistik aktivite sergilediğine ve dolayısıyla bitki hastalıklarını etkili bir şekilde baskıladığına dair önemli kanıtlar bulunmaktadır (Ownley vd., 2008). Bitkilerin *B. bassiana* ile yapraktan inoküle edilmesinin ardından, kabakta sarı mozaik virüsünün ve asmalarda mildiyö hastalığının görülme sıklığının ve şiddetinin azaldığı rapor edilmiştir (Jaber, 2015; Jaber ve Salem, 2014). *B. bassiana*, endofitik entomopatojen funguslar gibi, ekolojik nişler ve besinler için rekabet, mikoparazitizm ve ikincil metabolitlerin salgılanması yoluyla bitki patojenlerini doğrudan baskıladığı rapor edilmiştir (Barra Bucurei vd., 2019; Espinoza vd., 2019).

2.2.4 *Clonostachys rosea*

C. rosea (Link: Fries) toprak kaynaklı, mikoparazitik Ascomycete şubesine ait fungusudur ve birçok bitki patojeni fungusa karşı etkili bir biyolojik kontrol ajanı olduğu bildirilmiştir (Schroers vd., 1999; Sutton vd., 1997). *C. rosea*'nın çeşitli fungal patojenlere karşı biyolojik kontrol ajanı olarak etkili olduğu gösterilmiştir. Jensen vd. Jensen vd. (2004) tarafından yapılan çalışmalar *Alternaria sp.*, *Bipolaris sorokiniana*, *Botrytis cinerea* ve *Fusarium culmorum*'a karşı etkinliğini göstermiştir. Hue vd. Hue vd. (2009) tarafından *Fusarium graminearum*, Sutton vd. Sutton vd. (1997) tarafından *Botrytis cinerea* ve Rodríguez vd. Rodríguez vd. (2011) tarafından *Sclerotinia sclerotiorum* gibi çeşitli fungal patojenlere karşı biyolojik kontrol ajanı olarak başarılı bir şekilde etkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte yapılan araştırmalar, bazı *Clonostachys* türlerinin bitki paraziti nematodlara karşı biyokontrol ajanları olarak önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Nematod yumurtalarını ve kistlerini parazitleyerek nematod popülasyonlarının kontrol altına alınabileceği kanıtlanmıştır (Li vd., 2006; Zhang vd., 2008; Zou vd., 2010).

C. rosea, mikoparazitik ve parazitik özelliklerinin yanı sıra birçok böcek zararlısına, patojenik funguslara ve bitki paraziti nematodlara karşı olası bir biyokontrol ajanı olarak rapor edilmiştir (Tamta vd., 2022). *C. rosea*'nın *Oncometopia tucumana* Schröder, *Sonesimia grossa* Signoret, *Anopheles stephensi* Liston, *Culex quinquefasciatus* Say, *Hypera postica* Gyllenhal, *Carpomyia vesuviana* Costa, *Bemisia tabaci* Gennadius ve *Aphis gossypii* Glover dahil olmak üzere bir dizi böcek zararlısını enfekte etme ve öldürme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir (Tamta vd., 2022).

2.3 Türlerin Moleküler Düzeyde Tanımlanması

ITS bölgesi ribozomal DNA'nın kodlama yapmayan bölgelerinden biridir. 18S rDNA ile 5.8S rDNA arasında yer alan ITS1 bölgesini ve 5.8S rDNA ile 28S rDNA arasında yer alan ITS2 bölgesini içermektedir. Dış çevresel faktörlerin sınırlı etkisi ve evrimsel sürecin yüksek hızı nedeniyle, bu bölge çok sayıda bilgilendirici ve değişken alan sunmaktadır (Wang vd., 1999). ITS dizisi fungal türler arasında sıklıkla değişmektedir. Bunun sonucunda, yüksek sekans polimorfizmi sergileyen ve güçlü koruma, düşük evrimsel oran ve düşük farklılaşma derecesi gibi özellikler gösteren ribozomal DNA'nın diğer

bölgelerini (18S, 5.8S ve 28S) tanımlayabilmektedir. Ribozomal DNA'nın çeşitli bölgesel dizileri arasında, Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgesinin dizisi daha erişilebilir olduğu ve tür düzeyinde sınıflandırmak ve tanımlamak için kullanılmaktadır (Somai vd., 2002). ITS'nin işaretli dizisi üzerine yapılan çalışmalar ve uygulamalar, türler arası filogeni, sınıflandırma, fungal türlerin belirlenmesinin ve fungal hastalıkların moleküler tespitinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Yan vd., 2011). Ribozomal DNA'nın ITS bölgeleri, diğer bölgelere göre daha yüksek bir evrim ve değişkenlik oranına sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı, fungusları sınıflandırmak ve tür/alttür düzeyinde tanımlamak için etkili bir araç olarak kullanılmaktadır (Yan vd., 2011).

2.4 Tezin Amacı

Bu tezin amacı, *B. bassiana*'nın yalnızca böcek zararlılarına karşı değil, aynı zamanda fitopatojenik funguslara ve mikrobiyal biyolojik kontrol ajanları olarak kullanılan diğer funguslara karşı da etkinliğinin olup olmadığını araştırmaktır. Bu amaç doğrultusunda, *B. bassiana* tarafından üretilen enzimlerin *Trichoderma* türleri ve *C. rosea* gibi diğer funguslarla karşılaştırılmasıyla antagonist mekanizmalarının anlaşılması ve biyolojik kontrol stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlanması hedeflenmektedir. Bu çalışma, *B. bassiana*'nın geniş spektrumlu biyolojik kontrol ajanı olarak potansiyelini ortaya koyarak, tarımsal zararlılarla mücadelede yenilikçi ve sürdürülebilir yaklaşımların geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan besiyeri ve diğer çözeltilerin içeriği

Malt, Extract Agar (MEA), Potato Dextrose Broth (PDB), Patates Dekstroz Agar (PDA), Rose Bengal Agar (RBA) ve Cornmeal Agar (CMA) fungus kültürlerinin yetiştirilmesi için kullanılmıştır.

Malt Extract Agar (MEA) Besiyeri

Malt Ekstrakt Agar (MEA) (Fluka) mantar kültürleri yetiştirmek için yaygın olarak kullanılan bir besiyeridir. Bu besiyerini hazırlamak için 50 gram malt ekstrakt agar tozu (Formedium) 1000 ml distile su ile homojen bir şekilde karıştırılır ve agar tamamen çözülene kadar ısıtılır. Hazırlanan agar çözeltisi otoklavda 121°C'de ve 1 atmosfer basınçta 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

Potato Dextrose Broth (PDB) Besiyeri

Bu besiyerini hazırlamak için 24 gram patates dekstroz broth (Formedium) 1000 ml distile suya eklenmiş ve homojenize edilen karışım daha sonra çözünene kadar ısıtılmıştır. Elde edilen çözelti otoklavda 121°C'de ve 1 atmosfer basınçta 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

Potato Dextrose Agar (PDA) Besiyeri

Hazırlamak için 39 gram patates dekstroz agar tozu (Neogen) 1000 ml distile su ile karıştırılmış, agar tamamen çözülene kadar ısıtılmış ve elde edilen çözelti otoklavda 121°C'de ve 1 atmosfer basınçta 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

Rose Bengal Agar (RBA) Besiyeri

Rose Bengal Agar (RBA), özellikle *Trichoderma* türlerini seçici bir şekilde izole etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmış. Bu besiyerinin hazırlanması için, Siddiquee Siddiquee (2017) tarafından belirtilen bileşenler kullanılmıştır. Buna göre, 1.0 g KH_2PO_4 , 0.5 gr. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.0 gr. pepton, 10.0 gr. dekstroz, 0.35 gr. Rose Bengal ve 15 gr. agar 1000 ml distile su ile homojen bir karışım oluşturmak üzere bir araya getirilir. Elde edilen karışım, pH $6,6 \pm 2$ olacak şekilde ayarlandıktan sonra agar tamamen çözülene kadar kontrollü bir ısıtma işlemine tabi tutulur. Solüsyon otoklavda 121°C sıcaklıkta ve 1 atmosfer basınç altında 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

Cornmeal Agar (CMA) Besiyeri

Cornmeal Agar (CMA), entomopatojen fungusların geliştirilmesi için kullanılan besiyeridir. Bu besiyerinin hazırlanması için 20.0 gr. mısır unu, 20.0 gr. pepton, 20.0 gr. glukoz, ve 15.0 gr. agar kullanılmıştır. 500 ml distile su içinde 60°C sıcaklığa ısıtılan mısır unu 1 saat boyunca pişirilmiştir. Mısır unu karışımı, tülbent kullanılarak süzülerek elde edilen karışım, süzülen mısır unu sıvısı, agar, pepton ve dekstroz karışımı ile birleştirilerek toplam hacim 1000 ml olacak şekilde ayarlanıp, sterilizasyon için otoklavda 121°C sıcaklıkta ve 1 atmosfer basınç altında 15 dakika süreyle inkübe edilmiştir.

Minimal Besiyeri (MM)

Minimal medium (MM), enzim aktivitesi deneyleri için kullanılan bir besi ortamıdır. Hazırlanışında, 0,5 gr. KCl, 0,5 gr. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 gr. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 gr. K_2HPO_4 , 2 gr. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve 16 gr. agar 1000 ml distile su ile hazırlanmıştır. Araştırma için seçilen enzimler arasında amilaz, selülaz, ve proteaz yer almıştır. Her bir enzim deneyi için, besiyerinde uygun değişiklikler yapılmıştır.

Kullanılan Boylar ve Çözeltililer

Serum Fizyoloji

Serum fizyoloji hazırlığı için 9 gram (yaklaşık 0.9%) sodyum klorür (NaCl) 1000 ml steril distile su eklenmiş ve solüsyonun sterilizasyonu için otoklavda 121°C sıcaklıkta ve 1 atmosfer basınç altında 15 dakika süreyle inkübasyon sağlamıştır.

Kongo kırmızı boyası

0.2 gram Kongo kırmızısı (AnalytiCals) boyası, 100 ml distile su ile karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

Coomassie brilliant blue boya çözeltisi

Coomassie Brilliant Blue R250 1 gr., 400 ml metanol, 100 ml glasiyal asit ve 500 ml distile su ile karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

Boya geri alma çözeltisi

400 ml metanol, 100 ml glasiyal asit ve 500 ml distile su ile karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

İyot çözeltisi

İyot çözeltisi, 0.0340 gr. iyot ve 0.660 gr. potasyum iyodürün 100 ml distile su ile karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

Gram iyodu çözeltisi

1.7 gram iyot'u 3.3 gram Potasyum İyodür ile birlikte alıp havanda iyice ezildikten sonra üzerine 500 ml distile su ile karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

Enzimlerin Hazırlanması

Amilaz Enzimi Hazırlanışı

Minimal medium (MM) besiyer ortamına substrat olarak %0.2 çözünür nişasta kullanılmıştır. Ortamın pH değeri 6.8 olarak ayarlanmıştır.

Selüloz Enzimi Hazırlanışı

Minimal medium (MM) besiyer ortamına substrat olarak %1 carboxymethylcellulose (CMC) kullanılmıştır.

Proteaz Enzimi Hazırlanışı

Minimal medium (MM) besiyer ortamına sterilizasyon için otoklavda 121°C sıcaklıkta ve 1 atmosfer basınç altında 15 dakika süreyle inkübasyon sağlanır. Otoklavlanmış besiyerine %1,5 skimmed milk (sterilize edilmiş) soğutulmuş şekilde eklenmiştir.

Kitinaz Enzimi Hazırlanışı

Kitinaz tespiti için kullanılan besiyerin hazırlanması için, Agrawal ve Kotasthane, Agrawal ve Kotasthane (2012) tarafından belirtilen yöntem kullanılmıştır. Buna göre, 0.3 gr. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3,0gr. $(NH_4)_2SO_4$, 2,0 gr. KH_2PO_4 , 1,0 gr. sitrik asit monohidrat, 4,5 gr. koloidal kitin, 15 gr. agar, 200 µl Tween-80, 0,15 gr. bromokresol moru (Merck) ve 1000 ml distile su eklenerek oluşturulan besiyeri pH 4,7'ye ayarlanmıştır. Kitinaz aktivitesi için test edilecek izolatların yeni kültürleri besiyeri petri plakalarına inoküle edilmiştir ve 25 ± 2 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

3.2 Metot

3.2.1 *Trichoderma* spp. izolasyonu ve saflaştırılması

Niğde ve Adana yörelerinden alınan toprak örneklerinden bir gram örnek alınarak 10 ml steril distile suya ilave edilerek 10^{-6} oranında seyreltme yapılmıştır. Her bir toprak

numunesinin altı kat seri dilüsyonunun sterilizasyonu sağlanarak serum fizyolojik su içinde hazırlanmış ve her bir seyreltme örneğinin 10^{-4} ve 10^{-6} dilüsyonlarından 0,2 ml'lik petri plakalar içindeki RBA ve PDA üzerine dökülmüş ve yayma plaka yöntemi ile homojen bir şekilde yayma yapılmıştır (Elad vd., 1981; Siddiquee, 2017). Petri plakları, 168 saat boyunca $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Plakalar üzerinde morfolojik olarak farklı görünen koloniler, PDA içinde saflaştırılmıştır. Saflaştırılan izolatlar PDB içeren 15ml vidalı kapak cam şişelerde ve PDA içeren yatık besi ortamına alınarak $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Saflaştırılan izolatlar 4°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2 Fitopatojenik fungusların izolasyonu ve saflaştırılması

Hastalık belirtileri gösteren, lahana (*Brassica oleracea*), muz (*Musa Dwarf*), kivi (*Actinidia deliciosa*) ve avokado (*Persea americana*) bitkilerin kök, gövde ve yapraklarından enfekte dokulardan ayrı ayrı örnekler alınmıştır. Doku parçaları %5'lik hidroklorik asit (HCl) çözeltisi ile 5-10 dakika süreyle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş, ardından steril distile su ile üç kez yıkanmıştır. Daha sonra her bir bitki materyali patates dekstroz agar (PDA) ortamına ayrı ayrı yerleştirilmiş. Petri plakları, 168 saat boyunca $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Plakalar üzerinde morfolojik olarak farklı görünen koloniler, PDA içinde saflaştırılmıştır. Saflaştırılan izolatlar PDB içeren 15ml vidalı kapak cam şişelerde ve PDA içeren yatık besi ortamına alınarak $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Saflaştırılan izolatlar 4°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 *Beauveria bassiana* izolasyonu ve saflaştırılması

Beauveria bassiana izolatlarının toprak örneklerinden izolasyonu için toprak besleme yöntemi uygulanarak eklem bacaklılar konak olarak kullanılmıştır (Zimmermann, 2007). Konak üzerinden gelişen koloniler CMA üzerine yerleştirilmiştir. Petri plakları, 168 saat boyunca $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Plakalar üzerinde morfolojik olarak farklı görünen koloniler, PDA içinde saflaştırılmıştır. Saflaştırılan izolatlar PDB içeren 15ml vidalı kapak cam şişelerde ve PDA içeren yatık besi ortamına alınarak $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Saflaştırılan izolatlar 4°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4 Morfolojik analizler

Fungal morfolojinin mikroskopi analizleri ve fungal izolatlarının spor yoğunluğunun belirlenmesi Olympus CX31 marka mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Belirtilen deney prosedüründe, PDA besiyerinden kare kesitler alınmış ve steril lam bloklarının üstüne yerleştirilmiştir. Bunu takiben, fungal izolatlar hazırlanmış lam kültürlerinin üzerine aşılanmış ve ardından bir lamel ile kapatılmıştır. Kültürler daha sonra ortam koşullarında 28 ± 2 °C sıcaklıkta inkübasyona tabi tutulmuştur. 48 saatlik bir sürenin ardından, lam kültürleri lugol çözeltisi (seyreltilmiş iyot-potasyum iyodür çözeltisi) boyanmış mikroskopta gözlem ve analiz amacıyla incelemeye tabi tutulmuştur.

3.2.5 Moleküler tanımlama

Hizmet alınımlı kapsamında izole edilen mikroorganizmaların genomik DNA izolasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR veya PCR) ve dizileme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Firma tarafından belirtilen bilgilere göre Fungal DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Plant & Fungi DNA izolasyon kiti (Polonya) kullanılmıştır. İlgili kiti protokole uygun olarak takip ederek, izolasyon işlemi firma tarafından gerçekleştirilmiştir. Ardından, DNA izolasyonunun ardından, elde edilen DNA'ların miktarını ve saflığını belirlemek için Thermo Scientific Nanodrop 2000 (ABD) kullanılarak spektrofotometrik bir ölçüm yapılmıştır.

İzole edilen genomik DNA örneklerinin 18S ve 26S ribozomal RNA (rRNA) arasında olan türler arasında korunmuş ITS bölgesi PZR ile çoğaltılmıştır. PCR için evrensel korunmuş olan ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak ITS bölgesi çoğaltılmıştır. ITS1 ileri primeri olarak 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' dizileri kullanılmıştır. ITS4 geri primeri olarak 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3 dizileri kullanılmıştır. '

PZR sırasında kullanılan reaksiyonunun bileşenleri ve konsantrasyonları şu şekildedir: PCR tamponu 10X stok konsantrasyonunda hazırlanmış olup, reaksiyon sırasında 1X konsantrasyonda kullanılmıştır. Reaksiyon içinde $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTP karışımı 0,2 mM, ITS1 ileri ve ITS4 geri primerleri 0,3 μ M, Taq DNA polimeraz 2 U/ μ L, genomik DNA örneği 3 μ L konsantrasyonlarında kullanılıp kalan miktar dH₂O ile 35 μ L hacme tamamlanmıştır.

PZR aşamaları 5 basamakta gerçekleştirilmiştir. İlk adım olarak, 95°C'de 5 dakika boyunca yapılan başlangıç denatürasyonu, DNA çift zincirlerinin ayrılmasını sağlamıştır. Ardından, 40 döngü boyunca, 95°C'de 45 saniye süren denatürasyon gerçekleştirilir, bu süreçte DNA iplikçikleri tek iplikçiklere ayrılmıştır. Daha sonra, 57°C'de 45 saniye süren eşleşme ile primerler hedef DNA'ya bağlanmıştır. Son olarak, 72°C'de 60 saniye süren uzatma, DNA polimerazın hareket etmesini ve yeni DNA zincirinin sentezlenmesini sağlamıştır. Tüm döngülerin tamamlanmasının ardından, 72°C'de 5 dakika süren bir final uzatma adımı gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu, son aşamada sıcaklığın 4°C'de tamamlanmıştır.

PCR (Kyratex Thermocycler) ile elde edilen amplifikasyon sonuçları 1x TAE tampon ile hazırlanan %1,5 agaroz jelde 100 volt akımda 90 dakika elektroforezde yürütülmüş ve Ethidium Bromür (EtBr) boyası kullanılarak jel boyanıp, UV ışığında görüntüsü alınmıştır.

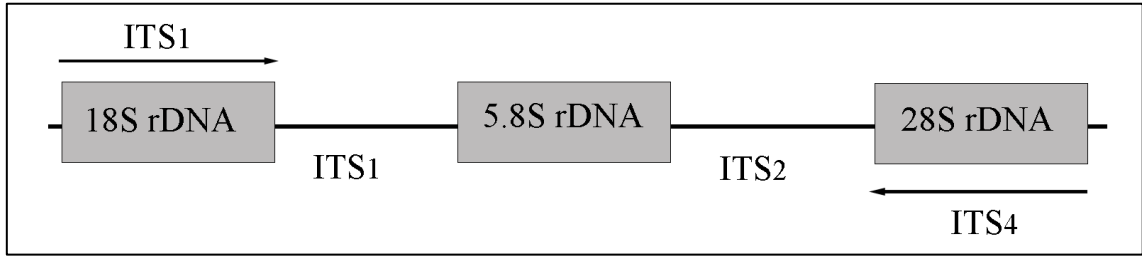
Hedeflenen 700 bp'lik bölgeyi çoğaltmak için tek aşamalı PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonunuz Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® DNA Polymerase Taq polimeraz enzimiyle gerçekleştirilmiştir. Örnekleriniz için PCR sonrasında agaroz jelde tek bant elde edilerek, PCR işleminin başarılı olan örnekler seçilerek saflaştırılma aşamasına geçilmiştir.

PCR ürünü saflaştırma aşamasında, elde edilen tek bant örnekler için MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System" (AC-60005) saflaştırma kiti kullanılıp, kitin prosedürlerine uyarak saflaştırılmıştır.

Sanger sekanslama örnekleri için MacroGen Hollanda laboratuvarında bir ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Dizileme Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılmıştır.

ITS1-ITS4 primerleri ile elde edilen okumalar, BioEdit yazılımındaki CAP contig montaj algoritması kullanılarak bir konsensüs dizisine birleştirilmiştir. Ayrıca tarafımıza gelen diziler nükleotit BLAST (BLASTn) araması yapılarak NCBI GenBank ile tür taraması

yapılmıştır. İlgili dizilerin e-değeri 0 ve 0'a yakın olan ve en yüksek skorlama puanı olan değerlere göre tanımlanan organizma isimleri eklerde belirtilmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Ribozomal DNA genomik dizilerini içeren ITS dizileri ITS1, ITS2

3.2.6 Filogenetik analizler

Dizileme sonrası elde edilen FASTA dizileri isimlendirilerek MUSCLE (Edgar, 2004) programı ile çoklu dizi hizalaması yapılmıştır. Hizalanan diziler MEGA X programı ile Neighbor-joining metodu 1000 güvenilirlik değeri kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Kumar vd., 2018).

3.2.7 Enzim analizleri

B. bassiana, *Trichoderma* türleri ve *C. rosea* izolatların hücre dışı enzimler üretilip üretilmediğini belirlemek için petri kabı bazlı deneyler kullanıldı. Araştırma için seçilen enzimler arasında amilaz, selüloz, kitinaz ve proteaz yer almıştır. Enzimlerin hazırlanışı materyal kısmında belirtilmiştir.

Amilaz aktivitesi

Amilaz aktivitesi için test edilecek izolatların aktif olarak büyüyen misel diskleri (6 mm) merkeze yerleştirilerek 25 ± 2 °C'de 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Amilaz aktivitesi, nişasta içeren petri plakalarına inoküle edilen funguslar 25 ± 2 °C'de 3 gün inkübe edildikten sonra, plakalar iyot çözeltisi ile 5 dakika süre ile boyanmış, substrat bölgesinde koyu mavimsi bir renk oluştuğu gözlenmiş, inoküle edilen fungal kolonilerin çevresinde oluşan zonlar hidroliz zonları olarak rapor edilmiş ve amilaz aktivitesinin varlığı için bir belirteç olarak değerlendirilmiştir (Gopinath vd., 2017). İyot, nişasta

molekülleriyle tepkimeye girerek canlı mavi/mor bir renk olan triiyod (I_3^- anyonlar) amilaz kompleksi oluşturur (Deb ve Dutta, 2021).

Selülaaz aktivitesi

Selülaaz aktivitesi için test edilecek izolatların aktif olarak büyüyen misel diskleri (6 mm) Karboksimetilselüloz (CMC) içeren petri plakalarının merkeze yerleştirilerek 25 ± 2 °C'de 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, selülaaz testi için plakalar hem Gram iyot hem de %0,2'lik Kongo kırmızısı çözeltisi uygulanarak analiz edilmiştir. 30 dakika boyunca Kongo kırmızısı (AnalytiCals) çözeltisi ile boyandıktan sonra 15 dakika boyunca 1 M NaCl çözeltisi ile yıkanmıştır. CMC ortamında inkübasyondan sonra, hidroliz bölgesini ortaya çıkarmak için plakalar Kongo kırmızısı ile boyanmıştır. Hidroliz bölgesi, hidroliz alanlarını gösteren β -1,4-glisidil bağları ile boyanın bağlanmamasıyla oluşmuştur (Florencio, 2011). Koloniyi çevreleyen açık, belirgin bir zon bölgesi oluşumu ile selülaaz aktivitesi değerlendirilmiştir (Florencio vd., 2012). Bu yöntem, selülaaz enzimleri üreten mikroorganizmaların tanımlanması için basit bir araç olarak kullanılmaktadır (Ten vd., 2004). Gram iyot çözeltisi ile boyanmış petri plakalarında, hidrolize olan kısımlarda sarı bir zon oluşumu ile, hidrolize olmayan kısımlarda ise koyu kahverengi renklenme ile değerlendirilmiştir (Kasana vd., 2008). CMC agar plakaları ile *B. bassiana*, *C. rosea* ve *Trichoderma* izolatları tarafından selülaaz üretiminin taranması ve kalitatif tahmini sağlamak için farklı boyaların etkinliğini karşılaştırılmıştır.

Proteaz aktivitesi

Proteaz aktivitesi için test edilecek izolatların aktif olarak büyüyen misel diskleri (6 mm) merkeze yerleştirilerek 25 ± 2 °C'de karanlık koşullarda 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Proteaz aktivitesi, skimmed milk (%1,5) ve jelatin (%0,5) içeren besiyerine inoküle edilen fungus izolatları değerlendirilmiştir (Deb ve Dutta, 2021). Protein substratı içeren petri plakalarına inoküle edilen funguslar, uygun inkübasyon sonrasında proteinlere bağlanan boya çözeltisi ile boyandığında, koloni etrafında oluşan zon bölgeleri proteaz aktivitesinin varlığını göstermektedir (Ozturkoglu Budak vd., 2016). Protein ile reaksiyona girdiğinde mavi bir leke üreten Coomassie Brilliant Blue

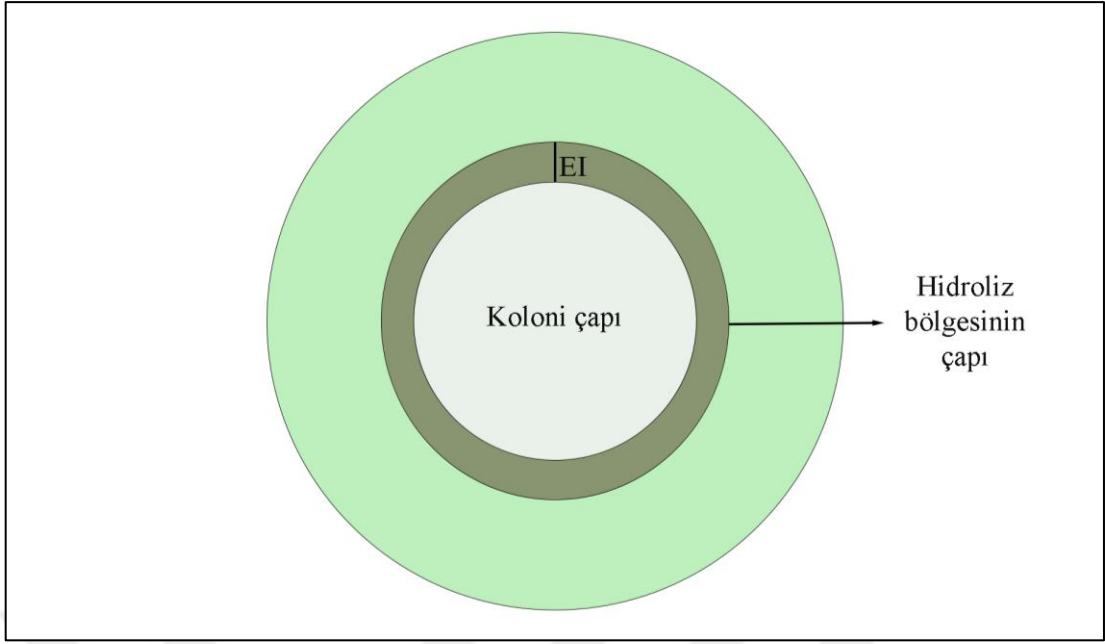
protein boyama çözeltisi ile boyandı, 3 saat bekletildikten sonra boya alma solüsyonu ile durulandı ve oluşun zon bölge oluşumu ile değerlendirilmiştir.

Kitinaz aktivitesi

Kitinaz aktivitesi için test edilecek izolatların aktif olarak büyüyen misel diskleri (6 mm) merkeze yerleştirilerek 25±2 °C'de karanlık koşullarda 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Kitinaz aktivitesi, bromokresol moru (pH 4.7) içeren kitin besiyeri ortamı, inoküle edilen fungus izolatları, kitinin N-asetil glukozamine parçalanarak pH'da alkaliniteye doğru değişeceğinden, sarıdan mor renk oluşumuna bağlı olarak tanımlanmıştır (Agrawal ve Kotasthane, 2012). Gözlemler, inokülasyondan sonraki üçüncü güne kadar mor renkli zonun çapı ve renk yoğunluğu ile ilgili değerlendirilip ortalaması alınmıştır.

Tüm enzim deneyleri için izolatlar minimal medium (MM) petri kabının ortasında yetiştirilmiştir. Her bir enzim deneyi için, besiyerinde uygun değişiklikler yapılmıştır. Her bir deney üç parael olarak gerçekleştirilmiştir. *B. bassiana*, *Trichoderma* türleri ve *C. rosea* izolatların kolonileri radyal çapı uygun solüsyonlarla boyanmadan önce ölçülmüştür. Amilaz, selüloz ve proteaz testleri için oluşan halonun radyal çapı boyamadan sonra değerlendirilmiştir (Şekil 3.2.). Enzimatik indeks (EI) (Chen vd., 2018; Florencio vd., 2012), *B. bassiana*, *Trichoderma* türleri ve *C. rosea* kolonisinin radyal çapı ile ilişkili halo arasındaki oran olarak aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$EI = \frac{\text{Hidroliz (berrak) bölgesinin çapı}}{\text{Koloni çapı}}$$

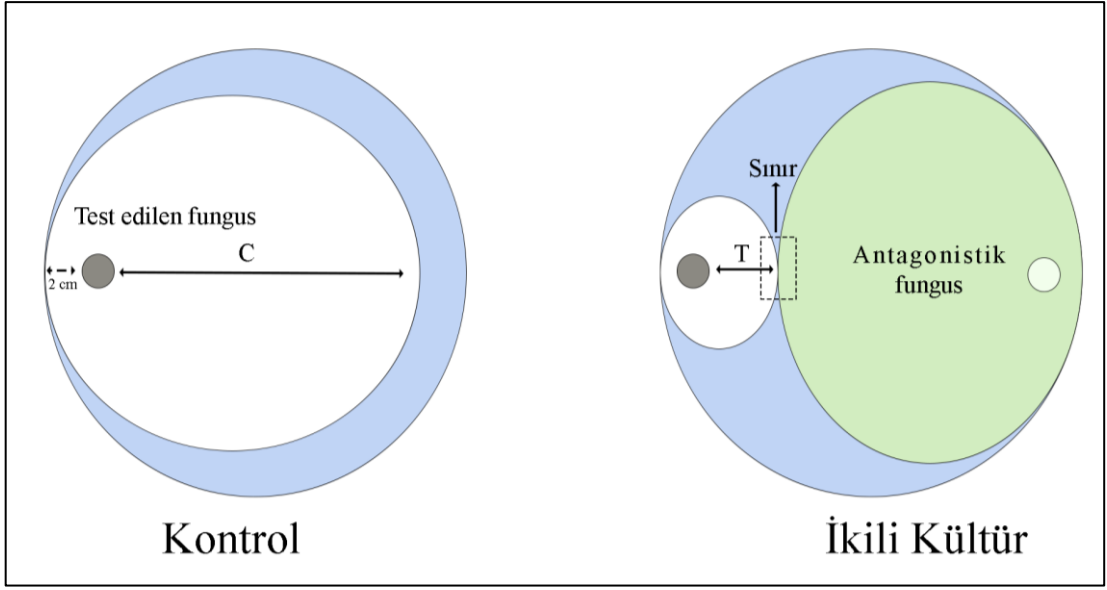


Şekil 3.2. Enzimatik indeks tayini için koloni çapı ve berrak zon çapının ölçümü

EI'nin istatistiksel analizi Jamovi versiyon 2.5.4 kullanılarak ANOVA ve Tukey HSD testi ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.8 *Beauveria bassiana*'nın mikrobiyal biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılan funguslara ve farklı fitopatojenik funguslara karşı antagonistik etkinliği gözlemlenmesi ve hesaplanması

Fokkema Fokkema (1978), tarafından uygulanan, ikili kültür tekniği kullanılarak PDA içeren petri plakları üzerine yerleştirilerek araştırılmıştır. Petri plaklarında gelişen *B. bassiana* diski (6 mm çapında) alınarak PDA içeren sterilize petri kabının kenarından 1 cm uzaklıkta yerleştirilmiştir. Eş zamanlı olarak aynı petri kabının tam karşısına tek bir fitopatojenik fungus izolatlarına ait disk (6 mm çapında) alınarak besiyerinin kenarından 1 cm uzaklıkta olacak şekilde yerleştirilmiştir. Besiyeri $27\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 192 saat inkübe edilmiştir. Aynı şekilde petri plaklarında gelişen *B. bassiana* diski (6 mm çapında) alınarak PDA içeren sterilize petri kabının kenarından 1 cm uzaklıkta yerleştirilmiştir. Eş zamanlı olarak aynı petri kabının tam karşısına tek bir *Trichoderma* türleri ve *C. rosea* ait disk (6 mm çapında) alınarak besiyerinin kenarından 1 cm uzaklıkta olacak şekilde yerleştirilmiştir. Besiyeri $27\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 192 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. İkili kültür yöntemi ile misel inhibisyon oranının belirlenmesi

Doğrusal büyüme inhibisyonu yüzdesi, test patojenlerinin misel büyümesinin inhibisyon yüzdesi büyümesinin ortam yüzeyini tamamen kapladığı zaman Vincent Vincent (1947) tarafından verilen aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$PI\% = \frac{C - T}{C} \times 100$$

PI = Doğrusal büyümenin inhibisyon yüzdesi.

C = Kontrol kaplarında aşılama noktasından patojen büyümesinin (cm olarak ölçülür) ortalama mesafesi.

T = Antagonist yönünde muamele edilmiş tabaklarda aşılama noktasından koloni sınırlarına patojen büyümesinin ortalama mesafesi (cm olarak ölçülür).

BÖLÜM IV

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Fungusların Morfolojik Tanımlanması

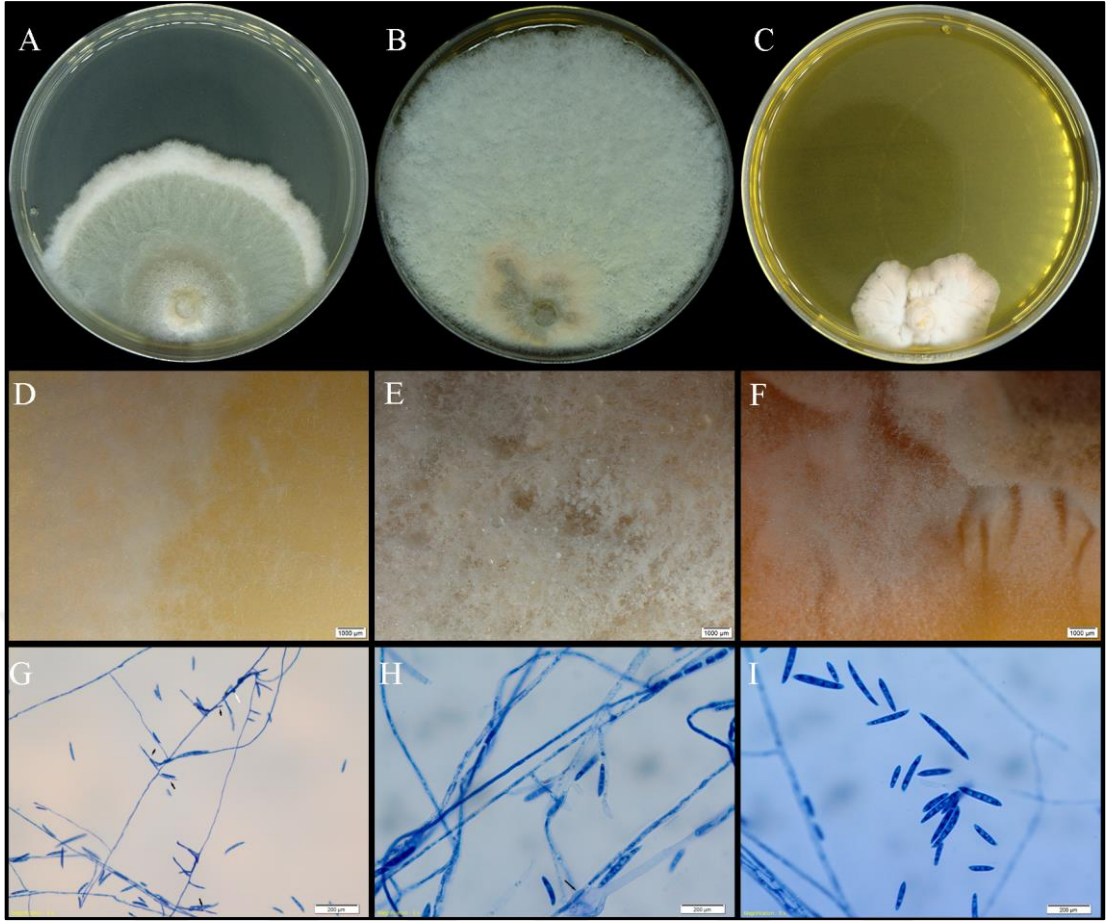
Test edilen tüm izolatların morfolojik özellikleri incelenmiş ve PDA, MEA ve SDA ortamlarında 27 ± 1 °C'de 7 günlük inkübasyon sonrası büyüme ve renk parametreleri açısından analiz edilmiştir.

4.1.1 Fitopatojenik fungusların morfolojik tanımlaması

Fusarium equiseti

Makroskobik özellikler, *F. equiseti*'nin misellerinin rengi soluk beyazdan turuncuya kadar değişebilmektedir. Başlangıçta koloniler şeffaf pamuksu bir görünüm sergilerken, yedinci günün sonunda açık turuncu pigmentasyona sahip kolonilerin olduğu gözlemlenmektedir. Mikroskobik gözlemler sonucunda miselyumun düz, dallanmış, silindirik ve septalı olduğu, konidoforlar silindirik, uzun, düz ve septalı olduğu, mikrokonidialar yuvarlaktan oval şekillinde, makrokonidialar kıvrımlı, konik ve uzun şeklinde olduğu ve misel üzerinde klamidosporların olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.).

F. equiseti'nin makroskobik tanımlaması ve mikroskobik incelemeler de miselyum, konidiofor, klamidospor oluşumları ve makrokonidia ve mikrokonidia yapısal özellikleri açısından ele alındığında bu çalışmada, Hami vd. (2021) çalışmasında da benzer bulgulara sahipken Tziros vd. (2022)'nin çalışmasında koloni renginde farklı bulguya rastlanmıştır.

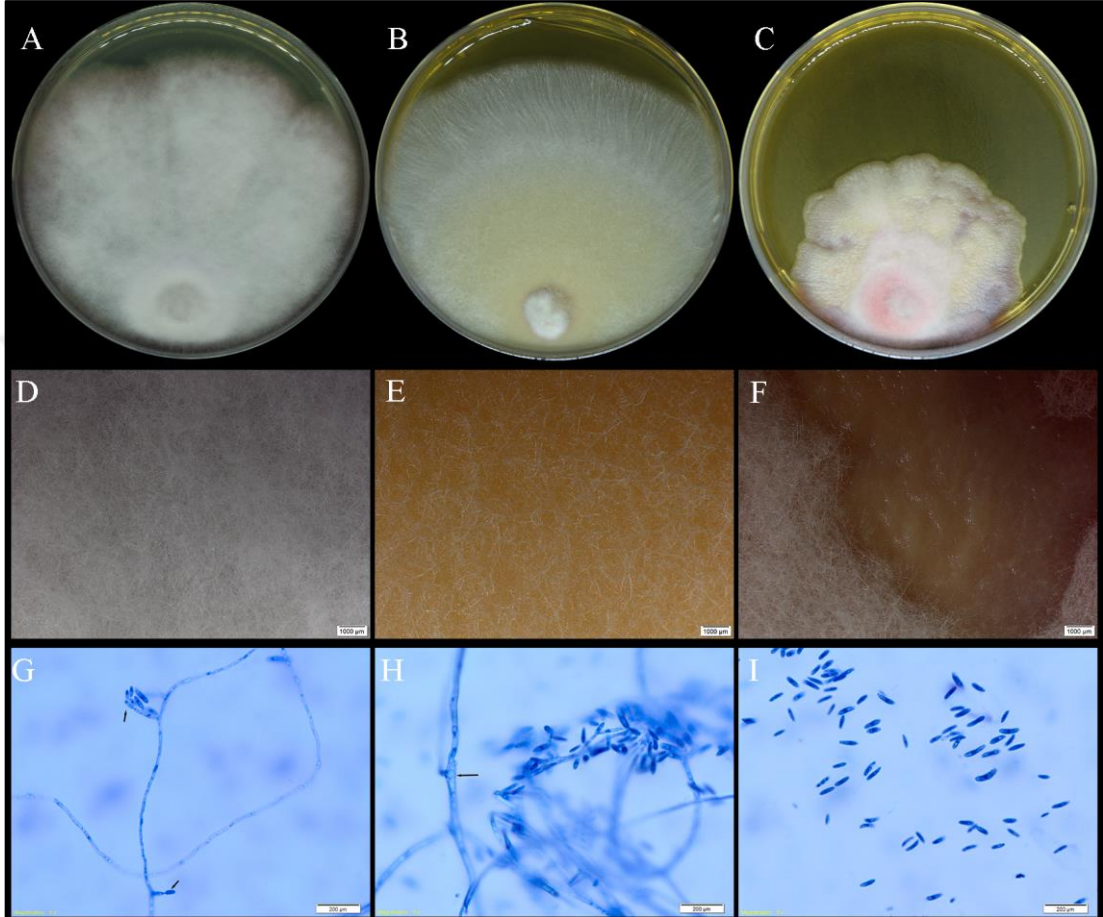


Şekil 4.1. *Fusarium equiseti*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), monofialidlerin uçlarında gelişimin çeşitli aşamalarındaki mikrokonidiler (G), klamidosporlar (H), makrokonidia ve mikrokonidia (I) gösterilmiştir

Fusarium redolens

Makroskobik özellikleri, *F. redolens*'in misellerinin rengi pembeden soluk beyaza kadar değişebilmektedir. Başlangıçta kolonilerin yapısı beyaz pamuksu bir görünüm sergilerken, yedinci günün sonunda koyu pembe pigmentasyona sahip kolonilerin olduğu gözlemlenmektedir. Mikroskobik gözlemler sonucunda miselyumun düz, dallanmış ve septalı olduğu, konidoforlar silindirik, kısa, düz ve septalı olduğu, mikrokonidia yuvarlaktan oval şekillinde olduğu, makrokonidia kısa uçlu, bazal hücreleri yay şekline benzer bir biçimde olduğu ve misel üzerinde klamidosporların olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2.).

F. redolens'in makroskobik tanımlaması, koloni görünümü, rengi, mikroskobik incelemeler de miselyum, konidiofor, klamidospor oluşumu, makrokonidia ve mikrokonidia yapısal özellikleri açısından ele alındığında bu çalışmada (Li vd., 2022; López Moral vd., 2024) çalışmalarına benzer bulguya rastlanmıştır.



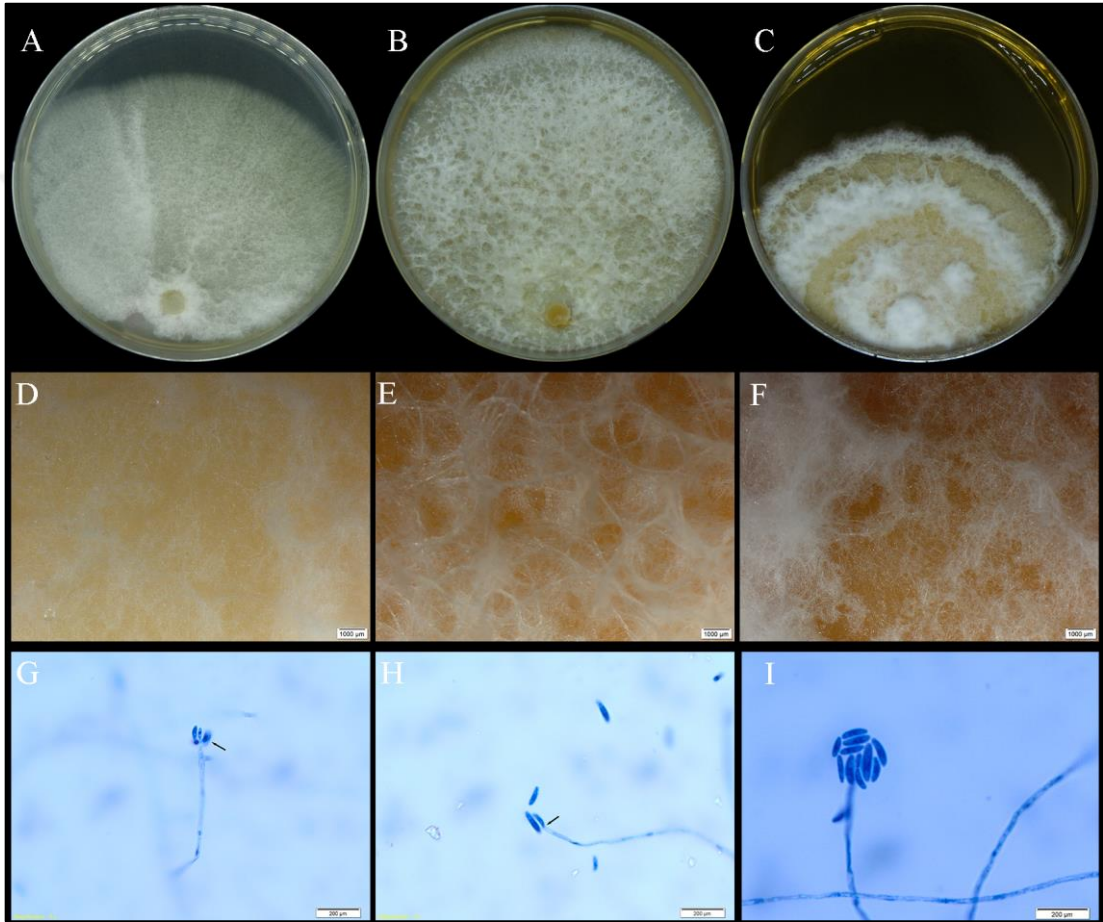
Şekil 4.2. *Fusarium redolens*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), monofialidlerin uçlarında gelişimin çeşitli aşamalarındaki mikrokonidiler (G), klamidosporlar (H), makrokonidia ve mikrokonidia (I), gösterilmiştir

Fusarium soloni

Makroskobik özellikleri, *F.soloni* miselleri kirli beyaz renge sahip olabilmektedir. Başlangıçta koloniler beyaz ve pamuksu bir görünüm sergilerken, yedinci günün sonunda şeffaf krem rengi pigmentasyona sahip kolonilerin olduğu gözlemlenmektedir. Mikroskobik gözlemler sonucunda miselyumun düzgün, dallanmış, silindirik ve septalı olduğunu, konidioforlar silindirik, kısa, yalın ve septalı olduğunu, mikrokonidialar,

yuvarlaktan, oval şekilde olduğu, makrokonidialar kısa uçlu, bazal hücreleri yay şeklinde olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.3.).

Bu çalışmada, *F. solani*'nin makroskopik ve mikroskopik incelemeler açısından ele alındığında, Summerbell Summerbell (2003)'in yapmış olduğu çalışmada benzer bulgulara sahip olduğu, Hami vd. Hami vd. (2021) 'un yapmış olduğu çalışmada ise mikroskopik incelemelerde farklı bulguya rastlandığı görülmektedir.



Şekil 4.3. *Fusarium solani*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), mikrokonidiaların üretildiği ve biriktiği fiyalidler (G), monofialidlerin uçlarında gelişimin çeşitli aşamalarındaki mikrokonidiler (H), makrokonidialar (I) gösterilmiştir

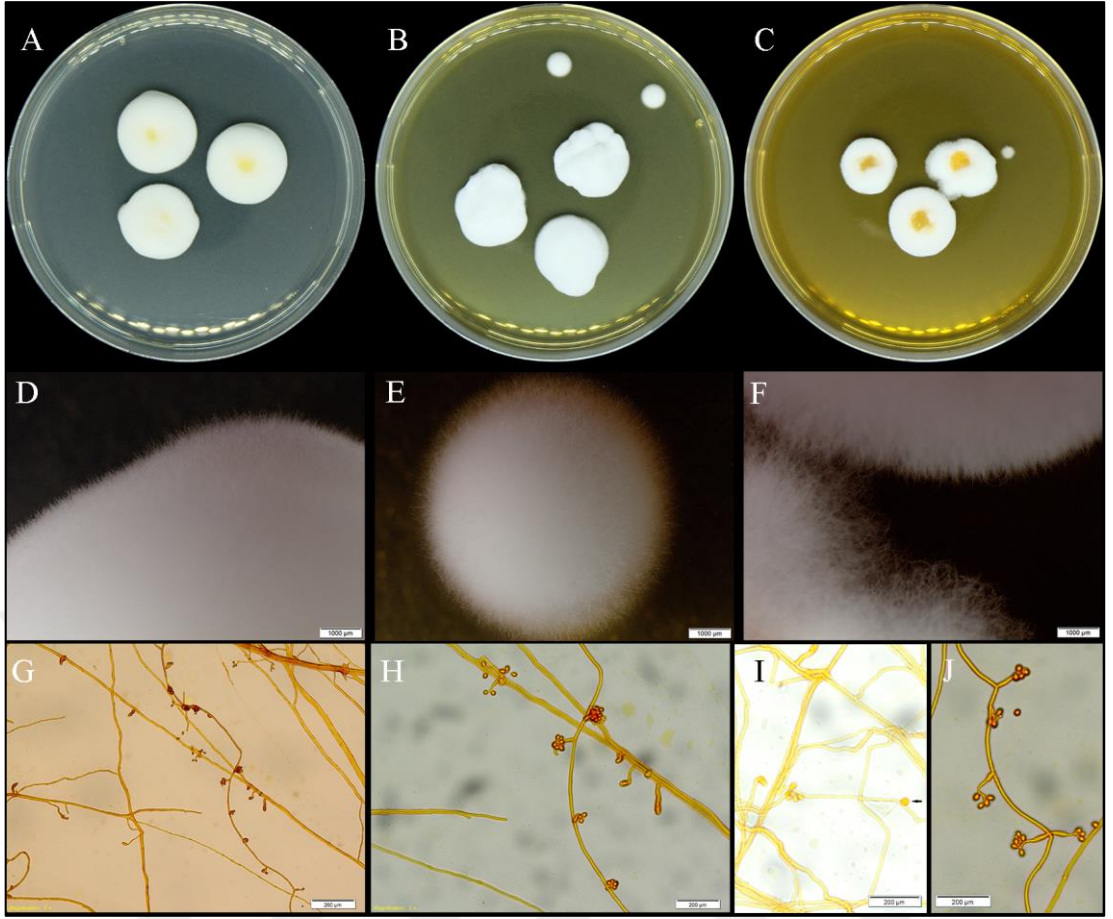
4.1.2 Mikrobiyal biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılan fungus izolatlarının morfolojik tanımlaması

Beauveria bassiana

Makroskobik olarak, *B. bassiana* başlangıçta beyaz görünmekte, kolonilerin dokusu kabarık veya pamuksu bir görünüm sergilemekte, ancak zamanla toz beyaz, krem ve açık sarı tonlarında pigmentasyona sahip koloniler oluşturduğu görülmektedir. *B. bassiana* izolâtının büyüme şekli düzensizden dairesel ve bombeye kadar geniş bir çeşitlilik göstermiştir. Mikroskobik gözlemler sonucunda *B. bassiana*'nın miselyumu septalı, hifleri ince yarı saydam veya soluk renklidir, konidioforlar dallıdır ve doğrudan miselyumdan çıkmakta, hiflerin uçlarında konidya kümeleri tek hücreli oval ve silindirik şekilde, böcek kütiküllerine tutunmasına yardımcı olan 'appressoria' adı verilen yapıların bulunduğu ve koloniler, konidia ve misel üretimi nedeniyle genellikle tozlu bir dokuya sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.4.).

B. bassiana makroskobik ve mikroskobik özellikleri, büyüme şeklini, büyüme formunu, koloni şeklini, dokusunu, pigmentasyonu ve koloni yüksekliği açısından ele alındığında (Barnett ve Hunter, 1998; Farida vd., 2018; Norjmaa vd., 2019) çalışmalarına benzer bulgular elde edilmiştir, Kulu vd. Kulu vd. (2015)'un farklı olarak, kolonilerin sert yüzeyli, kabarık dokulu ve bombeli şekilde geliştikleri gözlemlenmiştir.

Topraktan ve böcekten izole edilen *B.bassiana*'nın fenotipik özellikleri, koloninin yüzeyine ve yüksekliği açısından ele alındığında bu çalışmada Suharto vd. Suharto ve Purnomo (1998) koloni yüzeyinde farklılıklar belirlenmişken, Afandhi vd. Affandi vd. (2013) çalışmasında da benzer bulgulara rastlanmıştır.



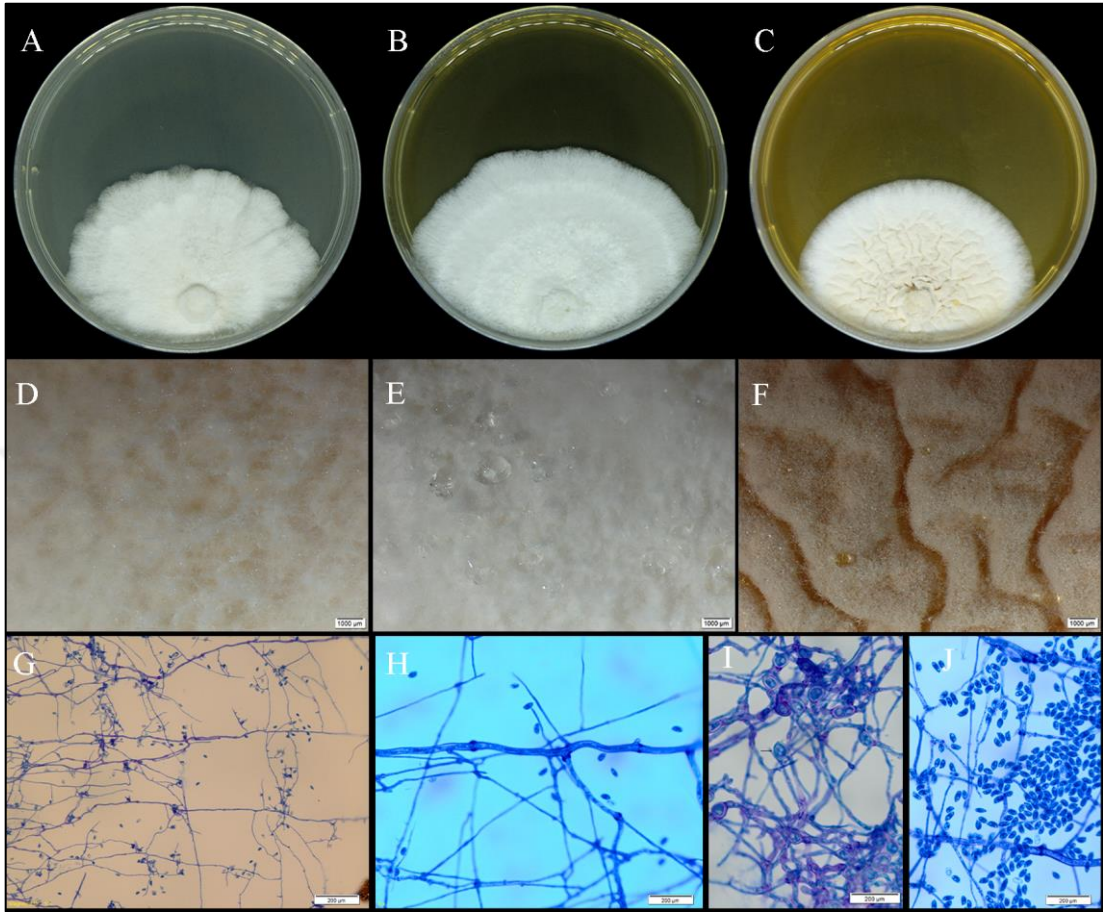
Şekil 4.4. *B. bassiana*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), miselyum ve hiflerin detayları (G), konidioforların ve fialidlerin detayları (H) klamidospor (I), konidioforlar üzerinde kümelenmiş konidialar (J) gösterilmiştir

Clonostachys rosea

Makroskobik olarak, *C. rosea* miseller başlangıçta kremi bir renkte görünmekte, kolonilerin dokusu pütürlü ve pamuksu bir görünüm sergilemekte, yedinci günde koyu sarıdan toz pembeye kadar değişen bir pigmentasyona sahip koloniler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Mikroskobik gözlemler sonucunda, *C. rosea*'nın hifleri septalı, konidioforlar dik, dallanmış ve uçlarında konidia bulundurduğu ve konidiaları oval ile elipsoit benzeri bir şekilde olduğu ve miselyumların üzerinde klamidosporların olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.5.).

C. rosea'nın makroskobik tanımlaması, koloni görünümü, pigmentasyonu ve mikroskobik incelemeleri miselyum, konidiofor, klamidospor oluşumları, konidia yapısal özellikleri ve koloni özellikleri açıdan ele alındığında bu çalışmada, Wang vd. Wang vd.

(2023) çalışmasında da benzer bulgulara sahipken, Anwar vd. (2018)'un çalışmasında pigmentasyonun değişmesiyle birlikte farklı bulgulara rastlanmıştır.



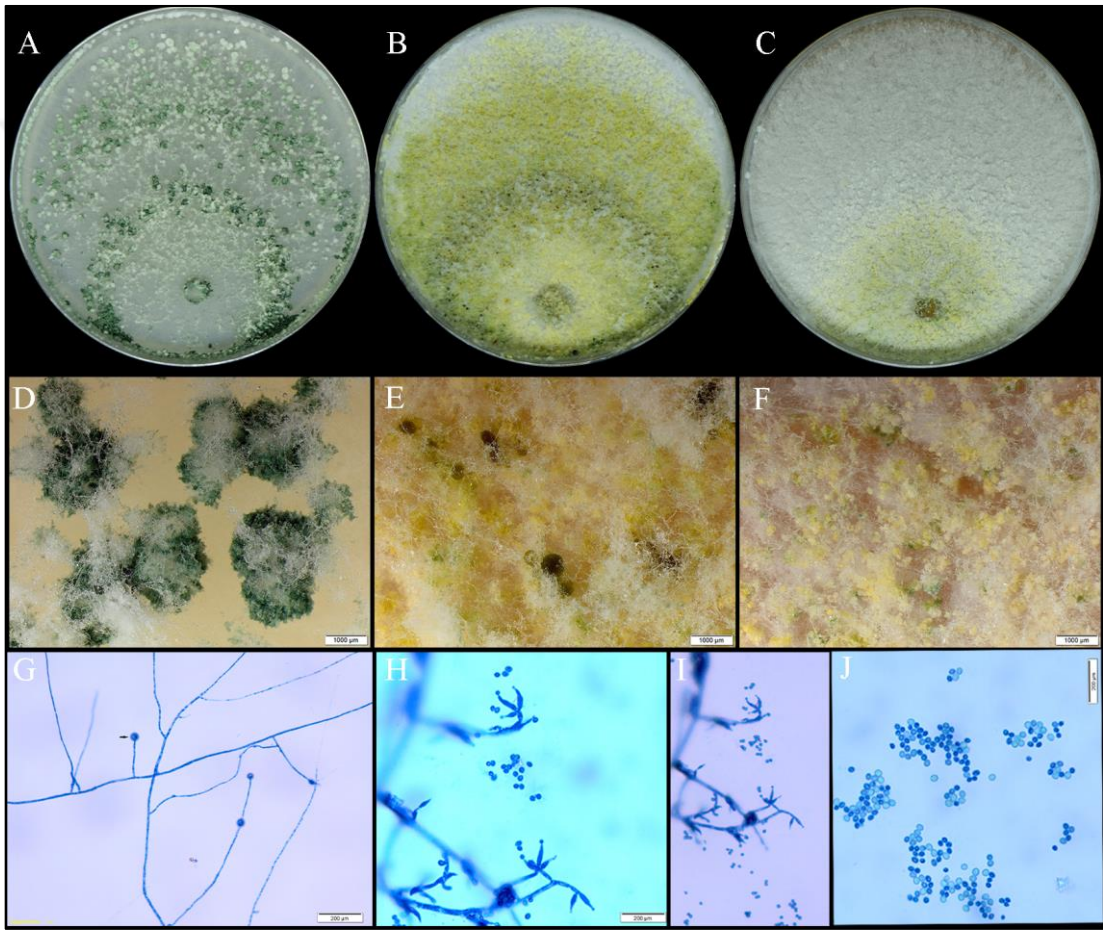
Şekil 4.5. *Clonostachys rosea*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloniler (D, E, F), miselyumun detayları (G), hiflerin detayları (H), klamidosporlar (I), konidia (J) gösterilmiştir

Trichoderma asperellum

Makroskobik olarak, *T. asperellum* kolonileri karakteristik olarak hızlı bir gelişim göstermekte ve substrat üzerinde hızla yayılarak tüysü misellere sahip koloniler oluşturduğu, kolonilerin renkleri değişebilir, ancak genellikle beyazdan sarıya, açık yeşil ile koyu yeşil tonlarına kadar değişen pigmentasyona sahip kolonilerin olduğu gözlemlenmiştir. Mikroskobik gözlemler, *T. asperellum*'un hiflerinin septalı ve dallanmış olduğunu, konidioforların püstüller halinde dallandığını, fiyalid uçlarında kümeler halinde konidyum bulduğu, konidiaların çok sayıda üretildiğini ve yarı saydam, oval ile

elipsoit arasında bir şekle sahip olduğu ve miselyumların üzerinde klamidosporların olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.6.).

T. asperellum'un makroskopik ve mikroskopik özellikleri açısından ele alındığında bu çalışmalarda (Ma vd., 2023; Moussa vd., 2023; Mulatu vd., 2022; Ortiz García vd., 2015; Sebumpun vd., 2022; Siddiquee, 2017) koloni görünümü, koloni dokusunu, pigmentasyonu, hif, miselyum, konidiofor, klamidospor oluşumu ve konidiaların yapısal özellikleri açısından elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.



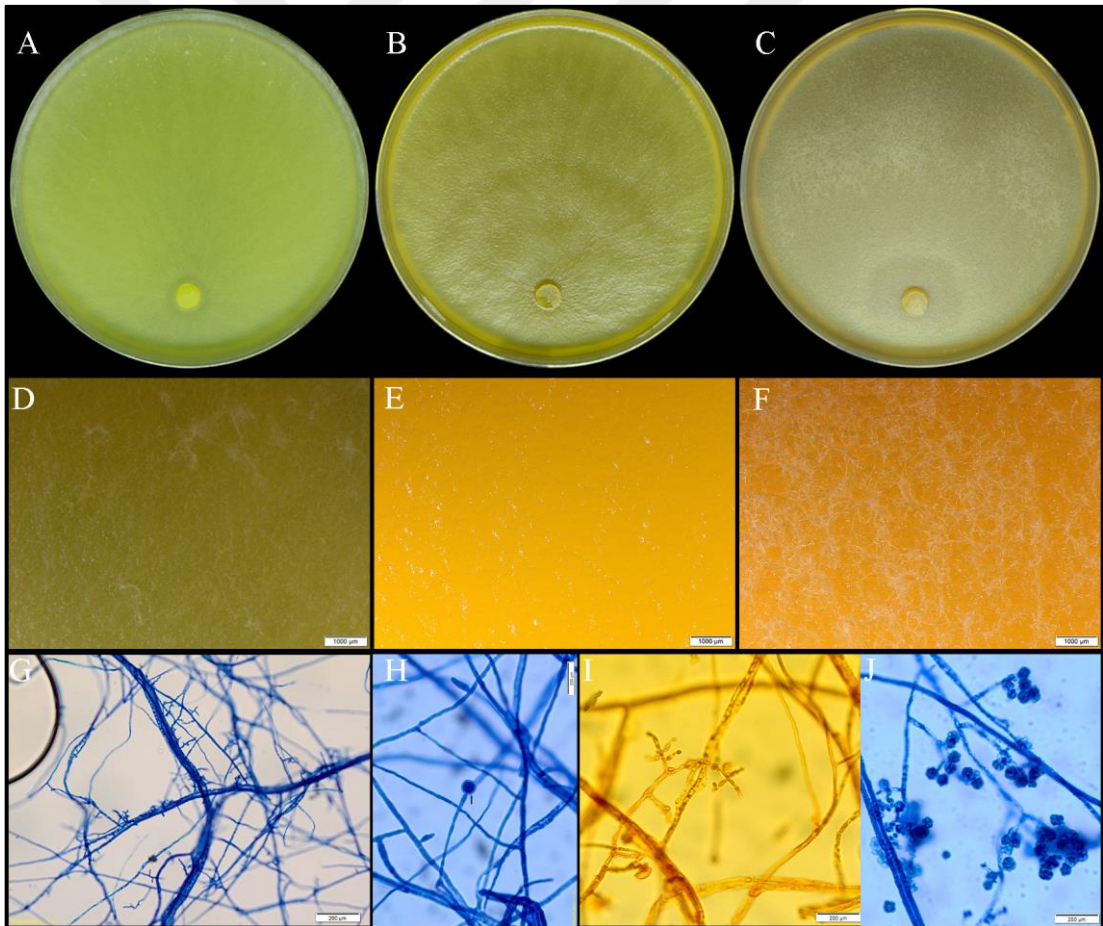
Şekil 4.6. *Trichoderma asperellum*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), klamidosporlar (G), konidioforların ve fialidlerin detayları (H), fialidlerin üzerinde kümelenmiş konidialar (I), konidia (J) gösterilmiştir

Trichoderma citrinoviride

Makroskopik olarak, *T. citrinoviride* kolonileri karakteristik olarak hızlı bir gelişim göstermekte ve substrat üzerinde hızla yayılarak hafif pütürlü pamuksu misellere sahip

koloniler oluşturduğu, beyazdan soluk sarıya kadar değişen bir pigmentasyona sahip kolonilerin olduğu gözlemlenmiştir. Mikroskopik gözlemler, *T.citrinoviride* hiflerinin septalı olduğunu ve karmaşık bir ağ oluşturacak şekilde dallandığını, konidioforlar dallanarak püstüller halinde olduğu, fialid uçlarında kümeler halinde konidium bulunduğu, konidiaların çok sayıda üretildiğini ve elipsoit ile yuvarlak arasında bir şekle sahip olduğu ve miselyumların üzerinde klamidosporelerin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.7.).

T. citrinoviride'in makroskopik tanımlaması, koloni görünümü, pigmentasyonu, mikroskopik incelemelerde hif, miselyum, konidiofor, klamidospore oluşumu ve konidiaların yapısal özellikleri açısından ele alındığında bu çalışmaların, (Fan vd., 2020; Gezgin vd., 2023; Mulatu vd., 2022) sonuçları ile benzer bulgulara rastlanmıştır.

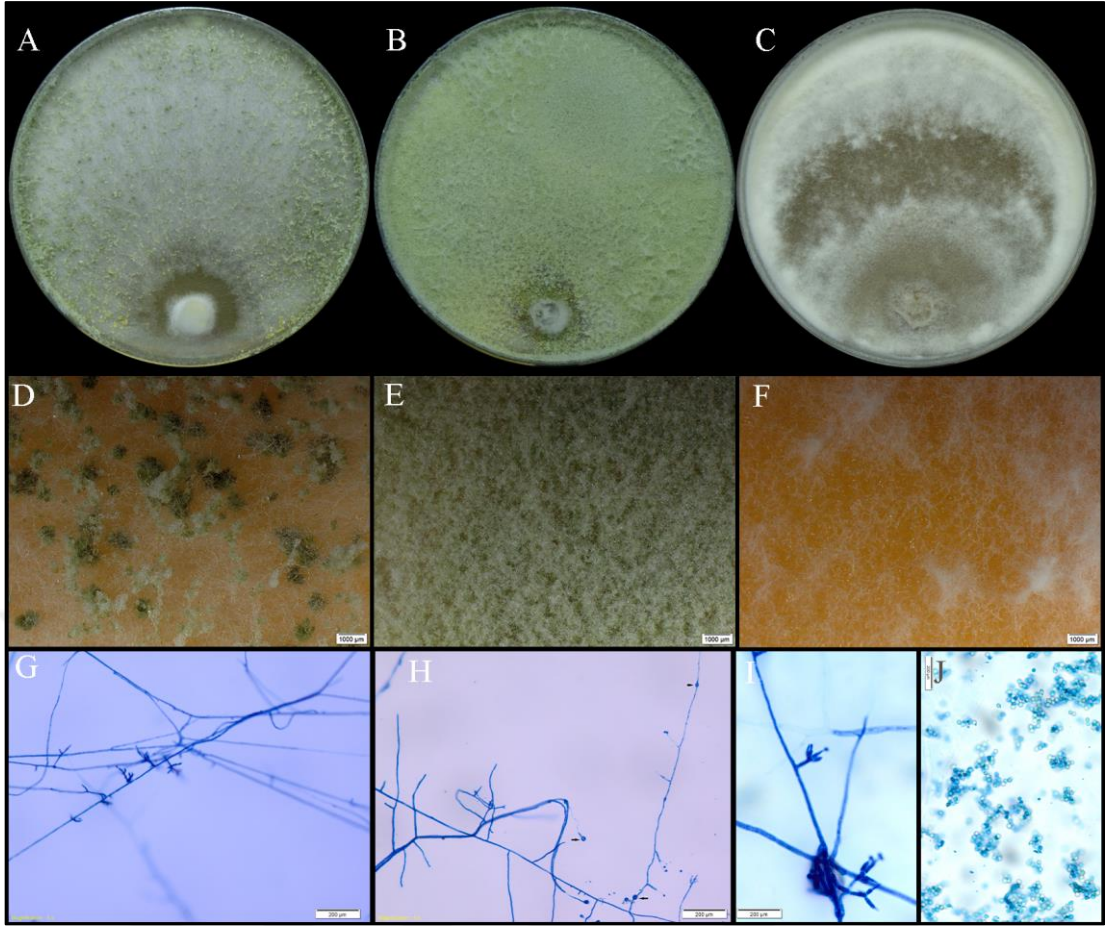


Şekil 4.7. *Trichoderma citrinoviride*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), miselyum ve hiflerin detayları (G), klamidospore (H), konidioforların ve fialidlerin detayları (I), konidioforlar üzerinde kümelenmiş konidialar (J) gösterilmiştir

Trichoderma harzianum

Makroskobik olarak, *T. harzianum* kolonileri karakteristik olarak hızlı bir gelişim göstermekte ve substrat üzerinde hızla yayılarak pamuksu misellere sahip koloniler oluşturduğu, beyazdan sarının ile yeşilin tonlarına kadar değişen renklerde pigmentasyona sahip kolonilerin olduğu gözlemlenmiştir. Mikroskobik gözlemler, *T. harzianum*'un hiflerinin hiflerinin septalı ve dallanmış olduğunu, konidioforların püstüller halinde dallandığını, fialid uçlarında kümeler halinde konidyum bulunduğu, konidiaların çok sayıda üretildiğini ve tek hücreli, yuvarlak ile elipsoit arasında bir şekle sahip olduğu ve miselyumların üzerinde klamidosporların olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.8.).

Bu çalışmada, *T. harzianum*'un makroskobik tanımlaması, koloni görünümü, koloni pigmentasyonu özelliklerini açısından, mikroskobik incelemelerinde miselyum, hif, konidyofor, fialid, klamidospor oluşumu ve konidiaların yapısal özellikleri açısından değerlendirilerek elde edilen sonuçlar, araştırmacılar tarafından yürütülen çalışmaların (De Padua ve dela Cruz, 2021; Mulatu vd., 2022; Siddiquee, 2017), sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

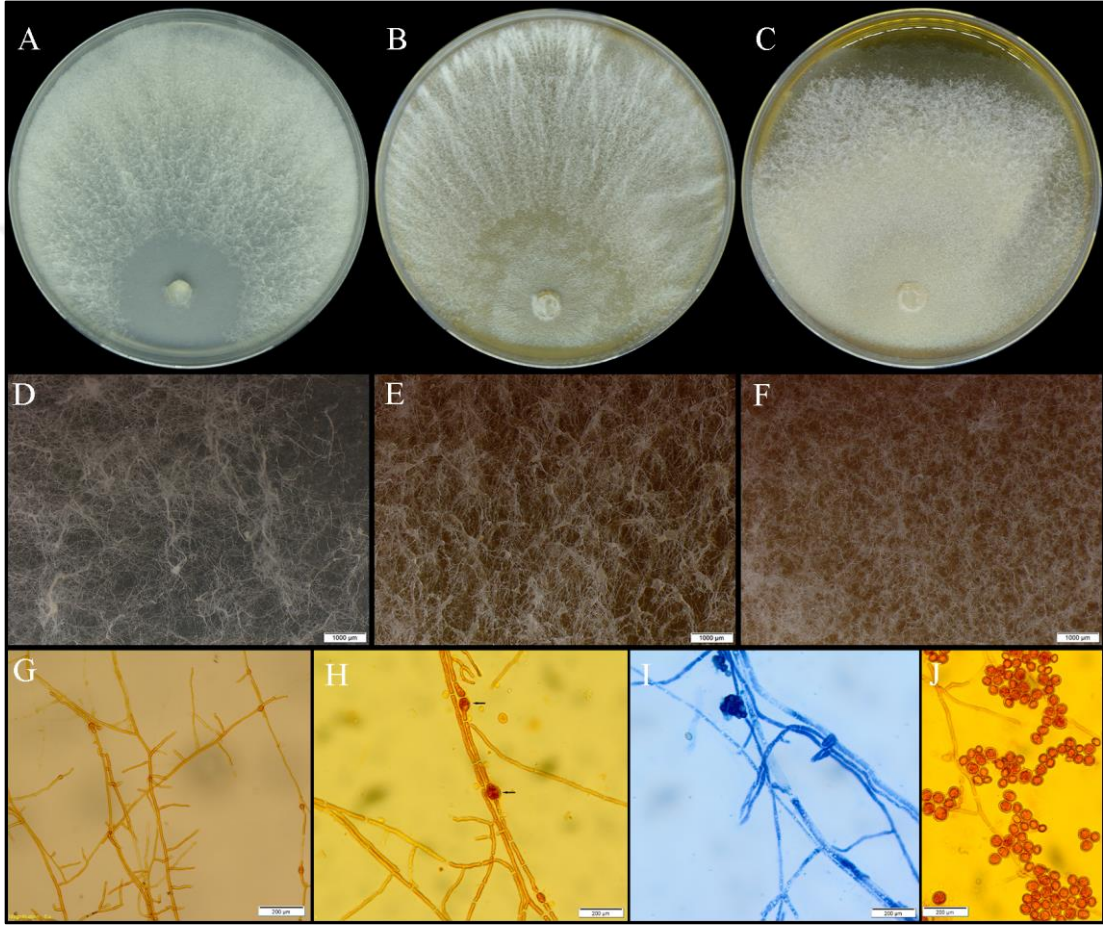


Şekil 4.8. *Trichoderma harzianum*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), miselyum ve hiflerin detayları (G), klamidospor (H), konidioforların ve fialidlerin detayları (I), konidialar (J) gösterilmiştir

Trichoderma koningiopsis

Makroskobik olarak, *T. koningiopsis* kolonileri karakteristik olarak hızlı bir gelişim göstermekte ve substrat üzerinde hızla yayılarak kadifemsi misellere sahip koloniler oluşturduğu, kolonilerin rengi beyaz, krem ile açık yeşile kadar değişen renklerde pigmentasyona sahip koloniler olduğu gözlemlenmiştir. Mikroskobik gözlemler, *T. koningiopsis* septalı hiflerinin septalı, dallanmış ve ağaç benzeri bir görünümde olduğu, konidioforların püstüller halinde dallandığını, konidioforlar tek ya da kümeler halinde olduğu, fialid uçlarında kümeler halinde konidyum bulduğu, konidiaların çok sayıda üretildiğini ve büyük yuvarlak ile elipsoit arasında bir şekle sahip olduğu ve miselyumların üzerinde klamidosporların olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.9.).

Bu çalışmada *T. koningiopsis*'in mikroskopik incelemelerde miselyum, hif, konidiofor, klamidospor oluşumu ve konidiaların yapısal özellikleri makroskopik tanımlaması, koloni görünümü, dokusu, pigmentasyonu açısından değerlendirilerek elde edilen bulgular, araştırmacılar tarafından yürütülen çalışmaların, (Mulatu vd., 2022; Ortiz García vd., 2015; Siddiquee, 2017), sonuçları ile karşılaştırıldığında tamamen benzerlik göstermektedir.



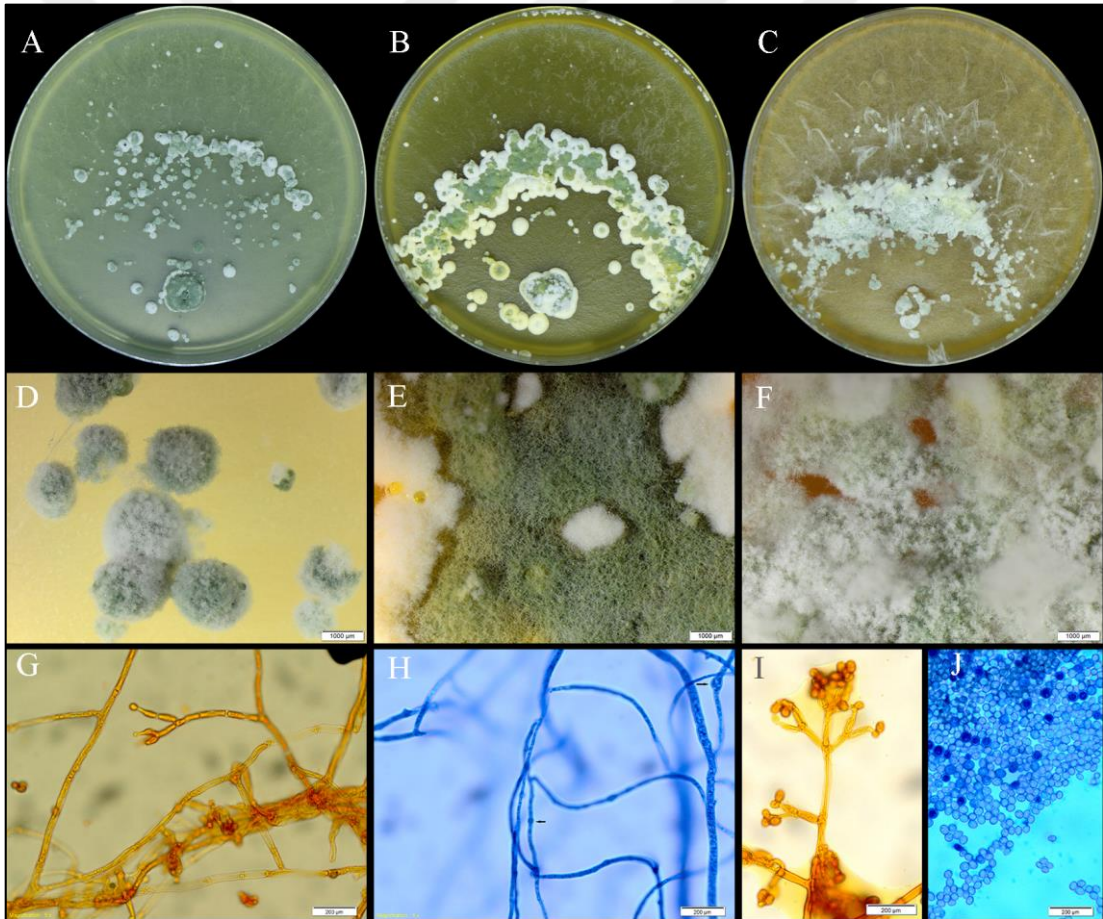
Şekil 4.9. *Trichoderma koningiopsis*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), miselyum ve hiflerin detayları (G), klamidospor (H), konidiofor (I), konidialar (J) gösterilmiştir

Trichoderma longibrachiatum

Makroskopik olarak *T. longibrachiatum* kolonileri karakteristik olarak hızlı bir gelişim göstermekte ve substrat üzerinde hızla yayılarak hava miselyumunun varlığı nedeniyle genellikle kabarık veya pamuksu misellere sahip koloniler oluşturduğu, kolonilerin rengi sarıdan kreme ile yeşilin tonlarına kadar değişen renklerde pigmentasyona sahip

kolonilerin olduğu gözlemlenmiştir. Mikroskopik gözlemler, *T. longibrachiatum* hiflerinin septalı ve dallanmış olduğunu, konidioforlar uzun ve püstüller halinde dallandığını, fiyalid uçlarında kümeler halinde konidyum bulduğunu, konidiaların çok sayıda üretildiğini ve elipsoit ile yuvarlak arasında bir şekle sahip olduğunu ve miselyumların üzerinde klamidosporelerin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.10.).

Bu çalışmada *T. longibrachiatum*'un makroskopik tanımlaması, koloni görünümü, dokusunu, pigmentasyonu ve mikroskopik incelemelerde hif, miselyum, konidiofor, klamidospore oluşumu ve konidiaların yapısal özellikleri açısından değerlendirilerek elde edilen sonuçlar, literatürde bulunan çalışmalarda (Mulatu vd., 2022; Siddiquee, 2017), bu çalışmaların sonuçları ile elde edilen sonuçlar bakımından benzerlik göstermektedir.

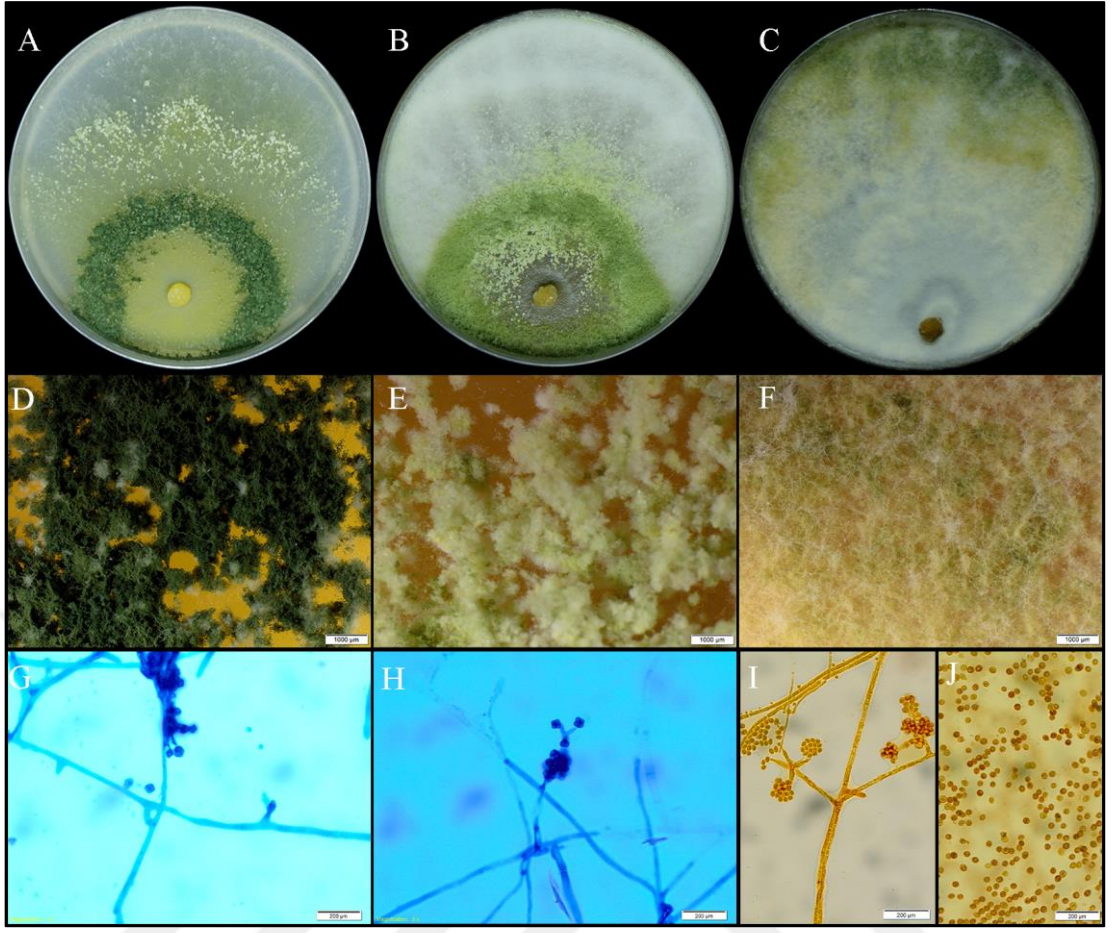


Şekil 4.10. *Trichoderma longibrachiatum*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), miselyum ve hiflerin detayları (G), klamidospore (H), konidioforların ve fiyalidlerin detayları (I), konidialar (J) gösterilmiştir

Trichoderma pleuroticola

Makroskobik olarak, *T. pleuroticola* kolonileri karakteristik olarak hızlı bir gelişim göstermekte ve substrat üzerinde hızla yayılarak yünümsü misellere sahip koloniler oluşturduğu, yeşilin tonları arasında değişen renklerde pigmentasyona sahip koloniler olduğu gözlemlenmiştir. Mikroskobik gözlemler, *T. pleuroticola*'nın hiflerinin septalı ve dallanmış olduğunu, konidioforların püstüller halinde dallandığını, fiyalid uçlarında kümeler halinde konidyum bulduğu, konidiaların çok sayıda üretildiğini ve tek hücreli yuvarlak ile elipsoit arasında bir şekle sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.11.).

Ortiz García vd. Ortiz García vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada *T. pleuroticola*'nın mikroskobik incelemelerde miselyum, hif, konidiofor, klamidospor oluşumu ve konidiaların yapısal özellikleri, makroskobik tanımlaması, koloni görünümü, dokusu, pigmentasyonu açısından değerlendirmişlerdir, makroskobik özellikler benzer olsa da bu çalışmanın aksine, mikroskobik incelemelerde klamidospor oluşumu gözlenmemiştir.

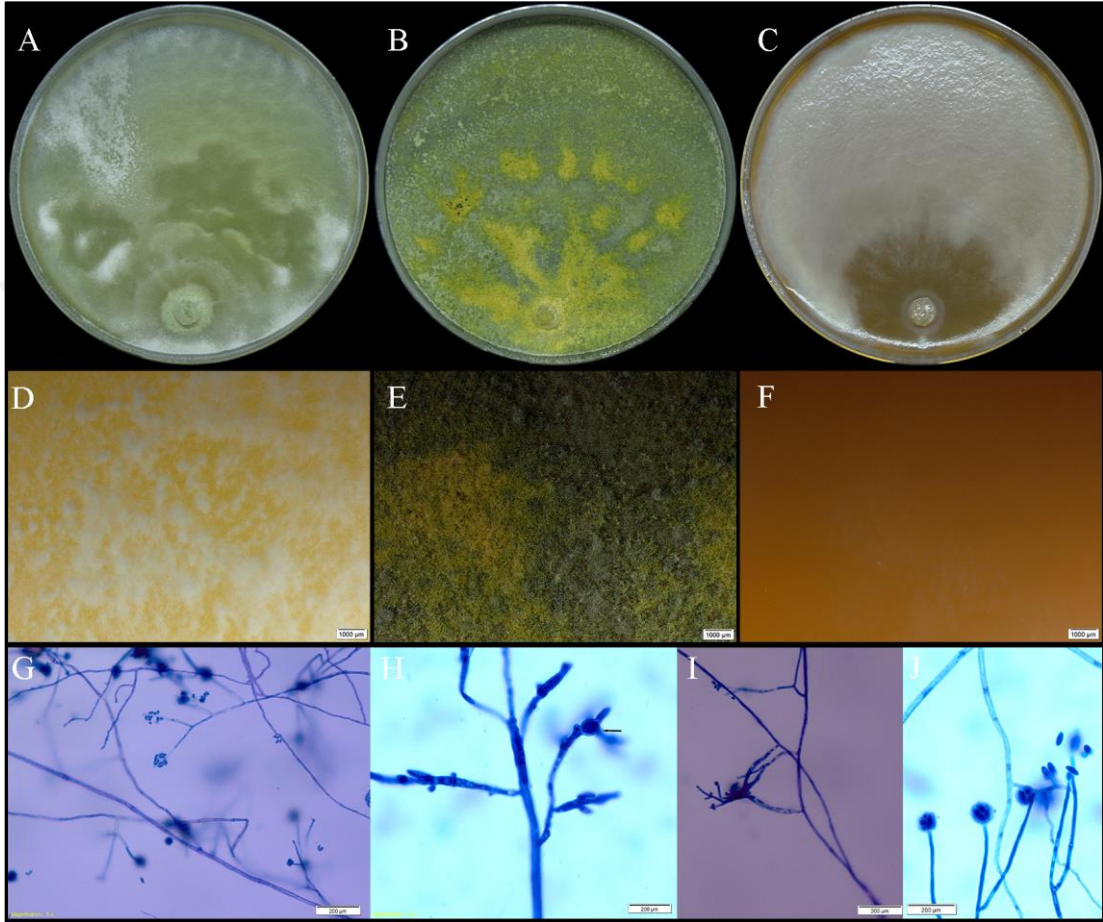


Şekil 4.11. *Trichoderma pleuroticola*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), miselyum ve hiflerin detayları (G), konidioforların ve fialidlerin detayları (H), fialidlerin üzerinde kümelenmiş konidialar (I), konidialar (J) gösterilmiştir

Trichoderma saturnisporum

Makroskobik olarak, *T. saturnisporum* kolonileri karakteristik olarak hızlı bir gelişim göstermekte ve substrat üzerinde hızla yayılarak yumuşak pamuksu misellere sahip koloniler oluşturduğu, kırık beyazda, sarımsı ile yeşilin tonları arasında değişen renklerde pigmentasyona sahip koloniler olduğu gözlemlenmiştir. Mikroskobik gözlemler, *T. saturnisporum*'un hiflerinin septalı ve dallanmış olduğunu, konidioforların püstüller halinde dallandığını, fialid uçlarında kümeler halinde konidyum bulduğunu, konidiaların çok sayıda üretildiğini ve hafif küresel şeklinde olduğunu, ampuliform fialidler ve miselyumların üzerinde klamidosporların olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.12.).

Di  nez Martınez vd. Di  nez Martınez vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada, *T. saturnisporum*'un mikroskopik incelemelerinde ‘apressorium’ benzeri yapılar, penetrasyon ve konidioforların yapısal özellikler açısından değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın farklı olarak, mikroskopik incelemelerde ‘apressorium’ oluşumları ve penetrasyon yapıları gözlenmemiştir.



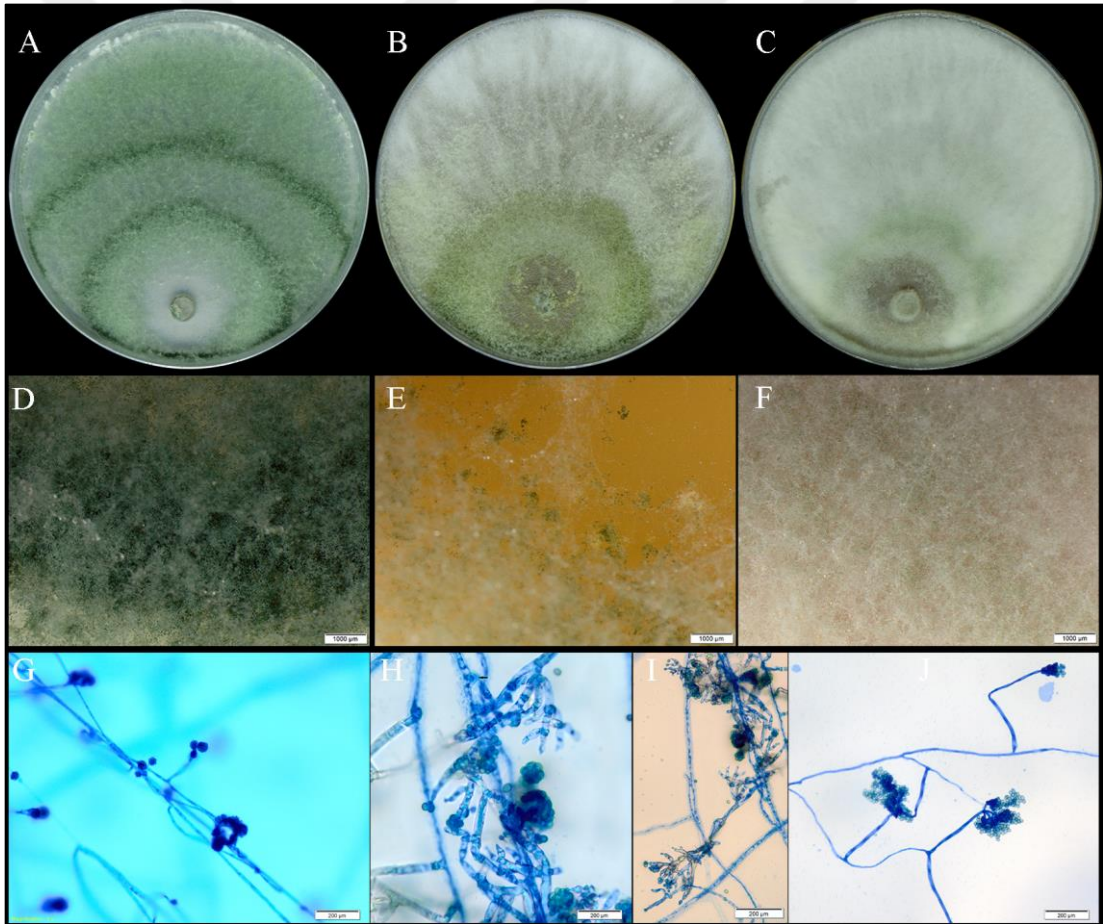
şekil 4.12. *Trichoderma saturnisporum*, PDA   zerinde (A), MEA   zerinde (B), SDA   zerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), miselyum ve hiflerin detayları (G), klamidospor (H), konidioforların ve fialidlerin detayları (I), konidioforlar üzerinde kümelenmiş konidialar (J) gösterilmiştir

Trichoderma virens

Makroskopik olarak, *T. virens* kolonileri karakteristik olarak hızlı bir gelişim göstermekte ve substrat üzerinde hızla yayılarak pamuksu veya yönlü misellere sahip koloniler oluşturduğu, kolonilerin renkleri beyazdan açık yeşile veya sarımsı yeşile kadar değişen renklerde pigmentasyona sahip koloniler olduğu gözlemlenmiştir. Mikroskopik

gözlemler, *T. virens*'in hiflerinin septatlı olduğunu, hiflerin ince, dallanmış ve esnek olduğunu, konidioforlar dik ve püstüller halinde dallandığını, fialid uçlarında kümeler halinde konidyum bulduğunu, konidiaların çok sayıda üretildiğini ve elipsoit ile yuvarlak arasında bir şekle sahip olduğunu ve miselyumların üzerinde klamidosporların olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.13.).

De Padua vd. De Padua ve dela Cruz (2021) tarafından yapılan çalışmada, *T. virens*'in mikroskopik incelemelerde konidioforların, fialidlerin ve konidiaların yapısal özellikleri, makroskopik tanımlanması, koloni görünüşü, dokusu, pigmentasyonu açısından değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın bulguları ile elde edilen sonuçlar benzerlik göstermektedir.

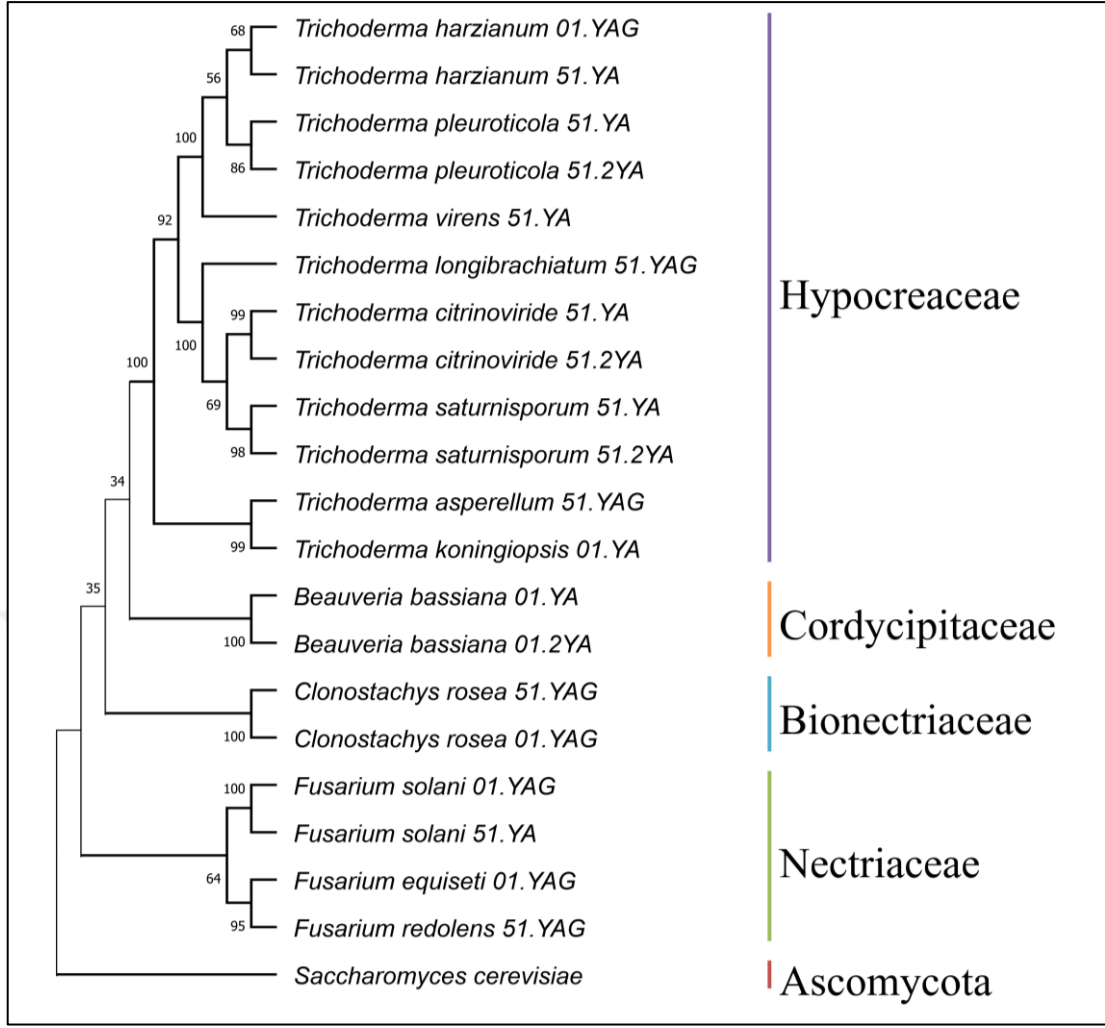


Şekil 4.13. *Trichoderma virens*, PDA üzerinde (A), MEA üzerinde (B), SDA üzerinde (C) 7 gün sonunda PDA, MEA ve SDA üzerinde stereomikroskop altında gözlemlenen koloni (D, E, F), miselyum ve hiflerin detayları (G), klamidospor (H), konidioforların ve fialidlerin detayları (I), konidioforlar üzerinde kümelenmiş konidialar (J) gösterilmiştir

4.2 Filogenetik Analizleri

Farklı türlerin korunmuş gen bölgelerinin dizileri arasındaki farklılıklar, söz konusu türlerin tanımlanmasında bir araç görevi görmektedir. Biyolojik çeşitliliğin ve türlerin belirlenmesi için korunmuş DNA bölgelerinin kullanılması, DNA barkod yönteminin temeli olan tür düzeyinde net bir ayrım sağlamaktadır (Gezgin vd., 2023).

Türler arasında korunmuş olan ve dizilerinin diğer genlere göre daha az farklılıklar oluşturması sebebiyle ITS bölgeleri kullanılmıştır. Bu bölgelerden elde edilen PCR ürünleri dizilenmesi sonrası elde edilen genomik DNA dizileri hizalanmıştır. Hizalanan diziler arasında tür içi ve arası evrimsel ilişkiyi anlamak adına filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Dış grup olarak Ascomycota üyesi *S. cerevisiae* eklenmiştir. Bu filogenetik ağacın karşılaştırılması sonucunda Hypocreaceae cinsine ait *Trichoderma* türleri yüksek düzeyde güvenilir (bootstrap değeri 100) bir boğum oluşturarak diğer türlerden ayrılmaktadır (Şekil 4.14.). Benzer şekilde diğer cinslere ait gruplarda yüksek düzeyde güvenilir (bootstrap değeri 100) bir boğum oluşturarak diğer türlerden ayrılarak ITS bölgelerinin aynı cinse ait türler arasında üzerinde yüksek oranda konsensus olduğu gözlemlenmektedir. Bulgularımızla benzer şekilde (Doolotkeldieva vd., 2019; Silva vd., 2019) *Trichoderma* ve *Beauveria* türlerini benzer şekilde sınıflandırmıştır.



Şekil 4.14. *B. bassiana*, *C. rosea*, *Trichoderma* izolatları ve *Fusarium* izolatlarının internal transcribed spacer (ITS) dizilerine dayanarak bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Ağaç, *B. bassiana*, *C. rosea*, *Trichoderma* izolatları ve *Fusarium* izolatlarının ITS dizilerinden MEGA10 kullanılarak neighbor-joining yöntemi ile oluşturulmuştur

4.3 Antagonizma Potansiyeli Olan Fungus Türlerinin Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, *B. bassiana* 01YA'nın antagonize veya parçalayabilecek hücre dışı enzimler olan amilaz, selülaz, kitinaz ve proteaz üretip üretmediğini belirlemek için petri bazlı enzim deneyleri yapılmış, *C. rosea* 51YAG ve *Trichoderma* izolatlarının enzim üretim düzeyleri açısından değerlendirilmiştir. Bu tez çalışmasında test edilen enzim aktivitelerinin ölçümü, *Trichoderma* izolatları petri plakasını dördüncü günde kapladığından ideal olarak üçüncü günde yapılmıştır. Enzim deneylerinde oluşan boyama

zonları ve renk değişimlerine bağlı olarak test edilen tüm türlerin Enzimatik Indeks (EI) değerleri hesaplanmıştır.

Amilaz aktivitesi

Amilaz, α -1,4-glikozidik bağları parçalayarak karbonhidratların hidrolizini katalize eden enzimdir (Rani, 2012). Funguslar nişastayı büyüme ve sporlaşma süreçleri için birincil enerji kaynağı olarak kullanmakta ve nişastayı hidrolize etmek için amilaz enzimlerini üretmektedir (Fernandes vd., 2012). Lipazlar, proteazlar ve kitinazların aksine, amilazlar entomopatojenik funguslarda patojenik veya virülans faktörleri olarak kategorize edilmemektedir. Bununla birlikte, enzimin genel olarak birçok fungus ve özellikle endofitik organizmalar tarafından üretildiğine dair raporlar bulunmaktadır (Shankar Naik, 2019; Toghueo vd., 2017).

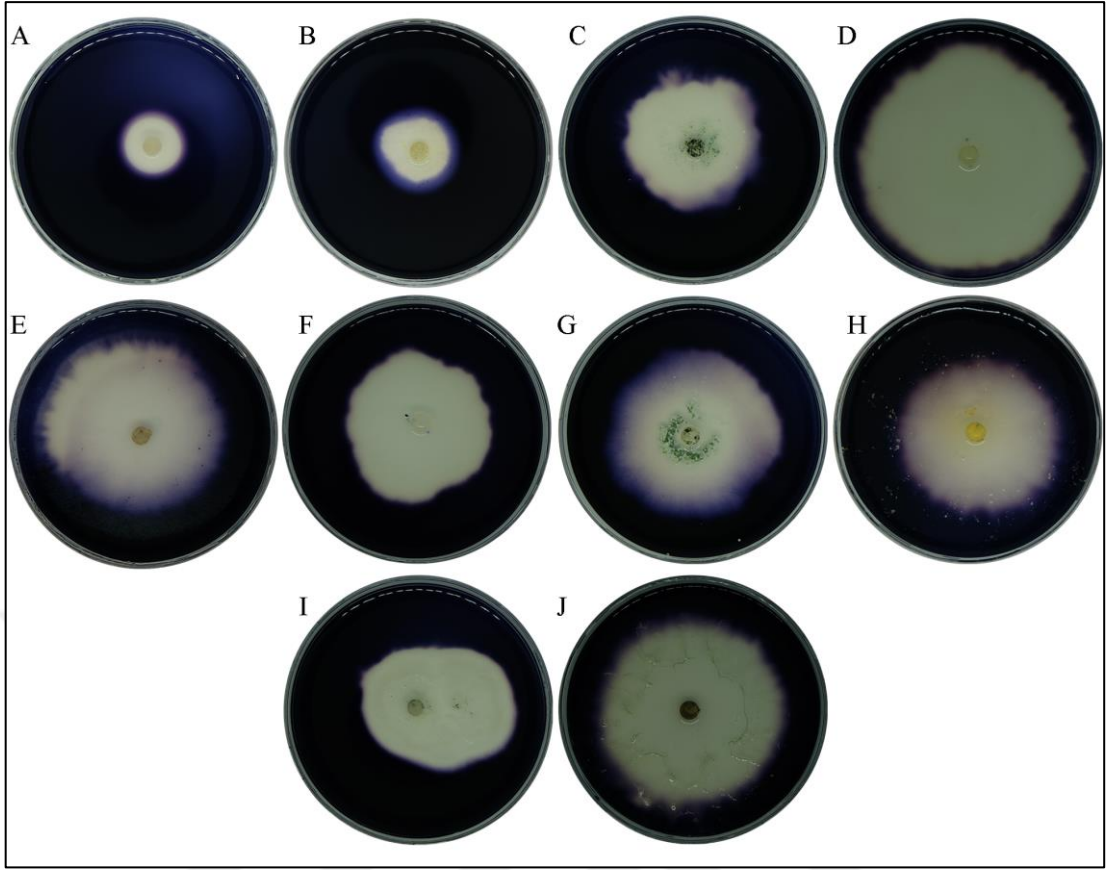
B. bassiana 01YA'nın antagonize etme mekanizmasını anlamak için, hücre dışı α -amilaz enzimi üretimi değerlendirilmiştir. Test edilen fungus izolatlarının amilaz aktivitesinin olduğu tespit edilmiştir. İnkübasyondan sonraki üçüncü günde, petri plakları iyot çözeltisi ile boyandığında, nişastanın hidrolize olduğu bölgelerde yani kolonilerin etrafında şeffaf bir zon görülürken, hidrolize olmayan bölgelerde menekşe mavisi bir renk görülmüştür (Şekil 4.15.). İnkübasyonun üçüncü gününden sonra, test edilen tüm izolatlar α -amilaz üretebilmiştir. Tukey HSD testi, *B. bassiana* 01YA ve *C. rosea* 51YAG 'nın, ayrı bir grup oluşturan diğer fungus suşlarına kıyasla önemli ölçüde daha yüksek amilaz aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. *T. asperellum* 51YAG, *T. harzianum* 51YA, *T. koningiopsis* 51YA, *T. longibrachiatum* 51YAG, *T. saturnisporum* 51YA, *T. virens* 51YA, *T. pleuotocola* 51YA ve *T. citrinoviride* 51YA' nin birbiri aralarında önemli bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.16.). Amilaz için değer aralığı 1.020 ile 1.300 arasındadır ve ortalamalar iki kategoride gruplandırılmıştır. Bu iki kategori "a" (*B. bassiana* 01YA ve *C. rosa* 51 YAG) ve "b" (*Trichoderma* türleri) olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda *B. bassiana* tarafından amilaz enziminin üretildiği ile ilgili konuda, literatürde bulunan birçok çalışmada olduğunu gibi benzer sonuçlar ile karşılaşılmıştır (Deb ve Dutta, 2021; Fernandes vd., 2012; Subramanian ve Punamalai, 2013). *B. bassiana* tarafından ekstraselüler amilaz enzimi üretme kabiliyetinin olduğu, benzer içeriğe sahip besiyerleri kullanılarak aynı metotla değerlendirilmiş, amilaz üretimi için Enzimatik Indeks (EI) değerinin inkübasyondan sonraki sekizinci günde önemli ölçüde

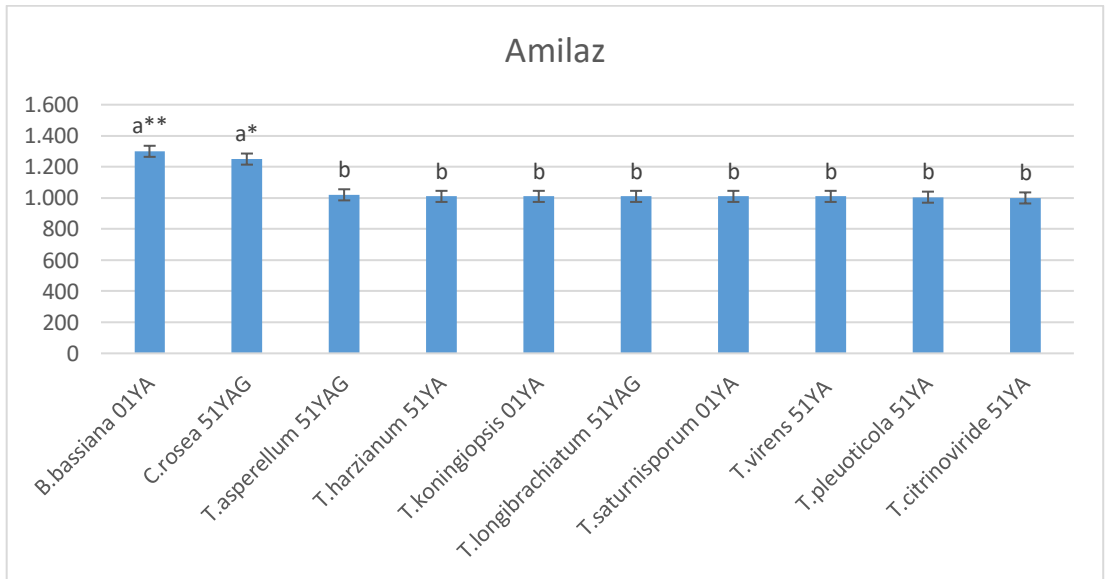
yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, *B. bassiana* 01YA'nın inkübasyonundan sonraki üçüncü günde, enzimatik indeks değerinin *C. rosea* 51YAG ve *Trichoderma* izolatlarından daha yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir. Entomopatojenik bir tür olan *B. bassiana*'nın amilaz üretme kabiliyeti nedeniyle bitkilerde endofit olarak kolonileşmesi beklendiği bildirilmiştir (Amobonye vd., 2023), elde edilen sonuçlar doğrultusunda *B. bassiana*'nın endofitik olduğunu düşündürmektedir.

Trichoderma türleri enziminin üretilmesine ilişkin literatürde yer alan çalışma ile benzer sonuçlar bulunmuştur (Abdenaceur vd., 2022; Cherkupally vd., 2017; Rees, 2021). *Trichoderma* türlerinin hücre dışı amilaz enzimleri ürettiklerini, benzer içeriğe sahip besiyerleri kullanılarak aynı metotla değerlendirilmiş, büyük bir çoğunluğunun Enzimatik İndeks (EI) değerlerinde fark olmadığını bildirmiştir. Bu çalışmanın sonuçla ile *Trichoderma* izolatları tarafından üretilen amilazın enzimatik indeks değerinin benzer olduğunu bulunmuştur.

C. rosea 51 YAG tarafından ekstraselüler amilaz enzimin ürettiği, inkübasyonun üçüncü gününde *Trichoderma* izolatlarından daha yüksek seviyede Enzimatik İndeks (EI) değeri tespit edilmiştir. Literatür taramasında *C. rosea*'nın amilaz enzimine ilişkin herhangi bir yayına rastlanmamıştır.



Şekil 4.15. Test edilen fungusların α -amilaz enzim üretimi; *B. bassiana* 01YA (A), *C. rosea* 51YAG (B), *T. asperellum* 51YAG (C), *T. citrinoviride* 51YA (D), *T. harzianum* 51YA (E), *T. koningiopsis* 01YA (F), *T. longibrachiatum* 51YAG (G), *T. pleuroticola* 51YA (H), *T. saturnisporum* 01YA (I), *T. virens* 51YA (J)



Şekil 4.16. Test edilen izolatlar tarafından hücre dışı α -amilaz enzim üretiminin enzimatik indeksi. "a", "b", "c" vb. istatistiksel gruplamaları temsil etmektedir (Tukey HSD testi ile tek yönlü ANOVA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Selüloz aktivitesi

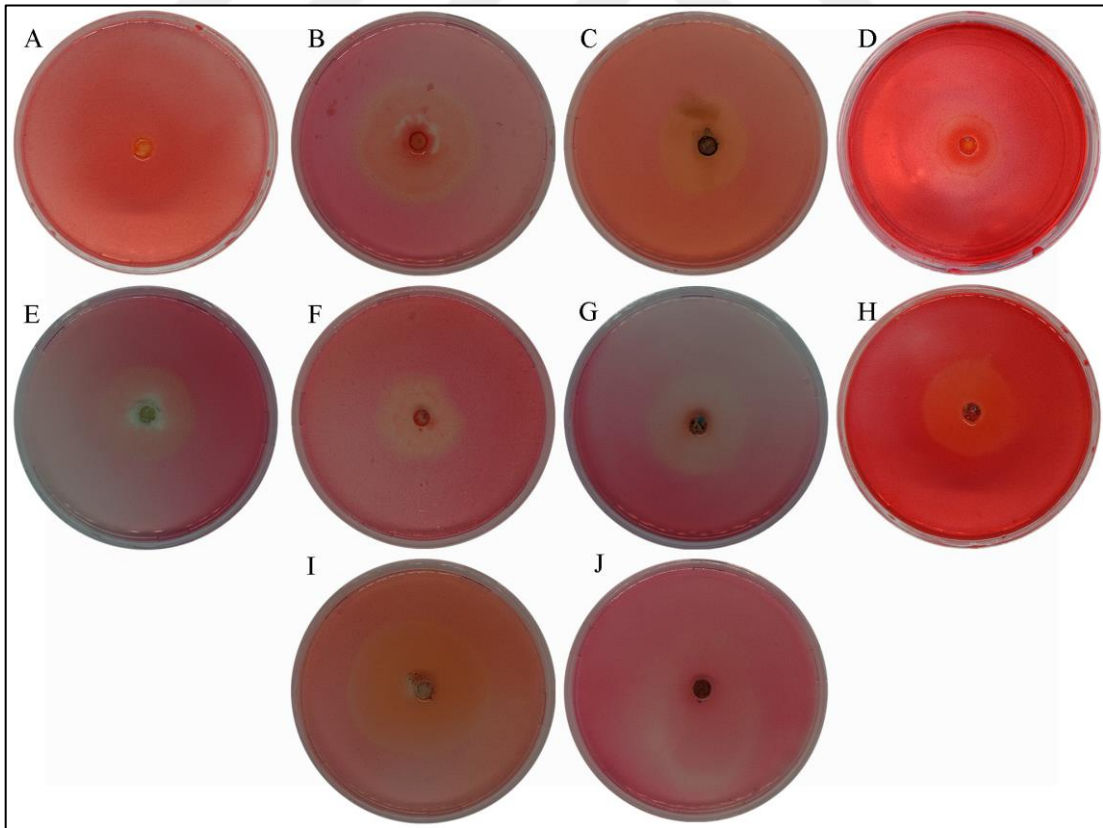
Selüloz glikozdan oluşan bir polisakkarit, β -(1-4)-bağlı d-glukoz birimlerinin doğrusal bir zincirinden meydana gelmektedir (Petlamul vd., 2017). Selülozu hidrolize edebilen selüloz enzimleri üçe ayrılabilir: β glukozidaz (1,4- β -glukozidaz EC 3.2.1.21), ekzoglukunaz (ekzo-1,4- β -glukanaz EC 3.2.1.91) ve endoglukanaz (endo- 1,4- β -glukanaz EC 3.2.1.4). Selüloz çoğunlukla bakteri ve filamentli funguslar gibi mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir (Sukumaran vd., 2005).

B. bassiana 01YA'nın antagonize etme mekanizmasını anlamak için, hücre dışı selüloz enzimi üretimi değerlendirilmiştir. İnkübasyonun üçüncü gününde, seçilen fungal izolatların selüloz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durumu doğrulamak için, karboksimetilselüloz (CMC) içeren petri plakalarındaki izolatlar 15 dakika süreyle Kongo kırmızısı ile boyanmış ve ardından 1 M NaCl çözeltisi ile durulanmıştır. Selülozun hidrolize olduğu bölgelerde kolonilerin etrafında saydam bölge gözlenirken, hidrolize olmayan bölgelerde işe açık kırmızı bir renk olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.17.). Test edilen tüm izolatlar selüloz üretme kabiliyetine sahip oldukları gösterilmiştir. Tukey testi, fungal suşlar arasında selüloz aktivitesi açısından önemli bir farklılık tespit etmemiştir. İstatistiksel analiz, *T. citrinoviride* 51YA, *T. koningiopsis* 51YA, *C. rosea* 51YA, *T. longibrachiatum* 51YAG, *T. asperellum* 51YAG, *T. harzianum* 51YA, *B. bassiana* 01YA, *T. saturnispora* 51YA, *T. pleuotocola* 51YA ve *T. virens* 51YA'nın istatistiksel olarak benzer düzeyde selüloz aktivitesi sergilediğini ortaya koymuştur (Şekil 4.19.). Selüloz için değer aralığı 1.020 ile 1.225 arasındadır ve tüm ortalamalar tek bir "a" kategorisinde gruplandırılmıştır.

Bu çalışmada, karboksimetilselüloz (CMC) içeren petri plakalarında *B. bassiana* tarafından selüloz enziminin üretilmesi ile ilgili literatür bulunan birçok çalışmada olduğu gibi benzer sonuçlar elde edilmiştir (Deb ve Dutta, 2021; Petlamul vd., 2017). *B. bassiana*'nın karboksimetilselüloz (CMC) gelişim gösterdiği, hücre dışı selüloz enzimi üretme kabiliyetinin olduğu, benzer içeriğe sahip besiyerleri kullanılarak aynı metotla değerlendirilmiş, inkübasyondan sonraki beşinci günden itibaren substratı hidrolize ettiğini ve yedinci günde işe selüloz enzimi üretimini belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında, *B. bassiana* 01YA'nın inkübasyonundan sonraki üçüncü günde, enzimatik indeks değerinin *Trichoderma* izolatları ile benzer seviyede olduğu, *C. rosea* 51YAG olduğu tespit edilmiştir. Amilaz enzimlerine ilişkin sonuçlara benzer şekilde, selülozların

salgılanmasının entamopatojenik fungus tür olan *B. bassiana* gibi endofitik funguslar için önemli olduğu belirlenmiştir (Deb ve Dutta, 2021). Bu sonuca göre *B. bassiana* 51 YA ve *C. rosea* 51YAG'nın endofitik özelliği olduğu düşünülmektedir.

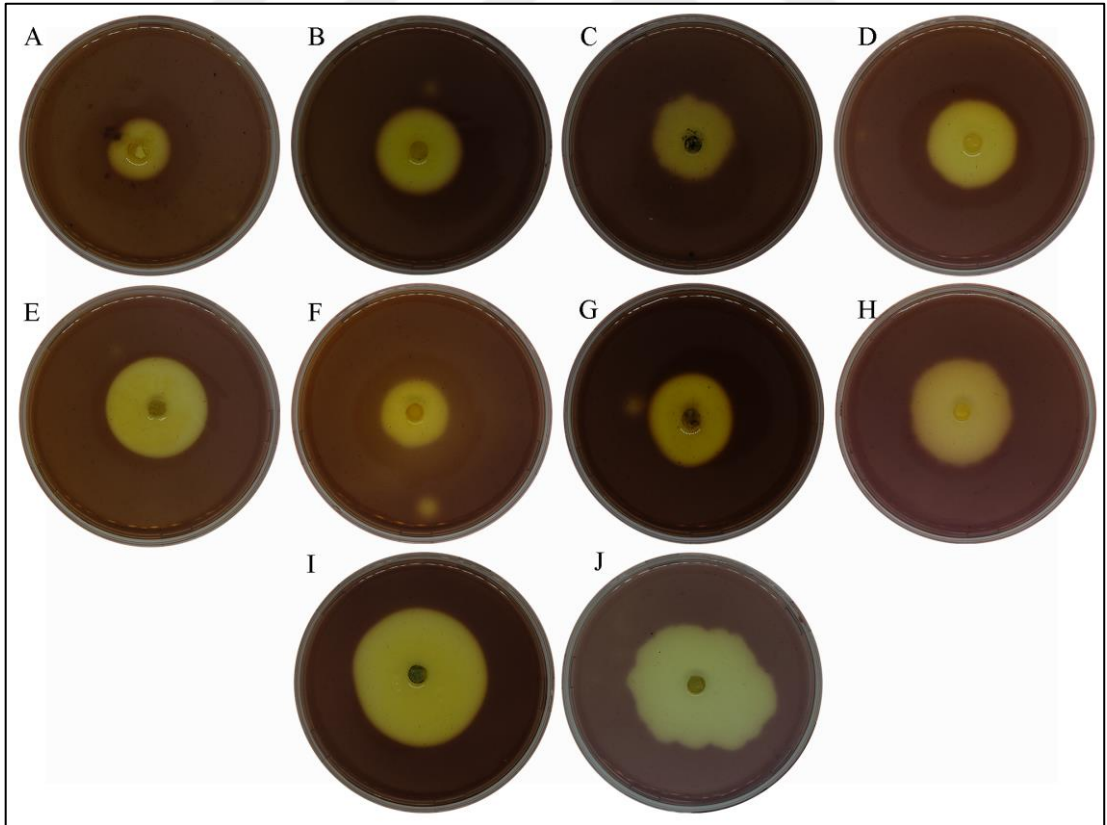
Trichoderma türleri için de selüloz enziminin üretilmesine ilişkin literatürde yer alan çok sayıda çalışma ile benzer sonuçlar bulunmuştur (Bischof vd., 2016; Cherkupally vd., 2017; Florencio, 2011; Maruyama vd., 2020; Rees, 2021). *Trichoderma* türlerinin hücre dışı selüloz enzimleri ürettiklerini, benzer içeriğe sahip besiyerleri kullanılarak aynı metotla değerlendirilmiş, Enzimatik İndeksinde (EI) önemli bir fark olmadığı, ancak (Rees, 2021) *T. virens*'in düşük seviyelerde selüloz aktivitesi sergilediği bildirmiştir. Bu tez çalışmasında, *Trichoderma* izolatları tarafından üretilen selüloz enzim seviyelerinin enzimatik indeks değerinin farklılık gösterdiği, *T. virens* 51YA'nın ise düşük selüloz göstermesi ile benzerlik göstermektedir. *Trichoderma* izolatları tarafından üretilen selüloz, *Aspergillus flavus* ve *Fusarium moniliforme*'ye karşı in vitro ortamda antagonistik aktivite gösterdiğini belirmişlerdir (Calistru vd., 1997).



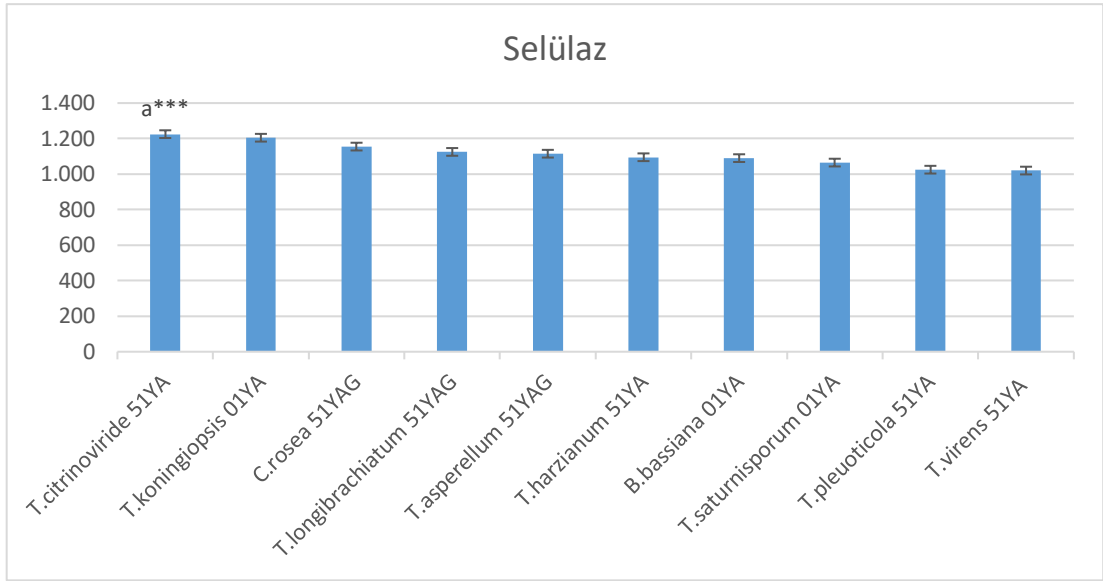
Şekil 4.17. Test edilen fungusların selüloz enzim üretimi; *B. bassiana* 01YA (A), *C. rosea* 51YAG (B), *T. asperellum* 51YAG (C), *T. citrinoviride* 51YA (D), *T. harzianum*

51YA (E), *T. koningiopsis* 01YA (F), *T. longibrachiatum* 51YAG (G), *T. pleurotica* 51 YA (H), *T. saturnisporum* 01YA (I), *T. virens* 51YA (J)

Kongo kırmızısı ile boyanmış plakların 1M NaCl çözeltisi ile yıkandığında düşük temizleme etkinliği gösterdiğini ve bu kimyasallarla işlem görmüş plaklarda CMC içeren bölgelerin ve enzim tarafından hidrolize edilen bölgelerin gözlemlenmesinin hem zor hem de zaman alıcı olduğunu bildirilmiştir. Gram iyot ile boyanan petri plakalarının daha etkili sonuçlar verdiğini bildirmiştir (Kasana vd., 2008). Gram iyot ile boyanmış petri plakalarının Kongo kırmızısı ile boyanmış olanlardan daha etkili olduğu görülmüştür. Selüloz hidrolizini doğrulamak için Gram iyot ile boyanan plakalarda koloninin etrafında sarı bir renk görülürken hidrolize uğramayan kısımlar koyu kahverengi olduğu görülmüştür (Şekil 4.18.). Kasana vd., Kasana vd. (2008) Gram iyot ile boyanmış plakalarda, selüloz hidrolizi gösteren bölgelerde kolonileri çevreleyen belirgin, berrak bir zonun yanı sıra besiyerinin hidrolize uğramamış kısmında mavimsi-siyah bir renklenme olduğunu belirlemiştir, bu araştırmanın bulgularına benzer bulgulara rastlanmıştır.



Şekil 4.18. Gram iyodun CMC agar plaklarındaki selülitik zon üzerine etkisi; *B. bassaiana* 01YA (A), *C. rosea* 51YAG (B), *T. asperellum* 51YAG (C), *T. citrinoviride* 51YA (D), *T. harzianum* 51YA (E), *T. koningiopsis* 01YA (F), *T. longibrachiatum* 51YAG (G), *T. pleurotica* 51 YA (H), *T. saturnisporum* 01YA (I), *T. virens* 51YA (J)



Şekil 4.19. Test edilen izolatlar tarafından hücre dışı selülaz enzim üretiminin enzimatik indeksi. "a", "b", "c" vb. istatistiksel gruplamaları temsil etmektedir (Tukey HSD testi ile tek yönlü ANOVA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Proteaz aktivitesi

Proteazlar, proteinlerin C veya N terminalinden peptitlere ayırır, ekzopeptidazlar veya endopeptidazlar olarak sınıflandırılırlar. Metallo proteazlar, sistein proteazlar, aspartik proteazlar ve serin proteaz olmak üzere dört proteaz sınıfı tanımlanmıştır (Rawlings ve Barrett, 1993). Bununla birlikte, sadece iki sınıf, serin proteazlar ve aspartik proteazlar, fungus biyokontrolünde rol oynamaktadır. Serin proteazlar, kimotripsin, tripsin veya elastaz gibi enzimleri içeren kimotripsin ailesi ve subtilisin ailesi olmak üzere iki enzim ailesinden oluşmaktadır. Aspartik proteazlar tipik olarak sindirim enzimlerini ve fungal proteazları içermektedir. Her iki enzim ailesi de benzer aktif bölge topolojisine sahiptir (Rawlings ve Barrett, 1993). Proteazlar mantar hücre duvarlarının parçalanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Xiao vd., 2023)

B. bassiana 01YA'nın antagonize etme mekanizmasını anlamak için, hücre dışı proteaz enzimin üretimi değerlendirilmiştir. Seçilen izolatlarda proteaz aktivitesinin olduğu tespit edilmiştir. İnkübasyonun üçüncü gününün sonunda, kültür ortamındaki protein ile reaksiyona girdiğinde mavi bir renk oluşturan 'Coomassie Brilliant Blue' protein boyama çözeltisi kullanılarak boyanmış ve üç saat bekletildikten sonra boya giderme solüsyonuyla durulanmıştır. Sonuç olarak, petri plakaları *B. bassiana* 01YA, *C. rosea* 51YAG ve *Trichoderma* izolatlarının proteini hidrolize ettiği alanlarda şeffaf bir zon

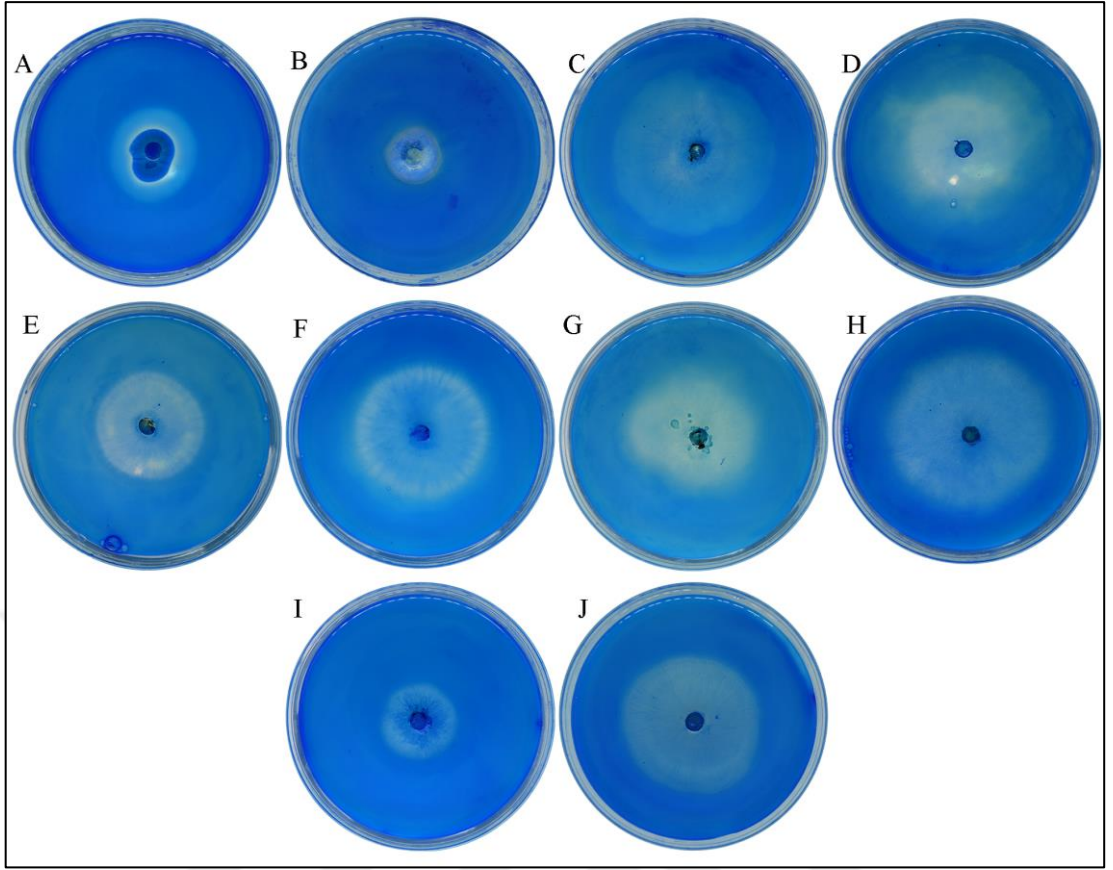
gösterirken, hidrolize olmayan alanlar ise mavi renge dönüşmüştür (Şekil 4.20.). Tukey testi, *B. bassiana* 01YA 'nın en yüksek proteinaz aktivitesini sergilediğini ve bunun diğer tüm suşlardan önemli ölçüde daha fazla olduğunu ortaya koymuştur. Bir sonraki en yüksek aktivite *C. rosea* 51YAG 'da gözlenmiş, onu takiben *T. saturnisporum* 51YA izlemiştir. Geri kalan fungal suşlar, *T. virens* 51YA, *T. koningiopsis* 51YA, *T. longibrachiatum* 51YAG, *T. asperellum* 51YAG, *T. harzianum* 51YA, *T. pleuotocola* 51YA ve *T. citrinoviride* 51YA'nın suşlar arasında istatistiksel olarak farksız bulunmuştur (Şekil 4.21.). Proteinaz için değer aralığı 1.000 ila 1.715 arasındadır ve ortalamalar dört kategoride gruplandırılmıştır: "a" (*B. bassiana* 51YA), "b" (*C. rosea* 51YAG), "bc" (*T. saturnisporum* 51YA) ve "c" (diğer *Trichoderma* suşları).

Bu çalışma, *B. bassiana*'nın proteaz enzimi üretimi ile ilgili olarak literatürde yer alan çalışmalarla benzer sonuçlar bulunmuştur (Deb ve Dutta, 2021; Subramanian ve Punamalai, 2013). *B. bassiana*'nın hücre dışı proteaz üretimi, benzer içeriklere sahip besiyerleri kullanılarak farklı yöntemlerle gerçekleştirilmiştir, inkübasyondan sonraki yedinci günde proteaz enzimi üretiminde yüksek değerde Enzimatik Indeks (EI) değeri görüldüğü belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında, *B. bassiana* 01YA'nın inkübasyonundan sonraki üçüncü günde, enzimatik indeks değerinin *C. rosea* 51YAG ve *Trichoderma* izolatlarından daha yüksek seviyelerde olduğu tespit edilmiştir. *B. bassiana*'daki yüksek proteaz seviyesinin böcek kütikül proteinlerinin sindirimiyle ilişkilendirildiğini (Leger vd., 1996), *B. bassiana* bir kez konağa tutunduğunda germinasyon geçirir ve suşa bağlı olarak proteazlar kitinazlar ve lipazlar dahil olmak üzere çeşitli kütikül parçalayıcı enzimler ürettiğini (Boucias vd., 1998), entamopatojenik funguslarda, kitinaz enzimleri zayıflamış mikrofiberlere saldırımadan önce proteazlar kütikülün parçalanmasını başlattığı belirtilmiştir (Grizanova vd., 2019). *B. bassiana* 01YA'nın proteaz aktivitesi hem bitki zararlılarının hem de bitki patojenlerinin biyolojik kontrolü için potansiyel bir avantaja sahip olabileceğini düşündürmektedir.

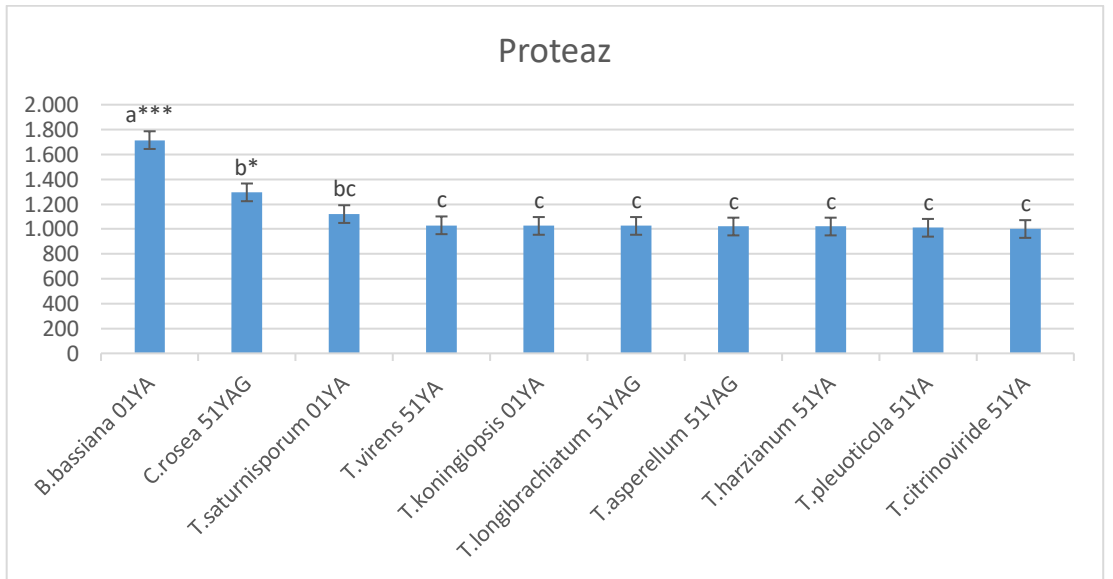
Trichoderma izolatları tarafından proteaz enzimlerinin üretilmesine ilişkin literatürde yer alan çok sayıda çalışmada benzer bulgular elde edilmiştir (Cherkupally vd., 2017; Rees, 2021; Xiao vd., 2023). *Trichoderma* izolatlarının hücre dışı proteaz ürettiği, benzer içeriğe sahip besiyerinde proteaz enzimi belirlemede, proteinlerle reaksiyona girdiğinde renk oluşturan boyaların kullanıldığı, Enzimatik Indeks (EI) değeri açısından *Trichoderma* izolatları arasında önemli bir fark olmadığı bildirilmiştir. Bu çalışmanın

sonuçlarından farklı olarak, *Trichoderma* izolatları tarafından üretilen proteaz enzimini belirlemek için Coomassie Brilliant Blue protein boyama çözeltisi kullanılmış olup, *Trichoderma* izolatları arasında enzimatik indeks değerinde önemli bir fark olmadığı, ancak *T.saturnisporum* 01YA'un proteaz üretimi belirgin seviyede yüksek olduğu tespit edilmiştir. *Trichoderma* türlerinin proteazlarının bitki patojeni funguslara karşı antagonistik etkiler gösterdiğini (Yan ve Qian, 2009), *Trichoderma* proteazların hücre duvarını hidrolize ettiği gösterilmiştir (De Marco ve Felix, 2002), bu da proteaz aktivitesine sahip *Trichoderma* izolatlarının bitki patojenlerinin biyolojik kontrolü için potansiyel suşlar olarak bir avantaja sahip olabileceğini düşündürmektedir.

C. rosea tarafından proteaz enzimlerinin üretilmesine ilişkin literatürde yer alan çalışmalarda benzer bulgular elde edilmiştir (Sun vd., 2020; Zou vd., 2010). *C. rosea* 51YAG'nın hücre dışı proteaz ürettiğini ve inkübasyonundan sonraki üçüncü günde, enzimatik indeks değerinin *Trichoderma* izolatları ile kıyaslandığında yüksek seviyelerde olduğu tespit edilmiştir. *C. rosea*'nın proteaz enzimleri nematodlar, eklembacaklılar ve bitki patojeni funguslar gibi çeşitli hedef konakçıların enfeksiyon sürecine dahil olabilmektedir (Gan vd., 2007; Li vd., 2006; Zhao vd., 2005)



Şekil 4.20. Test edilen fungusların protaz enzim üretimi; *B. bassiana* 01YA (A), *C. rosea* 51YAG (B), *T. asperellum* 51YAG (C), *T. citrinoviride* 51YA (D), *T. harzianum* 51YA (E), *T. koningiopsis* 01YA (F), *T. longibrachiatum* 51YAG (G), *T. pleuroticola* 51YA (H), *T. saturnisporum* 01YA (I), *T. virens* 51YA (J)



Şekil 4.21. Test edilen izolatlar tarafından hücre dışı proteaz enzim üretiminin enzimatik indeksi. "a", "b", "c" vb. istatistiksel gruplamaları temsil etmektedir (Tukey HSD testi ile tek yönlü ANOVA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Kitinaz aktivitesi

Fungus hücre duvarlarının ve eklembacaklı dış iskeletlerinin önemli bir bileşeni olan kitin, 1,4- β -bağlı N-asetil-D-glukozamin (GlcNAc) birimlerinden oluşan bir homopolimerdir (Brown vd., 2020). Kitinazlar, kitin parçalanma mekanizmasına bağlı olarak üç sınıfa ayrıldığını, (1) endokitinazlar kitin fibrili boyunca rastgele keser, (2) 1,4- β -N-asetil-glukozaminidazlar kitin polimerini ekzo-tip bir şekilde GlcNAc monomerlerine keser ve (3) ekzokitinazlar veya kitobiyosidazlar sadece diasetil-kitobiyoz birimlerini serbest bıraktığını bildirmiştir (Viterbo vd., 2002). Kitin polimerlerindeki iç β -1, 4-N-asetil-d-glukozamin bağlarını parçalayan **Bbchit1** geni, kitinaz üretimini kontrol etmektedir (Murad vd., 2007; Prabhukarthikeyan vd., 2014).

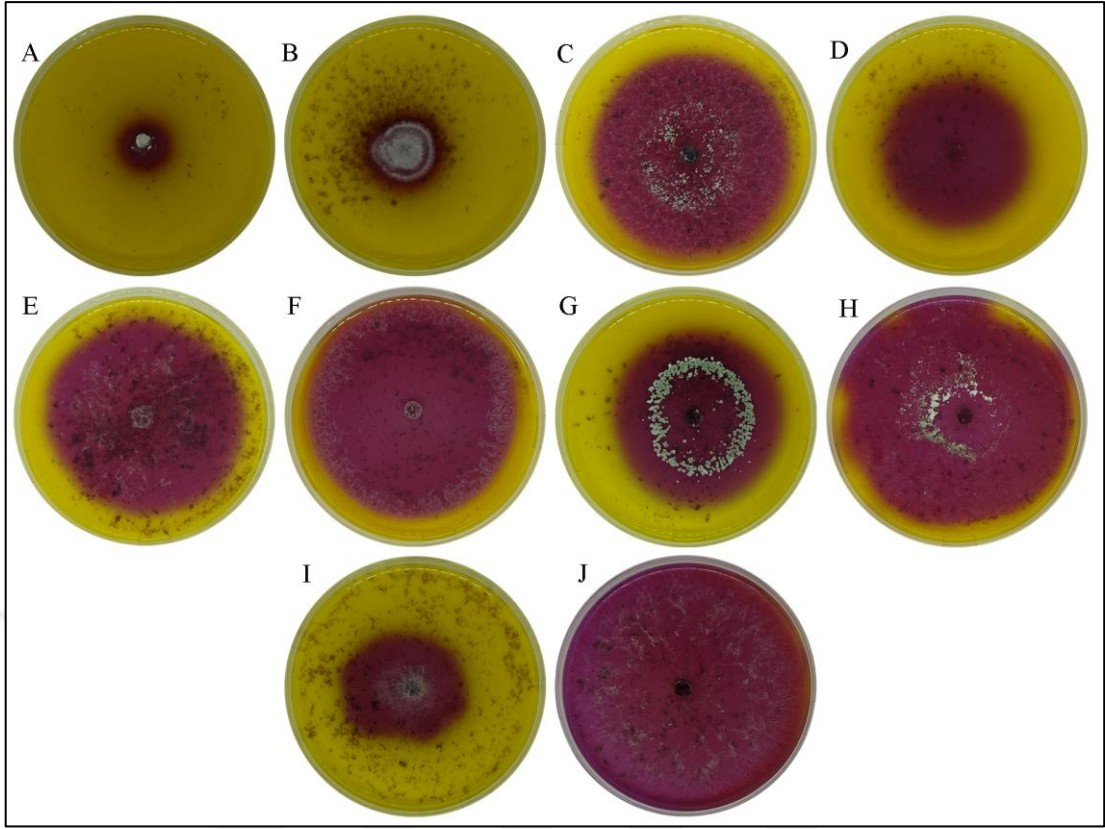
B. bassiana 01YA'nın antagonize etme mekanizmasını anlamak için, hücre dışı kitinaz enziminin üretimi değerlendirilmiştir. Seçilen tüm izolatların kitinaz aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. İzolatların gösterdiği kitinaz aktivitesi, kitin eklenmiş ortamda üçüncü günün sonunda mor renkli zonun çapına göre belirlenmiş ve hidrolize uğramayan bölgelerin sarı renkte kaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.22.). Tukey testi, *T. virens* 51YA'nın en yüksek kitinaz aktivitesini sergilediğini, bunu *T. pleuotocola* 51YA, *T. asperellum* 51YAG, *T. koningiopsis* 51YA ve *T. harzianum* 51YA 'dan oluşan bir grubun izlediğini göstermiştir. Bir sonraki grup *T. longibrachiatum* 51YAG ve *T. citrinoviride* 51YA tarafından oluşturulmuş ve bunu *T. saturnisporum* izlemiştir. *C. rosea* 51YA ve *B. bassiana* 01YA istatistiksel olarak işe düşük kitinaz aktivitelerini sergilemiştir (Şekil 4.23.). Kitinaz için değer aralığı 15.42 ila 71.30 arasındadır ve ortalamalar değerlerine göre çeşitli kategorilerde gruplandırılmıştır.

Bu çalışmada, *B. bassiana*'nın kitinaz enzimi üretimi ile ilgili literatürde yer alan çalışmalardakine benzer sonuçlar elde edilmiştir. (Deb ve Dutta, 2021; Subramanian ve Punamalai, 2013). Hücre dışı kitinaz üretimi, benzer içeriklere sahip besiyerleri kullanılarak, farklı yöntemlerle gerçekleştirilmiş, *B. bassiana* tarafından kitinaz üretimi inkübasyonu takip eden beşinci günde rapor edilmiştir. Tez çalışmasında, inkübasyonun üçüncü gününde *B. bassiana* 01YA'nın kitinaz aktivitesinin Enzimatik Indeks (EI) değerinin *Trichoderma* izolatlarından ve *C. rosea* 51YAG'dan daha düşük olmasının nedenlerinden biri, test edilen izolatlara göre yavaş gelişmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Kitinaz enziminin etkisinin düşük olmasının nedeni, kütikül

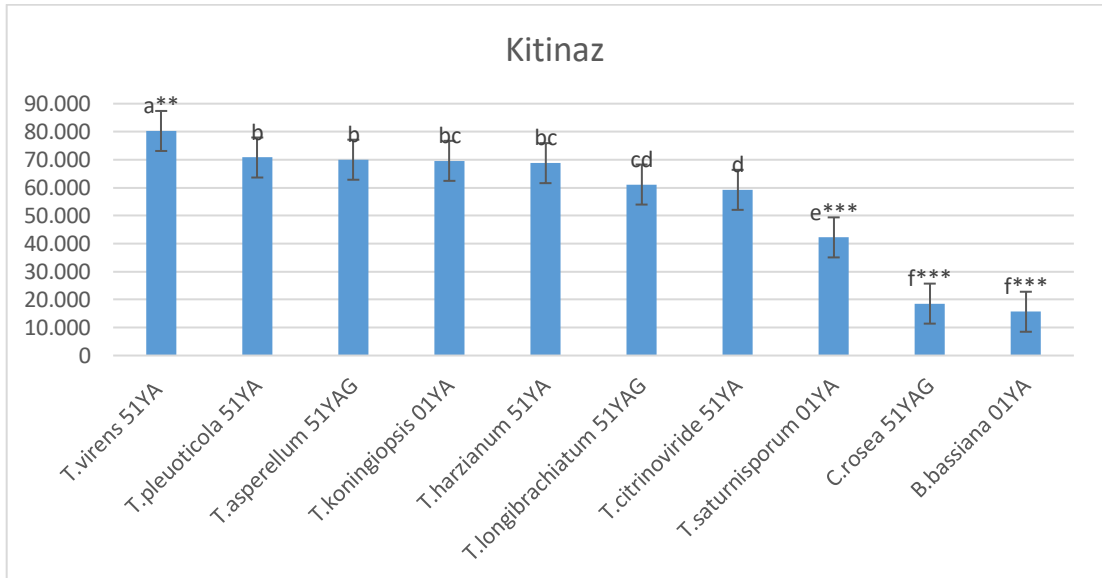
proteinlerinin *B. bassiana* tarafından böcek kütikülüne bağlanarak sindirilmesi ve proteazın kitinaz enzimini inhibe edebilmesinden kaynaklandığı bildirmiştir (Leger vd., 1996). *B. bassiana*, böcek kütiküllerini hidrolize etmek için ihtiyaç duyduğu enzimlerden biri olan kitinaz ürettiğini, kitinaz üretimi için en uygun inkübasyon süresinin genellikle dört veya beş gün olduğunu, kitini parçalama yeteneği nedeniyle patogeneizde önemli bir rol oynadığını çeşitli çalışmalarda vurgulanmıştır (Beygmoradi vd., 2018; Elawati vd., 2018; Mustafa ve Kaur, 2010). Kitinazlar ve proteazlar dahil olmak üzere kitinde oluşan dış iskeleti parçalayabilen enzimler de enfeksiyon için kritik öneme sahip olup, *B. bassiana*'da virülans belirteçleri olarak kullanılmıştır (Ortiz Urquiza ve Keyhani, 2016).

Trichoderma izolatlarının kitinaz enzimi üretimi ile ilgili literatürde yer alan çalışmalardakine benzer sonuçlar elde edilmiştir (Agrawal ve Kotasthane, 2012; Cherkupally vd., 2017; Maruyama vd., 2020; Sayed vd., 2019). Ekstraselüler kitinaz üretebilen *Trichoderma* izolatları benzer içerikli besiyerleri kullanılarak aynı yöntemle değerlendirilmiş, yüksek kitinaz aktivitesi gösterirken, Enzimatik İndeks (EI) değeri de yüksek seviyelerde olduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, inkübasyondan sonraki üçüncü günde, *Trichoderma* izolatları arasında enzimatik indeks değerinde önemli bir fark olmadığı, ancak *T. virens* 51YA'nın kitinaz üretimi belirgin seviyede yüksek olduğu tespit edilmiştir. *Trichoderma* izolatları arasında en yüksek kitinaz aktivitesine *T. virens*'in sahip olduğu bildirilmiştir (Agrawal ve Kotasthane, 2012). *Trichoderma* türlerinin kitinaz enzimin fitopatojenlere karşı antagonistik aktivitelerinde ve biyokontrolde önemli roller üstlenmektedir (Ghasemi vd., 2020; Guzmán Guzmán vd., 2019; Harman, 2006; Maruyama vd., 2020; Woo vd., 1999).

C. rosea 51YAG'nın kitinaz enzimi üretimi üzerine yapılan literatür çalışmalarında benzer sonuçlar bulunmuştur. (Gan vd., 2007; Sun vd., 2020; Tzelepis vd., 2015; Yang vd., 2010). Hücre dışı kitinaz enzimi üretebildiği görülmüştür. *C. rosea*'nın kitinaz enziminin, eklembacaklılar, bitki paraziti nematodlar ve bitki patojeni funguslar dahil olmak üzere çok çeşitli konakçıların hücre duvarlarındaki kitini parçalama kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Mouekouba vd., 2014).



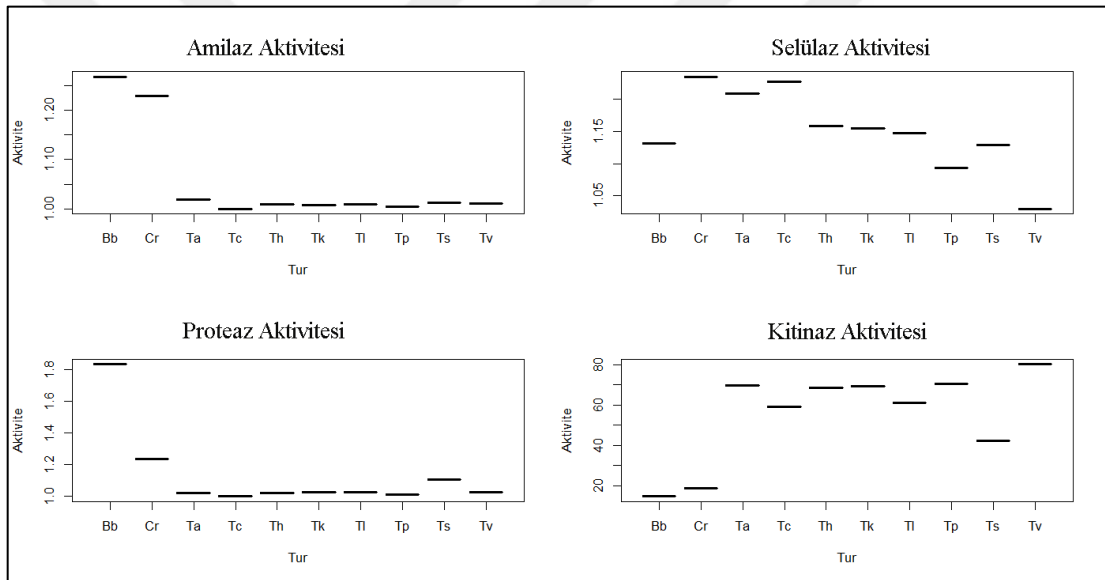
Şekil 4.22. Test edilen fungusların kitinaz enzim üretimi; *B. bassiana* 01YA (A), *C. rosea* 51YAG (B), *T. asperellum* 51YAG (C), *T. citrinoviride* 51YA (D), *T. harzianum* 51YA (E), *T. koningiopsis* 01YA (F), *T. longibrachiatum* 51YAG (G), *T. pleuroticola* 51YA (H), *T. saturnisporum* 01YA (I), *T. virens* 51YA (J)



Şekil 4.23. Test edilen izolatlar tarafından hücre dışı kitinaz enzim üretiminin enzimatik indeksi. "a", "b", "c" vb. istatistiksel gruplamaları temsil etmektedir (Tukey HSD testi ile tek yönlü ANOVA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Test edilen türlerin enzim aktivitelerinin birbirleriyle karşılaştırılması

Bu çalışmada elde edilen veriler, test edilen fungal türleri arasında enzim aktivitelerinde önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle, *B. bassiana* 01YA daha yüksek amilaz ve proteinaz aktiviteleri sergilemiş, selüloz aktivitesi test edilen fungal suşlar arasında istatistiksel olarak benzer seviyelerde olduğunu ortaya koymuş, kitinaz aktivitesi test edilen türlere kıyasla daha düşük bulunmuştur. *C. rosea*'nın amilaz ve proteinaz aktiviteleri test edilen *Trichoderma* türlerinden daha yüksek bulunurken, kitinaz aktivitesi daha düşük bulunmuştur. *Trichoderma* türleri arasında *T. virens* en yüksek kitinaz aktivitesini sergilemişken, amilaz aktivitesi istatistiksel olarak benzer bulunmuştur (Şekil 4.24.).



Şekil 4.24. Test edilen fungus türlerinin enzimatik indeksinin türler arası karşılaştırmaları

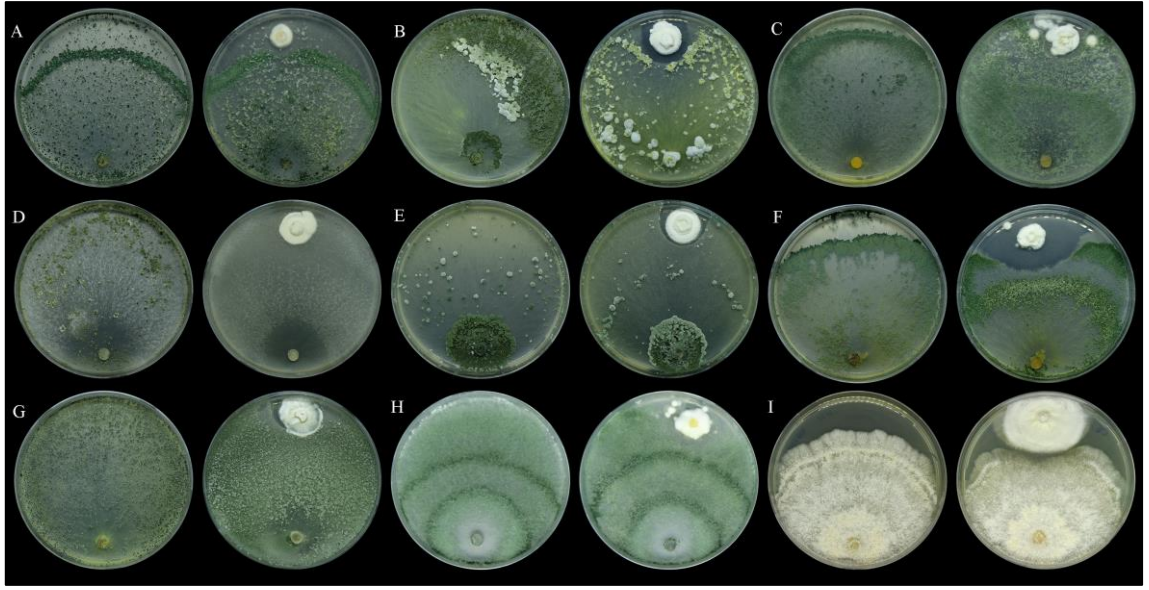
4.4 *Beauveria bassiana*'nın Antagonist Aktiviteleri

In vitro deneylerde, PDA içeren petri plakalarında ikili kültür testlerinde *B. bassiana* ve test edilen fungus izolatları arasındaki antagonistik ilişkileri incelenmiştir.

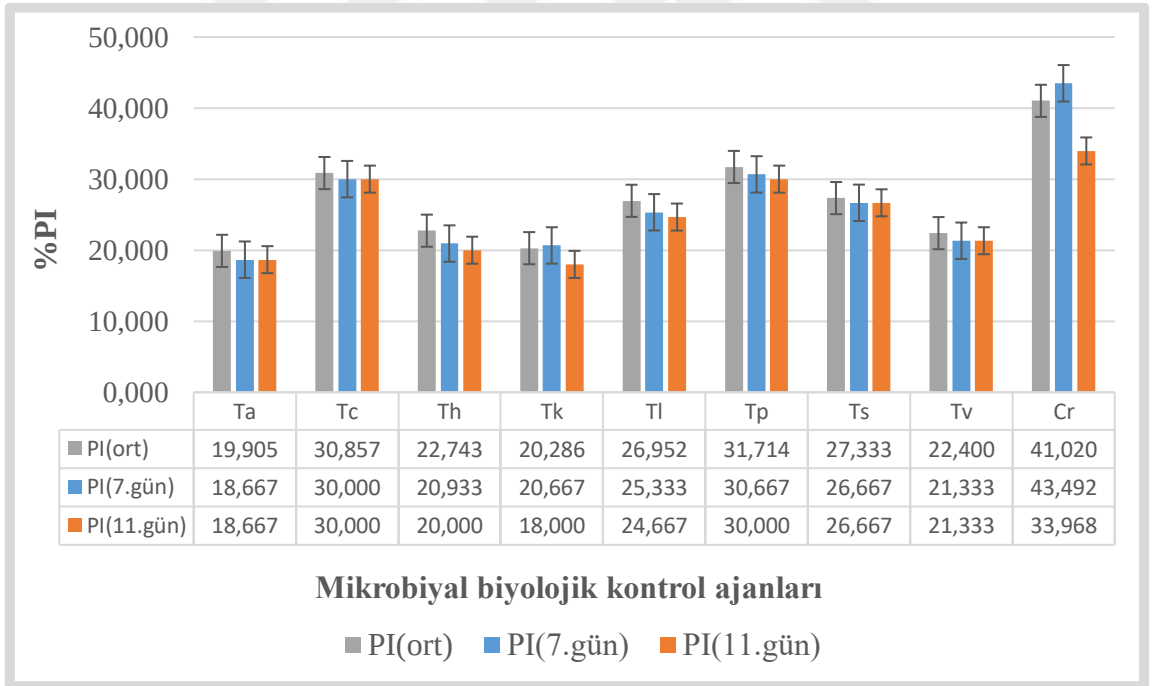
4.4.1 Mikrobiyal biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılan funguslara karşı antagonist aktivitesinin belirlenmesi

PDA içeren petri plakalarında gerçekleştirilen ikili kültür testlerinde, *B. bassiana* 01YA'nın, *Trichoderma* izolatlarına karşı antagonist etkisinin belirli seviyelerde olduğu veya hiç göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 4.25.). İnkübasyondan sonraki yedinci gündeki *T. pleurotica* 51 YA %30,667 (0,75 cm) ve *C. rosea* 51YAG %43,492 (0,51 cm), belirgin bir şekilde antagonist sınır oluşturduğu, bununla birlikte sırasıyla *T. citrinoviride* 51YA %30 (0,35 cm), *T. longibrachiatum* 51YAG %25,333 (0,27 cm), *T. saturnisporum* 01YA %26,667 (0,25 cm), *T. harzianum* 51 YA %20,933 (0,11 cm), *T. asperellum* 51YAG %18,667 (0,05 cm), *T. koningiopsis* 01YA %20,667 (0,05 cm), *T. virens* 51 YA %21,333 (0,075 cm) antagonistik sınırların oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.26.).

Trichoderma türleri ve *B. bassiana*'nın lahana bitkisinde aşılandığında, simbiyotik ilişki kurduğu, besin içeriğini değiştirerek afidler üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğu, böcek zararlıları ve bitki patojenlerine karşı antagonistik faaliyetlerinde kritik rol oynayan çeşitli ikincil metabolitler ürettiği bildirilmiştir (Akello, 2012). *Trichoderma* türleri ve *Beauveria bassiana*'nın floemle beslenen yaprak biti *M. Persicae* direnç gösterdiğini, bitki patojeni *S. sclerotiorum*'a karşı antagonistik etki göstererek etkisini azalttığını bildirmiştir (Pus, 2017). İlgili çalışmalarda, *Trichoderma* türleri ve *B. bassiana*'nın kombinasyonunun bitki direncini artırarak fitopatojenler ve zararlılara karşı etkili olduğu vurgulanmış, bu çalışmada ise ilk kez *B. bassian*'nın *Trichoderma* türlerine antagonistik aktiviteleri tespit edilmiştir. Bu bulgunun, gelecekteki biyokontrol formülasyonlarının geliştirilmesinde önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir.



Şekil 4.25. *B. bassiana* 01YA'nın mikrobiyal biyolojik kontrol ajanlarına karşı in vitro mikoparazitik ve antagonistik aktivitesini gösteren ikili kültür deneyi; *T. asperellum* 51YAG (A), *T. citrinoviride* 51YA (B), *T. harzianum* 51YA (C), *T. koningiopsis* 01YA (D), *T. longibrachiatum* 51YAG (E), *T. pleuroticola* 51YA (F), *T. saturnisporum* 01YA (G), *T. virens* 51YA (H), *C. rosea* 51YAG (I)

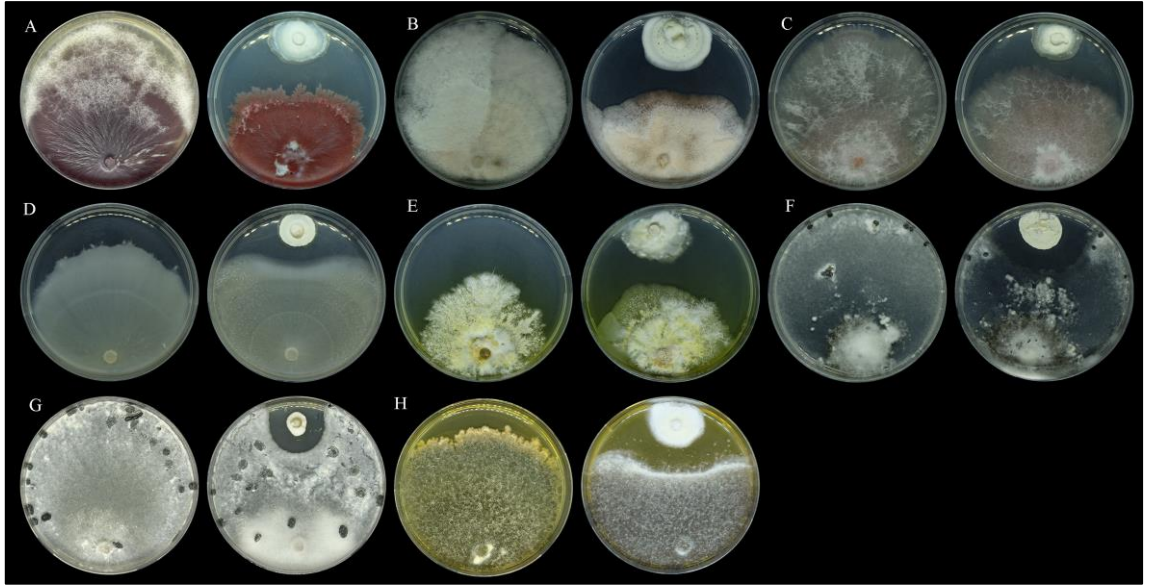


Şekil 4.26. *B. bassiana* 01YA'nın mikrobiyal biyolojik kontrol ajanları üzerindeki antagonisti aktivitesi; *T. asperellum* 51YAG, *T. citrinoviride* 51YA, *T. harzianum* 51YA, *T. koningiopsis* 01YA, *T. longibrachiatum* 51YAG, *T. pleuroticola* 51YA, *T. saturnisporum* 01YA, *T. virens* 51YA, *C. rosea* 51YAG

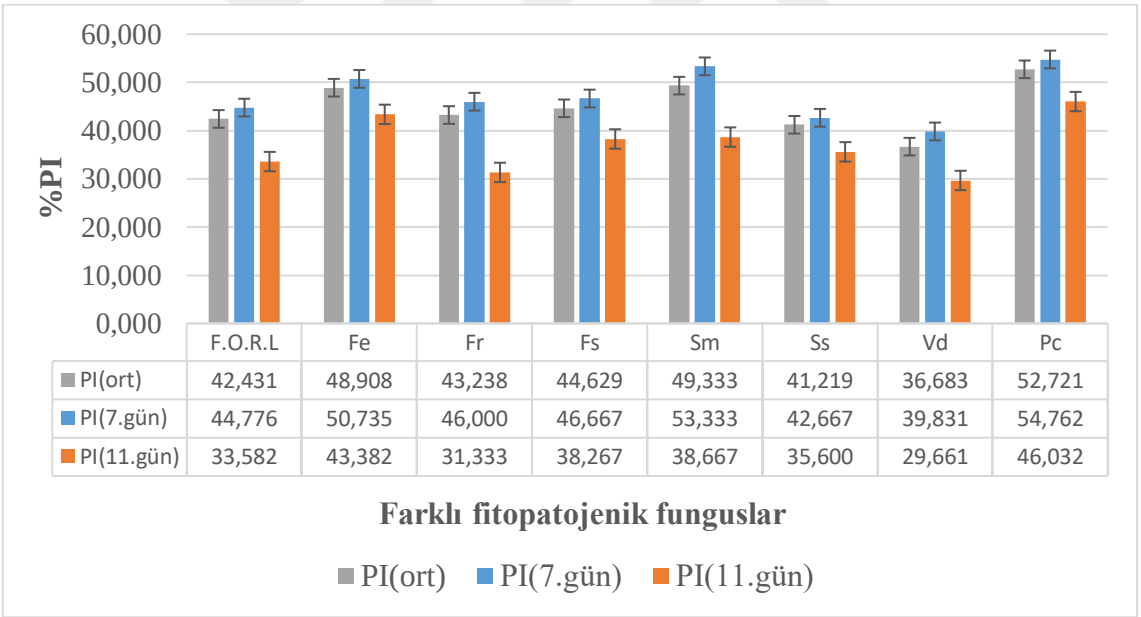
4.4.2 Fitopatojenik funguslar üzerindeki antagonistik aktivitesinin belirlenmesi

B. bassiana'nın fitopatojenik fungusların büyümesini engelleyebildiğini göstermiştir (Şekil 4.27.). PDA içeren petri plakalarında yapılan ikili kültür testlerinde *B. bassiana* ve fitopatojenik fungal izolatlarla karşı *B. bassiana* 01YA belirgin bir şekilde yüksek antagonist etki gösterdiği bulunmuştur. İnkübasyondan sonraki yedinci günde inhibisyon yüzdesinin ortalaması (*F.O.R.L* %44,78 (0,92 cm), *F. equiseti* 51YAG %50,74 (0,98 cm), *F. redolens* 51YAG % 46 (0,96 cm), *F. solani* 51YA %46,67 (0,51 cm), *S. minör* %53,33 (0,9 cm), *S. sclerotiorum* %42,67 (0,82 cm), *V. dahliae* %39,83 (1,10 cm), *P. cryptogea* %54,76 (1,01cm)) bulunmuştur (Şekil 4.28.). Test edilen bitki patojenlerin misellerini çevreleyen *B. bassiana* 01YA'nın koloni şeklinde yoğun büyümesi, tam büyüme gösteren kontrol plakasına kıyasla inokülasyondan sonraki beşinci günde büyümesini durdurduğu gözlenmiştir. Fitopatojenik fungusların miselyum büyümesinin engellenmesi, hücre duvarını parçalayan kitinaz ve proteaz enzimlerinin üretimine bağlı olabilmekte, bu enzimler patojenlerin hücre duvarının ana bileşenlerini hedef alarak yapısal bütünlüğünü bozmakta ve patojenlerin büyümesini engellemektedir. Kitinaz, hücre duvarının kitin bileşenlerini parçalarken, proteaz ise protein yapılarını bozarak fitopatojenik fungusların enfeksiyon yeteneğini zayıflatmaktadır (Spadaro ve Gullino, 2005).

Çeşitli çalışmalarda, *B. bassiana*'nın bitkilerde görülen hastalıklara karşı başarılı bir antagonist olduğu (*S. sclerotiorum*, *Phytophthora infestans*, *Pythium myriotylum*, *P. debaryanum*, *P. irregular*, *P. ultimum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Armillaria mellea*, *Rosellinia necatrix*, *Thielaviopsis bassicola*, *Botrytis cinerea*, *Septoria nodorum*, *Phoma betae*, *P. exigua*, *Colletotrichum falcatum*, *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum* ve *Meloidogyne incognita*) rapor edilmiştir (Azadi vd., 2016; Deb ve Dutta, 2021; Gothandapani vd., 2015; Griffin, 2007; Jaber, 2015; Jaber ve Ownley, 2018; Lozano Tovar vd., 2017; Ownley vd., 2008; Pus, 2017; Vega vd., 2009; Yun vd., 2017). Fitopatojenik funguslar, bitki hastalıklarına neden olan ve tarımsal ürünlere önemli zararlar verebilen organizmalardır (Chatterjee vd., 2016; Li vd., 2017; Marín Menguiano vd., 2019). Bu nedenle, bu fungusların kontrolü ve yönetimi tarımda büyük önem taşımaktadır. Elde edilen sonuçlar, *B. bassiana* 01YA'nın fitopatojenik funguslarla rekabet avantajına sahip olduğunu ve bu fungusların gelişimini kısıtlayabildiğini göstermektedir.



Şekil 4.27. *B. bassiana* 01YA'nın farklı fitopatojenik funguslara karşı in vitro mikoparazitik ve antagonistik aktivitesini gösteren ikili kültür deneyi; *F.O.R.L* (A), *F. equiseti* 51YAG (B), *F. redolens* 51YAG (C), *F. soloni* 51YA (D), *P. cryptogea* (E), *S. minor* (F), *S. sclerotiorum* (G), *V. dahliae* (H)



Şekil 4.28. *B. bassiana* 01YA'nın farklı fitopatojenik funguslara karşı antagonistik aktivitesi; *F.O.R.L*, *F. equiseti* 51YAG, *F. redolens* 51YAG, *F. soloni* 51YA, *P. cryptogea*, *S. minor*, *S. sclerotiorum*, *V. dahliae*

BÖLÜM V

SONUÇ

Tarımsal alanlarda fungal hastalıkların yönetimi için mikrobiyal biyolojik kontrol ajanlarını seçerken ve uygularken funguslar arasındaki antagonistik etkileşimlerin anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında kullanılan *B. bassiana* 01YA suşunun test edilen fitopatojenik fungusların (*F.O.R.L.*, *F. equiseti* 51YAG, *F. redolens* 51YAG, *F. soloni* 51YA, *P. cryptogea*, *S. minör*, *S. sclerotiorum*, *V. dahliae*) misel gelişimini inhibe ettiği bulunmuştur. *B. bassiana* 01YA suşunun amilaz ve selüloz aktivitesinin yüksek olmasından dolayı bitkilerdeki endofitik kolonizasyon yeteneği artırdığı görülmektedir. Aynı şekilde *B. bassiana* 01YA suşunun, proteaz aktivitesinin yüksek olması ve kitinaz aktivitesi göstermesi biyokontrol potansiyelini artırmaktadır. Çalışılan fungus türü olan *B. bassiana* 01YA suşunun test edilen fitopatojenik funguslara karşı geniş bir biyolojik kontrol spektrumu sunduğunu söylenebilir.

B. bassiana gibi entomopatojenik fungusların *Trichoderma* türleri gibi bitki hastalıklarını kontrol eden funguslarla kombinasyonu, bitki sağlığının korunması ve zararlıların kontrolünde etkili stratejilerin geliştirilmesi için umut verici bir yol sunmaktadır. Bu yaklaşım, tarımda biyolojik kontrol yöntemlerinin geliştirilmesinde ve sürdürülebilir uygulamaların teşvik edilmesinde değer taşımaktadır.

Sonuç olarak, tarımsal üretimde biyolojik mücadele stratejilerinin etkinliğini artırmak istiyorsak, *B. bassiana*'nın *Trichoderma* izolatları üzerindeki antagonistik etkilerini anlamak büyük önem taşımaktadır. Bu antagonistik etkileşimler, mahsullerde hastalık kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. *B. bassiana*'nın fitopatojenik funguslarla etkileşimleri ve antagonistik etkileri üzerine yapılan araştırmalar, tarımsal ürünlerin hastalıklardan korunmasına ve kimyasal mücadele yöntemlerine olan bağımlılığın azaltılmasına önemli ölçüde katkıda bulunma potansiyeline sahiptir. Bu tür çalışmalar, tarım sektöründe sürdürülebilir ve çevre dostu uygulamaların geliştirilmesine katkı sunmaktadır.

KAYNAKLAR

Abdenaceur, R., Farida, B.T., Mourad, D., Rima, H., Zahia, O. and Fatma, S.H., "Effective biofertilizer *Trichoderma* spp. isolates with enzymatic activity and metabolites enhancing plant growth", ***International Microbiology***, 25(4), 817-829, 2022.

Affandi, A., Chailani, S.R., Mimbar, S.M. and Wiroatmodjo, B., "Isolation and phenotypic characterisation of morphology in fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin colony naturally from leaf surface, soil, and insect as host in tomato plantation", ***AGRIVITA Journal of Agricultural Science***, 34(3), 303-310, 2013.

Agrawal, T. and Kotasthane, A.S., "Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India", ***SpringerPlus***, 1, 1-10, 2012.

Akello, J., Biodiversity of fungal endophytes associated with maize, sorghum and Napier grass and the influence of biopriming on resistance to leaf mining, stem boring and sap sucking insect pests, ***ZEF Bonn***, Germany, 2012.

Alabouvette, C., Olivain, C. and Steinberg, C., "Biological control of plant diseases: the European situation", ***European Journal of Plant Pathology***, 114, 329-341, 2006.

Amobonye, A., Bhagwat, P., Mthethwa, N., Kwenda, S., Ismail, A., Kumari, S., Singh, S. and Pillai, S., "Transcriptomic profiling of *Beauveria bassiana* SAN01, an endophytic fungal entomopathogen, for the production of lignocellulosic enzymes", ***Biocatalysis and Agricultural Biotechnology***, 54, 102918, 2023.

Anderson Bing, L. and Lewis, L.C., "Temporal relationships between *Zea mays*, *Ostrinia nubilalis* (Lep.: Pyralidae) and endophytic *Beauveria bassiana*", ***Entomophaga***, 37, 525-536, 1992.

Anwar, W., Ali, S., Nawaz, K., Iftikhar, S., Javed, M.A., Hashem, A., Alqarawi, A.A., Abd Allah, E.F. and Akhter, A., "Entomopathogenic fungus *Clonostachys rosea* as a biocontrol agent against whitefly (*Bemisia tabaci*)", **Biocontrol Science and Technology**, 28(8), 750-760, 2018.

Araújo, J.P.M. and Hughes, D.P., "Diversity of entomopathogenic fungi: which groups conquered the insect body?", **Advances in Genetics**, 94, 1-39, 2016.

Arnold, A.E. and Lewis, L.C., Ecology and evolution of fungal endophytes, and their roles against insects, In: *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*, **Oxford University Press**, New York, 2005.

Azadi, N., Shirzad, A. and Mohammadi, H., "A study of some biocontrol mechanisms of *Beauveria bassiana* against *Rhizoctonia* disease on tomato", **Acta Biologica Szegediensis**, 60(2), 119-127, 2016.

Bailey, B.A. and Lumsden, R.D., *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens, In: *Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*, **Taylor and Francis**, London, 1998.

Bailey, B.A. and Melnick, R.L., The endophytic *Trichoderma*, In: *Trichoderma: Biology and Applications*, **CABI**, Wallingford UK, 2013.

Barak, R., "Lectins: A possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii*", **Phytopathology**, 75(4), 458, 1985.

Barnett, H.L. and Hunter, B.B., *Illustrated Marga of Imperfect Fungi*, **Prentice-Hall**, USA, 1998.

Barra Bucarei, L., France Iglesias, A., Gerding González, M., Silva Aguayo, G., Carrasco Fernández, J., Castro, J.F. and Ortiz Campos, J., "Antifungal activity of *Beauveria bassiana* endophyte against *Botrytis cinerea* in two solanaceae crops", **Microorganisms**, 8(1), 65, 2019.

Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C. and Codon, A.C., "Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains", ***International Microbiology***, 7(4), 249-260, 2004.

Beygmoradi, A., Homaei, A., Hemmati, R., Santos Moriano, P., Hormigo, D. and Fernández Lucas, J., "Marine chitinolytic enzymes, a biotechnological treasure hidden in the ocean?", ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 102, 9937-9948, 2018.

Bischof, R.H., Ramoni, J. and Seiboth, B., "Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*", ***Microbial Cell Factories***, 15, 1-13, 2016.

Bockus, W.W., Bowden, R.L., Hunger, R.M., Murray, T.D. and Smiley, R.W., Compendium of Wheat Diseases and Pests, ***American Phytopathological Society (APS Press)***, USA, 2010.

Boland, G.J. and Hall, R., "Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*", ***Canadian Journal of Plant Pathology***, 16(2), 93-108, 1994.

Bolton, M.D., Thomma, B.P.H.J. and Nelson, B.D., "*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen", ***Molecular Plant Pathology***, 7(1), 1-16, 2006.

Boucias, D.G. and Pendland, J.C., "Attachment of mycopathogens to cuticle: the initial event of mycoses in arthropod hosts", ***The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals***, 101-127, 1991.

Boucias, D.G., Pendland, J.C., Boucias, D.G. and Pendland, J.C., "Entomopathogenic fungi: fungi imperfecti", ***Principles of Insect Pathology***, 321-364, 1998.

Brayford, D., "IMI descriptions of fungi and bacteria set 127", ***Mycopathologia***, 133(1), 35-63, 1996.

Brown, H.E., Esher, S.K. and Alspaugh, J.A., Chitin: a "hidden figure" in the fungal cell wall, In: *The Fungal Cell Wall: An Armour and A Weapon for Human Fungal Pathogens*, J.P. Latge, ***Springer***, Switzerland, 2020.

Brown, M.F. and Brotzman, H.G., Phytopathogenic fungi: a scanning electron stereoscopic survey, In: *Phytopathogenic Fungi: A Scanning Electron Stereoscopic Survey*, **University of Missouri Press, Extension Division**, Columbia, 1979.

Brownbridge, M. and Buitenhuis, R., "Integration of microbial biopesticides in greenhouse floriculture: The Canadian experience", ***Journal of Invertebrate Pathology***, 165, 4-12, 2019.

Bruck, D.J., "Fungal entomopathogens in the rhizosphere", ***The Ecology of Fungal Entomopathogens***, 103-112, 2010.

Bryła, M., Pierzgalski, A., Zapaśnik, A., Uwineza, P.A., Ksieniewicz Woźniak, E., Modrzewska, M. and Waśkiewicz, A., "Recent research on *Fusarium* mycotoxins in maize a review", ***Foods***, 11(21), 3465-3498, 2022.

Burgess, L.W., *The Fusarium Laboratory Manual*, **Blackwell Publishing**, USA, 1994.

Butt, T.M., Jackson, C. and Magan, N., *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*, **CABI Publishing**, 2001.

Calistru, C., McLean, M. and Berjak, P., "In vitro studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species", ***Mycopathologia***, 137, 115-124, 1997.

Castrillo, L.A., Griggs, M.H. and Vandenberg, J.D., "Vegetative compatibility groups in indigenous and mass released strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: likelihood of recombination in the field", ***Journal of Invertebrate Pathology***, 86(1-2), 26-37, 2004.

Chatterjee, S., Kuang, Y., Splivallo, R., Chatterjee, P. and Karlovsky, P., "Interactions among filamentous fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of secreted metabolites and fumonisin production", ***BMC Microbiology***, 16, 1-13, 2016.

Chen, P.H., Chen, R.Y. and Chou, J.Y., "Screening and Evaluation of Yeast Antagonists for Biological Control of Botrytis cinerea on Strawberry Fruits", **Mycobiology**, 46(1), 33-46, 2018.

Cherkupally, R., Amballa, H. and Reddy, B.N., "In vitro screening for enzymatic activity of *Trichoderma* species for biocontrol potential", **Annals of Plant Sciences**, 6, 1784-1789, 2017.

Chet, I., Inbar, J. and Hadar, I., Fungal antagonists and mycoparasites, In: The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships, D.T. Wicklow and B. Soderstrom, **Springer**, Berlin, Heidelberg, New York, 1997.

Chet, I., Viterbo, A., Brotman, Y. and Lousky, T., "Enhancement of plant disease resistance by the biocontrol agent *Trichoderma*", **Weizmann Institute of Science**, 1-2, 2006.

Chow, Y.Y., Rahman, S. and Ting, A.S.Y., "Interaction dynamics between endophytic biocontrol agents and pathogen in the host plant studied via quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) approach", **Biological Control**, 125, 44-49, 2018.

Contreras Cornejo, H.A., Macías Rodríguez, L., Del Val, E.K. and Larsen, J., "Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants ", **FEMS Microbiology Ecology**, 92(4), 36-53, 2016.

Cripps Guazzzone, N., Rhizosphere competence of selected *Trichoderma* species, Doctoral Thesis, **Lincoln University**, USA, s. 155, 2014.

Crous, P.W., Lombard, L., Sandoval Denis, M., Seifert, K.A., Schroers, H.J., Chaverri, P., Gené, J., Guarro, J., Hirooka, Y. and Bensc, K., "*Fusarium*: more than a node or a foot shaped basal cell", **Studies in Mycology**, 98, 100116, 2021.

De Marco, J.L. and Felix, C.R., "Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease", **BMC Biochemistry**, 3, 1-7, 2002.

De Padua, J.C. and dela Cruz, T.E.E., "Isolation and characterization of nickel-tolerant *Trichoderma* strains from marine and terrestrial environments", ***Journal of Fungi***, 7(8), 591, 2021.

Deb, L. and Dutta, P., "Antagonistic potential of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin against *Pythium myriotylum* causing damping off of tomato", ***Indian Phytopathology***, 74(3), 715-728, 2021.

Diáñez Martínez, F., Santos, M., Carretero, F. and Marín, F., "*Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent", ***Journal of the Science of Food and Agriculture***, 96(6), 1934-1944, 2016.

Dillard, H.R. and Grogan, R.G., "Relationship between sclerotial spatial pattern and density of *Sclerotinia minor*", ***Phytopathology***, 75, 90-94, 1985.

Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T.H., *Compendium of Soil Fungi*, ***Academic Press***, London, 1980.

Doolotkeldieva, T., Bobusheva, S., Kulmanbetova, A., Zholdosbekova, S. and Kyzy, A.A., "Characterization of *Beauveria bassiana* isolates from Kyrgyzstan", ***Journal of Invertebrate Pathology***, 167, 107-243, 2019.

Dromph, K.M., "Collembolans as vectors of entomopathogenic fungi", ***Pedobiologia***, 47(3), 245-256, 2003.

Durrant, W.E. and Dong, X., "Systemic acquired resistance", ***Annual Review of Phytopathology***, 42, 185-209, 2004.

Edgar, R.C., "Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput", ***Nucleic Acids Research***, 32(5), 1792-1797, 2004.

Elad, Y., Chet, I. and Henis, Y., "A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil", ***Phytoparasitica***, 9, 59-67, 1981.

Elawati, N.E., Pujiyanto, S. and Kusdiyantini, E., "Production of extracellular chitinase *Beauveria bassiana* under submerged fermentation conditions", ***Journal of Physics: Conference Series***, 1025(1), 1-6, 2018.

Esmaeili Taheri, A., Hamel, C., Gan, Y. and Vujanovic, V., "First report of *Fusarium redolens* from Saskatchewan and its comparative pathogenicity", ***Canadian Journal of Plant Pathology***, 33(4), 559-564, 2011.

Espinoza, F., Vidal, S., Rautenbach, F., Lewu, F. and Nchu, F., "Effects of *Beauveria bassiana* (Hypocreales) on plant growth and secondary metabolites of extracts of hydroponically cultivated chive (*Allium schoenoprasum* L. [Amaryllidaceae])", ***Heliyon***, 5(12), 2019.

Fan, H., Yao, M., Wang, H., Zhao, D., Zhu, X., Wang, Y., Liu, X., Duan, Y. and Chen, L., "Isolation and effect of *Trichoderma citrinoviride* Snf1910 for the biological control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*", ***BMC Microbiology***, 20, 1-11, 2020.

Farida, B., Sonia, H., Hakima, M.K., Fatma, B. and Fatma, H., "Histological changes in the larvae of the domestic mosquito *Culex pipiens* treated with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*", ***Scientific Research and Essays***, 13(1), 1-10, 2018.

Feng, P., Shang, Y., Cen, K. and Wang, C., "Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity", ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, 112(36), 11365-11370, 2015.

Fernandes, E.G., Valério, H.M., Feltrin, T. and Sand, S.T.V.D., "Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates", ***Brazilian Journal of Microbiology***, 43, 827-833, 2012.

Florencio, C., Microrganismos produtores de celulasas: seleção de isolados de *Trichoderma* spp., Master Thesis, ***Universidade Federal de São Carlos***, São Carlos, s. 163, 2011.

Florencio, C., Couri, S. and Farinas, C.S., "Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains", ***Enzyme Research***, 2012, 2012.

Fokkema, N.J., "Fungal antagonisms in the phyllosphere", ***Annals of Applied Biology***, 89(1), 115-119, 1978.

Fradin, E.F. and Thomma, B.P.H.J., "Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*", ***Molecular Plant Pathology***, 7(2), 71-86, 2006.

Fravel, D.R., "Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases", ***Annual Review of Phytopathology***, 26(1), 75-91, 1988.

Fravel, D.R., "Commercialization and implementation of biocontrol", ***Annual Review of Phytopathology***, 43, 337–359 2005.

Gan, Z., Yang, J., Tao, N., Yu, Z. and Zhang, K.Q., "Cloning and expression analysis of a chitinase gene Crchi1 from the mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea* (syn. *Gliocladium roseum*)", ***Journal of Microbiology***, 45(5), 422-430, 2007.

Gezgin, Y., Güralp, G., Barlas, A.B. and Eltem, R., "Morphological and molecular identification of trichoderma isolates used as biocontrol agents by DNA barcoding", ***European Journal of Biology***, 82(1), 59-69, 2023.

Ghasemi, S., Safaie, N., Shahbazi, S., Shams Bakhsh, M. and Askari, H., "The role of cell wall degrading enzymes in antagonistic traits of *Trichoderma virens* against *Rhizoctonia solani*", ***Iranian Journal of Biotechnology***, 18(4), 23-33, 2020.

Goettel, M.S., Douglas Inglis, G., Duke, G.M., Lord, J.C. and Jaronski, S.T., "Measurement of internal *Beauveria bassiana* to ascertain non-target impacts on arthropods in field environments", ***Biocontrol Science and Technology***, 31(8), 834-849, 2021.

Gómez Vidal, S., Salinas, J., Tena, M. and Lopez Llorca, L.V., "Proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) responses to endophytic colonization by entomopathogenic fungi", ***Electrophoresis***, 30(17), 2996-3005, 2009.

Gopinath, S.C.B., Anbu, P., Arshad, M.K.M., Lakshmipriya, T., Voon, C.H., Hashim, U. and Chinni, S.V., "Biotechnological processes in microbial amylase production", ***BioMed Research International***, 2017, 2017.

Gordon, T.R. and Martyn, R.D., "The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*", ***Annual Review of Phytopathology***, 35(1), 111-128, 1997.

Gothandapani, S., Boopalakrishnan, G., Prabhakaran, N., Chethana, B., Aravindhan, M., Saravanakumar, M. and Ganeshan, G., "Evaluation of entomopathogenic fungus against *Alternaria porri* (Ellis) causing purple blotch disease of onion", ***Archives of Phytopathology and Plant Protection***, 48(2), 135-144, 2015.

Griffin, M.R., *Beauveria bassiana*, a cotton endophyte with biocontrol activity against seedling disease, Doctoral Dissertations ***The University of Tennessee, Knoxville***, USA, s. 163, 2007.

Grizanova, E.V., Coates, C.J., Dubovskiy, I.M. and Butt, T.M., "*Metarhizium brunneum* infection dynamics differ at the cuticle interface of susceptible and tolerant morphs of *Galleria mellonella*", ***Virulence***, 10(1), 999-1012, 2019.

Gurulingappa, P., Sword, G.A., Murdoch, G. and McGee, P.A., "Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta", ***Biological Control***, 55(1), 34-41, 2010.

Guzmán Guzmán, P., Porras Troncoso, M.D., Olmedo Monfil, V. and Herrera Estrella, A., "*Trichoderma* species: versatile plant symbionts", ***Phytopathology***, 109(1), 6-16, 2019.

Hajek, A.E., Gardescu, S. and Delalibera, I., "Summary of classical biological control introductions of entomopathogens and nematodes for insect control", **BioControl**, 66, 167-180, 2021.

Hami, A., Rasool, R.S., Khan, N.A., Mansoor, S., Mir, M.A., Ahmed, N. and Masoodi, K.Z., "Morpho-molecular identification and first report of *Fusarium equiseti* in causing chilli wilt from Kashmir (Northern Himalayas)", **Scientific Reports**, 11(1), 3610, 2021.

Han, Y.K., Dumin, W., Park, M.J., Bae, Y.S., Park, J.H. and Back, C.G., "First report of fusarium wilt disease caused by *Fusarium equiseti* on grafted watermelon in Korea", **Plant Disease**, 106(11), 2989, 2022.

Harman, G.E., "Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp.", **Phytopathology**, 96(2), 190-194, 2006.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M., "*Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts", **Nature Reviews Microbiology**, 2(1), 43-56, 2004.

Hegedus, D.D. and Khachatourians, G.G., "The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents", **Biotechnology Advances**, 13(3), 455-490, 1995.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. and Monte, E., "Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes", **Microbiology**, 158(1), 17-25, 2012.

Hibar, K., Daami Remadi, M. and El Mahjoub, M., "Induction of resistance in tomato plants against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* by *Trichoderma* spp.", **Tunisian Journal of Plant Protection**, 2(1), 47-58, 2007.

Howell, C.R., "Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts", **Plant Disease**, 87(1), 4-10, 2003.

Hu, X., Roberts, D.P., Xie, L., Yu, C., Li, Y., Qin, L., Hu, L., Zhang, Y. and Liao, X., "Use of formulated *Trichoderma* sp. Tri-1 in combination with reduced rates of chemical pesticide for control of *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape", **Crop Protection**, 79, 124-127, 2016.

Hubbard, M., Hynes, R.K., Erlandson, M. and Bailey, K.L., "The biochemistry behind biopesticide efficacy", **Sustainable Chemical Processes**, 2(1), 1-8, 2014.

Hue, A.G., Voldeng, H.D., Savard, M.E., Fedak, G., Tian, X. and Hsiang, T., "Biological control of fusarium head blight of wheat with *Clonostachys rosea* strain ACM941", **Canadian Journal of Plant Pathology**, 31(2), 169-179, 2009.

Inglis, G.D., Goettel, M.S. and Johnson, D.L., "Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*", **Biological Control**, 5(4), 581-590, 1995.

Jaber, L.R., "Grapevine leaf tissue colonization by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* sl and its effect against downy mildew", **BioControl**, 60, 103-112, 2015.

Jaber, L.R. and Ownley, B.H., "Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens?", **Biological Control**, 116, 36-45, 2018.

Jaber, L.R. and Salem, N.M., "Endophytic colonisation of squash by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) for managing Zucchini yellow mosaic virus in cucurbits", **Biocontrol Science and Technology**, 24(10), 1096-1109, 2014.

Jensen, B., Knudsen, I.M.B., Madsen, M. and Jensen, D.F., "Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seedborne *Alternaria* spp", **Phytopathology**, 94(6), 551-560, 2004.

Jerushalmi, S., Maymon, M., Dombrovsky, A. and Freeman, S., "Fungal pathogens affecting the production and quality of medical cannabis in Israel", **Plants**, 9(7), 882, 2020.

Kamal, R.K., Athisayam, V., Gusain, Y.S. and Kumar, V., "*Trichoderma*: A most common biofertilizer with multiple roles in agriculture", **Biomedical Journal**, 2(3), 2018.

Kasana, R.C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. and Gulati, A., "A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine", **Current Microbiology**, 57, 503-507, 2008.

Kloepper, J.W., Tuzun, S. and Kuć, J.A., "Proposed definitions related to induced disease resistance", **Biocontrol Science and Technology**, 2(4), 349-351, 1992.

Kohn, L.M., Petsche, D.M., Bailey, S.R., Novak, L.A. and Anderson, J.B., "Restriction fragment length polymorphisms in nuclear and mitochondrial DNA of *Sclerotinia* species", **Phytopathology**, 78(8), 1047-1052, 1988.

Kreutz, J., Zimmermann, G. and Vaupel, O., "Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* among the spruce bark beetle, *Ips typographus* (Col., Scolytidae) in the laboratory and under field conditions", **Biocontrol Science and Technology**, 14(8), 837-848, 2004.

Krieg, A., Gröner, A., Huber, J. and Zimmermann, G., "Inaktivierung von verschiedenen Insektenpathogenen durch ultraviolette Strahlen", **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, 38-48, 1981.

Kulu, I.P., Abadi, A.L. and Afandhi, A., "Morphological and molecular identification of *Beauveria bassiana* as entomopathogen agent from Central Kalimantan peatland, Indonesia", **International Journal of ChemTech Research**, 8(4), 2079-2084, 2015.

Kumar, G., Maharshi, A., Patel, J., Mukherjee, A., Singh, H.B. and Sarma, B.K., "*Trichoderma*: a potential fungal antagonist to control plant diseases", **SATSA Mukhapatra-Annual Technical Issue**, 21, 206-218, 2017.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K., "MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms", ***Molecular Biology and Evolution***, 35(6), 1547, 2018.

Lacey, L., Grzywacz, D., Shapiro Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M. and Goettel, M.S., "Insect pathogens as biological control agents: Back to the future", ***Journal of Invertebrate Pathology***, 132, 1-41, 2015.

Leger, R.J.S., Joshi, L., Bidochka, M.J., Rizzo, N.W. and Roberts, D.W., "Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle", ***Applied and Environmental Microbiology***, 62(3), 907-912, 1996.

Leland, J.E. and Behle, R.W., "Coating *Beauveria bassiana** with lignin for protection from solar radiation and effects on pathogenicity to *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae)", ***Biocontrol Science and Technology***, 15(3), 309-320, 2005.

Leslie, J.F. and Summerell, B.A., The *Fusarium* Laboratory Manual, ***John Wiley & Sons***, USA, 2008.

Lewis, L.C. and Cossentine, J.E., "Season long intraplant epizootics of entomopathogens, *Beauveria bassiana* and *Nosema pyrausta*, in a corn agroecosystem", ***Entomophaga***, 31, 363-369, 1986.

Li, C., Zhang, M., Li, J., Huang, M., Shao, X. and Yang, Z., "*Fusarium redolens* causes black rot disease in *Gastrodia elata* grown in China", ***Crop Protection***, 155, 105933, 2022.

Li, J., Gu, F., Wu, R., Yang, J. and Zhang, K.Q., "Phylogenomic evolutionary surveys of subtilase superfamily genes in fungi", ***Scientific Reports***, 7(1), 45456, 2017.

Li, J., Yang, J., Huang, X. and Zhang, K.Q., "Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor", ***Process Biochemistry***, 41(4), 925-929, 2006.

Li, Z., Li, C., Huang, B. and Fan, M., "Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus", **Chinese Science Bulletin**, 46, 751-753, 2001.

Libert, M.A., "Plante cryptogamicae arduennae (Exsiccati) no. 326", **Published by the author**, 1837.

López Moral, A., Antón Domínguez, B.I., Lovera, M., Arquero, O., Trapero, A. and Agustí Brisach, C., "Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with wilting and crown rot in almond (*Prunus dulcis*)", **Scientific Reports**, 14(1), 5720, 2024.

Lozano Tovar, M.D., Garrido Jurado, I., Quesada Moraga, E., Raya Ortega, M.C. and Trapero Casas, A., "*Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* release secondary metabolites with antagonistic activity against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma* olive pathogens", **Crop Protection**, 100, 186-195, 2017.

Lu, H.L., Wang, J.B., Brown, M.A., Euerle, C. and St. Leger, R.J., "Identification of *Drosophila* mutants affecting defense to an entomopathogenic fungus", **Scientific Reports**, 5(1), 12350, 2015.

Ma, Y., Li, Y., Yang, S., Li, Y. and Zhu, Z., "Biocontrol potential of *Trichoderma asperellum* strain 576 against *Exserohilum turcicum* in *Zea mays*", **Journal of Fungi**, 9(9), 936, 2023.

Mandeel, Q. and Baker, R., "Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*", **Phytopathology**, 81(4), 462-469, 1991.

Marín Menguiano, M., Moreno Sánchez, I., Barrales, R.R., Fernández Álvarez, A. and Ibeas, J.I., "N-glycosylation of the protein disulfide isomerase Pdi1 ensures full *Ustilago maydis* virulence", **PLoS Pathogens**, 15(11), e1007687, 2019.

Maruyama, C.R., Bilesky José, N., de Lima, R. and Fraceto, L.F., "Encapsulation of *Trichoderma harzianum* preserves enzymatic activity and enhances the potential for biological control", **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 8, 225-239, 2020.

Matuo, T. and Snyder, W.C., "Use of morphology and mating populations in the identification of formae speciales in *Fusarium solani*", **Phytopathology**, 63(5), 562-565, 1973.

Monte, E., "Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology", **International Microbiology**, 4(1), 1-4, 2001.

Montesinos, E. and Bonaterra, A., Microbial pesticides, In: Encyclopedia of Microbiology, **Elsevier**, New York, 2009.

Morley Davies, J., Moore, D. and Prior, C., "Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures", **Mycological Research**, 100(1), 31-38, 1996.

Mouekouba, L.D.O., Zhang, L., Guan, X., Chen, X., Chen, H., Zhang, J., Zhang, J., Li, J., Yang, Y. and Wang, A., "Analysis of *Clonostachys rosea*-induced resistance to tomato gray mold disease in tomato leaves", **PLoS One**, 9(7), e102690, 2014.

Moussa, Z., Alanazi, Y.F., Khateb, A.M., Eldadamony, N.M., Ismail, M.M., Saber, W.E.I.A. and Darwish, D.B.E., "Domiciliation of *Trichoderma asperellum* suppresses *Globiosporangium ultimum* and promotes pea growth, ultrastructure, and metabolic features", **Microorganisms**, 11(1), 198, 2023.

Mulatu, A., Megersa, N., Abena, T., Kanagarajan, S., Liu, Q., Tenkegna, T.A. and Vetukuri, R.R., "Biodiversity of the genus *Trichoderma* in the rhizosphere of coffee (*Coffea arabica*) plants in Ethiopia and their potential use in biocontrol of coffee wilt disease", **Crops**, 2(2), 120-141, 2022.

Mur, L.A.J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O. and Wasternack, C., "The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include

synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death", ***Plant Physiology***, 140(1), 249-262, 2006.

Murad, A.M., Laumann, R.A., Mehta, A., Noronha, E.F. and Franco, O.L., "Screening and secretomic analysis of enthomopatogenic *Beauveria bassiana* isolates in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton", ***Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology***, 145(3), 333-338, 2007.

Mustafa, U. and Kaur, G., "Studies on extracellular enzyme production in *Beauveria bassiana* isolates", ***International Journal of Biotechnology & Biochemistry***, 6(5), 701-714, 2010.

Nakova, M. and Milieva, E., "Biological activity of *Phytophthora cryptogea* culture filtrate", ***Agricultural Sciences***, 9(22), 21-28, 2017.

Norjmaa, U., Nasamdulam, D., Enkhjargal, B. and Banzragch, D., "Morphological and molecular identification of *Beauveria bassiana* from agricultural soils", ***Mongolian Journal of Agricultural Sciences***, 27(02), 20-24, 2019.

O'Donnell, K., Sutton, D.A., Fothergill, A., McCarthy, D., Rinaldi, M.G., Brandt, M.E., Zhang, N. and Geiser, D.M., "Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex", ***Journal of Clinical Microbiology***, 46(8), 2477-2490, 2008.

O'Donnell, K., McCormick, S.P., Busman, M., Proctor, R.H., Ward, T.J., Doeiring, G., Geiser, D.M., Alberts, J.F. and Rheeder, J.P., "Marasas et al. 1984 "Toxigenic *Fusarium* species: identity and mycotoxicology" revisited", ***Mycologia***, 110(6), 1058-1080, 2018.

Ortiz García, C.F., Bautista Muñoz, C., Ramírez Pool, J.A., Ávalos Contreras, N., Cappello García, S. and la Cruz Pérez, D., "Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México", ***Revista Mexicana de Biodiversidad***, 86(4), 947-961, 2015.

Ortiz Urquiza, A. and Keyhani, N.O., "Molecular genetics of *Beauveria bassiana* infection of insects", ***Advances in Genetics***, 94, 165-249, 2016.

Ownley, B.H., Griffin, M.R., Klingeman, W.E., Gwinn, K.D., Moulton, J.K. and Pereira, R.M., "*Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control", ***Journal of Invertebrate Pathology***, 98(3), 267-270, 2008.

Ownley, B.H., Gwinn, K.D. and Vega, F.E., "Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution", ***BioControl***, 55(1), 113-128, 2010.

Ozbay, N. and Newman, S.E., "Biological control with *Trichoderma* spp. with emphasis on *T. harzianum*", ***Pakistan Journal of Biological Sciences***, 7(4), 478-484, 2004.

Ozturkoglu Budak, S., Wiebenga, A.d., Bron, P.A. and de Vries, R.P., "Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese", ***International Journal of Food Microbiology***, 237, 17-27, 2016.

Patocka, J., "Bioactive metabolites of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*", ***Military Medical Science Letters***, 85(2), 80-88, 2016.

Pegg, G.F. and Brady, B.L., *Verticillium wilts*, **CABI**, Netherlands, 2002.

Peng, Y., Li, S.J., Yan, J., Tang, Y., Cheng, J.P., Gao, A.J., Yao, X., Ruan, J.J. and Xu, B.L., "Research progress on phytopathogenic fungi and their role as biocontrol agents", ***Frontiers in Microbiology***, 12, 670135, 2021.

Petlamul, W., Sriporngam, T., Buakwan, N., Buakaew, S. and Mahamad, K., "The capability of *Beauveria bassiana* for cellulase enzyme production", ***Proceedings of the 7th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics***, Thailand, 62-66, 21-23 January, 2017.

Prabhukarthikeyan, S.R., Karthikeyan, G., Jeyarani, S. and Raguchander, T., "PCR based amplification of chitinase gene from native isolates of *Beauveria bassiana*", **Journal of Biological Control**, 28(1), 31–34, 2014.

Prieto, P., Navarro Raya, C., Valverde Corredor, A., Amyotte, S.G., Dobinson, K.F. and Mercado Blanco, J., "Colonization process of olive tissues by *Verticillium dahliae* and its in planta interaction with the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7", **Microbial Biotechnology**, 2(4), 499-511, 2009.

Punja, Z.K., Collyer, D., Scott, C., Lung, S., Holmes, J. and Sutton, D., "Pathogens and molds affecting production and quality of *Cannabis sativa* L", **Frontiers in Plant Science**, 10, 1120, 2019.

Purdy, L.H., "*Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact", **Phytopathology**, 69(8), 875-880, 1979.

Pus, W., Plant-mediated effects of *Trichoderma* spp. and *Beauveria bassiana* isolates on insect and pathogen resistance, Master Thesis, **Lincoln University**, New Zeland, s. 62, 2017.

Qu, S. and Wang, S., "Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system", **Developmental & Comparative Immunology**, 83, 96-103, 2018.

Quintanilha Peixoto, G., Torres, R.O., Reis, I.M.A., de Oliveira, T.A.S., Bortolini, D.E., Duarte, E.A.A., Azevedo, V.A.d.C., Brenig, B., Aguiar, E.R.G.R. and Soares, A.C.F., "Calm before the storm: a glimpse into the secondary metabolism of *Aspergillus welwitschiae*, the etiologic agent of the sisal bole rot", **Toxins**, 11(11), 631, 2019.

Rani, K., "Comparative study of kinetic parameters of bacterial and fungal amylases", **Journal of Bio Innovation**, 1(3), 48-57, 2012.

Rawlings, N.D. and Barrett, A.J., "Evolutionary families of peptidases", **Biochemical Journal**, 290(1), 205-218, 1993.

Rees, H.J., Getting to the root of the problem: understanding and controlling *Armillaria*, Doctoral Thesis, **University of Bristol**, UK, s. 268, 2021.

Rehner, S.A., "Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*", ***Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution***, 3, 27-35, 2005.

Roberts, D.W. and Hajek, A.E., Entomopathogenic fungi as bioinsecticides, In: *Frontiers In Industrial Mycology*, **Springer**, Switzerland, 1992.

Roberts, D.W. and Humber, R.A., "Entomogenous fungi", ***Biology of Conidial Fungi***, 2(201), 86, 1981.

Rodriguez, M.A., Cabrera, G., Gozzo, F.C., Eberlin, M.N. and Godeas, A., "*Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent", ***Journal of Applied Microbiology***, 110(5), 1177-1186, 2011.

Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y. and Hunt, M.D., "Systemic acquired resistance", ***The Plant Cell***, 8(10), 1809–1819, 1996.

Saremi, H., Amiri, M.E. and Mirabolfathi, M., "Application of soil solarization for controlling soilborne fungal pathogens in newly established pistachio and olive orchards", ***International Journal of Fruit Science***, 10(2), 143-156, 2010.

Sayed, M., Abdel Rahman, T., Ragab, A. and Abdellatif, A., "Biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by chitinolytic *Trichoderma* spp.", ***Egyptian Journal of Agronematology***, 18(1), 30-47, 2019.

Schmutterer, H. and Huber, J.r., *Natürliche Schädlingsbekämpfungsmittel*, **Ulmer**, Germany, 2005.

Schroers, H.J., Samuels, G.J., Seifert, K.A. and Gams, W., "Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to

Bionectria ochroleuca, and notes on other *Gliocladium*-like fungi", ***Mycologia***, 91(2), 365-385, 1999.

Schubert, M., Fink, S. and Schwarze, F.W.M.R., "In vitro screening of an antagonistic *Trichoderma* strain against wood decay fungi", ***Arboricultural Journal***, 31(4), 227-248, 2008.

Schuhmacher, R., Stoppacher, N. and Zeilinger, S., "Peptaibols of *Trichoderma atroviride*: screening, identification, and structure elucidation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry", ***Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology***, 609-617, 2007.

Sebumpan, R., Guiritan, K.R., Suan, M., Abapo, C.J., Bhat, A.H., Machado, R.A.R., Nimkingrat, P. and Sumaya, N.H., "Morphological and molecular identification of *Trichoderma asperellum* isolated from a dragon fruit farm in the southern Philippines and its pathogenicity against the larvae of the super worm, *Zophobas morio* (Fabricius, 1776)(Coleoptera: Tenebrionidae)", ***Egyptian Journal of Biological Pest Control***, 32(1), 1-7, 2022.

Shang, Y., Xiao, G., Zheng, P., Cen, K., Zhan, S. and Wang, C., "Divergent and convergent evolution of fungal pathogenicity", ***Genome Biology and Evolution***, 8(5), 1374-1387, 2016.

Shankar Naik, B., "Potential roles for endophytic fungi in biotechnological processes: a review", ***Plant and Human Health, Volume 2: Phytochemistry and Molecular Aspects***, 327-344, 2019.

Siddiquee, S., Practical handbook of the biology and molecular diversity of *Trichoderma* species from tropical regions, ***Springer***, Switzerland, 2017.

Silva, R.N., Monteiro, V.N., Steindorff, A.S., Gomes, E.V., Noronha, E.F. and Ulhoa, C.J., "*Trichoderma*/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security", ***Fungal Biology***, 123(8), 565-583, 2019.

Sinha, K.K., Choudhary, A.K. and Kumari, P., Entomopathogenic fungi, In: Ecofriendly Pest Management for Food Security, **Elsevier**, London, 2016.

Smolińska, U. and Kowalska, B., "Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* a review", **Journal of Plant Pathology**, 100(1), 1-12, 2018.

Somai, B.M., Dean, R.A., Farnham, M.W., Zitter, T.A. and Keinath, A.P., "Internal transcribed spacer regions 1 and 2 and random amplified polymorphic DNA analysis of *Didymella bryoniae* and related *Phoma* species isolated from cucurbits", **Phytopathology**, 92(9), 997-1004, 2002.

Soyer, J.L., Hamiot, A., Ollivier, B., Balesdent, M.H., Rouxel, T. and Fudal, I., "The APSES transcription factor LmStuA is required for sporulation, pathogenic development and effector gene expression in *Leptosphaeria maculans*", **Molecular Plant Pathology**, 16(9), 1000-1005, 2015.

Spadaro, D. and Gullino, M.L., "Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens", **Crop Protection**, 24(7), 601-613, 2005.

Steyaert, J.M., Ridgway, H.J., Elad, Y. and Stewart, A., "Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*", **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, 31(4), 281-291, 2003.

Stojšin, V., Balaž, F., Bagi, F. and Keljački, I., "Pathogenicity of *Fusarium* spp. isolates from sugar beet root", **Zaštita Bilja**, 52(4), 241-249, 2001.

Subbarao, K.V., "Progress toward integrated management of lettuce drop", **Plant Disease**, 82(10), 1068-1078, 1998.

Subramanian, C. and Punamalai, G., "Optimization process for blastospore production of *Beauveria bassiana* isolates in poly ethylene glycol (peg) supplemented medium", **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 2(11), 114-122, 2013.

Suharto, T.E.B. and Purnomo, H., "Kajian aspek fisiologik *Beauveria bassiana* dan virulensinya terhadap *Helicoverpa armigera*", ***Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia***, 4(2), 112-119, 1998.

Sukumaran, R.K., Singhanian, R.R. and Pandey, A., "Microbial cellulases-production, applications and challenges", ***Journal of Scientific & Industrial Research***, 64, 832-844, 2005.

Summerbell, R.C., Aspergillus, Fusarium, Sporothrix, Piedraia and their relatives, In: Pathogenic Fungi in Humans and Animals, D.H. Howard, **CRC Press**, USA, 2003.

Summerell, B.A., "Resolving *Fusarium*: current status of the genus", ***Annual Review of Phytopathology***, 57, 323-339, 2019.

Sun, Z.B., Li, S.D., Ren, Q., Xu, J.L., Lu, X. and Sun, M.H., "Biology and applications of *Clonostachys rosea*", ***Journal of Applied Microbiology***, 129(3), 486-495, 2020.

Sutton, J.C., Li, D.W., Peng, G., Yu, H., Zhang, P. and Valdebenito Sanhueza, R.M., "*Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops", ***Plant Disease***, 81(4), 316-328, 1997.

Tamta, A.K., Pandey, R., Sharma, J.R., Rai, R., Barman, M., MG, D., Mitra, D., Mohapatra, P.K.D., Sami, R. and Al Mushhin, A.A.M., "First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) entomopathogenic fungus in the mango hopper *Amritodus atkinsoni* (Hemiptera: Cicadellidae)", ***Pathogens***, 11(12), 1447, 2022.

Tariq, M., Yasmin, S. and Hafeez, F.Y., "Biological control of potato black scurf by rhizosphere associated bacteria", ***Brazilian Journal of Microbiology***, 41, 439-451, 2010.

Tariq, V.N., Gutteridge, C.S. and Jeffries, P., "Comparative studies of cultural and biochemical characteristics used for distinguishing species within *Sclerotinia*", ***Transactions of The British Mycological Society***, 84(3), 381-397, 1985.

Ten, L.N., Im, W.T., Kim, M.K., Kang, M.S. and Lee, S.T., "Development of a plate technique for screening of polysaccharide-degrading microorganisms by using a mixture of insoluble chromogenic substrates", **Journal of Microbiological Methods**, 56(3), 375-382, 2004.

Thompson, S.R., Brandenburg, R.L. and Arends, J.J., "Impact of moisture and UV degradation on *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin conidial viability in turfgrass", **Biological Control**, 39(3), 401-407, 2006.

Thynne, E., Saur, I.M.L., Simbaqueba, J., Ogilvie, H.A., Gonzalez Cendales, Y., Mead, O., Taranto, A., Catanzariti, A.M., McDonald, M.C. and Schwessinger, B., "Fungal phytopathogens encode functional homologues of plant rapid alkalization factor (RALF) peptides", **Molecular Plant Pathology**, 18(6), 811-824, 2017.

Toghueo, R.M.K., Zabalgoeazcoa, I., de Aldana, B.V. and Boyom, F.F., "Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Cananga odorata*", **South African Journal of Botany**, 109, 146-153, 2017.

Tsakas, S. and Marmaras, V.J., "Insect immunity and its signalling: an overview", **Invertebrate Survival Journal**, 7(2), 228-238, 2010.

Tzelepis, G., Dubey, M., Jensen, D.F. and Karlsson, M., "Identifying glycoside hydrolase family 18 genes in the mycoparasitic fungal species *Clonostachys rosea*", **Microbiology**, 161(7), 1407-1419, 2015.

Tziros, G.T., Samaras, A. and Karaoglanidis, G.S., "Fusarium equiseti as an emerging foliar pathogen of lettuce in Greece: Identification and development of a real-time PCR for quantification of inoculum in soil samples", **Pathogens**, 11(11), 1357, 2022.

van Lenteren, J.C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W.J. and Urbaneja, A., "Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities", **BioControl**, 63(1), 39-59, 2018.

Vega, F.E., "The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review", ***Mycologia***, 110(1), 4-30, 2018.

Vega, F.E., Goettel, M.S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M.A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N.K., Monzon, A. and Ownley, B.H., "Fungal entomopathogens: new insights on their ecology", ***Fungal Ecology***, 2(4), 149-159, 2009.

Vega, F.E., Meyling, N.V., Luangsa-ard, J.J. and Blackwell, M., "Fungal entomopathogens", ***Insect Pathology***, 171-220, 2012.

Vertyporokh, L., Hulaś Stasiak, M. and Wojda, I., "Host–pathogen interaction after infection of *Galleria mellonella* with the filamentous fungus *Beauveria bassiana*", ***Insect Science***, 27(5), 1079-1089, 2020.

Vidal, S. and Jaber, L.R., "Entomopathogenic fungi as endophytes: plant–endophyte–herbivore interactions and prospects for use in biological control", ***Current Science***, 109(1), 46-54, 2015.

Vinale, F., Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., Woo, S. and Lorito, M., "Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens", ***Letters in Applied Microbiology***, 48(6), 705-711, 2009.

Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E.L., Lorito, M. and Sivasithamparam, K., "Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens", ***Letters in Applied Microbiology***, 43(2), 143-148, 2006.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L. and Lorito, M., "Trichoderma–plant–pathogen interactions", ***Soil Biology and Biochemistry***, 40(1), 1-10, 2008.

Vincent, J.M., "The esters of 4-hydroxybenzoic acid and related compounds. Part I. Methods for the study of their fungistatic properties", ***Journal of the Society of Chemical Industry***, 66(5), 149-155, 1947.

Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L. and Chet, I., "Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens", ***Antonie Van Leeuwenhoek***, 81, 549-556, 2002.

Wagner, B.L. and Lewis, L.C., "Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*", ***Applied and Environmental Microbiology***, 66(8), 3468-3473, 2000.

Wang, C., Fan, M., Li, Z. and Butt, T.M., "Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China", ***Journal of Applied Microbiology***, 96(4), 861-870, 2004.

Wang, H., Peng, H., Li, W., Cheng, P. and Gong, M., "The toxins of *Beauveria bassiana* and the strategies to improve their virulence to insects", ***Frontiers in Microbiology***, 12, 705343, 2021.

Wang, J.B., Zhang, W.J. and Chen, J.K., "Application of ITS sequences of nuclear rDNA in phylogenetic and evolutionary studies of angiosperms", ***Journal of Systematics and Evolution***, 37(4), 407, 1999.

Wang, Q. and Xu, L., "Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review", ***Molecules***, 17(3), 2367-2377, 2012.

Wang, X.K., Wang, C.Y., Xie, C.J. and Yang, X.Y., "Advances in molecular mechanisms of *Verticillium* pathogenicity and plant resistance to *Verticillium* wilt", ***Journal of Henan Agricultural Sciences***, 43(1), 1-6, 2014.

Wang, Y., Duan, Y., Wang, J. and Zhou, M., "A new point mutation in the iron–sulfur subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to boscalid in *Sclerotinia sclerotiorum*", ***Molecular Plant Pathology***, 16(7), 653-661, 2015.

Wang, Y., Tang, D.X., Luo, R., Wang, Y.B., Thanarut, C., Dao, V.M. and Yu, H., "Phylogeny and systematics of the genus *Clonostachys*", ***Frontiers in Microbiology***, 14, 1117753, 2023.

Willetts, H.J. and Wong, J.A.L., "The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature", ***The Botanical Review***, 46(2), 101-165, 1980.

Woo, S.L., Donzelli, B., Scala, F., Mach, R., Harman, G.E., Kubicek, C.P., Del Sorbo, G. and Lorito, M., "Disruption of the ech42 (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1", ***Molecular Plant-Microbe Interactions***, 12(5), 419-429, 1999.

Xiao, Z., Zhao, Q., Li, W., Gao, L. and Liu, G., "Strain improvement of *Trichoderma harzianum* for enhanced biocontrol capacity: Strategies and prospects", ***Frontiers in Microbiology***, 14, 1146210, 2023.

Yan, J.M., Shi, X.H., Mei, M., Dai, H.B. and Ye, H.Z., "Amplifying and sequencing analysis the internal transcribed spacer (ITS) regions of *Olpidium viciae* Kusano's ribosomal DNA in broad bean", ***Advanced Materials Research***, 271, 507-513, 2011.

Yan, L. and Qian, Y., "Cloning and heterologous expression of SS10, a subtilisin-like protease displaying antifungal activity from *Trichoderma harzianum*", ***FEMS Microbiology Letters***, 290(1), 54-61, 2009.

Yang, J., Gan, Z., Lou, Z., Tao, N., Mi, Q., Liang, L., Sun, Y., Guo, Y., Huang, X. and Zou, C., "Crystal structure and mutagenesis analysis of chitinase CrChi1 from the nematophagous fungus *Clonostachys rosea* in complex with the inhibitor caffeine", ***Microbiology***, 156(12), 3566-3574, 2010.

Yin, Z., Ke, X., Kang, Z. and Huang, L., "Apple resistance responses against *Valsa mali* revealed by transcriptomics analyses", ***Physiological and Molecular Plant Pathology***, 93, 85-92, 2016.

Yun, H.G., Kim, D.J., Gwak, W.S., Shin, T.Y. and Woo, S.D., "Entomopathogenic fungi as dual control agents against both the pest *Myzus persicae* and phytopathogen *Botrytis cinerea*", **Mycobiology**, 45(3), 192-198, 2017.

Zeilinger, S., Gupta, V.K., Dahms, T.E.S., Silva, R.N., Singh, H.B., Upadhyay, R.S., Gomes, E.V., Tsui, C.K.M. and Nayak S, C., "Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants", **FEMS Microbiology Reviews**, 40(2), 182-207, 2016.

Zhang, F., Yuan, J., Yang, X., Cui, Y., Chen, L., Ran, W. and Shen, Q., "Putative *Trichoderma harzianum* mutant promotes cucumber growth by enhanced production of indole acetic acid and plant colonization", **Plant and Soil**, 368, 433-444, 2013.

Zhang, J., Fang, H., Zhou, H., Sanogo, S. and Ma, Z., "Genetics, breeding, and marker-assisted selection for *Verticillium wilt* resistance in cotton", **Crop Science**, 54(4), 1289-1303, 2014.

Zhang, L., Yang, J., Niu, Q., Zhao, X., Ye, F., Liang, L. and Zhang, K.Q., "Investigation on the infection mechanism of the fungus *Clonostachys rosea* against nematodes using the green fluorescent protein", **Applied Microbiology and Biotechnology**, 78, 983-990, 2008.

Zhao, M.L., Huang, J.S., Mo, M.H. and Zhang, K.Q., "A potential virulence factor involved in fungal pathogenicity: serine-like protease activity of nematophagous fungus *Clonostachys rosea*", **Fungal Divers**, 19, 217-234, 2005.

Zhao, P., Zhao, Y.L., Jin, Y., Zhang, T. and Guo, H.S., "Colonization process of *Arabidopsis thaliana* roots by a green fluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahliae*", **Protein & Cell**, 5(2), 94-98, 2014.

Zimmermann, G., "Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*", **Biocontrol Science and Technology**, 17(6), 553-596, 2007.

Zou, C.G., Tao, N., Liu, W.J., Yang, J.K., Huang, X.W., Liu, X.Y., Tu, H.H., Gan, Z.W. and Zhang, K.Q., "Regulation of subtilisin-like protease *prC* expression by nematode

cuticle in the nematophagous fungus *Clonostachys rosea*", ***Environmental Microbiology***, 12(12), 3243-3252, 2010.



EKLER

Ek-A Tez çalışmasından izole edile türlerin veri bankasına yüklendiği isimler

Katılım	İzole edilen türler	Accession number (GI)
SUB14450764	<i>Trichoderma asperellum</i> 51.YAG	PP799808
SUB14450764	<i>Trichoderma virens</i> 51.YA	PP799809
SUB14450764	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> 51 YAG	PP799810
SUB14450764	<i>Trichoderma koningiopsis</i> 01.YA	PP799811
SUB14450764	<i>Clonostachys rosea</i> 51.YAG	PP799812
SUB14450764	<i>Clonostachys rosea</i> 01.YAG	PP799813
SUB14450764	<i>Fusarium solani</i> 01.YAG	PP799814
SUB14450764	<i>Fusarium solani</i> 51.YA	PP799815
SUB14450764	<i>Fusarium equiseti</i> 01.YAG	PP799816
SUB14450764	<i>Fusarium redolens</i> 51.YAG	PP799817
SUB14450764	<i>Trichoderma harzianum</i> 01.YAG	PP799818
SUB14450764	<i>Trichoderma harzianum</i> 51.YA	PP799819
SUB14450764	<i>Beauveria bassiana</i> 01.YA	PP799820
SUB14450764	<i>Beauveria bassiana</i> 01.2YA	PP799821
SUB14450764	<i>Trichoderma pleuroticola</i> 51.YA	PP799822
SUB14450764	<i>Trichoderma pleuroticola</i> 51.2YA	PP799823
SUB14450764	<i>Trichoderma citrinoviride</i> 51.YA	PP799824
SUB14450764	<i>Trichoderma citrinoviride</i> 51.2YA	PP799825
SUB14450764	<i>Trichoderma saturnisporum</i> 01.YA	PP799826
SUB14450764	<i>Trichoderma saturnisporum</i> 01.2YA	PP799827

ÖZ GEÇMİŞ

Yunus BOZKURT tarihinde’in ilçesi’te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini’te tamamladı. 2016 yılında Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoteknoloji Bölümünde lisans eğitimine başladı. 2020 yılında mezun oldu. 2021 yılında Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Biyoteknoloji anabilim dalında tezli yüksek lisansa başladı.



