

## Çankırı (Eldivan) Karaçam Orman Topraklarında Saptanan Bazı Mikrofungusların *in vitro* Koşullarda Antagonistik Etkileşimlerinin Belirlenmesi<sup>1</sup>

Funda OSKAY<sup>a</sup>, Ziya ŐİMŐEK<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Çankırı Karatekin Üniversitesi Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü, Çankırı, Türkiye

\*Sorumlu yazar: fundaoskay@karatekin.edu.tr

### Öz

Bu çalışma, Çankırı ili Eldivan ilçesi Karaçam orman topraklarında saptanan bazı mikrofungusların *in vitro* koşullarda antagonistik etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçla, araştırma alanı topraklarından izole edilen fungal izolatlar arasından seçilen 18 izolat kullanılarak, indikatör ve potansiyel antagonistlerin PDA besi ortamında eş zamanlı olarak kültüre alınması ilkesine dayanan bir ikili kültür metodu olan fungal disk tekniği kullanılarak fungal inhibisyon testleri gerçekleştirilmiştir. Bu testlerde; *Trichoderma* (6 izolat), *Trichothecium* (1 izolat), *Ulocladium* (1 izolat) ve *Penicillium* (3 izolat) cinslerine bağlı türlerden toplam 11 izolat antagonist; *Fusarium* (5 izolat), *Thysanophora* (1 izolat) ve *Aspergillus* (1 izolat) cinslerine ait toplam 7 izolat ise indikatör olarak kullanılmıştır. Elde edilen bulgulara göre; test edilen indikatör izolatlara karşı en yüksek oranda antagonistik etkiye sahip izolatın ortalama % 73,86 engelleme oranı ile *Trichoderma harzianum*'a ait T9 izolatı olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca bu izolat, *Fusarium* sp.3'e ait F3 izolatına karşı gösterdiği %92 inhibisyon değeri ile tüm antagonistler arasında en yüksek engelleme değerine sahip izolat olarak belirlenmiştir. Öte yandan, *Penicillium chrysogenum*, *P. decumbens*, *P. glabrum*, *Trichothecium roseum* ve *Ulocladium atrum* izolatlarının fungal inhibisyon testlerinde sözü edilen indikatör funguslara karşı *Trichoderma* izolatları kadar etkili olmadıkları belirlenmiştir. Sonuç olarak, *Trichoderma* cinsine bağlı 6 izolatın (T2, T3, T9, T10, T13, T14) ortalama inhibisyon değerinin (%69,60), diğer antagonistlerden (% 40,89 – 51,00) daha yüksek düzeyde bulunduğu anlaşılmıştır. *Trichoderma harzianum*'a ait T9 izolatının, özellikle, orman fidanlıklarında sorun olan toprak ve tohum kökenli patojen fungusların biyolojik mücadelesinde kullanılabilme potansiyellerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda değerlendirilebileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Trichoderma*, Biyoloji mücadele, Fungal inhibisyon, antagonizm, Karaçam, Çankırı, Mikrofunguslar

## Determination of *in vitro* Antagonistic Interactions of Certain Microfungi Determined in Çankırı (Eldivan) Black Pine Forest Soils

### Abstract

This study was carried out to determine the antagonistic interactions of some microfungi isolated from black pine forests from Eldivan, Çankırı province between 2006 and 2007. For this purpose, fungal inhibition tests were carried out through a dual culture method; Fungal Disc Technique that is based on simultaneous cultivation of indicator organisms and potential antagonists in PDA medium using 18 isolates selected from the fungal isolates obtained from the soils of the study area. In these tests, while some isolates (11 isolates) from isolates belonging to *Trichoderma* (6 isolates), *Trichothecium* (1 isolate), *Ulocladium* (1 isolate) and *Penicillium* (3 isolates) were used as antagonist; 7 isolates belonging to the genus *Fusarium* (5 isolates), *Thysanophora* (1 isolate) and *Aspergillus* (1 isolate) were used as indicators. According to findings, it was understood that the isolate having the highest antagonistic effect against the tested indicator isolates was T9 isolate of *Trichoderma harzianum* with an average inhibition rate of 73.86%. In addition, this isolate was identified as the isolate with the highest inhibitory value among all antagonists with a 92% inhibition value against the F3 isolate of *Fusarium* sp. 3. However, in fungal inhibition tests of *Penicillium chrysogenum*, *P. decumbens*, *P. glabrum*, *Trichothecium roseum* and *Ulocladium atrum* isolates, were not as effective as *Trichoderma* isolates against indicator fungi. As a result, the mean inhibition value (69,60%) of the 6 isolates of *Trichoderma* genus (T2, T3, T9, T10, T13, T14) was higher than other antagonists (40,89-51,00%). The T9 isolate of *T.*

<sup>1</sup> Bu çalışma, Ankara Üniversitesi, Fenbilimleri Enstitüsü Orman Mühendisliği Anabilim dalında, 2007 yılı Őubat ayında tamamlanan, Çankırı İli Eldivan İlçesi Karaçam Orman Topraklarındaki Fungal Floranın ve İn-Vitro'da Antagonistik Etkileşimlerinin Belirlenmesi" isimli Yüksek lisans tez çalışmasının bir bölümünü kapsamaktadır.

*harzianum* could be evaluated in studies to determine its potential in biological control of soil and seed pathogenic fungi in forest nurseries.

**Keywords:** *Trichoderma*, Fungal inhibition, antagonism, Black Pine, ankırı, microfung

## 1. GİRİŐ

Toprak fungusları; doğal ve iŐlenmiŐ topraklarda, diğer toprak mikroorganizmaları ile birlikte organik maddenin ayrıŐtırılması, toksin maddelerin ortadan kaldırılması, karbon, azot, fosfor ve sülür döngüleri ve toprak strüktürünün oluŐumu gibi ekosistem süreçlerinde anahtar rol almak sureti ile toprak fonksiyonlarının muhafaza edilmesinde kritik öneme sahiptirler (Christenson 1981, Deacon 2005, Fisher ve Binkley 2000). Bunlara ek olarak, toprak kökenli bitki hastalıklarının baskı altına alınmasında ve bitki gelişiminin desteklenmesinde de rol alırlar (Haktanır ve Arcak 1997; Doğmuş ve Doğanoğlu 2003; Garbeva vd., 2004). Toprak fungusları doğada saf kültürler halinde yaşamlarını sürdürmezler. Belirli habitatlarda faaliyetlerini sürdürürlerken, karıŐık bir kültür manzarası gösterirler. Aynı yerde yaşayan fungal popülasyonlar arasında da sürekli bir etkileŐim mevcuttur. Bu karıŐık etkileŐimler incelendiğinde, toprakların bünyesinde, mikroorganizmalar arasında beliren rekabet ve antagonistik etkileŐimleri içerdii görölür (Waksman 1944, Öner 2002). Toprakta yaşamakta olan çeşitli organizmalar veya popülasyonlar arasındaki karıŐıklı etkileŐimler, organizmalardan birinin veya her ikisinin uyarılmasına (stimulation) veya engellenmesine (inhibisyon) bağlı olarak olumlu veya olumsuz olabilir (Cook, 1993). Toprakta süregelen bu etkileŐimler doğal ekosistemlerde yani bozulmamıŐ, dengesi deęiŐtirilmemiŐ ortamlarda toprakta bulunan canlıların popülasyonlarını dengede tutmalarını sağlar. Biyolojik çeŐitlilięin sürekliliğinde olduğu kadar zararlı popülasyonlarının baskı altında tutulmasında da bu etkileŐimler olduğa önemlidir. Birçok antagonistik mikroorganizma topraklarda doğal olarak bulunur ve insan aktivitesi olmaksızın bitki hastalıkları üzerinde belirli seviyelerde biyolojik mücadeleyi sağlarlar (Papavizas 1985; Garbeva vd. 2004; Kiewnick ve Sikora 2006).

Birçok fungusun, bakteri ve diğer funguslar baŐta olma üzere çeşitli mikroorganizmaları antagonize edebilme yetenekleri uzun yıllardan bu yana bilinmektedir (Weinding ve Fawcett 1934; Novogradsky 1936; Waksman 1941; Waksman ve Horning 1943; Waksman 1944). Nitekim, *Trichoderma* Pers., *Penicillium* Link, *Gliocladium* Corda, *Aspergillus* P. Micheli ex Haller gibi

saprotitik karakterli fungus cinsleri ile patojen olmayan bazı *Fusarium* Link, *Pythium* Pringsh gibi cinslere ait türlerin, toprak patojenlerinin baŐlıca antagonistleri arasında yer aldığı 1920’li yıllara dayanan çalışmalarda belirlenmiştir (Weinding 1934; Weinding ve Fawcett 1934; Raistrick vd., 1941; Waksman vd., 1942; Waksman ve Horning 1943). Özellikle, *Trichoderma* cinsine ait fungusların bitki patojenlerine karşı biyolojik etmen olarak davranma yetenekleri 1920’li yıllardan beri bilinmekte olup, yüzlerce araştırma sonucunda, *Trichoderma* türlerinin fungal bitki patojenlerinin biyolojik mücadelesinde olduğu etkili olduğu ortaya konulmuŐtur. Üzerinde en fazla çalıŐılan ve biyolojik mücadelede kullanılan *Trichoderma* türleri *Trichoderma harzianum* Rifai, *T. virens* (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx, *T. viride* Pers., *T. asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg olmakla birlikte, ticari biyolojik mücadele preparatları *T. polysporum* (Link) Rifai, *T. stromaticum* Samuels & Pardo-Schulth, *T. harzianum* ve *T. virens* türlerini içermektedir (Samuels 2004). Bazı *Penicillium* türlerinin de antifungal bileşikler üreterek topraklarda bitkileri fitopatojenlerinden koruyucu etki gösterdikleri bilinmektedir. Örneğin, Santamarina vd., (2002), *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* Link, *Alternaria* Nees ve *Trichoderma* cinslerine ait 70 izolatin antibiyotik aktivitelerini test ederek bunlar arasından baktericidal, fungisidal, insekticidal etkiye sahip olanları belirlemeye çalıŐmıŐtır. Söz konusu çalışmada, in vitro koşullarda, en yüksek aktivitenin üç *Penicillium oxalicum* Currie & Thom, bir *P. decumbens* Thom ve bir *T. harzianum* izolatu ile sağlandığı tespit edilmiŐ, antibiyotik üretme yetenekleri ile iyi bilinen *Penicillium* cinsi fungusların izolatlarının birçoğunun pozitif sonuçlar verdiğini belirtilmiŐtir. Benzer Őekilde, Yamaji and Fukushi (2005) orman fidanlıklarında *Picea glehnii* (F.Schmidt) Mast fidiciklerinde ökerten hastalığına sebep olan *Pythium vexans* de Bary ‘a karşı antifungal aktiviteye sahip olduğu tespit edilen *Penicillium frequentans* Westling izolatlarının biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymuŐlardır.

Konu ile ilgili ülkemizde yapılan alıŐmalar incelendiğinde; orman topraklarından izole edilen *Trichoderma* türlerinin baŐında *T. harzianum*’un geldiği anlaŐılmaktadır (BaŐpınar ve ınar 1995b,

Hasenekoğlu ve Azaz 1991, Küçük 2000, Azaz ve Pekel 2002,). Ülkemiz topraklarından izole edilen *Trichoderma* cinsine ait diğer türlerden bazıları; *Trichoderma aureoviride* Rifai, *T. viride* Pers, *T. polysporum* (Link ex Pers.) Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai, *T. koningii* Oud. ve Koning, *T. longibronchiatum* Rifai' dur (Hasenekoğlu ve Azaz 1991, olakoğlu 2002). Ülkemizde toprak funguslarının özellikle de *T. harzianum*'un bazı bitki patojeni funguslara karşı antifungal etkilerinin araŐtırıldıđı çok sayıda araŐtırmada, *Trichoderma* izolatlarının fitopatogen funguslara karşı antagonistik etki gösterdikleri belirlenmiştir (Kıvanç ve Kk, 2003, 2004).

Oskay (2007) ile Oskay ve ŐimŐek (2017), ankırı ili Eldivan ilçesi karaçam orman topraklarında bulunan mikrofungusları kalitatif ve kantitatif olarak belirlemiŐlerdir. Sözü edilen çalışmalarda, elde edilen fungal izolatların bir kısmının antagonistik özelliğe sahip bir kısmının ise patojenik türleri de bulunan fungal taksonları temsil ettiği bildirilmiŐtir. Söz konusu araŐtırmalarda, araştırma alanı topraklarının mikrofungal kompozisyonu incelendiğinde, en fazla sayıda koloni oluŐturan ve en fazla sayıda tür içeren taksonun *Penicillium* cinsi olduğu, bunu *Trichoderma* spp.'nin takip ettiği grlmektedir. Aynı çalışmada, antagonistik özellikleri iyi bilinen ve birçok çalışmada bitki patojenlerine karşı biyolojik mücadele potansiyeli bakımından değerlendirilmek üzere ele alınan *Trichoderma* cinsine ait *T. harzianum* Rifai ile *T. atroviride* P. Karst, *Trichoderma* sp1., ve *Trichoderma* sp2. olmak üzere 4 türe ait izolatların elde edildiği grlmŐtr. Aynı çalışmada, bulunma frekansı düşük olmakla birlikte, literatürde antagonistik özelliklere sahip olduğu bildirilen *Trichothecium roseum* (Pers.) Link ve *Alternaria atra* (Preuss) Woudenb. & Crous (Syn: *Ulocladium atrum* Preuss) türlerinin de izole edildiği anlaŐılmaktadır.

Bu alıŐma, Oskay ve ŐimŐek (2017) tarafından mikrofungus çeŐitliliđi belirlenmiŐ olan ankırı ili Eldivan ilçesi karaçam orman topraklarından izole edilmiŐ mikrofunguslar arasındaki etkileşimlerin *in vitro* koşullarda yapılan inhibisyon testleri ile incelenmesi ve araştırma alanı topraklarından izole edilen funguslar arasından biyolojik mücadele çalıŐmalarında kullanılabilme potansiyeli olan antagonistik izolatların ortaya koyulması amacıyla, 2006-2007 yılları arasında yrtlmŐtr.

## 2.MATERYAL VE METOT

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Antagonist ve indikatör fungus izolatları

Bu araŐtırmada, mikrofungal floranın *in vitro* koşullarda etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla yürütülen fungal inhibisyon testlerinde 7 farklı indikatör<sup>2</sup> fungus izolatına karşı 11 antagonist fungus izolatu kullanılmıştır (izelge 1). Bu izolatlar, araştırma alanı topraklarından izole edilen funguslar arasından seçilmiŐtir (Oskay 2007; Oskay ve ŐimŐek, 2017). Çalışmada antagonist olarak kullanılan izolatlar, daha önceden antagonistik etkiye sahip olduğu rapor edilmiŐ bazı funguslar (Al-Heeti ve Sinclair 1988, Kubicek ve Harman 1998, Khl ve Molhoek 2001, Kk 2000, Santamarina vd. 2002, Yamaji ve Fukushi 2005, Harman 2004, 2006) arasından, indikatör olarak kullanılan izolatlar ise patojenik formları (fitopatogenik ırkları) da bilinen funguslar arasından seçilmiŐtir. Ancak bu çalışma kapsamında, kullanılan indikatör izolatların patojenik olup olmadığı belirlenmemiŐtir.

### 2.2. Yöntem

#### 2.2.1. Antagonistik etkileşimlerin belirlenmesi (Fungal inhibisyon testleri)

Bu çalışmada, indikatör organizmaların ve potansiyel antagonistlerin PDA besi ortamında eş zamanlı olarak kültüre alınması ilkesine dayanan ikili kültür metodu "Fungal Disk Tekniği" kullanılmıştır (Parkinson 1994). Buna göre; indikatör ve antagonist fungus izolatlarının (izelge 1) her biri ayrı ayrı PDA besiyortamı içeren Petri kaplarında yeterli geliŐmeyi sağlayana kadar (genellikle 7 gün), 25±1°C' ye ayarlı ve 12 saat NUV aydınlatmalı inkübatörde geliŐtirilmiŐtir. Daha sonra antagonist izolatu ve indikatör izolatu bulunduğu Petri kabından, 5 mm çapında mantar delici kullanılarak ayrı ayrı diskler alınmıŐ ve aralarında 5 cm boŐluk olacak Őekilde PDA içeren steril bir Petri kabına ekilmiŐtir (Őekil 1). İndikatör fungusların antagonist içermeyen ortamdaki geliŐimlerinin değerlendirilebilmesi için, her bir

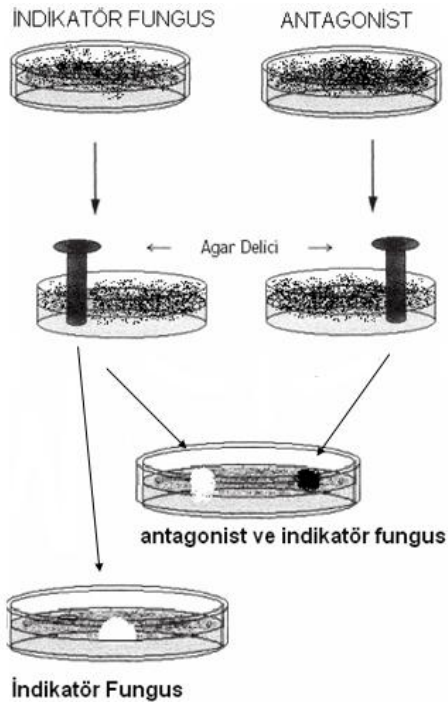
<sup>2</sup> İndikatör organizma ya da test organizması: antagonist(lere) karşı duyarlılığı test edilecek olan organizma

indikatör fungus izolatından 5 mm çapında diskler alınarak PDA içeren steril Petri kaplarına ekilmiŐtir (Őekil 1). Fungal disklerin alınmasında kullanılan mantar deliciler, her kullanımdan önce %96'lık alkole daldırıldıktan sonra alevden geçirilerek sterilize edilmiştir. Ekimleri yapılan petri kaplarının etrafı parafilm ile sarıldıktan sonra 25±1°C' ye ayarlı ve 12 saat NUV aydınlatmalı inkubatre yerleŐtirilmiŐtir. Ölçümler, antagonist içermeyen

besi ortamında geliŐen indikatör fungusun petri kabını tamamen kapladığı zamanda gerçekleştirilmiştir. Bu süreç 1-2 haftayı kapsamıŐtır. Öte yandan, indikatör olarak kullanılan *Thysanophora penicillioides* izolatının geliŐimi oldukça yavaŐ olup, fungusa ait kolonilerin tüm Petri kabını kaplaması söz konusu olmamıŐtır. Bu fungus için ölçümler ikinci haftanın sonunda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge.1 Antagonistik etkileşimlerin belirlenmesinde kullanılan antagonist ile indikatör fungus izolatları

İzolot adı	Antagonist olarak kullanılan funguslar	İzolot adı	İndikatör olarak kullanılan funguslar
T2	<i>Trichoderma atroviride</i> P. Karst	F1	<i>Fusarium</i> sp.1
T3	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	F2	<i>Fusarium</i> sp.2
T9	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	F3	<i>Fusarium</i> sp.3
T10	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	F9	<i>Fusarium</i> sp.1
T13	<i>Trichoderma</i> sp.2	F10	<i>Fusarium</i> sp.5
T14	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	Tp15	<i>Thysanophora penicillioides</i> W.B. Kendr.
Tr	<i>Trichothecium roseum</i> (Pers.) Link	An1	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i> Tiegh
U	<i>Alternaria atra</i> (Preuss) Woudenb. & Crous (Syn: <i>Ulocladium atrum</i> Preuss)		
Pd	<i>Penicillium decumbens</i> Thom		
Pf	<i>Penicillium glabrum</i> (Wehmer) Westling		
Pc	<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom		



Őekil 1. Antagonist ve indikatör funguslar arasındaki etkileŐimin belirlenmesinde fungal disk tekniğinin uygulanmasının Őematik gösterimi

İndikatör fungusun büyümesinin engellenmesi (fungal inhibisyon yüzdesi) aŐaĐıdaki formül ile hesaplanmıŐ (Grondana vd. 1997), ölçümler cetvel

kullanılarak yapılmıŐ ve değerler mm cinsinden kaydedilmiŐtir. Her deney, 3 kez tekrarlanmıŐ, yüzde engelleme (*RI*) değeri ise bunların ortalaması alınarak hesaplanmıŐtır.

$$RI = 100 \times \frac{(R_2 - R_1)}{R_2}$$

$R_1$ , indikatör fungus inokulumu ile bunun oluŐturduĐu koloninin antagonist inokulumu doğrultusunda ölçülen geliŐimi,

$R_2$ , indikatör fungusun maksimum yarıçap geliŐimi gösterdiği doğrultuda ölçülen geliŐimi

### 3.BULGULAR

ankırı (Eldivan) Karaçam Orman topraklarında saptanan bazı mikrofungusların in vitro koşullarda antagonistik etkileşimlerinin belirlenmesi amacı ile ele alınan çalışmamızda elde edilen sonuçlar izelge 2'de verilmiŐ, değerlendirmeye konu olan ikili ekimlerde ait görseller ise Őekil 2 ile 3'te yer almıŐtır.

Çizelge 2. İikili ekimler sonucunda elde edilen, antagonist izolatların indikatör fungusları inhibisyon (engelleme) değerleri (%)

İndikatör	Antagonist izolatlarının RI (inhibisyon ya da engelleme) değerleri (%)										
	T2	T3	T9	T10	T13	T14	Tr	U	Pd	Pf	Pc
Funguslar											
F1	77	78	69	63	73	58	56	43	31	44	28
F2	74	76	78	58	70	47	64	-	47	54	32
F3	-	68	<b>92</b>	79	82	76	54	42	40	30	-
F9	54	77	70	62	70	51	51	40	32	53	42
F10	70	80	72	73	74	73	44	-	52	60	37
Tp15	68	54	62	71	47	73	54	42	28	57	47
An1	71	77	74	62	73	78	34	43	-	32	-
Ortalama <sup>a</sup>	69,00	72,86	<b>73,86</b>	66,86	69,86	65,14	51,00	42,00	38,33	47,14	37,20
Ortalama <sup>b</sup>	69,60						51,00	42,00	40,89		

F1:*Fusarium* sp.1; F2:*F.sp.2*; F3:*F.sp.3*; F9:*F.sp.1*; F10: *F.sp.5*

Tp15: *Thysanophora penicillioides*; An1:*Aspergillus niger*

T2:*Trichoderma atroviride*; T3:*T. harzianum*; T9: *T. harzianum*; T10:*T.harzianum*; T13:*T.sp.2*; T14:*T. harzianum*

Tr: *Trichothecium roseum*; U: *Ulocladium atrum*

Pf: *Penicillium glabrum*; Pc: *P. chrysogenum*; Pd: *P. decumbens*

\* :Ölçülebilir nitelikte bir engelleme değerinin elde edilemediği test sonuçları

a: Her bir antagonist izolatın ortalama inhibisyon değeri (%)

b: Antagonist izolatların cins düzeyinde ortalama inhibisyon değerleri (%)

Çizelge 2 incelendiğinde, test edilen izolatlar arasından, ortalamada en yüksek antagonistik etkiye sahip olan fungusun *T. harzianum*'a ait T9 izolatı olduğu (%73,86), bunu yine aynı türe ait T3 izolatının (%72, 86) takip ettiği anlaşılmıştır. Bu izolatları sırası ile *Trichoderma* cinsine ait izolatlar olan T13 (%69, 86), T2 (%69,00), T10 (%66,86), T14 (%65, 14) izolatlarının izlediği belirlenmiştir. Buna göre, *Trichoderma* cinsine ait izolatların indikatör funguslara karşı engelleme başarısı bakımından ilk sıralarda yer aldığı görülmüştür (Çizelge 2). *Trichoderma* izolatlarının ardından, çalışmada antagonist olarak kullanılan diğer izolatların, etki bakımından sırası ile *Trichothecium roseum*'a ait Tr izolatı (%51), *P. glabrum*'a ait Pf izolatı (%47,14), *U. atrum*'a ait U izolatı (%42,00), *P. decumbens*'a ait Pd izolatı ve *P. chrysogenum*'a ait Pc izolatı (%37,20) olduğu anlaşılmıştır. Yine Çizelge 2 incelendiğinde, *Trichoderma* izolatlarının ortalama inhibisyon değerinin %69,60 iken, Tr izolatı hariç (%51,00) diğer antagonist izolatların %50'nin altında etkili oldukları, özellikle *Penicillium* cinsine ait izolatların ortalamada %40,9 ile en düşük engelleme etkisine sahip antagonist grubu olduğu anlaşılmıştır.

Antagonist izolatların etkinlikleri tek tek ele alındığında; T9 izolatının, *Fusarium* sp.3'e ait F3 izolatına karşı gösterdiği %92 inhibisyon değeri ile tüm antagonistler arasında en yüksek engelleme değerine sahip izolat olduğu belirlenmiş (Çizelge 2, Őekil 2), buna ek olarak T3 izolatının, indikatör izolatlar arasından *Fusarium* sp.5 (F10)'e karşı %80 engelleme yüzdesi ile de etkili bir antagonist olduğu anlaşılmıştır (Çizelge 2). *Penicillium* cinsine ait

izolatların ise indikatörlere karşı oldukça düşük etkinliğe sahip oldukları, bu izolatlardan *P. glabrum*'a ait Pf izolatının nispeten daha etkili olduğu, ancak *Trichoderma* izolatları kadar başarılı olamadığı aynı çalışmada belirlenmiştir. İndikatör olarak kullanılan *Fusarium* izolatlarından F9'un diğerlerine kıyasla daha dirençli, F10'un ise daha duyarlı olduğu görülmüştür (Çizelge 2).



Őekil 2. *Trichoderma harzianum*a ait T9 izolatının *Fusarium* (F3) izolatını inhibisyonu

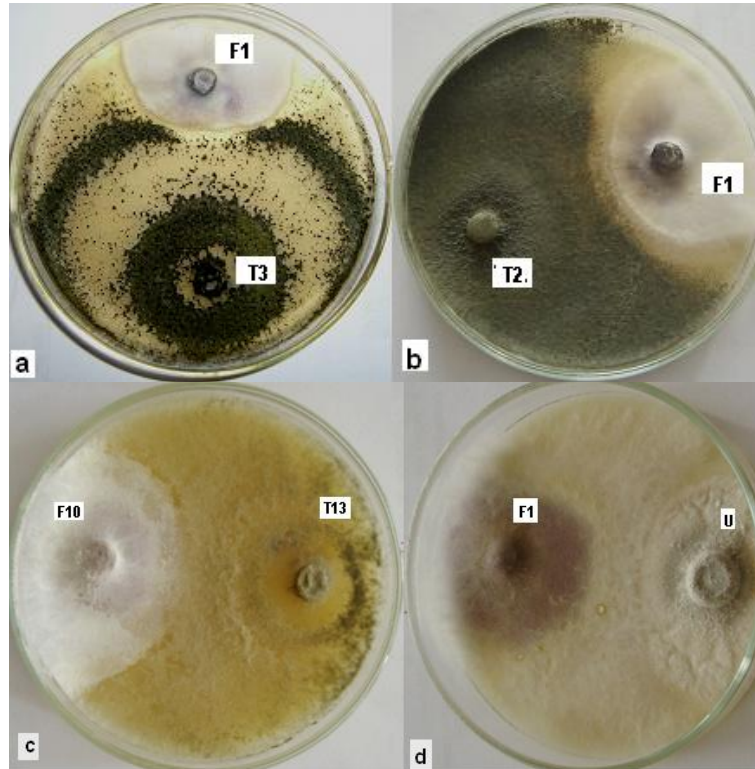
T3 ile F1 ve T2 ile F1 arasında bir engelleme zonunun oluştuğu görülmüştür (Őekil 3a, b). Bu oluşum, sözü edilen izolatlar arasındaki etkileşimde antibiosisin rol aldığının bir göstergesi olarak



düşünölmüştür. Diğer taraftan, T13 ile F10 arasında her hangi bir engelleme zonu gözlemlenmemiştir(Őekil 3c, d). Bu durumda söz konusu izolatların etki mekanizmasının ise mikoparazitizm olabileceği kanısına varılmıştır.

Gerek *Trichoderma*, gerekse diğer antagonist fungus izolatlarının test organizmalarına karşı farklı oranlarda etkili oldukları görölmektedir (Çizelge 2, Őekil 2, 3). Bu durum, yukarıda belirtildiği gibi antagonist izolatlarının antagonizm mekanizması, test organizmasının direnci gibi faktörlerle açıklanabilir. Örneğin inhibisyon testlerinde dikkat çekici bulgulardan biri olarak, *Fusarium* cinsi indikatör fungus F3 e karşı *T. atroviride*'ye ait T2 izolatının hiçbir engelleme gösteremezken, *Trichoderma harzianum*'a ait T9 izolatının aynı fungusu karşı inhibisyon değerı %92 bulunmuştur. İki farklı *Trichoderma* türüne ait izolatlar arasındaki bu büyük farklılık söz konusu antagonistlerin etki mekanizmasıyla ilgili olabilir. Bu indikatörün, kontrolde yavaş gelişmesine rağmen, ikili ekimlerde T2 izolatu üzerinde gelişmeye devam ettiği

gözlemlenmiştir. Buna göre, bu fungusun *T. atroviride* tarafından üretilen enzim ya da metabolitlerden etkilenmediğini, aksine tüm petrinin iki fungus tarafından tümöyle kaplamasının ardından misellial gelişimini sürdürdüğu görölmüştür. T2 izolatının diğer indikatörler üzerindeki etkisi incelendiğinde bu *Trichoderma* izolatının diğerlerine nispeten daha düşük bir etkinliğe sahip olduğu açıkça görölmektedir. T9 izolatının F3 karşı sergilediği yüksek etkinlik ise, indikatörün T9 tarafından üretilen uçucu ya da uçucu olmayan metabolitlere karşı duyarlı olduğunu, ya da indikatörün hücre duvarlarının bu antagonist tarafından kolaylıkla parçalanabileğini işaret etmektedir. Bununla birlikte T9 ve F3 izolatlarının ikili ekimlerde aralarında belirgin bir engelleme zonu oluşmaması etkileşimin kuvvetli bir mikoparazitizme dayanıyor olabileceğini gösterir. Buna ek olarak, petri kabında *Fusarium*'un misellial gelişiminin yer yer azaldığı ve zamanla boşluklar oluştuğu, bunun da lizisle ilişkili olduğu düşünülebilir.



Őekil 3. (a), T3-F1, *Fusarium* (F1) izolatına karşı, %78 inhibisyon değerı ile etkili bulunan *T. harzianum* (T3) izolatının ikili ekimdeki engelleme durumu; (b), T2-F1, %77 inhibisyon değerı ile *Fusarium* (F1) izolatına karşı etkili bulunan *T. atroviride* (T2) izolatının kili ekimdeki engelleme durumu; (c), T13-F10, %74 inhibisyon değerı ile *Fusarium* (F10) izolatına karşı etkili bulunan *Trichoderma* (T13) izolatının kili ekimdeki engelleme durumu; (d), U-F1, %43 inhibisyon değerı ile *Fusarium* (F1) izolatına karşı etkili bulunmayan *Ulocladium atrum* (U) izolatu kili ekimdeki durumu.

#### 4.TARTIŐMA

*Trichoderma* cinsine ait fungusların bitki patojenlerine karşı biyolojik etmen olarak davranma yetenekleri 1920'li yıllardan beri bilinmekte olup, yüzlerce araştırma sonucu, *Trichoderma* türlerinin fungal bitki patojenlerinin biyolojik mücadelesinde oldukça etkili olduğunu ortaya koymaktadır. *Trichoderma* türleri bitki gelişimini hızlandırdığı, bitki savunma mekanizmalarını stimüle ederek, bitkileri toprak kaynaklı patojenlere karşı dirençli hale getirdiği ve çeşitli antibiyotik bileşikler ürettiği için biyolojik mücadelede tercih edilmektedir (Küçük 2000). Bu çalışmamızda da test edilen antagonistler arasından *Trichoderma* cinsine ait izolatların diğer fungal cinslere ait izolatlara kıyasla daha etkili bulunması literatür bildirişleri ile uyumlu bulunmuştur.

Bu çalışmamızda, test edilen *Trichoderma* izolatlarının indikatör fungusların gelişimini engellemede farklı mekanizmalar sergiledikleri tespit edilmiştir. Dennis ve Webster (1971a,b,c), *Trichoderma* türlerinin çok çeşitli antibiyotikler ürettiklerini, *Trichoderma* ırklarının engelleyici etkiye sahip uçucu bileşenler üretme yeteneklerinde dolayı topraklarda kolonize olmalarına yardımcı olduğunu bildirmektedir. *Trichoderma* cinsi fungusların antagonizm mekanizmaları genel olarak antibiosis, liziz ya da mikoparazitizm şeklindedir. *Trichoderma* türleri, mikoparazitizmle yakından ilişkili olduğu düşünölen kitinaz ve glukanaaz gibi hidrolitik enzim aktiviteleri sayesinde birçok fungusun hücre yapılarını parçalarlar (Kubicek ve Harman 1998, Küçük ve Kıvanç 2003, 2004). Bununla birlikte enzim üretimi ya da metabolit üretimi kültür koşulları ve konukçuya göre değişir. Birçok antagonist fungusla birlikte *Trichoderma* türlerinin de farklı funguslara karşı farklı inhibisyon oranlarının, izolatların indikatörlere karşı seçici olduğu ve farklı indikatörlere farklı etki göstermelerinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Hadar vd. 1979, Küçük 2000, Küçük ve Kıvanç 2003, 2004).

Potansiyel biyolojik mücadele etmenleri bakımından orman toprakları oldukça zengindir (Dreisbach 2000, Fisher ve Binkley 2000, ). Ancak biyolojik etmen seçiminde önemli olan husus, topraklardan izole edilen potansiyel antagonistlerin test organizmalarına karşı in-vitro'da etkili bulunmalarından da öte bunların doğal koşullarda stabil kalabilmeleri ve arazi koşullarında hastalık etmenlerini baskı altında tutabilecek popölasyon

seviyesine ulaşabilecek yetenekte olmalarıdır. Ayrıca, in vitro testler, biyolojik mücadele etmenlerinin enzimatik ve antibiyotik aktivitelerinin belirlenmesinde kullanışlı olsa da, organizmaların doğal ortamındaki etkileşimlerini sürdürürken bu mekanizmaların nasıl ve ne kadar etkili olduklarının belirlenmesini sağlayamazlar (Whipp 1987). Bu bilgiler ışığında araştırma alanı mikofungal florasının kalitatif ve kantitatif analizleri sonucu (Oskay ve ŐimŐek 2017) ile bu çalışmamızda gerçekleştirilen in vitro testlerde elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde; bulunma sıklıkları düşük olan antagonistler (*Trichothecium roseum* ve *Ulocladium atrum*) ve in vitroda başarı oranları göreceli olarak düşük olan *Penicillium* izolatların biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılmasının önerilemeyeceği kanısına varılmıştır. Bununla birlikte, *T. harzianum* izolatlarının tümü in vitro testlerde patojen funguslara karşı test edilerek ve ardından in vivo'da denenerek biyolojik mücadele de kullanılabilirlikleri araştırılabilir. Bu test sonuçları, araştırma alanı topraklarında bulunma sıklığı yüksek olan *T. harzianum*'a ait izolatların *Fusarium* türleri üzerinde önemli derecede engelleyici etkiye sahip olduklarını ortaya koymuştur. Her ne kadar bu çalışmamız mikofloranın tüm bileşenleri arasındaki ilişkileri ortaya koyacak derinlikte bir araştırma olmamakla birlikte, toprakların mikofungal florasında türler arası etkileşimlerin dar kapsamlı bir bakış açısıyla açıklanmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

#### 5.SONUÇ

Bu çalışma, Çankırı ili Eldivan ilçesi Karaçam orman topraklarında saptanan bazı mikofungusların in-vitro koşullarda antagonistik etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla 2006-2007 yılları arasında yürütölmüştür. Elde edilen bulgulara göre; indikatör funguslara karşı test edilen tüm *Trichoderma* izolatları ortalama %69'un üzerindeki engelleme yüzdeleri ile denemelerde kullanılan diğer antagonistlerden daha etkili bulunmuştur (Çizelge 2). İndikatörlere karşı en yüksek oranda antagonistik etkiye sahip olan fungusun *Trichoderma* izolatları arasından ortalamada, *T. harzianum*'a ait T9 izolatı olduğu (%73,86) görölmüştür. Ayrıca, *T. harzianum*'a ait T9 izolatı *Fusarium* sp.3'e ait F3 izolatına karşı gösterdiği %92 inhibisyon değerı ile tüm antagonistler arasında en yüksek engelleme değerine sahip izolat olarak belirlenmiştir. Sonuç

olarak *Trichoderma* cinsine bağlı 6 türün (T2, T3, T9, T10, T13, T14) gerek tür ve gerekse cins düzeyindeki inhibisyon değerinin (%69,60) diğer cinslere ait antagonist adaylarından (U, Pd, Pf, Pc) oldukęa yüksek düzeyde bulunduğu anlaşılmıştır.

Sonuç olarak, biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılan biręok bakteriyel ve fungal antagonistlerin, orman topraklarından izole edilerek geliştirildiği düşünülürse; bu ęalıřmamızda *in vitro* testlerde etkili bulunan *Trichoderma* izolatlarının, özellikle, orman fidanlıklarında sorun olan toprak ve tohum kökenli patojen funguslara karşı kullanılabilme potansiyellerinin belirlenmesine yönelik ęalıřmalarda yararlanılabileceği anlaşılmıştır.

## TEŐEKKÜR

Ęalıřma konusunun belirlenmesinde ve ęalıřmaların yürütülmesinde önemli katkı ve destek sağlayan Yrd. Doğ. Dr. Hüseyin Aktaş'a teŐekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

Al-Heeti, M.B., Sinclair, J.B., 1988. Antagonism between *Gliodadium roseum*, *Trichoderma harzianum*, or *Trichothecium roseum* and *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glydnea* mycopathologia, 103 (3) 3: 135-140.

Azaz, A.D., Pekel, O., 2002., Comparison of Soil Fungi Flora in Burnt and Unburnt Forest Soils in The Vicinity of Kargıcak (Alanya-Turkey). Turk J Bot., 26: 409-416

Başpınar, N. ęınar, A., 1995. *Phytophthora citrophthora* Leon'ya Karşı Antagonist Etki Gösteren Fungus ve Bakteri İzolatlarının Orman Toprağındaki Populasyon Dalgalanmaları üzerinde ęalıřmalar, 7. Fitopatoloji Kongresi, Adana, pp149-153

Bora, T., zaktan, H., 1998. Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Savaş. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı, 204, İzmir.

Christensen, M., 1981. Species Diversity and Dominance in Fungal Communities, 201-202, in The Fungal Community, its Organisation and Role in The Ecosystem, Edited By Wicklow, D., and Carroll, G., Marcel Dekker, Inc., New York.

ęolakoęlu, G., 2002. Karaçam (*Pinus nigra* Arnold.) Meşcerelerinin Topraklarındaki Mikrofungus Florası zerinde Araştırmalar. İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi Seri A, 52 (1): 115-124

Dennis, C., Webster, J., 1971a. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc., 84:25-39

Dennis, C., Webster, J. 1971b. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc., 84:41-48

Dennis, C., Webster, J., 1971c. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyfal interaction. Trans. Br. Mycol. Soc., 57:363-369

Doğmuş, T., Doğanoğlu, . 2003. Orman Fidanlıklarında ękerten Hastalığının nemi ve Bu Hastalığın Biyolojik Kontrolnde Ektomikorizal Fungusların nemi. Sleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, Seri A (1): 103-118

Dreisbach, T., 2002. Importance Of Fungi In Forest Ecosystems. Web Sitesi: <http://www.notes.fs.fed.us:81/pnw/DecAID/DecAID.nsf/HomePageLinks/24D9761EE72378E688256B8F005A8FC1?OpenDocument>. Erişim tarihi: 22/10/2006.

Fisher, R. F., Binkley, D. T., 2000. Ecology and Management of Forest Soils. Third Edition, ISBN: 0-471-1942-3, John Willey & Sons, INC, USA.

Garbeva P., Van Veen, J.A., Van Elsas J.D., 2004. Microbial Diversity In Soil: Selection Of Microbial Populations By Plant and Soil Type And Implications for Disease Suppressiveness. Annu. Rev. Phytopathol., 42:243-70

Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M. D., Mateos, P. F. Bridge, P. D., Monte, E., Garcia-Acha, I., 1997. Physiological and Biochemical Characterization Of *Trichoderma Harzianum*, A Biological Control Agent Against Soilborne Fungal Plant Pathogens. Applied And Environmental Microbiology, 63 (8): 3189-3198

Hadar, Y. Chet, I., Katan, I., 1979. *Trichoderma Harzianum* A Biyokontrol Agent Effective Against *S. Rolfsii* And *R. Solani* Damping Off With Wheatbran Culture Of *Trichoderma Harzianum*. Phtopathology, 9: 64-68

Haktanır, K., Arcak, S., 1997. Toprak Biyolojisi (Toprak Ekosistemine Giriş). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Blm, 409s., Ankara.

Harman, G.E., 2004. *Trichoderma* spp., Including *T.harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and Other Spp., Cornell University, Geneva, <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/trichoderma.html>, Erişim Tarihi: 27/04/2004

Harman, G.E., 2006. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96: 190-194.

Hasenekoğlu, İ., Azaz, A.D., 1991. Sarıkamış Civarındaki Tıraşlanmış Orman Alanları Topraklarının Mikrofungus Florası ve Bunun Normal Orman Toprakları Florası İle Karşılaştırılması zerine Bir Araştırma. Turk J Of Bot., 15: 214-226.

Kiewnick S., Sikora R.A., (2006) Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. Biol Control, 38: 179-187

Khl, J. Molhoek, W. M. L., 2001. Effect of Water Potential on Conidial Germination and Antagonism of *Ulocladium atrum* Against *Botrytis cinerea*. APS Phytopathology 91(5): 485-491



- Trichoderma* and *Gliocladium*. 1998. Kubicek, C.P., Harman, G.E., (Eds.) Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy And Genetics. Taylor & Francis, London, 278 pp.
- Küçük, Ç., 2000. *Trichoderma harzianum* ile Toprak Kökenli Bazı Bitki Patojenlerinin Kontrolü, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir. 80s.
- Küçük, Ç., Kıvanç, M., 2003. Isolation of *Trichoderma* spp. and their antifungal, biochemical and physiological features. Turk J Biol. 27: 247-253.
- Küçük, Ç., Kıvanç, M. Ç., 2004. In Vitro Antifungal Activity of Strains of *Trichoderma harzianum*. Turk J Biol 28 p. 111-115.
- Lewis, J.A., Lumsden, R.D., 2001. Biocontrol of damping-off greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. Crop Protection 20: 49-56.
- Novogradsky, D. M., 1936. Antagonistic interrelations among microbes and biological methods of combating fungus diseases of cultivated plants. Adv. Mod. Biol. USSR, 5, 509-536.
- Oskay, F., 2007. Çankırı İli Eldivan İlçesi Karaçam Orman Topraklarındaki Fungal Floranın ve In-Vitro'da Antagonistik Etkileşimlerinin Belirlenmesi. Enstitüsü Yüksek lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen bilimleri. Çankırı.
- Oskay, F., ŐimŐek, Z., 2017. Çankırı (Eldivan) Karaçam Orman topraklarında saptanan Mikrofunguslar. Anadolu Orman Araştırmaları Dergisi, 3 (1): 23-38
- Öner, M., 2002. Mikrobiyal Ekoloji. 2.Baskı. Ege Üniversitesi Basımevi. Bornova-İzmir. 282s.
- Papavizas, G. C., 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. Annual review of phytopathology, 23(1): 23-54.
- Parkinson, D., 1994. Filamentous fungi. In: SSSA Book Series (ed) Methods of soil analysis. American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, pp 329-350
- Raistrick, H., Smith, G., 1941. Antibacterial substances from moulds. Chem. Ind. London, 6: 828-830.
- Samuels, G.J., 2004. *Trichoderma* In Biological Control: A Taxonomist Reports Web Sitesi: [http://pest.cabweb.org/journals/bni/bni25\\_1/gennews.htm](http://pest.cabweb.org/journals/bni/bni25_1/gennews.htm). Erişim Tarihi: 12/07/2005
- Samuels, G.J., Chaverri, P., Farr, D.F., & Mccray, E.B. (N.D.) 2006. *Trichoderma* Online, Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. Web Sitesi: <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/vtrichodermandex.cfm>. Erişim Tarihi: 12/07/2005
- Santamarina M.P, Roselló, J., Llacer, R., Sanchis, V., 2002. Antagonistic Activity Of *Penicillium oxalicum* Corrie and Thom, *Penicillium decumbens* Thom and *Trichoderma harzianum* Rifai İsolates Against Fungi, Bacteria and İnsects İn Vitro. Rev Iberoam Micol., 19: 99-103
- Waksman, S. A., 1941. Antagonistic relations of microorganisms. Bacteriological reviews, 5(3), 231.
- Waksman, S. A. 1944. Three Decades with Soil Fungi. Soil Science, 58(2): 89-116.
- Waksman, S. A., Horning, E. S., 1943. Distribution of antagonistic fungi in nature and their antibiotic action. Mycologia, 35(1): 47-65.
- Waksman, S. A., Horning, E. S., Welsch, M., Woodruff, H. B., 1942. Distribution of Antagonistic Actinomycetes in Nature. Soil Science, 54(4): 281-296.
- Weindling, R., 1934. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. Phytopathology, 24: 1153-1179
- Weindling, R., Fawcett, H. S., 1934. Experiments in biological control of *Rhizoctonia* damping off. Phytopathology, 24, 1142.
- Yakimenko, E.E., Grodnitskaya, I.D., 2000. Effect of *Trichoderma* Fungi on Soil Micromycetes That Cause Infectious Conifer Seedling Lodging İn Siberian Tree Nurseries. Microbiology, 60: 726-729
- Yamaji, K., Fukushi, Y., 2005. *Penicillium frequenstans* İolated From *Picea glehnii* Seedling Roots As A Possible Biological Control Agent Against Damping-Off. Ecol.Res., 20: 103-107