



# Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi

## International Journal of Agriculture and Wildlife Science

2022, 8(3): 462 – 474, doi: 10.24180/ijaws.1140271



### Çilekte *Verticillium dahliae*'ya Karşı Biyoetmen Olarak *Clonostachys* Türlerinin Etkileri \*

#### Effects of *Clonostachys* Species as Biocontrol Agents Against *Verticillium dahliae* on Strawberry

Tuba Genç Kesimci<sup>1</sup> , Erkol Demirci<sup>2</sup> 

Geliş Tarihi (Received): 04.07.2022

Kabul Tarihi (Accepted): 19.10.2022

Yayın Tarihi (Published): 15.12.2022

**Öz:** Çilek bitkilerinde solgunluk hastalığına neden olan *Verticillium dahliae*'nın biyolojik mücadelesinde *Clonostachys* izolatlarının test edilmesi bu çalışmanın amacını oluşturmuştur. Çalışma kapsamında çilek bitkilerinden yapılan izolasyonlar neticesinde 32 adet *Clonostachys* izolatu elde edilmiştir. Kültürel, morfolojik ve moleküler olarak tanıları yapılan bu izolatların *Clonostachys rosea* f. *rosea* (18 izolat) ve *Clonostachys rosea* f. *catenulata* (14 izolat) alt türlerine ait olduğu belirlenmiştir. *In vitro* koşullarda patojen ile *C. rosea* f. *rosea* ve *C. rosea* f. *catenulata* izolatları arasında yapılan karşılaştırma sonucunda engelleme oranlarının iki tür arasında önemli bir fark oluşturmadığı ve biyoetmenlere ait izolatların patojenin misel gelişimini engellemede farklı oranlarda etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen engelleme oranları değerlendirildiğinde en etkili izolatın %48.95 oranı ile *C. rosea* f. *rosea* Gr13 olduğu, bu izolatu %44.75 oranı ile *C. rosea* f. *rosea* Gr4'ün takip ettiği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Verticillium dahliae*, *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Clonostachys rosea* f. *catenulata*, biyolojik mücadele

&

**Abstract:** This study was conducted to test *Clonostachys* isolates in the biological control of wilt diseases caused by *Verticillium dahliae* on strawberry plants. As a result of the isolations made from strawberry plants, 32 *Clonostachys* isolates were obtained. Cultural, morphological and molecular characterization were used for the identification of these isolates. The isolates were identified as *Clonostachys rosea* f. *rosea* (18 isolates) and *Clonostachys rosea* f. *catenulata* (14 isolates). It was determined that the inhibition rates were not make a significant difference between the two species in the comparison of the pathogen with *C. rosea* f. *rosea* and *C. rosea* f. *catenulata* isolates, and the isolates of biocontrol agents had different percentage of effects in inhibiting the mycelial growth of the pathogen in *in vitro* condition. When the inhibition rates obtained as a result of the study were evaluated, it was determined that the most effective isolate was *C. rosea* f. *rosea* Gr13 (48.95%) and *C. rosea* f. *rosea* Gr4 (44.75%), respectively.

**Keywords:** *Verticillium dahliae*, *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Clonostachys rosea* f. *catenulata*, biological control

**Atıf/Cite as:** Genç Kesimci, T., & Demirci, E. (2022). Çilekte *Verticillium dahliae*'ya Karşı Biyoetmen Olarak *Clonostachys* Türlerinin Etkileri. Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi, 8(3): 462 – 474, DOI: 10.24180/ijaws.1140271.

**İntihal-Plagiarism/Etik-Ethic:** Bu makale, en az iki hakem tarafından incelenmiş ve intihal içermediği, araştırma ve yayın etiğine uyulduğu teyit edilmiştir. / This article has been reviewed by at least two referees and it has been confirmed that it is plagiarism-free and complies with research and publication ethics. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/ijaws>

**Copyright** © Published by Bolu Abant İzzet Baysal University, Since 2015 – Bolu

<sup>1</sup> Dr. Öğr. Üyesi Tuba GENÇ KESİMCİ, Iğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, tuba.genc@igdir.edu.tr (Sorumlu Yazar/Corresponding Author)

<sup>2</sup> Prof. Dr. Erkol DEMİRCİ, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, drerkol@ktu.edu.tr

## GİRİŞ

Çilek bitkilerinde (*Fragaria x ananassa* Duch.) *Verticillium* solgunluk hastalığı, toprak kaynaklı bir patojen olan *Verticillium dahliae* Kleb. tarafından oluşturulmakta (Diehl vd., 2013; Pegg ve Brady, 2002), etmen 4 farklı kıtada 14 bitki familyasına ait çok sayıda bitki türünde solgunluk hastalığına neden olmaktadır (Inderbitzin, 2011). Ekonomik öneme sahip 400'den fazla bitki türünde hastalık oluşturan patojen (Song vd., 2020), çilek üretim alanlarında yaygın olarak bulunmakta ve uygun çevre koşullarında %80'den fazla ürün kaybı meydana getirmektedir (Meszka ve Bielenin, 2009). Hastalık belirtileri; solgunluk, kloroz, gelişme geriliği, nekroz ve damarlar arasında renk açılması şeklinde ortaya çıkmaktadır (Fradin ve Thomma, 2006). Ayrıca çilek bitkilerinin dış ve yaşlı yapraklarında göstermiş olduğu tipik simptomu ile diğer kök ve taç hastalıklarından ayrılmaktadır (Raffle ve O'Neill, 2006). Bitkinin kök bölgesinden giriş yapan patojen, ksilem içinde oluşturduğu konidi ve miselleri ile bitkinin tepe noktalarına kadar ulaşmaktadır (Pegg ve Brady, 2002). Fungusun misellerinin gelişimine tepki olarak ksilem hücrelerinde jel ve tylose oluşumunun neden olduğu tıkanıklık, bitkilerde su akışını azaltmakta ve su stresine yol açmaktadır (Mulero-Aparicio vd., 2020). Hastalık döngüsünün son evresinde saprofitik yaşama giren patojen, tarım alanlarında esas inokulum kaynağı olan mikrosklerotiumlarını oluşturmakta ve bu mikrosklerotiumlar toprakta 10 yıldan fazla canlı kalabilmektedir (Hu vd., 2013; Vallad ve Subbarao, 2008).

*Verticillium dahliae* gibi toprak kaynaklı patojenler ile mücadelede toprak solarizasyonu, toprak fumigasyonu ve ürün rotasyonu patojenin inokulum miktarını azaltarak bu hastalıkla mücadeleyi etkin kılmaktadır (Fradin ve Thomma, 2006). Ancak kültürel önlemlerin alınmaması, dayanıklı çeşitlerin belirlenmemesi (Puri vd., 2021), solarizasyonun iklime bağlı olması, konukçu sayısının fazla olması sebebiyle rotasyonun uygulanamaması hastalığın mücadelesinde karşılaşılan zorluklardır. Ayrıca, kimyasalların agro-ekosistemde kısa ve uzun vadede meydana getirdiği olumsuz etkiler (Berg, 2007) doğrultusunda kimyasalların kullanılmasının yasaklanması (Fradin ve Thomma, 2006; Puri vd., 2021; Rekanovic vd., 2007) pratik anlamda bu hastalıkla mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Bununla birlikte *Verticillium* türlerinin geniş bir coğrafik alana yayılım göstermesi ve mikrosklerotiumlarının toprakta uzun süre canlı kalması, parazitik safhayı ksilemde geçiren patojene fungusitlerin ulaşamaması (Grunden vd., 2001; Tjamos ve Jimenez-Diaz, 1998) bu hastalıkla mücadelede istenilen sonuçların alınmasını engellemektedir. Patojenin mücadelesinde karşılaşılan tüm bu zorluklar alternatif yönetim stratejilerinin geliştirilmesine neden olmuştur. Biyolojik mücadele, bu yöntemler içerisinde en popüler yöntem olarak dikkat çekmektedir. Son yıllarda yapılan birçok çalışmada biyolojik kontrol etmeni olarak antagonist mikroorganizmaların kullanımı araştırılmıştır (Mulero-Aparicio vd., 2020). Günümüzde bilinen 100 binden fazla fungus türü içerisinde (Agrios, 2005), 13 sınıfa ve 113 cinsine ait yaklaşık 300 fungal antagonisten varlığı ortaya konulmuş ve biyolojik mücadele çalışmalarında öne çıkan canlı grubunu oluşturmuştur (Thambugala vd., 2020). Bu türler içerisinde *Gibellulopsis nigrescens* (Zhu vd., 2013), *Talaromyces flavus* (Madi vd., 1997; Naraghi vd., 2010), *Glomus mosseae*, *Glomus intraradices* (Demir vd., 2015), *Trichoderma harzianum* (Mirmajlessi vd., 2016), *Trichoderma virens*, *Trichoderma viride*, (Jabnoun-Khiareddine vd., 2009; Panth vd., 2020), non-patojen *Fusarium* spp., *Fusarium oxysporum* (Kowalska, 2021; Veloso ve Diaz, 2012) *Verticillium klebahnii* ve *Verticillium isaacii* (Puri vd., 2021) ve *Clonostachys* spp. (Alström, 2001; Deketelaere vd., 2017; Gourley ve MacNab, 1964; Keinath vd., 1991; Panth vd., 2020; Rodriguez vd., 2011; Varo vd., 2016) *V. dahliae*'nin biyolojik mücadelesinde başarı şansı yüksek olan funguslar olarak tespit edilmiştir. Dünya çapında yaygın olarak bulunan ve birçok habitatta yaşayabilen *Clonostachys rosea* (sinonim: *Gliocladium roseum*) bitki patojenlerine karşı kullanılan etkili antagonistlerden biri olarak ifade edilmektedir (Chatterton ve Punja, 2009; Gan vd., 2007; Moreira vd., 2016; Sun vd., 2020; Punja vd., 2002). Toprakta yaygın olarak bulunan *Clonostachys* türlerinin izolasyonlarda yüksek oranda çıkması bu fungusun biyolojik mücadele çalışmalarında kullanılma şansını artırmaktadır (Berg, 2007).

Bu çalışmada, Erzurum ve Erzincan illerine ait farklı lokasyonlardan toplanmış çilek bitkilerinden yapılan izolasyonlarda elde edilen *Clonostachys* izolatlarının tanımlanması ve bu izolatların *in vitro* koşullarda biyoetmen olarak *V. dahliae*'ya karşı etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Çalışmada vejetatif uyum grupları (VCG) ile patojeniteleri belirlenmiş *V. dahliae* izolatları (VCG2A-izolat SÜ(2)-1, VCG2B-izolat SH(1)-3, VCG4B-izolat SOR-8 ve VCGx-izolat SK5) kullanılmış, bu izolatlardan SÜ(2)-1 ve SH(1)-3 Erzincan, SOR-8 ve SK5 Erzurum ilinde çilek bitkilerinden izole edilmiştir (Kesimci ve Demirci, 2020).

### Metot

#### *Clonostachys İzolatlarının Elde Edilmesi*

Erzurum (Aziziye, Aşkale, Pasinler, Oltu ve Yakutiye) ve Erzincan (Merkez, Üzümlü ve Refahiye) illerinde 2008-2010 yılları arasında toplanan çilek bitkilerinden izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Her bitkinin gövde, yaprak-meyve sapından 1,5 cm uzunluğunda bitki parçaları alınmış, gövde parçalarından dış kısım uzaklaştırılmıştır. Bitki parçaları %1'lik NaOCI'de 1 dk bekletilerek yüzeysel dezenfeksiyona tabi tutulmuş, takiben steril saf suda durulanmış ve kurutma kağıtlarında kurutulmuştur. İzolasyon yapılan bitki parçalarından ikişer parça alınarak Su Agarı (SA) içeren besi ortamına bırakılmıştır. İnkübatörde 25°C'de 3-7 günlük bir gelişme periyodundan sonra petriyer mikroskopta biyoetmenin varlığı yönünden incelenmiş ve gelişen kolonilerden alınan sporlar steril iğne ile Patates Dekstroz Agar (PDA) içeren besiyerine aktarılarak fungusların saf bir şekilde gelişmesi sağlanmıştır.

#### *Tek Spor İzolasyonu ile Clonostachys İzolatlarının Saflaştırılması*

Çilek bitkilerinden izole edilen *Clonostachys* izolatlarının tek spor izolasyonu ile saflaştırılmasında dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde her bir izolat için 2 mL'lik 4 ependorf tüpü steril edilmiştir. İlk ependorf tüpüne 1000 µL, diğer ependorf tüplerine ise 900 µL steril su bırakılmıştır. PDA'da saf bir şekilde geliştirilen *Clonostachys* kolonilerinden 5 mm çapında alınan misel diski ilk ependorf tüpüne aktarılmış ve bu tüp 1 dk vortekste karıştırılmıştır. Ependorf tüpündeki süspansiyondan steril pipetle 100 µL alınmış ve içerisinde 900 µL steril su bulunan 2. tüpe konarak 1 dk vortekste karıştırılmıştır. Bu seyreltme işlemi 3 kez tekrarlanmış ve içerisinde 1000 µL'lik spor konsantrasyonu bulunan son seyreltme, 9 cm çapındaki boş plastik petriye aktarılmış, üzerine ise normal dökülme sıcaklığından biraz daha soğuk streptomycin sülfat (50 mg/L) içeren PDA dökülmüştür. Bu petriyer inkübatörde 25°C'de 2-3 gün inkübe edilmiş ve tek spordan gelişen saf koloniler elde edilmiştir. Bu kolonilerden alınan izolatlar PDA besiyerinde geliştirilmiştir. Saflaştırılan bu izolatlar PDA içeren test tüplerde depolanıp, çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmak üzere +5°C'de muhafaza edilmiştir.

#### *Clonostachys İzolatlarının Kültürel ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi*

*Clonostachys* izolatları PDA besi ortamına aktarıldıktan 10-15 gün sonra besiyerlerindeki koloni morfolojisi dikkate alınarak gruplara ayrılmıştır (Hasenekoğlu, 1991; Schroers vd., 1999; Schroers, 2001). PDA ve SA'nda geliştirilen bu izolatlar, mikroskopik olarak incelenmiş, her bir izolatın konidi en ve boyları (n=50) 100x'te µm cinsinden ölçülmüş, izolatların penisillat ve vertisillat konidioforları 20x'te fotoğraflanmıştır. Ayrıca *Clonostachys* izolatları PDA, Malt Extract Agar (MEA) ve Czapek Dox Agar (CDA)'dan oluşan 3 farklı besiyerine aktarılarak biyoetmenin besiyerleri arasındaki gelişim farklılıkları gözlemlenmiştir.

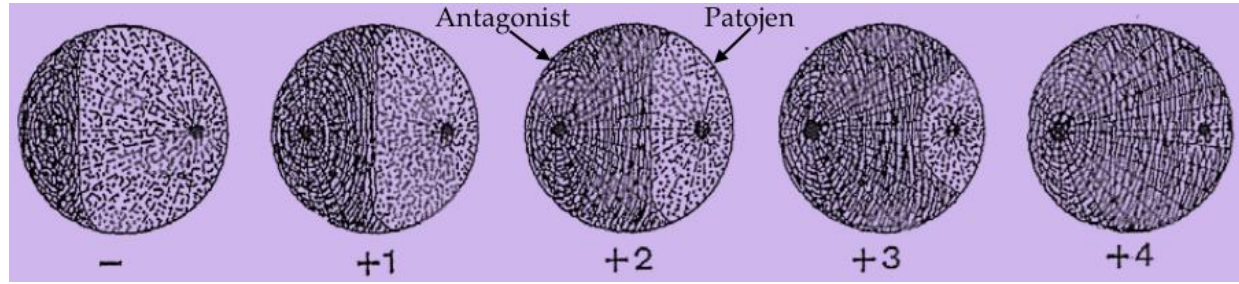
#### *Clonostachys İzolatlarının Moleküler Olarak Tanımlanması*

*Clonostachys* izolatlarının koloni morfolojileri dikkate alınarak seçilen toplamda dört izolatın moleküler olarak tanımları yapılmıştır. DNA izolasyonunda kullanılacak miselleri elde etmek için izolatlar PDA içeren petri kaplarında 25°C'de 7-10 gün geliştirilmiştir. Bu kültürlerden 5 mm çapında alınan misel diski 100 ml Patates Dekstroz Broth (PDB) içeren erlenmayere aktarılarak 4-7 gün 25°C karanlıkta inkübasyona bırakılmış ve takiben fungusun miselyumları steril ependorf tüplerinde toplanmıştır. *Clonostachys* izolatlarından genomik DNA izolasyonu, ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak rDNA-ITS bölgesinin (ITS1, 5.8, ITS2) PCR amplifikasyonu ile baz dizi analizi REFGEN (Ankara Üniversitesi Teknokent, Ankara, Türkiye) firması tarafından yapılmıştır. Elde edilen baz dizileri NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında BLAST analizi ile sorgulanmış, izolatların tür tayini yapılırken %99 ve üzeri sekans benzerlikleri göz önünde bulundurulmuştur. Her izolata ait baz dizileri BioEdit (Sürüm 7) yazılımı ile düzenlenmiş ve Clustal W algoritması kullanılarak hizalanmıştır.

NCBI veri tabanından baz dizileri elde edilen referans izolatlar (Schroers, 2001) ve uzak tür olarak da *Sclerotinia minor* kullanılarak MEGA (Sürüm 6) yazılımında uygulanan Neighbor-Joining yöntemi ve 1000 bootstrap değeri ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Dört adet *Clonostachys* izolatının baz dizileri NCBI veri tabanına yüklenmiş ve erişim numaraları alınmıştır.

#### *Verticillium dahliae*'ya karşı In Vitro'da Yürütülen Biyolojik Mücadele Çalışmaları

Biyolojik mücadele çalışmalarında *V. dahliae*'nın VCG2A, VCG2B, VCG4B ve VCGx gruplarına ait birer izolat ile izolasyonlar sonucu elde edilen *Clonostachys* izolatları *in vitro*'da ikili kültür yöntemi ile test edilerek karşılıklı etkileşimin derecesini veren skala değerleri ve engelleme oranları belirlenmiştir. Denemede öncelikle *V. dahliae* ve *Clonostachys* izolatları PDA içeren 9 cm'lik petrielerde 25°C'de 2 hafta süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kolonilerden 5 mm çapında kesilen misel diski patojenin yavaş gelişimi dikkate alınarak PDA içeren besi ortamına 2 gün önce bırakılmıştır (Alström, 2000). Ardından patojenin tam karşısına aralarında 6 cm olacak şekilde *Clonostachys* izolatı bırakılmış ve petrieler 25°C'de 21 gün inkübe edilmiştir. Kontrol petrielerine ise sadece patojen bırakılmış, deneme 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Patojen ile biyoetmen arasındaki karşılıklı etkileşimin derecesi Watanabe (1993)'ün belirlediği 0-4 tanımsal skalası (0: Patojen %50'den fazla antagonist üzerinde gelişmiş veya antagonistin gelişimi petride %50'den daha az, 1: Patojen ve antagonistin gelişimi %50 oranında, 2: Antagonist petriyi %70'den daha fazla kaplamış, 3: Antagonist petrinin %80'ini kaplamış, 4: Antagonist, petriyi tamamen kapatmış) kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1.** *Verticillium dahliae* ile *Clonostachys* izolatları arasındaki antagonizmin derecesini belirleyen skala (Watanabe, 1993).

Figure 1. A scale for determining the degree of antagonism between *Verticillium dahliae* and *Clonostachys* isolates (Watanabe, 1993).

*Verticillium dahliae* izolatlarının gelişiminin *Clonostachys* izolatları tarafından engellenmesi  $RI = (R1 - R2) / R1 \times 100$  formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Easa vd., 2011; Royse ve Ries, 1978). Burada; RI (% Engelleme oranı): büyümenin antagonist tarafından engellenmesi, R1: patojenin kontrol petrisindeki koloni yarı çapı, R2: ikili kültürde patojenin antagonist yönündeki koloni yarı çapını ifade etmektedir. Çalışmada aynı zamanda *V. dahliae* üzerinde *Clonostachys* izolatlarının geliştiği alandan 5 mm'lik misel diski PDA ve SA'na aktarılmış ve 3-4 günlük bir gelişme periyodundan sonra petrieler etmenin varlığı yönünden değerlendirilmiştir. Ayrıca, patojen ile biyoetmen arasında mikoparazitik ilişkinin olup olmadığını tespit etmek amacıyla izolatlar SA içeren petri kaplarında karşılıklı olarak eşleştirilmiş ve antagonist ile patojenin karşılaştığı hat mikroskopta incelenmiştir.

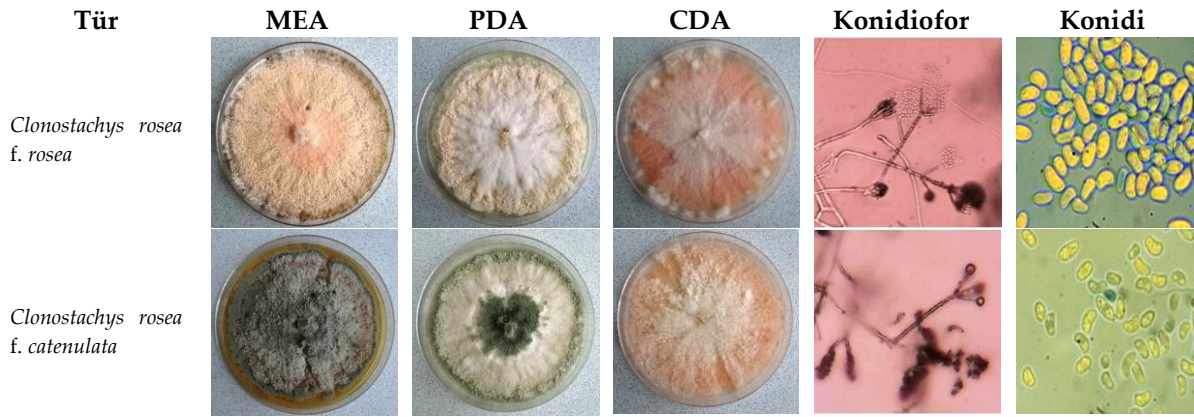
#### BULGULAR VE TARTIŞMA

Erzurum ve Erzincan illerinde çilek bitkilerinden yapılan izolasyonlar sonucunda toplam 32 *Clonostachys* izolatı elde edilmiştir. Bu izolatlar, klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanılanmıştır. Çalışma sonucunda, izolatlardan 18 tanesinin *Clonostachys rosea* f. *rosea* (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams (syn: *Gliocladium roseum*), 14 tanesinin ise *Clonostachys rosea* f. *catenulata* (Gilman & Abbott) Schroers (syn: *Gliocladium catenulatum*) alt türlerine ait olduğu belirlenmiştir. *C. rosea* f. *rosea* izolatlarının 15 tanesi çilek bitkilerinin gövde kısmından izole edilirken 3 tanesi meyve veya yaprak sapından izole edilmiştir. *C. rosea* f. *catenulata* izolatlarının tümü ise çilek bitkilerinin gövde kısmından elde edilmiştir. *C. rosea* f. *rosea* izolatları Refahiye (8 izolat), Oltu (5), Merkez (3), Üzümlü (1) ve Pasinler (1) ilçelerinden izole edilirken,

*C. rosea* f. *catenulata* izolatları Refahiye (9), Aşkale (1), Oltu (1), Üzümlü (1), Yakutiye (1) ve Pasinler (1) ilçelerinden elde edilmiştir.

### *Clonostachys rosea* f. *rosea* ve *Clonostachys rosea* f. *catenulata* İzolatlarının Kültürel ve Morfolojik Özellikleri

*Clonostachys rosea* f. *rosea* izolatlarının petrideki gelişimleri incelendiğinde koloni üstünün sarımsı beyaz, açık turuncu ve pembe renge, koloni altının ise, sarı veya pembe renge sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışmada kullanılan *C. rosea* f. *rosea* izolatlarının MEA, PDA ve CDA'dan oluşan üç farklı besiyerindeki gelişimlerinin birbirine nispeten benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Şekil 2). CDA gelişim hızı olarak *C. rosea* f. *rosea* izolatlarının en hızlı geliştiği besiyeri olup, bu besiyerini gelişim hızı olarak MEA ve PDA besi ortamları takip etmiştir. Konidilerinin hafif uzun, uç kısımlarının biraz eğilmiş şekilde yuvarlak olduğu belirlenmiştir. Penisillat ve vertisillat dallanan konidioforları, düz çeperli olmayıp pürüzlü veya siğilli bir yapı göstermiştir (Şekil 2). Aynı zamanda koloni merkezinde daha baskın bir penisillat dallanmanın olduğu tespit edilmiştir. *C. rosea* f. *rosea* izolatlarının konidi boy ve enlerinin ölçümleri neticesinde konidi boyunun ortalama 3.9 µm, eninin ise 2.1 µm olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 1).



**Şekil 2.** Farklı besiyerlerinde *Clonostachys rosea* f. *rosea* ve *Clonostachys rosea* f. *catenulata* kolonileri, konidioforları ile konidileri (MEA: Malt Extract Agar, PDA: Patates Dekstroz Agar, CDA: Czapek Dox Agar).

Figure 2. Colony, conidia and conidiophores of *Clonostachys rosea* f. *rosea* and *Clonostachys rosea* f. *catenulata* on the various media (MEA: Malt Extract Agar, PDA: Potato Dextroz Agar, CDA: Czapek Dox Agar).

*Clonostachys rosea* f. *catenulata* izolatlarının morfolojik gelişimlerine bakıldığında, karanlıkta *C. rosea* f. *rosea* ile benzer bir gelişim göstererek koloni rengi açısından bir farklılık oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Işık altına alınan kültürlerin ise başlangıçta açık zeytinimsi yeşil renge, yaşlı kolonilerde ise koyu yeşil renge dönüştüğü belirlenmiştir. Fungusun PDA ve MEA'daki koloni gelişiminin zeytinimsi renkte, CDA'da ise pembemsi bir renkte olduğu belirlenmiştir (Şekil 2). Bu haliyle CDA'daki koloni morfolojisinin *C. rosea* f. *rosea* ile ayırt edici bir özelliğe sahip olmadığı saptanmıştır. CDA gelişim hızı olarak *C. rosea* f. *catenulata* izolatlarının en hızlı geliştiği besiyeri olarak tespit edilmiş, bu besiyerini gelişim hızı açısından MEA ve PDA besiyerlerinin takip ettiği belirlenmiştir. Konidileri *C. rosea* f. *rosea* konidilerine benzerlik göstermiştir. Konidioforları düz çeperli olmayıp pürüzlü veya siğilli bir yapıya sahip olup, *C. rosea* f. *rosea*'da olduğu gibi penisillat ve vertisillat olmak üzere iki farklı tipte gelişmiştir (Şekil 2). Ancak *C. rosea* f. *rosea*'nın koloni merkezinde baskın olan penisillat dallanmanın, *C. rosea* f. *catenulata*'da koloni genelinde daha yoğun ve baskın bir şekilde geliştiği görülmüştür. Ölçüm yapılan konidi boyutları değerlendirildiğinde konidi boyunun ortalama 3.8 µm, genişliğinin ise 2.2 µm olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 1).

**Çizelge 1.** *Clonostachys rosea* f. *rosea* ve *Clonostachys rosea* f. *catenulata* izolatlarının konidi boyutları.  
Table 1. The conidia size of isolates of *Clonostachys rosea* f. *rosea* and *Clonostachys rosea* f. *catenulata*.

Tür	İzolat Numarası	Konidi Boyutu <sup>a</sup>	
		Boy (µm)	En (µm)
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i>	Gr1	(2.4) 3.7 (4.9)	(1.5) 2.2 (2.8)
	Gr2	(3.2) 4.2 (6.1)	(1.6) 2.2 (2.9)
	Gr3	(3.2) 4.4 (5.3)	(1.9) 2.3 (2.7)
	Gr4	(2.2) 4.3 (6.3)	(1.6) 2.0 (2.3)
	Gr5	(2.4) 3.3 (4.4)	(1.5) 1.9 (2.5)
	Gr6	(2.9) 4.1 (5.1)	(1.6) 1.9 (2.3)
	Gr7	(2.2) 3.8 (5.2)	(1.5) 2.0 (2.3)
	Gr8	(2.5) 3.7 (5.2)	(1.4) 2.0 (2.6)
	Gr9	(2.7) 4.0 (5.8)	(1.5) 2.1 (2.5)
	Gr10	(2.9) 3.8 (5.0)	(1.4) 1.9 (2.4)
	Gr11	(3.1) 3.9 (5.5)	(1.7) 2.1 (2.5)
	Gr12	(2.9) 3.8 (4.7)	(1.8) 2.0 (2.3)
	Gr13	(3.2) 3.9 (4.8)	(1.6) 2.0 (2.4)
	Gr14	(3.2) 4.2 (5.4)	(1.8) 2.2 (2.5)
	Gr15	(2.4) 3.5 (5.3)	(1.6) 2.1 (2.7)
	Gr16	(2.8) 3.6 (4.4)	(1.4) 1.9 (2.3)
	Gr17	(2.2) 3.9 (5.0)	(1.8) 2.3 (2.9)
	Gr18	(2.2) 3.7 (4.9)	(1.3) 2.0 (2.5)
<b>Ortalama</b>		<b>(2.2) 3.9 (6.3)</b>	<b>(1.3) 2.1 (2.9)</b>
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i>	Gc1	(2.5) 3.7 (5.1)	(1.7) 2.1 (2.5)
	Gc2	(2.3) 3.6 (4.8)	(1.7) 2.3 (2.8)
	Gc3	(2.4) 3.8 (5.5)	(1.7) 2.2 (2.6)
	Gc4	(2.1) 3.9 (6.2)	(1.5) 2.1 (2.5)
	Gc5	(2.6) 3.7 (5.2)	(1.6) 2.3 (3.1)
	Gc6	(2.6) 4.0 (5.3)	(1.9) 2.2 (2.5)
	Gc7	(2.2) 3.6 (6.0)	(1.5) 2.2 (2.7)
	Gc8	(1.8) 3.5 (5.8)	(1.5) 1.9 (2.6)
	Gc9	(2.6) 3.9 (5.2)	(1.7) 2.3 (3.3)
	Gc10	(2.3) 4.0 (5.6)	(1.3) 2.1 (2.9)
	Gc11	(2.6) 3.9 (5.1)	(1.5) 2.1 (2.6)
	Gc12	(2.7) 4.1 (6.1)	(1.5) 2.1 (2.7)
	Gc13	(3.1) 4.0 (5.5)	(1.8) 2.4 (2.8)
	Gc14	(2.9) 3.9 (5.2)	(1.4) 2.2 (3.0)
<b>Ortalama</b>		<b>(1.8) 3.8 (6.2)</b>	<b>(1.3) 2.2 (3.1)</b>

a; Minimum, ortalama ve maksimum değer.

#### *Clonostachys* İzolatlarının Moleküler Olarak Tanımlanması

Bu çalışmada çilek bitkilerinden izole edilen ve morfolojik özellikleri dikkate alınarak iki gruba ayrılan *Clonostachys* izolatları arasından seçilen 4 izolatın (Gr3, Gr9, Gc3 ve Gc10) ITS gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmıştır. Çalışmada elde edilen baz dizilerinin NCBI'da BLAST analizi yapılmış ve izolatların baz dizileri gen bankasına kaydedilerek erişim numaraları alınmıştır (Çizelge 2). Elde edilen baz dizilerine göre yapılan sorgulamalarda iki alt türü temsilen seçilen 4 izolatın gen bankasında kayıtlı *C. rosea* izolatları ile %99'un üzerinde sekans benzerliği gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sekans verileri ve referans izolatları (Çizelge 2) arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak ve izolatları karşılaştırmak için filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen *Clonostachys* izolatlarının aynı grupta yer aldığı referans izolatlar (Şekil 3), ayrıca koloni morfolojisindeki farklılıklar dikkate alınarak *C. rosea* f. *rosea* ve *C. rosea* f. *catenulata* alt türlerine ait olduğu tespit edilmiştir.

**Çizelge 2.** Filogenetik ağaç yapımında kullanılan izolatların ait olduğu türler, izolat numaraları, elde edildikleri lokasyonlar, konukçular ve gen bankası erişim numaraları.

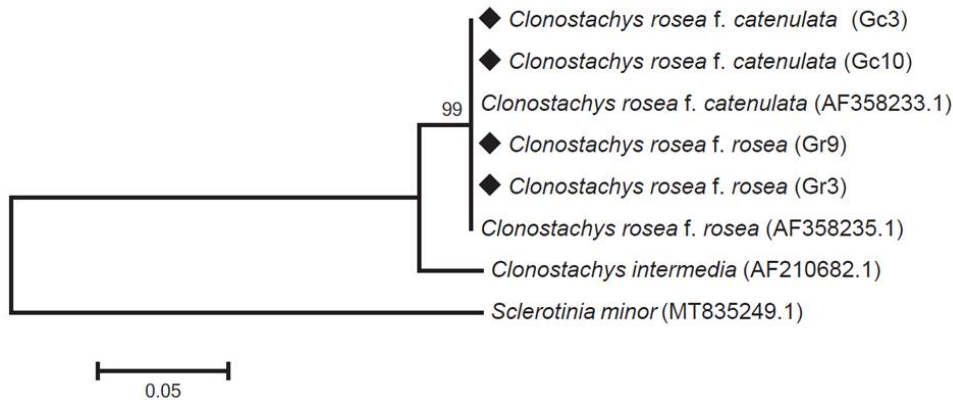
Table 2. Species, isolate number, location, host and GenBank accession numbers of isolates used in phylogenetic tree construction.

Tür	İzolat numarası	Lokasyon	Konukçu	Erişim numarası
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i> <sup>a</sup>	Gc3	Refahiye/Erzincan	Çilek	ON870907
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i> <sup>a</sup>	Gc10	Merkez/Erzincan	Çilek	ON870908
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i> <sup>a</sup>	Gr9	Refahiye/Erzincan	Çilek	ON870909
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i> <sup>a</sup>	Gr3	Refahiye/Erzincan	Çilek	ON870910
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i> <sup>b</sup>	443.65	ABD	Toprak	AF358233
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i> <sup>b</sup>	710.86	Hollanda	Toprak	AF358235
<i>Clonostachys intermedia</i> <sup>b</sup>	CBS 508.82	Hollanda	Toprak	AF210682
<i>Sclerotinia minor</i> <sup>c</sup>	YY6	Çin	Ginseng kökü	MT835249

a; Bu çalışmadan elde edilen izolatlar.

b; Referans izolatlar.

c; Uzak tür.



**Şekil 3.** Bu çalışmada elde edilen ve gen bankasından seçilen izolatlar ile Neighbor-Joining yöntemi kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç.

Figure 3. A phylogenetic tree generated by the Neighbor-Joining method using isolates obtained in this study and selected from the GenBank.

### *Verticillium dahliae*'ya Karşı In Vitro'da Yürütülen Biyolojik Mücadele Çalışmaları

*Verticillium dahliae* ile *Clonostachys* izolatları arasındaki karşılıklı etkileşimleri belirlemeye yönelik yapılan bu çalışma sonucunda engelleme oranları ve karşılıklı etkileşimin derecesini veren skala değerleri tespit edilmiştir (Çizelge 3). *C. rosea* f. *rosea* izolatlarının *V. dahliae*'nin VCG2A (%23.14-42.80), VCG2B (%24.29-38.96), VCG4B (%21,34-48,95) ve VCGx (%27.13-40.75) izolatlarının misel gelişimini farklı oranlarda engellediği belirlenmiştir. Elde edilen veriler karşılıklı etkileşimin derecesini veren skala değerleri açısından değerlendirildiğinde *C. rosea* f. *rosea* izolatların farklı skala değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Benzer şekilde *C. rosea* f. *catenulata* izolatları ile patojenin eşleştirilmesi sonucunda biyoetmenin VCG2A (%17.10-39.20), VCG2B (%28.12-37.22) VCG4B (%22.63-41.70) ve VCGx (%27.99-41.41) izolatlarını farklı oranlarda engellediği, bu farklılığın karşılıklı etkileşimin derecesini veren skala değerleri açısından da ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Çizelge 3).

*Verticillium dahliae*'nin neden olduğu solgunluk hastalığının mücadelesinde kullanılan kontrol yöntemleri incelendiğinde eradikasyon, ürün rotasyonu, toprak solarizasyonu, dayanıklı çeşit ve antagonist kullanımı gibi yöntemlerinin öne çıktığı görülmektedir (Kowalska, 2021). Hastalığın mücadelesinde önemli bir yere

sahip olan biyolojik mücadele, son yıllarda oldukça popüler bir yöntem olarak kabul edilmekte ve bu konuyla ilgili tüm dünyada çok sayıda bilimsel çalışma yürütülmektedir.

**Çizelge 3.** *Verticillium dahliae*'nin vejetatif uyum gruplarına karşı *Clonostachys rosea* f. *rosea* ve *Clonostachys rosea* f. *catenulata* izolatlarının engelleme oranları ve karşılıklı etkileşimlerinin skala değerleri.

Table 3. The scale degrees of mutual interaction and the inhibition rate of *Clonostachys rosea* f. *rosea* and *Clonostachys rosea* f. *catenulata* isolates against vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae*.

Tür	No	Vejetatif Uyum Grubu							
		VCG2A		VCG2B		VCG4B		VCGx	
		%EO*	Skala Değeri**	%EO	Skala Değeri	%EO	Skala Değeri	%EO	Skala Değeri
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i>	Gr1	42.80	2(2),3(1)	36.45	2(3)	29.20	2(2),3(1)	35.32	2(3)
	Gr2	29.89	1(2),2(1)	24.97	2(3)	39.44	1(1),2(2)	31.98	2(3)
	Gr3	38.68	2(3)	33.73	2(2),3(1)	44.73	2(3)	35.18	3(3)
	Gr4	28.18	2(2),3(1)	36.54	1(1),2(1), 3(1)	44.75	2(3)	39.79	2(3)
	Gr5	28.94	2(3)	38.96	2(3)	40.49	2(3)	32.58	2(3)
	Gr6	26.71	2(3)	33.01	2(3)	38.32	2(3)	37.36	2(3)
	Gr7	23.14	1(1),2(2)	24.29	1(2),2(1)	21.34	2(2),3(1)	27.85	1(1),2(2)
	Gr8	34.29	2(3)	31.77	2(3)	29.82	2(3)	40.75	2(1),3(2)
	Gr9	27.36	2(2),3(1)	35.40	3(3)	41.40	3(3)	34.03	3(3)
	Gr10	28.49	1(1),2(2)	37.53	2(3)	41.90	2(3)	40.00	1(1),2(1), 3(1)
	Gr11	32.98	1(1),2(1),3(1)	33.39	1(1),2(2)	27.49	1(2),3(1)	34.46	2(2),3(1)
	Gr12	39.91	2(3)	32.43	2(1),3(2)	30.57	2(1),3(2)	34.63	2(1),3(2)
	Gr13	36.57	2(2),3(1)	31.16	1(1),3(2)	48.95	3(3)	38.84	2(2),3(1)
	Gr14	25.23	2(3)	29.58	1(1),2(1), 3(1)	32.38	2(1),3(2)	33.05	1(1),2(2)
	Gr15	23.80	1(2),2(1)	37.24	1(1),2(2)	29.56	2(3)	27.13	1(3)
	Gr16	31.86	2(1),3(2)	27.23	2(3)	42.76	3(3)	32.64	3(3)
	Gr17	28.46	2(3)	32.49	2(2),3(1)	33.02	2(2),3(1)	33.84	2(2),3(1)
	Gr18	37.33	2(2),3(1)	35.40	2(1),3(2)	33.00	2(1), 3(2)	37.12	2(2),3(1)
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i>	Gc1	28.32	2(3)	30.72	2(3)	36.34	2(3)	36.22	2(1),3(2)
	Gc2	39.20	2(3)	29.79	2(3)	35.43	2(3)	41.41	2(2),3(1)
	Gc3	29.21	1(1),3(2)	33.09	1(1),3(2)	37.39	3(3)	36.09	3(3)
	Gc4	25.82	2(3)	35.76	2(3)	34.84	2(3)	32.04	2(3)
	Gc5	30.65	2(3)	34.18	1(1),2(2)	23.46	1(2),2(1)	32.62	1(3)
	Gc6	29.85	2(3)	35.59	2(3)	33.62	2(2),3(1)	30.51	1(1),2(2)
	Gc7	31.17	2(3)	35.56	2(3)	33.30	2(2),3(1)	35.45	2(3)
	Gc8	23.72	1(2),2(1)	33.76	2(3)	36.51	1(1),2(2)	35.06	1(2),2(1)
	Gc9	27.93	2(1),3(2)	28.42	2(2),3(1)	41.70	2(1),3(2)	32.30	2(3)
	Gc10	28.21	2(3)	37.22	2(3)	22.63	2(3)	34.14	2(1),3(2)
	Gc11	27.86	2(3)	31.89	2(3)	29.01	2(3)	30.87	2(2),3(1)
	Gc12	30.75	1(1),2(2)	28.10	2(3)	38.40	2(3)	32.43	2(3)
	Gc13	34.74	2(3)	33.97	2(3)	24.68	2(3)	27.99	2(3)
	Gc14	17.10	1(1),2(2)	28.12	1(1),2(2)	34.54	1(1),2(2)	32.28	1(3)

\*: EO: Engelleme oranı.

\*\* : Skala değeri; 0: Patojen %50'den fazla antagonist üzerinde gelişmiş veya antagonistin gelişimi petride %50'den daha az, 1: Patojen ve antagonistin gelişimi %50 oranında, 2: Antagonist petriyi %70'den daha fazla kaplamış, 3: Antagonist petrinin %80'ini kaplamış, 4: Antagonist, petriyi tamamen kapatmış (Watanabe, 1993) . Parantez içerisindeki rakam skala değerinin kaç tekrerde gözlemlendiğini ifade etmektedir.

Bu çalışma kapsamında çilek bitkilerinden izole edilen *Clonostachys* izolatlarının *V. dahliae*'nin biyolojik mücadelesinde etkinliği *in vitro* koşullarda test edilmiştir. Elde edilen izolatların kültürel, morfolojik ve moleküler olarak tanıları yapılarak *C. rosea* türünün *C. rosea* f. *rosea* ve *C. rosea* f. *catenulata* alt türlerine ait olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada antagonistik özelliği test edilen bu türlerin kültürel ve morfolojik özelliklerinin oldukça benzer olduğu tespit edilmiştir. Bu türlerin konidi ve konidiofor şekillerinin benzerlik göstermesi, çeşitli sıcaklıklarda gelişim oranlarının benzer olması, *C. rosea* f. *catenulata* izolatlarının yaşlı kültürlerde yeşil pigmentasyon oluşturması dışında bu iki tür arasında morfolojik karakterler açısından bir farklılık oluşturmaması, her iki türün fungal bitki patojenlerine karşı mikoparazit olarak kullanılması, farklı gen bölgelerinin kullanıldığı sekans analizlerinde birbirlerine oldukça benzerlik



göstermesi *C. rosea* f. *catenulata*'nın *C. rosea*'nın alt türü olarak yorumlanmasına sebep olmuştur (Schroers, 2001). Bu durum Köhl ve Ravensberg (2021)'in yapmış olduğu çalışmada da vurgulanmış ve *C. rosea*'nın konidi kitlelerinin rengi dikkate alınarak *C. rosea* f. *rosea* (beyaz, pembe ve sarı) ve *C. rosea* f. *catenulata* (yeşil) olmak üzere iki alt türe ayrıldığı ifade edilmiştir.

Çalışma sonucunda çilek bitkilerinden izole edilen *Clonostachys* izolatlarının morfolojik ve moleküler olarak tanılarının yapılması önem arz etmektedir. Nitekim fungal bitki patojenlerine karşı fungal antagonistlerin kullanıldığı çalışmalarda esas ve yaygın sorunun antagonistleri tanımlamak için kullanılan yöntemler olduğu vurgulanmakta, çalışmaların çoğunda uygun bir tanımlama yönteminin kullanılmadığı, ağırlıklı olarak geleneksel yöntem ve kaynakların kullanıldığı belirtilmektedir (Thambugala vd., 2020). Fungusların tanısında kullanılan bu geleneksel yöntemler, uzun zaman almasının yanı sıra kültürel özelliklerin inkübasyon koşullarından etkilenmesinden dolayı her zaman güvenilir sonuçlar vermemektedir. Ayrıca konusunda uzmanlaşmış deneyimli personel gerektirmesi diğer bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle son yıllarda fungal türleri tanılamak amacıyla farklı yöntemler üzerinde yoğun araştırmalar sonucunda çok daha hızlı, daha spesifik, daha hassas ve daha doğru sonuçlar veren moleküler yöntemler geliştirilmiştir (Capote vd., 2012; Palacioğlu vd., 2021).

İkili kültür testleri, farklı bitki patojenlerine karşı antagonist fungal izolatları değerlendirmede kullanılan rutin testlerdir. Bu testler aynı zamanda, antagonistlerin hangi mekanizma veya mekanizmaları kullanarak etkili olduğunu belirlemeye yardımcı olmaktadır (Rodriguez vd., 2011). Çalışmada kullanılan bu yöntemde *V. dahliae* ile *C. rosea* f. *rosea* ve *C. rosea* f. *catenulata* izolatları arasında yapılan karşılaştırma sonucunda petrilere hiçbirinde 0 ve 4 skala değeri gözlemlenmemiş, engelleme oranlarının da iki alt tür arasında önemli bir fark oluşturmadığı tespit edilmiştir. *C. rosea* f. *rosea* %48.95'lik bir engelleme oranıyla VCG4B izolatına karşı en yüksek engelleme oranına sahip olmuştur. *C. rosea* f. *catenulata* izolatlarında da benzer durumlar ortaya çıkmış, gerek kendi içerisinde gerekse *C. rosea* f. *rosea* izolatlarıyla çok büyük farklılıklar görülmemiştir. Bu tür en yüksek engelleme oranını %41.70 ile VCG4B grubuna karşı yapmıştır. Genel olarak *C. rosea* f. *catenulata* izolatlarının VCG2A misel gelişimini baskılamada diğer gruplara oranla daha başarısız olduğu belirlenmiştir. VCG2B izolatına karşı ise her iki biyoetmenin benzer engelleme oranı gösterdiği saptanmıştır. Önceki çalışmalarla uyumlu olarak ortaya çıkan bu durum, türler arasında veya aynı türün izolatları arasında inhibitör maddelere karşı duyarlılık açısından farklılıklar olabileceğini göstermektedir (Rodriguez vd., 2011).

*In vitro* denemelerde elde edilen veriler antagonistin başarısı açısından ortalama bir değer gibi görünse de patojen ile antagonistin karşılaştığı alandan alınan misel disklerinden *V. dahliae*'nin gelişmemesi, biyoetmenin patojenin gelişimini yavaşlatmada etkin olabileceğini göstermektedir. Literatürde *Clonostachys* türlerinin fitopatogen funguslara karşı biyokontrol etmeni olarak etkinliği önceki çalışmalarla ortaya konulmuş, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria citri* (Pratella ve Mari, 1993), *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum truncatum* ve *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* (Rodriguez vd., 2011) ve *V. dahliae* (Varo vd., 2016) gibi çok sayıda bitki patojenine karşı güçlü bir biyolojik kontrol yeteneği sergilediği tespit edilmiştir.

Çalışmada genel olarak patojen ile biyoetmen arasında bir engelleme zonu oluşmadığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte biyoetmenin patojenin miselleri üzerinden geçerek misel gelişimini baskı altına aldığı ve patojen hiflerinin morfolojik yapısında önemli değişiklikler meydana getirdiği belirlenmiştir. Bu morfolojik bozulmaların gözlemlendiği hattan alınan misel diskleri PDA içeren petrilere aktarıldığında patojenin gelişmemesi canlılığını kaybettiğini göstermektedir. Benzer şekilde yapılan çalışmalarda *C. rosea*'nın *in vitro* koşullarda *B. cinerea* misel gelişimini kontrole oranla azalttığı, çok daha yavaş geliştirdiği ve hiflerinde bozulmalar meydana getirdiği (Wang vd., 2019), *S. sclerotiorum*'un misellerinde morfolojik değişiklikler oluşturduğu (Rodriguez vd., 2011), *C. rosea* f. *catenulata*'nın *S. sclerotiorum* ve *Fusarium* spp. gibi patojenlerin hif hücrelerini yok ettiği, penetrasyon yapmaksızın konukçu hücrelerde çökme ve parçalanmalar oluşturduğu belirtilmektedir (Huang, 1978). Aynı zamanda bu çalışmada *Clonostachys* izolatlarının patojenin mikrosklerot oluşumunu ve gelişimini de olumsuz etkilediği belirlenmiştir. *V. dahliae*'nin biyolojik mücadelesinde *Trichoderma* spp.'nin kullanıldığı başka bir çalışmada paralel sonuçlar

alınmış olup, mikrosklerotların giderek tipik koyu rengini kaybettiği, çimlenemez ve olgunlaşamaz hale geldiği tespit edilmiştir (Jabnoun-Khiareddine vd., 2009). Yapılan başka çalışmalarda da bu durum gözlemlenmiş ve farklı *C. rosea* izolatlarının, *V. dahliae* mikrosklerotlarının çimlenmesini azalttığı (Keinath vd., 1991; Varo vd., 2016), *C. rosea* izolatları ile aynı bitkiden izole edilen *V. dahliae* izolatları arasında negatif korelasyon olduğu (Gourley ve MacNab, 1964), biyoetmenin steril olmayan toprağa ilave edildiği zaman patojen mikrosklerotlarını %100'e kadar azalttığı ve canlı kalan mikrosklerotların çimlenmesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Keinath vd., 1991). Biyoetmenin çilek bitkilerinin taç bölgesinde sıklıkla kolonize olması, petiol ve kökten kolayca izole edilen patojenin taç bölgesinden nadir izole edilmesi bu görüşü desteklemektedir (Gourley ve MacNab, 1964). Çilekte gram toprakta 3 mikrosklerot olmasıyla verim kaybının %50'ye ulaştığı bilinmekte (Carroll vd., 2018), toprakta uzun yıllar canlı kalabilen ve patojenin hayat döngüsünde önemli bir yer tutan bu mikrosklerotların miktarının azalması mücadelede önemli bir faktör olarak değerlendirilmektedir.

Bu çalışma kapsamında biyoetmenin patojen gelişimini baskılamada nasıl bir mekanizma kullandığı net bir şekilde tespit edilememiştir. *V. dahliae* ile *Clonostachys* izolatlarının karşılaştığı hatta yapılan mikroskobik incelemeler neticesinde hyperparazitizm oluşumuna rastlanılmamıştır. Ancak *Clonostachys* izolatlarının *Verticillium* izolatlarına oranla hızlı gelişerek, yer için rekabette üstünlük sağladığı ve aynı alanda bulunan patojenin gelişme şansını düşürdüğü tespit edilmiştir. Nitekim aynı petride bulunan iki fungusun konidileri başka petriye alındığında tek gelişen fungusun *Clonostachys* spp. olması, *Clonostachys* ve *V. dahliae*'nin karşılaştığı hattan alınan misel disklerinin hiçbirinden etmenin gelişmemesi bunun bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Alan ve besin için yapılan rekabet, patojenin gelişimini engellemek için biyoetmen tarafından uygulanan en genel mekanizmalardan biri olarak tanımlanmaktadır (Mirmajlessi vd., 2016). Bitki köklerinde patojen ile biyoetmenin kolonizasyonunu izlemek her ne kadar mümkün olmasa da bu antagonistlerin aynı ekolojik niş, alan ve besin için rekabet ederek patojeni baskıladığı düşünülmektedir (Puri vd., 2021). Aynı zamanda *Clonostachys* türleri bitki gelişimini aktive ederek, patojenlerin üreme yapılarının çimlenmesini engelleyerek, antibiyosis ve mikoparazit gibi mekanizmaları kullanarak biyolojik mücadeledeki başarı şansını artırmaktadır (Deketelaere vd., 2017; Papavizas, 1985). *C. rosea*'nın bitki patojenlerine karşı biyolojik kontrol mekanizmasında öncelikle hücre duvarını parçalayan çeşitli enzimler (kitinaz,  $\beta$ -1,3-, $\beta$ -1,4-, $\beta$ -1,6-glukanaz ve proteaz) salgılaması, antibiyotik ve toksin gibi sekonder metabolitleri üretmesi ve bitki savunma sistemlerini teşvik etmesi gibi çoklu mekanizmaların aktivasyonu ile açıklanmaktadır (Chatterton ve Punja 2009; Fatema vd., 2018; Panth vd., 2020; Sun vd., 2020). Bununla birlikte antagonistik mikroorganizmaların, uçucu toksik bileşikler üreterek antifungal etkiye sahip olduğu, üretmiş oldukları bazı enzimleri ile patojenin mikrosklerotiumlarında bozulmalara neden olduğu da belirtilmektedir (Kowalska, 2021).

## SONUÇ

Çilekte solgunluk hastalığını oluşturan *V. dahliae*'nin toprak kaynaklı olması ve bitkide sistemik olarak gelişmesi bu patojen grubuyla mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Yapılan bu çalışmada patojenin biyolojik mücadelesinde kullanılabilecek *C. rosea* f. *rosea* ve *C. rosea* f. *catenulata* alt türleri izole edilmiş, klasik ve moleküler tanıları yapılmış, antagonistik özellikleri test edilmiş ve patojeni baskılamada etkili oldukları tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda, bir sonraki aşama olan *in vivo* ve tarla denemelerinde farklı toprak tiplerinde, farklı sıcaklıklarda, farklı inokulum miktarları ve farklı inokulasyon şekilleriyle hazırlanan ortamlarda *Clonostachys* izolatlarının patojene karşı etkinliğinin araştırılması ve başarılı bir biyolojik mücadele için optimum şartların ortaya konulması gerekmektedir. Ayrıca hastalıkla mücadelede daha başarılı sonuçlar almak için içerisinde biyoetmenlerin de yer aldığı entegre yönetim stratejilerine yer verilmesi gerekmektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

## YAZAR KATKISI

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamıştır.

**TEŞEKKÜR**

Bu araştırma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığınca desteklenmiştir (Proje No: BAP 2010/52).

**KAYNAKLAR**

- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology* (5th ed.). Elsevier Academic Press.
- Alström, S. (2000). Root-colonizing fungi from oilseed rape and their inhibition of *Verticillium dahliae*. *Journal of Phytopathology*, 148(7-8), 417-423. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2000.00511.x>
- Alström, S. (2001). Characteristics of bacteria from oilseed rape in relation to their biocontrol activity against *Verticillium dahliae*. *Journal of Phytopathology*, 149, 57-64. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00585.x>
- Berg, G. (2007). Biological control of fungal soilborne pathogens in strawberries. In *Biological Control of Plant Diseases*. Birghamton: The Haworth Press, Inc.
- Capote, N., Pastrana, A. M., Aguado, A., & Sánchez-Torres, P. (2012). Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. *Plant pathology*, <https://doi.org/10.5772/38011>
- Chatterton, S., & Punja, Z. K. (2009). Chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(4), 356-367. <https://doi.org/10.1139/w08-156>
- Carroll, C. L., Carter, C. A., Goodhue, R. E., Lawell, C. Y. C. L., & Subbarao, K. V. (2018). A review of control options and externalities for *Verticillium* wilts. *Phytopathology*, 108(2), 160-171. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-17-0083-RVW>
- Deketelaere, S., Tyvaert, L., França, S. C., & Höfte, M. (2017). Desirable traits of a good biocontrol agent against *Verticillium* wilt. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1186. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01186>
- Demir, S., Şensoy, S., Ocak, E., Tüfenkci, Ş., Durak, E. D., Erdinc, C., & Ünsal, H. (2015). Effects of arbuscular mycorrhizal fungus, humic acid, and whey on wilt disease caused by *Verticillium dahliae* Kleb. in three solanaceous crops. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39(2), 300-309. <https://doi.org/10.3906/tar-1403-39>
- Diehl, K., Rebensburg, P., & Lentzsch, P. (2013). Field application of non-pathogenic *Verticillium dahliae* genotypes for regulation of wilt in strawberry plants. *American Journal of Plant Sciences*, 4, 24-32. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.47A2004>
- Easa, S. M., & Youssef, K. A. (2011). Biological control of wilt and stem-canker of potato by antagonism. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 21(1).
- Fatema, U., Broberg, A., Jensen, D. F., Karlsson, M., & Dubey, M. (2018). Functional analysis of polyketide synthase genes in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea*. *Scientific Reports*, 8(1), <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33391-1>
- Fradin, E. F., & Thomma, B. P. (2006). Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 7(2), 71-86. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00323.x>
- Gan, Z., Yang, J., Tao, N., Yu, Z., & Zhang, K. Q. (2007). 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.
- Grunden, E., Chen, W. D., & Crane, J. L. (2001). Fungi colonizing microsclerotia of *Verticillium dahliae* in urban environments. *Fungal Diversity*, 8, 129-141.
- Gourley, C. O., & MacNab, A. A. (1964). *Verticillium dahliae* and *Gliocladium roseum* isolation from strawberries in Nova Scotia. *Canadian Journal of Plant Science*, 44(6), 544-549. <https://doi.org/10.4141/cjps64-107>
- Hasenekoğlu, İ. (1991). Toprak Mikrofungusları. Atatürk Üniversitesi Yayınları.
- Hu, X., Bai, Y., Chen, T., Hu, D., Yang, J., & Xu, X. (2013). An optimized method for in vitro production of *Verticillium dahliae* microsclerotia. *European Journal of Plant Pathology*, 136(2), 225-229. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0170-2>
- Huang, H. C. (1978). *Gliocladium catenulatum*: hyperparasite of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium* species. *Canadian Journal of Botany*, 56(18), 2243-2246. <https://doi.org/10.1139/b78-270>

- Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Davis, R. M., Usami, T., Platt, H. W., & Subbarao, K. V. (2011). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PloS one*, 6(12), e28341. <https://doi.org/doi: 10.1371/journal.pone.0028341>
- Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Remadi, M., Ayed, F., & El Mahjoub, M. (2009). Biological control of tomato *Verticillium* wilt by using indigenous *Trichoderma* spp. *The African Journal of Plant Science and Biotechnology*, 3(1), 26-36.
- Keinath, A. P., Fravel, D. R., & Papavizas, G. C. (1991). Potential of *Gliocladium roseum* for biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 81(6), 644-648. <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-644>.
- Köhl, J., & Ravensberg, W. (2021). Microbial bioprotectants for plant disease management. Burleigh Dodds Science Publishing.
- Kesimci, TG., & Demirci, E. (2020). Vegetative compatibility groups and pathogenicity of *Verticillium dahliae* isolates from strawberry plants in Erzurum and Erzincan provinces, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 29(1), 454-462.
- Kowalska, B. (2021). Management of the soil-borne fungal pathogen-*Verticillium dahliae* Kleb. causing vascular wilt diseases. *Journal of Plant Pathology*, 103(4), 1185-1194. <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00937-8>
- Madi, L., Katan, T., Katan, J., & Henis, Y. (1997). Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. *Phytopathology*, 87(10), 1054-1060. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.10.1054>
- Meszka, B., & Bielenin, A. (2009). Bioproducts in control of strawberry *Verticillium* wilt. *Phytopathologia*, 52, 21-27.
- Moreira, G. M., Abreu, L. M., Carvalho, V. G., Schroers, H. J., & Pfenning, L. H. (2016). Multilocus phylogeny of *Clonostachys* subgenus *Bionectria* from Brazil and description of *Clonostachys chloroleuca* sp. nov. *Mycological Progress*, 15(10), 1031-1039. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1224-6>
- Mirmajlessi, S. M., Mand, M., Najdabbasi, N., Larena, I., & Loit, E. (2016). Screening of native *Trichoderma harzianum* isolates for their ability to control *Verticillium* wilt of strawberry. *Zemdirbyste-Agriculture*, 103(4), 397-404. <https://doi.org/10.13080/z-a.2016.103.051>
- Mulero-Aparicio, A., Varo, A., Agustí-Brisach, C., López-Escudero, F. J., & Trapero, A. (2020). Biological control of *Verticillium* wilt of olive in the field. *Crop Protection*, 128, 104993. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104993>
- Naraghi, L., Heydari, A., Rezaee, S., Razavi, M., & Afshari-Azad, H. (2010). Biological control of *Verticillium* wilt of greenhouse cucumber by *Talaromyces flavus*. *Phytopathologia Mediterranea*, 49(3), 321-329. <https://doi.org/10.2478/v10045-010-0061-x>
- Palacioğlu, G., Ö, Göksel., & Bayraktar, H. (2021). Bitki patojeni fungusların tespitinde polimeraz zincir reaksiyonu'na dayalı bazı moleküler teknikler. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(3), 1831-1845. <https://doi.org/10.21597/jist.826047>
- Panth, M., Hassler, S. C., & Baysal-Gurel, F. (2020). Methods for management of soilborne diseases in crop production. *Agriculture*, 10(1), 16. <https://doi.org/10.3390/agriculture10010016>
- Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 23(1), 23-54. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.000323>
- Pegg, G. F., & Brady, B. L. (2002). *Verticillium* wilts. CABI.
- Pratella, G. C., & Mari, M. (1993). Effectiveness of *Trichoderma*, *Gliocladium* and *Paecilomyces* in postharvest fruit protection. *Postharvest Biology and Technology*, 3(1), 49-56. [https://doi.org/10.1016/0925-5214\(93\)90026-Y](https://doi.org/10.1016/0925-5214(93)90026-Y)
- Punja, Z. K., Rose, S., & Yip, R. (2002, October 1-5). Biological control of root diseases. In Proceedings of the Canadian greenhouse conference.
- Puri, K. D., Hu, X., Gurung, S., Short, D. P., Sandoya, G. V., Schild, M., & Subbarao, K. V. (2021). *Verticillium klebahnii* and *V. isaacii* isolates exhibit host-dependent biological control of *Verticillium* wilt caused by *V. dahliae*. *PhytoFrontiers*, 1, 276-290. <https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-01-21-0001-R>
- Raffle, S., & O'Neill, Tim. (2006). The control of *Verticillium* wilt in strawberry. *Horticultural Development Council*.

- Rekanovic, E., Milijasevic, S., Todorovic, B., & Potocnik, I. (2007). Possibilities of biological and chemical control of *Verticillium* wilt in pepper. *Phytoparasitica*, 35(5), 436-441. <https://doi.org/10.1007/BF03020601>
- Rodriguez, M. A., Cabrera, G., Gozzo, F. C., Eberlin, M. N., & Godeas, A. (2011). *Clonostachys rosea* BAF3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1177-1186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04970.x>
- Royse, D. J., & Ries, S. M. (1978). The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology*, 68(4), 603-607. <https://doi.org/10.1094/Phyto-68-603>
- Schroers, H. J. (2001). A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. *Studies in Mycology*, 46, 1-214. [https://doi.org/10.1017/s0269-915x\(03\)27217-7](https://doi.org/10.1017/s0269-915x(03)27217-7)
- Schroers, H. J., Samuels, G. J., Seifert, K. A., & Gams, W. (1999). 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. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061028>
- Song, R., Li, J., Xie, C., Jian, W., & Yang, X. (2020). An overview of the molecular genetics of plant resistance to the *Verticillium* wilt pathogen *Verticillium dahliae*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1120. <https://doi.org/10.3390/ijms21031120>
- Sun, Z. B., Li, S. D., Ren, Q., Xu, J. L., Lu, X., & Sun, M. H. (2020). Biology and applications of *Clonostachys rosea*. *Journal of Applied Microbiology*, 129(3), 486-495. <https://doi.org/10.1111/jam.14625>
- Thambugala, K. M., Daranagama, D. A., Phillips, A. J., Kannangara, S. D., & Promputtha, I. (2020). Fungi vs. fungi in biocontrol: An overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.604923>
- Tjamos, E. C., & Jiménez-Díaz, R.M. (1998). A compendium of *Verticillium* wilts in tree species. CPRO.
- Vallad, G. E., & Subbarao, K. V. (2008). Colonization of resistant and susceptible lettuce cultivars by a green fluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 98(8), 871-885. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-8-0871>
- Varo, A., Raya-Ortega, M. C., & Trapero, A. (2016). Selection and evaluation of micro-organisms for biocontrol of *Verticillium dahliae* in olive. *Journal of Applied Microbiology*, 121(3), 767-777. <https://doi.org/10.1111/jam.13199>
- Veloso, J. F. C. A., & Díaz, J. (2012). *Fusarium oxysporum* Fo47 confers protection to pepper plants against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora capsici*, and induces the expression of defence genes. *Plant Pathology*, 61(2), 281-288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02516.x>
- Zhu, H. Q., Feng, Z. L., Li, Z. F., Shi, Y. Q., Zhao, L. H., & Yang, J. R. (2013). Characterization of two fungal isolates from cotton and evaluation of their potential for biocontrol of *Verticillium* wilt of cotton. *Journal of Phytopathology*, 161(2), 70-77. <https://doi.org/10.1111/jph.12027>
- Wang, Q., Chen, X., Chai, X., Xue, D., Zheng, W., Shi, Y., & Wang, A. (2019). The involvement of jasmonic acid, ethylene, and salicylic acid in the signaling pathway of *Clonostachys rosea*-induced resistance to gray mold disease in tomato. *Phytopathology*, 109(7), 1102-1114. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-19-0025-R>
- Watanabe, N. (1993). Antagonistic activity of *Gliocladium* spp. against soilborne plant pathogens in vitro. *Bulletin of the Faculty of Agriculture-Meiji University (Japan)*.