

Trichoderma Türlerinin *Rhizoctonia solani* Üzerinde Bazı Litik Enzim Aktiviteleri

Ceren Elibol İleri

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Ekim 2019

Some Lytic Enzyme Activities of *Trichoderma* Species on *Rhizoctonia solani*

Ceren Elibol İleri

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Agricultural Biotechnology

October 2019

Trichoderma Türlerinin *Rhizoctonia solani* Üzerinde Bazı Litik Enzim Aktiviteleri

Ceren Elibol İleri

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Coşkun Güçlü

Bu tez, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu tarafından 2018-2019 no'lu proje çerçevesinde desteklenmiştir.

Ekim 2019

ONAY

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ceren Elibol İleri'nin YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “*Trichoderma* Türlerinin *Rhizoctonia solani* Üzerinde Bazı Litik Enzim Aktiviteleri” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Coşkun Güçlü

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Üye: Prof. Dr. Ece TURHAN

Üye: Doç. Dr. Coşkun GÜÇLÜ

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Coşkun GÜÇLÜ danışmanlığında hazırlamış olduğum “*Trichoderma* Türlerinin *Rhizoctonia solani* Üzerinde Bazı Litik Enzim Aktiviteleri” başlıklı tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 28/10/2019

Ceren ELİBOL İLERİ

ÖZET

Tarımsal mücadelede gittikçe daha fazla tercih edilmeye başlayan biyokontrol ajanlarının salgıladığı bazı enzimler, hastalık etmeni olan patojeni baskılayarak gelişimini geriletmekte ve etkisini azaltmaktadır. Bu çalışmada önemli bir biyokontrol ajanı olan *Trichoderma* spp.'nin, *Rhizoctonia solani* Kühn. fitopatogenine karşı gösterdiği enzimatik tepki üzerinde durulmuştur. Materyal olarak *R. solani* ile *T. viride* (TVD1, TVD3), *T. virens* (TVN1, TVN2, TVN3), *T. harzianum* (TH2, TH3, TH4) ve *T. asperellum* (TA1, TA2, TA3) olmak üzere bazı *Trichoderma* türleri kullanılmıştır. Enzim üretim ortamında *R. solani* bulunan ve bulunmayan (kontrol) iki grup *Trichoderma* spp.'nin selüloz enzim aktiviteleri ayrı ayrı belirlenmiştir. Sonuçlar, *R. solani* bulunan örneklerin neredeyse tamamında, selüloz enzim aktivitesinin kontrol grubuna oranla en az 2 katına çıktığını göstermiştir. Bu durum *Trichoderma* spp.'nin, *R. solani*'yi baskılamak için biyokimyasal bir tepki oluşturduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Bu tepkinin morfolojik olarak da gösterilebilmesi adına karışık ikili kültür tekniği kullanılmış; *Trichoderma* spp.'nin hızlı bir yayılım göstererek *R. solani*'nin gelişim alanını sınırlandırdığı görülmüştür. Aktivite çalışmaları sırasında endo- β -1,4-glukanaz enzim üretim ortamı için optimizasyon çalışmaları yapılmış; optimum sıcaklık 30°C, optimum pH 5,0 olarak belirlenmiş ve enzimin %1 (w/v) CMC'ye yüksek spesifite gösterdiği görülmüştür. Sentezlenen fungal selüloz SDS-PAGE tekniği ile görüntülenmiştir. Ayrıca pH, sıcaklık, farklı substratlar ve farklı substrat konsantrasyonları gibi parametrelerin enzim aktivitesine etkisi de incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, *Trichoderma* spp.'nin biyokimyasal savunma ve saldırı mekanizmasının, yeni ve çevre dostu ticari ürünlerin geliştirilmesinde fikir verebileceğini belirtir niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: *Trichoderma* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn., Selüloz Aktivitesi, Litik Enzimler

SUMMARY

Some enzymes which released by biocontrol agents and preferred increasingly at agricultural pest control, reduces the growth and the effect of the pathogen which are disease factor. In this research, enzymatic response of *Trichoderma* spp., an important biocontrol agent, against *Rhizoctonia solani* Kühn. phytopathogen was evaluated. Some *Trichoderma* species as *T. viride* (TVD1, TVD3), *T. virens* (TVN1, TVN2, TVN3), *T. harzianum* (TH2, TH3, TH4) and *T. asperellum* (TA1, TA2, TA3) and *R. solani* were used as material. Cellulase enzyme activities of two *Trichoderma* spp. group that consist of *R. solani* and not (control) in the enzyme production media were determined separately. Results showed that cellulase enzyme activities were nearly twice as much of the control group in almost all of the samples that consist of *R. solani*. This result clearly reveals that the *Trichoderma* spp. constitute a biochemical response to inhibit the *R. solani*. Dual culture technique was used to represent this response morphologically and it was observed that *Trichoderma* spp. showed a quick spread and limit the growth area of *R. solani*. During the activity researches, optimization trials were carried out for the media of endo- β -1,4-glucanase. Optimum temperature and pH values were determined as 30°C and 5.0 respectively and high specificity of the enzyme was observed to 1% (w/v) CMC. The synthesized fungal cellulase was displayed via SDS-PAGE technique. Moreover, the effects of the parameters as pH, temperature, different substrates and different concentrations of substrates on the enzyme activity were also examined. The results indicated that biochemical defense and attack mechanism of *Trichoderma* spp. may provide insight to develop new and eco-friendly commercial products.

Keywords: *Trichoderma* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn., Cellulase Activity, Lytic Enzymes

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesi sırasında bana yön veren, manevi desteğini daima hissettiren değerli danışmanım Doç. Dr. Coşkun GÜÇLÜ'ye; enzim deneylerim sırasında beni laboratuvarına kabul eden ve benden hiçbir imkânı esirgemeyen, birikimiyle bana değerli katkılar sağlayan hocam Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e (Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya A.B.D.); çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen ESOGÜ Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü öğretim üye ve elemanlarına Bölüm Başkanı Prof. Dr. Ece TURHAN şahsında teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Materyal olarak kullanmış olduğum mikroorganizma örneklerinin temin edilmesini sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Emre DEMİRER DURAK'a (Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji A.B.D.); pek çok konuda sorularımı yanıtlayarak destek veren Araş. Gör. Yusuf SÜRMELE'ye (Namık Kemal Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji A.B.D.); enzim çalışmalarım sırasında benden yardım ve nezaketlerini hiç esirgemeyen kıymetli arkadaşlarım Uzm. Kimyager Oya BÜYÜKEMİR ve Uzm. Kimyager Deniz NEZİR'e; bu süreçte desteklerini gördüğüm sevgili arkadaşlarım Yük. Kimyager Nilüfer ÖZTÜRK ve Araş. Gör. Jale BİLGİN'e teşekkür ederim.

Babam Nejat, annem Nursel ELİBOL ve ablam İrem ARGİNOĞLU'na beni özveriyle yetiştirdikleri için; hayat arkadaşım Araş. Gör. Onur İLERİ'ye sabrı ve desteği için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmamı destekleyen Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu (Proje No: 2018-2219)'na teşekkür ederim.

Ceren ELİBOL İLERİ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	4
2.1. Enzimler	4
2.2. Selüloz	6
2.3. Selülaz enzimi	7
2.4. <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn.	11
2.5. <i>Trichoderma</i> spp.	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Mikroorganizma	25
3.1.2. Kullanılan cihazlar	26
3.1.3. Kullanılan çözeltiler	26
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Kültür koşulları ve enzim üretim ortamı	27
3.2.2. İkili karışık kültür deneyleri	28
3.2.3. Selülaz aktivite tayini	28
3.2.4. Kantitatif protein tayini	30
3.2.5. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi)	31
3.2.6. Boyama	34
3.3. Enzim Aktivitesine Etki Eden Bazı Parametrelerin İncelenmesi	35
3.3.1. pH değerinin etkisi	35

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.3.2. Sıcaklığın etkisi.....	35
3.3.3. Substrat spesifikliği	35
3.3.4. Substrat konsantrasyonunun etkisi	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1. Kùltür Koşulları ve Enzim Üretim Ortamı.....	37
4.2. İkili Karışık Kùltür Deneyleri	38
4.3. Selùlaz Aktivite Tayini	38
4.4. Kantitatif Protein Tayini	39
4.5. SDS-PAGE.....	40
4.6. Enzim Aktivitesine Etki Eden Bazı Parametreler	46
4.6.1. pH değerinin etkisi.....	46
4.6.2. Sıcaklığın etkisi.....	47
4.6.3. Substrat spesifikliği	49
4.6.4. Substrat konsantrasyonunun etkisi	49
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	53
EK AÇIKLAMALAR	63
Ek Açıklama-A: Çalışmada kullanılan cihazlar, markaları ve kullanım amaçları.....	64
Ek Açıklama-B: Çalışmada kullanılan çözeltiler ve içerikleri.....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2. 1. Selülozun yapısı.....	6
2. 2. <i>Thermomonospora fusca</i> tarafından üretilmiş selülaz enziminin yapısı	7
2. 3. Selülaz aktiviteleri	8
2. 4. Çalışma kapsamında PDA besiyerinde yetiştirilmiş 4 günlük (a), 5 günlük (b), 6 günlük (c), 7 günlük (d), 10 günlük (e) ve 18 günlük (f) <i>R. solani</i> örnekleri.....	11
2. 5. Çalışma kapsamında PDA besiyerinde tek koloni olarak yetiştirilmiş 5 günlük (a), 6 günlük (b), 7 günlük (c) ve 10 günlük (d) <i>T. virens</i> örneklerindeki belirgin halkasal yayılım.....	13
3. 1. PDA ile hazırlanmış yatık besiyerine yüzey ekimi yapılarak yetiştirilmiş 10 günlük <i>T. viride</i> (a), <i>T. harzianum</i> (b), <i>T. virens</i> (c), <i>T. asperellum</i> (d) ve <i>R. solani</i> (e) örnekleri.....	25
3. 2. PDA besiyerinde tek koloni olarak yetiştirilmiş 4, 5, 6, 7 ve 10 günlük TVN2, TH3, TA3, TVD3 ve RS örneklerinin morfolojik gelişimleri	26
3. 3. Steril kabin içerisinde petri kaplarına döküldükten sonra kontaminasyon gözlenmemiş, ekime hazır PDA besiyerleri	27
3. 4. Mandel ve Weber ortamında 5 gün inkübasyondan sonra örnekler	28
3. 5. Glukozun farklı konsantrasyonlarıyla hazırlanan standart grafiği	29
3. 6. BSA'nın farklı konsantrasyonlarıyla hazırlanan standart grafiği	31
3. 7. Hazırlanan SDS-PAGE jelinin elektroforez camlarının arasına doldurulması	32
3. 8. Jele yüklenen örneklerin 80 V akımda yürütülmesi (a) ve elektriksel alanda ilerlemeye başlamaları (b)	34
4. 1. PDA besiyerinde yetiştirilmiş olan TVN3 suşunun taze PDA besiyerine inokülasyonu	37
4. 2. TA3, TVN1, TH4 ve TVD3 izolatlarının <i>R. solani</i> Kühn. (RS) üzerindeki antagonistik etkisinin, 10 günlük karışık ikili kültürlerde morfolojik olarak gösterilmesi	38
4. 3. <i>Trichoderma</i> spp.'nin <i>R. solani</i> bulunan ve bulunmayan ortamlardaki selülaz aktiviteleri (U/ml) grafiği	39
4. 4. <i>R. solani</i> ile <i>Trichoderma</i> spp.'nin bir arada bulunduğu örneklere ait protein miktarları (mg/ml) grafiği	40
4. 5. 1 numaralı jel görüntüsüne ait R _f değeri-log(MK) grafiği	41
4. 6. 2 numaralı jel görüntüsüne ait R _f değeri-log(MK) grafiği	42
4. 7. 3 numaralı jel görüntüsüne ait R _f değeri-log(MK) grafiği	42
4. 8. 4 numaralı jel görüntüsüne ait R _f değeri-log(MK) grafiği	43
4. 9. TH3, TH2, TVD1 (1 numaralı jel), TA3 ve TA1 (2 numaralı jel) izolatlarından üretilen endo-β-1,4-glukanaz (EG) enziminin SDS-PAGE görüntüsü.....	44

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4. 10. TVN2, TVN3, TVN1, TVD3 (3 numaralı jel) ve TA2 (4 numaralı jel) izolatlarından üretilen endo- β -1,4-glukanaz (EG) enziminin SDS-PAGE görüntüsü .	44
4. 11. Farklı pH değerlerinin endo- β -1,4-glukanaz enzim aktivitesine etkisi	47
4. 12. Farklı sıcaklık değerlerinin endo- β -1,4-glukanaz enzim aktivitesine etkisi.....	48
4. 13. Farklı substratların endo- β -1,4-glukanaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	49
4. 14. Farklı substrat konsantrasyonlarının endo- β -1,4-glukanaz enzim aktivitesine etkisi	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2. 1. Enzimlerin sınıflandırılması (Arıcı, 2007)	5
2. 2. Aerobik fungal selülozların selüloz zinciri üzerine etki mekanizmaları (Bhat ve Bhat, 1997)	9
3. 1. Endo- β -1,4-glukanaz üretimi için hazırlanan ortamın bileşenleri	27
3. 2. Ayrırma jelinin bileşenleri	33
3. 3. Yığma jelinin bileşenleri	33
4. 1. <i>Trichoderma</i> spp.'nin <i>R. solani</i> bulunan ve bulunmayan ortamlardaki selüloz aktiviteleri.....	38
4. 2. <i>R. solani</i> ile <i>Trichoderma</i> spp.'nin bir arada bulunduğu örneklere ait protein miktarları (mg/ml)	40
4. 3. 1 numaralı jeldeki bantlara ait R_f değerleri ve hesaplanan molekül kütleleri (MK) ...	41
4. 4. 2 numaralı jeldeki bantlara ait R_f değerleri ve hesaplanan molekül kütleleri (MK) ...	42
4. 5. 3 numaralı jeldeki bantlara ait R_f değerleri ve hesaplanan molekül kütleleri (MK) ...	43
4. 6. 4 numaralı jeldeki bantlara ait R_f değerleri ve hesaplanan molekül kütleleri (MK) ...	43
4. 7. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen selüloz enzimlerinin molekül kütleleri.....	45
4. 8. Bazı <i>Trichoderma</i> türlerinden elde edilen selüloz enzimleri için optimum pH değerleri.....	47
4. 9. Bazı <i>Trichoderma</i> türlerinin enzim üretim ortamlarına ait optimum sıcaklık değerleri.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dk	Dakika
g	Göreceli Santrifüj Kuvveti
g	Gram
L	Litre
M	Molarite
mg	Miligram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
nm	Nanometre
rpm	Rounds Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
V	Hacim
%	Yüzde
°C	Santigrat derece

Kısaltmalar

(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
A.B.D.	Ana Bilim Dalı
APS	Amonyum persülfat
ATP	Adenozin trifosfat
<i>Azospirillum</i> spp.	<i>Azospirillum</i> türleri
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> türleri
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>B. macerans</i>	<i>Bacillus macerans</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
<i>Cellulomonas</i> sp.	<i>Cellulomonas</i> türleri

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar

CMC

CoCl₂

DNS

EC

FeSO₄.7H₂O*Fusarium* spp.*F. oxysporum**Glomus* spp.

IUB

KH₂PO₄MgCl₂MgSO₄.7H₂OMnSO₄.H₂O

MK

Na-metabisülfid

NaOH

Na-K tartarat

Na-sitrat

Na₂SO₄

No

örn.

PAGE

PGPR

pH

Pseudomonas spp.*Pythium* spp.*P. ultimum**Rhizobium* spp.

RNA

Açıklama

Karboksümetil selüloz

Kobalt klorür

Dinitrosalisilik asit

Enzim Komisyonu

Demir sülfat

Fusarium türleri*Fusarium oxysporum**Glomus* türleri

Uluslararası Biyokimya Birliği

Potasyum fosfat

Magnezyum klorür

Magnezyum sülfat heptahidrat

Mangan sülfat monohidrat

Molekül kütlesi

Sodyum metabisülfid

Sodyum hidroksit

Sodyum-potasyum tartarat

Sodyum sitrat

Sodyum sülfat

Numara

örneğin

Poliakrilamid jel elektroforezi

Bitki Büyümesini Teşvik Edici Rizobakteriler

Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)

Pseudomonas türleri*Pythium* türleri*Pythium ultimum**Rhizobium* türleri

Ribo nükleik asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar

R. solani

SDS

SDS-PAGE

S. rolfsii

TEMED

ZnSO₄.7H₂O

Thermoactinomyces sp.

Trichoderma spp.

T. asperellum

T. gamsii

T. hamatum

T. harzianum

T. koningii

T. ouroviride

T. pseudokoningii

T. reesei

T. virens

T. viride

vd.

w/v

Açıklama

Rhizoctonia solani

Sodyum dodesil sülfat

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

Sclerotium rolfsii

Tetrametiletilediamin

Çinko sülfat heptahidrat

Thermoactinomyces türleri

Trichoderma türleri

Trichoderma asperellum

Trichoderma gamsii

Trichoderma hamatum

Trichoderma harzianum

Trichoderma koningii

Trichoderma ouroviride

Trichoderma pseudokoningii

Trichoderma reesei

Trichoderma virens

Trichoderma viride

Ve diğerleri

Ağırlık/hacim oranı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda dünyada yaşanan kontrolsüz nüfus artışı ve buna bağlı açlık sorunu sebebiyle, yeni tarım alanlarının açılması ve mevcut alanlardan daha yüksek verim alma yollarına gidilmektedir. Ancak bitkisel üretimi artırmak için bilinçsizce ve yoğun şekilde uygulanan tarım ilaçları; toprağın fiziksel yapısının ve dengesinin bozulmasına, topraktaki canlılığın yitirilmesine yol açmaktadır. Yoğun gübre ve kimyasal ilaç kullanımının yol açtığı bu tür olumsuzlukları önlemek için, biyolojik mücadelede rol alabilecek birçok canlı grubu ön plana çıkarılmıştır. Bu konuda bitki gelişimini destekleyen mikroorganizmalar büyük önem taşımaktadır.

Bitki kök bölgesi ve toprağın rizosfer tabakası, kök salgılarının yoğun olduğu ve dolayısıyla yüksek mikroorganizma popülasyonu barındıran bir bölgedir. Rizosferde yaşayan mikroorganizmaların bir kısmının bitki gelişimini teşvik ettiği bilinmektedir. Bu yararlı mikroorganizmalar; bitki gelişimini doğrudan etkileyen mikroorganizmalar (PGPM) ve biyolojik kontrol ajanları (BCA) olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. PGPM olarak bilinen grubun bitki gelişimini doğrudan teşvik ettiği; BCA olarak tanımlanan grubun ise fitopatojenleri kontrol ederek bitki gelişimine dolaylı yoldan etki ettikleri belirtilmiştir. Bitki gelişimini teşvik ettiği bilinen başlıca mikroorganizmaların *Azospirillum* spp., *Rhizobium* spp., *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp. ve *Glomus* spp. olduğu bilinmektedir. Bu mikroorganizmalardan *Trichoderma* türleri, en çok çalışılan biyokontrol mikroorganizmalarıdır (Küçük ve Güler, 2009).

Trichoderma spp., antagonistik etki göstermek veya toksik antibiyotikler oluşturmak yoluyla bitki patojenleri üzerinde baskılayıcı ve geriletici etki gösterdiği bilinen mikroorganizmalardır. Bu etkileri sebebiyle farklı ülkelerde “F-Stop”, “BinabT”, “Suprevisit”, PlantShield” ve “T-22 Planter Box” adları ile tescilli ticari formları satılmaktadır. Bu ticari ürünler özellikle meyve, süs bitkileri, çim ve sebzeleri içeren çeşitli konukçularda toprak kökenli mantarların neden olduğu çökertme ve solgunluk hastalıklarına karşı kullanılmaktadır (Döken vd., 2011; Kavanagh, 2014).

Biyokontrol ajanı olarak sınıflandırılan canlıların hormon benzeri metabolitler ürettikleri, toprak veya organik maddeden besinleri çözerek bitki gelişiminde önemli rol oynadıkları ve verimi artırdıkları, bitkilerin sağlıklı olmasını sağlayarak dolaylı yoldan bitki patojenlerinin gelişimlerini engelledikleri kanıtlanmıştır (Kleifeld ve Chet, 1992; Yedidia vd., 2003; Altomare vd., 1999; Vinale vd., 2006). Fungal hastalıkların gelişimini engellemedeki etki mekanizmaları ise direkt antifungal aktivite (örn. hifsel engelleme), antifungal bileşiklerin salgılanması, konukçudaki patojenlerin uzaklaştırılmasıyla dolaylı kontrol ve konukçu savunma yanıtının desteklenmesi gibi yollarla gerçekleşmektedir (Kavanagh, 2014).

Bitkilerdeki hastalık faktörlerinin büyük çoğunluğunu fungal patojenler ya da fitopatojenler oluşturmaktadır. 19. yüzyılın başlarında, binlerce fungus bitki paraziti olarak tanımlanmıştır ve bu bitkilerin neredeyse tamamı kısmi fungal hastalıkların konukçusudur (Kavanagh, 2014). Bu patojenlerden biri olan *Rhizoctonia* spp. toprakta saprofit olarak veya bitki artıklarında bulunur. Birçok bitkide kök ve gövde çürüklüğüne sebep oldukları bilinmektedir.

Birçok mikroorganizmanın, bitki patojenlerinin gelişimlerini engellemek ve bu patojenlerin sebep olacağı hastalıkları önlemek amacıyla bazı enzimler salgıladıklarını veya mevcut enzim aktivitelerini artırdıkları bilinmektedir. *Trichoderma* spp.'nin özellikle glukanaz, proteaz ve kitinaz gibi litik enzimler salgılayarak patojen fungusların hücre duvarlarının yapısını bozdukları belirlenmiştir (Chet vd., 1990; Cook ve Baker, 1983; Elad vd., 1983). Ekzo- β -1,4-glukanaz ve endo- β -1,4-glukanazlar şeklinde tanımlanmış olan selüloolitik enzimler, patojen fungusların gelişimini engellemek için mikroorganizmalar tarafından salgılandığı bilinen enzimlerden bazılarıdır.

Bu tez çalışması kapsamında bazı *Trichoderma* suşları kullanılmış ve;

1. *Trichoderma* spp. izolatlarının kültür ortamındayken ürettiği endo- β -1,4-glukanaz enzim aktivitesinin belirlenmesi,
2. *Rhizoctonia solani* Kühn. ile aynı ortamda yetiştirilen *Trichoderma* spp.'nin ürettiği endo- β -1,4-glukanaz enzim aktivitesinin belirlenmesi,

3. Bu iki farklı koşuldan elde edilen sonuçların karşılaştırılarak, *R. solani* varlığının *Trichoderma* spp.'deki endo- β -1,4-glukanaz enzim aktivitesinde değişime sebep olup olmadığının saptanması,
4. Üretilen fungal selüloza ait moleküler ağırlığın SDS-PAGE yöntemiyle doğrulanması hedeflenmiştir.

Trichoderma spp.'nin *R. solani* varlığında selüloz enzim sentezini artırması, *R. solani*'nin hücre duvarını zarara uğratarak patojene karşı biyokimyasal tepki oluşturduğunun işaretidir. Dolayısıyla *R. solani* varlığındaki enzim aktivite artışı bize, *Trichoderma* spp.'nin *R. solani* ile mücadelede biyokontrol ajanı olarak kullanılmasının etkili olup olmayacağı hakkında bilgi vermektedir. Bu konuda yapılmış olan diğer çalışmaların da ortaya koyduğu üzere *Trichoderma* spp., hem *R. solani*'nin hücre duvarına saldırarak, hem de bitkilerin direncini artırıp gelişimlerini teşvik ederek biyolojik mücadeleye katkı sağlamaktadır. Bu çalışmada yukarıda belirtilen özellikler deneysel sonuçlara dayandırılarak, çevre dostu bir savaşım şekli olan biyolojik mücadeleye vurgu yapılmıştır. *Trichoderma* spp.'nin veya bu türlerden üretilecek olan ticari ürünlerin, çevreye zarar vermeden tarımsal anlamda pek çok fayda sağlayacağı; ayrıca üretilen fungal selülazın pek çok sanayi alanında değerlendirilebileceğinin altı çizilmiştir. Bu tez çalışmasının, çevre dostu ve ekonomik olabilecek hamleler yapılmasında *Trichoderma* spp. kullanımının önemine ışık tutabileceği umut edilmektedir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Enzimler

Enzimler, canlı hücre tarafından sentezlenen, hemen hemen tamamı proteinlerden oluşan biyolojik katalizörlerdir. Katalizör işlevini, kimyasal reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonu hızlandırmak yoluyla gösterirler. Reaksiyon sırasında herhangi bir değişikliğe uğramadan reaksiyondan aynı şekilde çıkarlar, bu sayede tekrar tekrar kullanılabilen biyomakromoleküllerdir. Hücre içinde işlev gördükleri gibi (intraselüler), hücre dışında da aktivite gösterebilirler (ekstraselüler) (Arıcı, 2007).

Enzim terimi ilk defa Alman fizyolog Kühne tarafından 1878’de kullanılmıştır. Fakat enzimlerin kullanımı, henüz bu terim ortaya konmadan önce başlamıştır. Zaten tarih boyunca ekmek, şarap, boza ve yoğurt gibi maddelerin üretiminde, bilinmese de enzimlerden yararlanılmıştır (Yıldız, 2007).

Enzimler, RNA yapısında olan ribozimler dışında protein yapısındadırlar. Bazı enzimler sadece proteinden oluşurken, bazı enzimler ise aktivite gösterebilmek için protein yapısının yanı sıra protein olmayan organik yapılara veya metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Protein olmayan bu kısım eğer vitaminlerden oluşuyorsa “koenzim”, minerallerden oluşuyorsa “kofaktör” olarak adlandırılır. Proteinden oluşan kısma ise “apoenzim” denir. Protein olmayan kısım ile apoenzimin birleşmesi sonucu meydana gelen yapı “holoenzim” olarak adlandırılır. Enzimler “substrat” olarak isimlendirilen maddeler üzerinde etki ederler. Tek bir substratı dönüştüren enzimler olduğu gibi, belirli substrat gruplarına etki eden enzimler de bulunmaktadır. Bu durum, enzimlerde spesifiteyi belirler (Hames ve Hooper, 1997).

Enzimler için ilk zamanlarda genel bir sistematığe dayanmayan (pepsin, tripsin gibi) karışık ve rastgele bir isimlendirme kullanılmıştır. İlk isimlendirilen enzim katalaz, ikincisi diyastaz, üçüncüsü ise peroksidaz enzimidir. Bu tür bir isimlendirme örnek alınarak daha sonraki enzimler, enzimin etki ettiği substratın sonuna –az eki getirilmesiyle (amilaz, lipaz, üreaz, proteaz gibi) ya da katalizledikleri tepkimenin tanımlanmasıyla (laktat dehidrogenaz

gibi) oluşturulan bir sistemle adlandırılmışlardır. Uluslararası Biyokimya Birliği (International Union of Biochemistry, IUB)'nin Enzim Komisyonu (EC) ilk kez 1961'de, günümüzde de kullandığımız sistematik adlandırmanın detaylarını içeren bir rapor yayınlamıştır. Bu rapor, o dönemde bilinmekte olan 712 enzimi kapsamaktadır. Bu isimlendirme ve sınıflandırma sistemi, 1992 yılında 3196 enzimi kapsayacak şekilde yenilenmiştir (Arıcı, 2007).

Enzimler, Enzim Komisyonu'nun belirlemiş olduğu şekilde altı ana grupta toplanmıştır (Çizelge 2.1). Bu ana grupların her biri, enzimin katalizlediği tepkime tipini ve etkilediği substratı temsil etmektedir. Her bir ana grup alt gruplara, alt gruplar da alt-alt gruplara ayrılmaktadır. Enzimlerin isimlendirilmelerinde ise dört haneden oluşan, her enzim için farklı olan bir EC numarası kullanılmaktadır. Bu dizinin birinci hanesi, enzimin hangi ana gruba ait olduğunu ifade etmektedir. İkinci hane alt grubu, üçüncü hane alt-alt grubu, dördüncü hane ise enzimin kendine özgü sıra numarasını belirtmektedir (Onat vd., 2006).

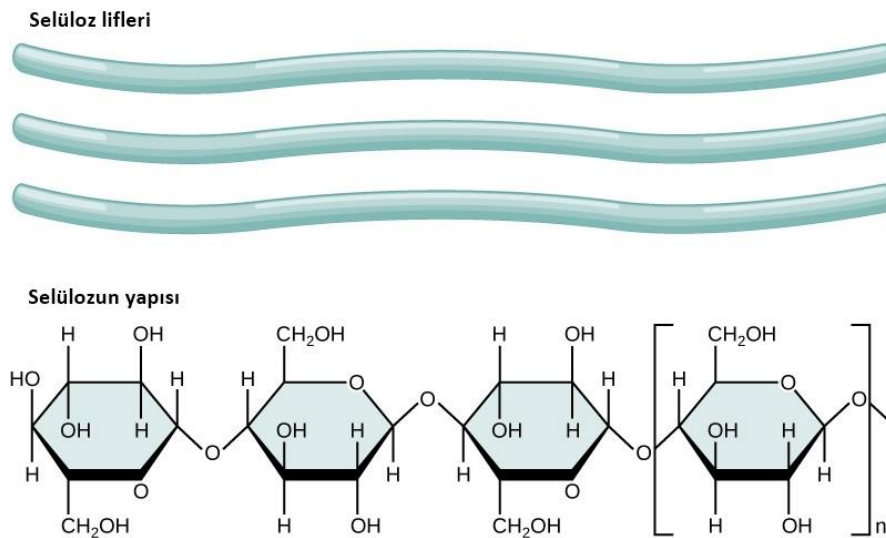
Çizelge 2. 1. Enzimlerin sınıflandırılması (Arıcı, 2007)

Enzim sınıfı	Reaksiyon tipi	Önemli alt sınıfları
Oksidoredüktazlar (EC 1...)	Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.	Dehidrogenazlar (Redüktazlar) Oksidazlar (Aldehit oksidaz)
Transferazlar (EC 2...)	Gruplar arası transferleri katalizlerler.	Metil transferaz
Hidrolazlar (EC 3...)	Hidrolitik reaksiyonları katalize ederler.	Üreaz, lipaz, fosfataz, selülaz
Liyazlar (EC 4...)	Grup eklenmesi veya çıkarılması reaksiyonlarını katalizlerler.	Karbonik anhidraz, dekarboksilaz
İzomerazlar (EC 5...)	İzomerizasyonu, yani molekül içinde yeniden yapılanmayı katalize eden enzimlerdir.	Rasemaz
Ligazlar (EC 6...)	ATP'nin parçalanması ile C-O, C-S, C-N, C-C bağlarını oluşturan enzim grubudur.	DNA ligaz

2.2. Selüloz

Selüloz bitki hücre duvarının temel bileşeni olup, dünya üzerinde en bol bulunan yenilebilir polimer olarak bilinmektedir. Bitki duvarına dayanıklılık ve güç verdiği, bitki yapısını desteklediği ve bitkilerin dik durmasında rolü olduğu bilinmektedir. Doğada selüloza saf hâlde rastlanmaz. Hemen hemen tüm bitkilerin iskelet yapısında hemiselüloz ve lignin ile birlikte (%40-60 selüloz, %20-40 hemiselüloz ve %10-25 lignin) bulunmaktadır (Lynd vd., 2002). Bitkilerin yanı sıra bazı bakteriler ve mantarlar tarafından da üretilmektedir. Hem insan, hem de doğa faaliyetleri sonucu yan ürün olarak en büyük atığı oluşturan selüloz, fibriler yapıda ve sert bir maddedir. Ayrıca kompleks yapısı ve yoğunluğu da selülozu hidrolize karşı dayanıklı hâle getirmektedir. Suya karşı afinitesi yüksek olmasına rağmen, suda hiç çözünmemektedir (Topuz vd., 2007).

Selüloz molekülü oldukça kararlı bir yapıdadır. β -glukozidik bağın 25°C 'deki yarılanma ömrünün 5-8 milyon yıl kadar olduğu öngörülse de, enzim aracılığıyla selülozun hidrolizi oldukça çabuk gerçekleşmektedir. Karbon atomunun atmosfere geri kazandırılmasında bu işlem oldukça büyük önem taşır (Kuduğ, 2013; Wolfenden ve Snider, 2001). Yapısında β -1,4-glukozidik bağlar ile lineer bir şekilde bağlanmış olan yaklaşık 15,000 glukoz birimi bulunmaktadır (Kavanagh, 2014). Bu lineer bağlanma, çok dayanıklı düz zincirler hâlinindedir (Şekil 2.1) ve zincirler birbirlerine paralel demetler şeklinde dizilmektedirler (Çakmar, 2005).

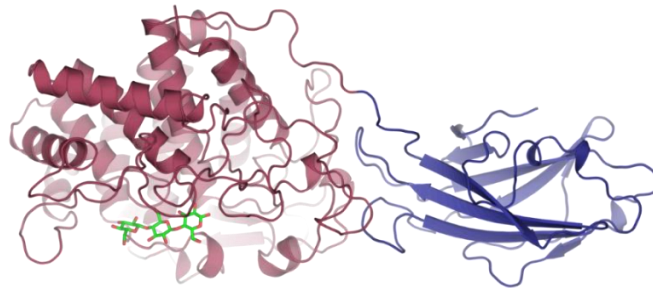


Şekil 2. 1. Selülozun yapısı

Selüloz glukoz; endoglukanaz, ekzoglukanaz ve β -glukozidaz olmak üzere üç farklı enzimin birlikte çalışması ile hidrolize olabilir (Niehaus vd., 1999). Diyetle alınan glikojen ve nişasta, α -amilazlar tarafından hidrolizlenir. Bu enzim tükürük ve intestinal salgıda bulunur ve glukoz birimleri arasında bulunan ($\alpha \rightarrow 4$) glukozidik bağları kırar. Birçok hayvan, ($\beta 1 \rightarrow 4$) bağlarını hidrolizleyecek enzimleri olmadığı için selülozu enerji olarak kullanamaz. Fakat istisnalardan biri olan termitler ağaçları sindirebilirler, çünkü bağırsaklarında selülaz enzimini salgılayabilen simbiyotik *Trichonympha* mikroorganizması barınmaktadır. Odunu çürütebilen mantarlar ve bakteriler de aynı şekilde selülaz enzimi salgılamaktadırlar. Omurgalılarından sadece sığırlar ve diğer geviş getirenler (koyunlar, keçiler, develer, zürafalar) selülozu besin olarak kullanabilirler. Çünkü onların da midelerinde selülaz salgılayabilen mikroorganizmalar bulunmaktadır (Nelson ve Cox, 2005).

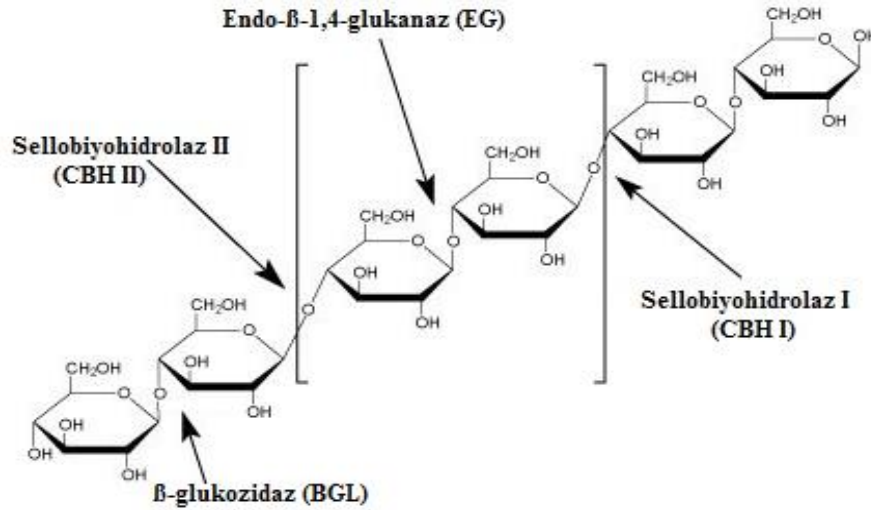
2.3. Selülaz enzimi

Selülozun yenilenebilir bir enerji kaynağı olma potansiyeli, ancak selülozlar gibi selülozu parçalayan enzimlerin de tanımlanmasından sonra fark edilmiştir (Bhat ve Bhat, 1997). Selülozu parçalama yeteneğine sahip selülaz enzimi, glukoz monomerleri arasında bulunan β -1,4 glukozit bağlarını tanır ve parçalar. Parçalanma sonucunda sellobiyoz, sellobiyoz türevleri ve glukoz açığa çıkar. Selülazlar, Şekil 2.2'deki gibi bağımsız katlanmaların olduğu farklı yapı ve fonksiyona sahip alt birimlerin bir araya gelmesi ile oluşurlar. Bu karmaşık enzim sistemi genellikle bir katalitik birim, bir veya daha fazla substrat bağlayıcı ya da kompleksi oluşturmada görevli yardımcı birimlerden oluşmaktadır. Bağlayıcı birimler genellikle glisin, prolin, serin ve treonince zengin peptidlerdir (Williamson vd., 1992).



Şekil 2. 2. *Thermomonospora fusca* tarafından üretilmiş selülaz enziminin yapısı

Hidrojen bağları ile birbirine bağlanarak kristal bir form oluşturmuş olan selüloz molekülleri, bu kompleks özelliklerinden dolayı tek bir enzimin faaliyeti ile parçalanamazlar. Selülozun tamamen parçalanabilmesi için endoglukanaz, ekzoglukanaz ve β -glukozidazları içeren üç temel enzimin birlikte hareket etmesi gerektiği bilinmektedir. Bu üçlü sistem ve aktiviteleri, Şekil 2.3'te belirtilmiştir.



Şekil 2. 3. Selülaz aktiviteleri

1. Endoglukanaz (Endo- β -1,4-glukanaz) selüloz polimerini genellikle amorf bölgesinden parçalar ve selüloz zincirlerinin gelişigüzel kesilmesini sağlar. Bu parçalama işlemi sonucunda açığa çıkan son ürün, farklı uzunluklardaki oligosakkaritlerdir.
2. Ekzoglukanaz (Sellobiyohidrolaz), daha çok pamuk iplikçikler veya avicel gibi çok düzenli yapıya sahip mikrokristal selüloza saldırır. Selüloz polimerini bütün olarak ya da endo- β -1,4-glukanaz yardımıyla parçalanmış kısımların uç kısımlarından ilerleyerek işlemi yürütür. Parçalanma sonucu ana ürün olarak glukoz veya sellobiyoz açığa çıkar (Lynd vd., 1991; Kuduğ, 2013).
3. β -glukozidaz ise sellodekstrin ve sellobiyozu glukozla hidrolizler (Gözükara, 2009; Çakmar, 2005). Selülazların selüloz zinciri üzerine nasıl etki ettikleri kısaca Çizelge 2.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 2. 2. Aerobik fungal selülazların selüloz zinciri üzerine etki mekanizmaları (Bhat ve Bhat, 1997)

Enzim türü	EC kodu	Diğer adı	Etki mekanizması
Endo-(1,4)-β-D-glukanaz	EC 3.2.1.4	Endoglukanaz veya endoselülaz	$\begin{array}{c} -G-G-G-G- \\ \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Bağları rastgele hidroliz eder} \end{array}$
Ekzo-(1,4)-β-D-glukanaz	EC 3.2.1.91	Sellobiyohidrolaz veya ekzoselülaz	$\begin{array}{c} G-G-G-G-G- \\ \uparrow \\ \text{İndirgenen veya indirgenmeyen} \\ \text{uçtan sellobiyozu ayırır} \end{array}$
Ekzo-(1,4)-β-D-glukanaz	EC 3.2.1.74	Ekzoglukanaz veya glukohidrolaz	$\begin{array}{c} G-G-G-G-G- \\ \uparrow \\ \text{İndirgenmeyen uçtan glukozu ayırır} \end{array}$
β-glukozidaz	EC 3.2.1.21	Sellobiyaz	$\begin{array}{c} G-G, G-G-G-G \\ \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Kısa zincirli selooligosakkaritlerden} \\ \text{ve sellobiyozdan glukozu ayırır} \end{array}$

Selülazlar yaygın olarak aeroblar, anaeroblar, termofilikler ve mezofilikler gibi çeşitli bakteri ve mantarlardan üretilirler. *Trichoderma reesei*, mantarlar arasındaki en önemli selülaz üreticisi olarak kabul edilmektedir. Selülaz üretiminde kullanılan diğer başlıca mantar türleri ise *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternate* ve *Penicillium chrysogenum*'dur (Sharada vd., 2013). Ekstraselüler selülitik aktivite gösteren bakterilere ise *Cellulomonas* sp., *Bacillus* sp. ve *Thermoactinomyces* sp. örnek gösterilmektedir (Gözükara, 2009).

Endo-β-(1,3-1,4)-glukanaz enzimi, arpa ve yulaf gibi tahılların endosperm hücre duvarlarının büyük kısmını oluşturan karma bağlı β-(1,3-1,4)-glukanları hidrolize edebilme özelliğindedir. β-glukanaz üretme yeteneği *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. macerans* ve *B. licheniformis*'te oldukça yaygın görülmektedir (Liming ve Xueliang, 2004).

Selülaz ve hemiselülaz ile ilgili ilk biyoteknolojik çalışmalar 1980'lerin başında, ilk olarak hayvan yemi alanında başlamıştır. Yine çiftçilikte ve tarım sektöründe, çiftlik hayvanlarının verim ve performansını artırıcı gıda takviyeleri olarak, yemlerin besin değerini ve sindirilebilirliğini artırmaları sebebiyle tercih edilmektedirler.

Selülazlar gıda endüstrisinde de, tek başına ya da diğer enzimler ile kombinasyon hâlinde önemli bir konumdadırlar (Şafak, 2019). Gıda sektöründe özellikle meyve suyu işlenmesi, berraklaştırılması ve alkol üretiminde istenen rengin elde edilmesinde rol oynamaktadırlar. Şarap ve bira endüstrisinde ürünlerin kalitesini ve verimini artırmak için uygulanan fermantasyon işlemlerine de dahil olmaktadır. Yine gıda alanında ürünün viskozitesini azaltan ve filtrelenebilirliği artıran mashing işleminde glukanaz kullanılmaktadır. Şarap endüstrisinde şarap ekstraksiyonu için, kolay arıtma, filtrasyon ve stabilizasyon işlemleri sırasında da selülaz, hemiselülaz ve pektinaz karışımı kullanılmaktadır (Kuhad vd., 2011).

Kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinde, özellikle gazete gibi basılı kâğıtların geri dönüşüm işlemlerinde kullanılmaktadırlar. Ayrıca biyomekanik hamurlama, mürekkep giderme ve biyolojik olarak parçalanabilen kâğıt havlular, sıhhi kâğıt ve kartonlar gibi çok çeşitli üretimlerde de tercih edilmektedirler (Kuhad vd., 2011; Shweta, 2012).

Tekstil endüstrisinde pamuğun ipliğe dönüştürülmeden önce geçirdiği süreçlerde yine selülaz enziminden faydalanılmaktadır. Rafine etme, ağartma, boyama, parlatma gibi pek çok işlem, ciddi miktarlarda su ve enerji tüketimine sebep olmakta; bu da insanları daha temiz ve ekonomik yollar arayışına itmektedir. Bu arayışın bir sonucu olarak tekstil endüstrisinde de enzim kullanım oranı hızla artışa geçmiştir. Tekstilde enzim kullanımına verilebilecek başlıca örneklerden biri kot pantolonlara uygulanan yıkama (ağartma) işleminin selülaz enzimiyle gerçekleştirilmesidir. Bu işlemde kullanılan selülaz enzimi çoğunlukla *T. viride*'den elde edilmektedir (Queiroga vd., 2007; Yachmenev vd., 2002).

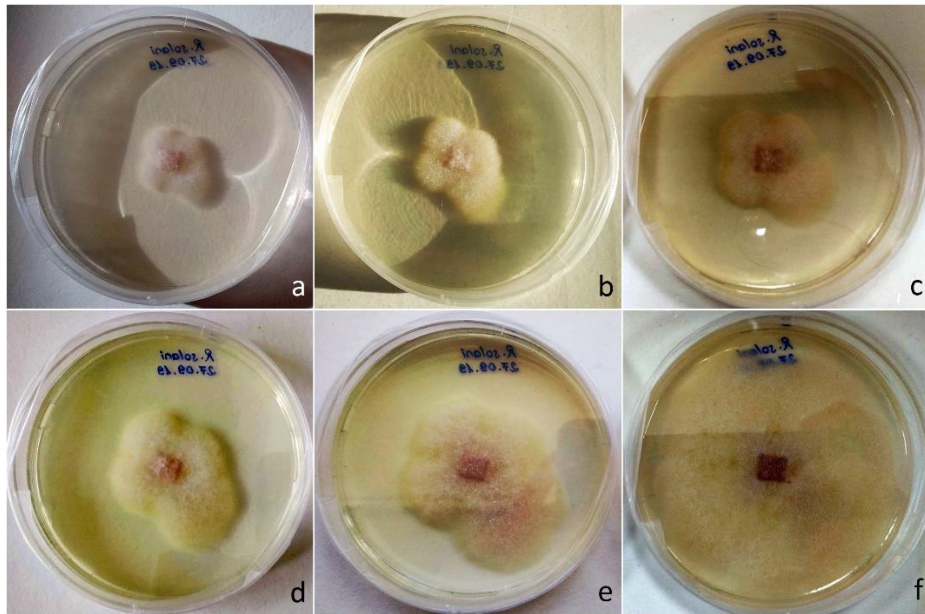
Selülazlar aynı zamanda yakıt üretimi için biyokütlenin etanole dönüşümünde rol oynamakta ve yenilenebilir enerjinin büyük kısmını oluşturmaktadırlar (Kavanagh, 2014; Topuz vd., 2007).

Selüloz enzimi toksik etki göstermemesi, yüksek spesifitesi, optimum pH, sıcaklık, basınç gibi özelliklerinde ılımlı aralıklara uyum sağlaması bakımından, inorganik katalizörlere göre daha avantajlı ve tercih edilebilir konumdadır (Taylor, 1991).

2.4. *Rhizoctonia solani* Kühn.

Rhizoctonia spp. Basidiomycota şubesi, Agaricomycotina alt-şubesi, Agaricomycetes sınıfı, Ceratobasidiaceae takımı, Cantharellales familyasına mensupturlar (Ajayi-Oyetunde ve Bradley, 2018).

Bazı *Rhizoctonia* türlerinin eşeyli olarak çoğalmaması, spor oluşturmaması veya tipik morfolojik özelliklerinin olmaması, bu fungus grubunun morfolojiye ve spor tipine dayalı fungus taksonomisi ile sınıflandırılmasını zorlaştırmaktadır. Günümüzde *Rhizoctonia* spp.'nin sınıflandırılmasında; vejetatif hif hücrelerinde bulunan çekirdek sayısı ve anastomosis gruplarına dayalı bir sistem kabul görmektedir (Buhur, 2014). Hifal dal, dallanma noktasında karakteristik bir daralma gösterir. Kahverengi dışında kültürel pigmentasyon gözlenmez. Şekil 2.4'te *R. solani*'nin 18 günlük morfolojik gelişim aşamaları verilmiştir.



Şekil 2. 4. Çalışma kapsamında PDA besiyerinde yetiştirilmiş 4 günlük (a), 5 günlük (b), 6 günlük (c), 7 günlük (d), 10 günlük (e) ve 18 günlük (f) *R. solani* örnekleri

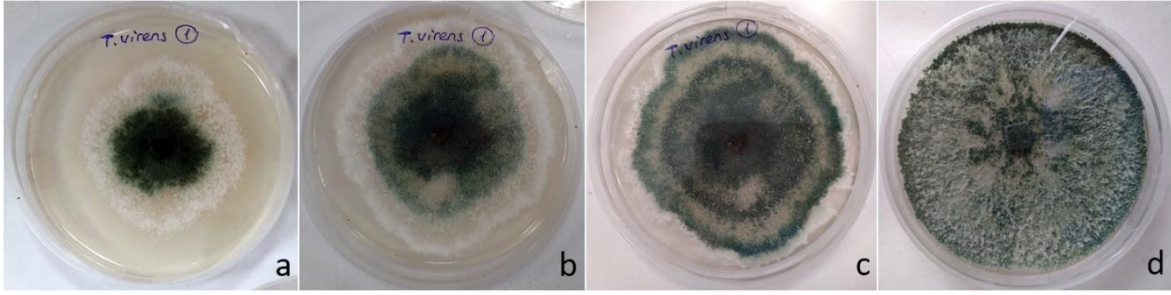
R. solani topraktaki bitki kalıntılarında miselyum halinde veya serbest hâlde sklerot olarak bulunan toprak kaynaklı bir fungustur. Çevresel koşullara kolay adapte olabildiği için geniş bir yayılım göstermektedir ve ekonomik olarak ciddi oranda tarımsal kayba yol açmaktadır. Özellikle bitkinin stolon ve gövdesinde çürüklüklere yol açarak, bitkide besin maddelerinin organlara taşınmasını engeller ve gelişme geriliğine bağlı büyük verim kayıplarına yol açar (Aydın ve Turhan, 2013). Hastalık etmeni bir yıldan diğer yıla tohum üzerinde de taşınabilmektedir.

R. solani önemli polifag bir kök hastalığıdır. Bu türler çok sayıda bitki türünün kök, kök boğazı, gövde veya yapraklarında enfeksiyon oluşturarak bitkilerde kök ve kök boğazı kanserine, kök çürüklüğüne ve çökertene sebep olurlar (Döken vd., 2011). Fidelerde görülen çökerten hastalığı; genç bitkilerin kök boğazında nekrozlara sebep olmaktadır. Enfeksiyon sonucunda bitkiler aniden solar ve kök boğazından kıvrılarak toprağa düşerler. Bu düşüşler topluca olur ve özellikle fideliklerde yer yer boşluklar meydana gelir. Hasta bitkilerin fizikî muayenesinde iletim demetlerinde de nekrozlara rastlanır. En yaygın görülen çökerten etmenlerinden birisi de *R. solani*'dir. Özellikle sebze fide firmalarında yetiştirilen fidelerde sıklıkla ortaya çıkan hastalık, koşulların uygun olması durumunda önemli ekonomik kayıplara sebep olabilmektedir (Dolar vd., 2011).

2.5. *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. Ascomycota şubesi, Sordariomycetes sınıfı, Hypocreales takımı ve Hypocreaceae familyasında yer almaktadırlar (Aydın, 2015).

Bu takıma ait fungusların bazıları stroma yapısına sahiptir, bazılarında ise bu yapı yoktur. Stroma mumsu ve yumuşak kıvamda, parlak renktedir. Bu funguslar başka funguslarda veya böceklerde parazittir (Sümer, 2006). Kolonileri 5 gün gibi kısa bir sürede gelişir ve olgunlaşır. Başlangıçta saydam-beyaz, sonradan dağınık sarı-yeşil, sarı, kehribar, mavi-yeşil veya yeşil renkleriyle karakterizedirler. Yayılım sırasında bazen eş merkezli halkalar görülebilir (Şekil 2.5).



Şekil 2. 5. Çalışma kapsamında PDA besiyerinde tek koloni olarak yetiştirilmiş 5 günlük (a), 6 günlük (b), 7 günlük (c) ve 10 günlük (d) *T. virens* örneklerindeki belirgin halkasal yayılım

Trichoderma türleri dünyanın her tarafında geniş bir yayılım gösterir. Çeşitli bitkilerin kök yüzeylerinde, çürüyen kabukta, sklerotlarda veya fungusların diğer üreme organlarının üzerinde bulunabilmektedirler (Papavizas, 1985). Bu fungus kültür ortamında hızlı bir gelişim gösterir ve bol miktarda spor verebilir.

Trichoderma spp. topraktaki bitki kalıntılarının ayrışmasına katkı sağlayarak ekolojik bir rol de üstlenmektedir. Bazı *Trichoderma* türlerinin selüloz üretme konusundaki yetenekleri, onları biyoteknoloji endüstrisinde önemli bir konuma getirmiştir (Réczey vd., 1996). Ayrıca *Trichoderma* türlerinin *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium* ve *Sclerotinia* türleri gibi bitki patojenlerinin paraziti olması biyolojik açıdan önemlerini artırmıştır. Bu antagonistik etkiyi patojenik fungusu karşı antifungal metabolitler üretmek, onlarla besin ve yer için yarışmak ve mikoparazitik etki göstermek yoluyla oluştururlar (Kredics vd., 2003).

Literatürde *Trichoderma* türleri tarafından sentezlenen litik enzimler hakkında pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar çoğunlukla; *Trichoderma* türlerinin patojenik fungusların hücre duvarı yapısını bozarak bu fungusları baskılamaları, aynı fungusların sebep olduğu hastalıkları engellemeleri ve dolayısıyla biyolojik kontrolde güvenle kullanılmaları ile ilgilidir. Ayrıca sentezlenen litik enzimlerin fitopatojene etki mekanizmaları ve biyokontrolde en etkili olan türün bulunması da çalışmalarda en çok ele alınan konulardandır.

Mandels vd. (1971) mutant *T. viride* tarafından yüksek selüloz üretimi üzerine yaptıkları çalışmada; selülozun glukoza basit, etkili ve ekonomik bir şekilde, enzimatik

hidroliz yoluyla çevrilmesinin, kirlilik sorunlarını ve yeni besin kaynaklarının geliştirilmesi konusundaki problemleri azaltacağına değinmişlerdir. Böylece üretilen glukozun maya veya başka bir mikrobiyal proteine çevrilebileceği belirtilmiştir. Pek çok fungusun selülozun yapısını parçalayabildiği, ancak yalnızca birkaçının selüloolitik enzimleri yüksek güç ve etkiyle üretebildiği vurgulanmıştır. Bunlardan biri olan *T. viride*'nin, doğal çözünmez selülozun glukozla çevrilmesinde rol oynadığı bulunmuştur. Çalışmada kullanılan *T. viride* QM9123 mutantının geliştirilmesiyle, selülazın atık ve çöpleri ortadan kaldırması gibi uygulamaların artırılacağı belirtilmiştir.

Shoemaker ve Brown (1978), *T. viride*'den saflaştırılmış endo- β -1,4-glukanaz enziminin karakterizasyonu üzerine bir çalışma yapmışlardır. Saflaştırılan enzimler endoglukan I, II, III ve IV izozimleri olarak adlandırılmışlardır. Endoglukanaz II, III ve IV'ün mannoz, galaktoz, glukoz ve glukozamine içerdiği belirlenmiştir. Mannozun her bir enzim için esas nötral şeker olduğu belirtilmiştir.

Harman vd. (1980) tarafından yayınlanan çalışma, *T. hamatum*'un *Pythium* türleri veya *R. solani* tarafından turp ve bezelyede meydana çıkan tohum ve tohumluk hastalıklarına etkisini konu almıştır. Tohumlara *T. hamatum* ile muamele etmenin, diğer pek çok biyokontrol girişimine göre daha etkili olduğu görülmüştür. Çalışma sonuçları *T. hamatum* ile tohum iyileştirmenin, neredeyse kimyasal yöntemler kadar etkili olduğunu göstermiştir.

Elad vd. (1980)'nin çalışması, *T. harzianum*'un *S. rolfsii* ve *R. solani*'ye karşı biyokontrol ajanı olarak kullanılabilirliğini konu almaktadır. Çalışma sonucu olarak *T. harzianum*'un hem sera hem de tarla koşullarında, *S. rolfsii* ve *R. solani*'nin bitkide yol açtığı zararlara karşı etkili bir biyolojik kontrol unsuru olduğu bildirilmiştir.

Chet vd. (1981), *T. hamatum*'un *R. solani* ve *Pythium* suşları ile olan hif etkileşimlerini incelemiştir. *T. hamatum*, konak hifler boyunca paralel bir gelişme göstermiş ve konağın etrafında sarmallar oluşturarak onu çevrelemiştir. Sonuç olarak *T. hamatum*'un diğer funguslara karşı parazitik etki gösterdiği ve bu tür toprak kaynaklı patojenlerin biyolojik kontrolünde işlev görebileceği ortaya konulmuştur.

Elad vd. (1982), *Trichoderma* türlerinin *R. solani* ve *S. rolfii* üzerinde parazitik etkisini ele alan bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada *T. harzianum* ve *T. hamatum* suşları kullanılmış, bu suşların gösterdiği parazitik etki ve saldırılar sırasında, tek başına yetiştirmelerine göre daha yüksek β -1,3-glukanaz ve kitinaz aktiviteleri saptanmıştır.

Sandhu ve Kalra (1982), *Trichoderma longibrachiatum*'un farklı substratlarda selüloz, ksilanaz ve pektinaz üretme yeteneğini konu alan bir çalışma yapmışlardır. Ksilanaz ve pektinazın tüm karbon kaynaklarında üretildiği; ancak en düşük sonucu glukozda verdiği, selülazın (C_1 , C_X ve β -glukozidaz) ise glukoz dışında tüm karbon kaynaklarında üretildiği gözlenmiştir. C_1 ve β -glukozidaz üretimi pektinde en yüksek sonucu vermiş, bu sonucu ksilan izlemiştir. C_X üretiminin en yüksek sonucu CMC ile verdiği görülmüştür. Üretimin gecikmesine rağmen CMC'nin oldukça iyi bir ortam olduğu belirtilmiştir. Glukoz varlığında ise daha az enzimin üretildiği tespit edilmiştir.

Elad vd. (1983) özellikle *R. solani* ve *S. rolfii* gibi toprak kökenli bitki patojeni funguslar tarafından üretilen lektinlerin, *Trichoderma* ve patojenik funguslar arasındaki tanıma mekanizmasında rol oynadığını belirtmiştir. Çalışmaya göre lektinler, *Trichoderma*'yı uyarmakta ve parazitik etkiyi algılamasına yardımcı olmaktadır.

Chahal (1984), katı hâl fermentasyonunda *T. reesei* ile selüloz üretimi üzerine bir çalışma yapmıştır. Çalışma materyali olarak kullanılan *T. reesei* QM9414, petri kaplarında agar ortamı üzerinde yetiştirilmiştir. Kolonilerden birinde yüksek hidrolitik aktivite gözlenmiştir.

Ridout vd. (1986) *Trichoderma* türlerinde, *R. solani*'nin hücre duvarı tarafından uyarılan enzim aktivitesi hakkında bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada glukoz veya *R. solani* hücre duvarı karbon kaynağı olarak kullanıldığında, *T. harzianum*'daki β -1,3-D-glukanaz ve kitinaz aktivitelerinin arttığı belirtilmiştir. Sonuçlar; kitinaz, β -1,3-D-glukanaz ve başka pek çok sayıdaki ekstraselüler proteinin, *R. solani* hücre duvarının parçalanmasında rol oynuyor olabileceğini göstermiştir.

Ridout vd (1987), *T. harzianum*'un mikoparazitik bir suşundan ekstraselüler enzimlerin saflaştırılması ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada β -1,3-D-glukanaz ve

kitinaz gibi bazı ekstraselüler enzimlerin mikoparazitik aktivitede rol oynadığı ve uygun bir konakçı hücre duvarına rastlandığında tetiklendiğinin düşünüldüğü belirtilmiştir. Bu deneyler *R. solani* hücre duvarı ile uyarılan *T. harzianum* suşu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Söz konusu enzimlerin çoğunu üretebilen *Trichoderma* suşlarının, çeşitli bitki patojenlerinin kontrolünde etkili olabileceği konusu vurgulanmıştır.

Sivan ve Chet (1989) fungal hücre duvarlarının, *T. harzianum*'un salgıladığı litik enzimler tarafından yıkımını konu alan bir araştırma yapmışlardır. Çalışmada iki farklı *T. harzianum* suşu ile *in vitro* testler yapılmıştır. Kültür ortamına karbon kaynağı olarak fungal hücre duvarı, kitin veya laminarin eklendiğinde, *T. harzianum* suşlarının her ikisinin de ortama β -1,3-glukanaz ile kitinaz salgıladıkları belirlenmiştir. Söz konusu suşların *R. solani* ve *Pythium aphanidermatum* üzerinde güçlü bir mikoparazitik etki oluşturdukları gözlenmiştir.

Farid ve El-Shahed (1993), yüksek düzeyde selüloz ve mısır maserasyon sıvısında selülaz üretimini araştırmışlardır. Bu çalışma için birkaç *T. reesei* mutanlığı kullanılmış, substrat olarak ise mısır maserasyon sıvısı ile mikrokristalin selüloz ilave edilmiştir. Optimum fermentasyon koşulları sağlandığında *T. reesei* Rut C 30 tarafından yüksek miktarda selülaz enzimi üretildiği belirlenmiştir.

Haran vd. (1996) tarafından yapılan bir başka çalışma, *T. harzianum*'un biyokontrol aktivitesinde rol oynayan litik enzimler ve bu enzimlerin moleküler mekanizmalarını konu almıştır. Söz konusu enzimler olarak kitinazlar, glukanazlar ve selülazlar incelenmiştir. Konakçı ile temas kurduğunda *T. harzianum* misellerinin, konakçının hücre etrafına sarıldığı ve konakçının hücre duvarına müdahale ettiği belirtilmiştir. *Trichoderma*'nın çoklu enzim sisteminin, parazitik etkileşimlerde rol oynadığı, *T. harzianum*'dan saflaştırılan enzimlerin *in vitro* çalışmalarda doğrudan antifungal etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca bu etkinin, çeşitli enzimler bir arada kullanıldığında arttığı rapor edilmiştir.

Witkowska ve Maj (2002), *Trichoderma* türleri tarafından üretilen litik enzimleri ve bu enzimlerin, fitopatojenik fungusların gelişimi üzerine etkilerini inceleyen bir çalışma yapmışlardır. Enzim sentezinin, fitopatojenik fungusun (*B. cinerea*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*) hücre duvarı tarafından teşvik edildiği belirtilmiştir. Çalışma sonucunda en

yüksek β -1,3-glukanaz aktivitesi gösterenin *T. hamatum*; enzim sentezinin indüklenmesinde en etkili olan fitopatojenin ise *F. oxysporum* olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca söz konusu fitopatojenler üstünde yapılan biyotik testler, fitopatojenik fungusların büyümesini inhibe etmede litik enzimlerin önemli bir rolü olduğunu göstermiştir.

Markovich ve Kononova (2002) tarafından yapılan derleme, *Trichoderma*'nın litik enzimleri ve bu enzimlerin fungal hastalıklara karşı bitki savunmasındaki rolü ele alınmıştır. Derlemede kitinaz, β -1,3-glukanaz ve proteaz üretiminin regülasyonu ile bu enzimlerin çeşitli fitopatojenik fungusların hücre duvarı yapısını bozma kabiliyetleri konu edilmiştir.

Viterbo vd. (2002) *Trichoderma* türlerinden elde edilen litik enzimlerin, bitki fungal patojenlerinin biyokontrolündeki önemi üzerine yayınladıkları derlemede kitinaz, glukanaz ve proteazlar üzerinde durmuşlardır. Özellikle *T. reesei*'nin, bilinen en iyi selüloz üreten suşlardan biri olduğu vurgulanmıştır. Aynı şekilde *T. harzianum* izolatu'nun da *P. ultimum* patojenine karşı oldukça etkili olduğu belirtilmiştir. Daha önce yapılmış çalışmalara göre; bu izolatu'nun yetiştirme ortamında selüloz bulunuyorsa, aktivite jelinde pek çok selülozun varlığı tespit edilmiştir.

Küçük ve Kıvanç (2004) tarafından yapılan çalışmada, *T. harzianum* suşlarının *in vitro* antifungal aktivitesi ele alınmıştır. Çalışmada PDA besiyerinde, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fusarium culmorum* ve *Fusarium moniliforme* toprak kökenli bitki patojenleri ve *T. harzianum* suşları arasındaki interaksiyon araştırılmıştır. Teste tabi tutulan tüm *T. harzianum* suşlarının, patojen fungusların gelişimini inhibe eden bazı metabolitler ürettikleri belirlenmiştir. Ayrıca karbon kaynağı olarak fungal hücre duvarı, kitin veya laminarin kullanıldığında β -1,3-glukanaz ve kitinaz enzimlerinin üretimi de gözlenmiştir.

Brewer ve Larkin (2005) yapmış oldukları çalışmada, bazı potansiyel biyokontrol organizmalarının etkinliğini patatesteki *R. solani*'ye karşı test etmişlerdir. Çalışma kapsamında *Trichoderma* sp. de dahil olmak üzere toplam 28 potansiyel biyokontrol organizması teste tabi tutulmuştur. Çalışma sonucunda *T. virens* ve *B. subtilis* ikilisinden oluşan biyolojik kontrol kombinasyonunun, kök kanserini diğer tüm organizmalardan daha iyi kontrol edebildikleri görülmüştür.

Monteiro ve Ulhoa (2006) tarafından yapılan bir başka çalışma, *T. koningii* tarafından üretilen ve *R. solani* hücre duvarı ile indüklenmiş β -1,3-glukanaz enziminin biyokimyasal karakterizasyonunu konu almaktadır. Çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda *T. koningii*'nin, *R. solani*'den izole edilen hücre duvarı ile uyarıldığında β -1,3-glukanaz aktivitesine sahip sadece bir protein ürettiği belirlenmiştir.

Shalini ve Kotasthane (2007) tarafından yapılan çalışmada; *R. solani*'nin *Trichoderma* suşları tarafından parazitlenmesi konusu üzerinde durulmuştur. Çalışmada *R. solani*'ye karşı 17 *Trichoderma* suşu, *in vitro* koşullar altında kullanılmıştır. İkili kültür denemelerindeki gözlemler tüm *Trichoderma* izolatları hiflerinin, *R. solani* hiflerine paralel olarak geliştiğini ortaya koymuştur.

Almeida vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada, *T. harzianum* suşlarının *R. solani*'ye karşı gösterdiği parazitik etki ve hidrolitik enzim üretimi üzerinde durulmuştur. İkili kültür testlerindeki fungal büyüme gözlenmiş; test edilen tüm *T. harzianum* izolatlarının, *R. solani* hiflerinin etrafını sarmalamak yoluyla antagonizm gösterdiği görülmüştür.

Shakeri ve Foster (2007), *T. harzianum*'un böceklere karşı gösterdiği proteolitik aktiviteyi ve antibiyotik üretimini araştırmışlardır. Çalışmada test edilen iki *T. harzianum* suşunun da, ortamdaki böcek varlığında proteaz, kitinaz ve antibiyotik aktivitelerinde artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar *Trichoderma* türlerinin, böcek türleri üzerinde biyokontrol ajanı olarak kullanılabilirliğini kanıtlamaktadır.

Rini ve Sulochana (2007); *Trichoderma* ve *Pseudomonas*'ın *R. solani*'ye ve *F. oxysporum* tarafından enfekte edilmiş domateslere karşı kullanılabilirliğini gösteren bir çalışma ortaya koymuşlardır. Çalışmada, Kerala'dan elde edilen 26 yerel *Trichoderma* izolatı ile 56 *Pseudomonas* izolatı kullanılmış, *in vitro* koşullar altında *R. solani* ve *F. oxysporum*'a karşı gösterdikleri antagonistik etkiler incelenmiştir. Sonuçlar doğrultusunda farklı izolatların, farklı derecelerde antagonizm gösterdiği belirlenmiştir. *R. solani*'ye karşı en antagonist izolatların *T. pseudokoningii* ve *T. harzianum* olduğu belirtilmiştir.

Verma vd. (2007), *Trichoderma*'nın antagonistik bir fungus olarak biyolojik kontrolde kullanılabilirliğini inceleyen bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada *Trichoderma* türlerinin, *R. solani* de dahil pek çok çeşitli patojene karşı antagonizm gösterdiğine dikkat çekilmiştir. Özellikle *T. virens*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. viride* ve *T. koningii* suşlarının; β -1,3-glukanaz, endoglukanaz, selülaz, kitinaz ve proteaz gibi enzimlerin sentezinden sorumlu olarak *R. solani*'ye karşı etki gösterdiği vurgulanmıştır.

Sahebani ve Hadavi (2008), bir kök ur nematodu olan *Meloidogyne javanica*'ya yönelik biyolojik kontrol için *T. harzianum*'u kullanmıştır. Çalışmalar, farklı *T. harzianum* konsantrasyonlarının nematod yumurtalarına etki ettiğini ve nematod yumurta kuluçka seviyesini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Ayrıca POX, PPO ve PAL gibi dirençle ilgili enzimlerin, *T. harzianum* aşılanan bitkilerde arttığı görülmüştür. Bu verilere dayanılarak, *T. harzianum*'un kök ur nematodlarına karşı etkili bir biyolojik ajan olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Vinale vd. (2008) yayınladıkları derlemede, *Trichoderma*-bitki-patojen arasındaki etkileşimleri incelemişlerdir. Derlemede *Trichoderma*'nın özellikle *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Ustilago* gibi bitki patojenlerine karşı mikoparazitik etkisi ve litik enzimlerinin bu noktada oynadıkları rol vurgulanmıştır. Bu süreç sırasında *Trichoderma*'nın, konakçı fungusun hücre duvarını hidrolize eden selülaz, kitinaz, glukanaz gibi birtakım enzimler salgıladığı belirtilmiştir. Ayrıca *Trichoderma*'nın bu enzim üretimi haricinde pek çok sekonder metabolit üreterek ve patojenlerle rekabete girerek de patojenlere karşı baskı uyguladığı üstünde durulmuştur.

Ahmed vd. (2009), selüloz parçalayıcı enzimlerin *T. harzianum* tarafından üretilmesi ve saflaştırılmasını konu alan bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada karbon kaynağı olarak glukoz, CMC, mısır koçanı, buğday kepeği gibi farklı substratlar kullanılmış ve *T. harzianum*'un sıvı hâl fermentasyonundaki enzim üretimi araştırılmıştır. CMC'nin, glukoz tarafından bastırılan selülaz aktivitesini indüklediği gözlenmiştir. Sonuç olarak selülaz genlerinin klonlanması ve mutajenez gibi farklı yaklaşımların, selülaz verimini artırabileceği düşünülmüştür.

Sharma vd. (2009)'nin *T. harzianum* ile yaptıkları çalışmada, *T. harzianum* izolatlarının biyokontrol ajanı olarak etkinlikleri ve morfolojik, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonları incelenmiştir. Çalışmada kullanılan 8 farklı *T. harzianum* izolatının, ikili kültür testlerinde *S. rolfii*'ye karşı gösterdikleri antagonizm üzerinde durulmuştur. İzolatların *S. rolfii*'ye karşı yüksek antagonistik aktivite gösterdiği gözlenmiştir; bu sonuç ise kitinaz, glukanaaz ve proteaz gibi fungal hücre duvarının yapısını bozan enzimlerin ve antibiyotiklerin üretimi açısından umut verici bulunmuştur. Ayrıca izolatlar kitinaz ve β -1,3-glukanaaz aktivitesi bakımından da teste tabi tutulmuşlardır. Ekstraselüler glukanaaz ve kitinaz üretiminin, *T. harzianum* izolatları sıvı kültür ortamında 5 ila 7 gün inkübe edildiğinde maksimum olduğu görülmüştür.

Radjacommare vd. (2010), *Pseudomonas fluorescens* ve *Trichoderma* türlerinin litik etkisiyle, vanilyada görülen fitopatojenik fungusların biyolojik kontrolü üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada 21 farklı *Trichoderma* izolatı kullanılmıştır. Çalışma sonucuna göre *Trichoderma* tarafından üretilen hidrolitik enzimlerin, konakçı fungusun öldürülmesinde anahtar rol oynadığı vurgulanmıştır. β -1,3-glukanaazlar, kitinazlar ve proteazlar gibi litik enzimlerin, hücre duvarı bileşenlerini sindirme yoluyla *R. solani*'yi lizis ettikleri belirtilmiştir.

Schuster ve Schmoll (2010)'un *Trichoderma*'nın biyolojisi ve biyoteknolojisini konu aldıkları çalışmalarında, özellikle *T. reesei* tarafından üretilen selülozların, selülozik atıklardan ikinci nesil biyoyakıt üretimi açısından önemi vurgulanmıştır. Artan enerji maliyetleri ve iklim değişikliği ile birlikte biyoyakıt üretimine verilen önem de artmış; çalışmada bu noktanın altı çizilmiştir. Güçlü bir selüloz üreticisi olan *T. reesei*'nin, günümüzde selülozik atık maddelerden biyoetanol üretiminin genel maliyetini azaltmak için kullanıldığı aktarılmıştır.

Anees vd. (2010), *R. solani*'ye karşı antagonistik etki gösteren *Trichoderma* izolatlarının karakterizasyonu üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada, *R. solani*'nin kök çürüklüğü hastalığına sebep olduğu bir şeker pancarı tarlasından 16 *Trichoderma* izolatı elde edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışma sonucunda antagonistik *Trichoderma* suşlarının *R. solani*'nin varlığı ile uyarıldığı ve tarladaki hastalık artışıyla birlikte

Trichoderma suşlarının da arttığı gözlenmiştir. En fazla antagonistik etki gösteren suşun ise *T. gamsii* olduğu belirlenmiştir.

Montealegre vd. (2010), domateslerdeki *R. solani*'nin biyolojik kontrolü için *T. harzianum* mutantları kullanmıştır. Denemeler sera ve tarla koşullarında yapılmıştır. Sonuç olarak *T. harzianum* mutantları ile muamele edilen domates bitkilerinin mortalitelerinin azaldığı; gelişim, yaş ve kuru ağırlık gibi bitki parametrelerinin ise arttığı görülmüştür.

Amin vd. (2010) *Trichoderma* türlerindeki uçucu metabolitlerin, 7 farklı fungal bitki patojenine karşı etkisini ortaya koymuştur. Çalışma doğrultusunda 6 *Trichoderma* izolatı; *R. solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum capsici*, *Helminthosporium oryzae* ve *Alternaria brassicicola*'dan oluşan fungal bitki patojeni grubuna karşı test edilmiştir. Gözlemlenen verilere göre maksimum verim, *T. viride*'nin *R. solani* üzerine etkisinde alınmış; *T. viride*'nin *R. solani* misellerinin gelişimini en aza indirdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak farklı *Trichoderma* izolatları tarafından üretilen uçucu bileşiklerin, patojenlere ait misel gelişmesini ve dolayısıyla hastalıkların yayılmasını kontrol ederek, bunları büyük ölçüde azalttıkları tespit edilmiştir.

Dubey vd. (2011), *Trichoderma* türleri tarafından üretilen enzimlerin ve sekonder metabolitlerin karakterizasyonunu konu alan çalışmalarında, bu enzim ve metabolitlerin bitki patojeni funguslara karşı etkinliğini de araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan *T. viride*, *T. virens* ve *T. harzianum* izolatları, nohutta kök çürüklüğüne sebep olan *Rhizoctonia bataticola* ve nohutta solgunluğa yol açan *Fusarium oxysporum*'a karşı test edilmiştir. Uygulanan tüm konsantrasyonların bu bitki patojenlerine karşı yok edici etkisi olduğu gözlenmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan tüm *Trichoderma* türlerinin kitinaz ve β -1,3-glukanaz gibi direnci destekleyen enzimler salgıladığı bildirilmiştir. En yüksek kitinaz aktivitesinin *T. virens*'te, en yüksek β -1,3-glukanaz aktivitesinin ise *T. viride*'de tespit edildiği bildirilmiştir.

Gveroska ve Ziberoski (2011) yaptıkları çalışmada *T. harzianum*'un, tütün fidelerinde *R. solani*'nin sebep olduğu kök çürüklüğünü azaltma üzerine etkisi incelenmiştir. Hastalıklı fidelere uygulanan *T. harzianum*'un tek başına, ilaç uygulamasından daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. Çalışma, *R. solani*'nin tütün fidelerinde neden olduğu

hastalığın *T. harzianum* tarafından azaltıldığını ortaya koymuş ve söz konusu patojenin biyolojik kontrolünde kullanılabilirliğini ispatlamıştır.

Hermosa vd. (2012) tarafından yayınlanan kısa derlemede, *Trichoderma*'nın bitkiye yararlı etkileri ve bu etkileri meydana getiren yollar belirtilmiştir. Derlemede *Trichoderma* türlerinin, bitkinin savunma mekanizmasını güçlendirdiği ve yaprak fotosentez oranının artırılmasını desteklediği, ayrıca bitki büyümesini teşvik ettiği ve bitkinin abiyotik strese karşı toleransını artırdığı vurgulanmıştır.

Saba vd. (2012)'nin yapmış oldukları çalışmada *Trichoderma*, umut verici bir bitki büyüme destekleyicisi ve bir biyokontrol ajanı olarak ele alınmaktadır. Patojenlere karşı hücre duvarı yapısını bozan enzimler salgılaması, patojenlerin ölümüne yol açabilen antibiyotikler üretmesi, bitki gelişimini desteklemesi ve bitki savunma mekanizmasını güçlendirmesi gibi sebeplerle, *Trichoderma*'nın biyokontrol ajanı olarak kullanılabilirliği vurgulanmıştır. Ayrıca *Trichoderma*'nın antifungal aktivitesini gösterdiği başlıca patojenler *R. solani*, *Botrytis cinerea*, *S. rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium spp.* ve *Fusarium spp.* olarak belirtilmiştir. Bitki kökünde ve rizosferinde kolonize olması, parazitizm ve antibiyotik üretimi gibi çeşitli mekanizmalarla bitki patojenlerinde kontrol sağlaması, bitki büyümesini teşvik ederek bitki sağlığını geliştirmesi ve bitki kökünü uyarması; *Trichoderma*'nın tarımda kullanılmasının avantajları olarak sıralanmıştır. Bu etkileri de göz önünde tutularak *Trichoderma*'nın biyopestisit, biyogübre ve toprak yapısını iyileştirici madde olarak ticaretinin yapılmakta olduğu ifade edilmiştir.

Ali ve Nadarajah (2013) yaptıkları çalışmada, *Trichoderma* izolatlarını ve *Bacillus subtilis*'i *R. solani*'ye karşı bir biyolojik kontrol ajanı olarak değerlendirmişlerdir. Çalışmada *Trichoderma* izolatları ile *B. subtilis*'in, *R. solani*'ye karşı etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmış ve ikili kültür testleri oluşturulmuştur. Testler sonucunda *Trichoderma* izolatları ile *B. subtilis*'in birlikte hareket ettiklerinde *R. solani*'yi daha etkili şekilde baskıladıkları ortaya konmuştur.

Kubicek (2013), *T. reesei*'nin selüloz üretimini anlamaya yönelik biyolojik yaklaşımları konu edinmiştir. Biyoyakıt ve biyorafineri üretimine karşı yenilenebilir lignoselülozik materyal kullanımı için biyokütleyi degrade edici enzimler üreten *T. reesei*

genomunun sekanslanması, bu organizma ve ürettiği enzimler hakkında çalışmaya imkân sağlamaktadır. Söz konusu çalışmada da biyokimyasal süreçlere getirilmiş olan özgün ve geliştirilmiş anlayışlar doğrultusunda genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomiğin kullanımı vurgulanmıştır.

Şahin vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada yerel *T. ouoviride* izolatından endo- β -1,3-glukanaz saflaştırılması ve karakterizasyonu konu edilmiştir. Aydın ilindeki bir sıcak su kaynağından izole edilen *T. ouoviride*'nin yüksek oranda endoglukanaz aktivitesi gösterdiği ispatlanmış ve bu suşun ticari selüloz üretiminde kullanılabilirliği vurgulanmıştır.

Şahin tarafından 2013'te tamamlanan tez çalışması ise *T. ouoviride*'den selüloz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu hakkındadır. Çalışmada ayrıca enzim aktivitesine etki eden pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu, inkübasyon süresi gibi bazı parametreler de incelenmiştir. Çalışma sonucunda enzimin en yüksek yanıt verdiği substrat CMC, optimum pH 5,0 ve optimum sıcaklık 50°C olarak belirtilmiştir.

Asad vd. (2014), *Trichoderma*'nın farklı izolatlarının toprak kaynaklı *R. solani* patojenine karşı biyokontrol etkinliğini test eden bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada *T. asperellum*, *T. harzianum* ve *T. viride* olmak üzere 3 farklı *Trichoderma* izolatı kullanılmıştır. Sonuçlar; söz konusu *Trichoderma* izolatlarının hepsinin *R. solani*'ye karşı etkili bir biyokontrol ajanı olarak kullanılabileceğini, fakat *T. asperellum*'un *R. solani*'ye karşı daha etkili ve istikrarlı olduğunu göstermiştir.

Parmar vd. (2015) tarafından yapılan çalışma, *Sclerotium rolfsii* ile in vitro antagonizm içerisindeki *Trichoderma* suşlarının litik enzim üretimini konu almaktadır. Çalışmada 6 farklı *Trichoderma* suşu, *S. rolfsii* gibi toprak kaynaklı patojenleri inhibe etme yetenekleri bakımından test edilmiştir. Hücre duvarını parçalayıcı enzimlerden kitinaz, β -1,3-glukanaz, proteaz ve selülazın spesifik aktiviteleri, patojene ait hücre duvarının varlığında araştırılmıştır. *T. viride*'nin kitinaz ve proteaz aktivitesini teşvik ettiği; fungus ve litik enzimler (kitinaz, β -1,3-glukanaz ve proteaz) arasında belirgin bir pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır. Test edilen tüm *Trichoderma* suşları arasından *S. rolfsii*'ye karşı biyolojik kontrolde kullanılabilecek en iyi suşun *T. viride* olduğu belirlenmiştir.

Konuyla ilgili bir başka çalışma Kotasthane vd. (2015) tarafından yapılmıştır. *Trichoderma* spp.'nin *Sclerotium rolfsii* ve *R. solani*'ye karşı *in vitro* antagonizminin araştırıldığı çalışmada, farklı coğrafik lokasyonlardan toplanmış 20 *Trichoderma* izolatu kullanılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda *T. viride*'nin T14 suşunun *in vitro* koşullarda hem *R. solani*, hem de *S. rolfsii*'ye karşı antagonistik etki gösterdiği; aynı zamanda denemelerde kullanılan hıyar bitkilerinin gelişimlerini de desteklediği ortaya konmuştur.

Polanco vd. (2015) tarafından yayınlanmış çalışmada, *T. harzianum*'un mutant suşları tarafından salgılanan biyokontrol enzimlerinin, *R. solani* hücre duvarı varlığındaki artışı incelenmiştir. Çalışmada *T. harzianum*'a ait hem yabani, hem de mutant suşlar kullanılmıştır. Suşların yetiştirildiği kültür ortamına, karbon kaynağı olarak *R. solani* hücre duvarları ilave edilmiştir. Çalışma sonucunda *R. solani* hücre duvarlarının varlığının, proteolitik aktivitenin etkisini desteklediği gözlenmiştir. Bu gözlemler doğrultusunda ise patojenlerin hastalıklara yol açmasını sağlayan mekanizmalarının etkisizleştirilmesinde, enzim sistemlerinin biyolojik kontrol olarak kullanılacakları belirtilmiştir.

Gupta vd. (2016), Jammu topraklarından izole edilen doğal *Trichoderma* izolatlarını, hidrolitik enzim aktiviteleri ve biyokontrol potansiyelleri açısından incelemiştir. Çalışmada 50 doğal *Trichoderma* izolatu kullanılmış ve ikili kültür tekniği ile antifungal aktiviteleri belirlenmiştir. Belirlenen 20 izolat; selülaz, kitinaz ve β -1,3-glukanazlar gibi hücre dışı hidrolitik enzimlerin salgılanmasında umut verici bulunmuştur.

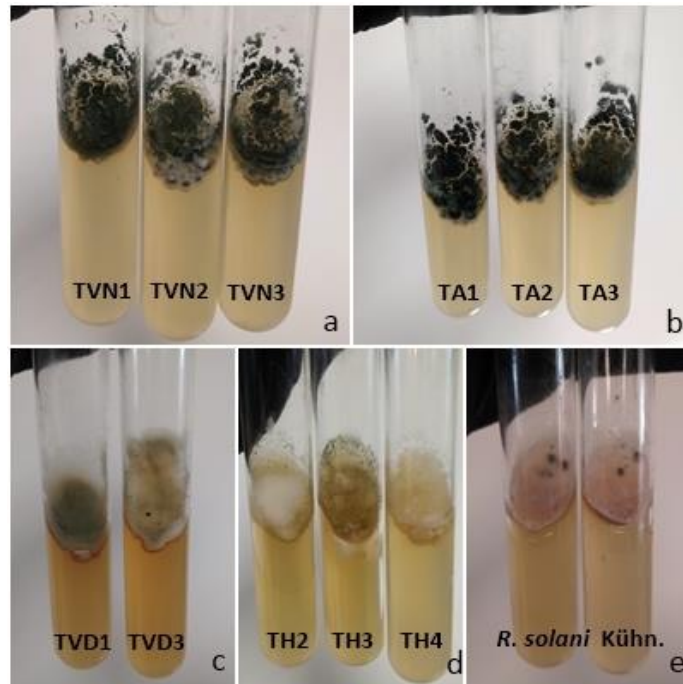
3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü laboratuvarları ile Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya A.B.D. laboratuvarında yürütülmüştür.

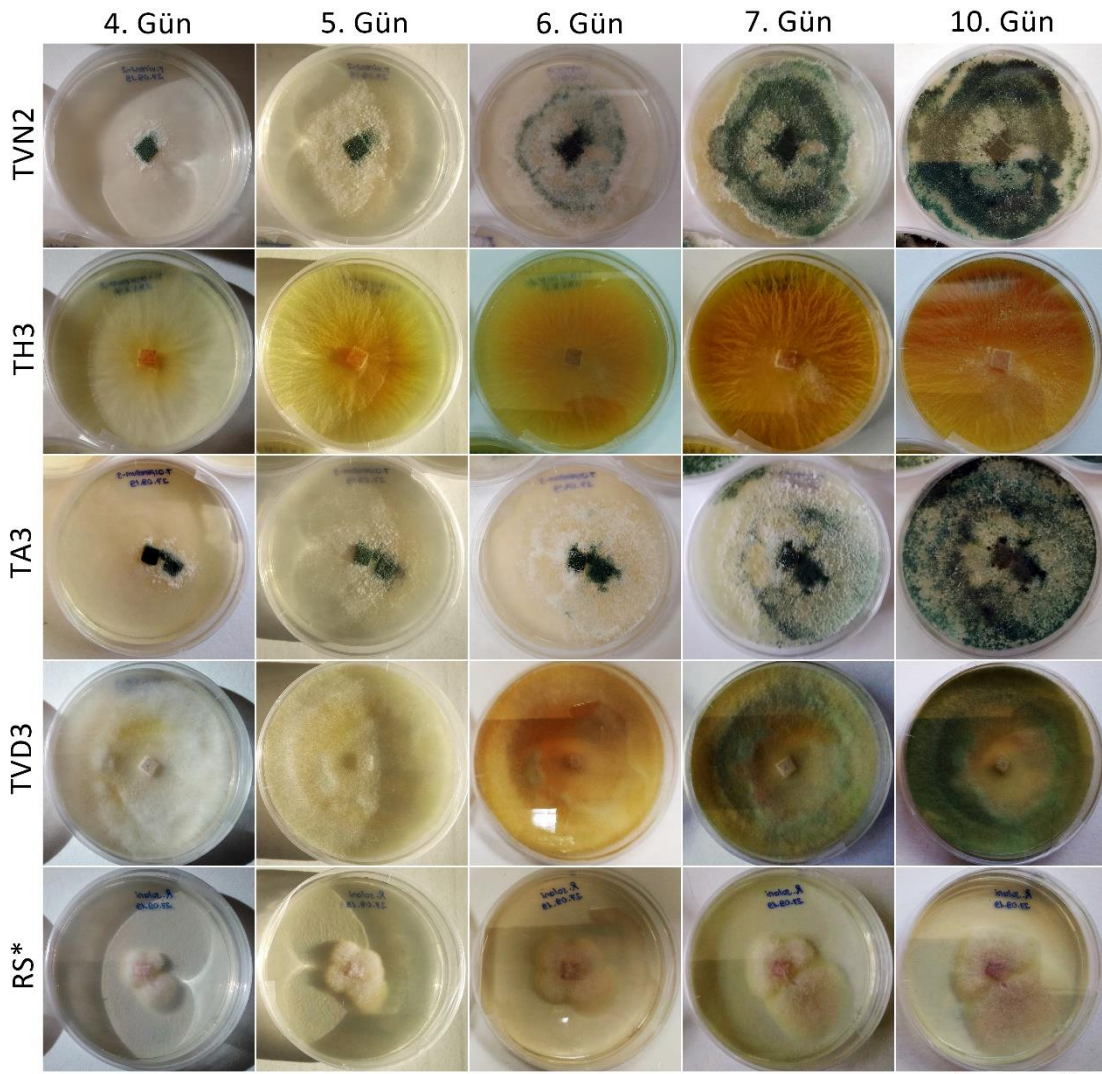
3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizma

Çalışma materyali olarak, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü'nden temin edilen 2 farklı *T. viride* (TVD1 ve TVD3), 3 farklı *T. harzianum* (TH2, TH3 ve TH4), 3 farklı *T. virens* (TVN1, TVN2 ve TVN3), 3 farklı *T. asperellum* (TA1, TA2 ve TA3) izolatı olmak üzere toplam 11 farklı *Trichoderma* izolatı ile *R. solani* Kühn. izolatı kullanılmıştır (Şekil 3.1). Şekil 3.2'de materyal olarak kullanılan mikroorganizmalardan bazılarının 10 günlük morfolojik gelişimleri verilmiştir.



Şekil 3. 1. PDA ile hazırlanmış yatık besiyerine yüzey ekimi yapılarak yetiştirilmiş 10 günlük *T. viride* (a), *T. harzianum* (b), *T. virens* (c), *T. asperellum* (d) ve *R. solani* (e) örnekleri



* *R. solani* Kühn.

Şekil 3. 2. PDA besiyerinde tek koloni olarak yetiştirilmiş 4, 5, 6, 7 ve 10 günlük TVN2, TH3, TA3, TVD3 ve RS örneklerinin morfolojik gelişimleri

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar Ek Açıklama-A'da belirtilmiştir.

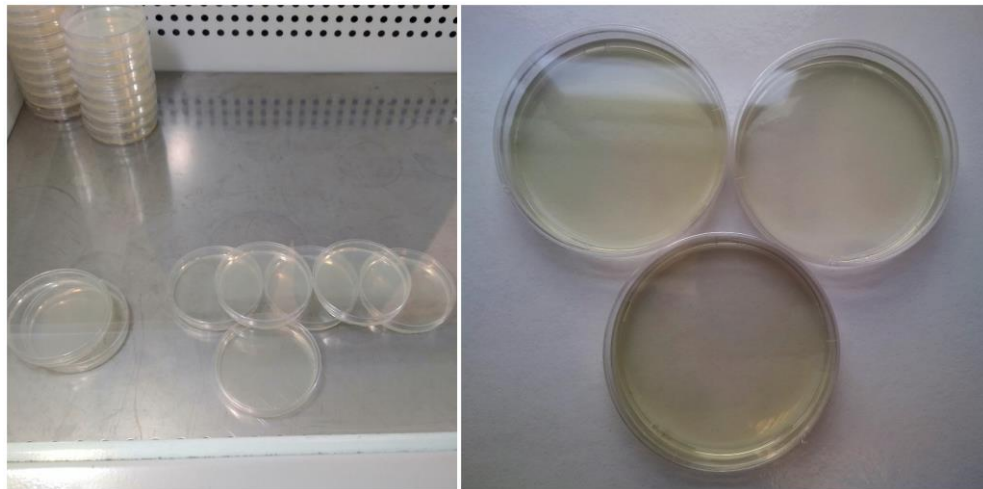
3.1.3. Kullanılan çözeltiler

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve içerikleri Ek Açıklama-B'de belirtilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kültür koşulları ve enzim üretim ortamı

Çalışmada kullanılacak *Trichoderma* izolatları ilk aşamada yatık agardan alınarak PDA besiyeri içeren petri kaplarına (Şekil 3.3) aktarılmış, burada her biri tek koloni olarak 30°C sıcaklıkta yetiştirilmiştir (Durak, 2016).



Şekil 3. 3. Steril kabin içerisinde petri kaplarına döküldükten sonra kontaminasyon gözlenmemiş, ekime hazır PDA besiyerleri

Çizelge 3. 1. Endo-β-1,4-glukanaz üretimi için hazırlanan ortamın bileşenleri

Bileşenler	Konsantrasyon (g/L)
Üre	0,3
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4
KH ₂ PO ₄	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3
CaCl ₂	0,3
İz Element Çözeltisi Bileşenleri	Konsantrasyon (mg/L)
MnSO ₄ .H ₂ O	1,56
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,4
FeSO ₄ .7H ₂ O	5
CoCl ₂	2

Mandel ve Weber (1969)'in belirlediği metoda uygun olarak hazırlanan ve bileşenleri Çizelge 3.1'de verilmiş olan enzim üretim ortamının pH'sı 5,0'e ayarlanmış, daha sonra 121°C'de 15 dk süreyle otoklavlanarak steril hâle getirilmiştir. Ortama karbon kaynağı olarak, önceden hazırlanıp sterilize edilmiş %1 (w/v) oranında CMC ilave edilmiştir. Mikroorganizma içeren PDA besiyerlerinden yaklaşık 1 cm²'lik miselyal diskler kesilmiş, enzim üretim ortamları bu diskler ile inoküle edilmiştir. Ortamlar 30°C sıcaklıkta 5 gün boyunca, 150 rpm hızla çalkalanarak inkübe edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3. 4. Mandel ve Weber ortamında 5 gün inkübasyondan sonra örnekler

3.2.2. İkili karışık kültür deneyleri

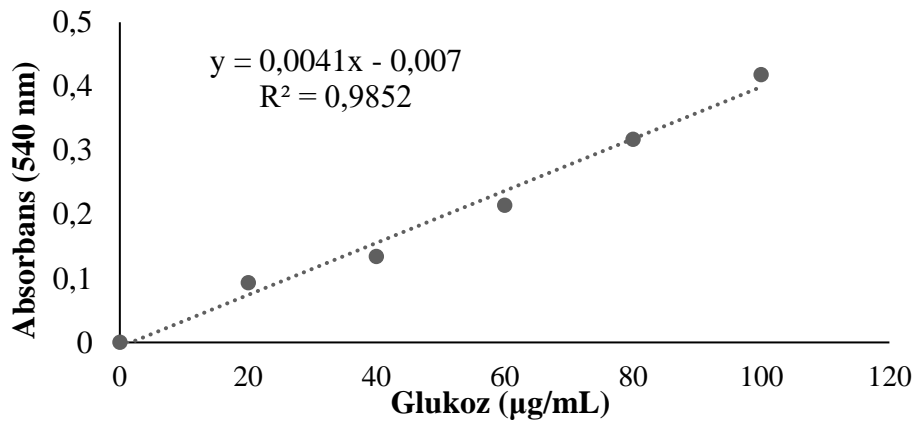
Yatık agarda muhafaza edilmekte olan *Trichoderma* spp. izolatları, ikili karışık kültür deneyleri için PDA besiyeri dökülmüş petri kaplarına, *R. solani* ile karşılıklı olarak inoküle edilmiştir. İnokülasyon işlemi, yaklaşık 1 cm²'lik miselyal diskler kesilerek gerçekleştirilmiştir. 30°C sıcaklıkta 10 gün boyunca inkübe edilen petri kaplarındaki morfolojik gelişim gözlenmiştir.

3.2.3. Selüloz aktivite tayini

Enzim aktiviteleri birim zamanda harcanan substrat veya oluşan ürün miktarı ölçülerek tanımlanır. En sık kullanılan enzim aktivite birimi “ünite (IU)”dir. 1 IU enzim

aktivitesi, optimum koşullar varlığında 1 dakikada 1 μmol substratı ürüne çeviren enzim miktarıdır. IU kadar yaygın kullanılmayan diğer aktivite birimleri ise “katal” ve “spesifik aktivite”dir. Katal, 1 saniyede 1 mol substratı katalizleyen enzim miktarıdır. Spesifik aktivite ise 1 mg enzim başına 1 dakikada oluşan ürün miktarı (μmol) veya harcanan substrat miktarı (μmol)dır (Yıldız, 2007).

Selülaz enzimi, karbon kaynağı olarak kullanılan CMC’u parçalamakta ve glukoz açığa çıkarmaktadır. Bu sebeple 1 IU selülaz aktivitesi, 1 dakikada 1 μmol glukozu açığa çıkaran enzim miktarı olarak ifade edilmektedir. Selülaz enzim aktivitesi, açığa çıkan glukozun belirlenmesi temeline dayandığı için; aktivite hesaplanırken glukozun farklı konsantrasyonları ölçüt alınarak çizilen glukoz standart grafiği kullanılmaktadır. Grafik, glukozun farklı konsantrasyonları ile bu miktarlara karşılık gelen absorbans değerlerinden oluşmaktadır (Şekil 3.5).



Şekil 3. 5. Glukozun farklı konsantrasyonlarıyla hazırlanan standart grafiği

Enzim aktivitesi hesaplanırken aşağıdaki denklem kullanılmıştır (Guruk, 2018).

$$\text{Enzim aktivitesi} = (\text{Absorbans} \times \text{Regresyon denklemini}) / \text{İnkübasyon süresi}$$

Enzim aktivitesi tayini, Ghose (1987) tarafından belirlenen metod izlenerek yapılmıştır. İnkübasyonu tamamlanan örnekler, selülaz aktivite tayini için 8,000 x g’de 4°C sıcaklıkta 15 dk santrifüj edilmiştir. Hazırlanan numune tüplerinin her birine 0,5 ml sitrat tamponu (pH 5,0), 0,5 ml supernatant ve 0,5 ml %1’lik (w/v) CMC eklenmiştir. Kör örnek

için ayrılan tüpe ise yalnızca 0,5 ml sitrat tamponu (pH 5,0) ile 0,5 ml CMC eklenmiştir. Tüpler 50°C sıcaklıktaki su banyosunda 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Shoemaker ve Brown (1978) β -1,4-glukanaz enziminin üretimi için optimum inkübasyon sıcaklığını ve süresini 40°C'de 30 dk olarak; Farid ve El-Shahed (1993) ise optimum inkübasyon sıcaklığını 50°C olarak belirlemiştir. Şahin vd. (2013) optimum inkübasyon koşullarının 50°C'de 30 dk olduğunu belirtmiştir.

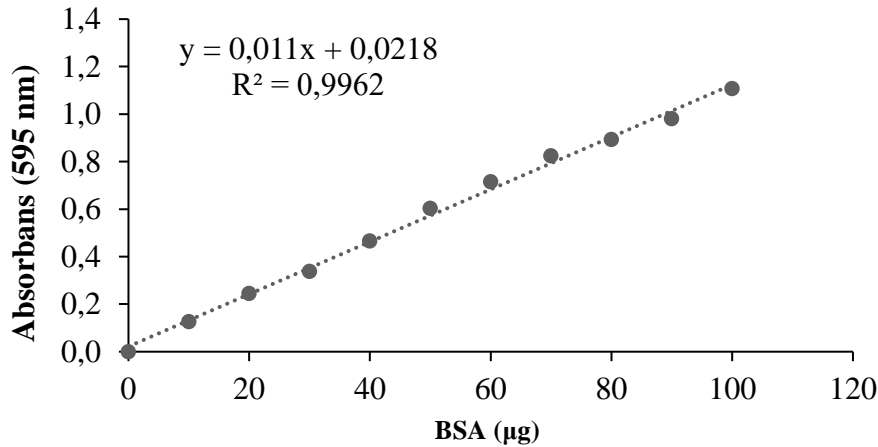
Su banyosundan alınan örneklerin her birine 3 ml DNS renk reaktifi eklenmiş ve bu şekilde 5 dk boyunca kaynatılarak renk oluşumunun tamamlanması sağlanmıştır. Kaynatılan örnekler buz içerisine alınarak soğutulmuş, soğuduktan sonra 540 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen absorbanslardan enzim aktivite değerleri hesaplanmış; *Trichoderma* izolatlarının *R. solani* varlığındaki ve yokluğundaki aktivite değerleri arasındaki fark SPSS 10 istatistik paket programında t testiyle belirlenmiştir.

3.2.4. Kantitatif protein tayini

Kantitatif protein tayini Bradford (1976) tarafından belirlenen metoda göre yapılmıştır. Bu metodda, (-) yüklü olan ve proteinlerdeki (+) yüklü gruplara bağlanan bir boyar madde olan Coomassie Brilliant Blue G-250'nin proteinleri boyama özelliğinden yararlanılmaktadır. Boya proteine bağlandığında, iki dakika içinde mavi renk oluşumu görülür ve bir saat kadar stabil kalır (Robyt ve White, 1987). Bradford metodu oldukça duyarlı, hızlı ve tekrarlanabilir bir metoddur.

Protein miktarlarının belirlenmesi için hazırlanan her bir örnek tüpüne 100 μ l protein örneği ve 5 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi eklenmiştir. Kör tüpüne sadece renk reaktifi konmuştur. Daha sonra örnekler hafifçe karıştırılarak, karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından her bir örneğin 595 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür.

Sığır serum albümininin (BSA) farklı konsantrasyonlarının suda çözünmesi ile BSA standart grafiği (Şekil 3.6) oluşturulmuş ve numunelerdeki protein miktarları bu grafiğe göre belirlenmiştir.



Şekil 3. 6. BSA'nın farklı konsantrasyonlarıyla hazırlanan standart grafiği

Elde edilen absorbans değerlerinin regresyon denkleminde yerine konmasıyla konsantrasyon hesaplanmış ve protein miktarları bulunmuştur.

3.2.5. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez)

Elektrofrez, yüklü moleküllerin elektriksel alandaki hareketlerini ve ayrımlarını inceleyen tekniktir. Moleküllerin hareketi yük, büyüklük, şekil, elektriksel alan ve kimyasal içeriğe bağlı olarak değişir. Proteinler yapılarındaki aminoasitlere bağlı olarak artı veya eksi yüklerle yüklüdürler. Protein örneği elektrofrez tekniği ile elektriksel bir alana uygulandığında, protein net yüküne, büyüklüğüne ve şekline bağlı olarak hareket eder. Jel elektrofrez tekniği; agaroz jel elektrofrez ve poliakrilamid jel elektrofrez (PAGE) olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır.

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) tekniği, proteinlerin analizinde ve molekül kütleleri ile alt birimlerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Teknikte, proteinlerin elektriksel alandaki hareketlerinin sağlanabilmesi için poliakrilamid jeller hazırlanır. Bu jeller, polimerizasyon sırasında çok sayıda çapraz bağ oluşturan akrilamid ve akrilamid türevi olan N-N'-metilen bisakrilamid ile hazırlanmaktadır. Polimerizasyon reaksiyonunda akrilamid molekülleri yan yana bağlanarak düz zincirler oluştururken; bisakrilamid molekülleri iki akrilamid zinciri arasında çapraz bağlar meydana getirir ve böylece ağsı bir yapı oluşur. Jel hazırlanırken kullanılan amonyum persülfat (APS) polimerizasyon için serbest radikal oluşumunu sağlar ve polimerizasyonu başlatır, TEMED

ise reaksiyonda katalizör görevini üstlenir. Çapraz bağlar arasında kalan gözenekler, moleküllerin elektriksel alandaki hareketlerine imkân vermektedir. Gözeneklerin boyutu, hareketi sağlanacak olan molekülün büyüklüğüne uygun ölçüde ayarlanmalıdır.

SDS-PAGE tekniğinde, protein örnekleri SDS veya SDS gibi güçlü eksi yük taşıyan bir deterjan çözeltisiyle muamele edilmektedirler. Deterjan, protein örneklerinin doğal konformasyonunun bozulmasına ve eşit miktarda eksi yükü yüklenmelerine sebep olmaktadır. Tüm örneklerin aynı şekilde gelmesi ve eşit yükü yüklenmesi ise yalnızca molekül kütlesine dayalı bir ayırım yapılmasını sağlamaktadır. Elektriksel alanda jeldeki gözeneklerden en hızlı ilerleyen ve jelin en altına ulaşan örneğin molekül kütlesi en küçük, daha yavaş ilerleyerek daha yukarıda kalan örneğin ise daha büyüktür.

Molekül kütlesi bilinen standart proteinler, örneklerle birlikte aynı jelde yürütülür ve örneklerin geldikleri nokta, standart protein ile karşılaştırarak molekül kütleleri hakkında tahmin yapmamıza olanak sağlamaktadır.



Şekil 3. 7. Hazırlanan SDS-PAGE jelinin elektroforez camlarının arasına doldurulması

Bu çalışmada enzimin saflık derecesi, %3-8 kesikli SDS-PAGE yapılarak kontrol edilmiştir. SDS-PAGE protokolünde ilk olarak, bileşenleri Çizelge 3.2’de verilen ayırma jeli hazırlanmış ve elektroforez camlarının arasına doldurulmuştur (Şekil 3.7). Yüzeyi düzeltmek amacıyla ayırma jelinin üzerine birkaç damla %1’lik SDS damlatılmıştır. Ayırma

jelinin polimerize olması için bir saat beklenmiş ve polimerizasyondan sonra üzerine damlatılan SDS, jelin üzerinden uzaklaştırılmıştır.

Çizelge 3. 2. Ayırma jelinin bileşenleri

Kullanılan bileşen	Konsantrasyon (ml)
1 M Tris-HCl (pH 8,8)	3,75
%30 Akrlamid - %0,8 BIS	3,30
%10'luk SDS	0,15
%5'lik TEMED	0,10
%1,5'lik Amonyum persülfat	0,05
dH ₂ O	1,84

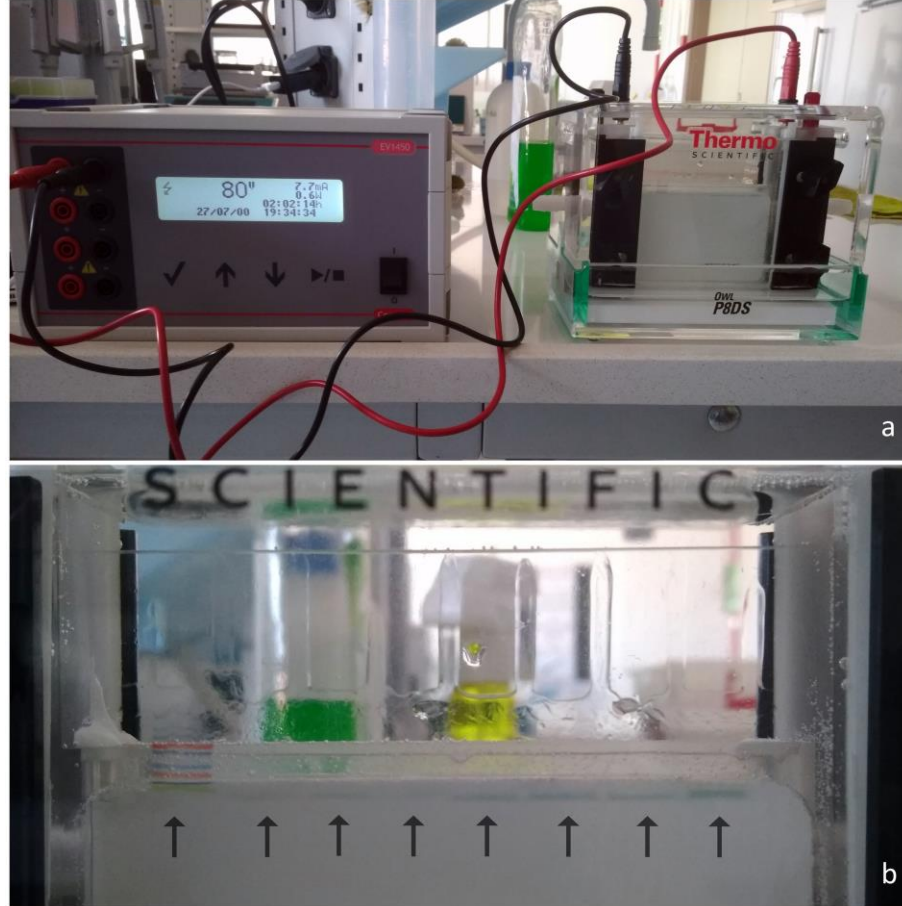
Daha sonra, bileşenleri Çizelge 3.3'te verilen yığma jeli hazırlanmış ve ayırma jelinin üst kısmına doldurulmuştur. Örneklerin yükleneceği kuyucukları oluşturması için, yığma jelinin üzerine tarak yerleştirilmiştir. Yığma jelinin de polimerize olması için iki saat beklenmiştir.

Çizelge 3. 3. Yığma jelinin bileşenleri

Kullanılan bileşen	Konsantrasyon (ml)
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,310
%30 Akrlamid - %0,8 BIS	0,3325
%10'luk SDS	0,025
%5'lik TEMED	0,025
%1,5'lik Amonyum persülfat	0,050
dH ₂ O	1,840

Tarak, polimerize olan yığma jelinin üzerinden yavaşça çekilmiştir. Elektroforez işlemi için hazır hâle gelen jel, cam plakalar arasında elektroforez tankına alınmıştır. Jelin üst kısmı ilk olarak distile su ile, daha sonra da yürütme tamponu ile yıkanmış ve tank, yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Yüklenecek örnekler, son hacim 40 µl olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponu ile karıştırılmıştır. Daha sonra her bir örnek 3 dakika kaynatılmış ve soğuduktan sonra jele yüklenmiştir.

Örnekler önce 40 V akımda 20 dk süreyle yürütülmüş; böylece ayırma jelinin başladığı yerde yığılmaları sağlanmıştır. Ardından akım 80 V olarak ayarlanmış, 2 saat boyunca yürütülmüş (Şekil 3.8) ve elektroforez işlemi tamamlanmıştır.



Şekil 3. 8. Jele yüklenen örneklerin 80 V akımda yürütülmesi (a) ve elektriksel alanda ilerlemeye başlamaları (b)

3.2.6. Boyama

Elektroforez işleminin ardından jel, cam plakalar arasından yavaşça çıkarılarak sabitleştirici çözelti içinde 20 dk süreyle yavaşça çalkalanmıştır. 20 dk sonunda bu çözültiden çıkarılan jel, boyama çözeltisi içine alınmış ve burada da 2 saat boyunca yine yavaşça çalkalanmıştır. Boyama çözeltisinden çıkarıldıktan sonra ise yıkama çözeltisine alınmış, yavaşça karıştırmaya devam edilmiştir. Yeteri kadar yıkanan jelde, molekül kütlelerine göre ayrılmış olan örneklere ait bantlar gözle görülebilir hâle gelmiştir.

Görüntüsünün alınması için jel, distile su içine aktarılmıştır. Ardından jelin fotoğrafı çekilmiştir.

3.3. Enzim Aktivitesine Etki Eden Bazı Parametrelerin İncelenmesi

3.3.1. pH değerinin etkisi

Enzimlerin yalnızca kendileri için optimum olan pH değerlerinde aktivite gösterdikleri bilinmektedir. Oldukça hassas olan enzim çalışmaları, özellikle pH konusunda ayrıca titizlik gerektirmektedir. Bu çalışmada pH'nın enzim aktivitesine etkisinin gösterilmesi amacıyla, farklı pH değerlerine sahip 6 farklı enzim üretim ortamı kullanılmıştır. Mikroorganizmalar pH değerleri sırasıyla 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 ve 8,0 olarak ayarlanmış olan kültür ortamlarına inoküle edilmiş ve diğer tüm koşullar eşit tutularak 5 gün boyunca 30°C'de inkübasyon sağlanmıştır.

3.3.2. Sıcaklığın etkisi

Bilindiği gibi enzimatik reaksiyonlar, pH değerine karşı gösterdikleri hassasiyeti sıcaklığa karşı da göstermektedirler. Tüm kimyasal reaksiyonlarda sıcaklık arttıkça reaksiyon hızı artmaktadır. Fakat kimyasal reaksiyonlardan farklı olarak, enzimatik reaksiyonların aktivitesi belirli bir sıcaklığın üzerinde düşmeye başlar. Bunun sebebi protein yapıda olan enzimlerin belirli bir sıcaklığın üzerinde denatüre olmalarıdır. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri sıcaklık veya sıcaklık aralığına "optimum sıcaklık" denir.

Farklı sıcaklıkların endo- β -1,4-glukanaz aktivitesine etkisinin gösterilmesi için, pH 5,0 olan enzim üretim ortamı sırasıyla 20°C, 30°C, 40°C ve 50°C sıcaklığa getirilmiştir. Belirtilen değerlerde enzim aktivitesi ölçülmüştür.

3.3.3. Substrat spesifikliğı

Her enzim, substrata spesifik olarak hareket etmektedir. Selülaz enziminin substrat spesifikliğinin belirlenmesi amacıyla CMC, buğday kepeğı, pamuk ve talaş kullanılmıştır. Kullanılan tüm substratlar, pH 5,0 olan 50 mM sitrat tamponu içerisinde, %1 (w/v) oranında

hazırlanmıştır. Deneme ortamlarına her bir substrattan eşit hacimde eklenmiştir. Enzim aktivite metodu izlenerek enzimin hangi substratta en iyi sonucu verdiğine bakılmıştır.

3.3.4. Substrat konsantrasyonunun etkisi

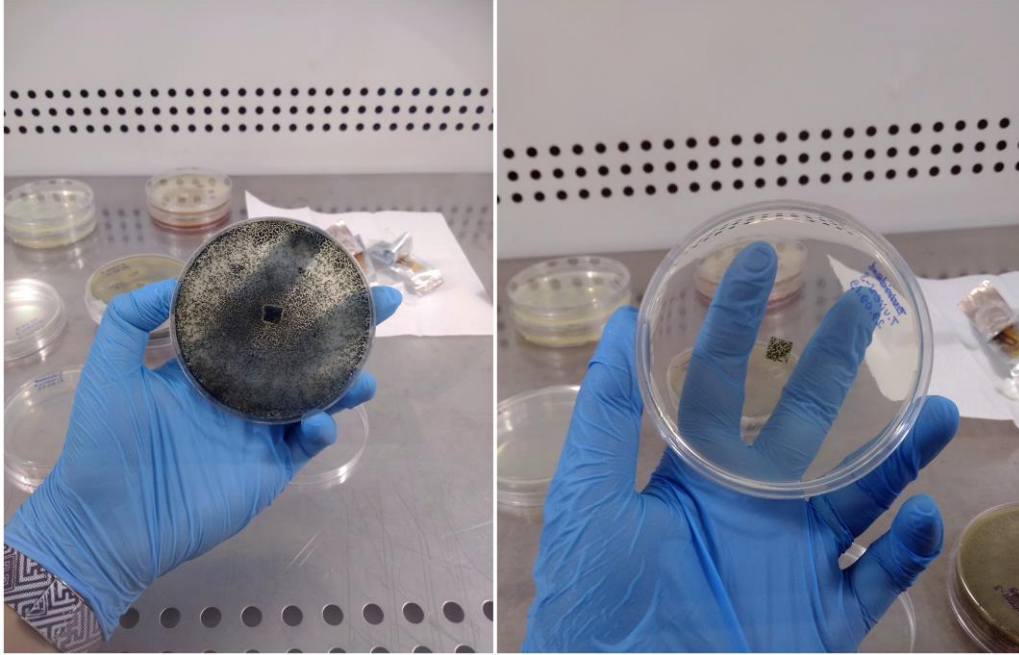
Çalışmada karbon kaynağı olarak kullanılan CMC'nin farklı konsantrasyonlarının enzim üretimine etkisi de incelenen diğer parametrelerden biridir. Bunun için pH değerleri 5,0 olan 4 farklı enzim üretim ortamına sırasıyla %0,5'lik, %1'lik, %1,5'lik ve %2'lik (w/v) CMC ilave edilmiş ve 30°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmışlardır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında *Trichoderma* suşlarının, *R. solani*'ye karşı etkinliği ve antagonizm amaçlı ürettiği endo- β -1,4-glukanaz enziminin miktarı belirlenmiştir. Böylece hem ticari formları yüksek maliyetli olan selüloz enziminin daha ekonomik yollarla üretimi, hem de *R. solani*'ye karşı biyolojik mücadelede *Trichoderma* spp.'nin kullanılabilirliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

4.1. Kültür Koşulları ve Enzim Üretim Ortamı

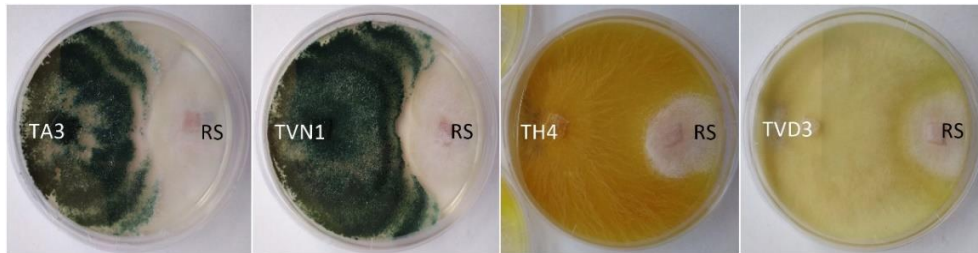
Çalışmada kullanılmak üzere PDA besiyerinde yetiştirilen *Trichoderma* izolatları, pH 5,0 olan Mandel ve Weber enzim üretim ortamına aktarılmış, 30°C sıcaklıkta 5 gün boyunca 150 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiş ve aktivite tayinine hazır hâle gelmişlerdir.



Şekil 4. 1. PDA besiyerinde yetiştirilmiş olan TVN3 suşunun taze PDA besiyerine inokülasyonu

4.2. İkili Karışık Kültür Deneyleri

30°C sıcaklıkta inkübe edilen ikili karışık kültürlerin morfolojik incelenmesi sonucu *Trichoderma* spp.'nin *R. solani* Kühn. üzerinde antagonistik etki gösterdiği, yayılım alanını sınırladığı ve gelişimini baskıladığı, Şekil 4.2'de açıkça görülmektedir.



Şekil 4. 2. TA3, TVN1, TH4 ve TVD3 izolatlarının *R. solani* Kühn. (RS) üzerindeki antagonistik etkisinin, 10 günlük karışık ikili kültürlerde morfolojik olarak gösterilmesi

4.3. Selülaz Aktivite Tayini

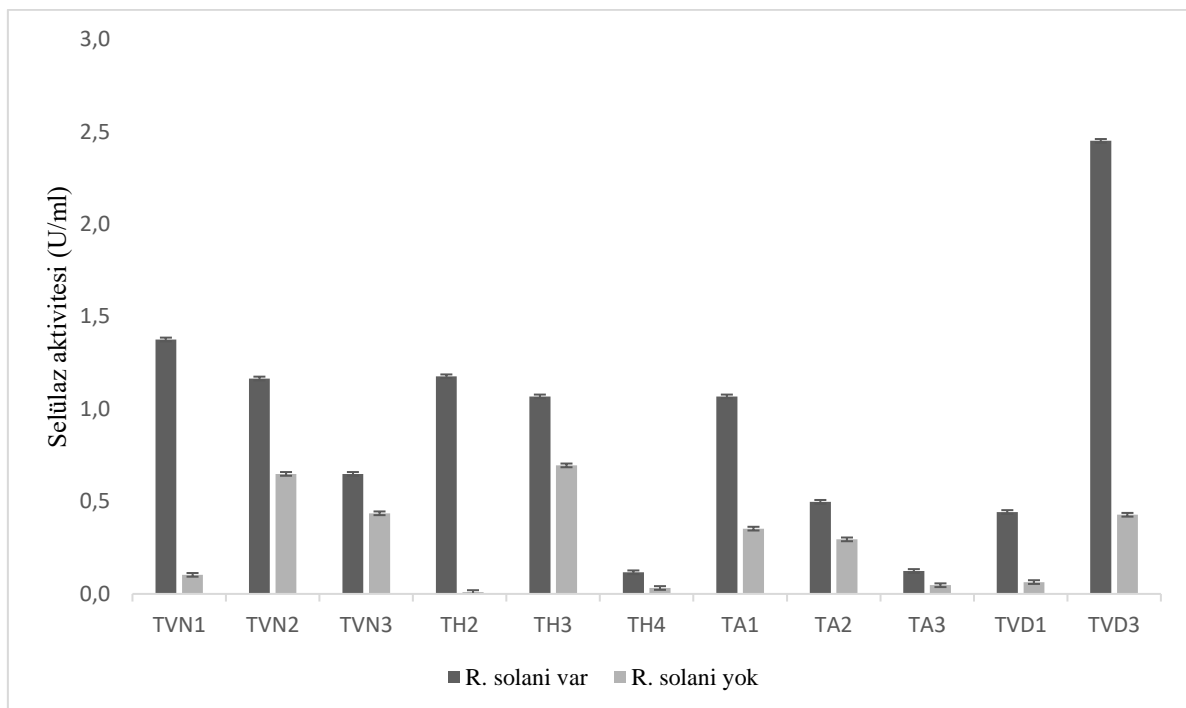
DNS metodunun izlenmesiyle elde edilen absorbans değerleri Bölüm 3.2.2'de belirtildiği şekilde kullanılmış ve enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Hesaplanan enzim aktivite sonuçları Çizelge 4.1 ve Şekil 4.3'te verilmiştir. Aktivite deneyleri her bir numune için üçer tekrarlı yapılmıştır. Yapılan t testiyle; kullanılan tüm *Trichoderma* izolatlarının *R. solani* varlığında ve yokluğunda gösterdikleri enzim aktiviteleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4. 1. *Trichoderma* spp.'nin *R. solani* bulunan ve bulunmayan ortamlardaki selülaz aktiviteleri

Mikroorganizma	Endo-β-1,4-glukanaz aktivitesi (U/ml)	<i>R. solani</i> varlığındaki endo-β-1,4-glukanaz aktivitesi (U/ml)
TVN1	0,103	1,376
TVN2	0,649	1,165
TVN3	0,436	0,649
TH2	0,010	1,177
TH3	0,695	1,068
TH4	0,032	0,117
TA1	0,353	1,068

Çizelge 4. 2. *Trichoderma* spp.'nin *R. solani* bulunan ve bulunmayan ortamlardaki selülaaz aktiviteleri (devam)

Mikroorganizma	Endo- β -1,4-glukanaz aktivitesi (U/ml)	<i>R. solani</i> varlığındaki endo- β -1,4-glukanaz aktivitesi (U/ml)
TA2	0,295	0,498
TA3	0,047	0,124
TVD1	0,064	0,443
TVD3	0,428	2,45



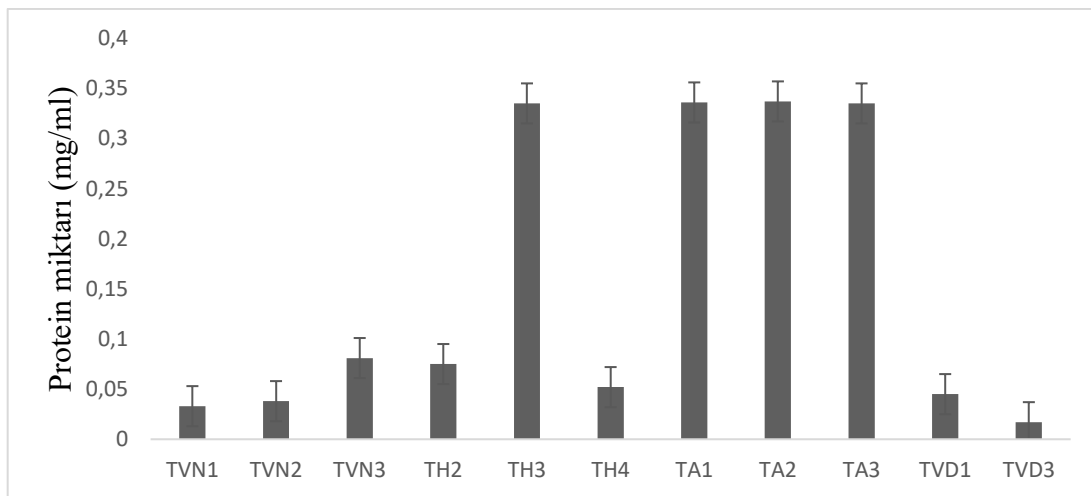
Şekil 4. 3. *Trichoderma* spp.'nin *R. solani* bulunan ve bulunmayan ortamlardaki selülaaz aktiviteleri (U/ml) grafiği

4.4. Kantitatif Protein Tayini

Absorbans değerlerinden hesaplanan protein miktarları Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4'te verilmiştir. Tayin deneyleri her bir numune için üçer tekrarlı yapılmıştır. En yüksek miktarı TA2 izolatının verdiği; TA1, TA3 ve TH3 izolatlarının da bu değeri takip ettiği görülmüştür.

Çizelge 4. 3. *R. solani* ile *Trichoderma* spp.'nin bir arada bulunduğu örneklere ait protein miktarları (mg/ml)

Mikroorganizma	Protein (mg/ml)
TVN1	0,033
TVN2	0,038
TVN3	0,081
TH2	0,075
TH3	0,335
TH4	0,052
TA1	0,336
TA2	0,337
TA3	0,335
TVD1	0,045
TVD3	0,017



Şekil 4. 4. *R. solani* ile *Trichoderma* spp.'nin bir arada bulunduğu örneklere ait protein miktarları (mg/ml) grafiği

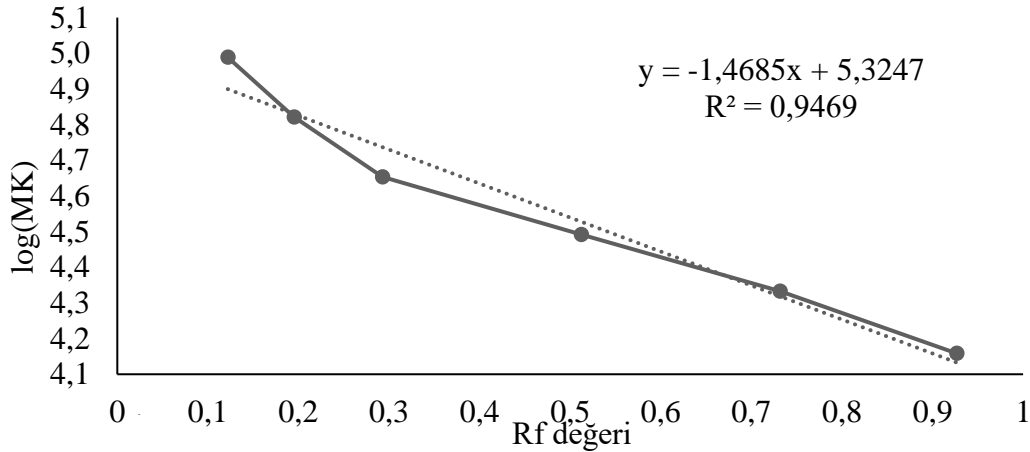
4.5. SDS-PAGE

Trichoderma spp. tarafından üretilen selüloz enziminin tespiti SDS-PAGE metodu kullanılarak yapılmıştır. Jel görüntülerindeki bantların hangi proteinlere ait olduğu, molekül kütlelerinin (MK) doğru tahmin edilmesiyle mümkün olmaktadır. Bantlara karşılık gelen molekül kütlelerinin en doğru şekilde tahmini için ise “sürüklenme derecesi” veya “alıkonma

faktörü” olarak bilinen R_f değerleri hesaplanmıştır. Hesaplama için aşağıda belirtilen formül kullanılmıştır (Durchschlag vd., 1991).

$$R_f = \frac{\text{Proteinin uygulama noktasından itibaren aldığı yol (cm)}}{\text{Boyanın orijinden itibaren aldığı yol (cm)}} = \frac{d_{\text{madde}}}{d_{\text{çözelti}}}$$

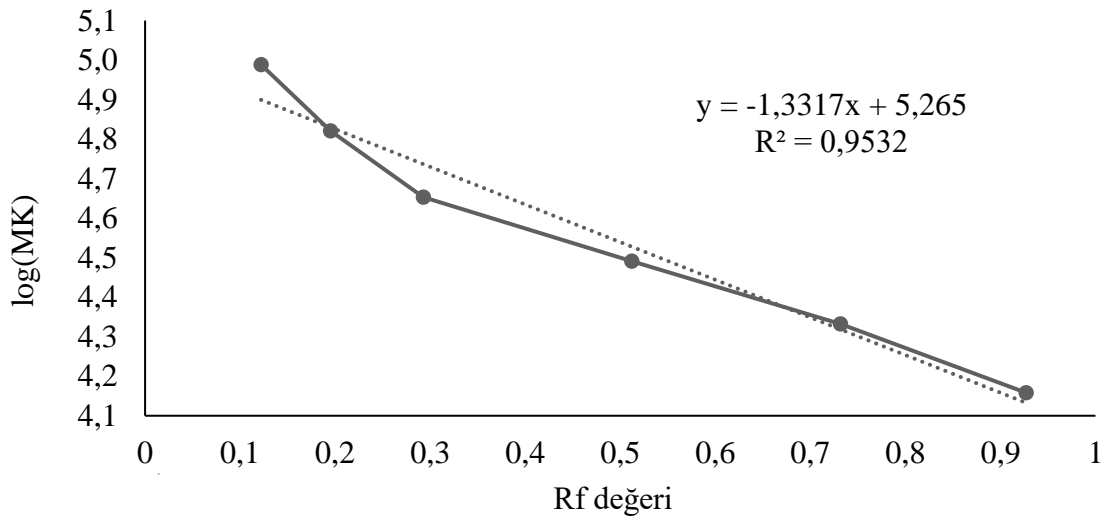
Çizilen R_f değeri-log(MK) grafikleri 1, 2, 3 ve 4 numaralı jeller için sırasıyla Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de verilmiştir. Grafiklerden elde edilen regresyon denklemleri ile hesaplanan molekül kütleleri ise 1, 2, 3 ve 4 numaralı jeller için sırasıyla Çizelge 4.3, Çizelge 4.4, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6’da belirtilmiştir. Jel görüntülerindeki bantlar, hesaplama sonuçları doğrultusunda işaretlenmiştir. SDS-PAGE analizlerinde MyBioSource (10–250 kDa) ve Sigma-Aldrich (29–200 kDa) firmalarından tedarik edilen protein markörleri kullanılmıştır.



Şekil 4. 5. 1 numaralı jel görüntüsüne ait R_f değeri-log(MK) grafiği

Çizelge 4. 4. 1 numaralı jeldeki bantlara ait R_f değerleri ve hesaplanan molekül kütleleri (MK)

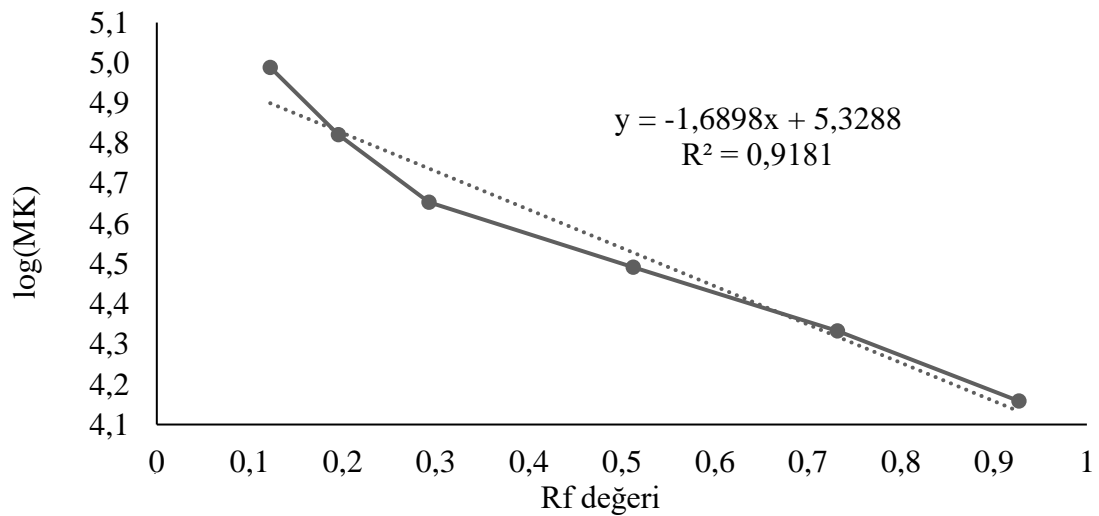
a	b	R_f	log(MK)	MK (Da)
186	114	0,612903	4,424652	26585,92
186	108	0,580645	4,472023	29649,86
186	76	0,408602	4,724668	53047,84
186	60	0,322581	4,85099	70956,20
186	26	0,139785	5,119426	131651,50



Şekil 4. 6. 2 numaralı jel görüntüsüne ait R_f değeri-log(MK) grafiği

Çizelge 4. 5. 2 numaralı jeldeki bantlara ait R_f değerleri ve hesaplanan molekül kütleleri (MK)

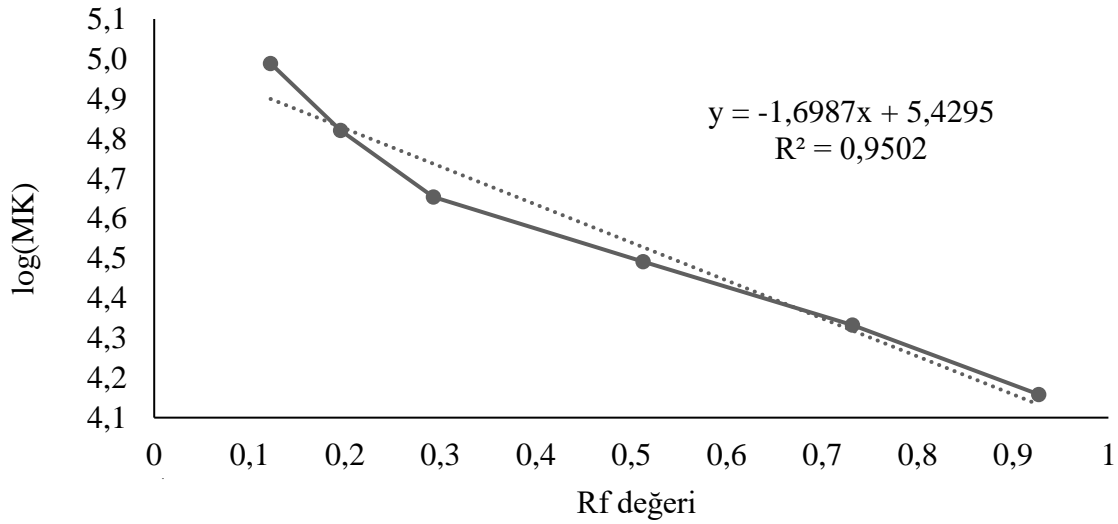
a	b	R_f	log(MK)	MK (Da)
144	93	0,645833	4,404944	25406,44
144	91	0,631944	4,42344	26511,82
144	59	0,409722	4,719373	52405,02
144	49	0,340278	4,811852	64841,36
144	16	0,111111	5,117033	130928,24



Şekil 4. 7. 3 numaralı jel görüntüsüne ait R_f değeri-log(MK) grafiği

Çizelge 4. 6. 3 numaralı jeldeki bantlara ait R_f değerleri ve hesaplanan molekül kütleleri (MK)

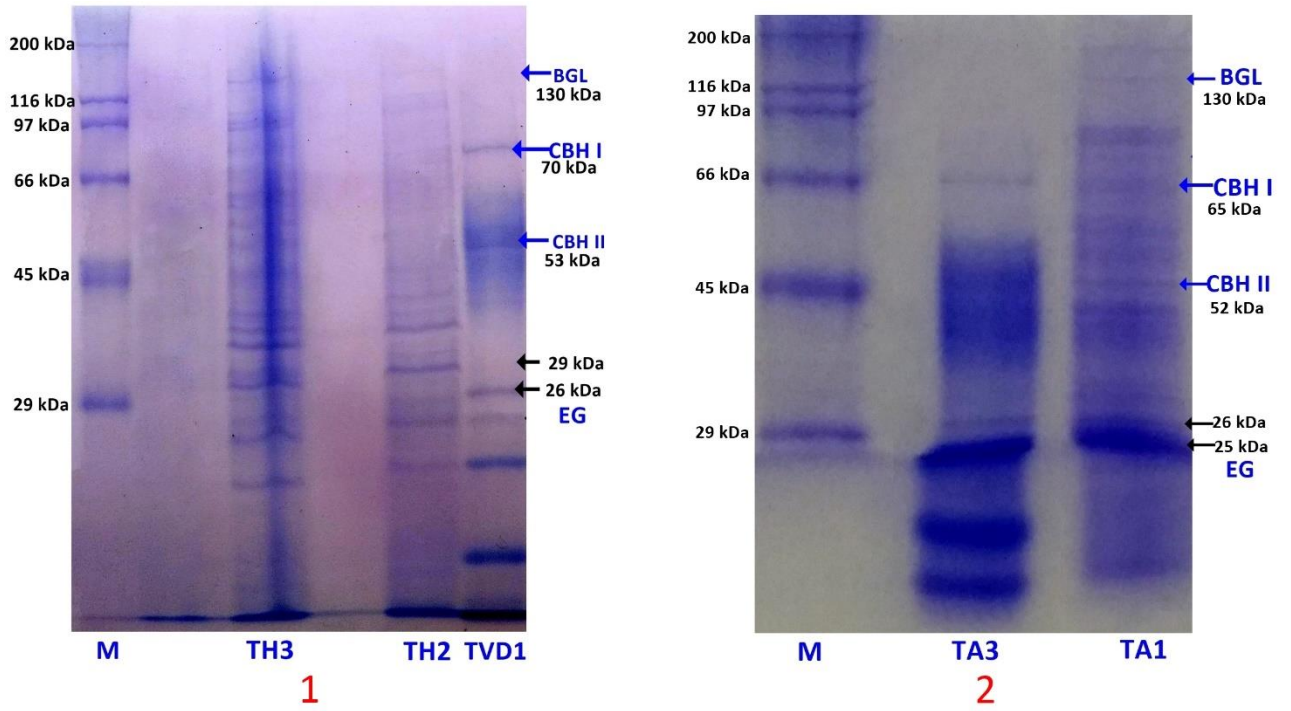
a	b	R_f	log(MK)	MK (Da)
158	87	0,550633	4,398341	25023,07
158	81	0,512658	4,46251	29007,49
158	59	0,373418	4,697799	49865,33
158	45	0,28481	4,847528	70392,74
158	23	0,14557	5,082816	121008,7



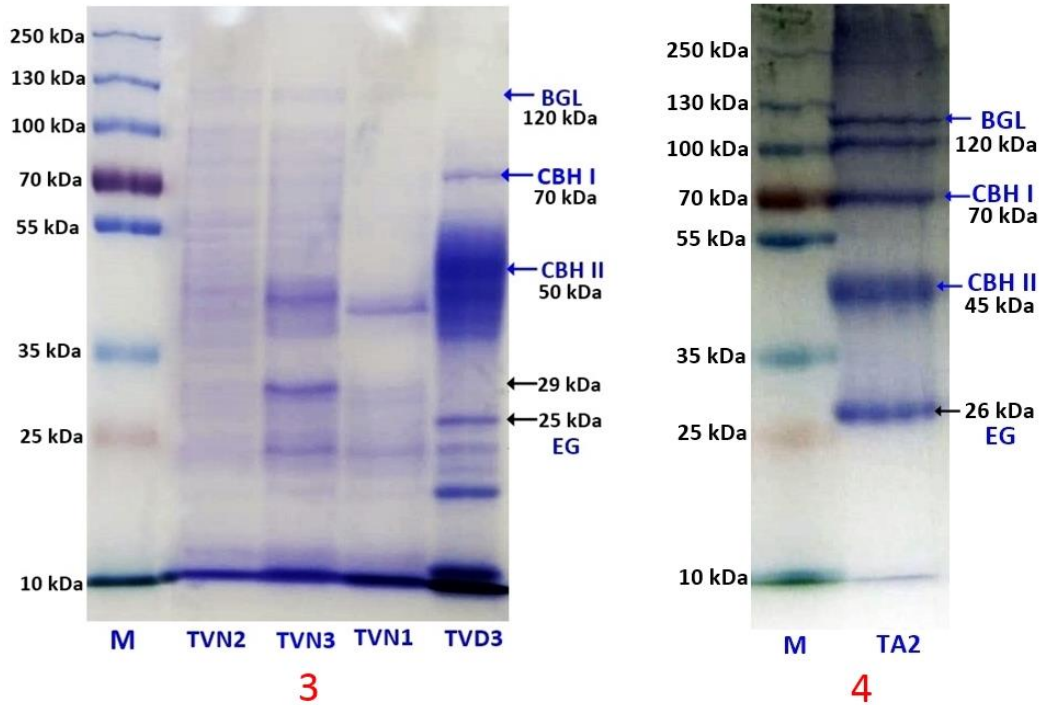
Şekil 4. 8. 4 numaralı jel görüntüsüne ait R_f değeri-log(MK) grafiği

Çizelge 4. 7. 4 numaralı jeldeki bantlara ait R_f değerleri ve hesaplanan molekül kütleleri (MK)

a	b	R_f	log(MK)	MK (Da)
178,4	106	0,59417	4,420183	26313,75
178,4	81	0,454036	4,658229	45522,83
178,4	61	0,341928	4,848666	70577,53
178,4	37	0,207399	5,077191	119451,37



Şekil 4. 9. TH3, TH2, TVD1 (1 numaralı jel), TA3 ve TA1 (2 numaralı jel) izolatlarından üretilen endo- β -1,4-glukanaz (EG) enziminin SDS-PAGE görüntüsü



Şekil 4. 10. TVN2, TVN3, TVN1, TVD3 (3 numaralı jel) ve TA2 (4 numaralı jel) izolatlarından üretilen endo- β -1,4-glukanaz (EG) enziminin SDS-PAGE görüntüsü

SDS-PAGE görüntüleri incelendiğinde TH2, TH3, TVN1, TVN2 ve TVN3 örneklerinin 29 kDa'da belirgin bantlar verdiği görülmektedir. Ayrıca TH2 ve TH3 örneklerinin 25 kDa'da da nispeten daha silik bantlar verdiği gözlenmiştir. TVD1 ve TA2 26 kDa'da; TA1, TA3 ve TVD3 ise 25 kDa'da belirgin bant vermiştir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Çizelge 4.7'de de belirtildiği üzere literatürde endo- β -1,4-glukanaz (EG) enziminin 29 ve 25 kDa'da bant verdiği dair çalışmalar mevcuttur. Bu da çalışmamızda istenen endo- β -1,4-glukanaz enziminin *Trichoderma* spp. tarafından üretildiğini doğrular niteliktedir.

Çizelge 4. 8. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen selülaz enzimlerinin molekül kütleleri

Mikroorganizma	Molekül kütlesi (kDa)	Kaynak
<i>T. harzianum</i>	66 – 25	Saravanakumar vd., 2016
<i>T. harzianum</i>	29	Noronha ve Ulhoa, 2000
<i>T. harzianum</i>	36	Noronha vd., 2000
<i>T. reesei</i>	32	Pirzadah vd., 2014
<i>T. ouroviride</i>	70 – 30	Şahin, 2013
<i>T. viride</i>	58	Iqbal vd., 2011
<i>T. viride</i>	66	Liu ve Xia, 2006
<i>T. koningii</i>	75 – 68	Monteiro ve Ulhoa, 2006
<i>Trichoderma</i> spp.	32	Guruk, 2018
<i>Sclerotium rolfsii</i>	43	El-Katatny vd., 2001
<i>Bacillus</i> spp.	32,5	Shanmugapriya vd., 2012
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	34 – 26,5	Kumar vd., 2012
<i>Aspergillus aculeatus</i>	45	Naika vd., 2007
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	36	Bakare vd., 2005

Selülaz sistemi; endoglukanaz, ekzoglukanaz ve β -glukozidaz olmak üzere 3 enzim grubundan meydana gelmektedir (Lynd vd., 2002). Çalışmada endo- β -1,4-glukanaz enzimi saf hâlde elde edilmediği için, SDS-PAGE jel görüntülerinde selülaz sistemini oluşturan diğer enzim grupları da gözlenmiştir. Ng vd. (2014), *T. reesei*'nin selülaz kompleksi üzerine yaptıkları çalışmada yaklaşık 130 kDa'da BGL, 70 kDa'da CBH I, 53 kDa'da CBH II ve 25 kDa'da EG bantı gözlemlemişlerdir. Çalışmaya ait Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da belirtildiği gibi, BGL olarak ifade edilen β -glukozidaz, farklı örneklerde 130 ve 120 kDa'da bant

vermiştir. CBH I ve CBH II olarak ifade edilen sellobiyohidrolaz I ve II, yani ekzoglukanazlar 35–70 kDa ve 45–53 kDa’da bant göstermişlerdir. EG olarak ifade edilen endoglukanaz ise 29, 26 ve 25 kDa’da bant vermiştir.

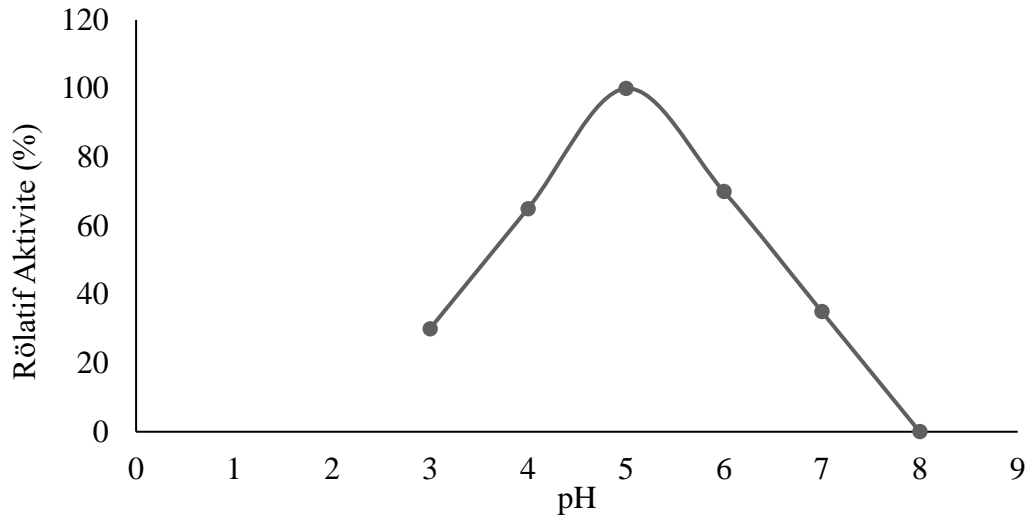
Selülazlar, domain adı verilen birbirinden bağımsız olarak katlanmış, farklı yapı ve fonksiyonlara sahip alt birimlerden oluşmaktadırlar (Şahin, 2013). Bu kompleks sistem genellikle bir katalitik birim, bir veya birden fazla substrat bağlayıcı veya kompleksin oluşumunda görevli yardımcı birimlerden meydana gelir. Ayrıca fonksiyonu henüz anlayamamış bazı başka birimlerin de bu kompleksin yapısında bulunduğu bilinmektedir (Kuduğ, 2013). Bu yapılarından dolayı SDS-PAGE’de birden fazla bant elde edilmesinin sebebinin, selülaza ait domainler olduğu düşünülebilir.

4.6. Enzim Aktivitesine Etki Eden Bazı Parametreler

4.6.1. pH değerinin etkisi

Farklı pH değerlerine sahip enzim üretim ortamlarından elde edilen verilere göre % rölatif aktivite belirlenmiş ve pH grafiği çizilmiştir (Şekil 4.11). pH değeri 5,0’e yaklaştıkça enzim aktivitesinin arttığı ve pH 5,0’te maksimum düzeye ulaştığı gözlenmiştir. pH değeri 5,0’ten yukarı çıktıkça enzim aktivitesi azalmış ve pH 8,0’de aktivite durmuştur. Endo- β -1,4-glukanaz enziminin üretimi için optimum pH değerinin 5,0 olduğu belirlenmiştir.

Shoemaker ve Brown (1978), *T. viride*’nin ürettiği β -1,4-glukanaz enzimi için optimum pH değerini 4,5 olarak belirlemiştir. Farid ve El-Shahed (1993), *T. reesei* ile yaptığı benzer çalışmada optimum pH’nın 4,6 olduğunu belirtirken; Şahin vd. (2013) *T. ouroviride* ile yaptığı çalışmada bu değeri 5,0 olarak belirlemiştir (Çizelge 4.8).



Şekil 4. 11. Farklı pH değerlerinin endo-β-1,4-glukanaz enzim aktivitesine etkisi

Çizelge 4. 9. Bazı *Trichoderma* türlerinden elde edilen selülaz enzimleri için optimum pH değerleri

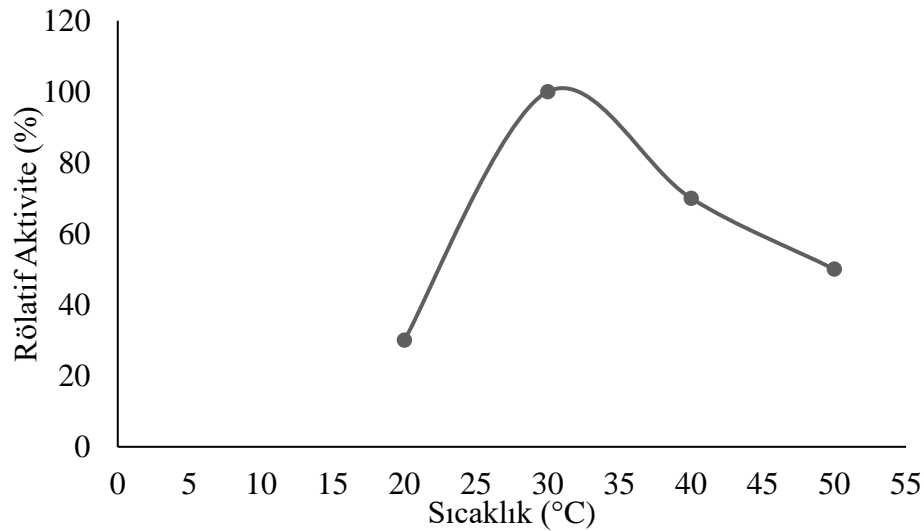
Mikroorganizma	Enzim	pH	Kaynak
<i>T. harzianum</i>	β-1,3-glukanaz	6,0	Polanco vd., 2015
<i>T. harzianum</i>	β-1,3-glukanaz	4,6	Kitamoto vd., 1987
<i>T. harzianum</i>	β-1,3-glukanaz	4,5 - 5,5	Lorito vd., 1994
<i>T. harzianum</i>	β-1,3-glukanaz	4,8	Sharma vd., 2009
<i>T. harzianum</i>	Endoglukanaz	5,5	Ahmed vd., 2009
<i>T. reesei</i>	β-1,4-glukanaz	4,6	Farid ve El-Shahed, 1993
<i>T. viride</i>	β-1,4-glukanaz	4,5	Shoemaker ve Brown, 1978
<i>T. ouroviride</i>	β-1,4-glukanaz	5,0	Şahin vd., 2013
<i>Trichoderma spp.</i>	β-1,3-glukanaz	4,8	Witkowska ve Maj, 2002
<i>Trichoderma spp.</i>	β-1,3-glukanaz	5,5	Parmar vd., 2015
<i>Trichoderma spp.</i>	β-1,3-glukanaz	6,5	Dubey vd., 2011

4.6.2. Sıcaklığın etkisi

Farklı inkübasyon sıcaklıklarına tabi tutulan enzim üretim ortamlarından elde edilen verilere göre % rölatif aktivite belirlenmiş ve sıcaklık grafiği çizilmiştir (Şekil 4.12). Sıcaklık 30°C'ye yaklaştıkça enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiş, 30°C'de aktivite maksimum değere ulaşmıştır. Sıcaklık 50°C'ye ulaştığında ise enzim aktivitesi

gözlenememiştir. Enzim üretim ortamı için optimum inkübasyon sıcaklığının 30°C olduğu belirlenmiştir.

Şahin vd. (2013) tarafından *T. ouroviride* ile yapılan çalışmada optimum sıcaklık 30°C olarak belirlenmiştir. Farklı *Trichoderma* türleri ile yapılan benzer çalışmalarda ise optimum sıcaklık değerleri 28°C, 27°C ve 25°C olarak bulunmuştur (Çizelge 4.9).



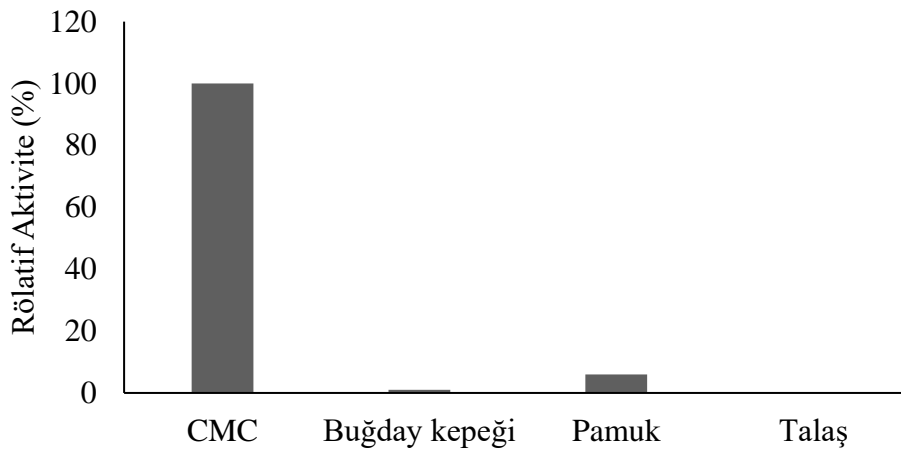
Şekil 4. 12. Farklı sıcaklık değerlerinin endo-β-1,4-glukanaz enzim aktivitesine etkisi

Çizelge 4. 10. Bazı *Trichoderma* türlerinin enzim üretim ortamlarına ait optimum sıcaklık değerleri

Mikroorganizma	Enzim	Sıcaklık (°C)	Kaynak
<i>T. harzianum</i>	β-1,3-glukanaz	27	Polanco vd., 2015
<i>T. harzianum</i>	β-1,3-glukanaz	28	Sivan ve Chet, 1989
<i>T. harzianum</i>	β-1,3-glukanaz	25	Ridout ve Coley-Smith, 1987
<i>T. harzianum</i>	β-glukanaz	30	Küçük ve Kıvanç, 2004
<i>T. harzianum</i>	Endoglukanaz	28	Ahmed vd., 2009
<i>T. ouroviride</i>	β-1,4-glukanaz	30	Şahin vd., 2013
<i>Trichoderma spp.</i>	β-1,3-glukanaz	25	Dubey vd., 2011
<i>Trichoderma spp.</i>	β-1,3-glukanaz	25	Ridout vd., 1986
<i>Trichoderma spp.</i>	β-1,3-glukanaz	28	Witkowska ve Maj, 2002
<i>Trichoderma spp.</i>	β-1,3-glukanaz	30	Parmar vd., 2015
<i>Trichoderma spp.</i>	β-1,3-glukanaz	25	Gupta vd., 2016

4.6.3. Substrat spesifikliği

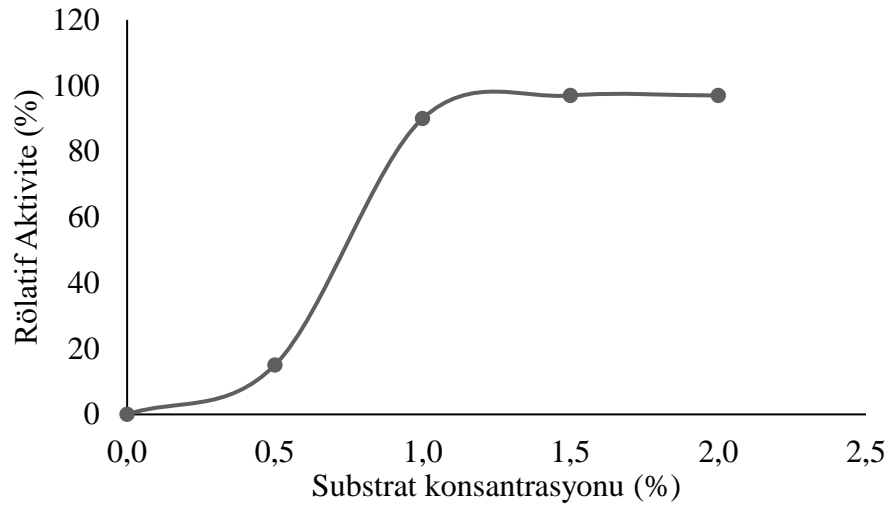
Farklı maddelerin substrat olarak kullanılması sonucu alınan veriler ile % rölatif aktivite hesaplanmıştır. Çizilen grafik, endo- β -1,4-glukanaz enzimi üretiminin CMC varlığında oldukça yüksek olduğunu ve enzimin bu substrata yüksek spesifite gösterdiğini ifade etmektedir (Şekil 4.13). Buğday kepeği, pamuk ve talaşta olumlu sonuç elde edilememesinin sebebi ise, bu maddelerin kompleks yapıda olması ve ön işlem uygulanması gerekmesidir.



Şekil 4. 13. Farklı substratların endo- β -1,4-glukanaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

4.6.4. Substrat konsantrasyonunun etkisi

Farklı konsantrasyonlarda CMC eklenmiş kültür ortamlarından elde edilen verilerle % rölatif aktivite hesaplanmış, Şekil 4.14'te belirtilen grafik çizilmiştir. Substrat konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinde de artış gözlenmiş; fakat substrat konsantrasyonu %2'nin üzerine çıktığında grafik sabit kalmıştır. Bu ise enzimin substrat doygunluğuna ulaştığını ifade etmektedir.



Şekil 4. 14. Farklı substrat konsantrasyonlarının endo-β-1,4-glukanaz enzim aktivitesine etkisi

Guruk (2018), *Trichoderma* spp. ile yapmış olduğu çalışmada %2'lik CMC konsantrasyonunun maksimum aktivite sağladığını belirtmiştir. Kim vd. (2002) tarafından *T. harzianum* ile yapılan bir başka benzer çalışmada ise, %2,5 oranında CMC kullanmanın aktiviteyi en yüksek değerine çıkardığı bildirilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çökerten, kök çürüklüğü, kök ve kök boğazı kanseri gibi bitki hastalıklarının sebebi olarak bilinen *Rhizoctonia solani* Kühn., tarımsal üretimde ciddi anlamda maddi kayıplara yol açmaktadır. Bu ve bunun gibi patojenlerle mücadelede kullanılan tarım ilaçlarının ise ne yazık ki hem çevreye, hem de insan sağlığına pek çok olumsuz etkisi olmaktadır. Kimyasal kullanımının bu tehlikeli etkilerini en aza indirmek amacıyla alternatif çözüm yollarına yönelim artmıştır. Antagonist mikroorganizmaların kullanımı, biyolojik mücadele adı altında tercih edilmekte olan yöntemlerden biridir.

Literatür özetinde de belirtilmiş olduğu gibi, *Trichoderma* türlerinin *R. solani* üzerindeki baskılayıcı ve geriletici etkisi, pek çok farklı çalışmaya konu olmuştur. *Trichoderma* türlerinin sözü edilen antagonistik etkiyi göstermesi, bazı litik enzim aktiviteleri yoluyla meydana gelmektedir. Bu litik enzimlerden biri olan endo- β -1,4-glukanaz, *Trichoderma* spp. tarafından uygun şartlarda doğal olarak üretilen bir enzimdir. Fakat *R. solani* varlığında endo- β -1,4-glukanaz üretiminin arttığı; *Trichoderma* spp.'nin bu enzim sayesinde *R. solani* üzerinde baskılayıcı etki yaptığı daha önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır.

Bu çalışma ile hem yüksek maliyetli selüloz enzimi mikroorganizmalar tarafından biyoteknolojik yöntemlerle üretilmiş, ekonomik enzim eldesi sağlanmış; hem de *R. solani*'ye karşı biyolojik mücadelede *Trichoderma* spp.'nin etkisi gösterilmiştir. Çalışma boyunca elde edilen veriler doğrultusunda, *Trichoderma* türlerine ait endo- β -1,4-glukanaz enzim üretiminin *R. solani* varlığında artış gösterdiği doğrulanmıştır. Ayrıca hazırlanan ikili karışık kültür denemelerinde de ortamdaki *Trichoderma* spp. varlığının, *R. solani* gelişimini baskıladığı ve yayılım alanını sınırlandırdığı morfolojik olarak da görülmüştür.

Laboratuvar koşullarında üretimi sağlanan endo- β -1,4-glukanazın, CMC'ye karşı yüksek spesifite gösterdiği tespit edilmiştir. pH değeri 5,0 olan, 30°C sıcaklıktaki ortamda, ortalama 5 gün içerisinde maksimum enzim üretimi gerçekleşmiştir.

SDS-PAGE sonucu elde edilen bantlar değerlendirilmiş, sonuçlar literatürdeki diğer benzer çalışmalarla karşılaştırılmış ve istenen endoglukanaz enzimine ait bantlar gözlenmiştir. Ayrıca selülağın modüler yapısını meydana getirdiği bilinen ekzoglukanaz ve β -glukozidaz enzimlerinin varlıkları da, jelde verdikleri bantların yorumlanmasıyla belirlenmiştir.

Bu çalışmada *Trichoderma* spp.'nin, *R. solani* gibi fitopatojenlerin hücre duvarını zarara uğratmak için selülağ enzimi sentezini artırdığı gözlenmiştir. Bu özellikleri *Trichoderma* spp.'yi biyolojik kontrol konusunda önemli bir yere taşıtmaktadır. Bu tez çalışmasının, bitki gelişimine ve direncine destek olduğu bilinen *Trichoderma* spp.'nin biyolojik mücadele kapsamında kullanımını teşvik edeceği; bu tür bir mücadelenin ekonomik ve çevresel avantajlar sağlayacağı umut edilmektedir.

Ayrıca çalışmada kullanılan suşların kültür ortamlarının daha da iyileştirilmesiyle selülağ enzim üretiminin artacağı ve üretilen fungal enzimin yüksek saflıkta elde edilebileceği öngörülmektedir. Böylece birçok endüstriyel alanda tercih edilen ve maliyeti yüksek olan selülağ enziminin mikroorganizmalar tarafından daha ekonomik yollarla üretimi mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmed, S., Bashir, A., Saleem, H., Saadia, M., Jamil, A., 2009, Production and purification of cellulosedegrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*, Pak. J. Bot., 41(3), p.1411-1419.
- Ajayi-Oyetunde, O.O., Bradley, C.A., 2018, *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean, Plant Pathology 67, p.3–17.
- Ali, H.Z., Nadarajah, K., 2013, Evaluating the efficacy of *Trichoderma* isolates and *Bacillus subtilis* as biological control agents against *Rhizoctonia solani*, Research Journal of Applied Sciences, 8(1), p.72-81.
- Almeida, F.B.R., Cerqueira, F.M., Silva, R.N., Ulhoa, C.J., Lima, A.L., 2007, Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production, Biotechnol Lett, 29, p.1189–1193.
- Altomare, C., Norvell, W.A., Björkman, T., Harman, G.E., 1999, Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22, Applied and Environmental Microbiology, Vol.65, No.7, p.2926–2933.
- Amin, F., Razdan, V.K., Mohiddin, F.A., Bhat, K.A., Sheikh, P.A., 2010, Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens *in-vitro*, Journal of Phytology, 2(10), p.34–37.
- Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L.G., He'raud, C., Steinberg, C., 2010, Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*, Fungal Biology, 114, p.691-701.
- Arıcı, M., 2007, Enzimoloji, Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, s.35.
- Asad, S.A., Ali, N., Hameed, A., Khan, S.A., Ahmad, R., Bilal, M., Shahzad, M., Tabassum, A., 2014, Biocontrol efficacy of different isolates of *Trichoderma* against soil borne pathogen *Rhizoctonia solani*. Polish Journal of Microbiology, Vol. 63, No 1, p.95–103.
- Aydın, M.H., Turhan, G., 2013, Patateste *Rhizoctonia solani*'ye karşı *Trichoderma* türlerinin etkinliği ve bazı fungusitlerle birlikte kullanılması, Anadolu J. of AARI, 23(1).
- Aydın, M.H., 2015, Bitki fungal hastalıklarıyla biyolojik savaşta *Trichoderma*'lar, Turk J Agric Res, 2, s.135–148.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bakare, M.K., Adewale, I.O., Ajayi, A., Shonukan, O.O., 2005, Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*, African Journal of Biotechnology, 4(9), p.898-904.
- Bhat, M., Bhat, S., 1997, Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications, Biotechnology Advances, 15:3-4, p.583-620.
- Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, Vol.72, 1-2, p.248-254.
- Brewer, M.T., Larkin, R.P., 2005, Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato, Crop Protection, 24, p.939-950.
- Buhur, N., 2014, Aydın ilinde çeşitli kültür bitkilerinden elde edilen patojen *Rhizoctonia* spp. izolatlarının anastomosis gruplarının belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 97 s. (yayımlanmış).
- Chahal, D.S., 1984, Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 49, No. 1, p.205-210.
- Chet, I., Harman, G.E., Baker, R., 1981, *Trichoderma hamatum* : Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp., Microbial Ecology, 7, p.29-38.
- Chet, I., Ordentlich, A., Shapira, R., Oppenheim, A., 1990, Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria, Plant and Soil, Vol.129(1), p.85-92.
- Cook, R.J., Baker, K.F., 1983, The nature and practice of biological control of plant pathogens, American Phytopathological Society, p.539.
- Çakmar, E., 2005, Farklı ortamlardan ayrımı yapılan aşırı halofilik bakterilerin protein profilleri ve bu bakterilerin selüloz enzim aktivitelerinin ölçülmesi, Yüksek lisans tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 58 s. (yayımlanmış).
- Dolar, F.S., Demirci, E., Basım H., Demirci, F., Elibüyük, İ.Ö., 2011, Fitopatoloji, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayını No: 2293, Açıköğretim Fakültesi Yayını No: 1290.
- Döken, M.T., Demirci, E., Zengin, H., 2011, Fitopatoloji, Atatürk Üniversitesi Yayınları, No: 729, Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 314, Ders Kitapları Serisi, No: 66.
- Dubey, S.C., Tripathi, A., Dureja, P., Grover, A., 2011, Characterization of secondary metabolites and enzymes produced by *Trichoderma* species and their efficacy against plant pathogenic fungi, Indian Journal of Agricultural Sciences, 81 (5), p.455-61.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Durak, E.D., 2016, Biological control of *Rhizoctonia solani* on potato by using indigenous *Trichoderma* spp., International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences, AIP Conf. Proc., doi: 10.1063/1.4945846.
- Durchschlag, H., Christl, P., Jaenicke, R., 1991, Comparative determination of the particle weight of glycoproteins by SDS-PAGE and analytical ultracentrifugation, Prog Colloid Polym Sci 86, p.41–56.
- El-Katatny, M.H., Gudelj, M., Robra, K.H., Elnaghy, M.A., Gübitz, G.M., 2001, Characterization of a chitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *T. harzianum* Rifai T-24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*, Appl. Microbiol. Biot. 56, p.137–143.
- Elad, Y., Chet, I., Katan, J., 1980, *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*, Phytopathology, 70, p.119-121.
- Elad, Y., Chet, I., Henis, Y., 1982, Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*, Canadian Journal of Microbiology, Vol.28, No.7, p.719–725.
- Elad, Y., Chet, I., Boyle, P., Henis, Y., 1983, Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*, Phytopathol. 52, p.456-462.
- Farid, M.A., El-Shahed, K.Y., 1993, Cellulase production on high levels of cellulose and corn steep liquor, Zentralbl. Mikrobiol., 148, p.277-283.
- Ghose, T.K., 1987, Measurement of cellulase activities, International Union of Pure and Applied Chemistry, 59(2), p.257-268.
- Gözükara, F., 2009, Termofil *Bacillus* sp. bakterisinden lichenaz (β -1,3 ve 1,4 glucanase) enzimi üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik kullanılabilirliği, Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 91 s. (yayımlanmış).
- Gupta, S., Mahajan, S., Gupta, M., Sharma, D., 2016, Screening of native isolates of *Trichoderma* spp. of Jammu for their biocontrol potential through hydrolytic enzyme activities, Indian Phytopathology, 69(2), p.173-180.
- Guruk, M., 2018, Harran Ovası topraklarından izole edilen *Trichoderma* spp. suşlarının selülaz üretme yeteneklerinin araştırılması, Yüksek lisans tezi, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 73 s. (yayımlanmış).
- Gveroska, B., Ziberoski, J., 2011, The influence of *Trichoderma harzianum* on reducing root rot disease in tobacco seedlings caused by *Rhizoctonia solani*, International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology, 2(2), p.1-11.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hames, D., Hooper, N., 1997, Biyokimya, Nobel Yayın No: 1479, Fen Bilimleri: 98, Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi Yayın No: 55, ISBN: 0-4153-6778-6, s.83–85.
- Haran, S., Schickler, H., Chet, I., 1996, Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*, Microbiology, 142, p.2321-2331.
- Harman, G.E., Chet, I., Baker, R., 1980, *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Pythium* spp. or *Rhizoctonia solani*, The American Phytopathological Society, Vol. 70, No. 12.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., Monte, E., 2012, Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes, Microbiology, 158, p.17–25.
- Iqbal, H.M.N., Ahmed, I., Zia, M.A., Irfan, M., 2011, Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility, Advances in Bioscience and Biotechnology, 2, p.149–156.
- Kavanagh, K., 2014, Fungi biology and applications, Yayın No: 1057, Fen Bilimleri, No: 086.
- Kim, S., Cheol, K., Yoo, S.S., Oh, Y., 2002, Isolation and characteristics of *Trichoderma harzianum* FJ1 producing cellulases and xylanase, J. Microbiol. Biotechnol., 13(1), p.1-8.
- Kitamoto, Y., Kono, R., Shirnotori, M., Ichikawa, Y., 1987, Purification and some properties of an exo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma barxianam*, Agric Biol Chem 51, p.3385-3386.
- Kleifeld, O., Chet, I., 1992, *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth response, Plant and Soil, Vol.144(2), p.267–272.
- Kotasthane, A., Agrawal, T., Kushwah, R., Rahatkar, O.V., 2015, In-vitro antagonism of *Trichoderma* spp. against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* and their response towards growth of cucumber, bottle gourd and bitter melon, Eur J Plant Pathol, 141, p.523–543.
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F., Nagy, E., 2003, Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential, Food Technol. Biotechnol. 41(1), p.37–42.
- Kubicek, C.P., 2013, Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*, Journal of Biotechnology, 163, p.133– 142.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kuduğ, H., 2013, Mikrobiyal kaynaklı selüloz enziminin *E. coli*'de rekombinant olarak üretilmesi, Yüksek lisans tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 92 s. (yayımlanmış).
- Kuhad, R.C., Gupta, R., Singh, A., 2011, Microbial cellulases and their industrial applications, *Enzyme Research*.
- Kumar, D., Ashfaq, M., Muthukumar, M., Singh, M., Garg N., 2012, Production and characterization of carboxymethyl cellulase from *Paenibacillus polymyxa* using mango peel as substrate, *J. Environ. Biol.*, 33, p.81-84.
- Küçük, Ç., Kıvanç, M., 2004, In vitro antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*, *Turk J Biol.*, 28, s.111-115.
- Küçük, Ç., Güler, İ., 2009, Bitki gelişimini teşvik eden bazı biyokontrol mikroorganizmalar, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 07-1, s.30-42.
- Liming, X., Xueliang, S., 2004, High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue, *Bioresource Technology*, 91, p.259-262.
- Liu, J., Xia, W., 2006, Purification and characterization of a bifunctional enzyme with chitosanase and cellulase activity from commercial cellulase, *Biochemical Engineering Journal*, 30, p.82–87.
- Lorito, M., Hayes, C.K., Di Pietro, A., Woo, L., Harman, C.E, 1994, Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3-beta-glucosidase and an N-acetylglucosaminidase from *Trichoderma harzianum*, *Plytopathology* 84, p.398-405.
- Lynd, L.R., Cushman, J.H., Nichols, R.J., Wyman, C.E., 1991, Fuel ethanol from cellulosic biomass, *Science*, 251, p.1318- 1323.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., 2002, Pretorius IS: Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66(3), p.506-77.
- Mandel, M., Weber, J., 1969, Exoglucanase activity by microorganisms, *Adv. Chem.* 95, p.391–414.
- Mandels, M., Weber, J., Parizek, R., 1971, Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*, *Applied Microbiology*, Vol. 21, No. I, p.152-154.
- Markovich, N.A., Kononova, G.L., 2002, Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: A review, *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 39, No. 4, p.341–351.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Montealegre, J., Valderrama, L., Sánchez, S., Herrera, R., Besoain, X., Pérez, L.M., 2010, Biological control of *Rhizoctonia solani* in tomatoes with *Trichoderma harzianum* mutants, *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol.13, No.2.
- Monteiro, V.N., Ulhoa, C.J., 2006, Biochemical characterization of a β -1,3-Glucanase from *Trichoderma koningii* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*, *Current Microbiology*, Vol. 52, p.92–96.
- Naika, G.S., Kaul, P., Prakash, V., 2007, Purification and characterization of a new endoglucanase from *Aspergillus aculeatus*, *J. Agric. Food Chem.*, 55, p.7566- 7572.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005, *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Palma Yayıncılık.
- Ng, I., Wu, X., Lu, Y., Yao, C., 2014, *Trichoderma reesei* cellulase complex in hydrolysis of agricultural waste of grapefruit peel and orange peel, *BioResources*, 9(4), p. 6420–6431.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G., 1999, Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application, *Application Microbiology Biotechnology*, 51, p.711-729.
- Noronha, E.F., Kipnis, A., Kipinis A.P.J., Ulhoa, C.J., 2000, Regulation of 36 kDa 1-3 glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*, *FEMS Microbiol Lett.*, 188, p.19-22.
- Noronha, E.F., Ulhoa, C.J., 2000, Characterization of a 29-KDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*, *FEMS Lett* 183, p.119–123.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., 2006, *İnsan Biyokimyası*, Palme Yayınları: 211, ISBN 975-8624-20-2, s.221–222.
- Papavizas, G.C., 1985, *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol, *Ann. Rev. Phytopathol.* 23, p.23–54.
- Parmar, H.J., Bodar, N.P., Lakhani, H.N., Patel, S.V., Umrana, V.V., Hassan, M.M., 2015, Production of lytic enzymes by *Trichoderma* strains during *in vitro* antagonism with *Sclerotium rolfsii*, the causal agent of stem rot of groundnut, *African Journal of Microbiology, Research*, Vol.9(6), p.365-372.
- Pirzadah, T., Garg, S., Singh, J., Vyas, A., Kumar, M., Gaur, N., Bala, M., Rehman, R., Varma, A., Kumar, V., Kumar M., 2014, Characterization of *Actinomycetes* and *Trichoderma* spp. for cellulase production utilizing crude substrates by response surface methodology, *Springer Plus* (3), p.622.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Polanco, R., Pino, C., Besoain, X., Montealegre, J., Pérez, L.M., 2015, Enhanced secretion of biocontrol enzymes by *Trichoderma harzianum* mutant strains in the presence of *Rhizoctonia solani* cell walls, *Ciencia e Investigacion Agraria*, 42(2), p.243-250.
- Queiroga, A.C., Pintado, M.M., Malcata, F.X., 2007, Novel microbial-mediated modifications of wool, *Enzyme and Microbial technology*, 40:6, p.1491-1495.
- Radjacommaré, R., Venkatesan, S., Samiyappan, R., 2010, Biological control of phytopathogenic fungi of vanilla through lytic action of *Trichoderma* species and *Pseudomonas fluorescens*, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, Vol. 43, No. 1, p.1–17.
- Réczey, K., Szengyel, Z., Eklund, R., Zacchi, G., 1996, Cellulase production by *T. reesei*, *Bioresource Technology*, Vol.57(1), p.25–30.
- Ridout, C.J., Coley-Smith, J.R., Lynch, J.M., 1986, Enzyme activity and electrophoretic profile of extracellular protein induced in *Trichoderma* spp. by cell walls of *Rhizoctonia solani*, *Journal of General Microbiology*, 132, p.2345-2352.
- Ridout, C.J., Coley-Smith, J.R., Lynch, J.M., 1987, Fractionation of extracellular enzymes from a mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*, *Enzyme Microb. Technol.*, vol.10.
- Rini, C.R., Sulochana, K.K., 2007, Usefulness of *Trichoderma* and *Pseudomonas* against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* infecting tomato, *Journal of Tropical Agriculture*, 45 (1-2), p.21–28.
- Robyt, J.F., White, B.J., 1987, *Biochemical techniques: Theory and practice*, Prospect Heights, p.237–238.
- Saba, H., Vibhash, D., Manisha, M., Prashant, K.S., Farhan, H., Tauseef, A., 2012, *Trichoderma* - a promising plant growth stimulator and biocontrol agent, *Mycosphere*, p.3-4-14.
- Sahebani, N., Hadavi, N., 2008, Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*, *Soil Biology & Biochemistry*, 40, p.2016–2020.
- Sandhu, D.K., Kalra, M.K., 1982, Production of cellulase, xylanase and pectinase by *Trichoderma longibrachiatum* on different substrates, *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 79(3), p.409-413.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Saravanakumar, K., Fan, L., Fu, K., Yu, C., Wang, M., Xia, H., Sun, J., Li, Y., Chen, J., 2016, Cellulase from *Trichoderma harzianum* interacts with roots and triggers induced systemic resistance to foliar disease in maize, Scientific Reports, 6(35543), p.1–18.
- Schuster, A., Schmoll, M., 2010, Biology and biotechnology of *Trichoderma*, Appl Microbiol Biotechnol, 87, p.787–799.
- Shakeri, J., Foster, H.A., 2007, Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects, Enzyme and Microbial Technology, 40, p.961–968.
- Shalini, S., Kotasthane, A.S., 2007, Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp., Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 6(8), p.2272-2281.
- Shanmugapriya, K., Saravana, P.S., Krishnapriya, Manoharan, M., Mythili, A., Joseph, S., 2012, Isolation, screening and partial purification of cellulase from cellulase producing bacteria, International Journal of Advanced Biotechnology and Research, Vol.3(1), p.509–514.
- Sharada, R., Venkateswarlu, G., Venkateshwar, S., Rao, M.A., 2013, Production of cellulase – a review, International Journal of Pharmaceutical, Chemical And Biological Sciences, 3(4), p.1070-1090.
- Sharma, K., Mishra, A.K., Misra, R.S., 2009, Morphological, biochemical and molecular characterization of *Trichoderma harzianum* isolates for their efficacy as biocontrol agents, J. Phytopathology, 157, p.51–56.
- Shoemaker, S.P., Brown, R.D., Jr., 1978, Characterization of endo-1,4-d-glucanases purified from *Trichoderma viride*, Biochimica et Biophysica Acta, 523, p.147-161.
- Shweta, A., 2012., Cellulases of bacterial origin and their applications: A review, International Journal of Science and Research, 3, p.1652-1655.
- Sivan, A., Chet, I., 1989, Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*, Journal of General Microbiology, 135, p.675-682.
- Sümer, S., 2006, Genel Mikoloji, Nobel Yayın No: 962, Fen ve Biyoloji Yayınları Dizisi: 36, s.227.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Şafak, H., 2019, *Haloarcula* sp. ve *Halolamina* sp. suşlarında selüloz enzim aktivitelerinin belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 107 s. (yayımlanmış).
- Şahin, S., Özmen, İ., Bıyık, H.H., 2013, Purification and characterization of endo- β -1,4-glucanase from local isolate *Trichoderma ouoviride*. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, Vol.3, No.2.
- Şahin, S., 2013, *Trichoderma ouoviride*'dan selüloz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 96 s. (yayımlanmamış).
- Taylor, R.E., 1991, Protein immobilization, Fundamentals and applications, Marcel Dekker Inc., 377.
- Topuz, U., Eren Kıran, Ö., Çömlekçiöğlü, U., 2007, Selüloz üreticisi *Bacillus* suşlarının enzimatik özelliklerinin araştırılması, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 10(2).
- Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., Valéro, J.R., 2007, Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control, Biochemical Engineering Journal 37, p.1–20.
- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E.L., Lorito, M., Sivasithamparam, K., 2006, Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens, Applied Microbiology, Vol.43(2), p.143–148.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M., 2008, *Trichoderma*-plant-pathogen interactions, Soil Biology & Biochemistry, 40, p.1–10.
- Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L., Chet, I., 2002, Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens, Antonie van Leeuwenhoek 81, p.549–556.
- Williamson, G., Belshaw, N.J., Williamson, M.P., 1992, O-glycosylation in *Aspergillus* glucoamylase conformation and role in binding, Biochemical Journal, 287(2), p.423–428.
- Witkowska, D., Maj, A., 2002, Production of lytic enzymes by *Trichoderma* spp. and their effect on the growth of phytopathogenic fungi, Folia Microbiol, 47(3), p.279–282.
- Wolfenden, R., Snider, M.J., 2001, The depth of chemical time and the powder of enzyme as catalysts. Accounts of Chemical Research, 34(12), p.938–945.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yachmenev, V.G., Bertoniere, N.R., Blanchard, E.J., 2002, Intensification of the bio-processing of cotton textiles by combined enzyme/ultrasound treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 77:5, p.559-567.
- Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y., Chet, I., 2003, Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins, *Plant Microbiology*, p.7343–7353.
- Yıldız, S., 2007, Enzimler, Fakülte Kitabevi Yayınları: 80, Mühendislik Dizisi: 1, s.183, 185–187.

EK AÇIKLAMALAR

Sayfa

Ek Açıklama-A: Çalışmada kullanılan cihazlar, markaları ve kullanım amaçları...64	
Ek Açıklama-B: Çalışmada kullanılan çözeltiler ve içerikleri.....65	

Ek Açıklama-A: Çalışmada kullanılan cihazlar, markaları ve kullanım amaçları

Cihaz	Cihazın Markası	Kullanım Amacı
Hassas terazi	Radwag, AS 220/C/2	Kimyasalların tartımında kullanılmıştır.
Manyetik karıştırıcı	MTOPS, MS300HS	Çözeltilerin karıştırılmasında kullanılmıştır.
pH metre	Hanna, HI2211	Çözeltilerin pH ayarlamasında kullanılmıştır.
Otoklav	ALP, CLC 32L	Besiyerinin ve çözeltilerin sterilizasyonunda kullanılmıştır.
Etüv	Binder, ED53	Fungus örneklerinin muhafaza edilmesinde kullanılmıştır.
Steril kabin	ARMA	Besiyerinin dökülmesi ve fungus örneklerinin inokülasyonunda kullanılmıştır.
Saf su cihazı	Millipore, TANK-PE-030	Çalışma boyunca ihtiyaç duyulan saf suyun temin edilmesinde kullanılmıştır.
Çalkalamalı inkübatör	Thermo Scientific, MAXQ 4450	İnokülasyon yapılan besiyerinin inkübasyonunda kullanılmıştır.
Soğutmalı santrifüj	Hermle, Z 326 K	Besiyeri içerisindeki misellerin çöktürülmesinde kullanılmıştır.
Vorteks	Vortex, Genie 2	Homojen dağılımı istenen maddelerin karışmasında kullanılmıştır.
Su banyosu	JSR, JSEB-22T	Enzim aktivitesinin belirlenebilmesi için örneklerin inkübasyonunu sağlamıştır.
Buz makinesi	Genbiotek, H-IMS-50	Kaynatılan örneklerin soğutulması buz içerisinde yapılmıştır.
UV-VIS spektrofotometre	Shimadzu, UV-1208	Örneklerin farklı absorbanstardaki değerlerinin ölçümünde kullanılmıştır.
Elektroforez	Thermo Scientific, Owl p82	SDS-PAGE işlemi sırasında kullanılmıştır.
Çalkalayıcı	Shaker Jeitech, OS-3000	Elektroforez işlemi biten jelin ilgili çözelti içinde tutulmasında kullanılmıştır.

Ek Açıklama-B: Çalışmada kullanılan çözeltiler ve içerikleri

Çözelti	Miktar ve İçerik
0,05 M sitrat tampon çözeltisi (pH 5,0)	0,17 g Na-sitrat 0,49 g sitrik asit dH ₂ O
%1 (w/v) CMC	100 ml 0,05 M sitrat tamponu (pH 5,0) 1 g CMC
%0,2 (w/v) glukoz standart çözeltisi	2 mg glukoz dH ₂ O
DNS renk reaktifi	1,06 g 3,5-Dinitrosalisilik asit 1,98 g NaOH 30,6 g Na-K tartarat 0,76 ml sıvı fenol 0,83 g Na metabisülfat dH ₂ O
Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi	100 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 50 ml %95'lik etanol 100 ml %85'lik H ₃ PO ₄ dH ₂ O
1 M Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 6,8)	30,27 g Tris 1 M HCl dH ₂ O
1 M Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 8,8)	30,27 g Tris 1 M HCl dH ₂ O
%30 Akrilamid - % 0,8 BIS	30 g Akrilamid 0,8 g BIS dH ₂ O
%5'lik TEMED	0,75 ml TEMED dH ₂ O
%1,5'lik Amonyum Persülfat	0,225 g Amonyum persülfat dH ₂ O
%10'luk SDS	1,5 g SDS dH ₂ O
%0,04'lük Bromtimol mavisi	0,08 g Bromtimol mavisi 12,8 ml 0,01 M NaOH dH ₂ O
Numune tamponu	1,5 ml %10'luk SDS 1,5 ml %100'lük gliserin 1,5 ml %0,1'lik Bromtimol mavisi 0,75 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,8) dH ₂ O
Jel yürütme tamponu (pH 8,3)	3,02 g Tris 15,02 g glisin %10'luk SDS dH ₂ O

Ek Açıklama-B: Çalışmada kullanılan çözeltiler ve içerikleri (devam)

Çözelti	Miktar ve İçerik
Sabitleştirici çözelti	%10 oranında TCA %50 oranında izopropanol %40 oranında dH ₂ O
Boyama çözeltisi	10 ml asetik asit 50 ml metanol 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 dH ₂ O
Yıkama çözeltisi	10 ml asetik asit 50 ml metanol dH ₂ O