

Antagonist *Clonostachys rosea* İzolatının Farklı Ph Koşullarında Miselial Kitle Gelişimi

Fatih ÖLMEZ^{1*}, Şahimerdan TÜRKÖLMEZ²

¹Sivas Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknoloji Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Sivas

²GAP Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Şanlıurfa

*Sorumlu Yazar: fatih.olmez@sivas.edu.tr

Geliş Tarihi: 05.09.2023 Düzeltme Geliş Tarihi: 14.10.2023 Kabul Tarihi: 01.11.2023

ÖZ

Biyopestisitler, bitki hastalık ve zararlılarıyla mücadelede, biyoloji mücadelenin en popüler unsurlarındandır. *Clonostachys rosae* birçok bitki patojeni fungusu karşı etki gösterebilen mikoparazit bir fungustur. Biyolojik mücadele ajanlarının yaygın kullanımlarının önündeki en büyük engel, belli bir standartta kitlesel olarak üretilmelerinde karşılaşılan zorluklardır. Katı besi yerlerinde geliştirme, elde edilen ürün miktarının nispeten az olması ve son kullanıma uygun ürün eldesinin zor olması gibi olumsuzluklar içermektedir. Bu çalışma kapsamında antagonist fungus *C. rosea*'nin sıvı kültürde, farklı pH koşullarındaki miselyal kitle gelişimi incelenmiştir. Patates Dekstroz Broth sıvı ortamının pH'sı 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7 ve 8'e ayarlanmış ve 121 °C'de 20 dakika sterilize edilerek 0.5 mL *C. rosea* spor süspansiyonu çeşitli pH değerlerine sahip 30 mL erlenmeyer şişelerine aşılanmıştır. Hazırlanan kültürler 25 ° C 'de 8 gün çalkalayıcılı inkübatörde 50-100 rpm'de inkübe edilmiştir. Antagonist *C. rosea* izolatının miselyal gelişimi için yapılan çalışmalar sonucunda *C. rosea*'nin 1.5-3.5 pH değerleri arasında gelişim göstermediği, en iyi geliştiği ve en fazla miselyal kitle oluşturduğu optimum pH derecesinin hem yaş ve hem de kuru ağırlıkta pH 6.5 seviyesinde olduğu belirlenmiştir. Elde edilen verilerin *C.rosea*'nın kitlesel üretimine katkı sunması beklenmektedir.

Anahtar kelimeler: Fungus, *Clonostachys rosea*, biyolojik mücadele, antagonist

Mycelial Mass Development of Antagonist *Clonostachys rosea* Isolate in Different pH Conditions

ABSTRACT

Biopesticides are one of the most popular elements of the fight against plant diseases and pests, biology. *Clonostachys rosae* is a mycoparasitic fungus that can act against many plant pathogenic fungi. The main obstacle to the widespread use of biological control agents is the difficulties encountered in mass production to a certain standard. Developing in solid media has disadvantages such as the relatively low amount of product obtained and the difficulty of obtaining products suitable for end use. In this study, mycelial mass growth of the antagonist fungus *C. rosea* in liquid culture at different pH conditions was investigated. The pH of the potato dextrose broth liquid medium was adjusted to 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7 and 8 and sterilized at 121 °C for 20 minutes. Then, 0.5 mL *C. rosea* spore suspension with 1×10^6 spores mL⁻¹ was added to 30 mL Erlenmeyer flasks with various pH values and incubated in a shaker incubator at 50-100 rpm for 8 days at 25 °C. As a result of the studies carried out for the mycelial growth of the antagonist *C. rosea* isolate, it was determined that the optimum pH level where it developed best and formed the most mycelial mass, has been determined as pH 6.5 for both wet and dry weight. In addition, *C. rosea* did not develop between 1.5-3.5 pH values. The data obtained are expected to contribute to the mass production of *C. rosea*.

Key words: Fungi, antagonist, *Clonostachys rosea*, mass production, biological control.

GİRİŞ

Hızla artan dünya nüfusunun bu yüzyılın ortalarında yaklaşık 9 milyar kişiyle zirveye ulaşacağı ve 2050 yılında yaklaşık 10 milyarı bulabileceği tahmin edilmektedir (FAO, 2023). Bu durum, sağlıklı gıdaya olan talebin her geçen gün artacağı anlamına gelmektedir. Dünyada tarıma elverişli üretim alanlarının azalması, iklim değişikliği ve bitkisel üretimi sınırlayan zararlı organizmaların olumsuz etkilerinin artması gibi riskler sürdürülebilir bitkisel üretimi tehdit etmektedir. Bu nedenle bitkisel üretimin her aşamasında önemli ekonomik kayıplara neden olan zararlı organizmaların uygun metotlarla önlenmesi çok büyük önem arz etmektedir. Verim kayıplarına neden olan hastalık ve zararlılara karşı, en sık başvurulan yöntem, uygulama kolaylığı ve kısa sürede etkili sonuçlar alınması nedeni ile kimyasal mücadeledir (Anonim, 2018; Godfray ve ark., 2010). Kimyasalların tarım alanlarında sık ve bilinçsizce kullanılması sonucu kalıntı, çevre kirliliği, yer altı sularının kirlenmesi, direnç oluşumu nedeniyle etkisizleşme gibi birçok olumsuzlukları beraberinde getirmektedir (Kotan, 2020). Bu nedenlerle tarımda çok yoğun olarak kullanılan kimyasallara alternatif yeni yöntemlerin mutlaka geliştirilmesi gerektiği ve bunun sürdürülebilir bir tarım için zorunlu olduğu kabul edilmektedir (Borkar, 2015; Kotan, 2020). Bu kapsamda Entegre Zararlı Yönetimi (Integrated Pest Management- IPM) olarak da adlandırılan ve kültürel, fiziksel, biyolojik, biyoteknik ve kimyasal mücadele yöntemlerinin eş zamanlı kullanılması yoluyla pestisit miktarını azaltmaya yönelik geliştirilen yaklaşım, tarımın sürdürülebilirliği açısından önemlidir. Bir zararlı/hastalığın başka bir organizma ile mücadelesi anlamına gelen biyolojik mücadele yaklaşımı, IPM uygulamaları içinde önemli bir yer tutmaktadır. Bu kapsamda hastalık etmeni mikroorganizmalar ile mücadelede, bakteri, fungus ve virüsler gibi çok farklı biyolojik gruplardan mikroorganizmalar başarı ile kullanılmaktadır (Avan ve Kotan, 2021). Bu amaçla kullanılan fungal gruplar içerisinde *Trichoderma* spp., *Clonostachys* spp., *Coniothyrium* spp., *Stachybotrys* spp. ve *Phoma* spp., cinsi funguslar bitki patojenlerine karşı biyolojik mücadelede en yaygın olarak bilinen ve kullanılanlardır (Park ve ark., 2019; Sun ve ark., 2018). Fungus aleminde Ascomycota şubesinde yer alan *Clonostachys rosea* türü (synonym: *Gliocladium roseum*) ilk olarak Bainier (1907) tarafından tanımlanmıştır. Biyolojik mücadele, biyodegradasyon, biyotransformasyon, biyolojik enerji kaynakları, fermantasyon özelliği gösteren mikoparazit bir türdür (Sun ve ark., 2020). Schroers ve ark. (1999), *G. roseum*'un morfolojisi, ekolojisi, eşeyli üreme biyolojisi ve DNA dizisi verilerinin diğer *Gliocladium* türlerinden oldukça farklı olduğunu bulmuş ve bu nedenle *G. roseum*'u *C. rosea* olarak yeniden sınıflandırmıştır. Antagonist özelliği gösteren *C. rosea*, yaşam döngüsü boyunca konidi ve klamidospore olarak iki farklı spor türü üretir. Konidi yapıları $2.9 \pm 0.3 \times 1.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$, klamidosporeler ise $5.8 \pm 0.4 \times 5.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$ boyutundadır (Sun ve ark., 2018). *C. rosea* kolonilerinin renkleri farklı koşullar altında değişiklik gösterdiği, koloniler daha koyu renkli bir ortamda grimsi beyazdır, ancak patates dekstroz agar ortamında daha açık sarıdan turuncuya döndüğü bildirilmiştir (Schroers ve ark., 1999). Antifungal, antibakteriyel ve antinematodidal özelliklere sahip mikoparazitik fungus *C. rosea*, bol miktarda toprak saprofitini izole edebileceğimiz çeşitli ekosistemler ve kaynaklar vardır (Badaluddin ve ark., 2018). Ayrıca bitkilerin farklı dokularında endofitik yetenek sergilediği bildirilmiştir (Wang, 2012). İzolatlar sıklıkla toprak olmakla birlikte arpa, soğan, çilek, gül ve kakao gibi farklı bitki türlerinin kök, yaprak ve çiçek kısımlarından izole edilmiştir (Muvea ve ark., 2014; Sun, Sun ve Li, 2015a, 2015b). Bu tür *Alternaria dauci*, *A. radicina*, *Botrytis cinerea*, *B. aclada*, *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera teres*, *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *Helminthosporium solani*, *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia solani*, *Rhynchosporium commune* ve *Sclerotinia sclerotiorum* gibi birçok patojene karşı biyolojik mücadele etmeni olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (Çevik ve ark., 2022; Jensen ve ark., 2004; Jensen, Cusini ve Gomberg, 2016; Kosawang ve ark., 2014; Krauss ve Soberanis, 2001; Lysøe, Dees ve Brurberg, 2017; Samsudin ve ark., 2017; Schöneberg ve ark., 2015; Sun, Sun ve Li, 2015a, 2015b; Yohalem ve ark., 2004). Ayrıca *C. rosea*, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus*, *Heterodera* ve *Helicotylenchus* cinsi nematodlara; *Oncometopia tucumana*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*, *Thrips tabaci* ve *Varroa destructor* gibi zararlı böceklerle karşı biyo pestisit etkisi göstermektedir (Hamiduzzaman ve ark., 2012; Muvea ve ark., 2014; Rodriguez ve ark., 2015). Farklı *C. rosea* izolatlarının, biyolojik mücadele amacıyla, biyofungusit olarak ruhsatlandırıldığı bildirilmiştir (Pasqualetti ve ark., 2019; Rodriguez-Martínez ve ark., 2018; Rybczyńska-Tkaczyk ve Kornikowicz-Kowalska, 2018). Bir biyolojik mücadele etmeni olarak *C. rosea*'nın kullandığı temel mekanizmalar: hücre duvarı parçalayıcı enzimlerin (Cell Wall Degrading Enzymes CWDE) salınması, antibiyotikler ve toksinler dahil olmak üzere bazı sekonder metabolitlerin üretilmesi ve bitki savunma mekanizmalarının tetiklenmesidir (Chatterton ve Punja, 2009; Fatema ve ark., 2018). *Clonostachys rosae* endofitik özelliği nedeniyle patojenlerin dokuya giriş yaptığı noktalara yakın yerlerde bulunduğu bildirilmektedir (Saraiva ve ark., 2015). Bazı durumlarda uyarılmış bitki savunma (Induced Systemic Resistance-ISR) tepkilere neden olur (Kamou ve ark., 2020; Wang ve ark., 2019) ve uyarılmış sistemik direncini arttırmaktadır (Lahoz ve ark., 2004).

Yapılan çalışmalar *C. rosea*'nın hastalık, böcek, nematod gibi çok farklı bitki patojeni unsurlar üzerindeki etkileri nedeniyle, entegre mücadele programlarında etkin bir biyolojik mücadele ajanı olarak kullanım potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak biyolojik mücadele etmenlerinin geniş alanlarda kullanımının önündeki en büyük engel, belli bir standartta kitlesel üretimlerinin zorluğudur. Bu nedenle, *C. rosea*'nın kitlesel üretimine temel teşkil edecek parametrelerin ortaya konulması büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada antagonist, mikoparazit *C. rosea* izolatının, sıvı besi yerinde farklı pH koşullarında miselial kitle gelişiminin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Bu çalışmanın materyalini Şanlıurfa Bozova İlçesinde Antep fıstığı (*Pistacia vera*) konukçusundan elde edilen *C. rosea* (CR9063) fungal izolatu ve Patates Dekstroz Agar (Himedia, Hindistan) ve Patates Dekstroz Broth (PDB) besi yeri (Himedia, Hindistan), sterilizasyon için kullanılan otoklav, spor sayımında kullanılan hemositometre, soğutmalı çalkalayıcı inkübatör, etüv, pH metre, çeşitli cam malzemeler, petri kapları, pH ayarlanmasında kullanılan hidroklorik asit ve sodyum hidroksit gibi kimyasallar ile diğer laboratuvar alet ve ekipmanlar oluşturmuştur.

Metot

İnokulum Üretimi

Bu amaçla -20 °C'de, eğik agar'da/vialerde muhafaza edilen *C. rosea* stok kültüründen steril koşullarda alınan agar parçası, spor üretimi için PDA besi ortamı içeren 9 cm'lik petrilere transfer edilmiştir. Hazırlanan kültür ortamları, 6 gün boyunca 25 °C'de 8 saat karanlık 16 saat aydınlık ortam koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra petrilere, steril fırça yardımıyla sporların steril saf suya geçmesi sağlanmış ve elde edilen süspansiyon miselial parçaların elimine edilmesi için üç katlı steril tülbent kullanılarak süzülmüştür. Spor konsantrasyonu bir hemositometre ile belirlendikten sonra final konsantrasyon steril saf su ile 10⁷ mL⁻¹e ayarlanmıştır.

Farklı pH koşullarında Antagonist *Clonostachys rosea* izolatının miselial kitle gelişiminin belirlenmesi

Çalışma kapsamında öncelikle *C. rosea*'nın sporülasyonunu Patates Dekstroz Broth sıvı ortamının pH'sı, hidroklorik asit ve sodyum hidroksit ile tam olarak 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7 ve 8'e ayarlanmış ve 121 °C'de 20 dakika sterilize edilmiştir. Daha sonra, bir önceki aşamada hazırlanan, 10⁷ mL⁻¹ yoğunluktaki spor süspansiyonundan alınan 0.5 mL *C. rosea* spor süspansiyonu, çeşitli pH değerlerine sahip 30 mL PDB içeren erlenmayer şişelerine aşılanmıştır. Ardından, 25 °C 'de 8 gün boyunca, çalkalayıcı inkübatörde 50-100 rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, gelişen misellerin hasadı yapılmıştır. Bu amaçla, tülbent yardımı ile besi yerleri süzülüş, elde edilen miseller steril kurutma kağıtlarına alınarak yaş ağırlıklarının tespiti için hassas terazide tartılmıştır. Tartım işlemi yapılan tüm örnekler, 65 °C 'de 48 saat süre ile etüvde kurutulmuştur. Ardından tüm örnekler için kuru ağırlık ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Denemeler, çalışılan her bir karakter için 5 tekerrürlü olarak, tesadüf blokları deneme desenine göre planlanarak uygulanmıştır.

İstatistik Analizi

In vitro çalışmalarında elde edilen farklı pH koşullarındaki yaş ve kuru ağırlık verilerinin varyans analizi (One-way ANOVA) SPSS v 21 paket programı yardımı ile yapılmış ve uygulamalar arasındaki farklılıkları ortaya koyabilmek amacıyla "Tukey Test" çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Çalışma kapsamında, *C. rosea* izolatının, farklı pH seviyelerine ayarlanmış PDB besi yerinde, miselial kitle gelişimi incelenmiştir. Yapılan hassas ölçümlerle denemede kullanılan parametrelere göre fungusun misel gelişim değerleri ortaya konulmuştur (Çizelge 1).

Çizelge 1. Farklı pH koşullarında *C. rosae* izolatının misel gelişim ağırlığı (gram)

pH	Uygulama	1. Tekerrür	2. Tekerrür	3. Tekerrür	4. Tekerrür	5. Tekerrür
1.5	Yaş Ağırlık	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.
	Kuru Ağırlık	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.
2.0	Yaş Ağırlık	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.
	Kuru Ağırlık	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.
2.5	Yaş Ağırlık	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.
	Kuru Ağırlık	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.
3.0	Yaş Ağırlık	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.
	Kuru Ağırlık	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.
3.5	Yaş Ağırlık	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.
	Kuru Ağırlık	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.	g.y.
4.0	Yaş Ağırlık	3,95	3,90	3,93	3,79	3,86
	Kuru Ağırlık	0,80	0,76	0,70	0,67	0,71
5.5	Yaş Ağırlık	3,94	3,68	3,25	3,37	3,44
	Kuru Ağırlık	1,60	1,65	1,68	1,49	1,58
6.5	Yaş Ağırlık	4,83	4,91	4,85	4,94	4,87
	Kuru Ağırlık	1,25	1,29	1,34	1,4	1,19
7.0	Yaş Ağırlık	5,07	5,1	4,92	4,86	5,02
	Kuru Ağırlık	2,5	2,6	2,57	2,63	2,61
8.0	Yaş Ağırlık	5,29	5,32	5,35	5,2	5,2
	Kuru Ağırlık	2,1	1,9	2,07	2,03	2,04

g.y= gelişim yok

Elde edilen verilere SPSS programı yardımı ile ANOVA analizleri yapılmış ve uygulamalar arasında fark olup olmadığı istatistiki olarak test edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 2 ve 3'de verilmiştir.

Çizelge 2. Farklı pH'larda *C. rosea* izolatının kuru ve yaş ağırlıklarının varyans analizi*

VK	D	S	Yaş Ağırlık KO	F	Kuru Ağırlık KO	F
pH Koşulları		8	29.7264	2766.	5.0089	1960.
Hata	6	3	0.0107	39*	9	89*
Genel Toplam	4	4	-	-	-	-

* $P < 0.01$ düzeyinde önemli; VK: Varyasyon Kaynakları; SD: Serbestlik Derecesi; KO: Kareler Ortalaması; F: F Değeri

Çizelge 3. Farklı pH'larda *C. rosea* izolatının kuru ve yaş ağırlıkları*

pH Koşulları	Yaş Ağırlık Ortalama \pm Sd(g)	Kuru Ağırlık Ortalama \pm Sd(g)
1.5	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d
2	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d
2.5	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d
3.5	0.00 \pm 0.00d	0.00 \pm 0.00d
4	3.34 \pm 0.05c	0.71 \pm 0.07c
5.5	3.75 \pm 0.21b	0.93 \pm 0.13c
6.5	4.99 \pm 0.14a	2.47 \pm 0.19a
7	5.05 \pm 0.05a	2.29 \pm 0.24ab
8	5.04 \pm 0.17a	2.08 \pm 0.08b

*Aynı sütundaki ortalamaları takip eden harfler, ortalamaların istatistiksel olarak önemli derecede farklı olduğunu gösterir (Anova $p < 0.01$, Tukey test)

Çizelge 3 incelendiğinde, fungusun hayatta kalabilmesi için pH 4 seviyelerinin kritik olduğu anlaşılmaktadır. Fungus sadece 4 ve üzeri pH derecelerinde gelişebilmiştir. Fungusun en iyi geliştiği ve en fazla

miseliyal kitle oluşturduğu optimum pH derecesinin, yaş ağırlıkta “a” grubunda yer aldığı 6.5, 7 ve 8 pH seviyesi olduğu ortaya konulmuştur. Kuru ağırlıkta ise en iyi değeri “a” grubunda pH 6.5 değeri vermiş ve bunu sırasıyla “b” grubu pH 8 ve “ab” grubu 7 takip etmiştir. Kuru ve yaş ağırlıkta ise en iyi misel gelişim pH değeri 6.5’dir. Antagonist *C. rosea* izolatının en iyi miseliyal kitle gelişimi pH 6.5, bitkinin besin elementinin topraktan alınımının ve kök gelişiminin en iyi olduğu (Ferrarezi ve ark., 2022) pH 6.0-6.5 arasında yer almaktadır. de Andrade Carvalho ve ark. (2018), *C. rosea*’nın seri üretimini optimize etmiş ve konidia, kurutulmuş biyokütle ve koloni oluşturan birimin veriminin sırasıyla maksimum 1.78×10^7 konidi ml^{-1} , 0.558g ve 5.15×10^6 Colony-forming unit/CFU’ya ulaşabileceğini bildirmiştir. *Clonostachys rosae* konidial gelişimi için sıcaklık, pH, fotoperiyot, karbon:azot oranı ve su aktivitesinin inokulum üretimi üzerindeki etkileri değerlendirdiklerinde pH ve fotoperiyot konidial üretime önemli bir katkıda bulunan faktör olmuşturlar. *Clonostachys rosae*’nın sıvı fermentasyon işleminde Tezgah üstü biyolojik reaktör (New Brunswick™ BioFlo/CelliGen® 115, Eppendorf®, New Brunswick, NY, United States) ve M3 ortamı (50:1 C:N (Karbon:Azot oranı), 36 g karbon/L, pH 6,0, inokulum yoğunluğu 5×10^6 spor/mL, %9.1 (a/h) dekstroz monohidrat ve %0.84 (a/h) soya fasulyesi küspesi kullanılarak konidial gelişim performansı test edilmiştir (Mascarin ve ark., 2022). *Clonostachys rosae*’nın konidial gelişim düzeyi, bizim çalışmamızda en iyi gelişme etkinliği gösteren pH 6.5 ‘a yakın bir değer olan, pH 6.0 olarak belirlenmiştir. Sun ve ark. (2014), fermantasyon sırasında ortam bileşiminin ve yetiştirme koşullarının *C. rosea*’nın konidi ve klamidospore verimi üzerindeki etkisini incelemiştir. Sıvı içinde hazırlanan tohum kültürü fermantasyon ortamına aktararak ardından besi yerine bakır sülfat (CuSO_4) iyonlarının eklenmesiyle *C. rosea*’daki klamidospore oranını artırılabilirliğini bildirmiştir. Araştırmacı, geleneksel koşullar altında klamidospore üretmesi zor olan *C. rosea* 67-1 izolatının, patates dekstroz ve pirinç unu besi yerlerindeki, dayanıklı spor yapılarının oluşum oranının, 8 günlük inkübasyonun ardından, sırasıyla %17.4 ve %15.5 oranında arttığını ifade etmiştir. Ortam pH’sının 67-1 sporülasyonunda hayati bir rol oynadığını belirlemiştir. Araştırmacılar, ortamdaki klamidosporelerin yüzdesinin, artan pH ile hızla azaldığını (pH 3.0’da %88.1 ile pH 6.5’te %1.0) bildirmişlerdir. Konidi üretimi için optimum pH’yı 6.0-6.5 olarak belirlerken ve bu değerde *C. rosea* 67-1 izolatının klamidospore oluşumunun güçlü bir şekilde engellendiğini bildirilmişlerdir. *C. rosea* izolatının miseliyal kitle gelişiminin belirlenmesinde konidi üretimi için optimum pH 6.0-6.5 bu çalışma ile aynı sonucu desteklemektedir. Pasqualetti ve ark. (2019), bir deniz sularından elde ettikleri *C. rosea*’nın IG119 izolatının, farklı pH (3-12 arası) ve tuzluluk (%0-40) kombinasyonlarında büyüme ve kitinolitik enzim aktivitesini araştırmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında pH 6.4 ve 0% tuzlulukta maksimum enzim aktivitesi (411.137 IU/L) tespit etmiş; ancak farklı pH aralığında (pH 4.5-8.5) da oldukça yüksek üretim (>390 IU/L) gerçekleştiğini ifade etmişlerdir. Pasqualetti ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada, deniz suyu kökenli *C. rosea* izolatının, genel olarak pH 8 seviyesinde optimum gelişme gösterdiği, bizim çalışmamızda kullanılan toprak kökenli *C. rosea* izolatının da pH 6.5’ te en iyi gelişim değerine sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bu durumun izolatların doğal yaşam alanlarına adaptasyondan kaynaklandığı düşünülebilir. Nitekim Pasqualetti ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada kullanılan izolatın tuzlu deniz suyunda yaşamaya adapte olmuş olması, pH 8 seviyelerinde optimum gelişme göstermesini açıklayabilir. Bir biyolojik mücadele ajanı olarak *C. rosea*’nın hastalık etmenlerine karşı geniş ölçekte kullanımının önündeki en büyük engel, fungusun yeterli miktarda kitlesel üretimidir. Bu çalışma kapsamında farklı pH koşullarında, sıvı besi yerinde, topraktan izole edilen bir *C. rosea* izolatının miseliyal kitle üretme potansiyeli araştırılmıştır. Çalışma sonunda optimum pH olarak belirlenen pH 6.5 seviyelerinin, bitkilerin yetiştirilmesi ve besin elementlerini sorunsuz olarak, maksimum düzeyde alabildikleri toprak pH seviyesi olduğu bilinmektedir (Ferrarezi ve ark., 2022). *Clonostachys rosea* gibi biyo-pestisit veya biyo-fertilizer biyolojik gübre olarak kullanılabilir antogonist mikroorganizmaların büyük ölçekli üretimlerinin yapılabilmesi ve ticarileştirilebilmesi için fungusun gelişiminde farklı sıcaklık, pH, su aktivitesi seviyeleri, uygun dolgu maddesi vb. etkenlerin etkilerinin belirlenmesi çalışmalarının tamamlanması gerekmektedir. PH’dan sonra diğer gelişim faktörleriyle birlikte denemeler yapılarak optimal gelişim koşullarının belirlenmesine yönelik çalışmaların fungal kitle üretimine önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, antagonist *C. rosea* izolatının miseliyal gelişimi için yapılan çalışmada *C. rosea*’nın 1,5-3,5 pH değerleri arasında gelişim göstermediği, en iyi geliştiği ve en fazla miseliyal kitle oluşturduğu optimum pH derecesinin hem yaş ve hem de kuru ağırlıkta pH 6.5 seviyesinde olduğu belirlenmiştir. Elde edilen verilerin *C. rosea*’nın kitlesel üretimine katkı sunması beklenmektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı: Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

YAZAR ORCID NUMARALARI

Fatih ÖLMEZ  <http://orcid.org/0000-0001-7016-2708>

Şahimerdan TÜRKÖLMEZ  <http://orcid.org/0000-0001-8775-5470>

KAYNAKLAR

- Anonim. 2018. *Kimyasal Mücadele. Tarım ve Orman Bakanlığı.*
- Avan, M. ve Kotan, R. 2021. Fungusların mikrobiyal gübre veya biyopestisit olarak tarımda kullanılması. *Uluslararası Doğu Anadolu Fen Mühendislik ve Tasarım Dergisi*, 3: 167-191.
- Badaluddin, N. A., Jamaluddin, S. N. T., Ihsam, N. S., Sajili, M. H., Khalit, S. I. ve Mohamed, N. A. 2018. Molecular identification of isolated fungi from Kelantan and Terengganu using internal transcriber spacer (ITS) region. *Journal of Agrobiotechnology*, 9: 222-231.
- Bainier, G. 1907. Mycothèque de l'école de Pharmacie. XI. Paecilomyces, genre nouveau de Mucédinées. *Bulletin Trimestrielle de la Societe de Mycologie Française*, 23: 26-27.
- Borkar, S.G., 2015, *Microbes as Biofertilizers and Their Production Technology*, Woodhead Publishing India Pvt. Ltd., 218p.
- Çevik, R., Demir, S., Türkölmez, Ş. ve Boyno, G. 2022. The effect of *Clonostachys rosea* (sch.) schroers and samuels against verticillium wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.) and early blight [*Alternaria solani* (Ell. and G. Martin) Sor.] diseases in tomato plants. *Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences*, 32: 372-382.
- Chatterton, S. ve Punja, Z. K. 2009. Chitinase and β -1, 3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. *Canadian journal of microbiology*, 55: 356-367.
- de Andrade Carvalho, A. L., de Rezende, L. C., Costa, L. B., de Almeida Halfeld-Vieira, B., Pinto, Z. V., Morandi, M. A. B., de Medeiros, F. H. V. ve Bettiol, W. 2018. Optimizing the mass production of *Clonostachys rosea* by liquid-state fermentation. *Biological control*, 118: 16-25.
- Food and Agriculture Organization of the United States (FAO), www.faostat.org (Erişim tarihi: 04.10.2023).
- Fatema, U., Broberg, A., Jensen, D. F., Karlsson, M. ve Dubey, M. 2018. Functional analysis of polyketide synthase genes in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea*. *Scientific Reports*, 8: 15009.
- Ferrarezi, R. S., Lin, X., Gonzalez Neira, A. C., Tabay Zambon, F., Hu, H., Wang, X., Huang, J.-H. ve Fan, G. 2022. Substrate pH influences the nutrient absorption and rhizosphere microbiome of Huanglongbing-affected grapefruit plants. *Frontiers in Plant Science*, 13: 856937.
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M. ve Toulmin, C. 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *science*, 327: 812-818.
- Hamiduzzaman, M. M., Sinia, A., Guzman-Novoa, E. ve Goodwin, P. H. 2012. Entomopathogenic fungi as potential biocontrol agents of the ecto-parasitic mite, *Varroa destructor*, and their effect on the immune response of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of invertebrate pathology*, 111: 237-243.
- Jensen, B., Knudsen, I. M., Madsen, M. ve Jensen, D. F. 2004. Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seedborne *Alternaria* spp. *Phytopathology*, 94: 551-560.
- Jensen, J., Cusini, M. ve Gomberg, M. 2016. European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections. In European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections.
- Kamou, N. N., Cazorla, F., Kandylas, G. ve Lagopodi, A. L. 2020. Induction of defense-related genes in tomato plants after treatments with the biocontrol agents *Pseudomonas chlororaphis* ToZa7 and *Clonostachys rosea* IK726. *Archives of microbiology*, 202: 257-267.
- Kosawang, C., Karlsson, M., Véléz, H., Rasmussen, P. H., Collinge, D. B., Jensen, B. ve Jensen, D. F. 2014. Zearalenone detoxification by zearalenone hydrolase is important for the antagonistic ability of *Clonostachys rosea* against mycotoxigenic *Fusarium graminearum*. *Fungal Biology*, 118: 364-373.
- Kotan, R., 2020. *Tarımda Biyolojik Çözümler*. Harman Yayıncılık, İstanbul, ISBN: 978-605-68060-4-9. Haziran 2020. s.158.

- Krauss, U. ve Soberanis, W. 2001. Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. *Biological control*, 22: 149-158.
- Lahoz, E., Contillo, R. ve Porrone, F. 2004. Induction of systemic resistance to *Erysiphe orontii* cast in tobacco by application on roots of an isolate of *Gliocladium roseum* Bainier. *Journal of Phytopathology*, 152: 465-470.
- Lysøe, E., Dees, M. W. ve Brurberg, M. B. 2017. A three-way transcriptomic interaction study of a biocontrol agent (*Clonostachys rosea*), a fungal pathogen (*Helminthosporium solani*), and a potato host (*Solanum tuberosum*). *Molecular plant-microbe interactions*, 30: 646-655.
- Mascarin, G. M., da Silva A. V. R., da Silva, T. P., Kobori, N. N., Morandi, M. A. B ve Bettioli, W. (2022). *Clonostachys rosea*: Production by Submerged Culture and Bioactivity Against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Bemisia tabaci*. *Front. Microbiol.*, 13:851000. doi: 10.3389/fmicb.2022.851000
- Muvea, A. M., Meyhöfer, R., Subramanian, S., Poehling, H.-M., Ekesi, S. ve Maniania, N. K. 2014. Colonization of onions by endophytic fungi and their impacts on the biology of *Thrips tabaci*. *PLoS one*, 9: e108242.
- Park, Y.-H., Mishra, R. C., Yoon, S., Kim, H., Park, C., Seo, S.-T. ve Bae, H. 2019. Endophytic Trichoderma citrinoviride isolated from mountain-cultivated ginseng (*Panax ginseng*) has great potential as a biocontrol agent against ginseng pathogens. *Journal of Ginseng Research*, 43: 408-420.
- Pasqualetti, M., Barghini, P., Giovannini, V. ve Fenice, M. 2019. High production of chitinolytic activity in halophilic conditions by a new marine strain of *Clonostachys rosea*. *Molecules*, 24: 1880.
- Rodríguez, M. A., Rothen, C., Lo, T. E., Cabrera, G. M. ve Godeas, A. M. 2015. Suppressive soil against *Sclerotinia sclerotiorum* as a source of potential biocontrol agents: selection and evaluation of *Clonostachys rosea* BAFC1646. *Biocontrol science and technology*, 25: 1388-1409.
- Rodríguez-Martínez, R., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Marcelino, L., López-Arellano, M. E., Gamboa-Angulo, M., Hanako Rosas-Saito, G., Reyes-Estébanez, M. ve Guadalupe García-Rubio, V. 2018. In vitro lethal activity of the nematophagous fungus *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) against nematodes of five different taxa. *BioMed Research International*, 2018.
- Rybczyńska-Tkaczyk, K. ve Kornikowicz-Kowalska, T. 2018. Activities of Versatile Peroxidase in Cultures of *Clonostachys rosea* f. *catenulata* and *Clonostachys rosea* f. *rosea* during Biotransformation of Alkali Lignin. *Journal of AOAC International*, 101: 1415-1421.
- Samsudin, N. I. P., Rodríguez, A., Medina, A. ve Magan, N. 2017. Efficacy of fungal and bacterial antagonists for controlling growth, FUM1 gene expression and fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* on maize cobs of different ripening stages. *International journal of food microbiology*, 246: 72-79.
- Saraiva, R. M., Czymmek, K. J., Borges, Á. V., Caires, N. P. ve Maffia, L. A. 2015. Confocal microscopy study to understand *Clonostachys rosea* and *Botrytis cinerea* interactions in tomato plants. *Biocontrol science and technology*, 25: 56-71.
- Schöneberg, T., Liebscher, I., Luo, R., Monk, K. R. ve Piao, X. 2015. Tethered agonists: a new mechanism underlying adhesion G protein-coupled receptor activation. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 35: 220-223.
- Schroers, H.-J., Samuels, G. J., Seifert, K. A. ve Gams, W. 1999. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia*, 91: 365-385.
- Sun, M., Chen, Y., Liu, J., Li, S. ve Ma, G. 2014. Effects of culture conditions on spore types of *Clonostachys rosea* 67-1 in submerged fermentation. *Letters in applied microbiology*, 58: 318-324.
- Sun, Z.-B., Li, S.-D., Ren, Q., Xu, J.-L., Lu, X. ve Sun, M.-H. 2020. Biology and applications of *Clonostachys rosea*. *Journal of applied microbiology*, 129: 486-495.
- Sun, Z.-B., Sun, M.-H. ve Li, S.-D. 2015a. Draft genome sequence of mycoparasite *Clonostachys rosea* strain 67-1. *Genome Announcements*, 3: 10.1128/genomea.00546-00515.
- Sun, Z.-B., Sun, M.-H. ve Li, S.-D. 2015b. Identification of mycoparasitism-related genes in *Clonostachys rosea* 67-1 active against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Scientific Reports*, 5: 18169.
- Sun, Z. B., Zhang, J., Sun, M. H. ve Li, S. D. 2018. Identification of genes related to chlamyospore formation in *Clonostachys rosea* 67-1. *MicrobiologyOpen*, 8: e00624.
- Wang, J. 2012. The effect of combining two biological control microbes on seed and root colonization.
- Wang, Q., Chen, X., Chai, X., Xue, D., Zheng, W., Shi, Y. ve Wang, A. 2019. The involvement of jasmonic acid, ethylene, and salicylic acid in the signaling pathway of *Clonostachys rosea*-induced resistance to gray mold disease in tomato. *Phytopathology*, 109: 1102-1114.

Yohalem, D. S., Nielsen, K., Green, H. ve Funck Jensen, D. 2004. Biocontrol agents efficiently inhibit sporulation of *Botrytis aclada* on necrotic leaf tips but spread to adjacent living tissue is not prevented. *FEMS microbiology ecology*, 47: 297-303.