	T.C. İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi **BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ SONUÇ RAPORU FORMU**

Projenin/Çalışmanın Başlığı	Türkiye Kökenli *Trichoderma* spp. İzolatlarının Transkripsiyonel ve Antagonistik analizleri ile Biyopotansiyellerinin Belirlenmesi
Proje No	İYYÜ-BAP-AP-2023-16
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacıların Ünvanı, Adı Soyadı, Fakülte/YO/ Program/ Ana BD	Doç. Dr. Emre Yörük, Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Prof. Dr. Evrim Özkale, Prof. Dr., Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi-Biyoloji Bölümü Araş. Gör. Özlem Sefer, Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Moleküler Biyolog Esma Özsoy, Rektörlük (Teknisyen)
Proje Yürütücüsü GSM No	05325993325
Proje Türü	Normal Kapsamlı Proje
Proje Grubu	(X) Fen ve Mühendislik Bilimleri
Rapor No	Sonuç Raporu
Proje Dönemi	Ocak 2024-Haziran 2024 (Kesin Rapor)

Rapor Hazırlanırken dikkat edilecek hususlar:

- İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen projeler için altı aylık zaman dilimlerinde hazırlanacak SONUÇ raporların yazımında bu rapor formatı değiştirilmeksizin kullanılmalıdır. Tüm kutucuklar içindeki alanlar istenildiği şekilde (toplam sayfa sayısı 20'yi aşmayacak şekilde) uzatılabilir.
- Rapor metni Türkçe dilinde, Calibri yazım karakterinde 11 punto ile iki yana dayalı formatta yazılmalıdır.
- PDF formatına çevrilmiş olan sonuç raporu metni tarafınıza bildirilen proje numarası kodlanarak, **"İYYÜ-BAP-AP-2022-10/sonuçraporu.pdf"** örneğinde olduğu gibi isimlendirilerek sisteme yüklenmelidir.

  https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSdlUF-vf4GlOOuVYvu5g29VKQhlBGJW24nWDiRd6Z5hkRWBQw/viewform

1. DÖNEM İÇİNDE PROJEYLE İLGİLİ BİLİMSEL, TEKNİK, SONUÇ, TARTIŞMA ve İDARİ GELİŞMELER: bilimsel ve teknik gelişmeler kapsamında elde edilen çıktılar yöntemler ve bulgular bir arada aynı alt başlıklar dahilinde yazılacak şekilde aktarılmalıdır. Sonuç ve tartışma verilerek değerlendirme yapılmalıdır. İdari gelişmeler kapsamında yürütücünün önerdiği/uygun gördüğü personel değişikliği, ticari firmalardan malzeme temini süreçleri (faturalama vb.), ek süre talepleri ve benzeri durumlar detaylıca açıklanmalıdır.

1.1 Materyal- Metod

İ.P.1. *Trichoderma* spp morfolojik kontrollerinin yapılması ve doğrusal büyüme oranı analizleri

Ağaç dipleri ve toprak örneklerinden (Manisa) elde edilen materyaller *Trichoderma* spp. izolatlarının saflaştırılmasında kullanıldı (Tablo 1). Fialid uzunlukları, konidyum şekilleri ve dallanma biçimleri kıstaslarına göre tür düzeyinde morfolojik tanılar gerçekleştirildi (Hoyos-Carvajal et al., 2009). Doğrusal üreme oranları Irzykowska ve diğ. (2013) ile Yörük (2018) tarafından temin edilen protokoller takip edilerek 4. ve 7. günlerdeki radyal üreme verilerine göre [mm/gün (cm/gün)] hesaplandı. Üremeler patates dekstroz agar (PDA) besi ortamında 7 gün süre ile 26°C±2°C sıcaklıkta takip edildi. Sıvı kültür eldesi ise karboksimetilselüloz (CMC) besiyeri kullanılarak 7 gün süre ile 23°C±2°C sıcaklıkta 150 rpm hızda çalkalama işlemi ile gerçekleştirildi. İstatistiksel analizler (kolon istatistikleri ve varyans analizleri) Graphpad Prism 9.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *Trichoderma* spp. izolatları ve GenBank'tan alınan aksesyon numaraları

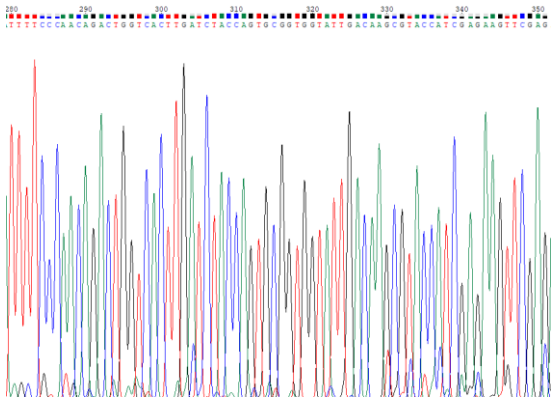
Kod	Tür	Erişim Numarası	Benzerlik Oranı (%)
TR1	*T. atroviride*	OR487466	99%
TR2	*T. atroviride*	OR487467	93%
TR6	*T. atroviride*	OR487468	99%
TR8	*T. atroviride*	OR487469	99%
TR9	*T. atroviride*	OR487470	99%
TR37	*T. harzianum*	OR487473	98%
TR38	*T. harzianum*	OR487474	99%
TR42	*T. harzianum*	OR487475	99%
TR43	*T. harzianum*	OR487476	99%
TR46	*T. harzianum*	OR487477	99%
TR47	*T. harzianum*	OR487478	99%
K9	*T. harzianum*	OR487479	99%
K17	*T. atroviride*	OR487471	99%
K19	*T. koningii*	OR487485	99%
K20	*T. harzianum*	OR487480	99%
K21	*T. harzianum*	OR487481	99%
K22	*T. atroviride*	OR487472	99%
K24	*T. harzianum*	OR487482	99%
K26	*T. brevicompactum*	OR487486	91%
K27	*T. harzianum*	OR487483	99%
K30	*T. harzianum*	OR487484	99%

İP.2 *Trichoderma* spp. İzolatlarının tür düzeyinde *tef1-α* gen sekanslaması ile tanısı

Türe özgü tanı için öncelikli olarak *Trichoderma* izolatlarından gDNA izolasyonu SDS-temelli protokol ile gerçekleştirildi. Niu ve diğ. (2008) ile Yörük ve diğ. (2016) tarafından temin edilen protokoller takip edildi. 50 mg taze miselyumlar 7 günlük kültürlerden temin edildi ve parçalama işlemi dismembranatör kullanılarak gerçekleştirildi (Merck-BeadBugTM, Germany). Lizis, bağlama, yıkama ve elüsyon basamakları protokol bire bir takip edilerek gerçekleştirildi. gDNA kalitatif ve kantitatif analizleri

sırasıyla %1'lik agaroz jel ve spektrofotometrik analizler (Thermo, A.B.D.) ile gerçekleştirildi.

tef1-α geni PCR ile tüm izolatlarda çoğaltıldı. Yaygın *tef1-α* primerleri kullanıldı (O'Donnell ve diğ., 1998). PCR bileşen ve miktarları; 50 ng gDNA, 1X PCR tamponu, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP karışımı, 10 pmol primerler ve 1 U *Taq* DNA polimeraz enzimi (Episozyme, Turkey) olacak şekilde ayarlandı. 94 ºC'de 5 dakikada yapılacak ön denatürasyon işlemini takiben, PCR, 35 siklus ve final uzama ile tamamlandı. 35 döngü; 94ºC'de 30 sn, 57ºC'de 30 sn, 72 ºC'de 45 sn olarak gerçekleştirildi. Son uzama aşaması 72 ºC'de 5 dakikada tamamlandı. PCR bantlarının varlığı %1'lik agaroz jel elektroforezi ile 1 saat 70 Volt sabit akımla UV transliminatör varlığında görüntülendi. Agaroz jelden steril bistüri ucu ile kesilip alınan bantlar ticari kit (Roche, İsviçre) kullanılarak saflaştırıldı. Bu kapsamda firmanın önereceği protokol takip edildi ve saflaştırılan bantlar sekanslamaya tabi tutuldu. Sekanslama süreci Sanger dideoksi terminasyon metoduna dayalı hizmet alımı (Applied biosystems 3100, A.B.D.) ile gerçekleştirildi. Elde edilen sekans sonuçları öncelikli olarak Chromas Lite programı ile sinyal piklerinin kalitesinin değerlendirilmesi anlamında yorumlandı (Şekil 1). Her bir örnek için kaliteli okumalar elde edilmesi ile birlikte BlastN ve ClustalW tekli-çoklu hizalama analizleri gerçekleştirildi. EBI-clustalW programı kullanılarak elde edilen tıraşlama sonucunda genome.jp çoklu hizalama web sitesi aracılığıyla çoklu hizalamalar gerçekleştirildi. *Trichoderma* spp. cinsine ait NCBI veritabanında kayıtlı tüm *TEF1-α* referans sekansları çoklu hizalamaya dahil edildi ve pozitif kalibratör olarak kullanıldı. E değeri < 0.05, bit skoru >50, query coverage > 90% okumalar bilimsel olarak anlamlı kabul edildi. Temel bileşen analizi (PCA), R programlama dili aracılığıyla "readxl", " ape", "phangorn" ve "factoextra" paketleri kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 1 TR1 izolatına ait *tef1-α* gen sekansının kromatogram görüntüsü

İP.3 Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) markırları ile filogenetik analizler

Trichoderma spp. izolatlarının genetik tiplendirmesi ISSR markırlarına dayalı olarak gerçekleştirildi. Bu bağlamda çıpalı ve çıpasız primerler kullanıldı (Tablo 2). ISSR-PCR uygulamasında bileşenler, son derişimleri 100 ng gDNA, 1X tampon, 3 mM $MgCl_2$, 0.4 mM dNTP karışımı, 10 pmol primer, 1 U *Taq* DNA polimeraz enzimi (Episozyme, Turkey) olacak şekilde bir araya getirilecektir. 94 ºC'de 5 dk yapılan ön denatürasyon işlemini takiben PCR iki aşamada gerçekleştirildi. İlk aşamada tüpler 5-7 döngü; 94ºC'de 1 dk, 40ºC'de 1 dk ve 72ºC'de 3 dk muamele edildi. Daha sonraki 35 döngü; 94ºC'de 1 dk, 48 ºC'de 1 dk, 72 ºC'de 2 dk olarak gerçekleştirildi. Son uzama aşaması 72 ºC'de 10 dk tamamlandı. %2'lik agaroz jel elektroforezi 1 saat 30 dakika, 70 V sabit akımda gerçekleştirildi. Ürünler UV transliminatör varlığında fotoğraflandı. Bantların varlığı '1', yokluğu '0' ile skorlandı ve MVSP 3.2 (multi variate statistical package-Kovach) programı kullanılarak Nei ve Li katsayısına (Nei ve Li, 1979) göre genetik çeşitlilik analiz edildi. Ayrıca polimorfizm bilgilendirici içerik (PIC) ve/veya rezolüsyon gücü (RP) değerleri de hesaplandı

(Roldan-Ruiz et al., 2000; Prevost and Wilkinson, 2000; Alkan et al., 2019).

Tablo 2. Çalışmada kullanılan ISSR primerleri ve verileri

Primer	5'-3' Dizi	Bant sayısı	PIC	RIP
UBC866	(ctc)6	13	0.49	12
UBC855	*(ac)8yt*	9	0.48	7.7
UBC867	*(ggc)6*	7	0.493	6.2
UBC872	*(gata)4*	3	0.327	1.2
UBC813	*(ct)8t*	11	0.482	13
UBC825	*(ac)8t*	10	0.489	9.4
AYS6	*(gagg)3gg*	7	0.471	5.3
AYS8	*(gttc)3gt*	9	0.491	10
AYS10	*(cgtg)3cg*	13	0.495	12
UBC828	*(ac)8t*	11	0.499	9.9
	Ortalama		0.47	8.67

İP.4 *Trichoderma* spp. izolatlarının *F. culmorum* üzerindeki mikoparazitik etkilerinin gösterimi

FcUK99 izolatı Türkiye'den elde edilen Trichoderma spp. izolatlarının mikoparazitizm potansiyellerinin gösterimi için kullanıldı. Uçucu organik bileşikler aracılı sandviç tekniği ile Trichoderma spp. izolatlarının F. culmorumüzerindeki potanasiyel üreme baskılayıcı etkileri araştırıldı (Yörük ve diğ., 2022). İkili kültürler 5 gün 26°C±2°C sıcaklıkta PDA besi ortamlarında gelişime bırakıldılar. *F. culmorum*'da gözlemlenen baskılanma % inhibisyon = [(misel çapı kontrol – misel çapı deney) / misel çapı kontrol] x 100 formüle göre değerlendirildi ve aşağıdaki değer aralıklarına göre izolatlar karakterize edildi (Popiel ve diğ., 2008; Błaszczyk ve diğ., 2017):

- Çok etkin, > 19 mm baskılama bölgesi
- Etkin, 13-19 mm baskılama bölgesi
- Kısmen aktif, 10-12 mm baskılama bölgesi
- Etkisiz, <100 mm baskılama bölgesi

İP.5 *Trichoderma* spp.'de mikoparazitizm ilişkili genlerin anlatım analizleri

Sekonder metabolizma ve mikoparazitizm ilişkili nag1 (N-acetylglucosaminidase) tgf-1 (histone acetyltransferase) genleri, bitki koruma metabolizması ilişkili tmk1 (mitogen-activated protein kinase) geni (Brunner et al., 2003; Reithner et al., 2007; Gómez-Rodriguez et al., 2018) hedef genler olarak belirlendi.

Total RNA izolasyonu Trizol bileşiği kullanılarak gerçekleştirildi. 50 mg yaş ağırlıktaki miselyum sıvı azot ile 1 mL monofazik bileşik, steril havan eli ve havanda homojenize edildi. Homojenatlar 1.5 mL'lik mikrotüplere aktarıldı. 25°C'de 5 dakika bekletilen örneklere 0.2 mL kloroform eklendi ve örnekler 10-15 saniye boyunca ters-yüz edildi. Tüpler 25°C'de 3 dakika inkübasyonun ardından 10000 xg'de 4°C'de 15 dakika santrifüj yapıldı. En üst faz yeni bir mikrotüpe aktarıldı. En üst fazın üzerine 0.5 mL izopropanol eklenecek ve örnekler 25°C'de 10 dakika inkübe edildi. 10000 xg'de 4°C'de 10 dakika santrifüj sonrasında süzüntü atıldı. Çökelti %75 etanolde çözündükten sonra, 6000 xg'de 4°C'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Üst sıvı atıldıktan sonra total RNA molekülleri toplam 50 µL hacim içerisinde RNaz

içermeyen distile su ile çözdürüldü. Total RNA'ların kalitatif ve kantitatif analizleri %1'lik agaroz jel elektroforezi ve spektrofotometrik ölçümler ile gerçekleştirildi. cDNA çevriminde kitin önerdiği protokol takip edildi. 500-4000 ng total RNA'dan cDNA çevrimi yapılan örnekler ¼ oranında sulandırılıp sabitlendi ve -20°C'de saklandı.

Gerçek zamanlı PCR uygulamasında *α-aktin* (mikrotübüllerin yapısal bileşenini kodlayan) geni housekeeping gen olarak kullanıldı. Çalışmada kullanılacak olan primerler Tablo 3'teki gibidir. RT-PCR analizleri "SYBR Green I" florofor temelli olarak gerçekleştirildi. Bileşenler; 50 ng cDNA, 5 pmol ileri ve geri primerler, 1X SYBR Green PZR karışımı ve hacim tamamlayıcı olarak distile su içerecek şekilde bir araya getirildi. Ön denatürasyon için örnekler 95 ºC'de 2 dakika bekletilecektir. Çoğaltım, 95 ºC'de 15 saniye, 58 ºC'de 20 saniye, 72 ºC'de 30 saniye bekleme süresinden oluşan 45 siklusta gerçekleştirildi. Devamında 40 ºC'de 30 saniyelik bekleme aşaması ve erime eğrisi sıcaklık taraması uygulandı. Çalışmalar üç biyolojik tekrarlı gerçekleştirildi. Gen anlatım profilleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalizasyon değerlerine göre yorumlandı (Livak ve Schmittgen, 2001).

Tablo 3. Gen anlatım analizlerinde kullanılan primerler ve özellikleri

Primer seti	İleri dizi (5'-3')	Geri dizi (5'-3')	Gen	Bant boyutu (bç)
Act fw / Act Rv	TCACCGAGGCCCCCATCAACC	CGACCGGAAGCGTACAGGGACAGA	*α-actin*	127
Tanag1f / Tanag1r	ACTTTGTGCCATGGAAGCTG	GCACTGATGTTGACCTGTCC	*nag1*	193
Tshaf / Tshar	CGACGCAGATGAACGAGATG	AGAGTTACAGCCAAGCCCAT	*tgf-1.*	250
Tatmk1f / Tatmk1r	CTCCTTCAATGTCAGCGAGC	TCGTGGTTGAAATAGCGCAG	*tmk1*	192

İP.6 *in planta* testler (Ek-Çalışma-1)

F. culmorum'a karşı yüksek mikoparazitik etki gösteren K26 ve düşük etkili K21 izolatları in planta testlerde kullanıldı. *Triticum aestivum* L. cv. Basribey (yaygın kullanıma sahip buğday çeşidi) in planta testlerde konak olarak kullanıldı. *F. culmorum* sıvı kültürleri CMC besi ortamında elde edildi ve steril gazlı bez ile süzülerek $1*10^6$ konsantrasyona sabitlendi. Saksılara otoklavlanmış steril toprak, *F. culmorum* sporları ve buğday tohumları eklendi. Deney setlerinde ise K21 ve K26 izolatları ayrıca eklendi. Toplamda 3 haftalık gelişim sonrası bitkiciklerden taze ağırlık, kuru ağırlık ve sürgün boyları ölçüldü (Gargouri-Kammoun et al., 2009; Moya-Elizondo and Jacobsen 2016; Moradi et al., 2017). İstatistiksel veriler Graphpad Prism 9.0 yazılımı ile gerçekleştirildi.

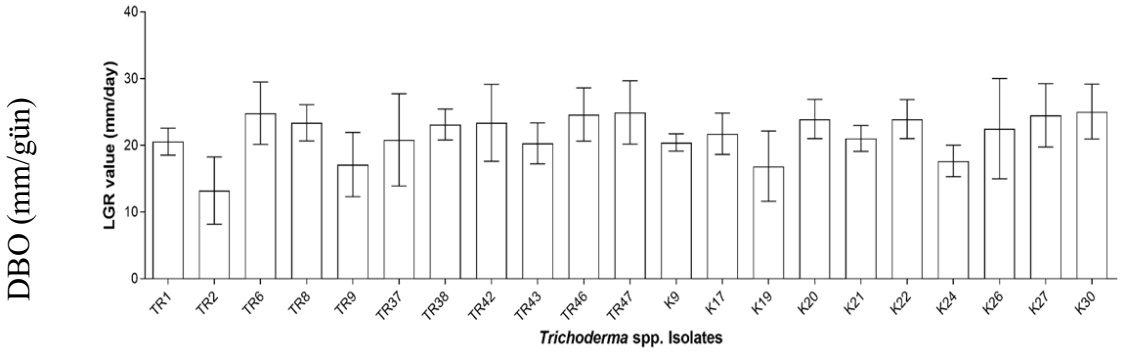
İP.7 Korelasyon matrisi ve temel bileşen analizleri (Ek-Çalışma-2)

Farklı bilimsel testlerden elde edilen verilerin bir arada değerlendirilmesinde 2D ve 3D analizler olarak sırasıyla korelasyon matrisi ve temel bileşen analizleri gerçekleştirildi. Temel bileşen analizleri Graphpad Prism 9.0 yazılımı ile gerçekleştirilirken, PCA ise readxl", "devtools", ggbiplot" paketleri aracılığıyla R yazılım dili ile gerçekleştirildi.

1.2 Bulgular

İP.1 *Trichoderma* spp. Morfolojik analizler

Bitki ve toprak örneklerinden toplamda 21 *Trichoderma* spp. izolatı morfolojik testler sonucunda tanılandı ve elde edildi (bkz. Tablo 1). Dört farklı tür karakterize edildi. Doğrusal büyüme oranları (DBO) değerleri 13.22 ±1.78mm/gün (TR2) ila 25.06±1.45mm/ (K30) arasında saptandı (Şekil 2).

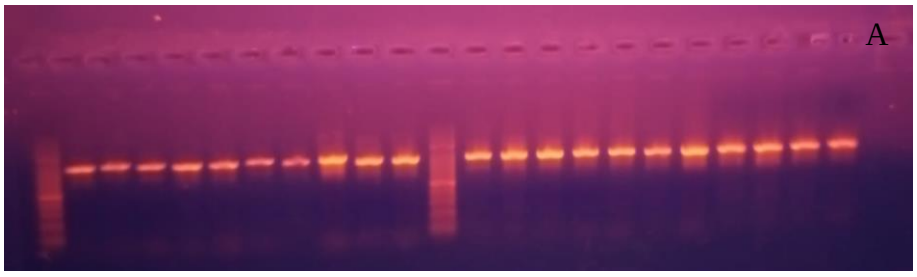


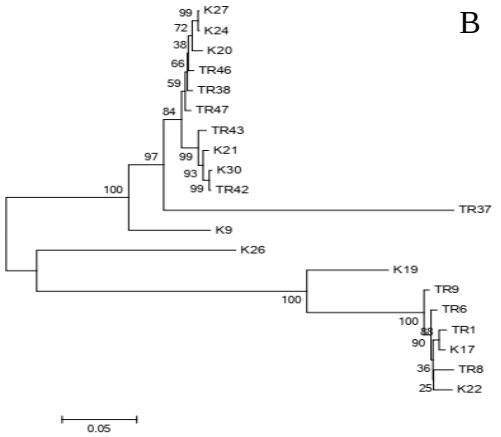
Trichoderma spp. izolatları

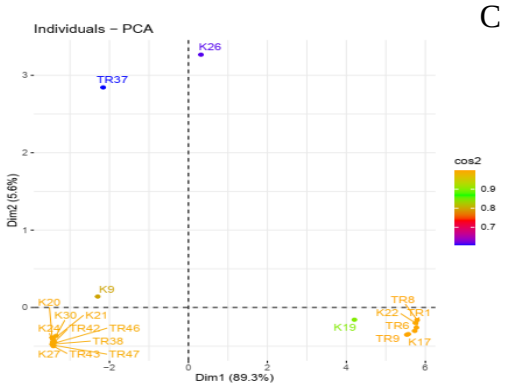
Şekil 2. *Trichoderma* spp. izolatlarının DBO verileri

İP.2 *Trichoderma* spp. izolatlarında *tef1-α* dizileme verileri

21 izolattan gDNA izolasyonu gerçekleştirildi ve 0.8 kb boyutta *tef1-α* geni çoğaltıldı (Şekil 3.A). Saflaştırılan bantlar sekanslama analizine tabi tutuldu. BLASTN analizleri sonrası E değerleri ve bit skorları kaydedildi (bkz Tablo 1) ve E değerlerinin %91 ila % 99 arasında olduğu kaydedildi. Morfolojik verilerle uyumlu şekilde *T. harzianum* ve *T. atroviride* izolatlarının NJ topoloji analizlerinde aynı kümede bulundukları görüldü (Şekil 3.B). PCA verileri göre ise 1. Eksende yüksek homoloji tespit edildi (Şekil 3.C).



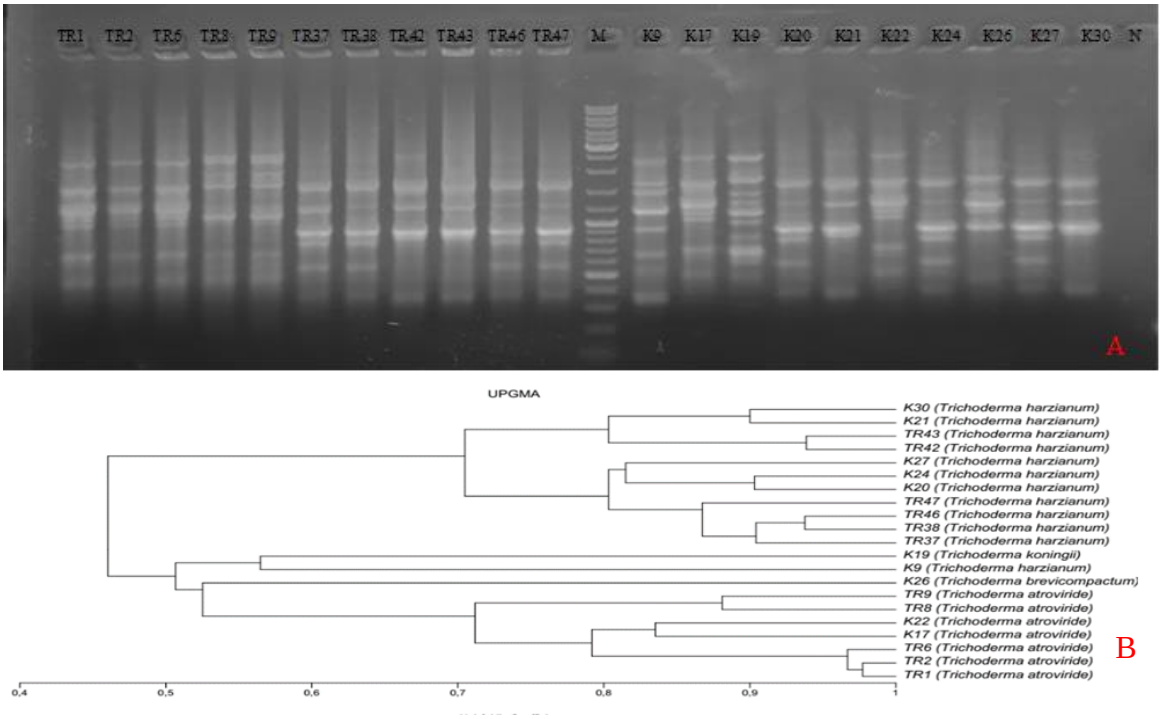




Şekil 3. 21 *Trichoderma* spp. izolatına ait *tef1-α* genine ait PCR profili (A), NJ dendrogramı (B) ve PCA grafiği (C).

İP.3 ISSR temelli filogenetik analizler

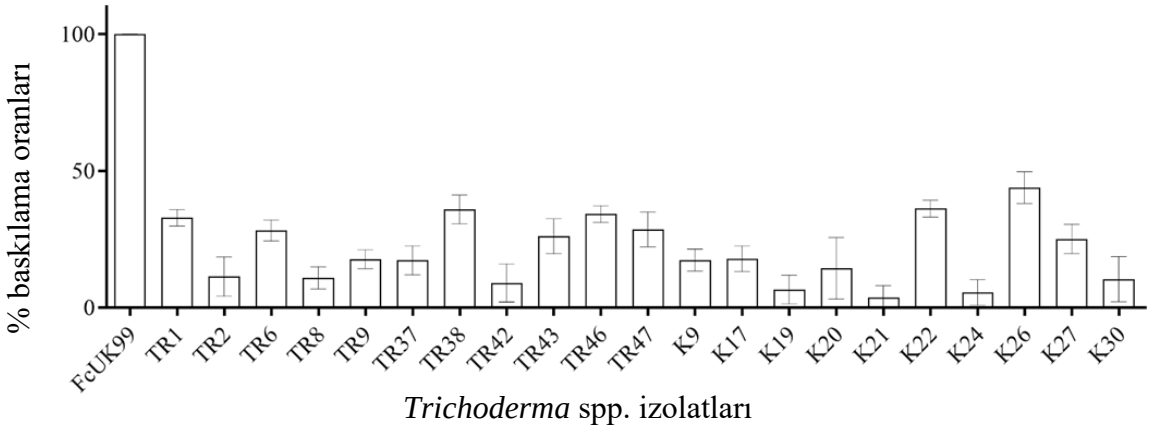
Çalışmada kullanılan tüm ISSR primerleri tüm izolatların genomlarından bant eldesini sağladı (bkz. Tablo 2). Toplamda 93 ISSR bantı elde edildi. 88 bant polimorfik olarak tayin edildi ki bu da %94.62'lik bir polimorfizmin varlığını göstermektedir. En yüksek ve en düşük bant sayıları sırasıyla 13 ve 3 olarak kaydedildi (bkz. Tablo 2). Şekil 4.A UBC828 ISSR bant profillemesini gösterirken, Şekil 4.B UPGMA temelli dendrogramı göstermektedir. Tıpkı DNA dizileme verilerinde olduğu gibi tür düzeyinde ayrım açıkça görülmektedir.



Şekil 4. 21 *Trichoderma* spp. izolatına ait ISSR analizleri. A. UBC828 ISSR profili, B. UPGMA dendrogramı

İP.4 *Trichoderma* spp. izolatlarının *F. culmorum* üzerindeki mikoparazitik etkileri

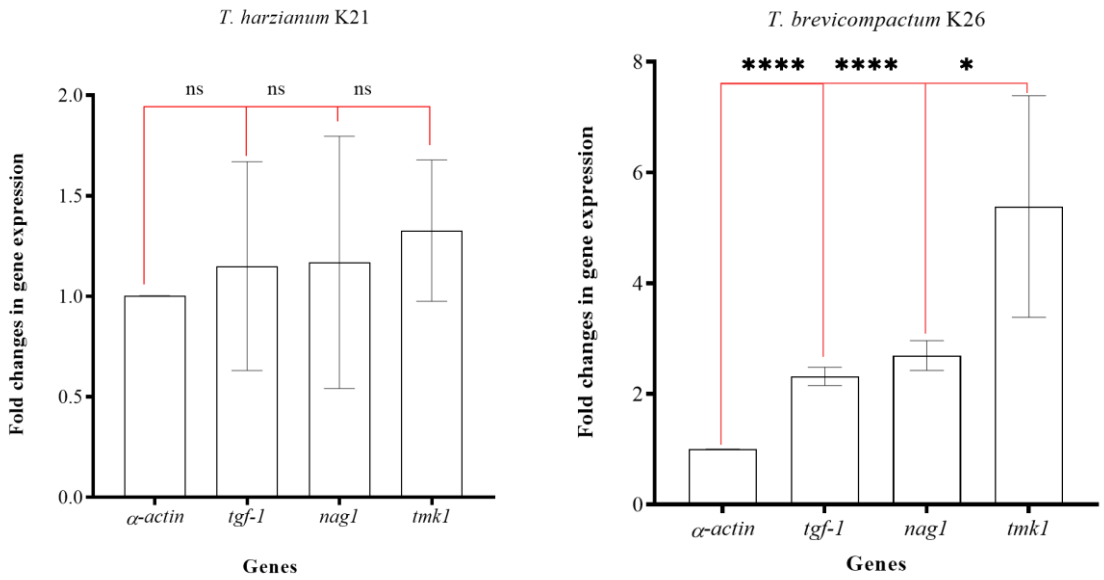
Sandviç kültürlerden elde edilen verilere göre *F. culmorum* üzerindeki en yüksek baskılama etkisi %43 oranı ile K26 izolatında görüldü. En düşük baskılama kapasitesi ise K21 izolatında saptandı (Şekil 5). Bu iki izolat ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere belirlendiler.



Şekil 5. *Trichoderma* spp. izolatlarının mikoparazitik etkilerinin grafiği

İP.5 Gen anlatım analizleri

K21 ve K26 izolatları gen anlatım analizlerine tabi tutuldular. Total RNA miktar ve kalite değerleri sırasıyla 1-2 µg µL $^{-1}$ ve 1.9-2.0 ($\Delta_{260/280}$) olarak belirlenmiştir. *tgf-1, nag1* ve *tmk1* genleri için oransal değişimler 1.15±0.51, 1.16±0.62 ve 1.32±0.35 olarak saptandı. K21 izolatında anlamlı farklılıklar saptanmadı ($p>0.05$). Buna karşın, K26 izolatında oransal değişimler aynı genler için sırasıyla 2.69±0.26 ($p<0.001$, ****), 2.23±0.16 ($p<0.001$, ****) ve 5.38±2.01 ($p<0.05$, *) olarak saptanmıştır. Şekil 6 gen anlatımındaki oransal değişimleri göstermektedir.



Şekil 6. K21 (sol) ve K26 (sağ) izolatlarında *tgf-1, nag1* ve *tmk1* genleri için anlatım verileri

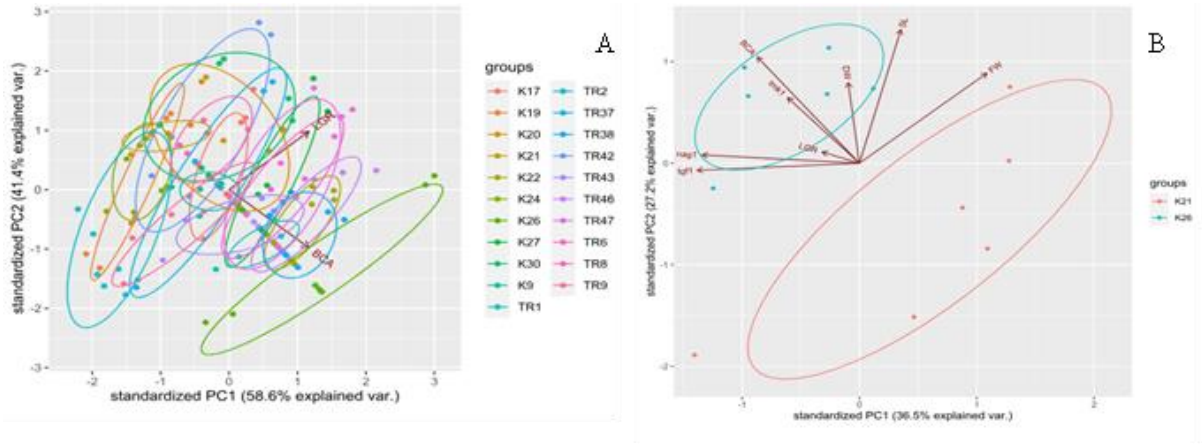
İP.6 *in planta* analizler (Ek-analizler-1)

Enfekte olmamış buğday, sadece enfekte olmuş buğday, K21 ile inoküle edilmiş buğday ve K26 ile

inoküle edilmiş buğday örneklerindeki taze ağırlık verileri sırasıyla 0.18±0.01 gr, 0.06±0.008 gr ($p<0.001$, ****), 0.15±0.02 gr ($p>0.05$), and 0.15±0.02 gr ($p>0.05$) olarak kaydedildi. Kuru ağırlık değerleri ise ynı setler için sırasıyla 0.018±0.001 gr, 0.009±0.0009 gr ($p<0.01$, ***), 0.013±0.001 gr ($p>0.05$), and 0.015±0.001 gr ($p>0.05$) olarak kaydedildi. Benzer şekilde sürgün boyları da *Trichoderma* uygulaması sonucunda (*Fusarium* enfeksiyonuna kıyasla) kontrole yakın şekilde anlamlı olmayan farklılıklar göstermiştir.

İP.7 2D ve 3D analizler (Ek-analizler-2)

Mikoparazitizm ve DBO testlerinde tıpkı filogenetik analizlerdeki gibi aynı türün bireylerinin benzer dağılım gösterdikleri tespit edilmiştir (Şekil 7.A). Hem korelasyon matirisi hem de temel bileşen analizleri sonucunda K21 ve K26 izolatlarının farklı deney setleri için kendi içinde homojen dağılımlar gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 7B.) DBO ve mikoparazitizm testleri için yapılan 3D analizlerde 1. Eksenin maksimum %'lik payı %58.6 olarak belirlenirken, K21 ve K26 için gerçekleştirilen PCA testlerinde ise bu değer %36.5 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 7. (A) Tüm izolatlar için yapılan PCA testi ve (B) K21 ve K26 için gerçekleştirilen PCA testi.

1.3. Tartışma ve Sonuç

Çalışmada öncelikli tür düzeyinde tanımlamalar gerçekleştirilmiştir. Veriler, 21 *Trichoderma* spp. izolatının Manisa bölgesindeki örneklemelerinde 4 farklı türün olduğunu ancak bunlardan ikisinin baskın olduğunu göstermektedir. Morfolojik tanısı yapılmış tüm izolatların ilgili DNA dizilerinin GenBank veritabanı kayıtları gerçekleştirilmiş ve aksesyon numaraları alınmıştır. Türkiye'de gerçekleştirilen geçmiş çalışmalara benzer şekilde bu çalışmada da *T. atroviride* ve T. harzianum türlerinin baskın olduğu saptanmıştır (Küçük ve Kıvanç, 2003; Gezgin ve diğ., 2020; Turgay ve diğ., 2023). Ayrıca geçmiş çalışmalarda olduğu gibi *tef1-α* geninin tür içi ve türler arası ayrımda kuvvetli bir markır gen olduğu tekrar görülmüş oldu. Ancak bahsedilen çalışmaların aksine bu çalışmada en yüksek mikoparazitik etki *T. brevicompactum* türüne ait K26 izolatında görüldü. Öyle ki en düşük baskılayıcı etki de *T. harzianum* K21 izolatında görüldü. DBO ile mikoparazitizm ilişkisi değerlendirildiğinde ise %70 oranının altında bir homojenite görülmesine rağmen (bkz Şekil 7.A), genel dağılımın DBO ve mikoparazitizm açısından ileri seviyede bağımsız olduğu söylenemeyebilir.

ISSR profilleme analizleri gösterdi ki *Trichoderma* spp. türlerine ait bireylerin dağılımı tıpkı tef1-α dizileme analizinde olduğu gibi yüksek oranda homojenite göstermektedir. %89 oranında olan PCA verileri her iki analiz için gerçekleştirilen dendrogramlarda ise esas olarak iki ana kümelenmenin olduğunu göstermektedir. Bu veriler geçmiş çalışmalara benzer şekilde tef1-α genin sadece tür tanısında değil aynı zamanda filogenetik ayrımlarda da kuvvetli bir araç olduğunu göstermektedir (Mehrabi-Koushki ve diğ., 2016; Sefer ve diğ., 2023; Turgay ve diğ., 2023). Benzer durum ISSR markırlarında dayalı filogenetik analizler için de geçerli görülmektedir. Öyle ki iki veya daha fazla *Trichoderma* spp. türleri ile yapılan çalışmalarda ISSR markırlarının türler arası ayrımda kuvvetli bir uygulama olduğu görülmüş (Muthu Kumar ve Sharma, 2011; Ghutukade ve diğ., 2015) mevcut çalışmada da özellikle iki türün (*T. atroviride* ve *T. harzianum*) bireylerinin açık şekilde alt kümelere ayrıldığı saptanmıştır.

Gen anlatım analizlerinden elde edilen veriler çalışmada hedeflenen *tgf-1, nag1* ve *tmk1* genlerinin geçmiş çalışmalara benzer şekilde mikoparazitizm ile potansiyel olarak ilişkili olabildiğini göstermiştir (Brunner et al., 2003; Reithner et al., 2007; Gómez-Rodriguez et al., 2018). Ancak mevcut çalışmada mikoparazitizm açısından zıt nitelikteki iki *Trichoderma* spp. izolatının ilgili gen anlatım profilleri karşılaştırılmış ve tamamen birbirlerine zıt anlatım profilleri sergiledikleri görülmüştür. Öyle ki mikoparazitizm potansiyeli yüksek izolat olan K26 bu üç geni de anlamlı seviyede yüksek anlatım yaptırmaktadır ki bu durum da biyokontrol niteliği taşıyacak bir izolatın bahsedilen genler açısından fazla anlatım yaptırması gerekliliği hususunda bizlere bilgi vermiştir. Benzer durum *in planta* analizler ve PCA testlerinde de görülmüştür. K26 ve K21 izolatları iki veya daha fazla sayıdaki farklı analitik yöntemler açısından karşılaştırıldığından yüksek bir çeşitlilik ve dolayısıyla da düşük bir birincil eksen yüzdesi göstermiştir.

Çalışmadan elde edilen veriler *T. brevicompactum* türünün ileriki çalışmalarda biyokontrol ajanı olarak kullanımına dair daha fazla çalışma yapılabilirliği hakkında bizlere fikir sunmuştur. Ancak sadece *Fusarium* spp.'de tek türe ait değil daha farklı bitki patojeni mantarlarla yapılacak çalışmalarla *T. brevicompactum* türünün biyokontrol ajanı olma potansiyelinin doğrulanması da gerekmektedir. İleriki çalışmalar *T. brevicompactum Fusarium*. spp haricinde diğer fungal fitopatojenlerin ve hatta bakteriyel hastalık ajanlarının *in vitro* veya *in planta* baskılanma araştırmalarını fizyolojik, biyokimyasal ve epigenetik seviyelerde içerebilir.

Kaynaklar

Alkan, M., Göre, M. E., Bayraktar, H., & Özer, G. (2019). Genetic variation of Fusarium spp. isolates associated with root and crown rot of winter wheat using retrotransposon-based iPBS assays. Uluslararasi Tarim ve Yaban Hayati Bilimleri Dergisi, 5(2), 250-259.

Błaszczyk, L., Basińska-Barczak, A., Ćwiek-Kupczyńska, H., Gromadzka, K., Popiel, D., & Stępień, Ł. (2017). Suppressive effect of Trichoderma spp. on toxigenic Fusarium species. Polish Journal of Microbiology, 66(1), 85.

Brunner, K., Peterbauer, C. K., Mach, R. L., Lorito, M., Zeilinger, S., & Kubicek, C. P. (2003). The Nag1 N-acetylglucosaminidase of Trichoderma atroviride is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. Current genetics, 43, 289-295.

Gargouri-Kammoun, L., Gargouri, S., Rezgui, S., Trifi, M., Bahri, N., & Hajlaoui, M. R. (2009). Pathogenicity and aggressiveness of Fusarium and Microdochium on wheat seedlings under controlled conditions. Tunisian Journal of Plant Protection, 4(2), 135-144.

Gezgin, Y., Maral Gül, D., Sözer Şenşatar, S., Kara, C. U., Sargın, S., Sukan, F. V., & Eltem, R. (2020). Evaluation of *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma citrinoviride* growth profiles and their potentials as biocontrol agent and biofertilizer. Turkish Journal of Biochemistry, 45(2), 163-175.

Ghutukade, K. S., Deokar, C. D., Gore, N. S., Chimote, V. P., & Kamble, S. G. (2015). Molecular characterization of *Trichoderma* isolates by ISSR Marker. Journal of Agriculture and Veterinary Sciences,

8(7), 1-5.

Gómez-Rodríguez, E. Y., Uresti-Rivera, E. E., Patrón-Soberano, O. A., Islas-Osuna, M. A., Flores-Martínez, A., Riego-Ruiz, L., ... & Casas-Flores, S. (2018). Histone acetyltransferase TGF-1 regulates Trichoderma atroviride secondary metabolism and mycoparasitism. PLoS One, 13(4), e0193872.

Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., & Bissett, J. (2009). Genetic and metabolic biodiversity of Trichoderma from Colombia and adjacent neotropic regions. Fungal Genetics and Biology, 46(9), 615-631.

Irzykowska, L., Bocianowski, J., & Baturo-Cieśniewska, A. (2013). Association of mating-type with mycelium growth rate and genetic variability of Fusarium culmorum. Open Life Sciences, 8(7), 701-711.

Küçük, Ç., & Kivanç, M. (2003). Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. Turkish Journal of Biology, 27(4), 247-253.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. methods, 25(4), 402-408.

Mehrabi-Koushki, M., Bavarsad, M., Farrokhinejad, R., Jamshid, M., & Alimohammadi, A. (2016). The comparison of ITS-rDNA and tef1α genomic regions for phylogenetic study of some Trichoderma species. Iranian Journal of Plant Protection Science, 47(1).

Moradi, M., Dehne, H. W., Steiner, U., & Oerke, E. C. (2017). Improved procedure for mass inoculum production of Fusarium species in a short period of time. Applied Entomology and Phytopathology, 84(2), 21-31.

Moya-Elizondo, E. A., & Jacobsen, B. J. (2016). Integrated management of Fusarium crown rot of wheat using fungicide seed treatment, cultivar resistance, and induction of systemic acquired resistance (SAR). Biological control, 92, 153-163.

Muthu Kumar, A., & Sharma, P. (2011). A study on corroboration between DNA markers (RAPD, ISSR, ITS) and bio-control efficacy of *Trichoderma* species. Fungal Genom. Biol, 1(1).

Nei, M., and Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. PNAS 76 (10), 5269–5273. doi: 10.1073/pnas.76.10.5269

Niu, C., Kebede, H., Auld, D. L., Woodward, J. E., Burow, G., and Wright, R. J. (2008). A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. Afr. J. Biotechnol. 7 (16), 2818–2822.

O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., and Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. PNAS 95 (5), 2044–2049. doi: 10.1073/pnas.95.5.2044

Popiel, D., Kwasna, A., Chelkowski, J., Stepien, L., & Laskowska, M. (2008). Impact of selected antagonistic fungi on Fusarium species-toxigenic cereal pathogens. Acta Mycologica, 43(1).

Prevost, A., & Wilkinson, M. J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theoretical and applied Genetics, 98, 107-112.

Reithner, B., Ibarra-Laclette, E., Mach, R. L., & Herrera-Estrella, A. (2011). Identification of mycoparasitism-related genes in Trichoderma atroviride. Applied and environmental microbiology, 77(13), 4361-4370.

Roldan-Ruiz, I., Dendauw, J., Van Bockstaele, E., Depicker, A., & De Loose, M. A. F. L. P. (2000). AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (Lolium spp.). Molecular breeding, 6, 125-134.

Sefer, Ö., Özsoy, E., Yörük, E., & Özkale, E. (2023). Determining the biocontrol capacities of Trichoderma spp. originating from Turkey on Fusarium culmorum by transcriptional and antagonistic analyses. Frontiers in Fungal Biology, 4.

Turgay, G., Eren, E., Eltem, R., Çakır, D., & Aydemir, B. Ç. (2023). Molecular characterization of *Trichoderma* spp. isolates in mushroom-growing farms in Turkey and their effects on *Agaricus bisporus* production. Plant Pathology, 72(7), 1272-1282.

Yörük, E., Tunali, B., Kansu, B., Ölmez, F., Uz, G., Zümrüt, I. M., ... & Meyva, G. (2016). Characterization of high-level deoxynivalenol producer Fusarium graminearum and F. culmorum isolates caused head blight and crown rot diseases in Turkey. Journal of Plant Diseases and Protection, 123, 177-186.

Yörük, E. (2018). Tetraconazole leads to alterations in Fusarium graminearum at different molecular levels. Appl. Ecol. Environ. Res. 16 (5), 6155–6167

Yörük, E., Özkale, E., Sefer, Ö., & Özsoy, E. (2022). Trichoderma atroviride triggers alterations at epigenetics, transcripts, oxidative stress, and apoptosis levels on Fusarium graminearum. Journal of Plant Pathology, 104(3), 1039-1047.

1.3 İdari Gelişmeler

Proje kapsamında alımı önerilen ürünlerin alımı proje sürecinde gerçekleştirilmiştir.

2. PROJE TAKVİMİNDEKİ OLUMLU/OLUMSUZ GELİŞMELER: Altı aylık dönemde taahhüt edilen uygulamaların yapılma durumları proje takvimi ile eşleştirilerek açıklanmalıdır. Bu kısımda başarı ölçütleri ile karşılaştırma yapılabilir.

Herhangi bir olumsuz gelişme gerçekleşmemiştir

3. PROJE TAMAMLANMA TABLOLARI: İş paketlerinde ulaşılan hedefler değerlendirilerek ilerleme tablosu oluşturulmalıdır. İş paketlerinin yüzdelik olarak ne kadarının tamamlandığını ifade etmek için %... tamamlandı şeklinde sayısal ifade kullanılmalıdır. Tüm iş paketlerinin tamamlandığı gösterilmelidir.

İş Paketleri	Gerçekleşme oranı
Trichoderma spp morfolojik kontrollerinin yapılması ve doğrusal büyüme oranı analizleri	%100 (1. Dönem iş paketi)
Trichoderma spp. izolatlarının tür düzeyinde *TEF1-α* gen sekanslaması ile tanısı	%100 (1. Dönem iş paketi)
Trichoderma spp. izolatlarının ISSR markırlarına dayalı filogenetik analizi	%100 (1. Dönem iş paketi)
İkili kültürler ile *F. culmorum* üzerinde baskılayıcı etkinin/ mikoparazitik potansiyelinin gösterimi	%100 (2. Dönem iş paketi)
Trichoderma spp. izolatlarında mikoparazitizm ve sekonder metabolit üretimi ilişkili genlerinin varlığının PCR ile saptanması	%100 (2. Dönem iş paketi)
Trichoderma spp. izolatlarında mikoparazitizm ve sekonder metabolit	%100 (2. Dönem

üretimi ilişkili genlerinin anlatımlarının gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) ile analizi	iş paketi)

4. RAPOR DÖNEMİ ÇIKTILARI: Proje kapsamında elde edilen verilerden gerçekleştirilen sempozyum/kongre sunumu, makale ve benzeri çıktıların künyesi bu kısımda açıklanmalıdır.
Proje çıktıları ESCI'de taranan Frontiers in Fungal Biology dergisinde makale olarak yayınlanmıştır. Makale künyesi aşağıdaki gibidir: Sefer, Ö., Özsoy, E., Yörük, E., & Özkale, E. (2023). Determining the biocontrol capacities of *Trichoderma* spp. originating from Turkey on *Fusarium culmorum* by transcriptional and antagonistic analyses. Frontiers in Fungal Biology, 4: 1278525.

Yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğruluğunu ve bilgilerin hatalı olması durumunda doğacak yükümlülüğü kabul ediyorum.

Proje Yürütücüsünün Ünvanı, Adı Soyadı: Doç. Dr. Emre Yörük

Fakülte / Yüksekokul / Bölüm / Program /Anabilim Dalı: Fen Edebiyat Fakültesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Sonuç Raporu Hazırlama Tarihi: 31.05.2024

İmza: