

## Antifungal Peptidler

Çiğdem Küçük<sup>1</sup>, Merih Kıvanç<sup>2</sup>, Engin Kınacı<sup>3</sup>, Gülcan Kınacı<sup>3</sup>

### Özet

Doğal peptidlerin çoğu mikroorganizmalardan elde edilmiştir. Bu peptidlerin bazıları klinik tedavilerde kullanılırken, bazıları da sadece in vitro testlerden geçirilmiştir. Peptidlerin çoğunun antimikrobiyal ve antifungal aktiviteleri in vitroda gram pozitif, gram negatif, anaerob ve aerob bakteriler ile funguslara karşı test edildiğinde geniş spektrum gösterdiği ortaya konmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Antifungal Aktivite, Sekonder metabolitler, Patojen funguslar

### Giriş

Sekonder metabolitler organizma tarafından üretilen fakat organizmanın büyümesi için gerekli olmayan ve sadece sınırlı taksonomik gruplarda mevcut olan bileşiklerdir (1). Özellikle bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunurlar. Bugüne kadar 10 000 den fazla mikrobiyal metabolit olduğu tespit edilmiş fakat bunlardan oldukça az bir kısmı uygulama alanı bulmuştur (2). Mikrobiyal sekonder metabolitler, çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir ve hormon, antibiyotik, toksin, anti-migren ajanı, anti-kanser ajanı olarak veya insektisit olarak işlev görmektedirler (2).

Mikrobiyal sekonder metabolitler, günümüzde daha çok tarımda endüstride ve sağlık alanında kullanılmaktadır (3). Son yıllarda üzerinde oldukça fazla durulan konulardan olan ekolojik tarım ile bitkinin ve toprağın verimliliğini ve direncini artırıcı doğal metabolitlerin kullanımı gündeme gelmiştir (4). Endüstride, sekonder metabolitler daha kararlı ürün oluşturduğu ve daha az enerji gerektirdiği için tercih edilmektedir. Bu alanda kullanılmak üzere katı faz fermentasyonu (solid-state fermentation) yolu ile üretilen bazı sekonder metabolitler Tablo 1'de verilmiştir (2).

Bu derlemede, mikroorganizmalardan ve bitkilerden elde edilen antifungal peptidler ile ilgili son bilgiler gözden geçirilmiştir.

<sup>1</sup> Uzm., Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir

<sup>2</sup> Prof. Dr., Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Eskişehir. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: [mkivanc@anadolu.edu.tr](mailto:mkivanc@anadolu.edu.tr)

<sup>3</sup> Doç. Dr, Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Eskişehir

Tablo 1. Katı faz fermentasyonu ile üretilen bazı sekonder metabolitler (3)

Sekonder Metabolit	Mikroorganizma	Substrat
Aflatoksin	<i>Aspergillus</i> sp.	pirinç, darı
Aflatoksin	<i>Aspergillus parasitus</i>	pirinç, darı, fıstık
Aktinorhodin	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Agar
Metibenomisin	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Agar
Bakteriyal Endotoksinler	<i>Bacillus thuringiensis</i>	hindistan cevizi
Gibberelik asit	<i>Fusarium moniliforme</i>	buğday kepeği
Gibberelik asit	<i>Gibberilla fujikuroi</i>	buğday kepeği
Iturin	<i>Bacillus subtilis</i>	Soya fasulyesi
Mikotoksinler	<i>A. flavus</i>	mısır, buğday, yulaf
Mikotoksinler	<i>Penicillium viridifaciens</i>	buğday, mısır, pirinç
Tetracyclin	<i>Aspergillus</i> spp.	patates
Tetracyclin	<i>Streptomyces viridifaciens</i>	patates
Chlorotetracyclin	<i>Streptomyces viridifaciens</i>	patates
Zearalenone	<i>Fusarium moniliforme</i>	mısır

## Bakteri ve Funguslardan Tarafından Üretilen Sekonder Metabolitler

*Bacillus subtilis* tarafından üretilen iturin'in bir anti-fungal antibiyotik olduğu belirlenmiş (5) ve *Fusarium oxysporum*, *F.moniliforme*, *Aspergillus niger*, *A.flavus* gibi bitki patojenlerine etkili olarak bulunmuştur (5). *Bacillus licheniformis* 'in ürettiği, yağ asidi içeren CB<sub>1</sub> peptidinin 50 µg/ml 'lik düzeyinin bitki patojenlerinden *F. oxysporum* üzerine etkili olduğu bildirilmiştir (6). Ayrıca *Bacillus licheniformis* 'in bazı izolatlarınca üretilen ve dar spektrumlu bir peptid olan M-4 fungusitinin *Microsporum canis*, *Mucor* türleri ve *Sporothrix schenckii* 'nin gelişimini engellediği saptanmıştır. *Bacillus circulans* J2154 'den izole edilen yeni bir lipopeptit serisi α-γ (1-4), *Streptococci* ve *Enterococci* 'yi içine alan gram-pozitif bakterilere etkili olduğu ortaya konmuştur (7).

*Bacillus* spp., *B.subtilis* MTCC 2423 tarafından üretilen ve bir sekonder metabolit olan surfaktinin, suyun yüzey gerilimini 72 nM/m<sup>3</sup> 'den 27 nM/m<sup>3</sup> 'e düşürdüğü belirlenmiştir (8). Bu mikroorganizmalar 96 saatte hemen hemen 1 gram biyosümfektant üretebilmektedir (8). Surfaktin bilinen en güçlü biyosümfektantlardan biridir. Surfaktin, ayrıca fibrin pıhtılaşmasını engelleyici ve bazı bakterilerin protoplastlarını, sferoplastlarını ve eritrositleri liziz edici olarak ta kullanılmaktadır (3).

*Gibberella fujikuroi* ve *Fusarium moniliforme* tarafından üretilen gibberellik asit yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Giberellik asit özellikle tohumlardaki çimlendirmeyi teşvik etmek, çiçeklenmeyi artırmak için tarımda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (9).

*Claviceps* spp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. ve *Rhizopus* spp. tarafından üretilen ergot alkaloidler migren, anjin, hipertansiyon gibi hastalıkların tedavisinde çok sık kullanılmaktadır (10). Halojenik lazersik asit dietilamit en çok bilinen ergot türevidir. Ayrıca ergotamin tartarat farmasötik bir ilaç olarak da kullanılmaktadır (11).

Cyclosporin A, *Fusarium solani*, *Neocosmospora varinfecta* ve *Tolyxpocladium inflatum* 'dan üretilen bir metabolit olup; kalp, karaciğer ve böbrek nakline gerek

duyan hastalarda kullanılmaktadır (3). Cyclosporin A'nın, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler, koklar, trichomonas, amoebae, mikoplazma ve balantidii'lere karşı kullanılabileceği belirlenmiştir. Ayrıca tetrasiklinler, ribozom, mRNA, aminoasit tRNA'nın gerekli komplekslerinin oluşumunu engellediği bildirilmiştir (12).

Filamentli fungus *Zalerion arboricola*'dan izole edilen Pneumocandin Do'nun, *Pneumocystis carinii*'ye karşı potansiyel bir inhibitör olduğu bulunmuştur (13).

Trichopolyns A ve B peptidleri *Trichoderma polysporum* tarafından üretilmektedir (14). *Candida albicans*, *C.neoformans*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus* ve *T. mentagrophytes* için trichopolyns A ve B'nin 0.78-6.25 µg/ml'lik dozlarda etkili olduğu bildirilmiştir (14). *Trichoderma* spp., toprak kökenli fungusların neden olduğu bitki hastalıkları için etkili bir biyolojik mücadele ajanıdır. *Trichoderma*'nın hastalıkta etkili olması, diğer funguslara olan antagonistik özelliğinden kaynaklanmaktadır (15). *Pythium ultimum*'un neden olduğu çökertenin, *Trichoderma virens* tarafından önlenmesi, *T.virens* tarafından üretilen bir epidithiodiketopiperazine antibiyotik olan gliotoxinin etkisiyle olduğu belirlenmiştir (16). Hedef fungusların parazitik seviyeleri toprak ve rhizosferdeki besinler için rekabet ve antibiyotiklerin üretimi, antagonistik interaksiyonlar için önemli faktörlerdir. *T. virens* tarafından üretilen bazı peptitlerin, *T. virens*'in biyokontrol işlevi üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (17). Fungal sideroforların beslenmede etkili olduğu, *T. virens*'in; dimerum asit, cis ve trans fusarinler ve copragen olmak üzere üç tip hidroksamat siderofor ürettiği belirlenmiştir (17).

*Trichoderma harzianum*'un çeşitli izolatlarının 1-hidroksi ve 1,8 dihidroksi-3-metilantrakuinan'ı sıvı ortamlarda ürettikleri ve buğday kök çürüklüğüne neden olan *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* üzerine etkili olduğu belirlenmiştir. *T. harzianum*'un bazı izolatlarının da *G. graminis*'in gelişimini, ürettiği bileşiklerle azda olsa etkilediği fakat patojen yokluğunda buğday kök uzunluğunu arttırdığı Dickinson vd. (18) tarafından bildirilmiştir. Eskişehir ve çevresindeki toprak örneklerinden izole edilen *Trichoderma harzianum* izolatları ile yapılan inhibisyon çalışmalarında izolatların ürettikleri antifungal metabolitlerin *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *F. culmarum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *Dreslera sorokiniana*, *Rhizoctonia solani*, *R. cerealis* ve *Gaeumannomyces graminis*'in gelişimini engellediği Küçük (15) tarafından belirlenmiştir. *T.harzianum* T8 ve T20 izolatlarının sera koşullarında da mısır, buğday, domates ve fasulye gelişimini antifungal özellikleri ile etkiledikleri saptanmıştır (15). *T. hamatum*'un trikovidin, isosanit, isonitril gibi antifungal bileşikler ürettiği saptanmıştır. Isonitril'in *Trichoderma harzianum*, *T.koningii*, *T. polysporum* ve *T. viride* türleri tarafından da üretildiği saptanmıştır (18). Isonitrin A'nın; Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler, mayalar ve filamentli funguslara karşı oldukça etkili olduğu, diğer iki bileşiğin etki alanının ise oldukça sınırlı olduğu belirlenmiştir (18).

Fluorescent *Pseudomonas* spp.'nin pryrol nitrin, pyoluteorin, pyrroles, pyocyanine, phenazin'ler (phenazine-1-carboxylic acid gibi), oomycin A, acetylphloroglucinol (2,4-diacetylphloro glucinol gibi) 'leri içeren in vitro da antifungal aktiviteyi önleyen sekonder metabolitleri ürettiği belirlenmiştir. *P. fluorescens* PFM2 tarafından üretilen antimikrobiyal bileşik, buğdayda *Puccinia recondita* ve *Septoria tritici*'nin biyolojik kontrolünde etkili bulunmuştur (19, 20). 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) geniş spektrumlu antibakteriyel ve antifungal aktivite gösteren *Pseudomonas fluorescens*

tarafından üretilen bir metabolittir. Buğdayda *Gaeumannomyces graminis* 'in ve tütünde *Thielaviopsis basicola* 'nın neden olduğu kök çürüklüğü hastalıklarında, şekerpancarında ise çökerten (*Pythium ultimum*) hastalığının bastırılmasında etkili olarak bulunmuş, böylece tarımda kullanılan pestisit miktarını azaltmıştır (21, 22, 23). Fluorescent pseudomonas 'lar, antibiyotik bileşim dizilerini içeren farklı sekonder metabolitler üretmişlerdir (24). *P. fluorescens* tarafından üretilen hidrojen siyanid (HCN) ve phenazin antibiyotiklerinin (phz) biyokontrolde önemli role sahip olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (23, 24).

## Bitkilerden Elde Edilen Antifungal Peptidler

Bitkilerden elde edilen peptidlerin memeli hücrelerine ve böceklere karşı olumsuz etkilerinin olmadığı belirlenmiştir. İşlev mekanizmaları tam olarak belirlenememesine rağmen, Hs-AFP<sub>1</sub>; *Heuchera sanguinea* 'dan, Rs-AFP<sub>2</sub> ise; *Raphanus sativus* tohumlarından izole edilmiştir ve 125 µg/ml'lik konsantrasyonları *Aspergillus flavus* 'un konidial çimlenmesini sırasıyla %20 ve %35 oranında azaltmıştır (25).

*Impatiens balsamina* tohumundan üretilen 1b-AMP<sub>3</sub> peptidi, 50µg/ml'lik konsantrasyonlarda *Aspergillus flavus* 'un konidial çimlenmesini %42 oranında azaltmış, ancak çimlenmemiş konidia üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır (26). 1b-AMP<sub>3</sub>'in 50 µg/ml 'lik konsantrasyonu *Fusarium moniliforme* 'nin çimlenmemiş konidiasına %95,5 oranında ve çimlenmiş konidiasına ise %75 oranında etkili olarak bulunmuş, peptidin yapısının ise kitine benzediği belirlenmiştir (25).

Tansı (27) tarafından yapılan bir çalışmada ise, *Satureja thymbra* 'dan elde edilen bileşikler, *Mucor hiemalis* 'in misel gelişmesini engellemiştir.

Soğan tohumlarının (*Allium cepa* L.) *Fusarium oxysporum* 'u inhibe eden bir peptid olan ACE-AMP<sub>1</sub>'i ürettiği (28), zeamatinin ise *Zea mays* (mısır) tohumlarından üretildiği ve peptidin ayrıca *Avena sativa*, *Sorghum bicolor* ve *Triticum aestivum* tohumlarında da bulunduğu belirlenmiştir (29). Ayrıca zeamatinin, *C. albicans* ve *Neurospora crassa* 'ya karşı etkili olduğu, fungal plazma membranının geçirgenliğini arttırdığı belirlenmiştir. Zeamatinin aktivitesinin, NaCl 'nin artan konsantrasyonlarında azaldığı tespit edilmiştir (29). Zeamatine benzer antifungal bir peptidin, keten tohumlarından elde edildiği ve nikkomisin Z ile aynı görevi gördüğü, *C. albicans* 'ı inhibe ettiği bildirilmiştir (29).

## Sekonder Metabolitlerin Biosentezinde Genler

Mikroorganizmalarca antibiyotik üretimi ile ilişkili genler üzerindeki çalışmalar 1980'li yılların başlarında başlamıştır. Bu çalışmalar sırasında büyük miktarda antibiyotik üretme yeteneğine sahip olan toprak bakterileri izole edilmiştir. Antibiyotik üretim genleri, yapısal ve düzenleyici genler grubu olarak mikrobiyal kromozomlarda yerleşiktirler. Bu özellik ilk kez *S. coelicolor* 'dan aktinorhodin gen gruplarının izolasyonu sonucunda ortaya çıkarılmış olup, bunu *Streptomyces* 'den plazmidler ve fajların izolasyonu, transformasyon ve transfeksiyon metodlarının geliştirilmesi ve özellikle antibiyotik üretimini engelleyen mutantların izolasyonu gibi çalışmalar

izlemiştir. Günümüzde özellikle sekonder metabolit genleri ve antibiyotik üretimi ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır (30).

Sekonder metabolitlerin üretimini spesifik olarak engelleyen mutantlar, enzim-gen ilişkisinin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Bu tür mutantların, yapısal genlerin klonlanmasına yardımcı oldukları bilinmektedir (30). Bazıları yapısal genleri şifrelemektedir. Bu özellikleri, yabancı organizmalardan alınan izole DNA klonunun bir mutanta aktarılmasıyla yapılan deneyler sonucu ortaya konulmuştur. Alt klonlama deneyleri ile özel bir mutantın üretimini yeniden yapan en küçük DNA parçası belirlenmektedir. Sekans analizleri ve iyi bilinen proteinlerle karşılaştırma yapılarak genlerin protein ürünleri üzerinde oynadığı rol hakkında fikir edinilebilmektedir (30). Bu yaklaşım; *S. coelicolor* 'dan aktinorhodin üretiminde yapısal, direnç ve düzenleyici genlerin klonlanmasında kullanılmıştır. Ayrıca tetracenomycin, streptomycin ve bialaphos üretiminde kullanılan gen grupları da aynı şekilde klonlanmıştır (30). Klonlanmış sekonder metabolit genlerinden bazıları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Klonlanmış sekonder metabolit örnekleri (31)

Antibiyotik	Sınıfı	Üreten organizma
Actinorhodin	polyketide	<i>Streptomyces coelicolor</i>
Tetracenomycin C	polyketide	<i>Streptomyces glaucescens</i>
Fortimicin	aminoglikosit	<i>Micromonospora olivasterospora</i>
Penicillin	$\beta$ -laktam	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Sterigmatocystin	poliketid	<i>Aspergillus nidulans</i>
Fengycin	peptit	<i>Bacillus subtilis</i>
Rapamycin	Makrolid	<i>Streptomyces hydroscopicus</i>
Cephalosporin	$\beta$ -laktam	<i>Cephalosporium acremonium</i>
Penicillin	$\beta$ -laktam	<i>Aspergillus nidulans</i>
Aflatoxin	polyketide	<i>Aspergillus parasiticus</i>
Rifamycin	Ansamycin	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>
Rubradirin	Ansamycin	<i>Streptomyces achromogenes</i>
Cephameycin C	$\beta$ -laktam	<i>Streptomyces cattleya</i>
PD 116740	polyketide	<i>Streptomyces strain WP 4669</i>
Tetrangulol	polyketide	<i>Streptomyces rimosus</i>
Tetrangomycin	polyketide	<i>Streptomyces rimosus</i>
Daunorubicin	$\beta$ -laktam	<i>Streptomyces peucetius</i>
Nikkomycin	nukleosit	<i>Streptomyces tendae</i>
Carbomycin	makrolid	<i>Streptomyces thermotolerans</i>
Candicidin	makrolid	<i>Streptomyces griseus</i>
Sisomycin	aminoglikosid	<i>Micromonospora inyoensis</i>
Nosiheptide	thiopeptit	<i>Streptomyces actuosus</i>
ActinomycinD	peptit	<i>Streptomyces antibioticus</i>

Plazmidler, *Actinomyces* 'de yaygındır ve temel gen klonlama vektörleri; farklı *Streptomyces* 'lerden izole edilmiş plazmidlerdir. Vektörler tipik olarak apramycin (aacIV), neomycin/kanamycin (aphII), thiostrepton (tsr) veya viomycin (vph)'lı transformantların seçimini sağlayan antibiyotik direnç genlerini taşırlar (31). Bu vektörlerin çoğu hem *E. coli* hem de *Streptomyces* spp.'de kullanılabilir (31). Faj vektörlerinin, plazmidlerle karşılaştırıldığında; daha çok efor sarfettikleri ve oldukça küçük DNA segmentlerini kabul ettikleri belirlenmiştir (31). Transpozonlarla

gen klonlama ve mutagenizasyon, actinomycetesler için temel basamaklardır. Bunlardan çok sayıda bulunmasına rağmen yaygın olarak sadece IS493 kullanılmaktadır. Transpozon esaslı vektörler sürekli olarak geliştirilmektedir. İşaretli transpozonlar ise *Pseudomonas* ve *Bacillus* spp.'lerde antibiyotik biyosentez genlerini tanımlamak için tercih edilmektedir (31).

Antibiyotik üretiminde kullanılan gen ve gruplarının büyük bir kısmı aktinomiset ve funguslardan klonlanmıştır (31). Yeni metabolitlerin keşfi için bilinen bir gen, diğer genlere klonlanmaktadır. Genler arasında ilgili enzimi fonksiyonel olarak kodlayan önemli homologların bulunduğu belirlenmiştir (31). Genomik DNA'lar benzer G+C içeriğine sahipse, bilinen gen genellikle homolog DNA'yı melezlemekte ve bu, daha sonra klonlanarak karakterize edilebilmektedir (30). Homolog genleri klonlamada PCR metodu da kullanılabilir. Bu yaklaşım; poliketide metabolitler, oligopeptit antibiyotikler ve bakteriyel metabolitler için başarılı olmuştur (30, 31).

Sekonder metabolit genlerinin özel bir grubunun klonlanmasında en önemli faktör; oluşturulacak metabolitin belirlenmesinden sonra, uygun bir konukçuda birkaç gen grubunun belirlenmesidir. Bu yaklaşımda başarılı olabilmek için dikkat edilmesi gereken bazı kriterler vardır:

- Klonlama vektörü büyük DNA segmentlerini kabul etmeli, kararlı bir şekilde konukçu ile bütünleşebilmelidir
- konukçu genlerin hepsi ekspres edebilmelidir,
- Enzimlerin hepsi gerekli olduğu zaman ve herhangi bir kofaktör gerektiğinde konukçuya ulaştırabilmelidir,
- Oluşturulacak ürün konukçuya karşı toksik olmamalıdır veya yapısal genlerle birlikte bir direnç geni de klonlanmalıdır (30).

## Sonuç

Sekonder metabolitlerin etkileri, çevresel faktörler, konukçunun bağışıklık durumu ve hastalık olayının derecesine göre değişebilmektedir (32). Derlemede yeni izole edilen, doğal mikrobiyal metabolitler ve bunların mikroorganizmaların gelişmesine etkileri ile sekonder metabolit genlerinin belirlenmesi ile yapılan çalışmaların özeti verilmeye çalışılmıştır. Son yıllarda biyoteknolojide sağlanan büyük ilerlemeler sonucu farklı konukçulara gen klonu ve ekspresi, spesifik enzim promotörü ve gen izolesi yapmak mümkün olmuştur.

Gelecek yıllarda, doğal kaynaklardan salgılanan moleküllerin şekillendirilmesi, fiziko-kimyasal özelliklerinin belirlenmesi, kimya ve moleküler biyoloji tekniklerinin birlikte kullanılması ile yeni sonuçlar elde edileceği beklenmektedir.

## Kaynakça

1. Bentley, R. (1997). Microbial secondary metabolites play important roles in medicine; Prospects for discovery of new drug's. *Perspectives in biology and medicine*. 40, 364-394.
2. Demain, A.L., (1998). Microbial natural products. Alive and well in 1998. *Nat. Biotechnol.* 16, 3-4.
3. Robinson, T., Singh, D., Nigam, P. (2001). Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 284-289.

4. Ertem, A.(1993). Ekolojik tarım ve rapunzel. İzmir, 36s.
5. Latoud, C., Peypoux, F., and Michel, G. (1987). Action of iturin A. An antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis* on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Modification of membrane permeability and lipid composition. *J. Antibiot.* 40, 1588-1595.
6. Lebbadi, M., Galvez, A., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., and Valdivia, E. (1994). Fungicidin M-4: a narrow spectrum peptide antibiotic from *Bacillus licheniformis* M-4. *J.Appl. Bacteriol.* 77, 49-53.
7. Haiyin, H., shen, B., Korshalla, J., Carter, G.T. (2001). Cieculacins new antibacterial lipopeptids from *Bacillus circulans* J2154. *Tetrahedron.* 57, 1189-1195.
8. Ohno, A., Takashi, A., Shoda, M. (1992b). Production of a lipopeptid antibiotic surphactin with recombinant *B.subtilis*. *Biotechnol Lett.* 14, 1165-1168.
9. Balakrishman, K., Panday, J.R. (1996). Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation. *J.Sci.Ind. Res.* 55, 365-372.
10. Demain, A.L. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 455-463.
11. De Grot, A.J., Dongen, P.W.J., Hekster, Y.A., Roomalen, J. (1998). Ergot alkaloids: current status and review of clinical pharmacology and therapeutic use compared with other oxytocics in obstetrics and gynaecology. *Drugs.* 56, 523-535.
12. Yang, S.S., and Ling, M.Y. (1989). Tetracycline production with sureat potato residute by solid state fermantation. *Biotechnol. Bioeng.* 33, 1021-1028.
13. Morris, S.A., Schwartz, R.E., Sesin, D.F., Masurekar, P., Hallada, T.C., Schmatz, D.M., Henses, O.D., Debarah, Z.L. (1994). Pneumocandin Do, a new antifungal agent and potent inhibitor of *Pneumocytis carinii*. *J.Antibiot.* 47, 755-764.
14. Fuji, K., fujita, E., Takaishi, Y., Fujita, T., Arita, I., Komatsu, M., and Hirasuka, N. (1978). New antibiotics, trichopolyns A and B: isolation and biological activity. *Experientia.* 34, 237-239.
15. Küçük, Ç. (2000). *Trichoderma harzianum* ile toprak kökenli bazı bitki patojenlerinin kontrolü. Y.Lisans Tezi. A.Ü. Fen Bil. Enst. 85s. (Yayımlanmamış).
16. Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam K. (1991). Antifungal Antibiotics Produced by *Trichoderma* spp., *Soil Biol. Biochem.*, 23, 1011-1020.
17. Lin, A., Lee, T.M., Rern, J.C. (1994). Tricholin, a new antifungal agent from *T.viride*, and its action in biological control of *Rhizoctonia solani*. *J. Antibiot.* 47, 799-805.
18. Dickinson, J.M., Hanson, J.R., Hitchcock, P.B. and Clydon, N. (1989). Structure and biosynthesis of harzianopyridone an antifungal metabolite of *T.harzianum*. *J.Chem. Soc. Chem. Commun.* 1, 1885-1887
19. Levy, E., Eyal, Z., Carmely, S., Kashman, Y., and Chet, I. (1989). Suppression of *Septoria tritici* and *Puccinia recondita* by an antibiotic-producing fluorescent pseudomonad. *Plant Pathol.* 38, 564-570.
20. Levy, E., Gough, F.J., Berlin, K.D., Guiana, P.W., and Smith, J.T. (1992). Inhibition of *Septoria tritici* and other phytopathogenic fungi and bacteria by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics. *Plant Pathol.* 41, 335-341.
21. Keel, C., Wirthner, P.H., Hass, D., Defago, G. (1990). *Pseudomonas* as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. *Symbiosis.* 9, 327-341.

22. Keel, C., Wirthner, P.H., Hass, D., Defago, G., Voisard, C. (1992). Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microb Interact.* 5, 4-13.
23. Thomashow, L.S., Weller, D.M. (1988). Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* 170, 3499-3508.
24. Voisard, C., Keel, C., Haas, D., Defago, G. (1989). Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.* 8, 351-358.
25. Terras, F.R.G., Goderis, I.J., Van Leuven, F., Van Leuven, F., Vanderleyden, J., and Cammue, B.P.A. (1992). Analysis of two novel classes of antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus*, L) seeds. *J. Biol. Chem.* 267, 15301-15309.
26. Taylor, R., Acland, D., Attenborough, S., Cammue, B.P.A., Evans, I.J., Osborn, R.W., Ray, J., Rees, S.B., and Broekaert, W.F. (1997). A novel family of small cysteine rich antimicrobial peptides from seed in *Impatiens balsamina*. *J. Biol. Chem.* 272, 24480-24487.
27. Tansı, S. (1995). Uçucu yağların bazı bitkiler ve toprak mikroorganizmalarına etkileri. *Ç.Ü.Z.F. Dergisi* 10(2), 43-50.
28. Cammue, B.P.A., Thevissen, K., Hendricks, M., Eggermont, K., Goderis, I.J., Proost, P., Van Damme, J., Osborn, W.R., Guerbet, F., Kender, J.C., Broekaert, W.F. (1995). A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer protein. *Plant Pathol.* 109, 445-455.
29. Vigers, A.J., Roberts, K.W., and Selitrennikoff, C.P. (1991). A new family of antifungal proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4, 315-323.
30. Meyers, A.R. (2000), *Molecular Biology and Biotechnology*. pp. 1568-1569.
31. Anke, T. (Ed.) (1997). *Fungal Biotechnology*, Chapman & Hall, Weinheim. p.284-312.
32. White, T.C., Marr, K.A., Bowden, R.A. (1998). Clinical cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 382-402.