

Orijinal makale (Original article)

Kızıl Kaliforniya solucanı sölom sıvısının *Alternaria solani*'ye karşı *in vitro* biyokontrol potansiyeli

Nil Melisa Yılmaz^{1*}, Özer ÇALIŞ¹

In vitro* biocontrol potential of coelomic fluid from the red Californian earthworm against *Alternaria solani

Abstract: In this study, the *in vitro* antagonist and biocontrol potential of coelomic fluid extracted from the Red Californian earthworm (*Eisenia fetida*) via electro-stimulation was investigated against *Alternaria solani*, an important phytopathogen causing early blight in tomatoes. To determine the methodological effects on the bioactivity of the coelomic fluid, Single-Centrifuged (TS) and Double-Centrifuged (CS) formulations, along with Crude and Sterile-Filtered (0.22 µm) applications, were compared using dual-culture assays. The findings revealed that endogenous *Bacillus* sp. and secondary microbiota naturally present in the crude coelomic matrix colonized the unfiltered culture media, demonstrating that sterile filtration is essential to accurately evaluate the direct coelomolytic humoral effect. In sterile-filtered coelomic fluid assays, while the inhibition zone in the control group was almost completely closed (0.50 mm) on the 18th day of incubation, the Single-Centrifuged (TS) sterile coelomic fluid created a strong and stable inhibition zone of 24.34 mm, highly suppressing fungal mycelial growth. Conversely, in the Double-Centrifuged (CS) group, the inhibition zone dropped to 6.81 mm. In conclusion, sterilized Single-Centrifuged (TS) *E. fetida* coelomic fluid shows strong potential as an eco-friendly and sustainable biopesticide component for controlling *A. solani*.

Key words: Antifungal activity, earthworm, *Eisenia fetida*, inhibition zone

Öz: Bu çalışmada, Kızıl Kaliforniya solucanından (*Eisenia fetida*) elektro-stimülasyon yöntemiyle elde edilen sölom sıvısının, domateste erken yanıklık hastalığına neden olan önemli fitopatojen *Alternaria solani* üzerindeki *in vitro* antagonist ve biyokontrol potansiyeli araştırılmıştır. Sölom sıvısının biyoaktivitesi üzerindeki metodolojik etkileri belirlemek amacıyla Tek Santrifüjlü (TS) ve Çift Santrifüjlü (ÇS) formülasyonlar ile Ham ve Steril Filtreli (0.22 µm) uygulamalar ikili kültür testlerinde karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular, filtresiz ham sölom sıvısı ortamında matrisin doğasından kaynaklanan endojen *Bacillus* sp. ve sekonder mikrobiyota gelişiminin gözlemlendiğini; doğrudan sölomolitik hümmoral etkinin net olarak değerlendirilebilmesi için steril filtrasyonun zorunlu olduğunu göstermiştir. Steril filtre edilmiş sölom sıvısı testlerinde, inkübasyonun 18. gününde kontrol grubunda

¹Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Kampüs, 075059 Konyaaltı-Antalya/Türkiye

* Sorumlu Yazar: nilmelisa20@gmail.com

ORCID ID: 0009-0007-6851-9182; 0000-0002-7219-1219

Alınış (Received): 27 Temmuz 2026

Kabul ediliş (Accepted): 15 Eylül 2026

inhibisyon bölgesi tamamen kapanırken (0.50 mm), Tek Santrifüjlü (TS) steril söloom sıvısı 24.34 mm'lik güçlü ve kararlı bir inhibisyon zonu oluşturarak fungal misel gelişimini yüksek oranda baskılamıştır. Buna karşın Çift Santrifüjlü (ÇS) grupta inhibisyon zonu 6.81 mm'ye gerilemiştir. Sonuç olarak, sterilize edilmiş Tek Santrifüjlü (TS) *E. fetida* söloom sıvısının, *A. solani* kontrolünde çevreci ve sürdürülebilir bir biyopestisit bileşeni olarak güçlü bir potansiyel taşıdığı ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: Antifungal aktivite, *Eisenia fetida*, inhibisyon zonu, toprak solucanı

Giriş

Domates, dünya genelinde olduğu gibi Türkiye'de de ekonomik açıdan önemli bir sebzedir (Atherton & Rudich 1986; Dura & Murat 2024). Hastalıklarla mücadelede, karar destek sistemlerinin ve güncel resmi mücadele talimatlarının önemi vurgulanmaktadır (Anonim 2024; Anonim 2025; Batista et al. 2006).

Solanaceae familyasına ait bitkilerde ciddi ekonomik kayıplara neden olan *Alternaria solani*, domateste erken yaprak yanıklığı hastalığının başlıca etmenidir (Chaerani & Voorrips 2006). Optimum 28-30°C sıcaklıklarda nekrotrofik funguslarda tipik olduğu üzere, konukçu hücrelerini öldürerek beslenen (Knogge 1996); çok hücreli, bölmeli konidiosporları aracılığıyla hızla yayılarak, yaşlı yapraklarda karakteristik iç içe geçmiş koyu kahverengi nekrotik lekeler oluşturur ve şiddetli enfeksiyonlarda bitkinin tamamen kurumasına yol açar (Rotem 1994; Van der Waals et al. 2004).

Bu patojenle mücadelede kültürel önlemlerin yetersiz kalması, üreticileri yoğun bir sentetik fungusit kullanımına yönlendirmektedir. Ancak kimyasal fungusitlerin bilinçsiz kullanımı; yüzey ve yeraltı sularının kontaminasyonuna, hedef dışı organizmaların zarar görmesine ve kalıntı problemlerine neden olmaktadır (Yıldız et al. 2005). Ayrıca sentetik fungusitlerin, toprak solucanları gibi tarımsal açıdan faydalı organizmaların biyomoleküler yapısı üzerinde de olumsuz etkileri bildirilmiştir (Kumari & Shukla 2022). Daha da önemlisi, patojenin genetik uyum esnekliği nedeniyle mevcut fungusitlere karşı hızla dayanıklılık geliştirmesi, kimyasal kontrolün etkinliğini giderek azaltmaktadır. Bu durum, çevre dostu, sürdürülebilir ve patojenin kolayca dayanıklılık geliştiremeyeceği yeni nesil biyokontrol ajanlarının keşfini zorunlu kılmaktadır.

Kızıl Kaliforniya solucanı (*Eisenia fetida*), organik atıkların biyo-dönüşümünde yaygın olarak kullanılan bir tür olmasının yanı sıra (Domínguez & Edwards 2011; Tutar 2013), zengin bir biyoaktif molekül kaynağıdır. Solucanların söloom boşluğunu dolduran söloom sıvısı, hücresel ve humoral bağışıklık sisteminin temelini oluşturan antimikrobiyal peptitler, lizozimler, proteazlar ve çeşitli litik enzimler açısından zengindir (Kocakurt 2022). Bu sıvı evrimsel süreçte toprak kökenli patojen organizmalara, funguslara ve bakterilere karşı bir savunma stratejisi olarak gelişmiştir (Gudeta et al. 2022).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, söloom sıvısının ve söloomosit adı verilen bağışıklık hücrelerinin çeşitli mikroorganizmalar ve hücre hatları üzerinde güçlü sitotoksik, litik ve antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğunu göstermektedir (Bilej et al. 1995; 2010; Aydılek 2012). Lumbricin, fetidin, lysenin ve coelomic cytolytic

factor-1 / CCF-1 gibi spesifik proteinlerin, fitopatojen fungusların hücre duvarı bütünlüğünü bozarak doğrudan litik etki yaratma veya patojenin saldırganlık genlerinin hücresel düzeyde baskılanması yoluyla enfeksiyon mekanizmalarını sekteye uğratma potansiyeli bulunmaktadır (Bilej et al. 1995; Kobayashi et al. 2001). Sölom sıvısında doğal olarak bulunan bu sitolitik faktörler, yabancı hücrelerin zarlarındaki lipid bileşenlerine spesifik olarak bağlanarak membran üzerinde gözenekler açmakta ve hedef hücreyi geri dönüşümsüz bir yıkıma sürüklemektedir (Kobayashi et al. 2001).

Sölom sıvısının, vermikompost vb. türevlerinin bazı patojenler üzerindeki etkileri çalışılmış olsa da (Tutar 2013), saf sölom sıvısının yeşil aksam patojenleri üzerindeki spesifik antifungal mekanizmaları ve doğrudan biyokontrol potansiyeli hakkındaki literatür oldukça sınırlıdır. Bu bağlamda çalışmanın amacı, *E. fetida*'dan ekstrakt edilen sölom sıvısının, domateste erken yanıklık hastalığı etmeni *A. solani* üzerindeki *in vitro* antifungal etkinliğini belirlemek ve hücresel düzeydeki biyokontrol potansiyelini, sterilizasyon ve santrifüj parametreleriyle karşılaştırmalı olarak ortaya koymaktır.

Materyal ve Yöntem

Fungal izolasyon ve kültürel işlemler

Çalışmada kullanılan erken yanıklık hastalığı etmeni *Alternaria solani* izolatu, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Moleküler Mikoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Patojenik izolat, 9 cm çapındaki petri kaplarında Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyerinde 26°C'de kültüre alınmıştır. Fungal misellerin ve konidiospor yapıların ışık mikroskobu altında teşhisi ve morfolojik doğrulaması yapıldıktan sonra patojen, *in vitro* testlerde kullanılmak üzere taze PDA ortamında alt kültüre alınarak çoğaltılmıştır.

Solucan temini ve sölom sıvısının ekstraksiyonu

Denemelerde kullanılan Kızıl Kaliforniya solucanları (*Eisenia fetida*), ticari bir işletmeden (Argesol Tarım Hayvancılık San. ve Tic. Ltd. Şti., Balıkesir) temin edilmiştir. 45 adet sağlıklı ve ergin solucan seçilmiş, yüzeylerindeki kompost partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla steril distile su ile yıkanmış ve kâğıt havlu üzerinde kurulanmıştır.

Sölom sıvısının elde edilmesi amacıyla solucanlar 15'erli 3 gruba ayrılmış ve her bir grup 4 ml %0.9'luk salin (NaCl) solüsyonu içeren beherlere aktarılmıştır. Sölom sıvısı ekstraksiyonu, humoral ve hücresel stresi teşvik etmek amacıyla girişimsel olmayan elektriksel uyarım (non-invaziv elektro-stimülasyon) yöntemiyle (5V DC, 30 s), literatürde tanımlanan protokoller esas alınarak gerçekleştirilmiştir (Bilej et al. 1995; Cooper et al. 2002). Uygulama sonrası solucanlar ortamdaki uzaklaştırılarak, salgılanan sarı renkteki ham sölom sıvısı mikro pipet yardımıyla toplanmıştır. Protein yıkımını önlemek amacıyla tüm işlemler buz banyosu üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Toplanan sıvı, 1 ml'lik hacimler halinde üç gruba (PDA1, PDA2, PDA3) ayrılarak Eppendorf tüplerine aktarılmış ve 5000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Bu üç grup (PDA1, PDA2, PDA3), her biri ayrı bir 15 solucanlık gruptan elde edilen sölom sıvısına karşılık gelmekte olup, çalışmanın üç bağımsız biyolojik tekerrürünü oluşturmaktadır; herhangi bir gruba farklı bir işlem uygulanmamıştır. Antifungal aktivite testlerinde her bir biyolojik tekerrür (PDA1, PDA2, PDA3) ayrıca üçer teknik tekerrürlü olarak değerlendirilmiş, böylece TS uygulaması için toplam dokuz petri kabı kullanılmıştır. İlk santrifüj sonrası elde edilen süpernatant Tek Santrifüjlü Sölom Sıvısı (TS) olarak adlandırılmıştır. Bu süpernatantın bir kısmı alınarak ikinci kez santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve Çift Santrifüjlü Sölom Sıvısı (ÇS) elde edilmiştir. Elde edilen sölom sıvıları kullanılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

***In vitro* antifungal aktivite testleri**

Sölom sıvısının *A. solani* üzerindeki antagonist etkisini belirlemek için modifiye edilmiş ikili kültür yöntemi kullanılmıştır (Dennis & Webster 1971). Antifungal aktivite testleri iki farklı yaklaşımla gerçekleştirilmiştir:

I. Ham Sölom Sıvısı Uygulaması: PDA besiyeri içeren petrilerin bir ucuna 10 mm (1cm) çapında taze *A. solani* misel diski yerleştirilmiştir. Patojen diskinin tam karşısına, 5 cm mesafe bırakılarak steril bir cork borer yardımıyla açılan 10 mm (1 cm) çapındaki kuyucuğa 100 µl ham sölom sıvısı (PDA1TS, PDA2TS, PDA3TS grupları ve ÇS grubu) aktarılmıştır.

II. Steril Filtreli Sölom Sıvısı Uygulaması: Ortamdaki olası sekonder mikroorganizma kontaminasyonunu engellemek amacıyla, TS ve ÇS formlarındaki sölom sıvıları 0.22 µm por çapına sahip steril şırınga filtrelerden geçirilmiştir. Filtre edilmiş 100 µl sıvı, misel diskinin karşısına aynı şekilde uygulanmıştır.

Her iki deneme setinde de kontrol grubu olarak açılan kuyucuklara sadece 100 µl steril distile su damlatılmıştır. Denemeler; tamamen tesadüfi desene göre üç tekerrürlü, her uygulama için 3'er petri olarak kurulmuştur. Hazırlanan petriler 26°C'ye ayarlanmış inkübatörde karanlık koşullarda inkübe edilmiştir.

Verilerin değerlendirilmesi

Antifungal aktivitenin belirlenmesi için, sölom sıvısı ile patojen diski arasındaki miseliyal gelişimi engelleyen inhibisyon zonu dijital kumpas yardımıyla ölçülmüştür. Ölçümler, fungal büyüme dinamiklerini gözlemlemek amacıyla inkübasyonun 4., 8. ve 18. günlerinde gerçekleştirilmiş olup, elde edilen ölçüm verilerinin ortalamaları hesaplanarak tablolastırılmıştır. Uygulama grupları arasındaki farkların istatistiksel açıdan anlamlılığı tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile değerlendirilmiş, ANOVA sonucunda anlamlı fark tespit edilen zaman noktalarında grup ortalamaları arasındaki farklar Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi ($\alpha=0.05$) ile belirlenmiştir. İstatistiksel olarak birbirinden farklı bulunan gruplar, tablolarda farklı küçük harflerle (a, b, c) gösterilmiştir. Tüm

istatistiksel analizler Python programlama dili (v3.11) ile SciPy ve statsmodels kütüphaneleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

In vitro koşullarda gerçekleştirilen antifungal aktivite testlerinde, Kızıl Kaliforniya solucanından (*Eisenia fetida*) elde edilen sölom sıvısının *Alternaria solani* misel gelişimi üzerindeki antagonist etkisi, ikili kültür yönteminde oluşan inhibisyon zonu (mm) ölçümleri ile değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular; hümmoral ve mikrobiyolojik etki mekanizmalarını ayırtırmak amacıyla Ham (Filtresiz) ve Steril Filtreli sölom sıvısı uygulamaları olmak üzere iki ayrı başlık altında incelenmiştir.

Filtre edilmemiş ham sölom sıvısının uygulandığı ikili kültür testlerinde, inkübasyonun 4. gününe kadar tüm deneysel gruplarda patojenik fungal büyüme başlamış olup, uygulamalar arasında görsel ve istatistiksel olarak belirgin bir fark saptanmamıştır (tek yönlü ANOVA, $F(4, 10)=2.09$; $p=0.158$) (Şekil 1).

Inkübasyonun 8. gününden itibaren antifungal baskılanmaya bağılı olarak inhibisyon zonları belirginleşmeye başlamıştır. Bu evrede kontrol grubunda patojenik gelişim hızlanmış, patojen misel hattı ile kuyucuk arasındaki mesafe 10.04 mm'ye gerilemiştir. Aynı inkübasyon periyodunda ham sölom sıvısı uygulanan Tek Santrifüjlü (TS) gruplarda (PDA1TS, PDA2TS, PDA3TS) sırasıyla ortalama 28.65 mm, 22.92 mm ve 24.13 mm inhibisyon zonu ölçülürken; Çift Santrifüjlü (ÇS) grupta bu değer 23.59 mm olarak kaydedilmiştir (Şekil 2).

Inkübasyonun 18. gününde kontrol grubundaki petrilere *A. solani* miselleri petri alanını tamamen kaplayarak inhibisyon zonunu sıfırlamıştır (0.00 mm). Buna karşın sölom sıvısı uygulanan gruplarda patojenik gelişimin anlamlı düzeyde sınırlandığı tespit edilmiştir (tek yönlü ANOVA, $F(4, 10)=30.59$; $p<0.001$). Tukey HSD testine göre PDA1TS grubu, diğler tüm uygulama gruplarından (PDA2TS, PDA3TS, ÇS) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek inhibisyon göstermiştir ($p<0.05$); PDA2TS, PDA3TS ve ÇS grupları ise kendi aralarında anlamlı farklılık göstermemiştir (Şekil 3). En yüksek miselyal baskılama PDA1TS uygulamasında 27.57 mm ile elde edilmiş; PDA2TS (18.62 mm), PDA3TS (18.72 mm) ve ÇS (13.48 mm) uygulamalarında ise daha düşük düzeyde bir inhibisyon kaydedilmiştir (Çizelge 1).

Diğler taraftan, steril filtre edilmemiş ham sölom sıvısı içeren tüm deneme setlerinde, sölom matrisinin yapısında doğall olarak bulunan endojen/simbioyotik *Bacillus* sp. kolonileşmesi ile sekonder mikroflora faaliyetleri gözlemlenmiştir. Ortamda gelişen sekonder mikrobiyota, filtresiz deneme setinde sölom sıvısının hümmoral faktörlerine bağılı doğrudan antagonist etkisinin saf olarak izole edilmesini ve değerlendirilmesini kısıtlamıştır.

Çizelge 1. *In vitro* ikili kültür testlerinde filtresiz (ham) söloom sıvısı uygulamalarının *Alternaria solani* misel gelişimi üzerindeki inhibisyon zonu (mm) ölçümleri

Table 1. In vitro inhibition zone (mm) measurements of unfiltered (crude) coelomic fluid applications on the mycelial growth of *Alternaria solani* in dual-culture tests

Uygulamalar	İnokülasyondan Sonra Geçen Zamana Bağlı Engelleme Mesafesi (mm)		
	4. Gün	8. Gün	18. Gün
Kontrol	26.29 ± 2.65 a	10.04 ± 0.18 b	0 ± 0 c
PDA1TS	31.85 ± 2.13 a	28.65 ± 2.28 a	27.57 ± 1.94 a
PDA2TS	32.01 ± 3.55 a	22.92 ± 3.18 a	18.62 ± 2.06 b
PDA3TS	31.75 ± 5.13 a	24.13 ± 4.05 a	18.72 ± 4.82 b
ÇS	33.38 ± 1.93 a	23.59 ± 2.53 a	13.48 ± 4.36 b

TS: Tek Santrifüjlü, ÇS: Çift Santrifüjlü. Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (Tukey HSD, $p < 0.05$); aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark anlamlı değildir. 4. günde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$).



Şekil 1. Filtresiz söloom sıvısı uygulanan ikili kültür petrilerinde inkübasyonun 4. günündeki gelişimler ve sekonder mikroorganizma (farklı fungal ve bakteriyel koloniler) kolonizasyonunun başlangıcı.

Figure 1. Development in dual-culture plates treated with unfiltered coelomic fluid on day 4 of incubation, and the onset of colonization by secondary microorganisms (different fungal and bacterial colonies).



Şekil 2. İnkübasyonun 8. gününde filtresiz Tek Santrifüjlü (TS) sölom sıvısı uygulamalarında (PDA1, PDA2, PDA3 grupları) *Alternaria solani* gelişimi ve ortamdaki antagonist sekonder mikroorganizma faaliyetleri.

Figure 2. Growth of *Alternaria solani* and activity of antagonistic secondary microorganisms in the medium in unfiltered Single-Centrifuged (TS) coelomic fluid treatments (PDA1, PDA2, PDA3 groups) on day 8 of incubation.



Şekil 3. İnkübasyonun 18. gününde filtresiz sölom sıvısı deneme gruplarında (TS ve ÇS) gözlenen inhibisyon zonları ile kontrol grubunda petriyi tamamen kaplayan *Alternaria solani* misellerinin görünümü.

Figure 3. Inhibition zones observed in the unfiltered coelomic fluid treatment groups (TS and ÇS) on day 18 of incubation, and the appearance of *Alternaria solani* mycelia completely covering the plate in the control group.

Sekonder mikroorganizma kontaminasyonunu ortadan kaldırmak amacıyla steril şırınga filtresinden ($0.22 \mu\text{m}$) geçirilen sölom sıvısı ile yapılan denemelerde, inkübasyonun 10. gününden itibaren belirgin farklar ortaya çıkmıştır. 10. günde TS uygulamasında 26.10 mm inhibisyon zonu ölçülürken, ÇS uygulamasında bu değer 18.64 mm'de, kontrol grubunda ise 13.19 mm'de kalmıştır.

İnkübasyonun 14. gününde TS uygulaması 25.72 mm fungal gelişimi baskılamayı sürdürmüştür. ÇS uygulamasında patojen gelişimi hızlanmış ve inhibisyon zonu 12.14 mm'ye gerilemiştir (Kontrol: 1.67 mm) (Şekil 4). Deneyin sonlandırıldığı 18. günde ise kontrol grubunda inhibisyon bölgesi kapanma noktasına gelmiş (0.5 mm), TS uygulamasında inhibisyon zonu 24.34 mm olarak korunmuş, ÇS uygulamasında ise etki azalarak 6.81 mm'ye düştüğü belirlenmiştir; her üç uygulama günü (10., 14. ve 18. gün) için gruplar arasındaki farklar tek yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($p < 0.001$) ve Tukey HSD testine göre TS, ÇS ve Kontrol grupları birbirinden anlamlı düzeyde farklılaşmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 5). Steril filtreli deneme setinde hiçbir sekonder mikrobiyal gelişime rastlanmamış olup; Tek Santrifüjlü (TS) steril sölom sıvısının, *A. solani* misel gelişimini en yüksek oranda ve zaman içerisinde en stabil şekilde baskılayan formülasyon olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 2. *İn vitro* koşullarda steril şırınga filtresinden geçirilmiş sölom sıvısı uygulamalarının (TS ve ÇS) *Alternaria solani*'ye karşı oluşturduğu inhibisyon zonu (mm) değerleri

Table 2. Inhibition zone (mm) values produced against *Alternaria solani* by sterile syringe-filtered coelomic fluid applications (TS and CS) under in vitro conditions.

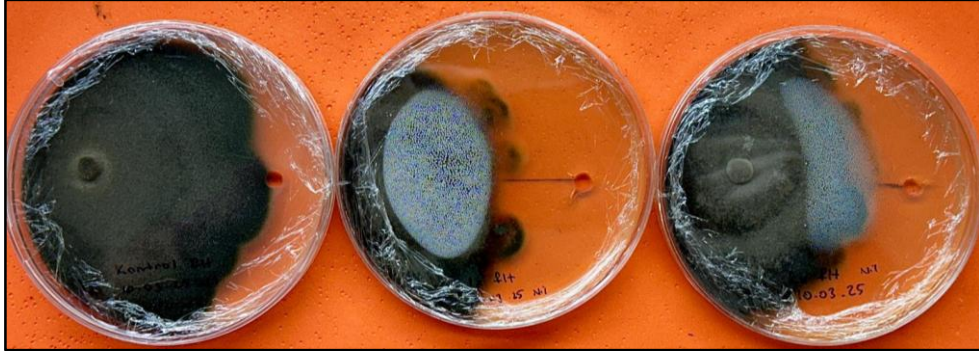
Uygulamalar	İnokülasyondan Sonra Geçen Zamana Bağlı Engelleme Mesafesi		
	10. Gün (mm)	14. Gün (mm)	18. Gün (mm)
Kontrol	13.19 ± 1.84 c	1.67 ± 1.26 c	0.5 ± 0.40 c
TS	26.10 ± 1.17 a	25.72 ± 1.12 a	24.34 ± 0.83 a
ÇS	18.64 ± 1.29 b	12.14 ± 1.24 b	6.81 ± 0.99 b

TS: Tek Santrifüjlü, ÇS: Çift Santrifüjlü. Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (Tukey HSD, $p < 0.05$).



Şekil 4. İnkübasyonun 14. gününde steril şırınga filtresinden geçirilmiş Tek Santrifüjlü (TS) ve Çift Santrifüjlü (ÇS) sölom sıvısı uygulamalarının *Alternaria solani* gelişimini baskılama düzeyleri ile kontrol grubu arasındaki makroskobik farklar.

Figure 4. Macroscopic differences in the suppression of *Alternaria solani* growth between the sterile syringe-filtered Single-Centrifuged (TS) and Double-Centrifuged (CS) coelomic fluid treatments and the control group on day 14 of incubation.



Şekil 5. Deneyin sonlandırıldığı 18. Günde kontrol grubu ve steril filtreli Tek Santrifüjlü (TS) ve Çift Santrifüjlü (ÇS) sölom sıvısı uygulamalarındaki nihai inhibisyon zonu görünümü.
Figure 5. Final appearance of the inhibition zones in the control group and the sterile-filtered Single-Centrifuged (TS) and Double-Centrifuged (CS) coelomic fluid treatments on day 18, when the experiment was terminated

Elde edilen bulguların yorumlanabilmesi için, *E. fetida* sölom sıvısının literatürde tanımlanmış biyokimyasal bileşimini kısaca özetlemek yararlı olacaktır. Sölom sıvısı; başlıca sölomositler (amebositler ve eleositler) ile bu hücrelerden salgılanan ya da hümmoral yolla üretilen çok sayıda biyoaktif molekülü bir arada barındıran karmaşık bir matristir. Bu moleküller arasında, gözenek oluşturan bir sitolitik protein olan ve sfingomiyeline bağlanarak hücre zarında lizise yol açan lysenin (yaklaşık 33-45 kDa), antibakteriyel özellikteki fetidin, kalsiyum bağımlı bir pattern-recognition proteini olan koelomik sitolitik faktör (CCF-1, ~42 kDa) ve prolin bakımından zengin, geniş spektrumlu bir antimikrobiyal peptit olan lumbricin-I yer almaktadır (Bilej et al. 1995; Sekizawa et al. 1997; Beschin et al. 1998; Kobayashi et al. 2001; Bilej et al. 2010;). Ayrıca sölom sıvısında çeşitli hidrolitik enzimler (proteazlar, lizozimler, metaloenzimler) ile fibrinolitik ve antioksidan aktiviteye sahip bileşenlerin de bulunduğu bildirilmiştir (Kauschke et al. 1997; Popović et al. 2005). Bu çok bileşenli yapı, sölom sıvısının hem bakteriler hem de funguslar gibi farklı mikroorganizma gruplarına karşı geniş spektrumlu bir biyoaktivite sergilemesinin olası temelini oluşturmaktadır.

Bu çalışmanın bulguları, Kızıl Kaliforniya solucanından (*Eisenia fetida*) ekstrakt edilen sölom sıvısının, domates ve patateste yıkıcı zararlara yol açan yeşil aksam patojeni *Alternaria solani*'nin misel gelişimi üzerinde *in vitro* koşullarda güçlü bir antagonist etki sergilediğini açıkça ortaya koymaktadır. Literatürde sölom sıvısının ve sölomositlerin omurgalı hücre hatları ve bakteriler üzerindeki litik etkileri geniş çapta incelenmiş olmakla birlikte (Milochau et al. 1997; Cooper et al. 2002) bu çalışma, söz konusu biyoaktif matriksin ekonomik öneme sahip fitopatogen bir fungus üzerindeki doğrudan biyokontrol potansiyelini ve zamana bağlı kararlılığını kanıtlaması açısından önemli bir temel oluşturmaktadır. Nitekim yakın tarihli çalışmalar da sölom sıvısının bitki patojeni bir başka fungus olan *Fusarium oxysporum* üzerinde benzer bir inhibitör etki sergilediğini (Plavšin et al. 2017) ve solucan sölom sıvısının bakteriyel patojenlere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini (Tutar & Karaman 2017; Danafar & Shokoohi 2025) bildirerek bulgularımızı desteklemektedir. Plavšin et al. (2017), *Dendrobaena veneta* ve *E.*

fetida'dan elde edilen söloom sıvısının *F. oxysporum*'un misel gelişimini konsantrasyona bağlı şekilde baskıladığını bildirmiştir; bu bulgu, mevcut çalışmada TS grubunda gözlenen güçlü ve kararlı inhibisyonla (18. günde 24.34 mm) yönsel olarak örtüşmektedir. Ancak söz konusu çalışmada santrifüj veya filtrasyon parametrelerinin biyoaktivite üzerindeki etkisi değerlendirilmediğinden, mevcut çalışma bu metodolojik değişkenlerin (TS/ÇS, ham/steril) etkisini ortaya koyması bakımından literatüre ek bir katkı sunmaktadır. Benzer şekilde Tutar & Karaman (2017), *E. fetida* mukus ve söloom sıvısının çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri türlerine karşı disk difüzyon yöntemiyle ölçülebilir inhibisyon zonları oluşturduğunu; Danafar & Shokoohi (2025) ise söloom sıvısının diyabetik yara enfeksiyonu etmeni bakterilere karşı hem antioksidan hem antibakteriyel etki sergilediğini rapor etmiştir. Bu çalışmalar, söloom sıvısının antimikrobiyal etkinliğinin bakterilerin ötesine, fitopatojen funguslara kadar uzandığını doğrulayan mevcut bulgularla tutarlılık göstermektedir; ancak literatürde doğrudan *A. solani* gibi ekonomik öneme sahip bir yeşil aksam patojenine karşı test edilmiş bir çalışmaya rastlanmamış olması, mevcut araştırmayı özgün kılmaktadır. Konunun güncelliğini teyit eden yakın tarihli bir çalışmada, Ećimović et al. (2021), *Eisenia andrei*, *Dendrobaena veneta* ve *Allolobophora chlorotica* türlerinden elde edilen söloom sıvısı özütlerinin altı farklı fitopatojen fungus türünün (*Berkeleyomyces basicola*, *Fusarium culmorum*, *Globisporangium irregulare*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* ve *Sclerotinia sclerotiorum*) gelişimini baskıladığını göstermiş ve en güçlü etkiyi *E. andrei* söloom sıvısının *R. solani* üzerinde sergilediğini bildirmiştir; bu bulgu, söloom sıvısının antifungal etkinliğinin tek bir tür veya patojenle sınırlı olmadığını, farklı solucan ve fungus türleri arasında genellenebilir bir fenomen olduğunu desteklemektedir. Benzer şekilde, çok yakın tarihli bir çalışmada Sanaiirad et al. (2025), *E. fetida* söloom sıvısı özütünün insan patojeni fırsatçı funguslar olan *Aspergillus fumigatus* ve *Candida albicans* üzerinde doza bağlı ve ölçülebilir bir inhibisyon etkisi gösterdiğini, ancak *Cryptococcus neoformans*'a karşı etkinliğin sınırlı kaldığını bildirmiştir; bu sonuç, söloom sıvısının antifungal etkinliğinin hem konakçı bitkiye hem de hedef fungusa özgü olabileceğine işaret etmesi bakımından mevcut çalışmanın bulgularıyla birlikte değerlendirilmeye değerdir.

Denemelerde, özellikle sterilize edilmiş Tek Santrifüjlü (TS) söloom sıvısı uygulamasının, Çift Santrifüjlü (ÇS) uygulamaya kıyasla patojen üzerinde çok daha yüksek ve kararlı bir inhibisyon zonu (18. günde TS: 24.34 mm; ÇS: 6.81 mm) oluşturduğu saptanmıştır. Ardışık ve yüksek devirli santrifüj işleminin (ÇS), sıvının biyolojik aktivitesinden sorumlu olan yüksek moleküler ağırlıklı biyoaktif protein fraksiyonlarının ve litik enzimlerin çökelerek ortamdaki uzaklaşmasına yol açtığı değerlendirilmektedir; ancak bu çalışma kapsamında söloom sıvısının protein profili (örn. SDS-PAGE, kütle spektrometrisi) doğrudan analiz edilmemiş olup, önerilen mekanizma yukarıda özetlenen literatür bulgularına dayanan bir çıkarım niteliğindedir ve ileriki çalışmalarda deneysel olarak doğrulanmayı gerektirmektedir.

Nitekim *E. fetida* söloom sıvısının protein profillerini inceleyen SDS-PAGE zimogram çalışmalarında, biyolojik aktivitesinden sorumlu olan en baskın protein bantlarının 30-46 kDa moleküler ağırlık aralığında kümелendiği bildirilmiştir (Bilej et al. 2000; Procházková et al. 2006). Bu ağırlık aralığı, literatürde *E. fetida*'ya özgü

gözenek oluşturan ve hedef hücre membranlarını kararsızlaştırarak lizise uğratan ünlü biyoaktif protein aileleri (*fetidin*: 40-45 kDa, *ccf-1*: 42 kDa, *lysenin/eiseniapore*: 38-41 kDa) ile tam bir morfolojik uyum göstermektedir (Lassegues et al. 1997; Sekizawa et al. 1997; Beschin et al. 1998). Nitekim sölom sıvısından saflaştırılan benzer moleküler ağırlıktaki proteinlerin hemolitik ve antibakteriyel aktivite gösterdiği (Hua et al. 2011), ayrıca sölomositlerden elde edilen özütlerin insan tümör hücre hatları üzerinde sitotoksik/apoptotik etki sergilediği (Yanqin et al. 2007) bildirilmiştir; bu da söz konusu protein ailelerinin geniş bir hedef yelpazesine karşı litik aktiviteye sahip olduğunu desteklemektedir. Dolayısıyla, TS formundaki sölom sıvısında bu makromoleküler yapıların bütünlüğü korunurken, ÇS formunda bu koruyucu proteinlerin çökelme yoluyla kaybedildiği ve buna bağlı olarak antifungal sitotoksitenin düştüğü hipotezi güçlenmektedir.

Sölom sıvısının sergilediği makroskobik antifungal aktivitenin arkasındaki temel hücresel mekanizmalardan bir diğeri, bünyesinde barındırdığı zengin ekstraselüler enzim ağıdır. Yapılan kantitatif enzim çalışmalarında, sölom sıvısının yüksek düzeyde proteaz, amilaz, selüloz ve fitaz aktivitelerine sahip olduğu kanıtlanmıştır (Prakash et al. 2018). Matrikste bulunan proteazlar ve selülozlar, *A. solani* gibi fitopatojenlerin kitin ve glukan bazlı hücre duvarı bileşenlerini enzimatik olarak katalize etme, hücre duvarı bütünlüğünü bozma ve hiyalin amebosit mekanizmalarıyla fungus üzerinde sitolitik bir yıkım yaratma potansiyeline sahiptir (Popović et al. 2005).

Steril filtre edilmemiş ham sölom sıvısı uygulanan petrilere sekonder mikroorganizmaların gelişmesi ise, matrisin doğası gereği bünyesinde barındırdığı zengin mikrobiyal yükten kaynaklanmaktadır. Filogenetik ve 16S rRNA gen dizileme çalışmaları, sölom sıvısının doğal olarak *Bacillus cereus* ve *Bacillus thuringiensis* gibi rizosferde ve bağırsak florasında simbiyotik yaşayan endojen *Bacillus* sp. suşlarını barındırdığını doğrulamaktadır (Toyota ve Kimura 2000; Byzov et al. 2009). Bu bakteriler bitki gelişimini uyaran ve ekstraselüler enzim sekresyonu yüksek olan faydalı mikroorganizmalar olmalarına rağmen, *in vitro* ikili kültür testlerinde *A. solani* üzerindeki doğrudan sölomolitik antifungal etkinin izole edilmesini zorlaştırmakta, bu da sölom sıvısının tarımsal uygulamalarda biyoaktif bileşenleri korunarak steril filtre (0.22 µm) edilmesinin zorunluluğunu ortaya koymaktadır.

Solucan bağışıklık faktörlerinin çevre şartlarına duyarlılığı göz önüne alındığında, sölom sıvısının *in vitro* testleri ve muhafaza süreçlerinde metodolojik optimizasyonlar büyük önem taşımaktadır. Literatür bulguları, sölomositlerin ve proteinlerin hücresel canlılığını korumak için en kararlı inkübasyon sıcaklığının 25°C olduğunu (Kauschke et al. 1997); protein yapısını bozan etkilere karşı korunması ve fizyolojik pH'ın (7.2-7.4) stabilize edilmesi için ortama 10 mM HEPES gibi zwitteriyonik bir tamponun ilave edilmesinin biyoaktivite kararlılığını artıracak olduğunu göstermektedir (Coperchini et al. 2015). Benzer şekilde, sölomosit kültür koşullarının optimize edilmesinin hücresel canlılığı ve deney tekrarlanabilirliğini doğrudan etkilediği de vurgulanmıştır (Fuller-Espie et al. 2015).

Sonuç

Bu çalışmada elde edilen *in vitro* veriler, Kızıl Kaliforniya solucanından (*E. fetida*) elde edilen sterilize edilmiş Tek Santrifüjlü (TS) sölom sıvısının, *A. solani* gelişimini baskılamada sürdürülebilir ve güçlü bir biyolojik mücadele faktörü adayı olduğunu ortaya koymuştur. Bu potansiyelin endüstriyel ve tarladaki biyopestisit uygulamalarına aktarılabilmesi amacıyla gelecekte şu çalışmaların yapılması önerilmektedir:

I. Moleküler ve Transkripsiyonel Analizler: Sölom sıvısı bileşenlerinin, *A. solani*'nin hücre duvarı sentezi veya saldırganlıktan sorumlu genlerin ifade düzeylerinde yol açtığı transkripsiyonel değişimler RT-qPCR analizleriyle hücresel düzeyde haritalandırılmalıdır.

II. RNA Susturma Mekanizmaları: Sıvının fungus üzerinde RNAi benzeri mekanizmaları veya konukçu tarafından tetiklenen gen susturma (HIGS) yollarını harekete geçirip geçirmediği moleküler boyutta aydınlatılmalıdır.

III. Analitik Karakterizasyon ve Saflaştırma: Etken antimikrobiyal peptitler ve protein fraksiyonları LC-MS/MS veya FPLC gibi kromatografik yöntemlerle saflaştırılmalı, karbohidrat/protein profilleri kantitatif olarak netleştirilmelidir.

IV. *In Vivo* ve Ekotoksikolojik Formülasyon Çalışmaları: *In vitro* ortamda elde edilen veriler saksı ve tarla denemelerine taşınmalı; sölom sıvısının bitki fizyolojisi, faydalı toprak mikrobiyotası ve hedef dışı organizmalar üzerindeki ekotoksikolojik etkileri belirlenerek optimum uygulama dozları standardize edilmelidir.

V. Entegre Mücadele Stratejileri: Sölom sıvısı temelli biyopestisit uygulamalarının, erken yanıklık hastalığına dayanıklılık ıslahı yapılmış domates çeşitleriyle (Mutschler et al. 2006) birlikte kullanımının entegre hastalık yönetimindeki sinerjik etkisi araştırılmalıdır.

Çalışmanın Sınırlılıkları: Bu araştırma, bilinçli olarak *in vitro* koşullarla sınırlandırılmış bir ilk aşama çalışması olarak tasarlanmıştır; bulgular saksı veya saha koşullarında bir bitki-patojen-biyoajan etkileşimini yansıtmamaktadır ve sölom sıvısının bitki üzerindeki fitotoksitesi bu çalışmada değerlendirilmemiştir. Ayrıca sölom sıvısının protein/enzim bileşimi bu çalışmada doğrudan analiz edilmemiş olup, öne sürülen etki mekanizmaları literatür temelli çıkarımlardır. Bu sınırlılıklar göz önünde bulundurularak, bulgular saksı ve saha denemeleriyle doğrulanmadan önce bir ön bulgu (proof-of-concept) niteliğinde değerlendirilmelidir.

Teşekkür

Bu çalışmada, sölom sıvısı ekstraksiyonu aşamasında elektrik doğru akım (DC) sisteminin kurulması ve uygulanmasındaki değerli teknik desteklerinden dolayı Dr. Öğr. Üyesi Ali Onur KAYA ve Doktora Öğrencisi Mert Can EMRE'ye teşekkürlerimizi sunarız. *Alternaria solani* izolatının kültürel işlemlerinde ve patojenin laboratuvar koşullarında çoğaltılmasında sağladığı katkılar için Yüksek Lisans Öğrencisi Abdellahe GALLEDU'ya minnettarız. Ayrıca, denemelerde kullanılan Kızıl Kaliforniya (*Eisenia fetida*) solucanlarının temininde sağladıkları kolaylık ve destekleri için Argesol Tarım Hayvancılık Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti.'ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Anonim, 2024. Domates, patlıcan ve patatestede erken yanıklık hastalığı (*Alternaria solani*). Kayseri İl Tarım ve Orman Müdürlüğü, Kayseri.
- Anonim, 2025. Ziraî Mücadele Teknik Talimatları, Cilt 3: Domates, Patlıcan ve Patatestede Erken Yanıklık Hastalığı (*Alternaria solani* Ell. & Mart.). T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM), Ankara.
- Atherton J.G. & J. Rudich, 1986. *The tomato crop: A scientific basis for improvement*. Chapman and Hall, London.
- Aydilek S., 2012. Toprak solucanlarından elde edilen sölom sıvılarının çeşitli hücreler üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Batista D.C., M.A. Lima, F. Haddad, L.A. Maffia & E.S.G. Mizubuti, 2006. Validation of decision support systems for tomato early blight and potato late blight under Brazilian conditions. *Crop Protection*, 25(7): 664-670.
- Beschin A., M. Bilej, F. Hanssens, J. Raymakers, E. Van Dijck, H. Revets, ... & P. De Baetselier, 1998. Identification and cloning of a 42-kDa coelomic fluid protein, CCF-1, a novel pattern recognition protein of *Eisenia foetida* reacting with β -1,3-glucan and lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, 273(38): 24944-24948.
- Bilej M., L. Brys, A. Beschin, R. Lucas, E. Vercauteren, R. Hanušová & P. De Baetselier, 1995. Identification of a cytolytic protein in the coelomic fluid of *Eisenia foetida* earthworms. *Immunology Letters*, 45(1-2): 123-128.
- Bilej M., De Baetselier P. & A. Beschin, 2000. Antimicrobial defense of the earthworm *Eisenia foetida*. *Folia Microbiologica*, 45(4): 283-300.
- Bilej M., P. Procházková, M. Šilerová & R. Josková, 2010. Earthworm immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 708: 66-79.
- Byzov B.A., N.V. Khomyakov, S.A. Kharin & A.V. Kurakov, 2009. Fate of soil bacteria and fungi in the gut of earthworms. *European Journal of Soil Biology*, 45(3): 209-215.
- Chaerani R. & R.E. Voorrips, 2006. Tomato early blight (*Alternaria solani*): The pathogen, genetics, and breeding for resistance. *Journal of General Plant Pathology*, 72(6): 335-347.
- Cooper E.L., E. Kauschke & A. Cossarizza, 2002. Digging for innate immunity since Darwin in *Lumbricus terrestris*. *BioEssays*, 24(4): 319-333.
- Coperchini F., P. Engelmann, B. Oppen, C. Bodó & P. Nemeth, 2015. Effect of temperature and pH variation on the cytotoxic and hemolytic activity of *Eisenia fetida* coelomic fluid. *Developmental & Comparative Immunology*, 50(2): 115-121.
- Danafar N. & M. Shokoohi, 2025. In vitro investigations of coelomic fluid of *Eisenia fetida*: Protein analysis, antioxidant activities and antibacterial effects on diabetic wounds' bacteria. *Iranian Journal of Microbiology*, 17(1): 163-170.
- Dennis C. & J. Webster, 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society, 57(1): 25-39.
- Domínguez J. & C.A. Edwards, 2011. Biology and ecology of earthworm species used for vermicomposting. In: Edwards C.A., N.Q. Arancon & R.L. Sherman (Eds.), *Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management*. CRC Press, Boca Raton, pp. 25-37.
- Dura S. & Ö. Murat, 2024. 2023 ve 2024 yıllarına ait Türkiye domates üretiminin değerlendirilmesi. Tarım Gündemi Dergisi.
- Ečimović S., K. Vrandečić, M. Kujavec, M. Žulj, J. Čosić & M. Velki, 2021. Antifungal activity of earthworm coelomic fluid obtained from *Eisenia andrei*, *Dendrobaena veneta*

- and *Allolobophora chlorotica* on six species of phytopathogenic fungi. *Environments*, 8(10): 102.
- Fuller-Espie S.L., D.R. Harris, J.H. Daly & J.M. Jakeman, 2015. Optimization of cell culture conditions for the earthworm *Eisenia hortensis*: A study investigating the effects of media, carbon dioxide, temperature, serum, and anti-fungal agents. *Journal of the Pennsylvania Academy of Science*, 89(2): 57-68.
- Gudeta K., A. Bhagat, J.M. Julka, R. Sinha, R. Verma, A. Kumar, S. Kumari, F. Ameen, S. A. Bhat, R. Amarowicz & M. Sharma, 2022. Vermicompost and its derivatives against phytopathogenic fungi in the soil: A review. *Horticulturae*, 8(4): 311.
- Hua Z., Y.H. Wang, H.W. Cao, L.J. Pu & Y.D. Cui, 2011. Purification of a protein from coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* and evaluation of its hemolytic, antibacterial, and antitumor activities. *Pharmaceutical Biology*, 49(3): 269-275.
- Kauschke E., W. Mohrig & E.L. Cooper, 1997. Coelomic fluid properties of earthworms. *Invertebrate Survival Journal*, 1(1):1-12.
- Knogge W., 1996. Fungal infection of plants. *The Plant Cell*, 8(10): 1711-1722.
- Kobayashi H., M. Ohtomi, Y. Sekizawa & N. Ohta, 2001. Toxicity of coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* to vertebrates but not invertebrates: Probable role of sphingomyelin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 128(3): 401-411.
- Kocakurt H., 2022. Kırmızı toprak solucanı *Eisenia fetida*'dan elde edilen sölom sıvısının özelliklerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Kumari T. & V. Shukla, 2022. Comparative impact of fungicides on biomolecules of *Eisenia fetida*. *Bulletin of Pure and Applied Sciences-Zoology (Animal Science)*, 41(1): 1-13.
- Lassegues M., A. Milochau, F. Doignon, L. Du Pasquier & P. Valembois, 1997. Sequence and homology of an antibacterial protein, fetidin, from the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 238(3): 680-684.
- Milochau A., M. Lassegues & P. Valembois, 1997. Purification, characterization and activities of two hemolytic proteins from *Eisenia fetida andrei*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1337(1): 123-132.
- Mutschler M., T. Zitter & C. Born, 2006. Tomato lines for the northeast combining early blight and late blight resistance. 22nd Annual Tomato Disease Workshop, Vegetable Program, New York.
- Plavšin I., M. Velki, S. Ećimović, K. Vrandečić & J. Ćosić, 2017. Inhibitory effect of earthworm coelomic fluid on growth of the plant parasitic fungus *Fusarium oxysporum*. *European Journal of Soil Biology*, 78: 1-6.
- Popović M., M. Milutinović & M. Stojanović, 2005. Enzymatic activities in coelomic fluid of earthworms and their potential role in phytopathogen inhibition. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(8): 1540-1547.
- Prakash M., N. Karmegam & T. Daniel, 2018. Extracellular enzymatic profiles of coelomic fluid extracted from *Eisenia fetida*. *Journal of Advanced Zoology*, 39(1): 45-52.
- Procházková P., M. Šilerová, J. Felsberg, R. Josková, A. Beschin, P. De Baetselier & M. Bilej, 2006. Relationship between coelomic fluid proteins and defense mechanisms in *Eisenia fetida*. *Developmental & Comparative Immunology*, 30(11): 981-988.
- Rotem J., 1994. *The genus Alternaria: Biology, epidemiology and pathogenicity*. APS Press, St. Paul.
- Sanaiirad S., M. Seifi, N. Hemmati, A. Khosravi & D. Nikaein, 2025. In vitro study of antifungal effects of earthworm coelomic fluid obtained from *Eisenia fetida* on three opportunistic fungal pathogens. *Current Medical Mycology*, 11:e1637.

- Sekizawa Y., T. Kubo, H. Kobayashi, T. Nakajima & S. Natori, 1997. Molecular cloning of cDNA for lysenin, a novel protein in the coelomic fluid of earthworm *Eisenia foetida*, inducing contraction of rat vascular smooth muscle. *Gene*, 191(1): 97-102.
- Toyota K. & M. Kimura, 2000. Microbial community in the earthworm cast and gut. *Biology and Fertility of Soils*, 31(5): 365-371.
- Tutar U. & İ. Karaman, 2017. Investigation of antibacterial properties of mucus and coelomic fluid obtained from *Eisenia fetida*. *Cumhuriyet Science Journal*, 38(3): 427-434.
- Tutar U., 2013. Toprak solucanlarından elde edilen vermikompostun bazı bitki patojenleri üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Van der Waals J.E., L. Korsten & B. Slippers, 2004. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. *Plant Disease*, 88(9): 959-964.
- Yanqin L., S. Yan, S. Zhenjun, L. Shijie, W. Chong, L. Yan & G. Yuhong, 2007. Coelomic fluid of the earthworm *Eisenia fetida* induces apoptosis of HeLa cells in vitro. *European Journal of Soil Biology*, 43: 143-148.
- Yıldız M., O. Gürkan, C. Turgut, Ü. Kaya & G. Ünal, 2005. Tarımsal savaşımında kullanılan pestisitlerin yol açtığı çevre sorunları. VI. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, 3-7 Ocak 2005, Ankara, s. 22.