



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

***Fusarium*'da PİGMENT ÜRETİMİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ**

Aylin GAZDAĞLI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK**

Aralık, 2022

İSTANBUL

Bu çalışma, 20.12.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Kadir TURAN
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Şule ARI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Erkan RAYAMAN
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Ercan ARICAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 29325 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 216Z007 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

Gazdağlı, A., Yıldırım-Baştemur, G., Yörük, E., Perçin-Özkorucuklu, S. Albayrak, G., 2023, Molecular analysis of the genes responsible for catalysing intracellular steps of aurofusarin biosynthesis in *Fusarium culmorum*, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 66, pp. 1-18.

ÖNSÖZ

Lisans eğitimimden bugüne kadar, tecrübesi, bilgisi ve sevgisiyle değerli desteğini her zaman hissettiğim, iyi bir bilim insanı olarak yetişmemde en büyük emeğe sahip olan, meslek hayatım boyunca açtığı yolda izinden gideceğim ve kendisini her zaman örnek alacağım çok değerli hocam Prof. Dr. Gülrüh ALBAYRAK'a içten teşekkürlerimi borç bilirim.

Lisans, yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca değerli emeklerini esirgemeyen Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN, Prof. Dr. Şule ARI ve Prof. Dr. Kadir TURAN ile İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde görev alan tüm saygıdeğer öğretim üyelerine ve emekli öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Aurofusarin ve rubrofusarinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile analizinde değerli bilgileriyle çalışmada katkı sağlayan hocam Prof. Dr. Sabriye PERÇİN ÖZKORUCUKLU'ya ve laboratuvar çalışmalarında kıymetli emeklerini veren Dr. Gizem YILDIRIM BAŞTEMUR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım esnasında katkılarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Kıvanç BİLECEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca beni yalnız bırakmayan sevgili çalışma arkadaşlarım Uzman Moleküler Biyolog Tuğba Teker'e, Uzman Moleküler Biyolog Gülin İnci VAROL'a ve Uzman Moleküler Biyolog Mehmet ARSLAN'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımda kullandığım patojen organizmaları geçmişte Moleküler Biyoloji ve Genetik kültür koleksiyonuna veren Samsun 19 Mayıs Üniversitesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Berna TUNALI ve Ishafan Teknoloji Üniversitesi'nden Sayın Prof. Dr. Bahram SHARIFNABI'ye; Theresa LEE'den (Seul Ulusal Üniversitesi) referans suşların sağlanmasında emeği geçen Doç. Dr. Emre YÖRÜK'e (İstanbul Yeniüzyıl Üniversitesi) ve çalışma arkadaşlarına teşekkür ederim.

Beni bu güzel günlere getiren, iyi ve kötü günlerimde yanımda olan sevgili anneme, babama ve kardeşime ve hayat arkadaşım Mehmet Hakan TALAY'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, bağımsız Türkiye Cumhuriyeti Devleti'nde, ülkemizin kaynaklarıyla kurulan ve yaşatılan en değerli devlet üniversitelerinden İstanbul Üniversitesi'nin imkânları kullanılarak gerçekleştirilmiş ve tez metni, kendi anadilim olan Türkçe ile yazılmıştır. Bu tez, tüm bunları borçlu olduğum Ulu önder Mustafa Kemal ATATÜRK ve silah arkadaşlarına Cumhuriyetimizin 100. yılı şerefine ithaf olunur.

Aralık 2022

Aylin GAZDAĞLI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xv
ÖZET	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. MANTARLARDA SEKONDER METABOLİZMA.....	4
2.1.1. Sekonder Metabolit Biyosentezintezinden Sorumlu Genlerin Organizasyonu	5
2.1.2. Gen Kümelerinin Anlatımının Kontrolü	6
2.2. MANTAR SEKONDER METABOLİTLERİ	9
2.2.1. Poliketidler	10
2.3. AUROFUSARİN	11
2.3.1. Aurofusarin Gen Kümesi.....	12
2.3.2. Aurofusarin Biyosentezinden Sorumlu Genlerin Anlatımlarının Düzenlenmesi	14
2.3.3. Aurofusarin Sentezleyen <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> Türleri.....	16
2.5. MANTAR SEKONDER METABOLİTLERİNİN BİYOKONTROL AJANI OLARAK KULLANIMI.....	17
2.5.1. Mantar Metabolitlerinin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkileri.....	18
2.5.1.1. <i>P. aeruginosa</i> ve Biyofilm Oluşumu.....	19
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	22
3.1. ÇALIŞMA MATERYALİ	22
3.1.1. Fitopatojenik <i>Fusarium</i> İzolatları.....	22
3.1.2. Antibakteriyal Aktivite Analizlerinde Kullanılan Bakteri Referans Suşları	22
3.2. MİKROORGANİZMALARIN İN VİTRO ÜRETİMİ.....	24
3.2.1. <i>Fusarium</i> Kültürlerinin Kurulması.....	24
3.2.2. Bakteri Kültürlerinin Kurulması.....	26

3.3. GENOMİK ANALİZLER	26
3.3.1. Genlerin Biyoinformatik Yaklaşımla Belirlenmesi ve Primer Tasarımı	26
3.3.2. Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu ve Analizi	27
3.3.3. Özgün Genlerin Çoğaltımı ve Analizi	28
3.4. TRANSKRİPTOM ANALİZLERİ	29
3.4.1. Gen Anlatımı Analizi için Kullanılan Primer-Prob Tasarımı	29
3.4.2. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	29
3.4.3. qPZR ve Analizi	30
3.5. PİGMENT EKSTRAKSİYONU VE ANALİZİ	31
3.5.1. Aurofusarin ve Rubrofusarin Ekstraksiyonu	31
3.5.2. İTK ile Analiz ve Standart Grafiğinin Oluşturulması	32
3.5.3. HPLC Analizi	32
3.6. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ	32
3.6. AUROFUSARİNİN ANTİBAKTERİYAL ETKİSİNİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK ANALİZLER	33
3.6.1. Aurofusarinin % İnhibisyon Değerinin Belirlenmesi	33
3.6.2. Zamana Bağlı Üreme Eğri Grafiklerinin Oluşturulması	34
3.6.3. Proliferasyon Testi	35
3.7. AUROFUSARİNİN BİYOFİLM OLUŞUMUNA ETKİSİNİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK ANALİZLER	36
3.7.1. Biyofilm Kütle Analizi	36
3.7.2. Biyofilm Metabolik Aktivite Analizi	36
3.7.3. Aurofusarin Kaynaklı Biyofilm Oluşumu Sürecinde Hücre-Hücre Etkileşim Analizi	37
3.7.3.1. gDNA İzolasyonu	37
3.7.3.2. Primer Tasarımı ve QS Genlerinin Çoğaltımı	38
3.7.3.3. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	38
3.7.3.4. qPZR Analizi	38
3.8. GEN ANLATIMI VE BİYOFİLM VERİLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ	39
4. BULGULAR	40
4.1. <i>FUSARIUM</i> KÜLTÜRLERİNİN PİGMENTASYONU İLE İLGİLİ BULGULAR	40
4.2. GENOM ANALİZ BULGULARI	43
4.2.1. Aurofusarin Biyosentezinden Sorumlu Genlerin PZR Analiz Sonuçları	43
4.2.2. Dizilim Bilgilerinin Analiz Verileri	45
4.3. TRANSKRİPTOM ANALİZ BULGULARI	51

4.3.1. Farklı Ortam Koşullarında Aurofusarin Biyosentezinden Sorumlu Genlerin qPZR Analiz Sonuçları	52
4.3.1.1. <i>Cp Değerlerine Ait Veriler</i>	52
4.3.1.2. <i>Rölatif Kantitasyon Verileri</i>	54
4.3.2. 48., 72., 120. ve 168. Saatlerde Aurofusarin Biyosentezinden Sorumlu Genlerin qPZR Analiz Sonuçları	56
4.4. AUROFUSARİNİN EKSTRAKSİYONU VE ANALİZİ	58
4.4.1. Pigment Ekstraksiyonu	58
4.4.2. İTK Analiz Bulguları.....	58
4.4.3. HPLC Analiz Bulguları	61
4.4. İSTATİSTİK ANALİZ BULGULARI	64
4.4.1 Kontrol ve Deney Grupları Arasındaki Gen Anlatım Değişimlerine Ait Analiz Bulguları	65
4.4.2. Gen Anlatımı ile Aurofusarin ve Rubrofusarin Üretimi Arasındaki İlişkiye Ait Bulgular	66
4.5. AUROFUSARİNİN ANTİMİKROBİYAL ETKİSİNİN ANALİZİ	71
4.5.1 Aurofusarinin Bakteri Üremesi Üzerindeki İnhibitör Etkisine Ait Bulgular	71
4.5.2. Üreme Eğrisi Analiz Bulguları	75
4.5.3. Proliferasyon Testi Bulguları	76
4.5. BİYOFİLM KONTROL ANALİZLERİ.....	77
4.5.1. Biyofilm Kütle Analizi Bulguları	77
4.5.2. Biyofilm Metabolik Aktivite Analiz Bulguları	79
4.6. BİYOFİLM OLUŞUMUNDA QS ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI	81
4.6.1. Genomik Analiz Bulguları	81
4.6.2. Transkriptom Analiz Bulguları.....	82
4.6.2.1. <i>QS Genlerinin Cp Değerlerine Ait Veriler</i>	82
4.6.2.2. <i>Rölatif Kantitasyon Verileri</i>	83
4.7.1. qPZR Sonuçlarının İstatistiksel Analiz Bulguları	84
4.7. GEN ANLATIMI VE BİYOFİLM ARASINDAKİ İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNE YÖNELİK BULGULAR.....	85
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	88
KAYNAKLAR.....	104
ÖZGEÇMİŞ	119

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Aurofusarin, molekülün homodimerik yapısı (Frandsen ve diğ., (2006)’den alınmıştır). 12
- Şekil 2.2:** Aurofusarin biyosentezi (Frandsen ve diğ., (2011)’den alınmıştır).....13
- Şekil 2.3:** Aurofusarin gen kümesi (Kim ve diğ., (2008)’den alınmıştır). 13
- Şekil 4.1:** KG (25 °C pH 5,6) DG1 (15 °C pH 5,6), DG2 (15 °C pH 7,0), DG3 (25 °C pH 7,0) şartlarında PDA besi ortamında yedi gün süreyle üretilen *F. graminearum* izolatlarına ait renklenme profilleri. 40
- Şekil 4.2:** KG (25 °C pH 5,6) DG1 (15 °C pH 5,6), DG2 (15 °C pH 7,0), DG3 (25pH °C 7,0) şartlarında PDA besi ortamında yedi gün süreyle üretilen *F. culmorum* izolatlarına ait renklenme profilleri. 41
- Şekil 4.3:** 15 °C (A) ve 25 °C (B)’de yedi gün süreyle patates dekstrozu sıvı besi ortamında (pH 3,0) inkübe edilerek yedi gün süreyle üretilen *F. graminearum* ve *F. culmorum* kültürleri. 42
- Şekil 4.4:** 25 °C’de PDA besi ortamında (pH 5,6) üretilen *F. culmorum* 9F izolatına ait 24, 48, 72, 120 ve 168 saatlik kültürlerin renklenme profilleri. 43
- Şekil 4.5:** Özgün primerlerle 5 *F. graminearum* ve 4 *F. culmorum* izolatında çoğaltılan (A) Pks12 genine ait 1282 bp, (B) Gip6 genine ait 449 bp, (C) Gip7 genine ait 1278 bp, (D) Gip4 genine ait 1572 bp, (E) StuAP genine ait 420 bp’lik ürünlerin agaroz jel elektorforezi. M 1 kb standart DNA (Thermo, ABD). (PCR ürünlerinin sırası gen ürünlerinin biyosentez yolağında aldığı görev sırasına göre verilmiştir). 45
- Şekil 4.6:** 7F ve 9F izolatlarından çoğaltılan *Pks12* geninin nukleotid diziliminin *F.graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUk99 referans genomları ile BLASTN analizine ait kısmi bölgesinin gösterimi. * identik nukleotidleri, - referansa göre delesyon ve insersiyonlu bazıları temsil etmektedir. 47
- Şekil 4.7:** 9F izolatlarından çoğaltılan *Gip6* geninin nukleotid diziliminin *F.graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUk99 referans genomları ile BLASTN analizine ait kısmi bölge. * identik nukleotidleri temsil etmektedir. 48
- Şekil 4.8:** 7F ve 9F izolatlarından çoğaltılan *Gip7* geninin nukleotid diziliminin *F.graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUk99 referans genomları ile BLASTN analizine ait kısmi bölge. * identik nukleotidleri, - referansa göre delesyon ve insersiyonlu bazıları temsil etmektedir. 48
- Şekil 4.9:** 7F, 9F ve F1 izolatlarından çoğaltılan *Gip7* geninin nukleotid diziliminin *F.graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUk99 referans genomları ile BLASTN

analizine ait kısmi bölge. * identik nukleotidleri, - referansa göre delesyon ve insersiyonlu bazıları temsil etmektedir.....	49
Şekil 4.10: 7F ve 9F ve izolatlarından çoğaltılan <i>Gip4</i> geninin nukleotid diziliminin <i>F. graminearum</i> PH-1 ve <i>F. culmorum</i> FcUk99 referans genomları ile BLASTN analizine ait kısmi bölge. * identik nukleotidleri, - referansa göre delesyon ve insersiyonlu bazıları temsil etmektedir.....	50
Şekil 4.11: 7F, 9F ve F1 izolatlarından çoğaltılan <i>StuAp</i> geninin nukleotid diziliminin <i>F. graminearum</i> PH-1 ve <i>F. culmorum</i> FcUk99 referans genomları ile BLASTN analizine ait kısmi bölge. * identik nukleotidleri temsil etmektedir.	51
Şekil 4.12: Kontrol grubunda üretilen <i>F. culmorum</i> izolatlarından izole edilen total RNA moleküllerinin agaroz jel görüntüsü. M: 1 kb standart DNA (Thermo, ABD).	52
Şekil 4.13: <i>Pks12</i> , <i>Gip7</i> , <i>Gip4</i> ve <i>StuAP</i> genlerinin kontrol, DG1, DG2 ve DG3 ortamlarındaki anlatımların β -tubulin'e göre oransal değişimi. Barlar standart hataları temsil etmektedir.	56
Şekil 4.14: <i>Pks12</i> , <i>Gip6</i> ve <i>Gip7</i> genlerinin 48., 72., 120. ve 168. saatlerdeki anlatımının β -tubulin'e göre oransal değişimi. Barlar standart hataları temsil etmektedir (* $p<0,5$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).	58
Şekil 4.15: Kontrol (A), DG1 (B), DG2 (C) ve DG3 (D) ortamlarında üretilen kültürlerden ekstre edilen pigment bileşikler.	58
Şekil 4.16: Kontrol ve deney gruplarına ait ince tabaka kromatografisi görüntüsü. Kontrol grubu, (B) DG1, (C) DG2, (D) DG3. Aur: aurofusarin standardı (1 mg/ml), Rubro: rubrofusarin standardı (1 mg/ml).	59
Şekil 4.17: 9F izolatına ait ince tabaka kromatografisi görüntüsü.	60
Şekil 4.18: Aurofusarin molekülünün sulandırım serilerinin kullanılarak çizildiği kalibrasyon diagramı.	61
Şekil 4.19: 7 günlük 9F kültürüne ait ekstreden elde edilen HPLC kromatogramları 1.Quercetin I.S. (5 mg/l); 2.Aurofusarin (50 mg/l); 3.Rubrofusarin (5 mg/l).	63
Şekil 4.20: <i>Pks12</i> , <i>Gip7</i> , <i>Gip4</i> ve <i>StuAP</i> genlerinin kontrol, DG1, DG2 ve DG3 ortamlarındaki anlatımlarının kontrol grubuna göre oransal değişimi. (* $p<0,01$). Barlar standart hataları temsil etmektedir.....	66
Şekil 4.21: Gen anlatımı, aurofusarin ve rubrofusarin biyosentezi ile çevre koşulları arasındaki ilişkiyi gösteren Spearman r değerleri (** $p<0,01$; **** $p<0,0001$) (tabloda istatistiksel olarak anlamlı ilişki belirlenen ikili grupta sadece birinde yıldız işareti kullanılmıştır).	69
Şekil 4.22: Gen anlatımı, aurofusarin ve rubrofusarin biyosentezi ile çevre koşulları arasındaki ilişkiyi gösteren temel bileşen analizleri.	71

Şekil 4.23: Farklı konsantrasyonlarda ticari aurofusarin içeren ortamlarda kültürlenmiş bakterilere ait % inhibisyon bulgularının istatistiksel analizi (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). Barlar standart hataları temsil etmektedir.	73
Şekil 4.24: Farklı konsantrasyonlarda aurofusarin ekstresi içeren ortamlarda kültürlenmiş bakterilere ait % inhibisyon bulgularının istatistiksel analizi (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). Barlar standart hataları temsil etmektedir.	75
Şekil 4.25: Saf aurofusarin (A) ve kültür ekstresinde (B) bulunan aurofusarinin üremeyi anlamlı şekilde yavaşlatan en düşük dozlarının %25, %50 ve %75'ini içeren ortamda üretilen <i>P. aeruginosa</i> PAO1 üreme eğrisi grafiği.	76
Şekil 4.26: Saf aurofusarin ve aurofusarin ekstresi içeren LB besiyerinde üretilen bakterilerde proliferasyonun istatistiksel analizi (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). Barlar standart hataları temsil etmektedir.	77
Şekil 4.27: <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun saf aurofusarin ve aurofusarin ekstresi içeren LB besi ortamında ürettiği biyofilmden dolayı kaydedilen absorbans değerlerine ait istatistiksel analizin grafikte gösterimi (* $p<0,05$). Barlar standart hataları temsil etmektedir.	78
Şekil 4.28: <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun saf aurofusarin ve pigment ekstresi içeren besi ortamlarında ürettiği biyofilm inhibisyon yüzdelerinin istatistiksel analizinin grafikte gösterimi. (** $p<0,01$; *** $p<0,001$). Barlar standart hataları temsil etmektedir.	79
Şekil 4.29: <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun saf aurofusarin ve aurofusarin ekstresi içeren LB besi ortamında ürettiği biyofilmdaki hücrelerin metabolik aktivitelerinden dolayı kaydedilen absorbans değerlerine ait istatistiksel analizin grafikte gösterimi (*** $p<0,001$). Barlar standart hataları temsil etmektedir.	80
Şekil 4.30: <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun saf aurofusarin ve aurofusarin ekstresi içeren besi ortamlarında üretilen biyofilm metabolik aktivite inhibisyonunun istatistiksel analizinin grafikte gösterimi (*** $p<0,001$). Barlar standart hataları temsil etmektedir.	81
Şekil 4.31: <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşuna ait genomik DNA'nın agaroz jel elektroforez görüntüsü. Standart DNA: λ HindIII (Thermo, ABD).	82
Şekil 4.32: Özgün primerlerle <i>P. aeruginosa</i> PAO1 genomundan çoğaltılan <i>LasI</i> , <i>LasB</i> , <i>LasR</i> ve <i>RpoB</i> genlerine ait PZR ürünleri. M: 100 bp standart DNA (Thermo, ABD).	82
Şekil 4.33: <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşundan izole edilen total RNA moleküllerinin agaroz jel görüntüsü. M: 1 kb standart DNA (Thermo, ABD).	82
Şekil 4.34: QS gen anlatımındaki kontrole göre gen anlatım değişimlerinin istatistiksel analizi. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). Barlar standart hataları temsil etmektedir.	85

- Şekil 4.35:** QS gen anlatımı, aurofusarin, biyofilm oluşumu ve biyofilm metabolik aktivite analizi arasındaki ilişkiyi gösteren Spearman r değerleri (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$) tabloda istatistiksel olarak anlamlı ilişki belirlenen ikili grupta sadece birinde yıldız işareti kullanılmıştır.....86
- Şekil 4.36:** QS gen anlatımı, aurofusarin, biyofilm oluşumu ve biyofilm metabolik aktivite analizi arasındaki ilişkiyi gösteren temel bileşen analizleri. 87



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan <i>F. graminearum</i> izolatlarının, etkili olduğu coğrafik bölgeler, konak organizmaları, genotipleri ve genomlarında taşıdıkları MAT lokusları.	23
Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan <i>F. culmorum</i> izolatlarının etkili olduğu coğrafik bölgeler, konak organizmaları, kemotipleri genomlarında taşıdıkları MAT lokusları.	24
Tablo 3.3: <i>Fusarium</i> izolatlarının üretilmesinde kullanılan besi ortamları ve içerikleri.	25
Tablo 3.4: pH ve sıcaklık değişkenleri ile oluşturulan deneme setleri. KG: Kontrol grubu; DG: Deney grubu.	25
Tablo 3.5: Bakteri suşlarının aktive edilmesinde ve kültürlenmesinde kullanılan besi ortamları ve içeriği (pH 7,0).	26
Tablo 3.6: Agaroz jel hazırlığında ve elektroforezinde kullanılan tamponlara ait bileşenler ve derişimleri.	28
Tablo 3.7: Saf aurofusarin, aurofusarin ekstresi ve DMSO içeren besi ortamlarında üreme eğrisi analizine yönelik olarak gerçekleştirilen deneme setleri kg: Kontrol grubu; dg-1: Saf aurofusarin ile kurulan deney grubu, ng-1: dg-1'e ait normalizasyon grubu, dg-2: Aurofusarin ekstresi ile kurulan deney grubu, ng-2: dg-2'ye ait normalizasyon grubu.	35
Tablo 4.1: PDA besi ortamında KG (25 °C pH 5,6), DG1 (15 °C pH 5,6), DG2 (15 °C pH 7,0) ve DG3 (25 °C pH 7,0) şartlarında yedi (7) süreyle kültürlenen <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> izolatlarına ait pigmentasyon profilleri.	42
Tablo 4.2: Özgün genlerin çoğaltımında kullanılan oligonukleotid primerler, bağlanma sıcaklığı (T _m) ve ürün boyutları (İ: ileri primer, G: geri primer).	44
Tablo 4.3: Çalışılan beş genin <i>F. graminearum</i> 7F ve <i>F. culmorum</i> 9F tarla izolatlarına ait dizilimleri ile NCBI veri bankasında kayıtlı PH-1 ve FcUk99 referans genomlarına ait dizilimler arasındaki benzerlik skorlarının % cinsinden değeri.	46
Tablo 4.4: Gerçek zamanlı PZR'de kullanılan primer-prob dizilimleri ile ürün boyutları (İ: ileri primer, G: geri primer).	51
Tablo 4.5: Aurofusarin biyosentezinden sorumlu genlere ait $\sum C_p$ değerleri ve standart hataları.	54
Tablo 4.6: Aurofusarin biyosentezinden sorumlu genlere ait $2^{-\Delta C_t}$ değerleri ve standart hataları.	55

Tablo 4.7: Aurofusarin biyosentezinden sorumlu genlere ait Ct değerleri ve standart hataları.	57
Tablo 4.8: İnce tabaka kromatografisi ile analiz edilen örneklerin RF değerleri (cm).	60
Tablo 4.9: Kontrol, DG1, DG2 ve DG3’de kültürlenен miselyumlarda üretilen aurofusarin miktarları (µg/µl).....	61
Tablo 4.10: KG, DG1, DG2 ve DG3 şartlarında PDA besi ortamında yedi (7) süreyle kültürlenен <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> izolatlarına ait miselyumlarda üretilen aurofusarin ve rubrofusarin miktarları (ppm) ve standart hataları.	62
Tablo 4.11: Kontrol şartlarında (25 °C pH 5,6) PDA besi yerinde üretilen <i>F. culmorum</i> 9F izolatına ait 24, 48, 72, 120 ve 168 saatlik kültürlerde üretilen aurofusarin ve rubrofusarin miktarları (ppm) ve standart hataları.	64
Tablo 4.12: Sharpio-Wilk lognormal dağılım testi verileri (W: Wilk).....	65
Tablo 4.13: KG, DG1, DG2 ve DG3 şartlarında kültürlenен izolatlardan elde edilen Cp verileri ile HPLC verileri arasındaki Spearman regresyon (r) katsayıları (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, ****p<0,0001, ns: not-significant).	67
Tablo 4.14: <i>Pks12</i> , <i>Gip5</i> , <i>Gip7</i> , <i>Gip4</i> ve <i>StuAp</i> gen anlatımı ile aurofusarin ve rubrofusarin biyosentezi arasındaki Spearman regresyon (r) katsayıları (* p<0,05, ns: not-significant).....	68
Tablo 4.15: <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> izolatlarında temel bileşenlerdeki (PC) varyasyon değerleri.	70
Tablo 4.16: Farklı konsantrasyonlarda saf aurofusarin içeren LB ortamında kültürlenен bakteri kültürlerine ait OD ₆₀₀ ölçümleri ve % inhibisyon değerleri ve standart hataları.	72
Tablo 4.17: Farklı konsantrasyonlarda aurofusarin ekstresi içeren LB ortamında kültürlenен bakteri kültürlerine ait OD ₆₀₀ ölçümleri ve % inhibisyon değerleri ve standart hataları.	74
Tablo 4.18: LB besi ortamında çoğaltılan <i>P. aeruginosa</i> PAO1’e ait proliferasyonunun belirlenmesi amacıyla 470 nm ve 620 nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin farkına ait ham veriler ve standart hataları.	76
Tablo 4.19: LB besi ortamında çoğaltılan PAO1 suşunun ürettiği biyofilm tabakasının belirlenmesi amacıyla 540 nm dalga boyundaki absorbans değerlerine ait ham veriler ve standart hataları.	77
Tablo 4.20: Saf aurofusarin, pigment ekstresi ve organik çözücülerini içeren ortamlarda PAO1 suşunun ürettiği biyofim tabakasının kütle miktarına ait yüzde değerleri ve standart hataları.	78

Tablo 4.21: LB besi ortamında çoğaltılan <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunun ürettiği biyofilm tabakasındaki metabolik aktivitenin belirlenmesi amacıyla 540 nm dalga boyundaki absorbans değerlerine ait ham veriler ve standart hataları.	79
Tablo 4.22: Saf aurofusarin, pigment ekstresi ve organik çözücülerini içeren ortamlarda PAO1 suşunun ürettiği biyofilm tabakasının kütle miktarına ait yüzde değerleri ve standart hataları.	80
Tablo 4.23: Gen anlatımı analizinde kullanılan primer molekülleri.....	81
Tablo 4.24: QS'den sorumlu genlere ait $\sum C_p$ değerleri ve standart hataları (dg-1 aurofusarin; dg-2 aurofusarin ekstresi ile hazırlanan deney grupları; ng-1 ve ng-2 DMSO ile hazırlanan normalizasyon grupları).	83
Tablo 4.25: QS'den sorumlu genlere ait $2^{-\Delta C_t}$ değerleri QS'den sorumlu genlere ait $\sum C_p$ değerleri (dg-1 aurofusarin; dg-2 aurofusarin ekstresi ile hazırlanan deney grupları; ng-1 ve ng-2 DMSO ile hazırlanan normalizasyon grupları).	84
Tablo 4.26: Biyofilm analizinde temel bileşenlerdeki (PC) varyasyon değerleri.	87

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

%	: Yüzde
β	: Beta
°C	: Santigrat Derece
bç	: Baz Çifti
g	: Gram
l	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
rpm	: Dakikadaki devir sayısı, “Revolutions Per Minute”
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
μ g	: Mikrogram
μ l	: Mikrolitre

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

ADON	: Asetildeoksinivalenol
DNA	: Deoksinukleik Asit
DON	: Deoksinivelenol
CFU	: Koloni Oluşum Birimi, “Colony Forming Unit”
FAD	: Flavin Adenin Dinukleotid
FMN	: Flavinmononukleotid
HPLC	:Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi, “High Pressure Liquid Chromotography”
LBA	: Luria Bertani Agar
MAT	: Eşem Tipi, “Mating Type”

MHFTR	: Metilenhidrofolat Redüktaz
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi, “National Center for Biotechnology Information”
NIV	: Nivalenol
NRPS	: Ribozom Dışı Peptidler, “Non-ribosomal Peptide”
OD	: Optik Yoğunluk, “Optical Density”
PDA	: Patates Dekstroz Agar
PCA	: Temel Bileşenler Analizi “Principle Component Analysis”
QS	: Quorum Sensing
RNA	: Ribonukleik Asit
SAM	: S-adenozil-L-metiyonin
SNA	: Sentetik Nutrient Agar
SNP	: Tekli Nukleotid Değişimi, “Single Nucleotide Polymorphism”
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi, “Thin Layer Chromatography”
ZEA	: Zearelenon

ÖZET

DOKTORA TEZİ

Fusarium'da PİGMENT ÜRETİMİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

Aylin GAZDAĞLI

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Gülrüh ALBAYRAK

Doktora tezinde *Fusarium graminearum* ve *F. culmorum*'da aurofusarin biyosentez gen kümesinin miselyum pigmentasyonundaki rolü ile birlikte aurofusarin ve öncül metabolitlerini içeren ekstrenin antibakteriyal ve biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi moleküler düzeyde araştırıldı. Bu kapsamda, çalışılan 47 *F. graminearum*, 24 *F. culmorum* izolatından 3F, 7F ve Fg174 (*F. graminearum*) ile 9F, 11F, F1 ve F14'ün (*F. culmorum*) kararlı pigment ürettiği morfolojik ve ince tabaka kromatografisi ile belirlendi. Biyosentetik yolda yer alan *Pks12*, *Gip6*, *Gip7*, *Gip4* ile genel transkripsiyon faktörünü kodlayan *StuAp* geninin, *F. graminearum* 88-1 ve H-11 referansları ile bu izolatların genomik DNA'larındaki varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) aracılığı gösterildi. Sanger dizileme, çoğaltılan *Gip6* ve *StuAp* kısmi gen bölgelerinde transisyon ve transversiyon tipi tek nükleotid değişimlerinin olduğunu, *Pks12*, *Gip7* ve *Gip4* genlerinde ise bu tek nükleotid değişimleri ile birlikte tekli, ikili ve üçlü *in-del* bölgeleri bulunduğunu gösterdi.

Miselyum renklenmesinde farklı ortam koşullarının beş genin anlatım seviye değişimi üzerindeki etkisi 15 °C ve 25 °C sıcaklık ile 5,6 ve 7,0 pH değişkenleri bakımından gerçek zamanlı PZR ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile incelendi. Tüm genler için en yüksek anlatım seviyeleri pH 5,6 besi ortamı ve 15 °C inkübasyonda belirlendi. Spearman korelasyon analizi, pH 5,6 ve 25 °C ortam koşulunda *Pks12* anlatım değişimi ile aurofusarin biyosentezi; pH 5,6 ve 15 °C'de *Pks12*, *Gip7* ve *StuAp* anlatım değişimleri ile aurofusarin biyosentezi; pH 7,0 ve 15 °C'de *Gip4* anlatımı değişimi ile aurofusarin biyosentezi arasında

anlamli iliskiliyi belirlemeyi sagladi. Çoklu regresyon ve temel bileşenler analizi, pH ve sıcaklık parametrelerinin tek başına miselunyum renklenmesini etkilemediğini ortaya koydu. Asidik pH'da (3,0) miselyum renklenmesi gerçekleşmedi.

Fusarium izolatına (9F) ait 0,72 ng/μl aurofusarin içeren ekstre *P. aeruginosa* PAO1'in (ATCC 15692) üremesini %38,89; 0,36 ng/μl aurofusarin içeren ekstre biyofilm tabakasını yaklaşık %116 azalttı. Korelasyon analizi 0,36 ng/μl aurofusarinin, hücrelerin metabolik aktivitesi ile quorum-sensing (QS) ile ilişkili *LasI*, *LasB* ve *LasR* anlatım düzeylerinde azalmaya neden olarak biyofilm oluşumu inhibe ettiğini gösterdi. Çalışmadan elde edilen bulgular aurofusarin biyosentezinin ve miselyum pigmentasyonunun moleküler mekanizması hakkında bilgi sağlamakla kalmamış, aynı zamanda çevresel koşulların *Fusarium*'da sekonder metabolit biyosentezi üzerindeki etkileri hakkında da önemli veriler sunmuştur. Aurofusarinin antibakteriyel etkisi ile birlikte biyofilm oluşumunu engelleyici etkisi olduğu da bu çalışma ile gösterilmiştir. Doktora tezi, genomda manipülasyon yapılmaksızın laboratuvar koşullarında yüksek ölçekte aurofusarin üretimine zemin hazırlaması açısından büyük önem taşımaktadır.

Aralık 2022, 140 sayfa.

Anahtar kelimeler: Aurofusarin, Rubrofusarin, Gen Anlatımı Analizi, HPLC Analizi, Biyofilm Oluşumu

SUMMARY

Ph.D. THESIS

MOLECULAR ANALYSIS OF PIGMENT PRODUCTION IN *Fusarium*

Aylin GAZDAĞLI

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Gülrüh ALBAYRAK

In this doctoral thesis, the role of the aurofusarin biosynthesis gene cluster in *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* on mycelium pigmentation and the effect of the extract containing aurofusarin and its precursor's on antibacterial and biofilm formation were investigated at the molecular level. In this context, 3F, 7F and Fg174 (*F. graminearum*) and 9F, 11F, F1 and F14 (*F. culmorum*) were investigated by morphological and thin layer chromatography in terms of stable pigments production in 47 *F. graminearum*, 24 *F. culmorum* isolates. The presence of *Pks12*, *Gip6*, *Gip7*, *Gip4*, which are involved in the biosynthetic pathway, and the *StuAp* gene, which encodes the general transcription factor, in the genomic DNA of these isolates with references of *F. graminearum* 88-1 and H-11 were amplified via polymerase chain reaction (PCR). Sanger sequencing showed that there were transition and transversion type single nucleotide changes in the amplified *Gip6* and *StuAp* partial gene regions, and single, double and triple in-del regions with these single nucleotide changes in *Pks12*, *Gip7* and *Gip4* genes.

The effect of different environmental conditions on the expression level alterations of five genes on mycelium pigmentation was investigated by real-time PCR and high performance liquid chromatography in terms of temperature of 15 °C and 25 °C and pH variables of 5.6 and 7.0. The highest expression levels for all genes were determined in pH 5.6 medium at 15 °C. Spearman correlation analysis identified a significant correlation between aurofusarin

biosynthesis with *Pks12* expression at pH 5.6 and 25 °C; with *Pks12*, *Gip7* and *StuAp* expressions at pH 5.6 and 15 °C; with *Gip4* expression at pH 7.0 and 15 °C. Multiple regression and principal component analysis revealed that pH and temperature parameters alone did not affect mycelium coloration. Mycelium coloration did not occur at acidic pH (3.0).

The extract of *Fusarium* isolate (9F) containing 0.72 ng/μl aurofusarin decreased the growth of *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) by 38.89%; the extract containing 0.36 ng/μl aurofusarin reduced the biofilm layer by approximately 116%. Correlation analysis showed that 0.36 ng/μl aurofusarin inhibited biofilm formation by causing a decrease in the metabolic activity of cells and the expression levels of *LasI*, *LasB* and *LasR* associated with quorum-sensing (QS). Findings from the study not only provided information about the molecular mechanism of aurofusarin biosynthesis and mycelium pigmentation, but also provided important data on the effects of environmental conditions on secondary metabolite biosynthesis in *Fusarium*. In this study, it has been shown that aurofusarin has an antibacterial effect as well as an inhibitory effect on biofilm formation. The doctoral thesis has great importance in terms of laying the groundwork for the high-scale production of aurofusarin under laboratory conditions without any manipulation of the genome.

December 2022, 140 pages.

Keywords: Aurofusarin, Rubrofusarin, Gene Expression Analysis, HPLC Analysis, Biofilm Formation

1. GİRİŞ

Fitopatojenik *Fusarium* türleri düşük molekül ağırlıklı sekonder metabolitleri sentezleyerek değişen çevre koşullarına uyum sağlamakta, diğer mikroorganizmalarla rekabet edebilmektedirler. Bu sekonder metabolitler arasında yer alan aurofusarin ve öncül metabolitleri, *F. graminearum* ve *F. culmorum* tarafından üretilen, miselyum pigmentasyonunda etkili olan poliketid yapıdaki pigment bileşikleridir (Lysøe ve diğ., 2011).

Aurofusarin ve öncül metabolitlerinin biyosentezinden, genomda bakterilerin operon düzenine benzer şekilde bir kümede organize olan genler tarafından kodlanan enzimler sorumludur. Aurofusarin gen kümesindeki genler ve işlevleri delesyon mutantları elde edilerek tanımlanmıştır (Kim ve diğ., 2006; Kim ve diğ., 2008; Frandsen ve diğ., 2010; Frandsen ve diğ., 2011). Aynı genin delesyonunu taşıyan mutantlarda farklı renkte miselyum pigmentasyonunun gözlenmesi (Frandsen ve diğ., 2006; Frandsen ve diğ., 2010; Jin ve diğ., 2009), pigmentasyon modelinin henüz tam olarak oluşturulamadığını, pigmentasyonun moleküler mekanizmasının hala açıklanamadığını düşündürmektedir. Aynı coğrafik bölgeden izole edilmiş bir türün farklı izolatları farklı miselyum pigmentasyonuna sahip olabilmektedir. Bir izolatin pigmentasyon profili çevre koşullarından (karbon kaynağı tipi, pH değişimleri, sıcaklık farkı vb.) da etkilenebilmektedir. Ayrıca, besin kıtlığı, oksidatif stres gibi miselyum büyümesini yavaşlatan çeşitli stres faktörlerinin pigment biyosentezini değiştirebildiği de gösterilmiştir (Malz ve diğ., 2005; Kim ve diğ., 2008). Bu nedenlerle, gerçekleştirilen doktora tezi kapsamında, *F. graminearum* ve ilk defa *F. culmorum* izolatlarında aurofusarin ve ara metabolitlerinin biyosentezinden sorumlu genlerin anlatım düzeyleri ile pigmentasyon arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Bu kapsamda biyosentez modelinde yer alan *Pks12*, *Gip6*, *Gip7* ve *Gip4* genleri ile birlikte, bu genlerin anlatımlarının regülasyonunda işlevsel olan genel transkripsiyon faktörünü şifreleyen *StuAP* geni *F. graminearum* ve ilk defa *F. culmorum* izolatlarından çoğaltılarak dizilenmiş; genlerde belirlenen tekli, ikili ve üçlü insersiyon-delesyon (*in-del*) tipi değişimler ile birlikte transisyon ve transversiyon tipindeki tek nukleotid polimorfizmlerinin (İng., single nucleotide polymorphism; SNP) miselyum renklenmesi üzerindeki etkisi tartışılmıştır. Kültür koşullarında sıcaklık ve pH değişimlerinin bu beş genin anlatım düzeyleri üzerindeki etkisi de gerçek

zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (kantitatif PZR; qPZR) ile miselyumlarda sentezlenen aurofusarin ve rubrofusarin miktarları yüksek performanslı sıvı kromatografisi (İng., high performance liquid chromatography-HPLC) ile belirlenmiştir. Farklı ortam koşullarında aurofusarin biyosentezinden sorumlu genlerin anlatımındaki değişimler ve gen anlatım bulguları ile hücrede sentezlenen aurofusarin ve rubrofusarin miktarı arasındaki ilişkiler istatistiksel yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Aurofusarin biyosentez yolağının hücre içi basamaklarını katalizleyen *Pks12*, *Gip6* ve *Gip7* genlerinin anlatımı ve hücrede sentezlenen aurofusarin ve rubrofusarin miktarı ile hücre döngüsü arasındaki ilişki, 9F izolatına ait kültürün 48., 72., 120. ve 168. saatlerinde gerçekleştirilen analizlerle ortaya konmuştur.

Bu tez çalışmasıyla ortam koşullarının aurofusarin biyosentez genlerinin anlatım düzeyinde ve sentezlenen aurofusarin ve rubrofusarin miktarında değişme neden olduğu, bu değişimde miselyum pigmentasyonunu etkilediği istatistiksel analizlerle ortaya konmuştur. Aurofusarin biyosentezi için en uygun şartın ise 15 °C sıcaklık ve pH 5,6 olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda gen dizilerindeki in-del ve SNP'lerin gen işlevini değiştirerek pigment biyosentezini ve miselyum pigmentasyonunu etkilediği gösterilmiştir. *F. graminearum* genomunda tanımlanan *Pks12*, *Gip6*, *Gip7* ve *Gip4* genlerinin homologlarının *F. culmorum*'da da aurofusarin biyosenteziyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Hücre içinde biriken rubrofusarinin miktarının en yüksek değerinin kültürün lag fazında; miselyumda biriken aurofusarinin miktarının da en yüksek durağan fazda olduğu gösterilmiştir (Gazdağlı ve Albayrak, 2023).

Poliketid sınıfı sekonder metabolitler antikarsinojen, antiallerjenik, antimikrobiyal etkiye sahip olabilen biyoaktif bileşiklerdir (Weismann, 2009). Doktora tezi kapsamında ticari saf aurofusarin ile *F. culmorum* türüne ait 9F tarla izolatından elde edilen aurofusarin ekstresinin bakteri üremesi üzerindeki etkisi; *E. coli* (ATCC25922), *K. pneumoniae* (ATCC13833), *S. agalactiae* (DM20), *S. saprophyticus* (DM17), *S. aureus* (ATCC25923), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ve *P. aeruginosa* PAO1 referans suşları (ATCC 15692) kullanılarak test edilmiştir. Aurofusarinin biyofilm oluşumu ve çoğunluk algılama (İng., quorum sensing; QS) mekanizmasına olan etkisi de *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) suşu üzerinde araştırılmıştır. Araştırma bulguları, aurofusarinin bakteri üremesi ve biyofilm oluşumu üzerinde anlamlı etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Doktora tezinden elde edilen bulgular, farklı ortam koşullarında ve farklı izolatlarda aurofusarin biyosentezinin gen anlatımıyla olan ilişkisini ve aurofusarin biyosentezi için en uygun kültür

koşulunu ortaya koymuştur. Çalışmadan elde edilen bulgular, aurofusarinin *P. aeruginosa* PAO1 üzerinde toksik etkiye sahip olduğunu ortaya koymuş, bakteri-bakteri etkileşimi üzerinde etkili olduğu biyofilm analizleriyle belirlenmiştir. Bu çalışma, laboratuvar şartlarında hızlı, ucuz, yüksek miktarda ve geniş renk yelpazesinde üretilebilen bu antibakteriyal etkili pigment molekülünün endüstriyel alanda üretimi ve kullanımıyla ilgili gerçekleştirilecek çalışmalara bilimsel bir temel oluşturacaktır.



2. GENEL KISIMLAR

2.1. MANTARLARDA SEKONDER METABOLİZMA

Sekonder metabolizma, organizmanın yaşamsal işlevlerini ve soyunu devam ettirmesi için gerekli olmayan, canlının ortama adaptasyonunu arttıran ve bulunduğu ortamda diğer canlılara karşı avantajlı olmasını sağlayan düşük molekül ağırlıklı farklı kimyasal yapıdaki metabolitlerin sentezi ve yıkımını içeren metabolik ağlar olarak tanımlanmaktadır (Luckner ve diğ., 1977). Sekonder metabolitlerin büyük bir bölümü primer metabolik yollarda ara ürün olarak sentezlenmekte iken daha az sayıdaki metabolit primer metabolizmadan bağımsız yollarla da sentezlenebilmektedir. Kimyasal yapı bakımından yüksek çeşitliliğe sahip olan bu metabolitlerin her biri birden fazla biyosentez yolağında öncül moleküller olarak da kullanılabilmektedir. Bu şekilde birden fazla metabolitin biyosentezi daha az enerji harcanarak gerçekleştirilebilmektedir (Firn ve Jones, 2000; Shwab ve Keller, 2008).

Filamentli mantarlar da diğer canlılarda olduğu gibi yaşam döngüleri boyunca pek çok sekonder metaboliti sentezlemektedir (Fox ve Howlett, 2008; Shwab ve Keller, 2008). Sentezlenen metabolitlerin bazılarının henüz işlevi bilinmemekle beraber büyük bölümü tıpta antibiyotik; gıda alanında katkı maddesi; inşaat endüstrisinde boyar madde, gıda katkı maddesi ve tarımsal alanda biyokontrol ajanı olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel metabolitlerin yanı sıra fungal organizma tarafından sentezlenen organik asit, poliketid ve terpenoid yapıdaki pek çok sekonder metabolit, organizmanın bulunduğu habitatda diğer canlıların üremelerini kontrol altına alabilmesine de yardımcı olabilmektedir (Azizan ve diğ., 2016).

Sekonder metabolit biyosentezi organizmanın yaşamsal faaliyetleri ve üreme süreçlerinden sorumlu olan primer metabolit sentezinin özgün basamaklarıyla eş zamanlı olarak gerçekleştirilmektedir. Filamentli mantarlarda sekonder metabolit biyosentezi ile sporulasyon sürecinin yakından ilişkili olduğu, hem sporulasyon hem de sekonder metabolit biyosentezinin başlamasında rol oynayan çevresel sinyaller ve paylaşılan özgün genlerin anlatım profilleri izlenerek ortaya konmuştur (Calvo ve diğ., 2002). Sekonder metabolitlerden çeşitli pigmentlerin sporulasyonu teşvik ettiği bildirilmiştir. *Fusarium* türleri tarafından da sentezlenen melanin pigment biyosentezinin seksüel ve aseksüel spor oluşumuyla yakından ilişkili olduğu, hücre duvarında biriken melaninin spor hücrelerini UV ışığının okside edici etkilerinden koruduğu belirlenmiştir. Pigment moleküllerinin yanı sıra sentezlenen

mikotoksinlerin de sekonder metabolit olarak sporulasyon ile yakından ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Örneğin, *F. graminearum*'da zearalenon biyosentezinin askokarp oluşumunu ve sporulasyonu indüklediği belirlenmiştir (Wolf ve Mirocha, 1973). *Aspergillus nidulans*'da poliamin biyosentezi inhibisyonunun hem sporulasyonu hem de mikotoksinlerden aflatoksin ve sterigmatosin biyosentezini inhibe ettiği ortaya konmuştur. Literatürde spor üretemeyen *Aspergillus* mutantlarında aflatoksin üretiminin de yapılamadığı rapor edilmiştir (Calvo ve diğ., 2002).

2.1.1. Sekonder Metabolit Biyosentezintezinden Sorumlu Genlerin Organizasyonu

Sekonder metabolit biyosentezi çok sayıda enzimatik basamaktan oluşan karmaşık metabolik yollar aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Mantar genomlarında aynı metabolik yolla ilişkili enzim ve diğer proteinleri şifreleyen genler genellikle türe özgün gen kümelerinde organize olmuşlardır (Fox ve Howlett, 2008). Moleküler yaklaşımlar; gen kümelerinin organizma genomlarına prokaryotik hücrelerden veya diğer mantar türlerinden horizontal gen transferi ile kazanıldığını, *Fusarium*, *Aspergillus* ve *Botrytis* türleri arasında gen kümesi transferlerinin gerçekleştiğini ortaya koymuştur (Khaldi ve diğ., 2008; Gardiner ve diğ., 2012). *Fusarium* genusu, diğer genuslarla karşılaştırıldığında 38 ortolog gen kümesinin bulunduğu belirlenmiştir. Ortolog gen kümelerinden 2 tanesi *Fusarium* genusu üyelerinden sadece *F. graminearum*'da bulunmaktadır. Örneğin, *F. graminearum* B05.1 ve *Botrytis fuckeliana* T4 izolatlarına ait genomlarda bulunan *Pks23* gen kümesinin horizontal gen transferi ile genomlara yerleşmiş olduğu gen kümesinin ve tüm genomun GC oranları karşılaştırılarak belirlenmiştir (Sieber ve diğ., 2014). Evrimsel süreçte gen kümelerinde bulunan genlerin dizilimlerini koruduğu düşünülmektedir (Keller ve Hohn, 1997; Khaldi ve diğ., 2008; Sieber ve diğ., 2014).

Gen kümelerinde bulunan genlerden biri, biyosentetik yolağın ilk basamağında basit yapılı moleküller arasında kondensasyon reaksiyonunu kataliz ederek karmaşık yapılı bir molekülün sentezini gerçekleştiren enzimi şifrelemektedir. Non-ribozomal peptid sentaz, poliketid sentaz veya terpen sentaz aktivitesi gösteren bu enzimler, yolağın diğer basamaklarında yine gen kümesindeki diğer genlerde kodlanan metiltransferaz, açıltransferaz ve oksidoredüktaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlarla modifiye edilir. Gen kümelerinde, sentezlenen metabolitin hücre dışına transportunu sağlayacak bir transmembran proteinini şifreleyen gen ile gen kümesindeki genlerin anlatımlarını pozitif yönde düzenleyecek yolak özgün transkripsiyon faktörlerini şifreleyen genler de bulunmaktadır (Ma ve diğ., 2013).

Mantar genomlarında gen kümesinde yer almayan genler de sekonder metabolit üretiminde görevlidir. Örneğin sefalosporin antibiyotiği ve melanin pigmenti bitosentezinden sorumlu enzimleri şifreleyen genler bazı mantar türlerinin (örneğin *Alternaria alternata*) genomunda farklı lokuslara dağılmışlardır. Bu durumun; başlangıçta gen kümesi halinde bulunan genleri bir arada tutacak seleksiyon baskısının olmaması veya baskının ilgili metabolik yolağın yok olması yönünde gerçekleşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Keller ve Hohn, 1997).

Fusarium genusu üyeleri çok sayıda sekonder metaboliti sentezleyebilmektedir (Cole ve diğ., 2003). Bir *Fusarium* türü bu metabolitlerden birkaçını eş zamanlı olarak sentezleyebilme kapasitesine sahip olabilmektedir (Desjardins ve diğ., 2006). Türler arasındaki yüksek genetik çeşitlilik ilgili gen kümelerinin farklı *Fusarium* türlerinde heterojen bir şekilde taşınması ve dağılmasına yol açmıştır (Ma ve diğ., 2010). Studt ve diğ. (2012) gerçekleştirdikleri çalışmalarında fusarubin biyosentezi ile ilişkili gen kümelerinin genomdaki yerleşimlerinin *F. graminearum*, *F. verticilliodies* ve *F. fujikuroi* genomlarında farklı olduğunu belirlemişlerdir. Ek olarak, filogenetik olarak birbiriyle yakın ilişkili iki türün, aynı sekonder metabolit yolağına sahip olmayabileceği de ortaya konmuştur. Örneğin, fumonisin ve giberellin biyosentezinden sorumlu gen kümeleri *F. fujikuroi* ve *F. oxysporum* tür kompleksi üyelerinin tümünde taşınmamaktadır (Bömke ve diğ., 2009; Ma ve diğ., 2013).

2.1.2. Gen Kümelerinin Anlatımının Kontrolü

Gen kümesindeki genler genellikle aynı kromozomda yakın lokuslarda bulunmakta ve transkripsiyonları gen kümesinde bulunan yolak özgün transkripsiyon faktörleri ile genel transkripsiyon faktörlerinin hiyerarşik etkileşimleriyle gerçekleştirilmektedir (Khaldi ve diğ., 2008; Sieber ve diğ., 2014). Gen anlatımlarının kontrolü ise; biyotik ve abiyotik stres koşulları ve diğer çevresel sinyallere karşı verilen biyokimyasal ve fizyolojik yanıtla göre, heterodimerik G proteinleri, genel transkripsiyon faktörleri ve yolak özgün transkripsiyon faktörleri ile sağlanmaktadır (Yu ve Keller, 2005).

Mantar sekonder metabolizması; ışık, sıcaklık, ortamın pH'sı, karbon ve azot kaynakları değişimi gibi çevresel faktörlerden etkilenmekte ve bu koşullar biyokimyasal ve fizyolojik yanıt için sinyal görevi üstlenmektedir. Bu sinyaller hücrede bulunan heterodimerik G proteinleriyle algılanmaktadır. Hücresel yanıt, gen anlatım seviyeleri değiştirilerek düzenlenmektedir. G proteini, α , β ve γ alt birimleri ve hücre-içi efektör domeninden oluşmaktadır. G proteini,

hücrede G protein reseptörü ile kompleks (GPCR) halinde bulunmaktadır. G protein reseptörüne ligand bağlandığında $G\alpha$ ile kompleks halinde bulunan GDP molekülü, GTP'ye dönüştürülür ve $G\alpha$ -GTP kompleksi $G\beta$ alt biriminden ayrılır. Bu reaksiyon mantar hücrelerinde iki farklı sinyal iletim yolağını (adenilil siklaz cAMP protein kinaz [PKA] ve/veya mitojen-aktif protein kinaz [MAPK]) aktive etmektedir. Mantar hücrelerinde bu reaksiyonlar; seksüel üreme, hücre bölünmesi, hücre-hücre füzyonu ve patojenite gibi süreçleri kontrol etmektedir. G proteini aracılı sinyal iletim yolağı Rgs adı verilen proteinler tarafından düzenlenmektedir. Rgs proteinleri, $G\alpha$ alt biriminin GTPaz aktivitesini artırarak işlevsel olabilmektedir (Yu ve Keller, 2005). *A. nidulans*'da $G\alpha$ proteinine (FadA, GanA ve GanB) ve RGS proteinine (RgsA, RgsB ve RgsC) ait üçer protein homologunun bulunduğu ortaya konmuştur. FadA ve FlbA proteinlerinin de diğer faktörlerle beraber sterigmatosin mikotoksininin biyosentezini, vejetatif üremeyi ve aseksüel spor üretimini düzenlediği belirlenmiştir (Hicks ve diğ., 1997). RgsA proteinin pigment üretimini ve vejetatif üremeyi inhibe ettiği, aseksüel spor üretimini ve sterigmatosin biyosentezini ise indüklediği gösterilmiştir (Yu ve Keller, 2005). Çeşitli *Fusarium* türlerinde $\Delta FadA$ mutasyonunun farklı biyolojik aktivitelerde değişime yol açtığı; *F. sporotrichioides*'de spor üretimini azalttığı; *F. oxysporum*'da ise hem üremeyi yavaşlattığı hem de patojeniteyi azalttığı gösterilmiştir (Tag ve diğ., 2000; Jain ve diğ., 2002; Jain ve diğ., 2005). G protein sinyallenmesinin pigment üretimini kontrol ettiği de *Penicillium marneffi* ve *Cruhonectria parasitica*'de $\Delta G\alpha$ delesyon mutantlarıyla gerçekleştirilen çalışmalarla ortaya konmuştur. İki türün mutantlarında pigment üretiminin azaldığı ve miselyum renklenmesinin değiştiği gösterilmiştir (Zuber ve Hynes, 2003; Kasahara ve Nuss, 1997; Yu ve Keller, 2005). Mantar hücrelerinde pigment üretiminin G proteinleri ile düzenlendiği ise *P. marneffi*'de *GanB* geninin homoloğu olan *GasC* geninin delesyonuyla elde edilen mutantlarda ortaya konmuştur. Bu $\Delta GasC$ mutantlarının yabani alleli taşıyanlara göre çok daha düşük konsantrasyonda pigment sentezlediği gösterilmiştir (Zuber ve Hynes, 2003). Literatürde *Fusarium* türlerinde G proteinlerinin pigment biyosentezinden sorumlu genlerin anlatımının regülasyonundaki işlevleriyle ilişkili olarak henüz bir çalışma bulunmamaktadır.

Temel transkripsiyon faktörü olarak da isimlendirilen genel transkripsiyon faktörleri genomda farklı lokuslarda yerleşmiş genler tarafından, yolak özgün transkripsiyon faktörleri ise genellikle gen kümeleri içinde bulunan genler tarafından kodlanmaktadır. Genel transkripsiyon faktörleri genellikle Cys2His2 DNA bağlanma motifi taşımaktadır ve kromatin paketlenmesini

değiştirerek metabolit üretimini kontrol etmektedir (Yu ve Keller, 2005). *A. nidulans* genomunda keşfedilen ve filamentli mantarlarda sekonder metabolizmayı düzenleyen genel transkripsiyon faktörü olan velvet protein ailesinden LaeA proteinleri metil transferaz aktivitesine sahiptir ve farklı *Aspergillus* türlerinde sekonder metabolizmada görevli genlerin anlatımının yaklaşık % 10'unu düzenlemektedir (Bok ve Keller, 2004; Fox ve Howlett, 2008). 10 farklı proteinden (VeA, VeA-bezeri, VelB ve VosA protein grup üyelerine ait) oluşan LaeA proteinleri aynı zamanda; karanlıkta VeA proteininin VelB ve LaeA proteinleri ile etkileşime girmesi ile sekonder metabolizma ve seksüel-aseksüel üreme aydınlık/karanlığa göre düzenlemektedir (Bayram ve diğ., 2008; Bayram ve diğ., 2012). LaeA proteini karanlıkta VeA-VelB heterodimeri ile nukleusta kompleks oluşturarak sekonder metabolizmayı aktive etmektedir (Bok ve Keller, 2004; Bayram ve diğ., 2008). VeA proteini, bazı türlerde seksüel üremeyi, bazı türlerde ise aseksüel üremeyi pozitif şekilde düzenlemektedir (Jiang ve diğ., 2011). *F. graminearum* genomunda LaeA, VelA ve VelB genlerinin homologları tanımlanmış, FgLaeA'nın karanlık ortamda aseksüel gelişimin ve mikotoksinlerin de dâhil olduğu çeşitli sekonder metabolitlerin üretiminin düzenlenmesinde görev aldığı ortaya konmuştur. Ayrıca, delesyon mutantları ile yapılan çalışmalardan elde edilen $\Delta FgLaeA$, $\Delta FgVelA$ ve $\Delta FgVelB$ 'de pigment üretiminde önemli ölçüde azalma olduğu bildirilmiştir (Jiang ve diğ., 2011; Kim ve diğ., 2013). $\Delta FgLaeA$ 'da renkli sekonder metabolitlerden olan aurofusarinin kültürlemenin erken dönemlerinde gelişen hiplerde üretildiği, ancak kültürün ilerleyen dönemlerinde gelişen yeni hiplerde üretimin durduğu, bu nedenle kültürde radyal olarak genişleyen miselyumda radyal renklenme profili olduğu rapor edilmiştir (Kim ve diğ., 2013).

APSES protein ailesi, asklı mantar genomlarında bulunan bir diğer genel transkripsiyon faktörüdür. Bu ailede bulunan proteinler, yapılarında türler arasında yüksek nukleotid dizi benzerliğine sahip, sarmal-döngü-sarmal DNA bağlanma motifi olan APSES domenini taşımaktadır. APSES protein ailesi hücre siklusunun kontrolü, virulans ve patojenite, cAMP sinyal iletim yolağının ve sekonder metabolizmanın farklı basamaklarında gen anlatımını düzenlemektedir (Lysøe ve diğ., 2011). *F. graminearum* genomunda APSES protein ailesi üyesi olan StuAP faktörünün kodlandığı belirlenmiş ve $\Delta FgStuAP$ delesyon mutantlarıyla yapılan çalışmalarda genin; gelişme, seksüel/aseksüel sporulasyon ve pigment üretimi süreçlerinde aktif rol oynadığı belirlenmiştir (Lysøe ve diğ., 2011).

Regülasyon basamaklarının sonraki aşamalarında ise, gen kümelerinde bulunan genler tarafından kodlanan bir ya da birden fazla yolak-özgün transkripsiyon faktörü görev almaktadır. Genellikle $Zn(II)2Cys_6$ motifi taşıyan yolak özgün transkripsiyon faktörleri, gen kümesindeki genlerin anlatımlarını genellikle pozitif olarak düzenlerken organizmanın pH ve ortamdaki azot kaynakları gibi çevresel koşullara yanıt oluşturmada da işlevseldir (Yu ve Keller, 2005; Kim ve diğ., 2013). Son yapılan çalışmalar yolak özgün transkripsiyon faktörlerinin aynı zamanda farklı metabolik yolaklardaki genlerin anlatımını da düzenleyebileceğini ortaya koymuştur (Fox ve Howlett, 2008). *A. flavus* ve *A. parasiticus*'da aflatoksin biyosentezinden sorumlu gen kümesinde, *A. nidulans*'da ise sterigmatositin gen kümesinde bulunan *AflR* geninin aflatoksin gen kümesinin dışında bulunan üç farklı genin anlatımını da regüle ettiği belirlenmiştir (Yu ve diğ., 1996).

2.2. MANTAR SEKONDER METABOLİTLERİ

Mantarlar, penisilin ve siklosporin gibi farmakolojik; aflatoksin ve trikotesen gibi toksik ve ergot alkaloidler gibi hem toksik hem de farmakolojik özelliğe sahip pek çok sekonder metabolit sentezlemektedir. Üretilen sekonder metabolitlerin bakteri, mantar, protozoa, böcek ve virüslerin üremesini inhibe edici özellikleri ile birlikte antitümör aktivitesi de keşfedilmiştir. Aynı zamanda sitotoksik, mutajenik, karsinojenik, teratojenik, immün baskılayıcı ve enzim inhibitörü aktivitesi gibi pek çok biyolojik aktivitesi de belirlenmiştir (Keller ve diğ., 2005).

Mantar sekonder metabolitleri kimyasal yapılarına göre (1) non-ribozomal peptidler (NRPS) (2) terpenler, (3) indol alkaloidler, (4) poliketidler olmak üzere dört grup altında toplanmıştır. NRPS, proteinojenik amino asitler ve non-proteinojenik amino asitlerden türevlenmektedir. Çok alt birimli enzimler olan metabolitler, non-ribozomal peptid sentazlar olarak da isimlendirilmektedir. Farklı organizmalar tarafından sentezlenen NRPS'ler, peptid zincirinin uzunluğu ve aktif domenlerin etkileşime girdiği moleküller arasındaki farklar bakımından çeşitlilik göstermektedir. NRPS'ler arasında üzerinde en çok araştırma *Trichoderma virens* tarafından sentezlenen peptaibol sentaz enzimi ile yapılmaktadır. Bu enzim, tıpta organ transplantasyonunda immünosupresif ilaç olarak kullanılan siklosporin metabolitini sentezlemektedir (Weber ve diğ., 1994). *F. graminearum* genomunda 15 adet NRPS biyosentezi ile ilişki gen olabileceği bildirilmekle beraber *F. graminearum* ve *F. culmorum* tarafından sentezlenen NRPS grubuna ait ferrikrokin metabolitinin, organizmanın bitki

dokuları üzerinde neden olduğu enfeksiyon sürecinde kullanıldığı rapor edilmiştir (Tobiasen ve diğ., 2007).

Mantarların sentelediği terpenler, birden fazla halkasal veya doğrusal yapıdaki izopren ünitesinden meydana gelmektedir (Firn, 2010). Terpen sınıfındaki bileşikler kimyasal yapılarına göre üç gruba ayrılmaktadır: (1) monoterpenler (2) seskuiterpenler (3) diterpenler ve karotenoidler. Her bir grupta bulunan bileşik, farklı bir terpen siklaz enzimi tarafından farklı bir difosfat molekülünün substrat olarak kullanılmasıyla sentezlenmektedir. *F. fujikuroi*, *F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *A. terreus* ve *Penicillium roquefortii* başta olmak üzere pek çok mantar türlerinde hücrede farklı işlevlere sahip terpen sınıfına dahil metabolit tanımlanmıştır (Keller ve diğ., 2005).

2.2.1. Poliketidler

Poliketid sınıfı bileşikler; (1) altı halkalı aromatik poliketidler, (2) lakton ve laktam halkalarına sahip kompleks poliketidler olarak iki temel grup altında toplanırlar (Hranueli ve diğ., 2001; Calvo ve diğ., 2002). Poliketid biyosentezinden birden fazla domene sahip heteromultimerik poliketid sentaz enzimleri sorumludur. Enzimler, yapısında bulunan domen sayısına göre; tip-I, -II ve -III poliketid sentazlar şeklinde gruplandırılmaktadır. Her biri biyosentezin farklı bir basamağını kataliz etmektedir (Hranueli ve diğ., 2001).

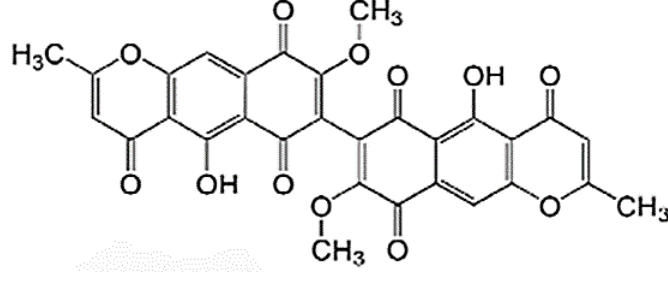
Poliketidler mantarlarda çok alt birimli PKS'ler tarafından sentezlenen en yaygın sekonder metabolit grubudur. PKS'ler, ökaryotik yağ asidi sentaz enzimleriyle yapısal olarak benzerlik göstermektedir. Her iki enzim de genellikle asetil koenzim A (asetil CoA) ve malonil CoA gibi kısa zincirli karboksilik asit arasında kondensasyon tepkimesini kataliz ederek farklı uzunluktaki karbon zincirlerini sentezlemektedir. Poliketidler ile yağ asitleri arasındaki en temel fark, yağ asitlerinin yapısında bulunan β -karbonlarının tamamının indirgenmiş olması, poliketidlerde ise indirgenmenin tüm karbonlarda gerçekleşmemesidir. Mantar PKS'lerinin tümünde ketoaçıl CoA sentaz (KS), açıltransferaz (AT) ve açıl taşıyıcı (ACP) domenler poliketid sentezinden sorumludur. Buna karşın, yağ asidi zincirlerindeki keton redüksiyonunu kataliz eden ketoredüktaz (KR), dehidrataz (DH) ve enoil redüktaz enzimleri bazı mantar PKS'lerinde bulunmaktadır. Poliketid biyosentezi, bir asetil CoA ve bir malonil CoA ünitesinin sırasıyla enzimin AT ve ACP domenlerine bağlanmasının ardından KS domeni tarafından kataliz edilen kondensasyon tepkimesi ile başlar.

Bakteriyal tip I PKS'lerde farklı olarak altı alt birimli bir domen (6-deoksi eritronolid B sentaz) daha bulunmaktadır. Bu domen, poliketid zincirine birden fazla metilmalonil CoA ekleyerek zincirin halkasal bir forma dönüştürülmesinden sorumludur. Mantar PKS'leri ise, poliketid zincirine yalnızca bir malonil CoA ekleyebildiğinden bu enzimlere tekrarlı PKS'ler adı verilmektedir. Örneğin *A. nidulans*'da üretilen askokuinon A pigmentinin öncülü olan naptopiron yapıdaki sarı renkli WA pigmentinin biyosentezini gerçekleştiren PKS enzimi, KS-AT-ACP domenlerine sahiptir. Enzim metilmalonil üniteleri arasında redüksiyon olmaksızın tekrarlı kondensasyon tepkimelerini katalizleyerek bir heptaketid zinciri sentezler. Enzimin tiyoesteraz motifine sahip olan C-terminal domeni, heptaketid zincirinin halkasal forma dönüştürülerek aromatik naptopiron molekülünün sentezlenmesinden sorumludur. Kondensasyon tepkimesinin kaç defa gerçekleştirileceği ve reaksiyonun hangi mekanizmalarla durdurulduğu henüz aydınlatılamamıştır (Brown ve Salvo, 1994).

Mantar poliketid bileşiklerinin çeşitliliği, kondensasyon tepkimesinin tekrar sayısı, biyosentez esnasında gerçekleşen redüksiyon reaksiyonlarının ve aromatik poliketidlerin biyosentezinde poliketid zincirinin siklizasyon reaksiyonlarının sayısına bağlı olarak değişmektedir. Poliketid molekülünün ileri kimyasal yapı modifikasyonları farklı enzimlerin kataliz ettiği reaksiyonlarla gerçekleştirilir. Örneğin, *A. nidulans* tarafından üretilen poliketid yapıdaki sterigmatosin mikotoksininin biyosentezi bir PKS enziminin hekzanoil CoA birimleri arasında kondensasyon tepkimesini kataliz etmesiyle başlar. Poliketid zincirinin biyosentezi gerçekleştikten sonra metabolit üzerinde beş farklı monooksijenaz, dört dehidrogenaz, bir O-metiltransferaz, bir redüktaz, bir oksidaz enzimi modifikasyon gerçekleştirir. Bu enzimleri şifreleyen genler, poliketid biyosentezini gerçekleştiren enzimi şifreleyen gen ile genellikle aynı gen kümesinde yer alır. *A. nidulans* genomunda olduğu gibi farklı *Aspergillus* ve *Fusarium* türlerine ait genomlarda da bir PKS geni ve çok sayıda poliketid zincir modifikasyon enzimini şifreleyen genin bir arada bulunduğu PKS gen kümeleri yer almaktadır (Keller ve diğ., 2005). *Fusarium* genusunun ürettiği poliketidlerin sentezi tip-I PKS tarafından kataliz edilmektedir (Keller ve Hohn, 1997; Chan ve diğ., 2009).

2.3. AUROFUSARİN

Aurofusarin *Fusarium* genusunun bazı türleri tarafından sentezlenen, moleküler ağırlığı 570 g/mol olan renkli bir sekonder metabolittir (Şekil 2.1).



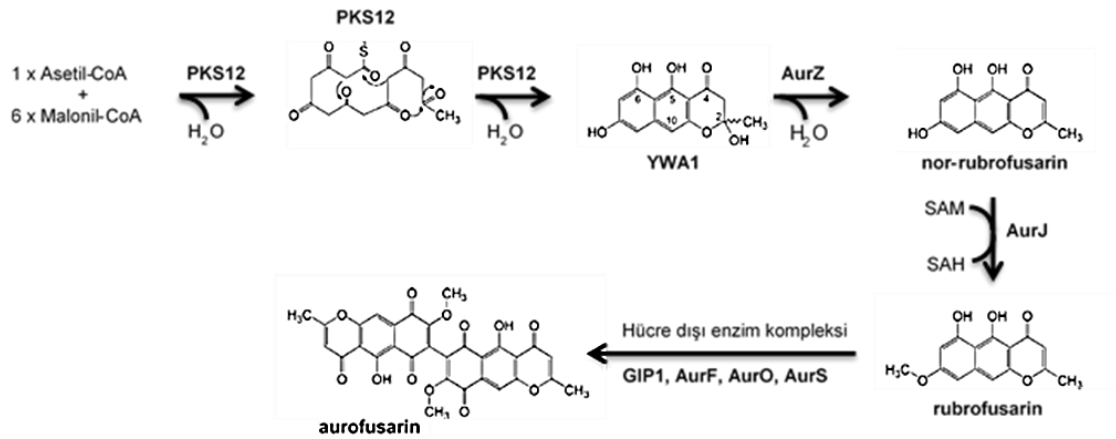
Şekil 2.1: Auropusarin, molekülün homodimerik yapısı (Frandsen ve diğ., (2006)'den alınmıştır).

Poliketid grubunun naptokuinon sınıfına dahil olan auropusarinin biyosentezi, PKS12 enzimi katalizörlüğünde başlatılmakta ve aynı gen kümesinde şifrelenen diğer enzimler tarafından molekül modifiye edilmektedir (Ashley ve diğ., 1937). Üretildiği mantarlarda miselyum renklenmesine neden olan metabolit aynı zamanda antimikrobiyal etkilidir (Medentsev ve diğ., 2005).

Aynı ve/veya farklı coğrafik bölgeden saflaştırılarak kültüre alınmış *Fusarium* izolatlarında miselyum renklenmesi, pH ve sıcaklık gibi kültür koşulları ile C ve N kaynaklarına bağlı olarak değişebilmektedir (Ashley ve diğ., 1937). Auropusarin, kendisi gibi renkli öncülü olan iki adet naftopiron yapısındaki rubropusarin molekülünün dimerleşme reaksiyonunun bir ürünüdür. Yapısındaki konjuge çift bağlar nedeniyle UV-görünür alanda 240 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon vermektedir (Frandsen ve diğ., 2010).

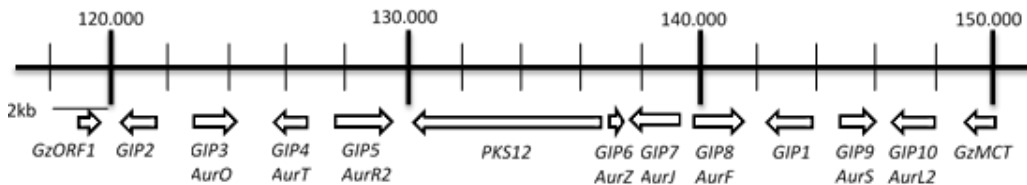
2.3.1. Auropusarin Gen Kümesi

Auropusarin biyosentezinden sorumlu genler ve biyosentez yolağı (Şekil 2.2), *F. graminearum* türünün farklı izolatlarından elde edilen delesyon mutantlarında gerçekleştirilen çalışmalarla ortaya konmuştur (Medentsev ve diğ., 2005; Kim ve diğ., 2008; Frandsen ve diğ., 2011).



Şekil 2.2: Aurofusarin biyosentezi (Frandsen ve diğ., (2011)'den alınmıştır).

Diğer sekonder metabolitlerin biyosentezinden sorumlu genlerde olduğu gibi aurofusarin sentezinden sorumlu genler de gen kümesi şeklinde organize olmuştur. Gen kümesinde altı adet katalitik enzimi (*Pks12*, *Gip1*, *Gip3*, *Gip7*, *Gip8* ve *Gip10*), iki transkripsiyon faktörünü (*Gip2* ve *Gip5*), bir transmembran proteinini (*Gip4*) ve iki hipotetik proteini (*Gip6* ve *Gip9*) kodlayan toplam 11 adet gen bulunmaktadır (Şekil 2.3) (Malz ve diğ., 2005; Kim ve diğ., 2008; Frandsen ve diğ., 2011).



Şekil 2.3: Aurofusarin gen kümesi (Kim ve diğ., (2008)'den alınmıştır).

Gip2 ve *Gip5* genleri tarafından kodlanan transkripsiyon faktörlerinde Zn(II)2Cys6 DNA bağlanma motifi yer almaktadır. 1197 bp uzunluğundaki *Gip2* geninin protein ürünü 398 amino asit; 2177 bp uzunluğundaki *Gip5*'in ürünü ise 292 amino asit uzunluğundadır (Frandsen ve diğ., 2006). Biyosentez yolağında ilk basamaktaki reaksiyonu kataliz eden tip-I poliketid sentaz enzimi *Pks12* geninin ürünü olup yaklaşık 19200 amino asit uzunluğundadır (Proctor ve diğ., 2007). Bu enzim, biyosentez yolağındaki ilk ara ürün olan sarı renkli YWA1'in üretiminden sorumludur (Kim ve diğ., 2006; Frandsen ve diğ., 2006; Frandsen ve diğ., 2011). 514 bp

uzunluğa sahip olan *Gip6* geni 55 bç'lik bir intron tarafından ayrılan iki adet eksondan (398 ve 61 bç) oluşmaktadır. Genin ürünü olan 152 amino asitlik hipotetik protein, bir diğer renkli ara metabolit olan nor-rubrofusarin sentezinden sorumlu bir enzimdir. Gen kümesindeki *Gip7* ise nor-rubrofusarinden rubrofusarin biyosentezini kataliz eden S-adonizil-L-metiyonin (SAM) grubu taşıyan O-metiltransferazı şifrelemektedir. Hücre içinde sentezlenen rubrofusarin, 629 ve 1635 bç'lik iki adet ekzondan oluşan *Gip4* geninin kodladığı transmembran proteinini aracılığıyla hücre dışına pompalanmaktadır. Hücre dışında rubrofusarinin aurofusarine dönüşümünden, dört genin (*Gip1*, *Gip8*, *Gip3* ve *Gip9*) ürünü olan hücre dışı enzim kompleksi sorumludur. *Gip1* tarafından şifrelenen lakkaz enzimi, rubrofusarin molekülünün C5-OH veya C6-OH gruplarından elektron koparılmasını kataliz etmektedir. Bu reaksiyondan sonra sırasıyla *Gip8* ve *Gip3* genleri tarafından şifrelenen flavin içeren monooksijenaz enzimi (P450 monooksijenaz) ve FAD/FMN içeren dehidrogenaz enzimleri dimerik moleküllerden hidrojen atomunun uzaklaştırılmasını sağlar. *Gip9* geni 48 bç'lik bir intron bölgesinin ayırdığı iki adet ekson bölgesi taşımaktadır. Genin primer transkriptinden (1281 baz) 407 amino asitlik bir hipotetik protein sentezlenmektedir. Gen kümesindeki bir diğer gen, *Gip10*, askorbat oksijenazı şifrelemektedir (Kim ve diğ., 2008; Frandsen ve diğ., 2006). Ancak, delesyon mutantlarıyla gerçekleştirilen çalışmalarda, ilgili genin aurofusarin biyosentezinde görev almadığı ortaya konmuştur (Kim ve diğ., 2008; Frandsen ve diğ., 2006).

2.3.2. Aurofusarin Biyosentezinden Sorumlu Genlerin Anlatımlarının Düzenlenmesi

Besin kaynaklarında azalma, oksidatif stres, solunumun inhibisyonu gibi çeşitli stres faktörlerinin miselyum büyümesini yavaşlatırken aurofusarin biyosentezini indüklediği rapor edilmiştir (Malz ve diğ., 2005; Kim ve diğ., 2008). Abiyotik stres koşullarında üretilen aurofusarinin primer metabolitlerin biyosentez miktarında da değişikliğe neden olduğu düşünülmektedir (Kim ve diğ., 2008). Aurofusarin biyosentezinden sorumlu genlerin anlatımı, çevreden gelen sinyaller doğrultusunda genel transkripsiyon faktörleri ve yolak içi transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenmektedir. *F. graminearum*'da temel transkripsiyon faktörlerinden velvet protein ailesi üyesi olan *ΔFgVea*'nın delesyon mutantlarıyla yapılan çalışmalarda, miselyumların kırmızı pigment üretmediği gözlenmiştir. Aynı mutantlarda *Pks12* ve *Gip7* genlerinin anlatımlarının yapılmadığı da ortaya konmuştur (Jiang ve diğ., 2011). Mantar genomlarında bulunan bir diğer transkripsiyon faktörü olan APSES protein ailesinden *ΔFgStuAP*'ya ait mutantlarının ise aurofusarin ürettiği belirlenmiştir (Lysøe ve diğ., 2011).

Aurofusarin gen kümesinde bulunan ve yolak içi transkripsiyon faktör genlerinin delesyon mutantlarıyla yapılan çalışmalarda *Gip2* gen ürününün gen kümesindeki diğer genlerin anlatımlarını pozitif yönde düzenlediği ortaya konmuştur (Frandsen ve diğ., 2006; Kim ve diğ., 2008). Δ *Gip5* mutantlarında ise gen kümesindeki genlerin anlatımlarında bir farklılık olmadığı, buna karşın miselyumlarda mutant olmayan izolatlar göre daha fazla rubrofusarin biriktiği belirlenmiştir (Frandsen ve diğ., 2006).

Hücredeki metilenhidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimlerinin aktivitesinin de aurofusarin biyosentezinin kontrolünde önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir (Frandsen ve diğ., 2010). Pek çok primer metabolik reaksiyonun katalizinde önemli görevler üstlenen MTHFR enzimlerini şifreleyen genlerdeki kusurlar insanda hiperhomosisteinemi, nöral tüp defekti, kalp-damar hastalıkları gibi pek çok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Frandsen ve diğ., 2010). Çok sayıda mantar genomu karşılaştırılarak, şimdiye kadar tanımlanmış MTHFR şifreleyen genlere ek olarak *Met12* ve *Met13* olarak isimlendirilen iki genin daha sadece mantarlarda bulunduğu ortaya konmuştur. *Met12* ve *Met13* enzimleri kofaktör olarak flavin adenin dinukleotid (FAD), indirgeyici ajan olarak NAD(P)H kullanarak 5,10-metilentetrafolatın 5-metiltetrahidrofolata indirgenme reaksiyonunu kataliz etmektedir. 5-metiltetrahidrofolat, L-homosisteinden metilasyonla L-metiyonin amino asidinin sentezinde C sağlayıcısı olarak görev almaktadır. L-metiyonin biyosentezinin yanı sıra, bu yolakta görevli SAM molekülleri, nükleotid biyosentezi aracılığıyla C sağlayıcısı olarak görev almaktadır. SAM'ın aynı zamanda *Gip7* tarafından şifrelenen SAM bağımlı-O-metiltransferaz enzimi tarafından kataliz edilen nor-rubrofusarinden rubrofusarin sentezinde de C sağlayıcısı olarak görev aldığı belirlenmiştir (Frandsen ve diğ., 2010). *F. graminearum*'da Δ *Met12* mutantlarının aurofusarin üretmediği ancak miselyumlarda nor-rubrofusarin ve rubrofusarinin biriktiği belirlenmiştir. Δ *Met13* mutantlarında ise hücre dışı enzim komplekslerinin (lakkaz, P450 monooksijenaz ve FAD/FMN içeren dehidrogenaz) işlevsel olmaması nedeniyle aurofusarin üretilmediği saptanmıştır. Mutantlarda aurofusarin biyosenteziyle ilişkili gen anlatımlarında bir farklılık olamamasına rağmen miselyumlarda nor-rubrofusarin ve rubrofusarin moleküllerinin biriktiği rapor edilmiştir. Aynı zamanda yüksek konsantrasyonda metiyonin içeren ortamlarda üretilen delesyon mutantlarında (Δ *Met13*) hücre dışı enzim kompleksinde bulunan, *Gip8* tarafından kodlanan, P450 monooksijenaz enziminin de işlevsiz kaldığı belirlenmiştir (Frandsen ve diğ., 2011).

Aurofusarin biyosentezini etkileyen bir diğer mekanizma ise kromatin modifikasyonlarıdır. *F. graminearum* PH-1 izolatının heterokromatin proteinini (HEP1) şifreleyen *Hep1* geninin delesyonu ile elde edilen mutantlarda, *Gip2* ve *Pks12* genlerinin anlatım seviyeleri önemli ölçüde artmıştır (Reyes-Dominguez ve diğ., 2012).

2.3.3. Aurofusarin Sentezleyen *F. graminearum* ve *F. culmorum* Türleri

Aurofusarin, aralarında *F. graminearum* ve *F. culmorum*'un da dahil olduğu pek çok *Fusarium* türü tarafından sentezlenmektedir. Aurofusarin, miselyum renklenmesinde aktif rol üstlenmekle birlikte, ekstrem koşullar altında miselyum büyümesini azaltıcı etki göstererek organizmanın adaptasyon yeteneğini artırmaktadır (Medentsev ve diğ., 2005; Kim ve diğ., 2008).

F. graminearum Schwabe ülkemizde ve dünya genelinde buğday, arpa, mısır başta olmak üzere ekonomik değere sahip farklı tahıl bitkilerinde *Fusarium* başak yanıklığı etmenidir (Goswami ve Kistler, 2004). Miselyumlar kış mevsimi boyunca hastalıklı bitki artıkları üzerinde varlığını sürdürmektedir. İlkbahardaki ılık ve nemli ortam koşulları, tahıl bitkilerinin çiçeklenmesiyle eş zamanlı olarak, miselyumlardan gelişen askokarplardan seksüel sporların (askospor) üretilmesi ile birlikte aseksüel sporların (konidiaspor) gelişmesi ve olgunlaşmasını da teşvik eder (Markel ve Franc, 2003). Askokarplarda olgunlaşan askosporlar, rüzgar, yağmur ve eklem bacaklılar aracılığıyla konakçı bitkilere taşınmaktadır (Parry ve diğ., 1995). Eşeyli üreme fazında homotallik olan *F. graminearum* genomunda farklı eşem (MAT) genleri aynı lokus üzerinde bulunmaktadır. Dört kromozom üzerinde organize olan 36-Mb boyutundaki *F. graminearum* genomunda yaklaşık 67 gen kümesi sekonder metabolit üretimi ile ilişkilendirilmiştir (Sieber ve diğ., 2014). Gen kümelerinde şimdiye kadar 15 poliketid sentaz, 19 non-ribozomal peptid sentaz ve 17 terpenoid sentaz enzimini şifreleyen gen bulunduğu ortaya konmuştur (Cuomo ve diğ., 2007; Hansen ve diğ., 2012; Wong ve diğ., 2011). Bu genler biyosentez yollarının temel sentez basamaklarını kataliz etmektedirler. Bununla birlikte gen kümelerinde toplam 114 adet sitokrom P450 geni kodlama bölgesi olduğu rapor edilmiştir. Bu enzimler, gen kümesinde kodlanan metiltransferaz, açıltransferaz, oksidoredüktaz ve glikoziltransferaz aktivitesine sahip diğer enzimler ile temel basamaklarda sentezlenmiş olan ara ürünlerin modifikasyonunda görev almaktadırlar (Sieber ve diğ., 2014; Tralamazza ve diğ., 2019). *F. graminearum* genomunda bulunan bu gen kümeleri, aurofusarin, bütenolid, siklamidosporol, kulmorin, siklonerodiol,

fusarin, trikotesen ve zearalenon olmak üzere sekiz farklı sekonder metabolit ve öncüllerinin biyosentezinden sorumludur.

F. culmorum (W.G. Smith) küçük daneli tahıllarda Fusarium başak yanıklığı, Fusarium solgunluğu, kök ve kök boğazı çürüklüğü ve küllenme hastalıklarına neden olan nekrotrofik bir fitopatojendir (Özer ve Soran, 1991; Waller ve diğ., 2005; Hornok ve diğ., 2007; Scherm ve diğ., 2013). Heterotallik olan organizmanın genomunda MAT lokuslarından sadece biri (MAT-1 veya MAT-2) veya ikisi birden taşınabilmektedir. 38.24 Mb büyüklüğündeki genom, *F. graminearum*'da olduğu gibi dört kromozomda taşınmaktadır. Genomda zearalenon ve aurofusarin biyosentezinde işlevsel poliketid sentaz enzimlerini şifreleyen genler ile birlikte trikotesen ve non-ribozomal peptid sentezinde işlevsel genlerin bulunduğu rapor edilmiştir (Tobiasen ve diğ., 2007; Atoui ve diğ., 2012; Scherm ve diğ., 2013). *F. graminearum* genomunda tanımlanan *FgStuAp* geniyle % 98,5 oranında benzerlik gösteren *FcStuA* transkripsiyon faktör geninin *F. graminearum*'da da olduğu gibi sekonder metabolizmanın düzenlenmesinde işlevsel olduğu belirlenmiştir (Lysøe ve diğ., 2011; Schmidt ve diğ., 2018).

2.5. MANTAR SEKONDER METABOLİTLERİNİN BİYOKONTROL AJANI OLARAK KULLANIMI

Fungal organizmalar tarafından sentezlenen sekonder metabolitler, sahip oldukları antibakteriyal etkileri nedeniyle temizlik endüstrisi, tıp ve tarım başta olmak üzere pek çok alanda kullanım potansiyeline sahiptir. *P. chrysogenum* tarafından üretilen penisilinin keşfi, mantarlar tarafından üretilen yeni antibakteriyal ajanların belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalara öncü olmuştur (Newton ve Abraham 1955). İlerleyen yıllarda, mantarlar tarafından sentezlenen sefalosporinler ve fusidik asit başta olmak üzere yüzlerce sekonder metabolitin kara ve denizlerde yaşayan farklı patojen türlere karşı biyokontrol ajanı olarak kullanılabileceği keşfedilmiştir (Wo ve diğ., 1962). Günümüzde tıp ve endüstri alanında kullanılan aurasperon H, asperkondol ve fumagillin gibi biyokontrol ajanlarının büyük bir bölümü *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* genuslarının dâhil olduğu asklı mantarlar grubu tarafından sentezlenmektedir (Bala ve diğ. 2011; Al-Fakih ve Almaqtri, 2019). Patojen ve endofitik *Fusarium* türleriyle gerçekleştirilen çalışmalar, farklı türler tarafından sentezlenen antibiyotik Y, beuverisin, enniatin ve fusarik asit gibi metabolitlerin farklı bakteri türleri üzerinde toksik etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Ek olarak, endofitik *Fusarium* türlerinin sentezledikleri bu metabolitlerle seralarda fitopatojenlere karşı biyokontrol ajanı olarak

kullanılabileceği rapor edilmiştir. Sondergaard ve diğ. (2016) *Fusarium* türleri tarafından üretilen 17 farklı sekonder metabolitin antibakteriyal etkisini araştırdıkları çalışmalarında; bu dört metabolitin *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella typhimurium* üzerinde; aurofusarinin ise *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium breve* üzerinde toksik etkiye sahip oldukları bildirmişlerdir. Thongkamngam ve Jaenaksorn (2017), endofitik *F. oxysporum* F221-B suşunun, fitopatojen türler olan *Curvularia lunata*, *F. semitectum*, *F. oxysporum* ve *Rhizoctonia solani*'ye karşı antagonistik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Mantarlar tarafından sentezlenen bir sekonder metabolitin antibakteriyal etkinliğinin test edilmesinde en sık uygulanan yaklaşımlar; (1) agar disk difüzyon testi, (2) agar plaka difüzyon testi ve (3) mikrodilüsyon testidir. Disk difüzyon testi, antibakteriyal ajan emdirilmiş diskin, yüksek sayıda hücrenin ekilmiş olduğu katı besi yerine yerleştirilmesinin ardından inkübasyon süresince ajanın besi yerine difüze olarak mikroorganizma üremesini inhibe etmesi temeline dayanmaktadır (Lee ve Kommary, 1976). Agar plaka difüzyon testi ise mikroorganizmaların antibakteriyal ajanı farklı konsantrasyonlarda içeren katı besi ortamına ekilerek üremenin gözlenmesi temeline dayanmaktadır. Mikrodilüsyon testi de mantar kültürlerinden hazırlanan özütün sulandırım serilerinin sıvı besi ortamına eklenmesi ve ardından üremenin izlenmesi temeline dayanmaktadır. Üremeyi inhibe eden doz (ing., minimum inhibitory concentration; MIC) ve bakteriyi öldüren dozun (ing., minimum bactericidal concentration; MBC) nicel olarak belirlenmesini sağlamaktadır (Al-Fakih ve Almaqtri, 2019).

2.5.1. Mantar Metabolitlerinin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkileri

Biyofilm birçok bakteri türü tarafından oluşturulan, DNA, protein ve polisakkaritlerden oluşan kompleks bir yapıdır. Biyofilimde bulunan bakteri hücreleri, yine kendileri tarafından üretilen bu kompleks matriksin içine gömülü halde bulunurlar. Bakteri hücreleri, biyofilm oluşturarak olumsuz çevre şartlarının etkilerine karşı kendilerini koruyabilmektedirler. Biyofilm yapısında bulunan bakteri hücreleriyle mücadelede başta antibiyotikler olmak üzere farklı kimyasal ajanlar kullanılmaktadır ancak tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklerin pek çoğu, biyofilm yapısı oluşturan bakteriler üzerinde etkisiz kalmaktadır (Rasamiravaka ve diğ., 2015). Bu nedenle bakteri enfeksiyonlarının tedavisine yönelik yeni ve etkili ajanların araştırılıp geliştirilmesi oldukça önemlidir. Bunun yanında, biyofilm oluşumu, konak organizmaya ait dokularda olduğu kadar medikal gereçlerin ve mimari yapıların yüzeylerinde de gerçekleşmektedir. Dokularda ve farklı yüzeylerde biyofilm oluşumunu inhibe eden veya

doğrudan biyofilm yapısını yok eden çok sayıda mantar metaboliti kullanılmaktadır. Bu metabolitler; biyofilm oluşumu için de mutlak gerekli olan hücreler arası iletişimde birlikte algılama olarak da ifade edilen “quorum sensing”i (QS) engelleyerek ya da yüzeye tutunan hücreleri öldürerek etkilerini ortaya koymaktadır (Estrela ve Abraham, 2016).

Günümüzde mantar hücreleri tarafından üretilen terpen, poliketid, ve non-ribozomal peptid sınıfına dahil olan pek çok sekonder metabolit, tıp alanına ve temizlik endüstrisine ait ticari ürünlerde biyofilm oluşumunun önlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin, *Candida albicans* tarafından üretilen terpen yapıdaki farnesol, belirli antibiyotiklere karşı dirençli olan *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* ve *Streptococcus mutans* türleri üzerinde toksik etki göstermiş ve bu türlerin oluşturduğu biyofilm yapısını inhibe etmiştir (Koo ve diğ., 2003). *C. albicans* tarafından sentezlenen ve non ribozomal peptid grubuna dahil olan tirosool, farnesol ile birlikte biyofilm inhibitörü olarak kullanılmaktadır (Tian ve diğ., 2016). Poliketid yapıdaki bileşiklerden protolikesterinik asit *P. aeruginosa* ve *Burkholderia cenocepacia* türlerinde biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir (Riedel ve diğ., 2008). Aynı şekilde *Penicillium* türleri tarafından üretilen poliketid grubu bileşiklerden patulin ve penisillik asit *P. aeruginosa*’da QS mekanizmasını baskılayarak biyofilm oluşumunu engellemiştir (Rasmussen ve diğ., 2005; Koch ve diğ., 2005). *Metarhizium anisopliae* tarafından sentezlenen poliketid sınıfı bileşiklerden izokumarin glikozitleri de *P. aeruginosa*’da biyofilm oluşumu üzerinde güçlü bir inhibitör etki göstermiştir (Tian ve diğ., 2016).

2.5.1.1. *P. aeruginosa* ve Biyofilm Oluşumu

P. aeruginosa, doğada hem toprak hem de su habitatlarında yaşamını sürdüren, memeliler, eklem bacaklılar ve nematodlardan oluşan geniş konak aralığında patojenik olan bir bakteri türüdür. (Warren ve diğ., 2017). Basil şekilli Gram negatif olan tür 1,5-3 µm boyutundadır (Bladen ve Mergenhagen, 1964). Aerobik solunum yapan *P. aeruginosa*’da hareket polar flagella ile sağlanmaktadır. Yüksek ısıya oldukça duyarlı olan bu tür, oda sıcaklığında özellikle organik kalıntıların bulunduğu ortamlarda aylarca canlılığını sürdürebilmektedir. Bu patojen, hastanelerde tedavi gören hastalarda zatürre, idrar yolu enfeksiyonu ve sepsis gibi komplikasyonlara neden olmaktadır (Bai ve Rai, 2015). Bakterinin kistik fibröz hastalarında yol açtığı enfeksiyonun akciğer hasarına ve hatta ölüme neden olduğu bildirilmiştir (Kollef ve diğ., 2014). Bakterinin neden olduğu enfeksiyonun bu derece tehlikeli olmasının temel nedeni, canlının β laktamlar, florokuinolonlar ve aminoglikozidlerin de içinde bulunduğu

antibiyotiklere karşı oldukça dirençli olmasıdır. Bu nedenle *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonların tedavisi, diğer bakteri enfeksiyonlarının tedavisiyle kıyaslandığında oldukça güçtür (Breindenstein ve diğ., 2011; Das ve diğ., 2016).

Doğada planktonik veya biyofilm oluşturarak canlılığını devam ettiren *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumu, *GacS/GacA* ve *RetS/LadS* ikili sistemi tarafından düzenlenen QS mekanizması ve hücre dışı polimerik bileşenlerin sentezlenmesiyle eş zamanlı olarak gerçekleştirilir. QS süreci, *LuxR* protein ailesi üyesi *LasR* ve *RhlR* transkripsiyon düzenleyicileri tarafından kontrol edilmektedir. Las sisteminde görevli 720 bp uzunluğundaki *LasR* geni, 606 bp'lık *LasI* geni tarafından şifrelenen açıl homoserin-lakton sentaz enzimi tarafından sentezlenen N-(3-okso-dodekanoil)- L-homoserin lakton (3-okso-C12-HSL) sinyal molekülü ile kompleks oluşturmaktadır. 3-okso-C12-HSL-*LasR* kompleksi aralarında *LasB* geni tarafından şifrelenen virulans faktörü olan, konak dokularındaki yüzey proteinlerinin yıkımından sorumlu elastaz enzimini şifreleyen *LasB* ile *RhlR*, *LasI* ve *RhlI* genlerinin anlatımını etkinleştirmektedir (Gilbert ve diğ., 2009). Rhl sisteminde görevli olan *RhlI* geni ise N-bütanoil- L-homoserin lakton (C4-HSL) bileşiğini sentezleyen açıl homoserin lakton sentaz enzimini şifrelemektedir (Soto-Aceves ve diğ., 2019). *RhlR* geninin ürünü olan transkripsiyon faktörü, C4HSL ile kompleks oluşturmakta ve bu kompleks ramnolipid bileşikleri ve piyosyanin pigmenti gibi virulans faktörlerinin sentezini yapan enzimleri şifreleyen genlerin anlatımını aktive etmektedir (Rasamivaraka ve diğ., 2014; Soto-Aceves ve diğ., 2019).

P. aeruginosa, antibiyotikleri enzimatik olarak modifiye ederek yapısını değiştirme yeteneğine ve antibiyotikleri hücre dışına pompalayan enerji bağımlı sistemlere sahiptir. Bu nedenle günümüzde kullanılan pek çok antibiyotik bu patojen üzerinde etkisiz kalmaktadır. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu hastalıklarla mücadelede ve yüzeylerde biyofilm oluşturmalarını önlemede alternatif doğal bileşiklerin keşfedilmesi büyük önem arz etmektedir. Hızlı ve ucuz şekilde üretimi yapılabilen doğal bileşiklerin araştırılmasında üç strateji üzerine durulmaktadır; (1) canlının yüzeye tutunmasının engellenmesi, (2) biyofilm oluşumunun engellenmesi, (3) var olan biyofilm yapısının yok edilmesi. Günümüze kadar hayvanlardan, mantarlardan ve bitkilerden elde edilen çeşitli doğal bileşiklerin *P. aeruginosa*'nın canlılığı ve biyofilm oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmış, fenolik bileşiklerin, terpenlerin, alkaloid ve flavonoidlerin QS ve biyofilm oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Rasamivaraka ve diğ., 2014).

Aurofusarinin de aralarında bulunduğu aromatik poliketidler farklı mikroorganizma sınıfları tarafından sentezlenen biyoaktif bileşiklerdir (Han ve diğ., 2018). Aromatik poliketid grubu bileşiklerden naftokuinon sınıfı bileşiklerin bakteri, maya ve mantar türleri için antimikrobiyal etkiye sahip oldukları bilinmektedir (Medentsev ve Akimenko, 1998). *Fusarium*'da aurofusarin sentezinin, zorlu çevre koşullarında miselyum üremesini inhibe edici aktiviteye sahip olduğu ortaya konmuştur (Malz ve diğ., 2005). Bu doğrultuda, *P. aeruginosa* ile mücadelede laboratuvar şartlarında ucuz ve hızlı şekilde üretimi yapılabilen aurofusarinin kullanım potansiyelinin değerlendirilmesi önem kazanmaktadır.

Bu çalışma kapsamında *F. graminearum* ve *F. culmorum*'da farklı ortam koşullarında miselyum renklenmesi ve aurofusarin biyosentezinin moleküler temelleri aydınlatılması ve aurofusarinin hangi şartta en yüksek miktarda üretildiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İki türe ait dokuz izolatta gerçekleştirilen moleküler analizler sonucunda en yüksek konsantrasyonda aurofusarin sentezleyen izolat (*F. culmorum* 9F) seçilerek kültürlenmiş ve kültürden aurofusarin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. aurofusarinin antibakteriyal etkinliği Uluslararası Standartlar Organizasyonu (ing. International Organization for Standardization; ISO) tarafından antibakteriyal etkinlik testlerinde kullanımı önerilen ve literatürdeki çalışmalarda da yaygın olarak kullanılan *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC15962), *Escherichia coli* (ATCC25922), *K. pneumoniae* (ATCC13833), *S. agalactiae* (DM20), *S. saprophyticus* (DM17), *S. aureus* (ATCC25923) ve *P. aeruginosa* (ATCC 27853) suşları üzerinde mikrodilüsyon testi ile araştırılmıştır (Valgas ve diğ., 2007; Balouiri ve diğ., 2016). Aurofusarinin biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerinde test edilmiş olup aynı zamanda biyofilm oluşumunu kontrol eden QS ile ilişkili genlerin anlatımları da analiz edilmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA MATERYALİ

Doktora tez çalışması kapsamında, pigmentasyonun moleküler analizi fitopatojenik mantarlardan *F. culmorum* ve *F. graminearum* türlerinin tarla izolatlarında gerçekleştirildi. Aurofusarinin toksik etkisi altı (6) farklı insan patojeni bakteri suşu üzerinde test edildi.

3.1.1. Fitopatojenik *Fusarium* İzolatları

Tez çalışmasında, tek spor analizi (Nash ve Snyder, 1961) ile saflaştırılarak İ.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonunda saklanan, yurdumuzun 4 farklı coğrafik bölgesinde etkili olan 24 *F. culmorum* ve 14 *F. graminearum* izolatı ile İran’da 3 farklı coğrafik bölgede hastalık etmeni olan 31 *F. graminearum* izolatı kullanıldı. *F. graminearum*’un 88-1 ve H-11 referans suşları ise Seul Ulusal Üniversitesi’nden Dr. Therese Lee’den sağlandı. Bitki patojenlerinin etkili olduğu coğrafik bölge, izolatların enfekte ettiği konak organizmaları ve moleküler özellikleri *F. graminearum* için Tablo 3.1 ve *F. culmorum* için 3.2’de verilmektedir.

3.1.2. Antibakteriyal Aktivite Analizlerinde Kullanılan Bakteri Referans Suşları

Antibakteriyal aktivite analizleri Amerikan kültür koleksiyonu materyali olan *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC15962), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. coli* (ATCC25922), *K. pneumoniae* (ATCC13833), *S. saprophyticus* (DM17) ve *S. aureus* (ATCC25923) referans suşları kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan *F. graminearum* izolatlarının, etkili olduğu coğrafik bölgeler, konak organizmaları, genotipleri ve genomlarında taşıdıkları MAT lokusları.

Kültür Kodu	Konak	Coğrafik Bölge	Kenotip	MAT1	MAT2	Kültür Kodu	Konak	Coğrafik Bölge	Kenotip	MAT1	MAT2
FgF5	Buğday	Sakarya	15ADON	+	+	Fg18	Buğday	Moghon	NIV	+	+
FgF6	Buğday	Sakarya	15ADON	+	+	Fg56	Buğday	Gorgan	NIV	+	+
FgF7	Buğday	Sakarya	15ADON	+	+	Fg49	Buğday	Moghon	DON	+	+
FgF8	Buğday	Sakarya	15ADON	+	+	Fg170	Buğday	Gorgan	NIV	+	+
FgF9	Buğday	Balıkesir	15ADON	+	+	Fg174	Buğday	Gorgan	NIV	+	+
Fg15F	Buğday	Sakarya	15ADON	+	+	Fg4	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+
Fg3F	Mısır	Samsun	15ADON	+	+	Fg5	Buğday	Sari	NIV	+	+
Fg5F	Mısır	Samsun	15ADON	+	+	Fg165	Buğday	Kordkooy	NIV	+	+
Fg6F	Mısır	Samsun	15ADON	+	+	Fgsh13	Buğday	Bilinmiyor	15ADON	+	+
Fg7F	Mısır	Samsun	15ADON	+	+	Fgsh14	Buğday	Bilinmiyor	DON	+	+
Fg14F	Buğday	Kastamonu	3ADON	+	+	Fgsh15	Buğday	Bilinmiyor	DON	+	+
Fg1F	Buğday	Bolu	NIV	+	+	Fgsh5	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+
Fg2F	Buğday	Çankırı	15ADON	+	+	Fgsh7	Buğday	Mazandaran	DON	+	+
Fg4F	Arpa	Bolu	15ADON	+	+	Fgsh10	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+
FgM1	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+	FgT2	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+
FgM3	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+	FgT3	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+
FgM5	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+	FgT7	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+
FgM6	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+	FgT9	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+
FgM7	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+	FgT10	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+
FgM9	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+	FgT11	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+
FgM10	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+	FgT12	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+
Fgsh1	Buğday	Mazandaran	DON	+	+	FgT16	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+
Fgsh4	Buğday	Mazandaran	NIV	+	+	H-11	Mısır	Kore	15ADON	+	+
88-1	Arpa	Kore	NIV	+	+						

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan *F. culmorum* izolatlarının etkili olduğu coğrafik bölgeler, konak organizmaları, kemotipleri genomlarında taşıdıkları MAT lokusları.

Kültür Kodu	Konak Organizma	Coğrafik Bölge	Kemotip	MAT-1	MAT-2
F1	Buğday	Marmara	DON	+	-
F2	Buğday	Marmara	DON	-	+
F3	Buğday	Konya	DON	-	+
F4	Buğday	Marmara	DON	-	+
F10	Buğday	Bilecik	DON	+	-
F12	Buğday	Balıkesir	DON	-	+
F14	Buğday	Bilecik	DON	-	+
F15	Buğday	Sinop	DON	+	-
F16	Buğday	Konya	DON	+	+
F17	Buğday	Konya	DON	+	-
F19	Buğday	Konya	DON	+	-
F20	Buğday	Bilecik	DON	-	+
F21	Buğday	Uşak	DON	+	-
F24	Buğday	Konya	DON	-	+
8F	Buğday	Ankara	DON	-	+
9F	Buğday	Isparta	DON	+	+
10F	Buğday	Samsun	DON	-	+
11F	Buğday	Çorum	DON	-	+
12F	Buğday	Amasya	DON	-	+
13F	Buğday	Konya	DON	+	+
17F	Buğday	Ankara	3ADON	+	+
18F	Buğday	Eskişehir	3ADON	+	+
19F	Buğday	Eskişehir	3ADON	+	+
20F	Arpa	Afyon	3ADON	+	-

3.2. MİKROORGANİZMALARIN İN VİTRO ÜRETİMİ

3.2.1. *Fusarium* Kültürlerinin Kurulması

Fitopatogenlerden 47 *F. graminearum* ve 24 *F. culmorum* izolatına ait kültürler, Tablo 3.3’de verilen bileşenlerin uygun konsantrasyonlarda bir araya getirilmesiyle hazırlanan sentetik nutrient agar (SNA) ve patates dekstroza agar besi ortamı (PDA) kullanılarak üretildi. Besi ortamları, 121 °C’de 1,2 atmosfer basınç altında 15 dakika boyunca steril edildi. Uzun süreli saklamaya alınacak izolatlar, SNA besi ortamında yedi (7) gün süreyle kontrollü şartlar altında (25 °C sıcaklık, % 50 nem, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık) üretildi. Süre sonunda miselyumların üzerine 5 ml % 15’lik gliserol eklendi. Miselyumlar steril öze yardımıyla süpürülerek 1,5 ml’lik steril mikrotüp içerisinde toplandı. Tüpler 16 saat boyunca -20 °C’de inkübe edildi ve süre sonunda -80 °C’de uzun süreli saklamaya alındı. Saklamaya alınan izolatların canlandırılması amacıyla, gliserol stoktan 500 µl alınarak PDA’ya ekildi. Vejetatif hiflerin oluşmasının ardından, izolatların metabolik olarak aktifleştirilmesi amacıyla

miselyumlar yeni bir PDA ortamına aktarılarak altı (6) gün süreyle yine aynı kontrollü koşullar altında kültürlendi. Farklı ortam koşullarında kararlı pigment üreten izolatların seçildiği çalışmada yetmiş bir (71) izolat 9×9 cm'lik petrilerde PDA besi ortamında 25 °C sıcaklıkta, % 50 nem ve 16 saat aydınlık/8 saat karanlık şartlarında yedi (7) gün süreyle üretildi. Bu koşullarda üretilen izolatlar çalışmada kontrol grubunu temsil etti. Kontrol grubunda gelişen miselyumların ürettiği pigmente bağlı olarak kültürlerin aldığı renkler kayıt altına alındı. Denemeler üç (3) tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Üç farklı zamanda kurulan kültürlerde de kararlı pigment üretiminin sonucu olarak aynı miselyum rengine sahip olan dört (4) *F. graminearum* ve beş (5) *F. culmorum* izolatı gen anlatımı ve HPLC analizlerinde kullanılmak üzere seçildi.

Tablo 3.3: *Fusarium* izolatlarının üretilmesinde kullanılan besi ortamları ve içerikleri.

Besi Ortamı (pH 5,6)	Bileşenler	Derişim
Sentetik Nutrient Agar (SNA)	KH ₂ PO ₄	7.35 mM
	KCl	6.7 mM
	KNO ₃	10 mM
	MgSO ₄ .7H ₂ O	2.02 mM
	Glukoz	1.11 mM
	Sukroz	0,58 mM
Patates Dekstroz Agar (PDA)	Agar	15 g/l
	Patates Özütü	4 g/l
	Dekstroz	20 g/l
	Agar	15 g/l

Farklı ortam koşullarının pigmentasyona etkisi kararlı pigment üreten dokuz (9) izolatta araştırıldı. Besi ortamının pH değişkenleri pH 3,0, pH 5,6 ve pH 7,0 olarak; inkübasyon sıcaklık değişkenleri de 15 ve 25 °C olarak test edildi (Tablo 3.4). Bu değişkenlerin kombinasyonu ile 5 grup oluşturularak deney setleri kuruldu (Tablo 3.4). Kültürler yedi (7) gün boyunca kontrollü koşullar altında (25 °C, % 50 nem ve 16 saat aydınlık /8 saat karanlık) üretildi. Denemeler üç (3) tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.4: pH ve sıcaklık değişkenleri ile oluşturulan deneme setleri. KG: Kontrol grubu; DG: Deney grubu.

	KG	DG1	DG2	DG3	DG4	DG5
Sıcaklık (°C)	25	15	15	25	15	25
pH	5,6	5,6	7,0	7,0	3,0	3,0

Pigmentasyon değişimlerinin üreme evreleri ile ve özgün gen anlatımlarının, aurufusarin ve öncül metabolitin üretilmesi ile ilişkisinin araştırılmasına yönelik çalışmalar, kontrollü şartlarda

her üç kültürlemede de kiremit kırmızısı rengine sahip miselyuma sahip *F. culmorum* türünün 9F tarla izolatında gerçekleştirildi. 9F izolatı PDA ortamında (25 °C, %50 nem ve 16 saat aydınlık /8 saat karanlık) yedi (7) gün boyunca kültürlendi ve koloni çapı ölçülerek kayıt altına alındı. Aynı zamanda miselyum pigmentasyonunun değiştiği saatler belirlenerek aurofusarin dönüşümü izlendi. Kültür pigmentasyonundaki değişimlerin moleküler temellerinin belirlenmesine yönelik analizler, hücre döngüsünün uyum (48. saat), logaritmik (72. saat) ve durağan (120. ve 168. saatler) evrelerinde gerçekleştirildi.

3.2.2. Bakteri Kültürlerinin Kurulması

Doktora tez çalışmasında kullanılan *E. coli* (ATCC25922), *K. pneumoniae* (ATCC13833), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC15692), *S. aureus* (ATCC25923) ve *S. saprophyticus* (DM17) suşlarına ait -80 °C'deki gliserol stok örnekleri steril öze yardımıyla alınarak Luria-Bertani agar (LBA) besi ortamına (Tablo 3.4) azaltma yöntemiyle ekildi ve 37 °C'de 16 saat süre ile inkübe edildi. Elde edilen tek kolonilerden steril öze ile alınan örnekler 3 ml LB besi ortamına aktararak 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde 180 rpm'de 16 saat boyunca üretilmek suretiyle metabolik olarak aktive edildi (Tablo 3.5).

Tablo 3.5: Bakteri suşlarının aktive edilmesinde ve kültürlenmesinde kullanılan besi ortamları ve içeriği (pH 7,0).

Besi Ortamı (pH 7,0)	Bileşenler	Derişim (mM)
Luria Bertani (LB)	Maya özütü	18,24
	NaCl	85,5
	Trypton	15,45
Luria Bertani Agar (LB ve Agar)	Agar	22,4

3.3. GENOMİK ANALİZLER

3.3.1. Genlerin Biyoinformatik Yaklaşımla Belirlenmesi ve Primer Tasarımı

Aurofusarin üretimi ile doğrudan ilişkili olduğu delesyon mutantlarında gösterilmiş *Pks12*, *Gip6*, *Gip7*, *Gip4* genleri ile genel transkripsiyon faktörünü şifreleyen *StuAp* geninin izolatların genomundaki varlığının PZR)ile taranması için bu genlere özgün primer molekülleri biyoinformatik araçlar yardımıyla tasarlandı. Bu kapsamda *F. graminearum* (PRJNA410599), *F. culmorum* (PRJEB12835) ve *F. pseudograminearum* (PRJNA326033) referans ırklarına ait ilgili gen dizilimleri NCBI (İng., National Center of Biotechnology Information) veri tabanında

“nukleotid¹” sekmesi seçilerek görüntülendi. Üç türe ait gen dizilimleri FASTA formatında kopyalanarak çevrimiçi hizmet veren CLUSTALW² programıyla hizalandı. İleri ve geri primer molekülleri için hizalama sonucunda üç izolatta ortak taşınan bölgeler belirlenerek tasarım gerçekleştirildi. Oligonukleotidlerin PZR’da kullanılabilirliği OligoAnalyser³ programında test edildi. Oligonukleotid dizilimlerinin self-dimer, hetero-dimer ve saç tokası oluşturma olasılıkları ΔG değerinin matematiksel olarak hesaplanması ile değerlendirildi. ΔG değerleri -6 ile 3 kcal/mol arasında (Mann ve diğ., 2009) olan oligonukleotidler PZR’da kullanılmak üzere seçildi. Seçilen oligonukleotidler, primer molekülü olarak kullanılmak üzere hizmet alımı ile IDT firması tarafından sentezlendi.

3.3.2. Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu ve Analizi

gDNA izolasyonu, kararlı pigment ürettiği saptanan dokuz izolattın (88-1, H-11, 3F, 7F, Fg174, 9F, 11F, F1 ve F14) yedi (7) günlük kültürlerinden (bkz. Bölüm 3.2.1) CTAB yöntemi (Doyle ve Doyle, 1987) modifiye edilerek gerçekleştirildi. Bu amaçla 50 mg miselyum örneği steril bistüri ile toplanıp steril porselen havanda sıvı azot yardımıyla parçalandı. Parçalama işlemine CTAB (100 mM Tris, 20 mM EDTA (pH 8,0), 1,4 M NaCl, % 2 CTAB, 1:500 (v/v) β -merkapto etanol) tamponu ile devam edildi. Homojenat steril mikrotüpe aktarıldı ve üzerine 8 M LiCl eklenip karıştırıldı. Karışıma kloroform:izoamil alkol (24:1) eklendikten sonra tüpler oda sıcaklığında 13000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı yeni bir tüpe alındıktan sonra üzerine RNazA (10 mg/ml) eklenip 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda eşit hacimde kloroform:izoamil alkol eklenip karıştırılan tüpler 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından üst sıvı yeni bir tüpe aktarıldı, 1/10 hacim 3 M NaOAc ve 2 hacim % 95 etanol eklendikten sonra örnekler -80 °C’de 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı. Üst sıvı atılıp tüpe 1 ml % 70 etanol eklenerek 13000 rpm’de 30 saniye santrifüj gerçekleştirildi. Üst sıvı uzaklaştırıldı ve gDNA pelleti 50 μ l steril saf su ile çözdürüldü. İzole edilen gDNA’ların miktar ve saflık değerleri NanoDrop 2000 cihazı ile belirlendi. Nukleik asit moleküllerinin 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki UV ışığı absorbans değerleri ölçüldükten sonra nukleik asit miktarı denklem 3.1’e göre hesaplanırken DNA saflığı A_{260}/A_{280} oranına göre hesaplandı.

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>[Ziyaret Tarihi: 30.06.2017]

² <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>[Ziyaret Tarihi: 30.06.2017]

³ <http://www.eu.idtdna.com/calc/analyzer/>[Ziyaret Tarihi: 30.06.2017]

$$\text{DNA Miktarı } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \text{Sulandırım Faktörü} \times 50 \quad (3.1)$$

Çalışılan örneklerle ait gDNA'ların nitel analizi agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla % 1'lik agaroz jel hazırlandı. Agaroz tris-asetat-EDTA (TAE) tamponunda (Tablo 3.6) çözdürüldükten ve soğutulduktan sonra süspansiyona etidyum bromür (10 mg/ml) eklendi. Jel kasetine dökülen jel katılaştıktan sonra izole edilen gDNA'lar elektroforez yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez, TAE (1×) tamponu ile 70 V sabit güç altında 30 dakika süre ile gerçekleştirildi.

Tablo 3.6: Agaroz jel hazırlığında ve elektroforezinde kullanılan tamponlara ait bileşenler ve derişimleri.

Tampon	Bileşenler	Derişim
Tris-Asetat-EDTA tamponu (TAE)	Tris bazı	2 M
	Glisiyal asetik asit	% 0,0571 (v/v)
	EDTA (pH 8,0)	0,05 M
	Tris-HCl (pH 7,6)	10 mM
Elektroforez yükleme tamponu (6×)	Bromofenol mavisi	% 0,03 (v/v)
	Xylene siyanol FF	% 0,03 (v/v)
	Gliserol	% 60 (v/v)
	EDTA	60 mM

3.3.3. Özgün Genlerin Çoğaltımı ve Analizi

Pks12, *Gip6*, *Gip7*, *Gip4* ve *StuAp* genleri PZR ile çoğaltıldı. Bileşenler reaksiyon karışımında 50 ng gDNA, 1 × PZR tamponu, 2,5 mM MgCl₂, 0,08 mM dNTP karışımı, 10 pmol ileri ve geri primerler, 0,2 U/μl Taq DNA polimeraz enzimi olacak şekilde 25 μl hacimde karıştırıldı. PZR koşulları 94°C'de ön denatürasyonu takiben 35 döngülük 94 °C'de 1 dakika, 54-55 °C'de 1 dakika ve 72 °C'de 2,5 dakikanın ardından 72 °C'de 5 dakikalık final uzama olacak şekilde uygulandı. Çoğaltım ürünleri % 1,5'luk agaroz jelle 1 kb DNA standardı (Thermo, ABD) ile yüklendikten sonra elektroforez ile 70 V sabit güç altında 30 dakika boyunca yürütüldü. Elektroforez sonrası çoğaltım ürünleri görüntüleme cihazı kullanılarak görüntülendi ve fotoğraflandı (Avegene, X-lite 200, Türkiye). Nukleotid sırası belirlenecek ürünler, bileşenlerin aynı konsantrasyonlarda 50 μl hacimde bir araya getirilmesi ile aynı koşullar altında çoğaltıldı. Çift yönlü dizileme REFGEN A.Ş. tarafından hizmet alımı ile Sanger metodu kullanılarak gerçekleştirildi.

3.4. TRANSKRİPTOM ANALİZLERİ

3.4.1. Gen Anlatımı Analizi için Kullanılan Primer-Prob Tasarımı

qPZR’de kullanılacak primer molekülleri Primer3 yazılım programı ve evrensel prob kitaplığı çevrimiçi servisi⁴ aracılığıyla tasarlandı. Oligonukleotid sentezi için veri bankalarında kayıt altına alınmış farklı türlere ait referans izolatları (*F. graminearum* [PRJNA410599], *F. culmorum* [PRJEB12835] ve *F. pseudograminearum* [PRJNA326033]) ait genom veri bilgisine NCBI veri bankasından ulaşıldı. *Pks12*, *Gip6*, *Gip7*, *Gip4* ve *FgStuAp* genlerinin kodlama dizileri tasarım için seçildi. Üç türe ait gen dizilimleri FASTA formatında kopyalanarak çevrimiçi hizmet veren CLUSTALW⁵ programıyla hizalandı. İleri ve geri primer moleküllerinin tasarımı, hizalama sonucunda üç izolatta ortak taşınan bölgeler belirlenerek gerçekleştirildi. PZR ile çoğaltımı yapılacak nihai ürün boyutunun 200 nukleotidi geçmemesi hedeflendi. Aynı zamanda primer moleküllerinin self-dimer ve saç tokası yapısı oluşturmalarının engellenmesi amacıyla oligonukleotidlere ait son üç nukleotidinin guanin (G) ve/veya sitozin (C) bazlarının olmaması sağlandı. Tasarlanan primerlerde ve prob moleküllerinde oluşabilecek muhtemel sap-ilmek, “self-dimer” ve “hetero-dimer” yapıları “Oligoanalyser” programı ile de kontrol edildi. ΔG değeri -6 ile +3 arasında olanlar kullanılmak üzere seçildi (bkz. 3.4.1). Prob olarak TaqMan monocolor UPL prob (Roche) dizileri tasarlandı. Bu kapsamda tasarlanan ileri ve geri primer molekülleriyle çoğaltılacak nukleotid dizilimi çevrimiçi hizmet veren “IDT Primer Request Tool⁶” aracına kopyalandı ve programın sunduğu dizilimler prob olarak kullanıldı.

3.4.2. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

F. graminearum ve *F. culmorum* türlerine ait dokuz izolatu (88-1, H-11, 3F, 7F, Fg174, 9F, 11F, F1, F14) Tablo 3.3’de verilen kontrol ve üç deney grubu (DG1, DG2 ve DG3) için kurulan yedi günlük kültürlerinden ve aynı zamanda kontrol grubu şartlarında kültürlenmiş 9F izolatının 48., 72., 120. ve 168. saatlik kültürlerinden (bkz. 3.2.1.) total RNA izolasyonu Tripure (Roche, İsviçre) ticari ürünü kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla 50 mg miselyum örneği steril bistiiri ile toplanıp steril porselen havanda sıvı azot yardımıyla parçalandı. Ezme işlemine 800 μ l Tripure eklenerek devam edildi. Homojenat steril mikrotüpe alınıp oda sıcaklığında 5 dakika

⁴ www.rocheappliedscience.com[Ziyaret Tarihi: 04.05.2017]

⁵ <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>[Ziyaret Tarihi: 30.06.2017]

⁶ <https://eu.idtdna.com/pages/tools/primerquest>[Ziyaret Tarihi: 06.05.2017]

bekletildi. Tüplere 160 µl kloroform eklenip karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 15 dakika daha inkübe edildi. Süre sonunda 4 °C'de 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Yeni tüpe aktarılan üst sıvıya 400 µl izopropanol eklendi, karıştırılan tüpler oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 4 °C'de 11000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Pellet steril DEPC'li destile su ile hazırlanmış % 75 etanol ile yıkandı ve ardından tüpler 4 °C'de 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün sonunda kurutulan pellet 50 µl steril nukleaz içermeyen su ile çözdürüldü. İzole edilen total RNA'ların miktar ve saflık değerleri NanoDrop 2000 cihazı ile yapılan ölçümlerle belirlendi. Nukleik asit moleküllerinin 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki UV ışığı absorbans değerleri alınıp nukleik asit miktarı denklem 3.2'ye göre, saflık değeri ise A_{260}/A_{280} oranına göre hesaplandı (Maniatis ve diğ., 1982).

$$\text{RNA Miktarı } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \text{Sulandırım Faktörü} \times 40 \quad (3.2)$$

İzole edilen total RNA'lardan cDNA sentezi termal döngü cihazında gerçekleştirildi. Bu amaçla ticari tek iplikli cDNA sentez kiti (Roche, İsviçre) kullanıldı. Total RNA konsantrasyonu tüm örneklerde 2 µg olarak normalize edildi. Bileşenler 2 µg total RNA ve 1.75 mM hegzamer olacak şekilde 11,4 µl içerisinde bir araya getirildi. Bileşenler, kısa süreli çöktürmenin ardından 65 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 1 × ters transkriptaz reaksiyon tamponu, koruyucu RNAaz inhibitörü (40 U/µl), dNTP karışımı (10 mM), diklorodifeniltrikloroetan (DDT) ve ters transkriptaz enzimi (20 U/µl) eklenen tüplerde cDNA sentezi 55 °C'de 30 dakika ve 85 °C'de 5 dakika uygulaması ile tamamlandı.

3.4.3. qPZR ve Analizi

Dokuz izolatin aurofusarin biyosentezinden sorumlu olan *Pks12*, *Gip6*, *Gip7*, *Gip4* ve *StuAP* genlerinin (bkz. 3.4.1) anlatım düzeyleri qPZR yöntemi ile belirlendi. Aynı zamanda *Pks12*, *Gip6*, *Gip7* gen anlatım seviye farklılıkları, 48., 72., 120. ve 168. saatlerinde sonlandırılan 9F izolatına ait kültürde aynı yaklaşımla tarandı. Kontrol geni olarak β -tubulin seçildi ve anlatım düzeyi eş zamanlı olarak belirlendi. Bileşenler 5 µl cDNA, 10 µl (1×) TaqMan Prob master karışımı (FastStart Taq DNA Polymerase, reaksiyon tamponu, MgCl₂ and dNTP karışımı), 0,4 µl (5 pmol) ileri ve geri primer, 0,2 µl (5 pmol) prob ve 4 µl dH₂O içeren toplam 20 µl hacimde mikroparka içerisinde bir araya getirildi. Plaka cihaza yerleştirilmeden önce 1500 rpm'de 20 saniye santrifüjde döndürüldü ve LightCycler 480 II (Roche) cihazına yerleştirildi. Ön denatürasyon 95 °C'de 10 dakika uygulaması ile sağlandı. Çoğaltım; 95 °C'de 10 saniye, 55-65 °C'de 10 saniye, 72 °C'de 30 saniye sürelerinden oluşan 45 döngüde sağlandı. Reaksiyon 40

°C’de 30 saniye uygulaması ile durduruldu. Eşik döngü (ing., Crossing Point; Cp) değerleri Roche LightCycler 480 yazılımı aracılığıyla belirlendi.

3.5. PİGMENT EKSTRAKSİYONU VE ANALİZİ

3.5.1. Aurofusarin ve Rubrofusarin Ekstraksiyonu

Aurofusarin ve ara metaboliti olan rubrofusarinin sıcak ekstraksiyonunda kloroform kullanılırken soğuk ekstraksiyonda su ile birlikte, metilen klorür, hekzan, metanol, butanol, asetik asit, dimetil sulfoksit (DMSO), etanol aseton, dietil eter ve kloroform organik çözücüler denendi. Pigment bileşiklerinin sıcakta ekstraksiyonuna ait ön denemeler kiremit kırmızısı (9F), sarı (H-11) ve mor pigmentli (3F) üç izolatta gerçekleştirildi. Sıcak ekstraksiyon için toplanan 1 gr miselyum bıçaklı homojenizatör ile parçalandı ve 25 ml organik çözücü (kloroform) kullanılarak ekstraksiyon balonuna aktarıldı. Geri soğutma düzeneğine bağlandı ve çözücü 5 saat süreyle kaynatıldı. Süre sonunda organik faz süzülerek yeni bir balona alındı. Ekstraksiyon balonu vakumlu döner buharlaştırıcı cihazına bağlandı ve kloroform uçuruldu. Balonda kalan pellet 1,5 ml kloroform ile çözdürülerek mikrotüpe aktarıldı. Pigment bileşiklerinin soğukta ön ekstraksiyonunda 100 mg yaş ağırlıklı miselyum cam tüp içerisine alındı. Üzerine 3 ml çözücü eklendi. Çözücü olarak su veya diğer organik çözücülerin her biri için ayrı denemeler gerçekleştirildi. İnkübasyon oda sıcaklığında 24 saat boyunca gerçekleştirildi. Süre sonunda miselyumlar süzüldü ve çözücü yeni bir tüpe aktarıldı (Harwood ve diğ., 1989).

Aurofusarin pigmenti ve ara metabolitleri, dokuz izolatın kontrol, DG1, DG2 ve DG3 ortamlarında üretilen kültürleri ile birlikte 9F izolatına ait 48., 72., 120. ve 168. saatlik kültürlerinden soğuk ekstraksiyonda verimi en yüksek olduğu belirlenen saf glisiyal asetik asit kullanılarak ekstre edildi. Bu kapsamda 20 g kültür parçalayıcı yardımıyla homojenize edilerek cam behere aktarıldı. Cam behere 100 ml asetik asit eklendi ve oda sıcaklığında 16 saat boyunca bekletildi. Süre sonunda üst sıvı süzülerek ekstraksiyon balonuna aktarıldı ve glisiyal asetik asit vakum altında uçuruldu (Harwood vd., 1989). Aurofusarinin antimikrobiyal etkisinin test edildiği mikrobiyal çalışmalarda kullanılacak ekstre ise yine soğuk ekstraksiyon metoduyla 2 ml DMSO ile hazırlandı.

3.5.2. İTK ile Analiz ve Standart Grafiğinin Oluşturulması

Aurofusarin pigmenti ve ara metabolitleri İTK ile görüntülendi. Pigment ekstresinden 2 µl alınarak İTK silika jel 60 F₂₅₄ plağına aurofusarin (Adipogen, İsviçre) ve rubrofusarin (Merck, ABD) standartları ile birlikte spotlandı. Hareketli faz olarak 7:3 klorofom:asetik asit kullanılarak pigment ve ara molekülleri yürütüldü (Fair ve Kormos, 2008). Örneklerin RF değerleri denklem 3.3'e göre hesaplandı. Kromatografi tabakaları gün ışığında görüntülendi.

$$RF = \frac{\text{Örneğin aldığı yol}}{\text{Mobil fazın aldığı yol}} \quad (3.3)$$

3.5.3. HPLC Analizi

Farklı ortam koşullarında kültürlendiğinde farklı pigmenasyona sahip *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarına ait kültürler ile 9F izolatına ait 48, 72, 120 ve 168 saatlik kültürlerinden ekstre edilen aurofusarin ve rubrofusarinin kantitatif analizi, HPLC-DAD sisteminde (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonya) 150 mm × 4,6 mm'lik 5 µm partikül boyuna sahip Mediterranean Sea 18 HPLC kolonu ile gerçekleştirildi (Frandsen vd., 2011). Analiz esnasında kullanılmak üzere iki farklı hareketli faz hazırlandı. 1. hareketli faz olan deiyonize su ve 2. hareketli faz olan % 0,2 oranında o-fosforik asit içeren metanol, gradient şeklinde kolona yüklendi. Yıkama programı 0. ile 14. dakikalar arasında, 2. hareketli fazın % 50'den % 100'e yükseleceği; 14. ile 18. dakikalar arasında ise % 100'den % 50'ye düşeceği şekilde programlandı. Hareketli fazın akış hızı dakikada 1 ml, kolonun sıcaklığı ise 30 °C olacak şekilde belirlendi. Aurofusarinin en yüksek absorbans verdiği dalga boyunun belirlenmesi amacıyla kolona 20 µl örnek yüklendi ve analiz 250-600 nm'ler arasında alan taraması gerçekleştirildi. Uygun dalga boyu belirlendikten sonra analizler aynı şartlarda 20 dakika boyunca gerçekleştirildi. Standart stok solüsyonları aurofusarin (100 mg/L), rubrofusarin (100 mg/L) ve kuersetin (I.S.) asetik asitte çözdürüldü ve 4 °C'de saklamaya alındı

3.6. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ

qPZR analizinden elde edilen verilerin kontrol genine (*β-tubulin*) göre kat artış ve azalışları, denklem 3.4 kullanılarak hesaplandı (Livak ve Schmittgen, 2006; Sarlin ve diğ., 2006, De Spiegelaere ve diğ., 2015).

$$\Delta Ct = 2^{-(Cp \text{ hedef}-Cp \text{ referans})} \quad (3.4)$$

İstatistiksel analizinde kullanılacak uygun metodun belirlenmesi amacıyla, kat artış ve azalışları hesaplanan verilerin log normal dağılıma uygunluğu Graphpad Prism 9 programı kullanılarak Sharpio-Wilk testi ile değerlendirildi (Sharpio ve Wilk, 1965). Kontrol ve deney grupları arasındaki farkların anlamlılığı, normal dağılıma uyan gruplarda parametrik bağımlı örneklem t testi ile, normal dağılıma uymayan gruplarda ise Wilcoxon testi ile değerlendirildi. Gen anlatım verileri, sentezlenen aurofusarin ve rubrofusarin miktarının ortam şartları ile olan ilişkisi ile yine Graphpad Prism 9.0 programı kullanılarak Spearman testi ile ortaya kondu. Aynı zamanda Spearman çoklu regresyon testi ve temel bileşenler analizi (İng., Principle Component Analysis-PCA) uygulanarak miselyum pigmentasyonu, gen anlatımı, sentezlenen aurofusarin ve rubrofusarin miktarı ve çevresel koşullar arasındaki ilişkiler de değerlendirildi.

3.6. AUROFUSARİNİN ANTİBAKTERİYAL ETKİSİNİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK ANALİZLER

3.6.1. Aurofusarinin % İnhibisyon Değerinin Belirlenmesi

Antibakteriyal etkisi araştırılacak olan aurofusarin ekstresi *F. culmorum* 9F izolatından soğuk ekstraksiyon ile DMSO kullanılarak hazırlandı (bkz. 3.5.1) ve ekstredeki aurofusarin konsantrasyonu spektrofotometrik yöntemle (bkz. 3.5.3) belirlendi.

İlk olarak DMSO'nun üreme üzerindeki % cinsinden inhibisyon değeri belirlendi. Bu amaçla bakteri suşları (bkz. 3.1.2), 3.2.2'de verildiği şekilde üretildi. OD₆₀₀ değeri 0,1 (10⁷ CFU/ml) olan bakteri kültürlerinden 2 µl alındı ve DMSO'nun % 7 ila % 33 (v/v) arasındaki tüm konsantrasyonlarda içeren toplam 200 µl LB'ye ekildi. Kültürler 37 °C'de 16 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra saf aurofusarinin ve aurofusarin ekstresinin bakteri üremesi üzerindeki % cinsinden inhibisyon değeri belirlendi. Bu doğrultuda saf aurofusarini 15 µg/µl - 110 µg/µl; kültür ekstresindeki aurofusarini ise 0,1 ng/µl - 30 ng/µl arasındaki tüm konsantrasyonlarda içeren 200 µl LB besi ortamı hazırlandı. Besi ortamına 3.2.2.'deki gibi üretilen ve OD₆₀₀ değeri 0,1 (10⁷ CFU/ml) olan bakteri kültürlerinden 2 µl ekildi ve kültürler 37 °C'de 16 saat boyunca inkübe edildi. Süre sonunda kültürlerle ait OD₆₀₀ değerleri ölçüldü. % inhibisyon değerleri, kontrol, normalizasyon ve deney gruplarına ait absorbans değerleri kullanılarak denklem 3.5'e göre hesaplandı. Deney gruplarına ait veriler normalizasyon gruplarına ait verilere oranlanarak % inhibisyon değerleri normalize edildi. Normalize edilen

veriler ile kontrol arasındaki farkların anlamlılığı tek yönlü ANOVA ile Graphpad 9.0 değerlendirildi. Çalışmalar üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

$$\% I = [(OD_c - OD_t) / OD_c] \times 100 \quad (3.5)$$

I; Üreme inhibiyonu, OD_c; Kontrol grubuna ait 600 nm'deki absorbans değeri, OD_t; Deney grubuna ait 600 nm'deki absorbans değeri

3.6.2. Zamana Bağlı Üreme Eğri Grafiklerinin Oluşturulması

Aurofusarinin bakteri hücrelerine ait üreme eğrisi üzerindeki etkisi, 3.6.1'de verilen denemeler sonucunda, üremeyi anlamlı şekilde yavaşlattığı belirlenen *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerinde gerçekleştirildi. Bu kapsamda bölüm 3.2.2'de verilen şekilde kültürlenmiş suşların üreme yoğunluğu, 24 saat boyunca OD₆₀₀ değerleri iki saatlik aralıklarla ölçülerek belirlendi ve üreme eğrisi grafiği çıkartıldı. Saf aurofusarin ve aurofusarin ekstresine ait üremeyi inhibe ettiği belirlenen dozun %25, %50 ve %75'ini içeren deney grupları ile deney gruplarıyla aynı oranda DMSO içeren normalizasyon grupları toplam hacim 200 µl olacak şekilde LB besiyeri kullanılarak oluşturuldu. Başlık 3.2.2'de verilen şekilde kurulan ve OD₆₀₀ değeri 0,1'e ulaşan kültürlerden 2 µl alınarak bu gruplara ekildi. Kültürler, 37 °C'de 24 saat boyunca inkübe edildi. Kültürlerden her iki saatte bir örnek alınarak 600 nm'deki absorbans değeri ölçüldü. Normalizasyon gruplarından elde edilen absorbanslar, deney gruplarından çıkarıldı ve kayıt altına alındı. Denemeler, üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi (Tablo 3.7).

Tablo 3.7: Saf aurofusarin, aurofusarin ekstresi ve DMSO içeren besi ortamlarında üreme eğrisi analizine yönelik olarak gerçekleştirilen deneme setleri kg: Kontrol grubu; dg-1: Saf aurofusarin ile kurulan deney grubu, ng-1: dg-1'e ait normalizasyon grubu, dg-2: Aurofusarin ekstresi ile kurulan deney grubu, ng-2: dg-2'ye ait normalizasyon grubu.

		Ticari Saf Aurofusarin	Aurofusarin Ekstresi	DMSO
kg		-	-	-
dg-1	dg1.15	+	-	+
	dg1.25	+	-	+
	dg1.40	+	-	+
ng-1	ng1.15	-	-	-
	ng1.40	-	-	-
	ng1.75	-	-	-
dg-2	dg2/32	-	+	+
	dg2/48	-	+	+
	dg2/72	-	+	+
ng-3	ng2./32	-	-	-
	ng2/48	-	-	-
	ng2/72	-	-	-

3.6.3. Proliferasyon Testi

Saf aurofusarinin ve aurofusarin ekstresinin *P. aeruginosa* PAO1 suşunun (bkz. 3.1.2) proliferasyonu üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, bakteri kültürleri 3.2.2'de belirtilen şekilde üretildi. Üretimin ardından bakteri kültüründen 2 µl alınarak aurofusarin standardı ve pigment ekstresinin üremeyi anlamlı şekilde inhibe eden dozlarının %25, %50 ve %75'ini içeren 200 µl LB besi ortamına aktarıldı. Hücreler logaritmik fazın ortasına ulaşana kadar (7 saat) 37 °C'de kültürlendi. Süre sonunda ortama, 1:10 (v/v) hacimde WST-1 (2-(4-İyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu) eklendi ve 37 °C'de 2 saat boyunca inkübe edildi. Kör örnek olarak dH₂O (200 µl) ve WST-1 (20 µl) karışımı hazırlandı. Eş zamanlı olarak sadece DMSO içeren, bölüm 3.6.1'de verilen % değerlerin kullanıldığı normalizasyon grubu ile birlikte pigment bileşikler ve çözücü içermeyen kontrol grubu için de deney setleri oluşturuldu (Tablo 3.5). İnkübasyon sonrası spektrofotometre ile 450 nm ve 620 nm dalga boyunda spektral ölçümü alındı. Çalışma üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. 620 nm ölçümden elde edilen verilerin 450 nm'de okunan değerlerden çıkartılmasıyla WST boyasının arka plan ışması ihmal edildi. Normalizasyon gruplarından elde edilen absorbans değerleri, deney gruplarınınkinden çıkarıldı ve kayıt altına alındı. Kontrol grubu ve normalize edilen deney grupları arasındaki oransal değişimler istatistiksel olarak Graphpad 9.0 programında tek yönlü ANOVA kullanılarak Tukey testi ile değerlendirildi. Pigment molekülü ve ara metabolitinin hücre proliferasyonuna etkisi grafikler halinde sunuldu.

3.7. AUROFUSARİNİN BİYOFİLM OLUŞUMUNA ETKİSİNİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK ANALİZLER

Aurofusarinin biyofilm oluşumu ve hücre-hücre iletişimine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda *P. aeruginosa* PAO1 3.2.2’de anlatıldığı şekilde kuruldu. Bölüm 3.6.2’de verilen deneme grupları (Tablo 3.5) düz tabanlı 96 kuyucuklu plaka içerisinde oluşturuldu. OD₆₀₀ değeri 0,1’e ulaşan kültürlerden 2 µl alınarak inoküle edildi ve plaka 37 °C’de 24 saat boyunca inkübe edildi. Ardından biyofilm kütle ve metabolik aktivite analizleri üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.7.1. Biyofilm Kütle Analizi

3.6’da verildiği şekilde 96 kuyucuklu plakada üretilen kültürler 24 saatin sonunda ters-yüz edilerek besi ortamı içindeki hareketli hücreler ile birlikte uzaklaştırıldı. Mikroplaka kuyularına tutunmuş olan hücreler % 0,85’lik (w/v) NaCl çözeltisi ile nazikçe yıkandı ve çözelti uzaklaştırıldı. Kuyulara 250 µl saf metanol eklenerek 5 dakika bekletildi. Süre sonunda metanol uzaklaştırıldı. Ortama 250 µl % 0,1’lik kristal viyole eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Süre sonunda boya uzaklaştırıldı ve kuyular saf su ile yıkandı ve kurutuldu. Kuyulara 200 µl % 33’lük (v/v) glisyal asetik asit eklendi ve spektrofotometrede 570 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldü. Biyofilm inhibisyonu denklem 3.7’de verilen formüle göre hesaplandı (Chanda ve diğ., 2017). Normalizasyon gruplarından elde edilen veriler deney gruplarınınkinden çıkartılarak deney gruplarına ait veriler normalize edildi. Normalize veriler ile kontrol grubu verileri arasındaki farkın anlamlılığı Graphpad Prism 9.0 programı kullanılarak tek yönlü ANOVA ile Tukey testi kullanılarak değerlendirildi.

$$\% \text{ BI} = [(OD_c - OD_t) / OD_c] \times 100 \quad (3.6)$$

BI; Biyofilm inhibisyonu, OD_c; Kontrol grubuna ait 570 nm’deki absorbans değeri, OD_t; Deney grubuna ait 570 nm’deki absorbans değeri

3.7.2. Biyofilm Metabolik Aktivite Analizi

Bölüm 3.7’de verildiği şekilde elde edilen 24 saatlik bakteri kültürlerinin besi ortamı ve içindeki hareketli hücreleri 96 kuyucuklu plaka ters-yüz edilerek uzaklaştırıldı. Mikroplaka kuyularına 200 µl alamar mavisi (% 10; v/v) içeren LB eklendi. Kültür 37 °C’de 180 rpm’de 5 saat inkübe edildi. Süre sonunda spektrofotometrede 570 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldü.

Biyofilm metabolik aktiviteleri denklem 3.7’de verilen formüle göre hesaplandı. Normalizasyon gruplarından elde edilen veriler deney gruplarınıninkilerden çıkartılarak deney gruplarına ait veriler normalize edildi. Normalize veriler ile kontrol grubu verileri arasındaki farkın anlamlılığı Graphpad Prism 9.0 programı kullanılarak tek yönlü ANOVA ile Tukey testi kullanılarak değerlendirildi.

$$\% \text{ BI} = [(Ac - At) / Ac] \times 100 \quad (3.7)$$

BI; Biyofilm inhibiyonu, Ac; Kontrol grubuna ait 570 nm’deki absorbans değeri, At; Deney grubuna ait 570 nm’deki absorbans değeri

3.7.3. Aurofusarin Kaynaklı Biyofilm Oluşumu Sürecinde Hücre-Hücre Etkileşim Analizi

Aurafusarin ve pigment ekstresinin biyofilm oluşturma sürecini kontrol eden QS ile ilişkili genlerin anlatım düzeyleri üzerindeki etkisi araştırıldı. Bu kapsamda öncelikle *LasB*, *LasI* ve *LasR* genlerinin *P. aeruginosa* PAO1 referans genomundaki varlığı özgün primerlerin kullanıldığı PZR ile teyit edildi. Ardından saf aurofusarini ve aurofusarin ekstresinin üremeyi yavaşlatan dozlarının %25, %55 ve %75’ini içeren deneme grupları ve normalizasyon gruplarına ait kültürde (Tablo 3.5) bakteri hücreleri arasındaki QS ile ilişkili gen anlatım düzeyleri qPZR ile belirlendi.

3.7.3.1. gDNA İzolasyonu

P. aeruginosa PAO1 suşunun genomik DNA izolasyonu ticari kit (Genomic DNA Purification Kit Roche, İsviçre) kullanılarak gerçekleştirildi. Bölüm 3.3.2’de verildiği şekilde üretilen 10 ml kültür 7000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pellet 200 µl PBS eklenerek (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) çözdürüldü. Tüpe 5 µl lizozim eklendi ve 37 °C’de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tüpe sırasıyla 200 µl bağlama tamponu ve 10 µl RNaz eklenerek 65 °C’de 20 dakika inkübe edildi. Süre sonunda tüpe 40 µl Proteinaz K eklendi ve tüp vorteks ile karıştırıldı. 70 °C’de 10 dakikalık inkübasyonun ardından sıvı toplama tüpüne aktarıldı. 1000 rpm’de 1 dakikalık santrifüjün ardından filtreli tüp temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi. Tüpe 500 µl yıkama tapmonu eklendi ve 10000 rpm’de 1 dakika santrifüj uygulandı. Yıkama basamağı tekrar edildikten sonra filtreli tüp steril bir mikrotüpe aktarıldı. Tüpe önceden ısıtılmış

elüsyon tamponu eklendi ve tüp 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda 10000 rpm’de 1 dakika santrifüj uygulanarak gDNA izolasyonu tamamlandı. Miktar ve saflık tayini Bölüm 3.4.2’de verildiği şekilde gerçekleştirildi.

3.7.3.2. Primer Tasarımı ve QS Genlerinin Çoğaltımı

gDNA’dan genlerin PZR aracılı çoğaltımında ve qPZR’de kullanılacak primer moleküllerinin tasarımı amacıyla *P. aeruginosa* PAO1 suşuna ait genom bilgisine NCBI veritabanı “Gene”⁷ sekmesi seçilerek ulaşıldı. İleri ve geri primer molekülleri çoğaltımı hedeflenen genlerin nukleotid dizilimlerine (*LasB* Gen ID: 880368; *LasI* Gen ID: 881777; *LasR* Gen ID: 881789) göre Primer3 yazılım programı aracılığıyla Bölüm 3.3.1’deki gibi tasarlandı.

PZR reaksiyonunda 50 ng gDNA, 1× PZR tamponu, 1,5 mM MgCl₂, 0,08 mM dNTP karışımı, 10 pmol ileri ve geri primer, 0,2 U/μl Taq DNA polimeraz enzimi 25 μl hacimde karıştırıldı. PZR koşulları 94 °C’de ön denatürasyonu takiben 30 döngülük 94 °C’de 45 saniye, 55 °C’de 45 dakika ve 72 °C’de 1 dakikanın ardından final uzama 72 °C’de 5 dakikada gerçekleştirildi. PZR ürünleri % 1’lik agaroz jel elektroforezinde analiz edildi. Çoğaltım ürünleri 100 bç boyut markırı (Thermo ABD) ile birlikte agaroz jele yüklenerek 70 V sabit güç altında 30 dakika boyunca yürütüldü.

3.7.3.3. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

QS’den sorumlu genlerin gen anlatım profilleri transkript bolluğu üzerinden araştırıldı. Bu nedenle total RNA’lar Tripure ticari ürünü ile 3.4.2.’de anlatıldığı şekilde izole edildi. cDNA sentezi total RNA’lardan termal döngü cihazında 3.4.2.’de verildiği şekilde gerçekleştirildi.

3.7.3.4. qPZR Analizi

QS sürecinden sorumlu *LasB*, *LasI* ve *LasR* ile birlikte kontrol geni olarak RNA polimerazın β-zinciri sentezinden sorumlu *RpoB* geninin anlatım analizi qPZR yöntemi ile araştırıldı. Çalışmada prob olarak SYBR Green I (T_m:57 °C) kullanıldı. Erime eğrisi analizinde ise 95 °C’de 5 saniye ve 65°C’de 1 dakikalık süreler uygulandı ve özgün olmayan ürün ve primer dimerleri araştırıldı. PZR bileşenleri; 2 μl cDNA, 2 μl (1×) SYBR Green I master karışımı (FastStart Taq DNA polimeraz, reaksiyon tamponu, dNTP karışımı, SYBR Green I boyası ve

⁷ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=txid208964> [Ziyaret Tarihi: 21.12.2017]

2 m) MgCl₂), 1 µl (10 pmol) ileri ve geri primer, 4 µl destile su içeren toplam 20 µl hacimde plaka içerisinde bir araya getirildi. Plaka cihaza yerleştirilmeden önce 1500 rpm’de 1 dakika süre ile santrifüjlendi ve sonrasında plaka Roche LightCycler 480 II sistemine yerleştirildi. Ön denatürasyon için 95 °C’de 10 dakika inkübasyonun ardından çoğaltım 45 döngüde; 95 °C’de 10 saniye, 57 °C’de 10 saniye, 72 °C’de 30 saniye uygulamaları ile gerçekleştirildi. Erime eğrisi 65 °C’de 50 saniye ve 65 °C’de 1 dakikalık inkübasyon ile sağlandı. Reaksiyon 40 °C’de (30 saniye) durduruldu. qPZR sonuçlarının analizinde, saf aurofusarini ve aurofusarin ekstresini farklı oranlarda içeren deney gruplarında hedef genler ve kontrol geni için Cp değerleri belirlendi.

3.8. GEN ANLATIMI VE BİYOFİLM VERİLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ

QS genlerinin Cp değerleri, *RpoB*’ye göre kat artış ve azalışları denklem 3.4’e göre hesaplandı. Deney ve normalizasyon gruplarında kontrol grubuna göre gen anlatımı kat artış ve azalışları ise Denklem 3.8’e göre hesaplandı (Livak ve Schmittgen 2001).

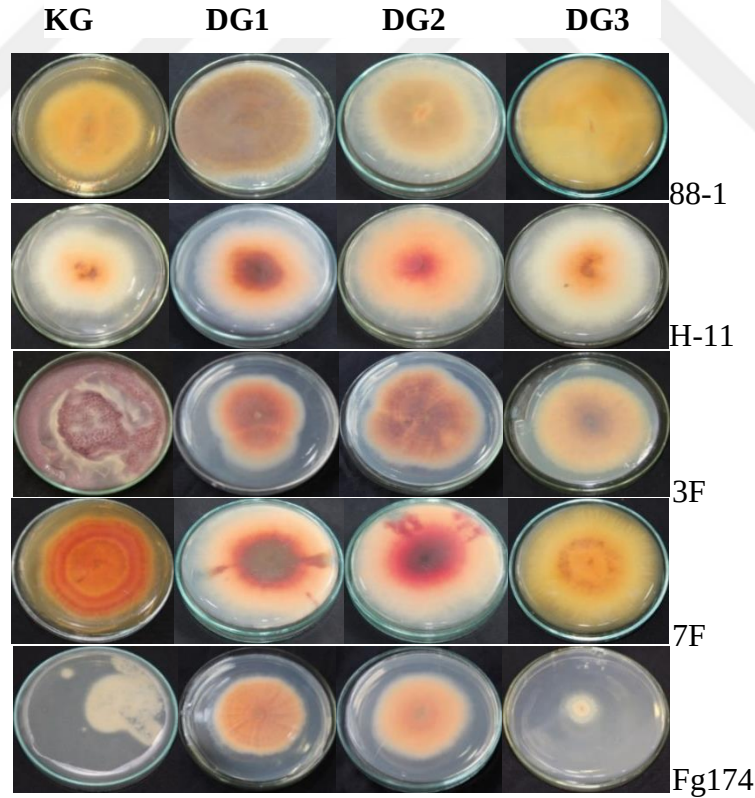
$$\text{Kat Artışı} = 2^{-(\Delta C_p \text{ deney} - \Delta C_p \text{ kontrol})} \quad (3.8)$$

Denklem 3.8 ile hesaplanan deney gruplarına ait veriler, normalizasyon gruplarının verileri ile oranlandı ve deney gruplarındaki kat değişimleri normalize edildi. Deney gruplarına ait normalize veriler ile kontrol grubu verileri arasındaki farkların anlamlılığı bağımlı örneklem t testi ile Graphpad Prism 9.0 programı kullanılarak belirlendi. Bulgular grafikler halinde sunuldu. Biyofilm kütle, biyofilm metabolik aktivite ve QS gen anlatımı arasındaki ilişkiler Spearman testi ve PCA ile Graphpad Prism 9.0 programında araştırıldı.

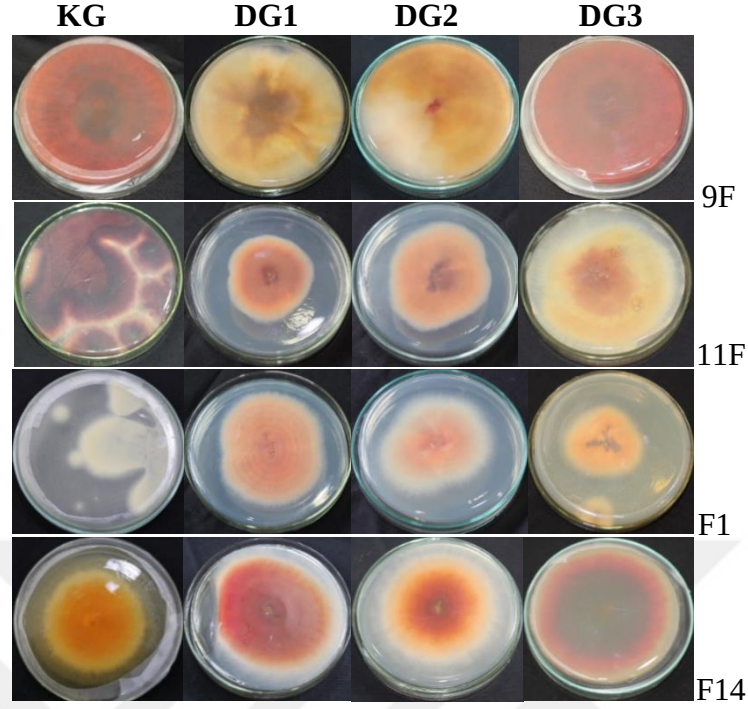
4. BULGULAR

4.1. *Fusarium* KÜLTÜRLERİNİN PİGMENTASYONU İLE İLGİLİ BULGULAR

Kontrol şartlarında kültürlenerek toplam 71 *Fusarium* izolatu renklerine göre; (1) kiremit kırmızısı, (2) sarı, (3) yavruağzı/pembe, (4) mor ve (5) beyaz pigmentasyona sahip olanlar olmak üzere beş grupta toplandı. Üç kültürlemede de kararlı miselyum renklenmesi; aralarında referans *F. graminearum* suşlarının (88-1 ve H-11) da bulunduğu toplam dokuz (9) izolatta gözlemlendi. Bu izolatlardan 3F, 7F ve Fg174 *F. graminearum*, 9F, 11F, F1 ve F14 de *F. culmorum* türüne ait izolatlardır. *F. culmorum* 9F izolatu kiremit kırmızısı, 88-1 referans suşu sarı, H-11 referansı ile *F. graminearum* 7F ve *F. culmorum* F14 izolatları yavruağzı/pembe, *F. graminearum* 3F ve *F. culmorum* 11F izolatları mor, *F. graminearum* Fg174 ve *F. culmorum* F1 izolatları da beyaz renk grubunu temsilen seçilen izolatlardır. Bu izolatlar arasından 7F'in klasik radyal üreme profili sergileyen izolat olduğu tespit edildi (Şekil 4.1 ve 4.2).



Şekil 4.1: KG (25 °C pH 5,6) DG1 (15 °C pH 5,6), DG2 (15 °C pH 7,0), DG3 (25 °C pH 7,0) şartlarında PDA besiyerinde yedi gün süreyle üretilen *F. graminearum* izolatlarına ait renklenme profilleri.



Şekil 4.2: KG (25 °C pH 5,6) DG1 (15 °C pH 5,6), DG2 (15 °C pH 7,0), DG3 (25pH °C 7,0) şartlarında PDA besî ortamında yedi gün süreyle üretilen *F. culmorum* izolatlarına ait renklenme profilleri.

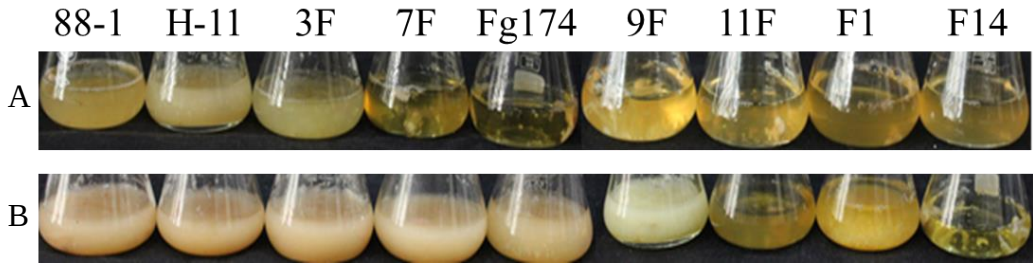
Kararlı pigment üreten izolatlarda sıcaklık ve pH değişkenleri miselyum renginde değişime neden oldu (Tablo 4.1). Deneme setlerinden DG-1 ve DG-2’de H-11, 3F, Fg174, 11F ve F1 izolatları yavruağzı; 9F sarı; F14 ise kültürün merkezinde kiremit kırmızısı, kültürün dış kısımlarındaki genç miselyumlarda ise sarı pigmentasyona sahipti. 88-1 izolatının DG-1 ve DG-2’de kahverengi miselyumlara sahip olduğu gözlemlendi. 7F izolatına ait DG-1 ve DG-2 şartlarında kültürlen miselyumların merkezde pembe, dış kısımlarda beyaz olduğu belirlenirken, DG-2’de kültürün merkezinde siyah pigmentasyon da gözlemlendi. DG-3 şartlarında Fg174 beyaz pigmentasyona; diğer tüm *F. graminearum* izolatları ise sarı miselyumlara sahipti. Aynı ortam şartlarında kültürlen *F. culmorum* izolatlarının pigmentasyon profilleri incelendiğinde ise 11F’in sarı; F1’in yavruağzı miselyumlara sahip olduğu belirlendi. 9F izolatı DG-3’de kiremit kırmızısı miselyuma sahip iken F14 izolatı kültürün merkezinde siyah, dış kısımlarındaki genç miselyumlarda ise kiremit kırmızısı pigmentasyon üretti. Sıcaklık değişkeninin her iki *Fusarium* türünde sekonder metabolizmayı etkileyerek pigment profilini değiştirdiği belirlendi (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2; Tablo 4.1).

Tablo 4.1: PDA besi ortamında KG (25 °C pH 5,6), DG1 (15 °C pH 5,6), DG2 (15 °C pH 7,0) ve DG3 (25 °C pH 7,0) şartlarında yedi (7) süreyle kültürlen *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarına ait pigmentasyon profilleri.

<i>F. graminearum</i>					
	88-1	H-11	3F	7F	Fg174
KG	Sarı	Sarı	Mor	Kiremit Kırmızısı-Pembe	Beyaz
DG-1	Kahverengi	Yavruağzı	Yavruağzı	Beyaz-Pembe	Yavruağzı
DG-2	Kahverengi	Yavruağzı	Yavruağzı	Beyaz-Pembe-Siyah	Yavruağzı
DG-3	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Beyaz

<i>F. culmorum</i>				
	9F	11F	F1	F14
KG	Kiremit Kırmızısı	Mor	Beyaz	Sarı-Yavruağzı
DG-1	Sarı	Yavruağzı	Yavruağzı	Kiremit Kırmızısı-Sarı
DG-2	Sarı	Yavruağzı	Yavruağzı	Kiremit Kırmızısı-Sarı
DG-3	Kiremit Kırmızısı	Sarı	Yavruağzı	Kiremit Kırmızısı-Sarı-Siyah

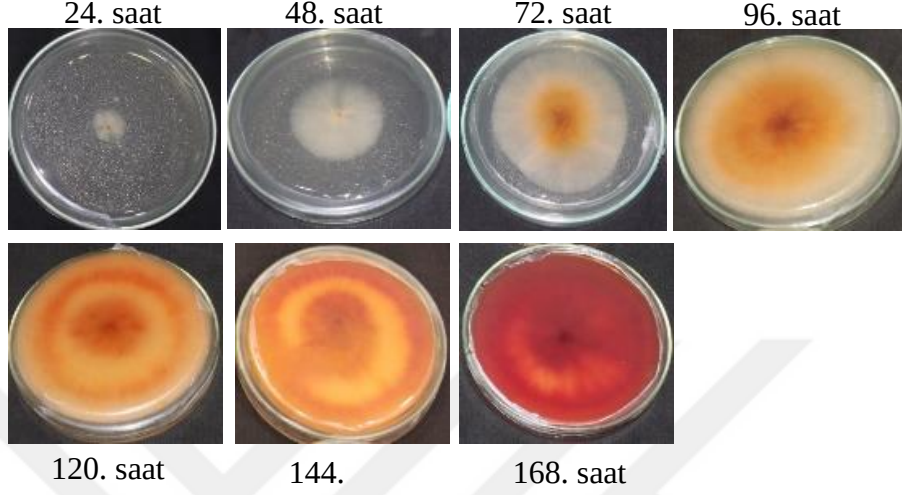
pH değeri 3,0 olan besi ortamında, hem 15 °C (Şekil 4.3A) hem de 25 °C’de (Şekil 4.3B) inkübe edilen kültürlerde ise üremenin oldukça sınırlı olduğu ve bu kültürlerde etkin pigment biyosentezinin gerçekleşmediği belirlendi. Bu nedenle bu deneme setleri gen anlatım çalışmalarının dışında bırakıldı.



Şekil 4.3: 15 °C (A) ve 25 °C (B)’de yedi gün süreyle patates dekstrozu sıvı besi ortamında (pH 3,0) inkübe edilerek yedi gün süreyle üretilen *F. graminearum* ve *F. culmorum* kültürleri.

Miselyum pigmentasyonundaki değişimin hücre döngüsüyle ilişkisinin PDA’da (pH 5,6) 25°C’de üretilen 9F izolatında araştırıldığı çalışmada, kültürlerde pigmentasyon değişimi 24, 48, 72, 96, 120, 144 ve 168. saatlerde yapılan gözlemlerle belirlendi ve kültürün bu saatlerde sahip olduğu koloni çapı ölçüldü (Şekil 4.3). Morfolojik gözlem ve yapılan ölçümlerle kültürün 48. saatinde lag fazındaki 9F’in beyaz pigmentasyonlu hiflerine ait radyal üreme çapının $4,37 \text{ cm} \pm 0,35$ olduğu belirlendi. Logaritmik fazın başladığı 48 ila mid-log aşaması olan 72. saatleri arasında miselyumlar, kültürün merkezinden dışarıya doğru sarı renkte pigment üretmeye başladı. Bu evrede koloni çapı ortalama değeri $6,9 \pm 0,42 \text{ cm}$ olarak hesaplandı. Kültürün 96.

saatinde radyal üreme çapı en yüksek değer olan $9 \pm 0,00$ cm'ye ulaştı. 120. saatten itibaren miselyumlar belirgin şekilde sarı renk aldı ve yer yer kiremit kırmızısı pigmentasyon da gözlemlendi. 168. saatte ise miselyumların tamamı kiremit kırmızısı rengini aldı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: 25 °C'de PDA besi ortamında (pH 5,6) üretilen *F. culmorum* 9F izolatına ait 24, 48, 72, 120 ve 168 saatlik kültürlerin renklenme profilleri.

4.2. GENOM ANALİZ BULGULARI

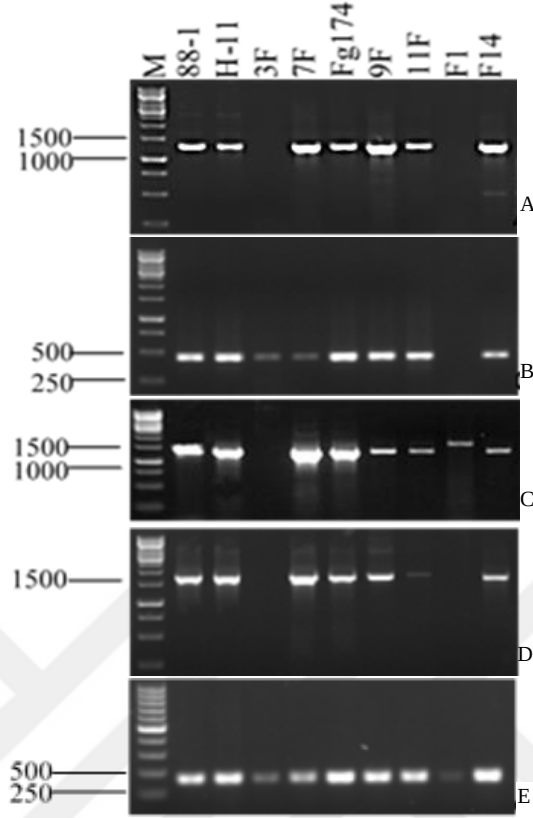
4.2.1. Aurofusarin Biyosentezinden Sorumlu Genlerin PZR Analiz Sonuçları

Dokuz izolatın yedi (7) günlük kültürlerinin 50 mg yaş miselyumlarından izole edilen gDNA'ların PZR'nunda kalıp olarak kullanılmak üzere uygun miktar (300-500 µg/ml aralığında) ve saflık değerlerine ($OD_{260}/OD_{280} = 1,4-1,8$) sahip oldukları belirlendi (Şekil 4.6). Aurofusarin biyosentezinin katalizinden sorumlu enzimleri kodlayan gen kümesindeki *Pks12*, *Gip6*, *Gip7*, *Gip4* ve *StuAP* genlerinin çoğaltımında kullanılmak üzere tasarlanan özgün oligonukleotid primerlere ait nükleotid dizileri Tablo 4.2'de verildi.

Tablo 4.2: Özgün genlerin çoğaltımında kullanılan oligonukleotid primerler, bağlanma sıcaklığı (T_m) ve ürün boyutları (İ: ileri primer, G: geri primer).

Gen	Primer Dizisi 5'-3'	T _m (°C)	Ürün Boyutu (bp)
<i>Pks12</i>	İ: GTGGATTGGCTTGACCAGA G: CTCTACGAAGGTCGCGATG	55	1118
<i>Gip6</i>	İ: GCCATCGTTGACAAATTCCT G: TGTCACCGGTCAACCTGATA	54	593
<i>Gip7</i>	İ: GCTGATGGTCAATAAGCACA G: ATCATTGACCTTGCGAACG	54	1278
<i>Gip4</i>	İ: ACAGACAACACCGACATGGA G: AAGCACCTCAGCAAGACGAT	55	1893
<i>StuAP</i>	İ: TGACTTGCATCGTTCTGGTC G: GGGAGCATGTCATTTGAGGT	54	420

Pks12 genine ait 1118 bp ve *Gip4* genine ait 1893 bp boyutundaki kısmi bölgeler iki izolat hariç (3F ve F1) diğer tüm izolatlardan (88-1, H-11, 7F, Fg174, 9F, 11F ve F14) PZR ile etkin bir biçimde çoğaltıldı (Şekil 4.5A ve 4.6D). *Gip7* genine ait 1278 bp'lik fragment ise 88-1, H-11, 7F, Fg174, 9F, 11F ve F14 izolatlarından çoğaltılırken F1 izolatının genomundan çoğaltılan ampikonun yaklaşık 1600 bp boyutunda olduğu belirlendi (Şekil 4.5C). *Gip6* genine ait 593 bp'lik kısmi fragment ise 88-1, H-11, 3F, 7F, Fg174, 9F, 11F ve F14 izolatlarından çoğaltılabildi (Şekil 4.5B). *StuAp* genine ait 420 bp'lik ampikon ise izolatların tamamından elde edildi (Şekil 4.5E).



Şekil 4.5: Özgün primerlerle 5 *F. graminearum* ve 4 *F. culmorum* izolatında çoğaltılan (A) Pks12 genine ait 1282 bç, (B) Gip6 genine ait 449 bç, (C) Gip7 genine ait 1278 bç, (D) Gip4 genine ait 1572 bç, (E) StuAP genine ait 420 bç'lik ürünlerin agaroz jel elektorforezi. M 1 kb standart DNA (Thermo, ABD). (PCR ürünlerinin sırası gen ürünlerinin biyosentez yolağında aldığı görev sırasına göre verilmiştir).

4.2.2. Dizilim Bilgilerinin Analiz Verileri

PZR ile çoğaltılan *Pks12*, *Gip6*, *Gip7*, *Gip4* ve *StuAp* genleri, KG'de kiremit kırmızısı pigmentasyon ürettikleri için seçilen *F. graminearum* 7F ve *F. culmorum* 9F tarla izolatlarından hizmet alımı ile dizilendi. Bununla birlikte *Gip7*'ye ait F1 izolatının genomundan çoğaltılan PZR ürününün boyutunun, diğer izolatların genomlarından çoğaltılan ampliconlara kıyasla farklı olması nedeniyle, bu amplicon da dizileme analizine dahil edildi.

Elde edilen nukleotid dizilim bilgileri, NCBI'da *F. graminearum* PH-1 izolatına ait PRJNA782099 ve *F. culmorum* FcUK99 izolatına ait PRJEB12835 aksesyon numaraları ile kayıtlı tüm genom dizilimleri ile hizalandığında tüm gen dizilimleri bakımından benzerlik yüzdesi *F. culmorum*'da *F. graminearum*'dan daha yüksekti (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Çalışılan beş genin *F. graminearum* 7F ve *F. culmorum* 9F tarla izolatlarına ait dizilimleri ile NCBI veri bankasında kayıtlı PH-1 ve FcUk99 referans genomlarına ait dizilimler arasındaki benzerlik skorlarının % cinsinden değeri.

%		PH-1	FcUK99	7F	9F
FcUK99		96.3			
7F	<i>Pks12</i>	79.7	78.3		
9F		84	86.8	86.6	
FcUK99		100			
9F	<i>Gip6</i>	99.4	99.4		
FcUK99		92.4			
7F	<i>Gip7</i>	84.8	79.3		
9F		80	83.8	79.2	
F1		20.02	21.5	20.1	18.6
FcUK99		97.8			
7F	<i>Gip4</i>	89	87.2		
9F		62.2	63.4	66.5	
FcUK99		99.4			
7F	<i>StuAp</i>	99.7	99.1		
9F		99.4	100	99.1	

7F ve 9F izolatlarından çoğaltılan *Pks12* genine ait kısmi bölgenin iki tarla izolatu arasındaki benzerliğinin %86.6 olduğu ortaya kondu. Aynı kısmi bölgenin 9F ile FcUk99 arasındaki benzerlik değeri %86.7 olarak hesaplanırken bu oran 7F ile PH-1 arasında %79.7 idi. Hizalama analizleri ile *Pks12*'ye ait kısmi fragmentte tekli ve ikili nukleotid delesyonları ile tansversiyon ve transisyon tipinde SNP'lerin taşındığı belirlendi (Şekil 4.6).

PH-1	ACGTCCACCCTAGCGATGATTGGAGAGAGGTCAACAGTGGGCAGAATGTCGACACTTATT
Fcuk99	ACGGCATGACTAGCGATGATTGGAGAGAGGTCAACAGTGGTCAGAATGTCGACACTTATT
9F	ACGGCATGACTAGCGATGATTGGAGAGAGGTCAACAGTGGTCAGAATGTCGACACTTATT
7F	ACGGCATGACTAGCGATGATTGGAGAGAGGTCAACAGTGGGCAGAATGTCGACACTTATT
	*** * *****
PH-1	TTATTCCTGGTAAGTTGTTTGTTCGCGTTTCACGACAATACTGATTGCAGACTACAGGTG
Fcuk99	TTATTCCTGGTAAGTTGTTTGTTCGCGTTTCACGGCAATGCTGATTGCAGACTACAGGTG
9F	TTATTCCTGGTAAGTTGTTTGTTCGCGTTTCACGGCAATGCTGATTGCAGACTACAGGTG
7F	TTATTCCTGGTAAGTTGTTTGTTCGCGTTTCACGACAATACTGATTGCAGACTACAGGTG

PH-1	GCAACAGAGCGTTCCTCCTGGTCTGACTCAACTACTTCTTCAAGTTCAGTGGGCCTAGCG
Fcuk99	GCAACCGAGCGTTCCTCCTGGTAGACTCAACTACTTCTTCAAGTTCAGTGGGCCAGCG
9F	GCAACCGAGCGTTCCTCCTGGTAGACTCAACTACTTCTTCAAGTTCAGTGGGCCAGCG
7F	GCAACAGAGCGTTCCTCCTGGGAGACTCAACTACTTCTTCAAGTTCAGTGGGCCTAGCG

PH-1	CTAGTGTGATACGGCTTGCTCCTCCAGTCTCGCTGCCCTACACTTGGCTTGAATTCCC
Fcuk99	CCAGTGTGATACAGCTTGCTCCTCCAGTCTCGCTGCCCTACACTTGGCTTGAATTCCC
9F	CCAGTGTGATACAGCTTGCTCCTCCAGTCTCGCTGCCCTACACTTGGCTTGAATTCCC
7F	CTAGTGTGATACGGCTTGCTCCTCCAGTCTCGCTGCCCTACACTTGGCTTGAATTCCC
	* *****
PH-1	TCTGGAGAAATGATTGCGATACAGCTATTGCGGGCGGAACCAATGTCATGACTAACCCTG
Fcuk99	TCTGGAGAAATGATTGCGATACAGCTATTGCGGGCGGAACCAATGTCATGACCAACCCTG
9F	TCTGGAGAAATGATTGCGATACAGCTATTGCGGGCGGAACCAATGTCATGACCAACCCTG
7F	TCTGGAGAAATGATTGCGATACAGCTATTGCGGGCGGAACCAATGTCATGACTAACCCTG

PH-1	ACAACCTTCGCTGGTTTGGACCGAGGCCACTTCCTATCAAGAACCGTAAGTCTCTCACAG
Fcuk99	ACAACCTTGTCTGGTTTAGACCGAGGCCACTTCCTATCAAGAACCGTAAGTCTCTCACAG
9F	ACAACCTTGTCTGGTTTAGACCGAGGCCACTTCCTATCAAGAACCGTAAGTCTCTCACAG
7F	ACAACCTTCGCTGGTTTGGACCGAGGCCACTTCCTATCAAGAACCGTAAGTCTCTCACAG

PH-1	ATCTTGAAGCTTCCTTCTTTTAGTGTTTTACTGACCTTGCTCCAGGCAACTGCAACA
Fcuk99	ATCTTGAAGCTTCCTTCTTTTAGTGTTTTACTGACCTTGCTCCAGGCAACTGCAACA
9F	ATCTTGAAGCTTCCTTCTTTTAGTGTTTTACTGACCTTGCTCCAGGCAACTGCAACA
7F	ATCTTGAAGCTTCCTTCTTTTAGTGTTTTACTGACCTTGCTCCAGGCAACTGCAACA

PH-1	CCTTTGACGATGGAGCAGACGGATACTGTGAGCTGATGGCGTCGGAACCATCATCTCA
Fcuk99	CCTTTGACGATGGAGCAGACGGATACTGTGAGCTGATGGCGTCGGAACCATCATCTCA
9F	CCTTTGACGATGGAGCAGACGGATACTGTGAGCTGATGGCGTCGGAACCATCATCTCA
7F	CCTTTGACGATGGAGCAGACGGATACTGTGAGCTGATGGCGTCGGAACCATCATCTCA

Şekil 4.6: 7F ve 9F izolatlarından çoğaltılan *Pks12* geninin nukleotid diziliminin *F.graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUk99 referans genomları ile BLASTN analizine ait kısmi bölgesinin gösterimi. * identik nukleotidleri, - referansa göre delesyon ve insersiyonlu bazıları temsil etmektedir.

Gip6 geni 7F izolatından çoğaltıldığında yetersiz ürün elde edildi. Bu nedenle dizileme hizmeti *Gip6* için bu izolattan gerçekleştirilemedi. 9F'den çoğaltılan PZR ürünü iki referans genoma ait kısmi fragment ile hizalandı. Bulgular, 9F'e ait amplikonun hem PH-1 hem de FcUk99 izolatlarına ait referans diziyle %99.4 oranında benzediğini gösterdi. Aynı zamanda 9F izolatına ait fragmentte yalnızca transisyon ve transversiyon tipi SNP'ler belirlenirken insersiyon ve delesyonlu bölgelere rastlanmadı (Şekil 4.7).

FcUK99	AACTGTCACCGGTCAACCTGATACCCCTATTGCTAACCATCACGGCCTACAAAAACC
PH-1	AACTGTCACCGGTCAACCTGATACCCCTATTGCTAACCATCACGGCCTACAAAAACC
9F	AATTGTCACCGGTCCACCTGATACCCCTATTGCTAACCATCACGGCCTACAAAAACC
	** *****
FcUK99	TTCTCTTAGCGAGAAAGAGTACAGGCACCACATGACAAAGATTGATGCCAAGCTCGTCAG
PH-1	TTCTCTTAGCGAGAAAGAGTACAGGCACCACATGACAAAGATTGATGCCAAGCTCGTCAG
9F	TTCTCTTAGCGAGAAAGAGTACAGGCACCACATGACAAAGATTGATGCCAAGCTCGTCAG

FcUK99	CCCTCTGATGGAGGAGTATGGTATTGTTGCTACACCATGACACACAACACGAAAGAGAC
PH-1	CCCTCTGATGGAGGAGTATGGTATTGTTGCTACACCATGACACACAACACGAAAGAGAC
9F	CCCTCTGATGGAGGAGTATGGTATTGTTGCTACACCATGACACACAACACGAAAGAGAC

Şekil 4.7: 9F izolatlarından çoğaltılan *Gip6* geninin nukleotid diziliminin *F.graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUk99 referans genomları ile BLASTN analizine ait kısmi bölge. * identik nukleotidleri temsil etmektedir.

7F ve 9F genomlarından çoğaltılan *Gip7* genine ait kısmi fragmentlerin referans genomlarla hizalama bulguları, 7F ile PH-1 arasındaki benzerliğin %84.8; 9F ile FcUk99 arasındaki benzerliğin ise %83.8 olduğunu ortaya koydu. Tarla izolatlarına ait kısmi fragmentlerde tekli, ikili, üçlü ve dördü delesyonlar ile transisyon ve transversiyon tipinde SNP'ler bulundu (Şekil 4.8).

FcUK99	ATTTGGATGCCAATAAGACAAGGAGAAGCACGCAGGCAAGCACAAGAAGTGAACGATG
PH-1	ATTTGGATGCCAATAAGACAAGGAGAAGCACGCAGGCAAGCACAAGAAGTGAACGATG
7F	ATTTGGATGCCAATAAGACAAGGAGAAGCACGCAGGCAAGCACAAGAAGTGAACGATG
9F	ATTTGGATGCCAATAAGACAAGGAGAAGCACGCAGGCAAGCACAAGAAGTGAACGATG

FcUK99	CGGCCGCTGTCCAGGCGTATTTCTACCCACCCATTGAAGAGCAAGGATGAGGCAGATG
PH-1	CGGCCGCTGTCCAGGCGTATTTCTACCCACCCATTGAAGAGCAAGGATGAGGCAGATG
7F	CGGCCGCTGTCCAGGCGTATTTCTACCCACCCATTGAAGAGCAAGGATGAGGCAGATG
9F	CGGCCGCTGTCCAGGCGTATTTCTACCCACCC-ATTGAAGAGCAAGGATGAGGCAGATG

FcUK99	ACTCCAGGGAGGAAGACGAGGTTTCCCATGGATCGAGCTGCTTGATCTGCTGCTTGATG
PH-1	ACTCCAGGCAGGAAGACGAGGTTTCCCATGGATCGAGCTGCTTGATCTGTTGCTTGACA
7F	ACTCCAGGCAGGA-GACGAGGTTTCCC-ATGGATCGAGCTGCTTGATCTGTTGCTTGAC-
9F	ACTCCAGGGAGGA-GACGAGGTTTCCC-ATGGATCGAGCTGCTTGATCTGCTGCTTGATG

FcUK99	GAGACAGATTCAATGACGGGAACCTCGGGAAGAGGAGAATGAGGCAAGCGACTGCTGCT
PH-1	GAGACAGTTCAATGACGGGAACCTCGGGAAGAGAGAATAAGGCAAGCGAGCTGCTGCT
7F	GAGACAG-TTCATTGACGG--AACTTGGGAGAGAG---ATGAGGCA-GCGACAGCTGCT
9F	GAGACAGATTCAATGACGGG-AACTTCGGGAAGAG-AGAATGAG-CA-GCGACTGCTGCT

FcUK99	CCTCCGACGGGAAGACTGGACACGAGATAGTTAGCATTGTTTAAATTAGCCTAAAGGTGG
PH-1	CCTCCGACGGGAAGACTGGACACGAGATAGTTAGCATTGTTCAAATTAGCCTAAAGGTGG
7F	CCTCCGACGG-AAGACTGGACACGAGATAGT-AGCATTGCT--ATTAGCT--AAGTGG
9F	CT--CGACGGGAAGACTGGACACGAGATAGT-AGCAT-GTT--AATAGCT--AAGTGG
	* *****

Şekil 4.8: 7F ve 9F izolatlarından çoğaltılan *Gip7* geninin nukleotid diziliminin *F.graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUk99 referans genomları ile BLASTN analizine ait kısmi bölge. * identik nukleotidleri, - eferansa göre delesyon ve insersiyonlu bazıları temsil etmektedir.

PZR sonucunda diğer izolatlara göre farklı boyda ürün elde edilen F1 izolatına ait amplikonda ise benzerlik değerlerinin %18.6 ile %20.5 aralığında olduğu; hem referans izolatlarla hem de

tarla izolatlarına göre sayısı 1 ile 7 nukleotid arasında değişen delesyonların bulunduğu ve nukleotid diziliminin diğer izolatlara göre oldukça farklı olduğu ortaya kondu (Şekil 4.9).

7F	GAGTCTCTACTCAAAAGTGTTCGCGTATGGCAATGACAAGCAACATCTTGGCAGAACCA
9F	GAGTCTCTGCTCAAAAGTGTTCGCGTATGGCAATGACAAGCAACATCTTGGCAGAACCA
F1	GCACGTCCAGGAACACGCCATGCACG-GTGGTGGTGG-GCGCGAGCTTCTTGCCAGGTA * ** * * * * * * * * * * * *
7F	ACCACGGGTCAAGTCGCGCACTCTGCCAATTCTGCCATGTTTGCAAATTTCCCAACATG
9F	ACCACGGGTCAAGTCGCGCACTCTGCCAATTCTGCCATGTTTGCAAATTTCCCAACATG
F1	GATGCGCAGCAGGTCGATCAGCTGCGCGG--CCGCCACGGGAGTGACAGCAGCGGCACC ** ** * * * * * * * * * * * *
7F	CGCGACTGGGCTCGTACATGTTCACTGCCTCAATTCCGACCGCTGCTGCCATGGTCCAA
9F	CGCGACTGGGCTCTTACATGTTCACTGCCTCAATCCCGACAGCTGCTGCCATGGTCCAA
F1	TGGTGCTGG--TCGCATTGGTCCAC----CAGATCTGCGGCGGC-GTCAGGCCGTGC * * * * * * * * * * * * * * *
7F	GCTACAGAAAAGTGGCCAGGAAGTGTAAGAAGACCGAGACAGCTTACAACATCGCATTTC
9F	GCTACAGAAAAGTGGCCAGGAAGCGTAAAGAAGACAGAGACAGCTTACAACATCGCATTTC
F1	GC--CAGCAGGATGGCCGGCAGGCC--GCCGATCAGCAACTCGTCCATGTGGTGCAATGC ** * * * * * * * * * * * * * *
7F	AATCATGATTTGCCCTTCTTTGATCATTTGTCCAGAGTCCTGTCTATGACAAAGCAGTTC
9F	AATCATGATTTGCCCTTCTTTGATCATTTGTCCAGAGTCCTGTCTATGACAAAGCAGTTC
F1	GGCGGCGCAGGTGGAAGCGGTGTAGTACGCCAGTTCTCTCTGGCCGAACACCTGGATGC * * * * * * * * * * * * * *
7F	TCTGGATACATGAGAAGTGTGACTGACGGTCAAGGCATGGATCTCTCCATCTCGTCAAC
9F	TCTGGATACATGAGAAGTGTGACTGACGGCCAAGGCATGGATCTCTCTATCTCGTCAAC
F1	GCGACGGGTGGATCAGGTTGAGGTGCCACAGGTCGGCGGCCGC--CATGCCGTATC * * * * * * * * * * * * * *
7F	GGGTTTGACTGGGCCAGCCTGC-AGACAGTCCCTCATTGTTGA----CGTAAGTGATAT
9F	GG-TTTGACTGGGCCAGCCTGCGGACAAATCCCTCATTGTTGA----TGTAAGTGATAT
F1	GGGATCGCGCGGTCCGCGCCCTGGCCGGAATCCAGTTGATGGGATTTGTGCGCGTTGC ** * * * * * * * * * * * * *
7F	CAAGCGCTCATCTCTCTC--AAACACTTACTA-CTCGTA-AGATTGAG-CTCTGCGGGC
9F	CACG-GCTCATTCTCTCAGAAATAATTTACTAATCTTGAGATGGAGGTTCTGCGGTC
F1	CGTC-GACAGTTCTGCACCGGAGCATGGCACGTTTCCGCGAGGTCGAG--TTGGCCGTG * * * * * * * * * * * * * *
7F	ATGCA-GCTATGCTTAGC-GCTGCTATCC--CACTCGCTTGAGGTACAGACTTGACAC
9F	ATGCAAGCTATGCTTAGCCGCTGCTATCCACACCTCCGCTCGAGGTACAACTTGACAC
F1	GTAGA--CTAC-TTGTGACCGACGCGGG----ATCCGTCGGGGACA-GGCCTCGCGAC * * * * * * * * * * * * * *

Şekil 4.9: 7F, 9F ve F1 izolatlarından çoğaltılan *Gip7* geninin nukleotid diziliminin *F.graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUk99 referans genomları ile BLASTN analizine ait kısmi bölge. * identik nukleotidleri, - referansa göre delesyon ve insersiyonlu bazıları temsil etmektedir.

Gip4 genine ait dizi bilgisinin elde edilmesi amacıyla çoğaltılan kısmi fragmentlerin hizalamaları, 7F ile PH-1 arasında %89, 9F ile FcuK99 arasında %63.4 benzerliğin olduğunu ortaya koydu. 9F tarla izolatı ile 7F tarla izolatı arasındaki benzerlik değeri (%66.5), 9F'in referansı ile olan benzerliğinden (%66.5) daha yüksek hesaplandı. Çalışılan diğer genler

arasından *Gip4* nukleotid dizisi 9F izolatında en polimorfik taşınan fragment olarak belirlendi. *Gip4* genine ait 7F ve 9F’den çoğaltılan kısmi bölgede tek nukleotid değişimlerine (transisyon ve transversiyon tipi) ek olarak tekli ve ikili delesyon bölgelerinin taşındığı belirlendi (Şekil 4.10).

FcUK99	ATTTGGATGCCAATAAAGACAAGGAGAAGCACGCAGGCAAGCACAGAAGTGAACGATG
PH-1	ATTTGGATGCCAATAAAGACAAGGAGAAGCACGCAGGCAAGCACAGAAGTGAACGATG
7F	ATTTGGATGCCAATAAAGACAAGGAGAAGCACGCAGGCAAGCACAGAAGTGAACGATG
9F	ATTTGGATGCCAATAAAGACAAGGAGAAGCACGCAGGCAAGCACAGAAGTGAACGATG

FcUK99	CGGCCGCTGTCCCAGGCGTATTTCTCACCACCCATTGAAGAGCAAGGATGAGGCAGATG
PH-1	CGGCCGCTGTCCCAGGCGTATTTCTCACCACCCATTGAAGAGCAAGGATGAGGCAGATG
7F	CGGCCGCTGTCCCAGGCGTATTTCTCACCACCCATTGAAGAGCAAGGATGAGGCAGATG
9F	CGGCCGCTGTCCCAGGCGTATTTCTCACCACCC-ATTGAAGAGCAAGGATGAGGCAGATG

FcUK99	ACTCCAGGGAGGAAGACGAGGTTTCCCCATGGATCGAGCTGCTTGATCTGCTGCTTGATG
PH-1	ACTCCAGGCAGGAAGACGAGGTTTCCCCATGGATCGAGCTGCTTGATCTGTTGCTTGACA
7F	ACTCCAGGCAGGA-GACGAGGTTTCCC-ATGGATCGAGCTGCTTGATCTGTTGCTTGAC-
9F	ACTCCAGGGAGGA-GACGAGGTTTCCC-ATGGATCGAGCTGCTTGATCTGCTGCTTGATG

FcUK99	GAGACAGATTCATTGACGGGAACTTCGGGAAGAGGAGAATGAGGCAAGCGACTGCTGCT
PH-1	GAGACAGGTTTCATTGACGGGAACTTCGGGAAGAGAGAATAAGGCAAGCGACAGCTGCT
7F	GAGACAG-TTCATTGACGG--AACTTGGGAGAGAG---ATGAGGCA-GCGACAGCTGCT
9F	GAGACAGATTCATTGACGGG-AACTTCGGGAAGAG-AGAATGAG-CA-GCGACTGCTGCT

FcUK99	CCTCCGACGGGAAGACTGGACACGAGATAGTTAGCATTGTTTAAATTAGCCTAAAGGTGG
PH-1	CCTCCGACGGGAAGACTGGACACGAGATAGTTAGCATTGTTCAAATTAGCCTAAAGGTGG
7F	CCTCCGACGG-AAGACTGGACACGAGATAGT-AGCATTGTC---ATTAGCT---AAGTGG
9F	CT--CGACGGGAAGACTGGACACGAGATAGT-AGCAT-GTT---AATAGCT---AAGTGG
	* *****

Şekil 4.10: 7F ve 9F ve izolatlarından çoğaltılan *Gip4* geninin nukleotid diziliminin *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUk99 referans genomları ile BLASTN analizine ait kısmi bölge. * identik nukleotidleri, - referansa göre delesyon ve insersiyonlu bazıları temsil etmektedir.

StuAp geni, her iki tarla izolatında en yüksek homolojiye sahip gen olarak belirlendi. *F. culmorum* izolatının (9F) referans genomu ile identik dizilere (benzerlik %100) sahip olduğu saptandı. *F. graminearum* izolatı (7F) ile PH-1 arasında %99.7’lik homoloji bulundu. İki tarla izolatı arasındaki benzerlik de %99.1 olarak hesaplandı (Tablo 4.2). Dizi analizi bulguları tarla izolatlarına ait amplikonlarda delesyon veya insersiyon bulunmadığını gösterdi. Belirlenen tek nukleotid değişiminin, *F. graminearum* referans ve tarla izolatı ile *F. culmorum* referans ve tarla izolatları arasında transversiyon tipinde olduğu ortaya kondu (Şekil 4.11).

9F	ACATACATGGAATGCCCAACGGATATCCCACCAAGTCGCCCCTCGGAAGTGTTACCAAC
FcUK99	ACATACATGGAATGCCCAACGGATATCCCACCAAGTCGCCCCTCGGAAGTGTTACCAAC
7F	ACATACATGGAATGCCCAACGGATATCCCACCAAGTCGCCCCTCGGAAGCGTTACCAAC
PH1	ACATACATGGAATGCCCAACGGATATCCCACCAAGTCGCCCCTCGGAAGCGTTACCAAC

9F	CTCCCATGCAGAACGGAATGATGGTGGACTCAAGCGAGGCCGAGAAGAGCACGACGACA
FcUK99	CTCCCATGCAGAACGGAATGATGGTGGACTCAAGCGAGGCCGAGAAGAGCACGACGACA
7F	CTCCCATGCAGAACGGAATGATGGTGGACTCAAGCGAGGCCGAGAAGAGCACGACGACA
PH1	CTCCCATGCAGAACGGAATGATGGTGGACTCAAGCGAGGCCGAGAAGAGCACGACGACA

9F	TGCACAGGGCAGGCCCAATGGACATGATCCAATGAACAACATGCCTGGTGGCATGCCTA
FcUK99	TGCACAGGGCAGGCCCAATGGACATGATCCAATGAACAACATGCCTGGTGGCATGCCTA
7F	TGCACAGGGCAGGCCCAATGGACATGATCCAATGAACAACATGCCTGGTGGCATGCCTA
PH1	TGCACAGGGCAGGCCCAATGGACATGATCCAATGAACAACATGCCTGGTGGCATGCCTA

9F	GCCTCCCAAATTATGCCCCACCGCCTCTCCAGAACCTTCACCAGCCTCTTTCCAATGGTG
FcUK99	GCCTCCCAAATTATGCCCCACCGCCTCTCCAGAACCTTCACCAGCCTCTTTCCAATGGTG
7F	GCCTCCCAAATTATGCCCCACCGCCTCTCCAGAACCTTCACCAGCCTCTTTCCAATGGTG
PH1	GCCTCCCAAATTATGCCCCACCGCCTCTCCAGAACCTTCACCAGCCTCTTTCCAATGGTG

Şekil 4.11: 7F, 9F ve F1 izolatlarından çoğaltılan *StuAp* geninin nukleotid diziliminin *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUk99 referans genomları ile BLASTN analizine ait kısmi bölge. * identik nükleotidleri temsil etmektedir.

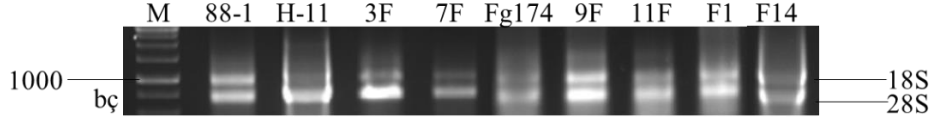
4.3. TRANSKRİPTOM ANALİZ BULGULARI

Aurofusarin biyosentezinden sorumlu enzimleri şifreleyen genlerin anlatım düzeylerinin belirlenmesi için tasarlanan primer-prob nukleotid dizileri ($T_m=55$ °C) Tablo 4.4’de verilmektedir.

Tablo 4.4: Gerçek zamanlı PZR’de kullanılan primer-prob dizilimleri ile ürün boyutları (İ: ileri primer, G: geri primer).

Gen	Primer Dizisi 5'-3'	Prob Dizisi 5'FAM-Q3'	Ürün Boyutu (bp)
<i>Pks12</i>	İ: CGAGTTACAGCCACTCAAGTAT G: GCTTGTGAGACCTTGGTAAGA	CCGCTGCTGTGTTAGTGATATGCTCA	94
<i>Gip6</i>	İ: TCAAGGACTTTCTTCGCATGA G: GTGTCAGCAAAGTTGACGTG	TTTCGAGGAAACGCGGATCTGCC	80
<i>Gip4</i>	İ: TCTTCGGCATTGCTTCGG G: AAAGCACCATCGCCAAGT	CGCCCTTGATCGGAGGAGCTTT	77
<i>Gip7</i>	İ: GCCAATGTACCTGAGTCTCTAC G: TGGTTGGTTCTGCCAAGAT	TTGTCATTGCCATACGCGCAACAC	76
<i>StuAP</i>	İ: ATGACATGCTCCCTCAATCC G: CCCGTCGCTTATAGTGTTTC	CAATGGAGCATACCAGGGTC	93

Tablo 3.3’de verilen ortam şartlarında kültürlen ve farklı miselyum rengine 7 günlük izolatlardan izole edilen total RNA moleküllerinin miktarları 200-1000 µg/ml aralığında, saflık değerleri (OD_{260}/OD_{280}) ise 2.00 olarak hesaplandı (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: Kontrol grubunda üretilen *F. culmorum* izolatlarından izole edilen total RNA moleküllerinin agaroz jel görüntüsü. M: 1 kb standart DNA (Thermo, ABD).

4.3.1. Farklı Ortam Koşullarında Aurofusarin Biyosentezinden Sorumlu Genlerin qPZR Analiz Sonuçları

4.3.1.1. Cp Değerlerine Ait Veriler

9 izolatta gerçekleştirilen qPZR analizlerinde çalışılan hedef genler ve β -tubulin genin Cp değerleri standart hataları ile birlikte Tablo 4.4'te verildi.

Pks12 genini null allel olarak taşıma olasılığı olan 3F ve F1 izolatlarında, KG ve deney gruplarında gen anlatımının yapılmadığı belirlendi. Geni taşıdığı PZR ile belirlenen izolatlardan Fg174 ve 11F'de kontrol ve tüm deney gruplarında; 9F'de ise DG2'de eşik döngü değeri aşılmadığı için genlerin anlatım yapmadığı kabul edildi. Çalışmada kullanılan diğer izolatlardan elde edilen Cp değer aralıkları, kontrol grubunda $27,50 \pm 0,17 - 33,09 \pm 1,5$; DG1'de $26,71 \pm 0,16 - 30,87 \pm 1,10$; DG2'de $27,3 \pm 0,00 - 30,48 \pm 0,44$; ve DG3'de ise $26,98 \pm 0,36 - 35,35 \pm 1,15$ olarak hesaplandı.

KG'de *Gip6* geni, sadece 7F ve 9F izolatlarında anlatım yaptı (Cp değerleri sırasıyla $29,31 \pm 0,00$ ve $33,53 \pm 0,00$). DG1'de 88-1 ve F14 izolatında anlatım saptandı (Cp değerleri sırasıyla $31,67 \pm 0,00$ ve $35,45 \pm 0,00$). DG2'de 9F izolatında anlatım saptandı (Cp= $30,28 \pm 0,00$). DG3'te de 7F ve 9F izolatlarında sırasıyla $34,23 \pm 1,19$ ve $30,29 \pm 0,00$ Cp değerleri ile anlatım gösterildi.

Gip7 geninin KG'de 3F, 11F ve F1 hariç tüm izolatlarda çoğaltım yaptığı elde edilen $29,12 \pm 0,00 - 38,94 \pm 0,00$ Cp değerleri ile gösterildi. DG1'de anlatımın belirlendiği 88-1, 7F, 9F ve F14 izolatlarında Cp değerleri sırasıyla $31,57 \pm 0,55$; $28,07 \pm 0,14$; $30,69 \pm 0,19$ ve $31,71 \pm 0,4$ olarak hesaplandı. DG2'de ise 88-1 (Cp= $31,32 \pm 0,26$), H-11 (Cp= $32,58 \pm 0,00$), F1 (Cp= $36,74 \pm 0,13$) ve F14 (Cp= $31,23 \pm 0,3$) izolatlarında gen anlatımı saptandı. DG3'de ise 9F ve F1 izolatları hariç diğer tüm izolatlarda gen anlatımı saptandı (Cp= $31,08 \pm 0,09 - 39,43 \pm 0,00$).

Gip4 geninin ise 3F ve F1 izolatları hariç tüm örneklerin KG ve tüm deney gruplarında anlatım yaptığı; KG'de $28,86 \pm 0,46 - 36,33 \pm 0,48$; DG1'de $24,3 \pm 0,12 - 32,77 \pm 0,02$; DG2'de $24,25 \pm 0,67 - 35,10 \pm 0,69$; DG3'de ise $24,15 \pm 0,05 - 34,4 \pm 1,6$ Cp değer aralıkları ile gösterildi.

StuAP gen anlatımı KG ve deneme setlerinden DG2 ve DG3'de 3F, Fg174, 11F ve F1 izolatlarından; DG1'de Fg174, 11F ve F1 izolatlarından saptanmadı. Gen anlatımının gerçekleştiği diğer izolatlarda ise Cp değerleri KG'de $25,61 \pm 0,27 - 28,18 \pm 0,16$; DG1'de $25,47 \pm 0,00 - 28,86 \pm 0,06$; DG2'de $24,53 \pm 0,34 - 27,04 \pm 0,14$; DG3'de ise $25,32 \pm 0,38 - 27,84 \pm 0,00$ değer aralığında kaydedildi (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Aurofusarin biyosentezinden sorumlu genlere ait $\sum$ Cp değerleri ve standart hataları.

	<i>β-Tubulin</i>	<i>Pks12</i>	<i>Gip6</i>	<i>Gip7</i>	<i>Gip4</i>	<i>StuAp</i>	
Kontrol	88-1	29,81±0,13	33,09±1,5	-	33,48±0,00	28,3±0,39	28,18±0,48
	H-11	28,69±0,22	30,03±0,71	-	30,47±0,4	27,82±0,56	27,38±0,4
	3F	38,93±0,56	-	-	-	-	-
	7F	25,96±0,31	30,79±0,1	29,31±0,00	29,86±0,29	27,55±0,14	28,73±0,16
	Fg174	32,43±0,38	-	-	38,94±0,00	37,15±0,45	-
	9F	26,80±0,02	27,50±0,17	33,53±0,00	29,12±0,00	26,26±0,02	25,61±0,27
	11F	32,81±0,24	-	-	-	36,33±2,00	-
	F1	33,7±0,08	-	-	-	-	-
	F14	28,62±0,4	31,89±0,05	-	32,19±0,5	26,09±0,48	27,44±0,74
DG1	88-1	30,64±0,77	30,87±1,10	31,67±0,00	31,57±0,55	26,29±0,24	28,86±0,06
	H-11	29,42±0,35	30,41±0,00	-	-	24,36±0,36	25,47±0,00
	3F	30,47±0,25	-	-	-	-	26,41±0,05
	7F	30,14±0,00	26,71±0,16	-	28,07±0,14	25,1±0,11	26,41±0,05
	Fg174	34,08±1,22	-	-	-	28,83±1,37	-
	9F	26,855±0,28	29,61±0,01	-	30,69±0,19	24,3±0,12	27,48±0,22
	11F	34,07±1,01	-	-	-	32,77±0,02	-
	F1	33,21±0,39	-	-	-	-	-
	F14	25,65±0,12	30,77±0,44	31,45±0,00	31,71±0,4	24,63±0,26	25,93±0,00
DG2	88-1	26,68±0,06	29,15±0,33	-	31,32±0,26	24,25±0,67	24,53±0,34
	H-11	28,87±0,38	30,48±0,44	-	32,58±0,00	26,07±0,19	26,90±0,06
	3F	31,2±0,05	-	-	-	-	-
	7F	27,26±1,99	27,3±0,00	-	-	23,67±0,12	25,79±0,86
	Fg174	30,59±0,16	-	-	-	35,10±0,21	-
	9F	26,67±0,21	-	30,28±0,00	-	24,39±0,31	26,81±0,11
	11F	30,47±0,17	-	-	-	33,63±0,69	-
	F1	29,69±0,19	-	-	36,74±0,13	-	-
	F14	28,98±0,45	30,02±0,43	-	31,23±0,03	24,95±0,18	27,04±0,14
DG3	88-1	28,29±0,36	35,35±0,74	34,23±1,09	34,76±0,26	27,03±0,26	25,86±0,00
	H-11	27,98±0,56	29,13±0,18	-	31,6±0,00	26,12±0,41	25,11±0,38
	3F	31,22±4,09	-	-	39,46±0,00	-	-
	7F	27,5±0,00	31,53±0,24	30,29±0,00	31,08±0,09	24,15±0,05	25,92±0,14
	Fg174	30,87±0,32	-	-	35,61±0,00	34,4±1,69	-
	9F	27,91±0,02	26,98±0,00	-	-	24,64±0,39	25,32±0,00
	11F	30,94±0,43	-	-	-	35,29±0,09	-
	F1	32,84±1,15	-	-	-	-	-
	F14	29,10±0,13	29,69±0,20	-	30,52±0,57	27,01±0,45	27,84±0,00

4.3.1.2. Rölatif Kantitasyon Verileri

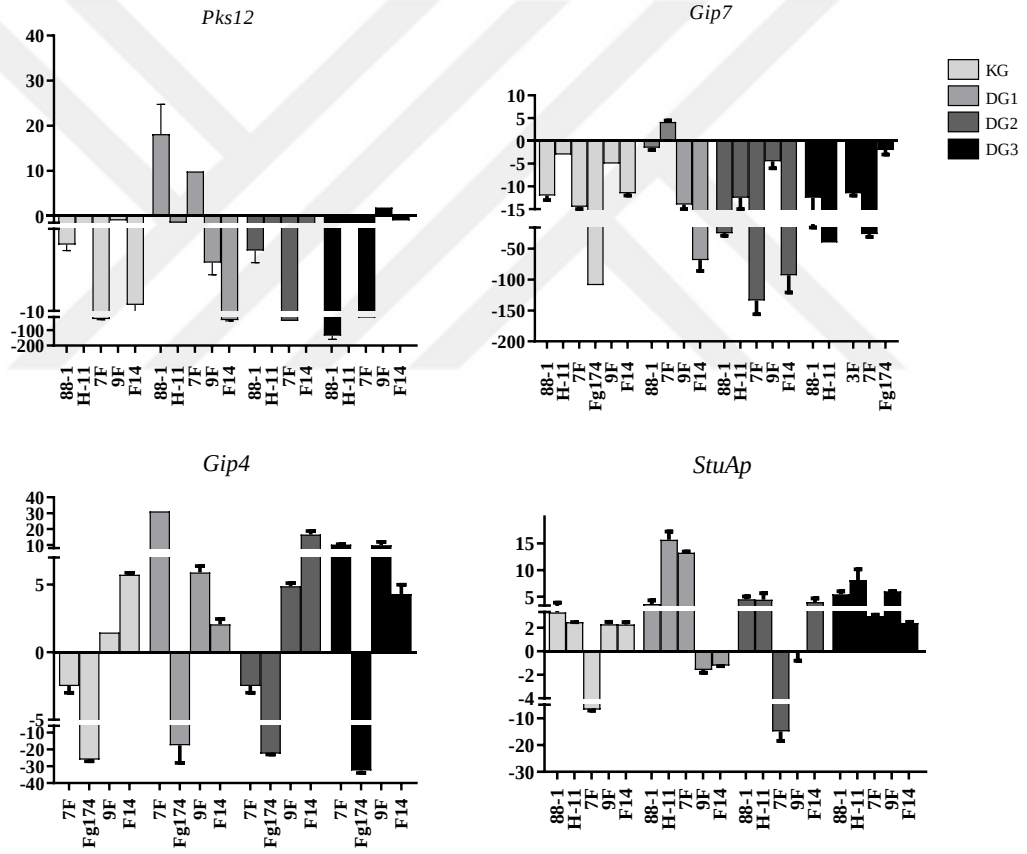
Hedef genlere ait Cp değerlerinin *β -tubulin*'e oranlanmasıyla belirlenen kat artış ve azalışlarını gösteren $2^{-\Delta C_t}$ değerleri Tablo 4.6'da verildi.

Tablo 4.6: Aurofusarin biyosentezinden sorumlu genlere ait $2^{-\Delta Ct}$ değerleri ve standart hataları.

		<i>Pks12</i>	<i>Gip6</i>	<i>Gip7</i>	<i>Gip4</i>	<i>StuAP</i>
Kontrol	88-1	1,38E-01	-	7,91E-02	2,96E+00	3,31E+00
	H-11	4,36E-01	-	2,92E-01	1,97E+00	2,48E+00
	3F	-	-	-	-	-
	7F	3,54E-02	1,16E-01	6,74E-02	3,36E-01	1,47E-01
	Fg174	-	-	9,15E-03	3,80E-02	-
	9F	6,17E-01	9,51E-03	2,00E-01	1,46E+00	2,31E+00
	11F	-	-	-	2,64E-01	-
	F1	-	-	-	-	-
	F14	1,06E-01	-	8,41E-02	5,74E+00	2,28E+00
DG1	88-1	1,81E+01	7,17E-01	5,29E-01	2,30E+01	3,63E+00
	H-11	5,11E-01	-	-	3,53E+01	1,57E+01
	3F	-	-	-	-	-
	7F	9,90E+00	-	4,19E+00	3,11E+01	1,33E+01
	Fg174	-	-	-	8,40E-02	-
	9F	1,50E-01	-	6,99E-02	5,91E+00	6,69E-01
	11F	-	-	-	2,45E-02	-
	F1	-	-	-	-	-
	F14	2,91E-02	1,69E-02	1,55E-02	2,07E+00	8,23E-01
DG2	88-1	1,84E-01	-	4,08E-02	5,66E+00	4,53E+00
	H-11	3,28E-01	-	7,78E-02	7,02E+00	4,44E+00
	3F	-	-	-	-	-
	7F	2,50E-02	-	-	3,18E-01	7,98E-02
	Fg174	-	-	-	4,36E-02	-
	9F	-	7,36E-02	-	4,89E+00	9,23E-01
	11F	-	-	-	1,23E-01	-
	F1	-	-	7,62E-03	-	-
	F14	4,88E-01	-	2,16E-01	1,65E+01	4,01E+00
DG3	88-1	7,65E-03	1,67E-01	1,18E-02	2,50E+00	5,48E+00
	H-11	4,82E-01	-	8,46E-02	3,64E+00	8,11E+00
	3F	-	-	-	-	-
	7F	5,42E-02	1,45E-01	8,40E-02	1,02E+01	2,99E+00
	Fg174	-	-	3,79E-02	3,06E-02	-
	9F	1,88E+00	4,48E-01	7,66E+00	9,88E+00	6,02E+00
	11F	-	-	-	5,09E-02	-
	F1	-	-	-	-	-
	F14	6,73E-01	-	3,95E-01	4,31E+00	2,41E+00

Pks12 KG ve DG2’de anlatımın belirlendiği tüm izolatlarda down regülasyon ile kontrol edildi. Gen, DG1’de 7F ve 88-1’de up regülasyon; diğer izolatlarda ise down regülasyon ile kontrol edildi. DG3’de ise yalnızca 9F’de gen anlatım seviyesinde kat artışı gerçekleşti. *Gip6* tüm

izolatlar ve ortam koşullarında down-regüle edildi. *Gip7* anlatımı seviyesinde KG ve DG2’de kat azalışı belirlenirken; DG1’de 7F, DG3’de ise 9F için kat artışı belirlendi. *Gip4* geni DG1 ve DG3’de 88-1, H-11, 7F, 9F ve F14 izolatlarında up regülasyon; Fg174 ve 11F izolatlarının ise down regülasyonla kontrol edildi. Gen anlatım seviyesi KG ve DG2’de 88-1, H-11, 9F ve F14’te artarken, 7F, Fg174 ve 11F’de azaldı. *StuAp* anlatım seviyesinde tüm izolatlar için KG (7F hariç) ve DG3’de kat artışı belirlendi. Gen DG1’de *F. graminearum* izolatlarında (88-1, H-11 ve 7F) up regülasyon; *F. culmorum* 9F ve F14 izolatlarında ise down regülasyon ile kontrol edildi. Gen DG2’de ise 88-1, H-11 ve F14’de up regülasyon ile; 7F ve 9F’de ise down regülasyon ile kontrol edildi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: *Pks12*, *Gip7*, *Gip4* ve *StuAP* genlerinin kontrol, DG1, DG2 ve DG3 ortamlarındaki anlatımların β -tubulin’e göre oransal değişimi. Barlar standart hataları temsil etmektedir.

4.3.2. 48., 72., 120. ve 168. Saatlerde Aurofusarin Biyosentezinden Sorumlu Genlerin qPZR Analiz Sonuçları

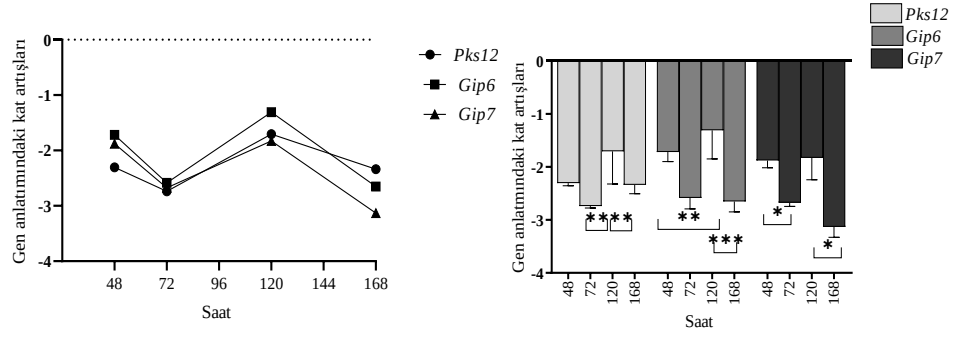
9F izolatında anlatım seviye değişimleri 48., 72., 120. ve 168. saatlerde araştırılan *Pks12*, *Gip6* ve *Gip7* genlerinin β -tubulin ile birlikte belirlenen Cp değerleri ve hedef/referans oranından

hesaplanan $2^{-\Delta C_t}$ değerleri standart hataları ile birlikte Tablo 4.7’de verildi. *Pks12* genine ait C_p değeri, lag faza karşılık gelen 48. saatte $30,28 \pm 0,17$; log faza karşılık gelen 72. saatte $31,04 \pm 0,06$; durağan faza girilen 120. saatte $31,89 \pm 0,05$ ve son olarak 168. saatte $32,01 \pm 0,05$ olarak hesaplandı. *Gip6* genine ait C_p değeri, 48. saatte $29,43 \pm 0,00$, 72. saatte $30,92 \pm 0,00$ ve 120. saatte $32,24 \pm 0,25$; 168. saatte ise $33,53 \pm 0,00$ olarak hesaplandı. *Gip7* genine ait C_p değeri, 48. saatte $29,11 \pm 0,07$, 72. saatte $30,74 \pm 0,55$, 120. saatte $31,2 \pm 0,00$, 168. saatte ise $32,57 \pm 0,00$ olarak hesaplandı.

Tablo 4.7: Aurofusarin biyosentezinden sorumlu genlere ait C_t değerleri ve standart hataları.

		48. saat	72. saat	120. saat	168. saat
Ct	<i>β-Tubulin</i>	25,67 $\pm$ 0,27	25,57 $\pm$ 0,14	27,82 $\pm$ 0,00	27,26 $\pm$ 0,38
	<i>Pks12</i>	30,28 $\pm$ 0,17	31,04 $\pm$ 0,06	31,89 $\pm$ 0,05	32,01 $\pm$ 0,05
	<i>Gip6</i>	29,43 $\pm$ 0,00	30,92 $\pm$ 0,00	32,24 $\pm$ 0,25	33,53 $\pm$ 0,00
	<i>Gip7</i>	29,11 $\pm$ 0,07	30,74 $\pm$ 0,55	31,20 $\pm$ 0,00	32,57 $\pm$ 0,00
2^{-ΔC_p}	<i>Pks12</i>	4,10E-02	2,24E-02	5,95E-02	3,81E-02
	<i>Gip6</i>	8,47E-02	2,28E-02	8,56E-02	1,30E-02
	<i>Gip7</i>	9,33E-02	2,83E-02	9,59E-02	1,68E-01

Aurofusarin üretiminden sorumlu genlerin anlatım seviyelerinde *β -tubulin*’e göre azalma belirlendi. 168. saatte *Gip7* geninde en yüksek (1,68E-01), 72. saatte *Pks12* geninde en düşük (2,24E-02) anlatım seviyesi kaydedildi. Organizmanın log evresinde bulunduğu 72. saatte her üç genin de anlatımının en düşük seviyede olduğu belirlenirken durağan fazın başladığı 120. saatte gen anlatımlarının en yüksek seviyedeydi. *Pks12* geninde 72. saat ile 120. saatteki gen anlatım seviye değişimleri arasındaki fark anlamlı bulundu ($p < 0,01$). Benzer şekilde 120. saat ile 168. saatteki anlatım seviye değişimleri arasındaki farkın anlamlıydı ($p < 0,01$). *Gip6* geninde ise 48. saat ile 120. saat arasındaki ($p < 0,01$) ve 120. saat ile 168. saat arasındaki ($p < 0,001$) gen anlatım farklılıkları anlamlı bulundu. *Gip7* genine ait anlatım verileri incelendiğinde, 48. ile 72. saatler ($p < 0,05$) ve 120. ile 168. saatler arasındaki ($p < 0,05$) gen anlatımı değişimlerinin anlamlı bulundu (Şekil 4.14).

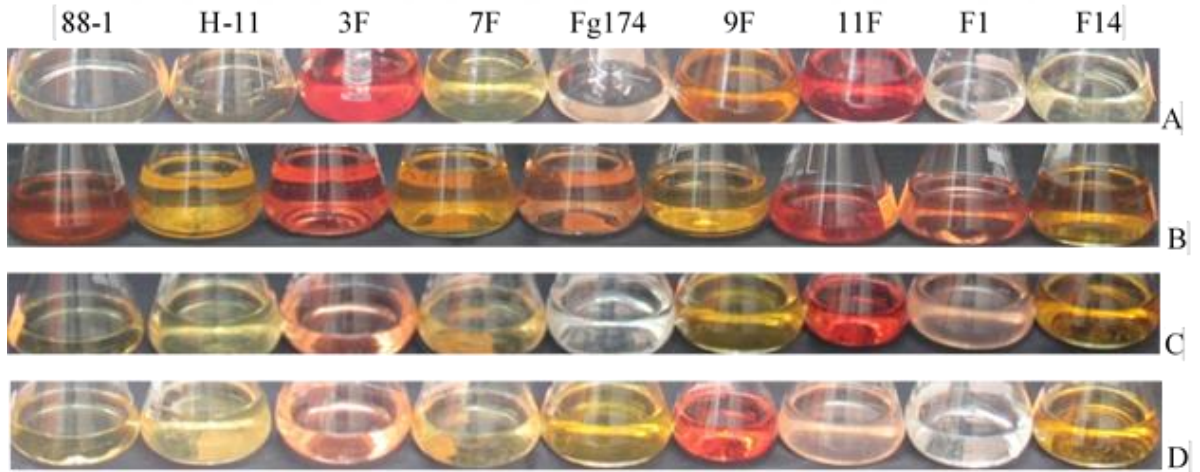


Şekil 4.14: *Pks12*, *Gip6* ve *Gip7* genlerinin 48., 72., 120. ve 168. saatlerdeki anlatımının β -tubulin'e göre oransal değişimi. Barlar standart hataları temsil etmektedir (* $p<0,5$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

4.4. AUROFUSARİNİN EKSTRAKSİYONU VE ANALİZİ

4.4.1. Pigment Ekstraksiyonu

5 *F. graminearum* ve 4 *F. culmorum* izolatının kontrol ve tüm deney gruplarından en yüksek verimi sağlayan asetik asit çözücünün kullanıldığı soğukta ekstraksiyon yaklaşımıyla elde edilen pigment ekstreleri Şekil 4.15'de verildi.

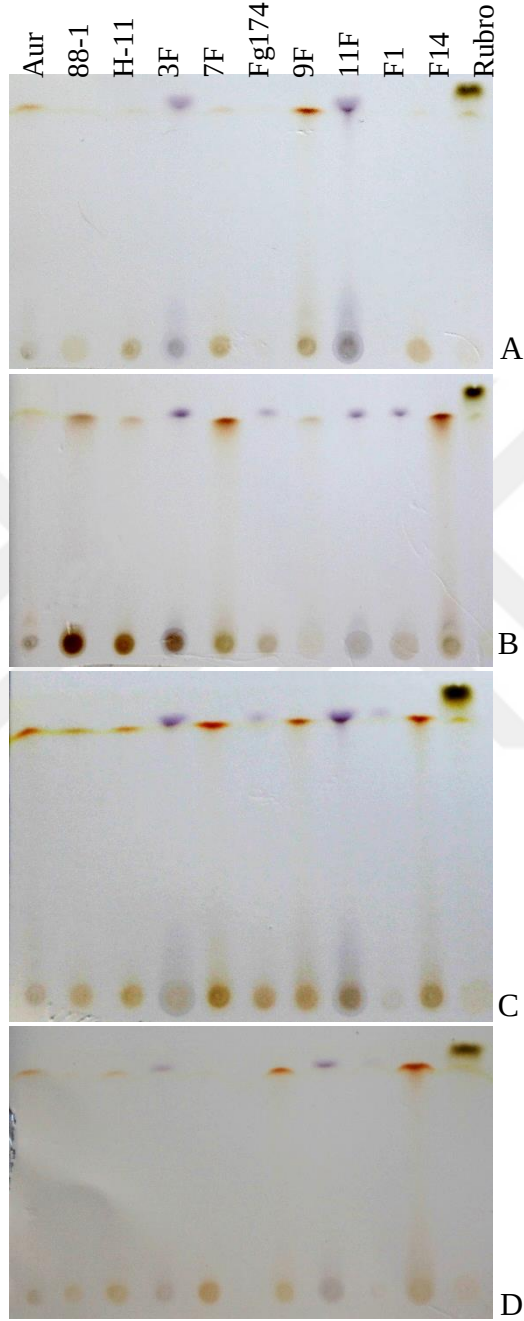


Şekil 4.15: Kontrol (A), DG1 (B), DG2 (C) ve DG3 (D) ortamlarında üretilen kültürlerden ekstre edilen pigment bileşikler.

4.4.2. İTK Analiz Bulguları

İTK plaklarında aurofusarin standardı ile aynı göç profili sergileyen spotlar, izolatların (3F, Fg174, F1 ve 11F hariç) bu pigmenti ürettiğini düşündürdü. 4 izolatta ise mor renkte farklı bir

spot belirlendi. Ancak İTK'da rubrofusarin üretimi ile ilişkili bir spot görüntülenemedi (Şekil 4.16).



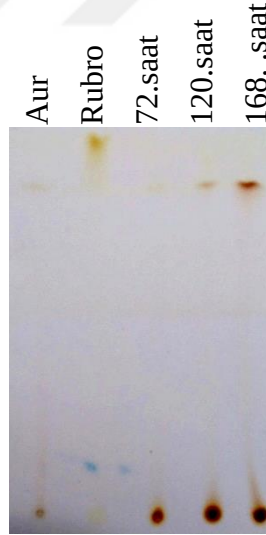
Şekil 4.16: Kontrol ve deney gruplarına ait ince tabaka kromatografisi görüntüsü. Kontrol grubu, (B) DG1, (C) DG2, (D) DG3. Aur: aurofusarin standardı (1 mg/ml), Rubro: rubrofusarin standardı (1 mg/ml).

Hesaplanan RF (İng. Reterdation factor) değerleri Tablo 4.18’de verildi. Kontrol grubu ile DG1, DG2 ve DG3’de aurofusarin standardı ile 88-1, H-11, 7F, 9F ve F14 izolatlarının aynı RF değerlerine sahip olduğu; bu 5 izolattan farklı olarak 3F, F1 ve 11F izolatlarının da kendi aralarında aynı RF değerini paylaştığı ortaya kondu. Yalnızca kontrol grubunda Fg174’ün 5 izolatla (88-1, H-11, 7F, 9F ve F14) aynı RF değerine sahip olduğu ve bu izolatın DG1 ve DG2’de 3F, F1 ve 11F izolatlarıyla aynı RF’e sahip olduğu bulundu (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: İnce tabaka kromatografisi ile analiz edilen örneklerin RF değerleri (cm).

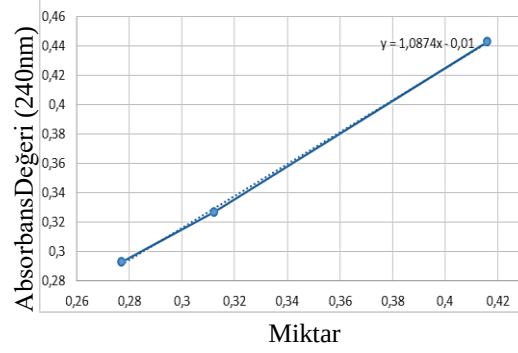
	Aur	88-1	H-11	3F	7F	Fg174	9F	11F	F1	F14	Rubro
Kontrol	0,89	0,89	0,89	0,94	0,89	0,89	0,89	0,94	-	0,98	0,97
DG1	0,87	0,87	0,87	0,92	0,87	0,92	0,87	0,92	0,92	0,87	0,95
DG2	0,88	0,88	0,88	0,94	0,88	0,94	0,88	0,94	0,94	0,88	0,97
DG3	0,83	0,83	0,83	0,86	0,83	-	0,83	0,86	0,86	0,83	0,88

9F izolatının 72., 120. ve 168. saatlik kültürlerinden elde edilen ekstraller ince tabaka kromatografisi ile analiz edildiğinde üç zaman periyodunda da aurofusarinin üretilmiş olduğu (RF değeri 0,66) ortaya kondu (Şekil 4.17).



Şekil 4.17: 9F izolatına ait ince tabaka kromatografisi görüntüsü.

İzolatların ürettiği aurofusarin miktarının belirlenmesinde kullanılan aurofusarin standardının konsantrasyon gradientinin absorbansı temel alınarak çizilen kalibrasyon diyagramı Şekil 4.18’de verildi.



Şekil 4.18: Aurofusarin molekülünün sulandırım serilerinin kullanılarak çizildiği kalibrasyon diagramı.

Kalibrasyon diagramı kullanılarak en yüksek aurofusarin üretimi (0,292 µg/µl) kontrol grubunda kiremit kırmızısı miselyum renklenmesine sahip 9F izolatında hesaplandı. DG1’de ise yoğun kahverengi renklenmeye sahip 88-1 izolatı ile koyu kırmızı-kahverengi miselyumlara sahip H-11, 7F ve F14 izolatlarında en yüksek aurofusarin miktarları belirlendi (sırasıyla 0,347, 0,384 ve 0,384 µg/µl). DG2 için en yüksek değer (0,257 µg/µl) koyu pembe renkli 7F izolatında belirlenirken DG3’de en yüksek miktar (0,389 µg/µl) koyu pembe renklenli F14 izolatında tespit edildi. KG şartlarında kültürlen 9F izolatına ait 48 saatlik kültürde aurofusarin konsantrasyonu spektral yöntemle hesaplanamadı. Aurofusarin konsantrasyonu aynı izolatın 72 saatlik kültüründe ise 2,81 µg/µl; 120 saatlik kültüründe 4,71 µg/µl ve 168 saatlik kültüründe 5,17 µg/µl olarak belirlendi (Tablo 4.9).

Tablo 4.9: Kontrol, DG1, DG2 ve DG3’de kültürlen miselyumlarda üretilen aurofusarin miktarları (µg/µl).

	88-1	H-11	7F	Fg174	9F	11F	F14
Kontrol	0,178	0,139	0,149	0,042	0,292	0,130	0,262
DG1	0,425	0,347	0,384	0,223	0,133	0,167	0,384
DG2	0,139	0,187	0,257	0,155	0,237	0,221	0,239
DG3	0,158	0,286	0,24	-	0,22	0,126	0,389

4.4.3. HPLC Analiz Bulguları

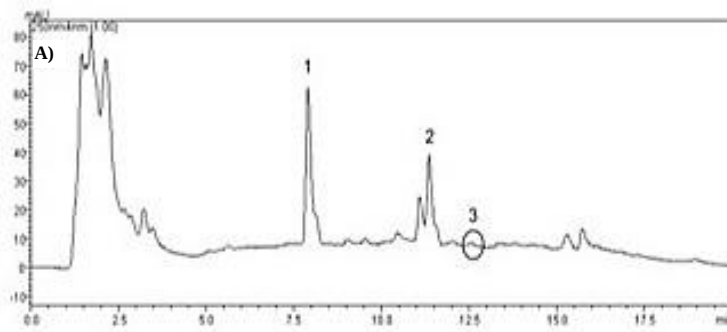
Çalışmada kullanılan *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarının KG, D1, DG2 ve DG3’de belirlenen aurofusarin ve rubrofusarin konsantrasyonları Tablo 4.10’da verilmektedir.

Tablo 4.10: KG, DG1, DG2 ve DG3 şartlarında PDA besi ortamında yedi (7) süreyle kültürlen *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarına ait miselyumlarda üretilen aurofusarin ve rubrofusarin miktarları (ppm) ve standart hataları.

İzolat	Deneme Grubu	Aurofusarin Derişim (ppm)	Rubrofusarin Derişim (ppm)
88-1	KG	1,630±0.002	-
	DG1	14,349±0.001	1,402±0.002
	DG2	0,835±0.002	0,319±0.002
	DG3	-	0,058±0.004
H-11	KG	-	-
	DG1	0,482±0.001	0,400±0.002
	DG2	0,543±0.003	0,074±0.005
	DG3	0,583±0.001	-
3F	KG	-	1,799±0.002
	DG1	-	1,062±0.002
	DG2	-	1,915±0.001
	DG3	-	0,211±0.004
7F	KG	-	-
	DG1	18,176±0.001	0,457±0.002
	DG2	20,291±0.001	0,414±0.001
	DG3	-	-
Fg174	KG	-	-
	DG1	-	0,695±0.004
	DG2	-	0,238±0.003
	DG3	-	-
9F	KG	3,685±0.002	0,052±0.003
	DG1	3,524±0.004	0,862±0.005
	DG2	5,346±0.002	0,611±0.003
	DG3	8,509±0.004	0,120±0.005
11F	KG	-	1,635±0.001
	DG1	-	1,081±0.003
	DG2	-	1,589±0.002
	DG3	1,892±0.002	2,342±0.001
F1	KG	-	-
	DG1	-	0,865±0.002
	DG2	-	0,689±0.004
	DG3	-	1,032±0.001
F14	KG	-	-
	DG1	24,108±0.003	1,567±0.002
	DG2	9,183±0.001	0,552±0.002
	DG3	13,675±0.002	0,282±0.002

HPLC-DAD analizi ile kontrol grubunda kiremit kırmızısı-sarı miselyum renklenmesine sahip F14 izolatında en yüksek aurofusarin üretimi (24,108±0,003) yapıldı. En düşük aurofusarin biyosentezi ise DG1’de üretilen H-11 izolatında (0,482±0,001) gerçekleşti. En düşük rubrofusarin konsantrasyonu DG1’de üretilen 88-1 izolatında (0,058±0,004); en yüksek rubrofusarin konsantrasyonu kontrol grubunda üretilen 3F izolatında (1,799±0,002) belirlendi.

88-1 izolatında kontrol grubunda yalnızca aurofusarin; DG3'de ise yalnızca rubrofusarin üretiminin yapıldığı, DG1 ve DG2'de ise her iki metabolitin de sentezlendiği görüldü. Benzer şekilde H-11 izolatında da DG1 ve DG2'de hem aurofusarin hem de rubrofusarin biyosentezinin yapıldığı belirlenirken DG3'de yalnızca aurofusarin sentezi gösterildi. Aynı izolata ait kontrol grubunda üretilen kültürlerde ise aurofusarin ya da rubrofusarin belirlenemedi. PZR ile aurofusarin genlerinin çoğaltımının yapılamadığı 3F izolatında kontrol ve deney gruplarında sadece rubrofusarin biyosentezinin gerçekleştiği gözlemlendi. 7F izolatında DG1 ve DG2'de yüksek miktarda aurofusarin ve rubrofusarin konsantrasyonu belirlenirken kontrol ve DG3'de ilgili pigmentlerin konsantrasyonları hesaplanamadı. Kontrol ve DG3'de beyaz; DG1 ve DG2'de yavruğazı miselyum renklenmesine sahip olan Fg174'de DG1 ve DG2'de sadece rubrofusarin sentezlendiği; KG ve DG3'de herhangi bir pigment üretiminin yapılmadığı belirlendi. 9F izolatında kontrol ve tüm deney gruplarında hem aurofusarin hem de rubrofusarinin yüksek konsantrasyonlarda sentezlendiği gösterildi. 11F izolatında sadece DG3'de düşük miktarda aurofusarin biyosentezinin yapılmış olduğu; kontrol grubu hariç diğer gruplarda ise sadece rubrofusarin sentezinin yapıldığı belirlendi. Kontrol grubunda beyaz; DG1, DG2 ve DG3'de ise yavruağzı miselyum renklerine sahip F1 izolatında ise aurofusarin biyosentezinin yapılmadığı belirlendi. DG1 ve DG2'de kiremit kırmızısı-sarı; DG3'de ise pembe ve yer yer siyaha yakın miselyum renklenmesi sergileyen F14'e ait miselyumlarda hem aurofusarin hem de rubrofusarin belirlenirken kontrol grubunda HPLC ile aurofusarin ve rubrofusarin belirlenemedi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19: 7 günlük 9F kültürüne ait ekstreden elde edilen HPLC kromatogramları 1.Quercetin I.S. (5 mg/l); 2.Aurofusarin (50 mg/l); 3.Rubrofusarin (5 mg/l).

9F izolatına ait KG şartlarında üretilen miselyumlarda ise en yüksek aurofusarin konsantrasyonu 168. saatte 27,350 ppm; en yüksek rubrofusarin konsantrasyonu ise 24. saatte 13,443 ppm olarak hesaplandı (Tablo 4.11).

Tablo 4.11: Kontrol şartlarında (25 °C pH 5,6) PDA besi yerinde üretilen *F. culmorum* 9F izolatına ait 24, 48, 72, 120 ve 168 saatlik kültürlerde üretilen aurofusarin ve rubrofusarin miktarları (ppm) ve standart hataları.

İzolat	Kültür Saati	Aurofusarin Derişim (ppm)	Rubrofusarin Derişim (ppm)
9F	48. saat	4,717±0.001	13,443±0.001
	72. saat	2,355±0.001	0,098±0.001
	120. saat	4,742±0.002	0,068±0.001
	168. saat	27,350±0.003	0,063±0.002

4.4. İSTATİSTİK ANALİZ BULGULARI

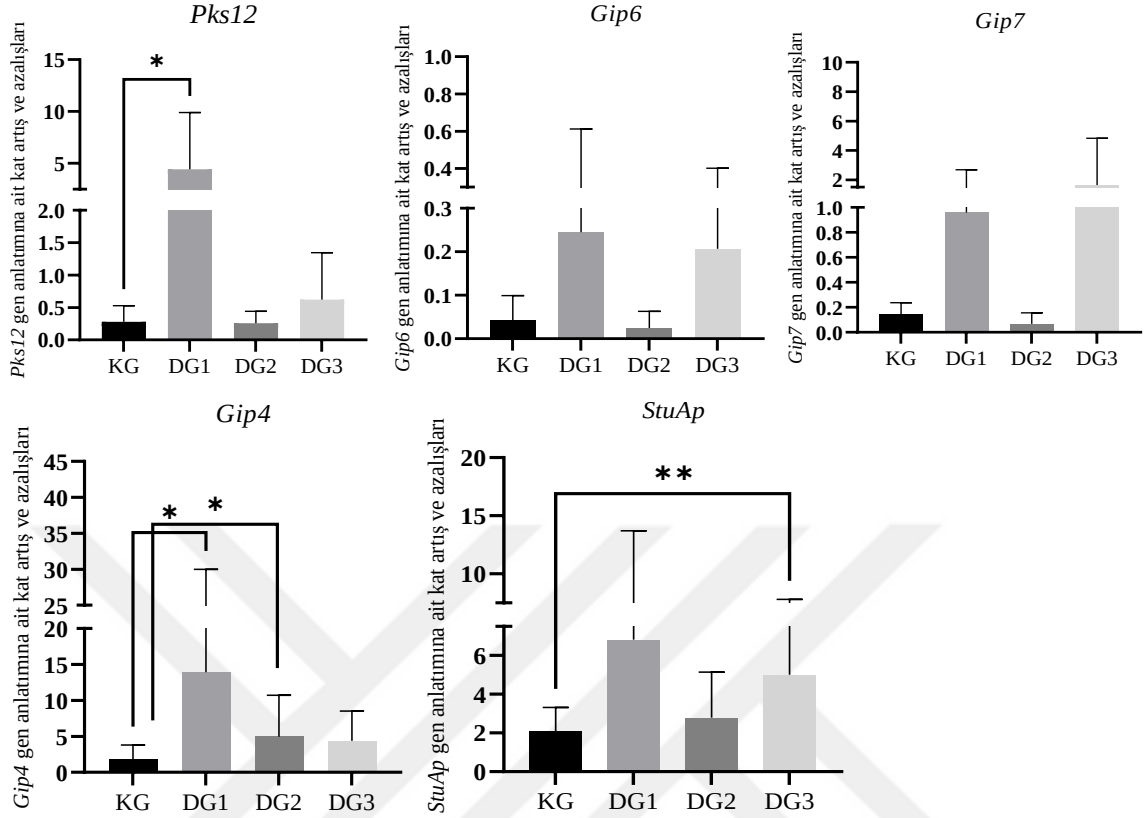
Cp değerleri *Pks12*'de KG, DG1 ve DG3'de; *Gip6*'da sadece DG3'de ve *Gip4*'de sadece KG'de lognormal dağılıma uydu. *Gip7* geninde KG'deki Cp değerleri lognormal dağılıma uymazken diğer gruplardan elde edilen Cp'ler normal dağılım gösterdi. *StuAp* genine ait Cp'ler sadece DG1'de normal dağılım göstermedi ancak diğer tüm gruplarda normal dağılıma uydu. Bu doğrultuda, normal dağılıma uyan iki grubun karşılaştırmasında parametrik bağımlı iki örneklem t testi; normal dağılım göstermeyen iki grup ile biri normal dağılım ve diğeri normal dağılmayan ikin grubun karşılaştırmasında parametrik olmayan Wilcoxon testi kullanıldı (Tablo 4.12).

Tablo 4.12: Sharpio-Wilk lognormal dağılım testi verileri (W: Wilk).

		KG	DG1	DG2	DG3
Pks12	W değeri	0,9265	0,8603	0,8010	0,8910
	p değeri	0,4145	0,0770	0,0294	0,1741
	Lognormalite Testi Sonucu	Geçti	Geçti	Geçmedi	Geçti
Gip6	W değeri	0,6933	0,6559	0,6412	0,8363
	p değeri	0,0053	0,0021	0,0014	0,1214
	Lognormalite Testi Sonucu	Geçmedi	Geçmedi	Geçmedi	Geçti
Gip7	W değeri	0,8237	0,9229	0,9645	0,9127
	p değeri	0,0281	0,4537	0,8539	0,3001
	Lognormalite Testi Sonucu	Geçmedi	Geçti	Geçti	Geçti
Gip4	W değeri	0,9101	0,8396	0,8589	0,7704
	p değeri	0,1579	0,0161	0,0294	0,0022
	Lognormalite Testi Sonucu	Geçti	Geçmedi	Geçmedi	Geçmedi
StuAp	KS değeri	0,8718	0,8179	0,9242	0,8469
	p değeri	0,1050	0,0239	0,3932	0,0533
	Lognormalite Testi Sonucu	Geçti	Geçmedi	Geçti	Geçti

4.4.1 Kontrol ve Deney Grupları Arasındaki Gen Anlatım Değişimlerine Ait Analiz Bulguları

Pks12 anlatımı kontrole göre DG1 ve DG3’de arttı, ancak anlamlı artış sadece DG1’de gerçekleşti ($p<0,04$). Bu artışa KG (25 °C) ve DG1 (15 °C) arasındaki sıcaklık farkı neden oldu. DG2’deki gen anlatımı KG’ye göre down regülasyon ile kontrol edildi ancak gen anlatımındaki azalış anlamlı bulunmadı. *Gip6* ve *Gip7*’de DG1 (15 °C pH 5,6) ve DG3’de (25 °C pH 7,0) gen anlatımı kontrole göre arttı. 15°C sıcaklık ve 7,0 pH ile oluşturulan DG2’de ise anlatım kontrole göre azaldı. Her iki gende belirlenen bu değişimler anlamlı bulunmadı. *Gip4* geninde DG1’de ve DG2’de KG’ye göre belirlenen gen anlatımı artışları anlamlı bulunurken ($p<0,05$), DG3’de kontrole göre belirlenen gen anlatımı artışı anlamsız bulundu. Sonuç olarak hem sıcaklık hem de pH değişkeni *Gip4* anlatımını anlamlı şekilde etkiledi. *StuAp* anlatımı DG3’de aynı sıcaklık değerine (25 °C) sahip kontrole göre anlamlı şekilde arttı ($p<0,01$). Ancak DG1 ve DG2’de kontrole göre belirlenen gen anlatımı artışları anlamlı bulunmadı (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: *Pks12*, *Gip7*, *Gip4* ve *StuAP* genlerinin kontrol, DG1, DG2 ve DG3 ortamlarındaki anlatımlarının kontrol grubuna göre oransal değişimi. (*p<0,01). Barlar standart hataları temsil etmektedir.

4.4.2. Gen Anlatımı ile Aurofusarin ve Rubrofusarin Üretimi Arasındaki İlişkiye Ait Bulgular

Farklı sıcaklık ve pH parametrelerinin uygulandığı kültür koşullarında aurofusarin üretimi ile *Pks12* ($r=0,6272$) ve *Gip4* ($r=0,6197$) anlatım seviye değişimi arasında yüksek; *Gip7* ($r=0,4328$) ve *StuAp* ($r=0,5364$) anlatım seviye değişimi ile orta şiddette korelasyon bulundu. Rubrofusarin biyosentezi ile yalnızca *Gip7* gen anlatım seviye değişimi orta şiddette ters korelasyon gösterdi ($r=-0,4615$) (Tablo 4.13).

Tablo 4.13: KG, DG1, DG2 ve DG3 şartlarında kültürlenmiş izolatlardan elde edilen Cp verileri ile HPLC verileri arasındaki Spearman regresyon (r) katsayıları (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns: not-significant).

	Aurofusarin				
	<i>Pks12</i>	<i>Gip6</i>	<i>Gip7</i>	<i>Gip4</i>	<i>StuAp</i>
Spearman r	0,6272	0,2889	0,4328	0,6197	0,5364
p değeri	<0,0001	0,0875	0,0084	<0,0001	0,0007
Testin anlamlılığı	****	ns	**	****	***
	Rubrofusarin				
	<i>Pks12</i>	<i>Gip6</i>	<i>Gip7</i>	<i>Gip4</i>	<i>StuAp</i>
Spearman r	-0,3255	-0,1321	-0,4615	-0,2577	-0,3934
p değeri	0,0527	0,4426	0,0046	0,1292	0,0176
Testin anlamlılığı	ns	ns	**	ns	*

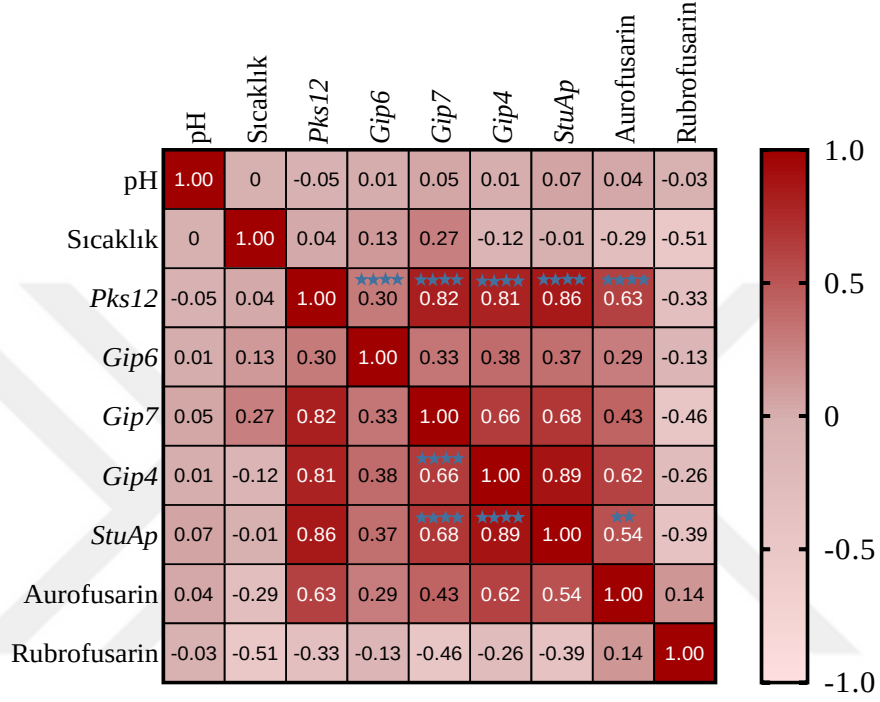
Gen anlatımlarının aurofusarin sentezi ile ilişkisi her bir ortam şartında ayrı ayrı değerlendirildiğinde, KG’de yalnızca *Pks12* gen anlatımı ile aurofusarin biyosentezi arasında yüksek pozitif korelasyon belirlendi ($r=0,6499$). DG1’de *Pks12*, *Gip7* ve *StuAp* anlatımı ile aurofusarin biyosentezi yüksek korelasyon gösterdi (r değerleri sırasıyla 0,7818, 0,8390 ve 0,7636). DG2’de ise sadece *Gip4* anlatım seviyesinin aurofusarin üretimi ile yüksek korelasyona sahipti ($r=0,71$). DG3’de ise seçilen genlerin anlatımı ile aurofusarin biyosentezi arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. KG, DG1, DG2 ve DG3’de rubrofusarin biyosentezi ile gen anlatımı arasında anlamlı bir korelasyon belirlenmedi (Tablo 4.14).

Tablo 4.14: *Pks12*, *Gip5*, *Gip7*, *Gip4* ve *StuAp* gen anlatımı ile aurofusarin ve rubrofusarin biyosentezi arasındaki Spearman regresyon (r) katsayıları (* p<0,05, ns: not-significant).

	KG-Aurofusarin				
	<i>Pks12</i>	<i>Gip6</i>	<i>Gip7</i>	<i>Gip4</i>	<i>StuAp</i>
Spearman r	0,6499	0,3438	0,4410	0,3896	0,6198
P değeri	0,0417	0,3194	0,2639	0,3194	0,0556
	*	ns	ns	ns	Ns
	KG-Rubrofusarin				
	<i>Pks12</i>	<i>Gip6</i>	<i>Gip7</i>	<i>Gip4</i>	<i>StuAp</i>
Spearman r	-0,3223	0,01356	-0,3928	-0,4027	-0,3723
P değeri	0,3948	>0,9999	0,2897	0,2817	0,3393
	ns	ns	ns	ns	Ns
	DG1-Aurofusarin				
	<i>Pks12</i>	<i>Gip6</i>	<i>Gip7</i>	<i>Gip4</i>	<i>StuAp</i>
Spearman r	0,7818	0,6198	0,8390	0,6817	0,7636
P değeri	0,0203	0,0556	0,0152	0,0523	0,0265
	*	ns	*	ns	*
	DG1-Rubrofusarin				
	<i>Pks12</i>	<i>Gip6</i>	<i>Gip7</i>	<i>Gip4</i>	<i>StuAp</i>
Spearman r	-0,1480	0,7075	0,09129	-0,4268	-0,3046
P değeri	0,7025	0,0556	0,8340	0,2530	0,4233
	ns	ns	ns	ns	ns
	DG2-Aurofusarin				
	<i>Pks12</i>	<i>Gip6</i>	<i>Gip7</i>	<i>Gip4</i>	<i>StuAp</i>
Spearman r	0,5223	0,2860	0,1636	0,7167	0,6727
P değeri	0,1502	0,7778	0,6603	0,0389	0,0531
	ns	ns	ns	*	ns
	DG2-Rubrofusarin				
	<i>Pks12</i>	<i>Gip6</i>	<i>Gip7</i>	<i>Gip4</i>	<i>StuAp</i>
Spearman r	-0,3729	0,1369	-0,2872	-0,5523	-0,5919
P değeri	0,3232	0,8889	0,4500	0,1282	0,0993
	ns	ns	ns	ns	ns
	DG3-Aurofusarin				
	<i>Pks12</i>	<i>Gip6</i>	<i>Gip7</i>	<i>Gip4</i>	<i>StuAp</i>
Spearman r	0,6244	0,1059	0,4753	0,4176	0,09825
P değeri	0,0774	0,8214	0,2024	0,2738	0,7857
	ns	ns	ns	ns	ns
	DG3-Rubrofusarin				
	<i>Pks12</i>	<i>Gip6</i>	<i>Gip7</i>	<i>Gip4</i>	<i>StuAp</i>
Spearman r	-0,1724	-0,3424	-0,4407	-0,3915	-0,5223
P değeri	0,6670	0,3671	0,2385	0,2935	0,1502
	ns	ns	ns	ns	ns

Pks12, *Gip6*, *Gip7*, *Gip4* ve *StuAp* gen anlatımı, aurofusarin ve rubrofusarinine ait HPLC verileri ve sıcaklık ile pH değişkenleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, *Pks12* anlatımı ile *Gip7* (r=0,82), *Gip4* (r=0,81) ve *StuAp* (r=0,86) gen anlatımı arasında çok yüksek pozitif korelasyon, *Gip6* gen anlatımı ile zayıf pozitif korelasyon (r=0,30) bulundu. *Pks12*, *Gip4* ve *StuAp* gen

anlatımı ile aurofusarin biyosentezi arasında ise orta şiddette pozitif korelasyon (r değerleri sırasıyla 0,63, 0,62 ve 0,54) belirlendi. *StuAp* gen anlatımı ile *Gip7* gen anlatımı arasında ise orta şiddette ($r=0,68$); *StuAp* ile *Gip4* genlerinin anlatımları arasında ise çok yüksek pozitif korelasyon ($r=0,89$) bulundu (Şekil 4.21).



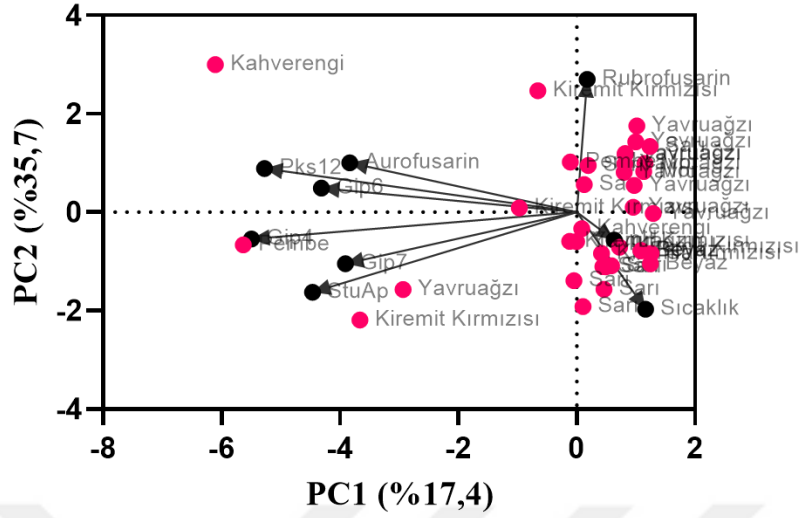
Şekil 4.21: Gen anlatımı, aurofusarin ve rubrofusarin biyosentezi ile çevre koşulları arasındaki ilişkiyi gösteren Spearman r değerleri (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$) (tabloda istatistiksel olarak anlamlı ilişki belirlenen ikili grupta sadece birinde yıldız işareti kullanılmıştır).

Verilerin temel bileşen analizinde (PCA), ilk dört temel bileşen varyasyonların sırasıyla %35,57, %17,49, %13,38 ve %11,8'ini oluşturdu. PC1 toplam varyasyon %35,57'si açıkladı ve *Pks12* (-0,83), *Gip4* (-0,86), *StuAp* (-0,70), *Gip6* (-0,68) ve *Gip7* (-0,61) anlatımları negatif korelasyonları temsil etti. PC2 toplam varyasyon %17,49'unu açıkladı ve rubrofusarin biyosentezi pozitif korelasyonu (0,82), sıcaklık parametresi ve *StuAp* gen anlatımı (-0,48) negatif korelasyonu temsil etti. PC3 toplam varyasyon %13,38'ini temsil etti. *Gip6* gen anlatımı (0,60) ve sıcaklık parametresi (0,55) pozitif korelasyonları temsil ederken *StuAp* (-0,44) ve *Gip4* (-0,38) anlatımları negatif korelasyon gruplarını temsil etti. Toplam varyasyon %11,8'ini temsil eden PC4'de pH parametresi (-0,90) negatif korelasyonu temsil etti.

Tablo 4.15: *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarında temel bileşenlerdeki (PC) varyasyon değerleri.

Temel Bileşenler				
	PC1	PC2	PC3	PC4
Öznitelik katsayısı	3,201	1,574	1,204	1,062
Varyans Oranı	%35,57	%17,49	%13,38	%11,80
Kümülatif Varyans Oranı	%35,57	%53,06	%66,44	%78,24
Öznitelik Değerleri				
	PC1	PC2	PC3	PC4
pH	0,15	-0,17	0,14	-0,90
Sıcaklık	0,28	-0,58	0,55	0,28
<i>Pks12</i>	-0,83	0,27	0,22	0,19
<i>Gip6</i>	-0,68	0,15	0,60	0,06
<i>Gip7</i>	-0,61	-0,31	0,36	-0,23
<i>Gip4</i>	-0,86	-0,16	-0,38	0,06
<i>StuAp</i>	-0,70	-0,48	-0,44	-0,01
Aurofusarin	-0,60	0,31	0,02	-0,26
Rubrofusarin	0,04	0,82	0,03	-0,05

PCA ile elde edilen çift boyutlu grafikte, *Pks12*, *Gip6* anlatımı seviye değişimleri ve aurofusarin biyosentezi bir arada kümelenirken; *Gip4*, *Gip7* ve *StuAp* anlatım seviyeleri diğer alanda birlikte kümelendi. Rubrofusarin üretimi, bir kümeyi tek başına temsil etti. Pigment üretiminin moleküler analizinin gerçekleştirildiği izolatlara ait pigmentasyon profilleri heterojen dağılım gösterdi. (Şekil 4.22).



Şekil 4.22: Gen anlatımı, aurofusarin ve rubrofusarin biyosentezi ile çevre koşulları arasındaki ilişkiyi gösteren temel bileşen analizleri.

4.5. AUROFUSARİNİN ANTİMİKROBİYAL ETKİSİNİN ANALİZİ

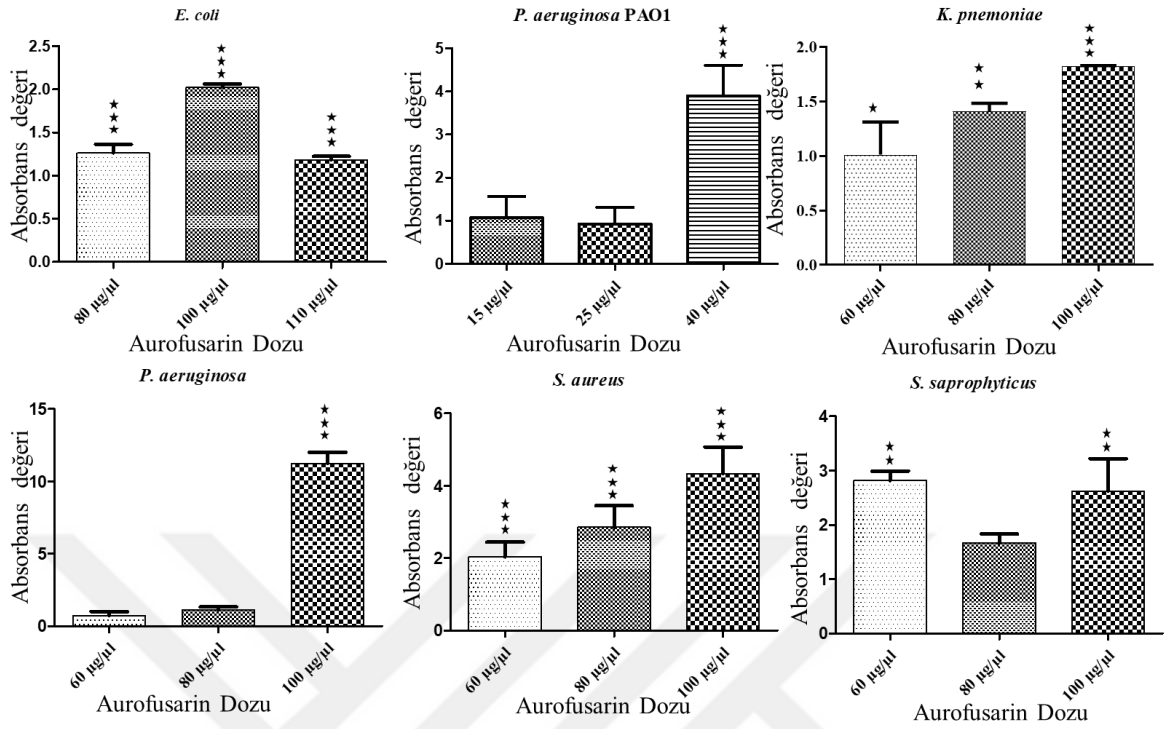
4.5.1 Aurofusarinin Bakteri Üremesi Üzerindeki İnhibitör Etkisine Ait Bulgular

Antibakteriyal analizlerin yapılması için ticari saf aurofusarin konsantrasyonu 1 µg/µl olacak şekilde DMSO'da çözündürüldü. Şekil 4.18'de verilen kalibrasyon diagramına göre yapılan hesaplamada 9F kültüründen DMSO ile hazırlanan ekstredeki aurofusarin konsantrasyonu 208 ng/µl olarak hesaplandı. Besi ortamına %11 (v/v) oranında eklenen DMSO'nun *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC15962) suşu üzerinde, %15 (v/v) oranındaki DMSO'nun diğer tüm bakteri suşlarında (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ATCC27853, *S. aureus*, *S. saprophyticus*) üremeyi inhibe ettiği belirlendiği için DMSO toplam hacmin %11'ini (v/v) geçmeyecek şekilde kullanıldı. Bu nedenle saf aurofusarinin üreme üzerindeki etkisinin araştırıldığı denemelerde, metabolitin konsantrasyonu *E. coli*'de en yüksek 110 µg/µl; diğer bakteri türlerinde ise 100 µg/µl olarak ayarlandı. Tablo 4.16'da, üreme üzerinde en fazla etkinin görüldüğü saf aurofusarin konsantrasyonları ve kültürlerin 24. saatlerinde alınan OD₆₀₀ ölçümleri ile % inhibisyon değerleri standart hatalarıyla birlikte verildi.

Tablo 4.16: Farklı konsantrasyonlarda saf aurofusarin içeren LB ortamında kültürlenene bakteri kültürlerine ait OD₆₀₀ ölçümleri ve % inhibisyon değerleri ve standart hataları.

	Konsantrasyon (µg/µl)=	0	15	25	40
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	$\bar{x}$ OD600=	1,251±0,03	1,038±0,03	0,973±0,03	0,041±0,00
	$\bar{x}$ % inhibisyon=		1,069±0,08	0,922±0,067	3,90±1,21
	Konsantrasyon (µg/µl)=	0	80	100	110
<i>E. coli</i>	$\bar{x}$ OD600=	0,928±0,01	0,497±0,03	0,186±0,00	0,072±0,03
	$\bar{x}$ % inhibisyon=		1,261±0,17	2,022±0,07	1,182±0,07
	Konsantrasyon (µg/µl)=	0	60	80	100
<i>K. pneumoniae</i>	$\bar{x}$ OD600=	1,013±0,09	0,731±0,04	0,41±0,00	0,157±0,00
	$\bar{x}$ % inhibisyon=	0	1,012±0,51	1,408±0,13	1,823±0,01
<i>P. aeruginosa</i>	$\bar{x}$ OD600=	0,873±0,00	0,414±0,1	0,332±0,01	0,117±0,03
	$\bar{x}$ % inhibisyon=	0	0,728±0,471	1,144±0,31	11,24±1,34
<i>S. aureus</i>	$\bar{x}$ OD600=	0,821±0,08	0,188±0,04	0,289±0,01	0,208±0,03
	$\bar{x}$ % inhibisyon=	0	1,597±0,13	2,41±0,44	3,667±0,19
<i>S. saprophyticus</i>	$\bar{x}$ OD600=	0,961±0,01	0,343±0,08	0,291±0,04	0,394±0,09
	$\bar{x}$ % inhibisyon=	0	2,817±0,29	1,673±0,28	4,751±0,3

Saf aurofusarinin 40 µg/µl'si *P. aeruginosa* PAO1 üremesini %3,9±1,21 inhibe etti ($p<0,001$). 15 µg/µl ve 25 µg/µl saf aurofusarin, üreme üzerinde anlamlı bir etki yaratmadı. *E. coli* üremesini metabolitin 80 µg/µl'si %1,261±0,17; 100 µg/µl'si %2,022±0,07 ve 110 µg/µl'si %1,182±0,07 inhibe etti ($p<0,001$). *K. pneumoniae* üremesi, aurofusarinin 60 µg/µl'sinde %1,012±0,51 ($p<0,05$); 80 µg/µl'sinde %1,408±0,13 ($p<0,01$) ve 100 µg/µl'sinde %1,823±0,01 ($p<0,001$) inhibe oldu. *P. aeruginosa* (ATCC 27853) üremesi ise sadece 100 µg/µl saf aurofusarin içeren ortamda anlamlı şekilde ($p<0,001$) inhibe oldu (11,24±1,34). *S. aureus*'u 60 µg/µl saf aurofusarin %1,597±0,13; 80 µg/µl saf aurofusarin %2,41±0,44 ve 100 µg/µl saf aurofusarin %3,667±0,19 inhibe etti ($p<0,001$). *S. saprophyticus* üremesi 60 µg/µl saf aurofusarin varlığında %2,817±0,29; 100 µg/µl saf aurofusarin ile %4,751±0,3 inhibe olurken ($p<0,001$) 80 µg/µl saf aurofusarin bakteri üremesini anlamlı şekilde inhibe etmedi (Şekil 4.23).



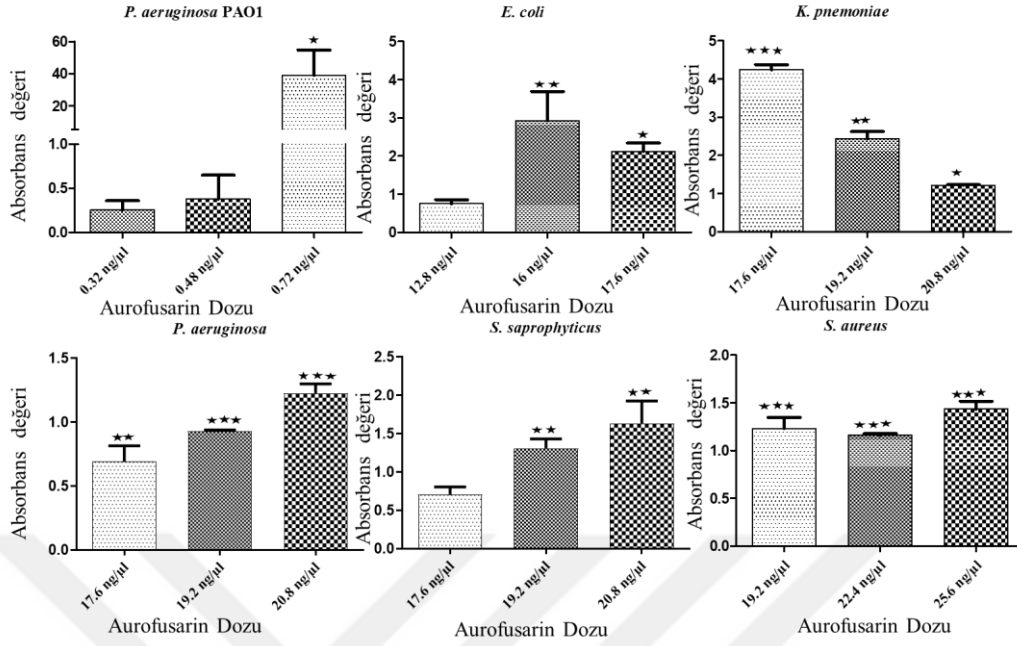
Şekil 4.23: Farklı konsantrasyonlarda ticari aurolfusarin içeren ortamlarda kültürlenene bakterilere ait % inhibisyon bulgularının istatistiksel analizi (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Barlar standart hataları temsil etmektedir.

Bakteri üretmesi üzerinde en yüksek inhibitör etkinin belirlendiği ekstrelerde bulunan aurolfusarin konsantrasyonları ile kültürlerin 24. saatteki OD₆₀₀ verileri ve % inhibisyon değerleri standart hatalarıyla birlikte Tablo 4.17’de verildi.

Tablo 4.17: Farklı konsantrasyonlarda aurofusarin ekstresi içeren LB ortamında kültürlenilen bakteri kültürlerine ait OD₆₀₀ ölçümleri ve % inhibisyon değerleri ve standart hataları.

	Konsantrasyon (ng/μl)=	0	0,32	0,48	0,72
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	$\bar{x}$ OD600=	1,251±0,04	1,194±0,06	1,17±0,12	0,009±0,00
	$\bar{x}$ % inhibisyon=	0	0,255±0,17	0,379±0,46	38,89±3,72
	Konsantrasyon (ng/μl)=	0	12,8	16	17,6
<i>E. coli</i>	$\bar{x}$ OD600=	0,928±0,02	0,676±0,05	0,056±0,00	0,072±0,01
	$\bar{x}$ % inhibisyon=		0,751±0,18	2,92±1,34	2,124±0,37
	Konsantrasyon (ng/μl)=	0	17,6	19,2	20,8
<i>K. pneumoniae</i>	$\bar{x}$ OD600=	1,013±0,01	0,479±0,03	0,378±0,03	0,31±0,03
	$\bar{x}$ % inhibisyon=	0	4,245±0,18	2,436±0,26	1,22±0,01
	Konsantrasyon (ng/μl)=	0	17,6	19,2	20,8
<i>P. aeruginosa</i>	$\bar{x}$ OD600=	0,873±0,01	0,635±0,1	0,367±0,01	0,396±0,03
	$\bar{x}$ % inhibisyon=	0	0,692±0,21	0,929±0,01	1,225±0,13
	Konsantrasyon (ng/μl)=	0	19,2	22,4	25,6
<i>S. saprophyticus</i>	$\bar{x}$ OD600=	0,821±0,03	0,508±0,04	0,29±0,09	0,357±0,05
	$\bar{x}$ % inhibisyon=	0	0,708±0,16	1,31±0,21	1,635±0,5
	Konsantrasyon (ng/μl)=	0	19,2	22,4	25,6
<i>S. aureus</i>	$\bar{x}$ OD600=	0,961±0,1	0,326±0,01	0,322±0,03	0,089±0,04
	$\bar{x}$ % inhibisyon=	0	1,233±0,19	1,161±0,02	1,434±0,14
	Konsantrasyon (ng/μl)=	0	19,2	22,4	25,6

P. aeruginosa PAO1 üremesini 0,72 ng/μl aurofusarin içeren ekstre %38,89±3,72 oranında anlamlı şekilde inhibe etti ($p<0,05$). 0,32 ve 0,48 ng/μl aurofusarin içeren ekstre üremeyi anlamlı şekilde etkilemedi. *E. coli* üremesini 16 ng/μl ve 17,6 ng/μl aurofusarin içeren ekstre sırasıyla %2,92±1,34 ($p<0,01$) ve %1,22±0,01 ($p<0,05$) inhibe etti. 12,8 ng/μl aurofusarin içeren ekstre ise üremeyi anlamlı şekilde inhibe etmedi. *K. pneumoniae* üremesi 17,6 ng/μl aurofusarin içeren ekstre varlığında %4,245±0,18 ($p<0,001$), 19,2 ng/μl'de 2,436±0,26 ($p<0,01$) ve 20,8 ng/μl'de %1,22±0,01 ($p<0,05$) inhibe oldu. *P. aeruginosa* (ATCC 27853) üremesi 17,6 ng/μl aurofusarin içeren ekstre varlığında %0,692±0,21 ($p<0,01$), 19,2 ng/μl aurofusarin ekstresinde %0,929±0,01 ($p<0,001$) ve 20,8 ng/μl ekstrede %1,225±0,13 ($p<0,001$) inhibe oldu. *S. saprophyticus* üremesi 19,2 ng/μl ve 20,8 ng/μl aurofusarin ekstresinde sırasıyla %1,31±0,21 ($p<0,01$) ve %1,635±0,5 ($p<0,01$) inhibe oldu. 17,6 ng/μl aurofusarin içeren ekstre üremeyi anlamlı şekilde inhibe etmedi. *S. aureus* üremesi üzerinde 19,2 ng/μl aurofusarin içeren ekstre %1,233±0,19 ($p<0,01$); 22,4 ng/μl aurofusarin %1,161±0,02 ($p<0,01$) ve 25,6 ng/μl aurofusarin %1,434±0,14 ($p<0,01$) inhibitör etkiye sahipti (Şekil 4.24).



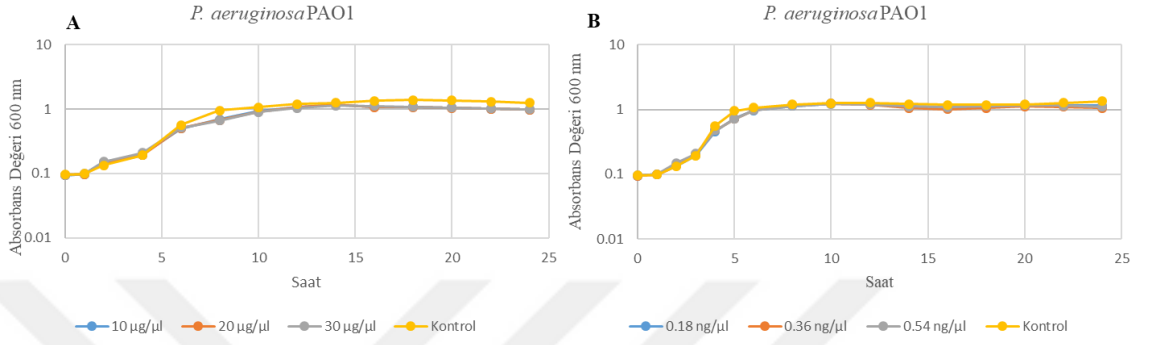
Şekil 4.24: Farklı konsantrasyonlarda aurolfusarin ekstresi içeren ortamlarda kültürlen bakterilere ait % inhibisyon bulgularının istatistiksel analizi (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Barlar standart hataları temsil etmektedir.

Saf aurolfusarin ve aurolfusarin ekstresinin hücre döngüsü ve proliferasyonu üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalara gram negatif türler arasından ise en yüksek inhibisyonun görüldüğü ve literatürde biyofilm analizinde yaygın olarak kullanılan *P. aeruginosa* PAO1 suşu ile devam edildi.

4.5.2. Üreme Eğrisi Analiz Bulguları

Aurolfusarinin 40 µg/µl'lik konsantrasyonu *P. aeruginosa* PAO1 üremesini anlamlı şekilde yavaşlatan en düşük dozdu. Bu dozun %25 (10 µg/µl), %50 (20 µg/µl) ve %75'ini (30 µg/µl) içeren ortamda kültürlen bakteriyeye ait üreme eğrisi grafiği Şekil 4.25(A)'da verildi. Aurolfusarinin 10, 20 ve 30 µg/µl konsantrasyonlarının logaritmik evreye geçişi etkilemediği, kontrol grubunda olduğu gibi deney gruplarındaki hücrelerin yaklaşık 3. saatte logaritmik evreye girmeleriyle gözlemlendi. Ancak en yüksek hücre sayısı artışı kontrol grubunda gerçekleşti. 0,72 ng/µl aurolfusarin içeren ekstre *P. aeruginosa* PAO1 üremesini en yüksek oranda (%38,89±3,72) anlamlı şekilde (p<0,5) inhibe eden dozdu. Bu dozun %25 (4.4 ng/µl), %50 (8.8 ng/µl) ve %75'ini (13.2 ng/µl) içeren ekstrede bulunan ortamda kültürlen *P. aeruginosa* PAO1'e ait üreme eğrisi grafikleri Şekil 4.25(B)'de verildi. Bulgular, bakteri

üremesinin kontrol ortamında en yüksek seviyede olduğunu ancak hücre döngüsü profilinin kontrol ve deney gruplarında birbirine çok yakın olduğunu ortaya koydu. Hücreler kontrol grubu ve ekstre içeren ortamlarda 3. saatten itibaren log fazına girdi ve bu faz yaklaşık 8. saate kadar sürdü. Hücreler 8. saatten itibaren durağan faza geçti.



Şekil 4.25: Saf aurofusarin (A) ve kültür ekstresinde (B) bulunan aurofusarinin üremeyi anlamlı şekilde yavaşlatan en düşük dozlarının %25, %50 ve %75'ini içeren ortamda üretilen *P. aeruginosa* PAO1 üreme eğrisi grafiği.

4.5.3. Proliferasyon Testi Bulguları

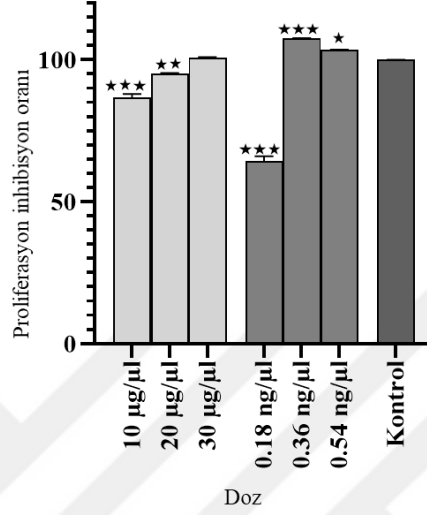
P. aeruginosa PAO1'in besi ortamında hareketli haldeki hücrelerine ait proliferasyonun belirlenmesine yönelik olarak 470 nm ve 620 nm'de ölçülen absorbans değerlerinin farkı standart hataları ile birlikte Tablo 4.18'de verildi. En yüksek absorbans değeri, farkı 0,36 ng/µl aurofusarin içeren ekstrenin bulunduğu ortamda üretilen bakteri kültüründe ölçüldü. En düşük absorbans değeri farkı ise 0,18 ng/µl aurofusarin içeren ekstrenin bulunduğu kültürden alındı (Tablo 4.18).

Tablo 4.18: LB besi ortamında çoğaltılan *P. aeruginosa* PAO1'e ait proliferasyonunun belirlenmesi amacıyla 470 nm ve 620 nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin farkına ait ham veriler ve standart hataları.

Saf Aurofusarin			Aurofusarin Ekstresi		
10 µg/µl	20 µg/µl	30 µg/µl	0,18 ng/µl	0,36 ng/µl	0,54 ng/µl
2,14±0,02	2,35±0,002	2,49±0,005	1,58±0,04	2,66±0,001	2,55±0,01

Proliferasyon 10 µg/µl ve 20 µg/µl saf aurofusarin içeren bakteri kültürlerinde kontrol grubundan anlamlı şekilde (sırasıyla $p < 0,001$ ve $p < 0,01$) düşüktü. 30 µg/µl saf aurofusarin içeren ortamda ise kontrol grubuyla aradaki proliferasyon farkı anlamsız bulundu. 0,18 ng/µl aurofusarin içeren ekstrenin bulunduğu ortamda proliferasyon kontrole göre düşük; 0,36

ng/μl’de ise kontrolden yüksek bulundu ($p<0,001$). Proliferasyon 0,54 ng/μl aurofusarin içeren ekstrede de kontrole göre yüksek bulundu ancak proliferasyon değeri 0,36 ng/μl’de belirlenenden daha düşüktü (Şekil 4.26).



Şekil 4.26: Saf aurofusarin ve aurofusarin ekstresi içeren LB besiyerinde üretilen bakterilerde proliferasyonun istatistiksel analizi (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). Barlar standart hataları temsil etmektedir.

4.5. BİYOFİLM KONTROL ANALİZLERİ

4.5.1. Biyofilm Kütle Analizi Bulguları

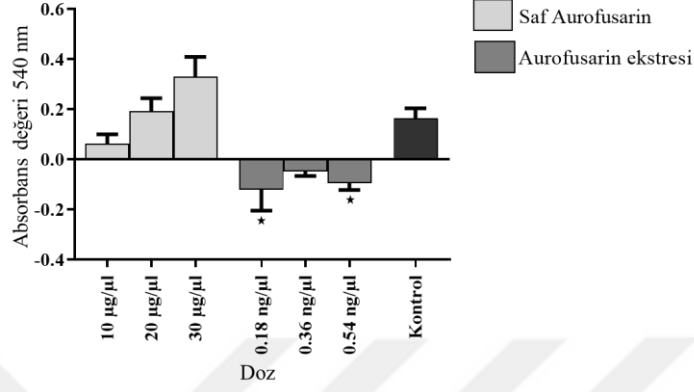
P. aeruginosa PAO1’in ürettiği biyofilm tabakasının belirlenmesi için 540 nm dalga boyunda alınan ve normalize edilen absorpsiyon değerleri standart hataları ile birlikte Tablo 4.19’da verildi.

Tablo 4.19: LB besi ortamında çoğaltılan PAO1 suşunun ürettiği biyofilm tabakasının belirlenmesi amacıyla 540 nm dalga boyundaki absorbans değerlerine ait ham veriler ve standart hataları.

Saf Aurofusarin			Aurofusarin Ekstresi		
10 μg/μl	20 μg/μl	30 μg/μl	0,18 ng/μl	0,36 ng/μl	0,54 ng/μl
0,0915±0,05	0,192±0,08	0,330±0,13	-0,121±0,14	-0,049±0,02	-0,095±0,04

En yüksek absorbans değeri (0,330±0,13) 30 μg/μl saf aurofusarin içeren besi ortamında, en düşük absorbans (-0,049±0,02) ise 0,36 ng/μl aurofusarin içeren ekstrenin bulunduğu ortamda kaydedildi. Aurofusarin ekstresi içeren deney grupları, DMSO ile oluşturulan normalizasyon

gruplarından daha düşük absorbans verdi. 0,18 ng/μl ve 0,54 ng/μl aurofusarin içeren ekstrelerin bulunduğu besi ortamıyla kurulan kültürlerdeki absorbans değişimleri anlamlı ($p<0,05$) oldu (Şekil 4.27).



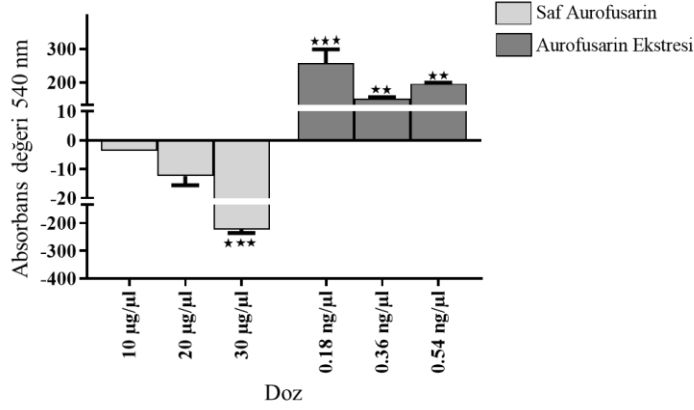
Şekil 4.27: *P. aeruginosa* PAO1 suşunun saf aurofusarin ve aurofusarin ekstresi içeren LB besi ortamında ürettiği biyofilmden dolayı kaydedilen absorbans değerlerine ait istatistiksel analizin grafikte gösterimi (* $p<0,05$). Barlar standart hataları temsil etmektedir.

Biyofilm tabakasının inhibisyonu Denklem 3.6'ya göre hesaplandı ve biyolojik tekrarlar için veriler standart hataları ile birlikte Tablo 4.20'de verildi.

Tablo 4.20: Saf aurofusarin, pigment ekstresi ve organik çözücülerini içeren ortamlarda PAO1 suşunun ürettiği biyofilm tabakasının kütle miktarına ait yüzde değerleri ve standart hataları.

Saf Aurofusarin			Aurofusarin Ekstresi		
10 μg/μl	20 μg/μl	30 μg/μl	0,18 ng/μl	0,36 ng/μl	0,54 ng/μl
-3,696±0,00	-12,401±4,47	-222,955±17,9	257,519±18,9	152,242±5,59	196,569±3,35

30 μg/μl saf aurofusarin biyofilm oluşumunu %222,955 oranında anlamlı şekilde indükledi ($p<0,001$). 10 μg/μl ve 20 μg/μl saf aurofusarinin ise biyofilm oluşumunda anlamlı bir etkiye sahip olmadı. 0,18 ng/μl aurofusarin içeren ekstre biyofilm oluşumunu %257,519±18,9 ($p<0,001$); 0,36 ng/μl aurofusarin %152,242±5,59 ($p<0,01$) ve 0,54 ng/μl aurofusarinine sahip ekstre ise biyofilmi %196,569±3,35 ($p<0,01$) oranında inhibe etti (Şekil 4.28).



Şekil 4.28: *P. aeruginosa* PAO1 suşunun saf aurofusarin ve pigment ekstresi içeren besi ortamlarında ürettiği biyofilm inhibisyon yüzdelerinin istatistiksel analizinin grafikte gösterimi. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Barlar standart hataları temsil etmektedir.

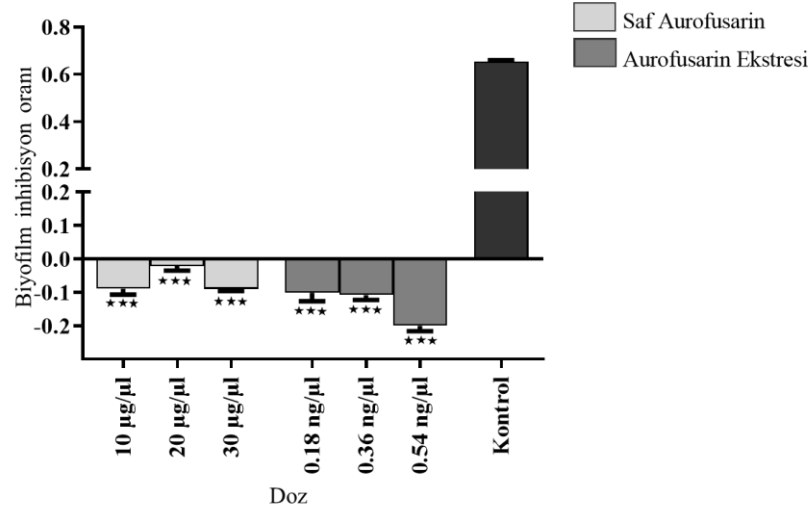
4.5.2. Biyofilm Metabolik Aktivite Analiz Bulguları

Saf aurofusarin ve aurofusarin ekstresi içeren ortamda üretilen bakteri hücrelerin metabolik aktivitelerinin normalizasyon gruplarına göre daha düşük olduğu absorbans verileriyle ortaya kondu (Tablo 4.21).

Tablo 4.21: LB besi ortamında çoğaltılan *P. aeruginosa* PAO1 suşunun ürettiği biyofilm tabakasındaki metabolik aktivitenin belirlenmesi amacıyla 540 nm dalga boyundaki absorbans değerlerine ait ham veriler ve standart hataları.

Saf Aurofusarin			Aurofusarin Ekstresi		
10 µg/µl	20 µg/µl	30 µg/µl	0,18 ng/µl	0,36 ng/µl	0,54 ng/µl
-0,089±0,02	-0,021±0,01	-0,0905±0,00	-0,101±0,03	-0,108±0,02	-0,200±0,02

10 µg/µl, 20 µg/µl ve 30 µg/µl saf aurofusarin ile 0,18 ng/µl, 0,36 ng/µl ve 0,54 ng/µl aurofusarin içeren ekstrenin bulunduğu ortamda kültürlenmiş hücrelerde belirlenen metabolik aktivitedeki azalma anlamlı ($p < 0,001$) bulundu (Şekil 4.29).



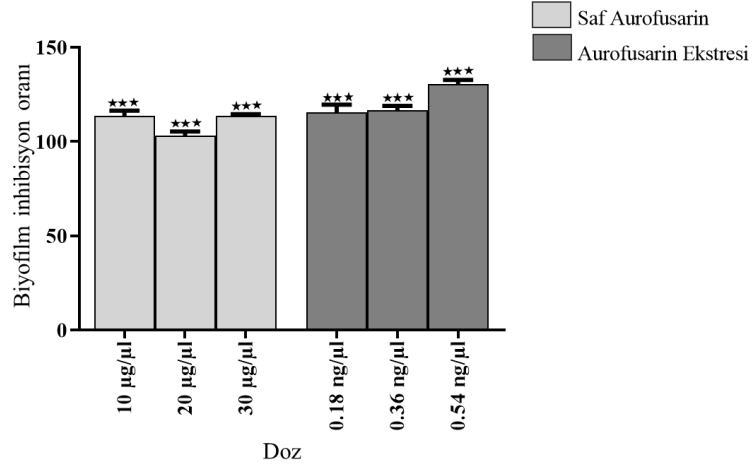
Şekil 4.29: *P. aeruginosa* PAO1 suşunun saf aurofusarin ve aurofusarin ekstresi içeren LB besi ortamında ürettiği biyofilmdeki hücrelerin metabolik aktivitelerinden dolayı kaydedilen absorbans değerlerine ait istatistiksel analizin grafikte gösterimi (*** $p < 0,001$). Barlar standart hataları temsil etmektedir.

Biyofilmdeki metabolik aktivite inhibisyonu Denklem 3.7'ye göre hesaplandı ve biyolojik tekrarlar için veriler standart hataları ile birlikte Tablo 4.22'de verildi.

Tablo 4.22: Saf aurofusarin, pigment ekstresi ve organik çözücülerini içeren ortamlarda PAO1 suşunun ürettiği biyofilm tabakasının kütle miktarına ait yüzde değerleri ve standart hataları.

Saf Aurofusarin			Aurofusarin Ekstresi		
10 µg/µl	20 µg/µl	30 µg/µl	0,18 ng/µl	0,36 ng/µl	0,54 ng/µl
113,609±4,03	103,19±2,98	113,811±1,03	115,526±5,67	116,582±3,3	130,594±3,01

10 µg/µl saf aurofusarin metabolik aktiviteyi %113,609±4,03; 20 µg/µl aurofusarin %103,19±2,98 ve 30 µg/µl aurofusarin %113,811±1,03 oranında inhibe etti ($p < 0,001$). 0,18 ng/µl aurofusarin içeren ekstre metabolik aktiviteyi %115,526±5,67; 0,36 ng/µl aurofusarin %116,582±3,3 ve 0,54 ng/µl aurofusarin ise %130,594±3,01 oranında inhibe etti ($p < 0,001$) (Şekil 4.30).



Şekil 4.30: *P. aeruginosa* PAO1 suşunun saf aurofusarin ve aurofusarin ekstresi içeren besi ortamlarında üretilen biyofilm metabolik aktivite inhibisyonunun istatistiksel analizinin grafikte gösterimi (*** p<0,001). Barlar standart hataları temsil etmektedir.

4.6. BİYOFİLM OLUŞUMUNDA QS ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

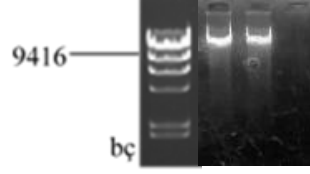
4.6.1. Genomik Analiz Bulguları

Aurofusarin biyosentezinden sorumlu enzimleri şifreleyen genlerin anlatım profillerinin belirlenmesinde kullanılacak primer molekülleri 3.3.9’da anlatıldığı şekilde tasarlandı ve hizmet alımıyla IDT firmasına sentezlettirildi (Tablo 4.23).

Tablo 4.23: Gen anlatımı analizinde kullanılan primer molekülleri.

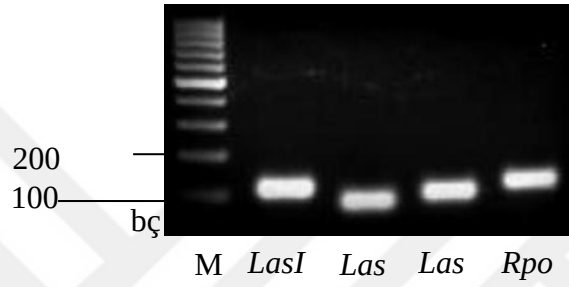
Gen	Primer	Primer Dizisi 5'-3'	Ürün Boyutu (bp)
<i>RpoB</i>	İleri	GAAATGGCCGAGAACCAGT	117
	Geri	CTTGGCGTTGATCAGGTCTT	
<i>LasI</i>	İleri	TGACGCACTCAGTCCTTATTAC	113
	Geri	AGGTGTTCTTCAGCATGTAGG	
<i>LasB</i>	İleri	GGAATGAACGAAGCGTTCTC	99
	Geri	GCCCTTCTTGATGTCGTAGC	
<i>LasR</i>	İleri	AACCGTCCATCTACCAGACG	82
	Geri	ATGGTCAGCCCATACACCAG	

16 saat süreyle üretilen kültürlerden izole edilen genomik DNA molekülünün miktarı 600 µg/ml olarak hesaplanırken saflık değerlerinin (OD₂₆₀/OD₂₈₀) 1,8 olduğu belirlendi (Şekil 4.34).



Şekil 4.31: *P. aeruginosa* PAO1 suşuna ait genomik DNA'nın agaroz jel elektroforez görüntüsü. Standart DNA: λ HindIII (Thermo, ABD).

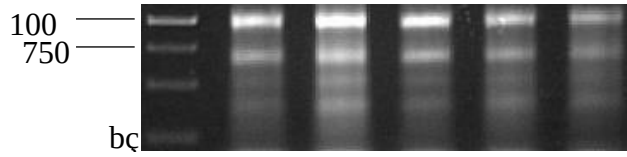
PZR ile *LasI* geninden 113 bç, *LasR* geninden 82 bç, *LasB* geninden 99 bç ve *RpoB* geninden 117 bç'lik beklenen ampikonlar elde edildi (Şekil 4.32).



Şekil 4.32: Özgün primerlerle *P. aeruginosa* PAO1 genomundan çoğaltılan *LasI*, *LasB*, *LasR* ve *RpoB* genlerine ait PZR ürünleri. M: 100 bp standart DNA (Thermo, ABD).

4.6.2. Transkriptom Analiz Bulguları

Farklı ortam koşullarında üretilen ve farklı miselyum rengine sahip 3-7 günlük izolatlardan izole edilen total RNA moleküllerinin miktarları 200-1000 μ g/ml aralığında ölçülürken, saflık değerleri ($O.D_{260}/O.D_{280}$) ise 2.00 olarak hesaplandı. Şekil 4.33, total RNA moleküllerinin agaroz jel görüntüsünü vermektedir.



Şekil 4.33: *P. aeruginosa* PAO1 suşundan izole edilen total RNA moleküllerinin agaroz jel görüntüsü. M: 1 kb standart DNA (Thermo, ABD).

4.6.2.1. QS Genlerinin Cp Değerlerine Ait Veriler

Bütün izolatlarda hedef genler ve *RpoB* geninin Cp değerleri belirlendi ve standart hataları ile birlikte Tablo 4.25'de verildi. *RpoB*'nin Cp değerleri dg-1'de $16,21 \pm 0,11$ - $19,82 \pm 0,31$; ng-1'de $16,17 \pm 0,89$ - $26,82 \pm 0,05$; dg-2'de $16,37 \pm 0,41$ - $26,25 \pm 0,06$; ng-2'de ise $16,52 \pm 0,03$ -

26,38±0,06 değer aralığındaydı. *LasB* genine ait Cp değerleri dg-1’de 21,12±0,31 - 23,87±0,08; ng-1’de 23,84±0,11 - 28,49±1,61; dg-2’de 20,70±1,30 - 25,20±0,32; ng-2’de ise 27,84±0,18 – 20,82±1,20 değerleri arasındaydı. *LasI* genine ait Cp değerleri dg-1’de 16,82±0,12 - 20,90±0,00; ng-1’de 19,54±0,27 – 24,90±0,05; dg-2’de 17,48±0,06 - 21,61±0,61; ng-2’de 17,34±0,12 – 24,06±0,02 aralığında hesaplandı. *LasR* genine ait Cp değerleri dg-1’de 17,62±0,12 - 21,56±0,17; ng-1’de 20,96±1,40 - 26,07±0,01; dg-2’de 18,02±0,23 - 24,33±0,24; ng-2’de ise 17,78±0,04 – 24,77±0,15 aralığında belirlendi (Tablo 4.24).

Tablo 4.24: QS’den sorumlu genlere ait $\sum$ Cp değerleri ve standart hataları (dg-1 aurofusarin; dg-2 aurofusarin ekstresi ile hazırlanan deney grupları; ng-1 ve ng-2 DMSO ile hazırlanan normalizasyon grupları).

Aurofusarin ve DMSO Konsantrasyonu			<i>RpoB</i>	<i>LasB</i>	<i>LasI</i>	<i>LasR</i>
dg-1	dg1.10	10 µg/µl	19,81±0,27	23,87±0,08	20,73±0,04	21,50±0,78
	dg1.20	20 µg/µl	19,82±0,31	24,87±0,82	20,90±0,00	21,56±0,17
	dg1.30	30 µg/µl	16,21±0,11	21,12±0,31	16,82±0,12	17,62±0,12
ng-1	ng1.10	%10 (v/v)	16,17±0,89	23,84±0,97	19,54±0,27	20,96±1,40
	ng1.20	%20 (v/v)	26,82±0,05	28,49±1,61	24,90±0,05	26,07±0,01
	ng1.30	%30 (v/v)	26,53±0,09	27,88±0,01	23,35±0,05	25,50±0,05
dg-2	dg2/18	0.18 ng/µl	16,37±0,41	20,70±1,30	17,48±0,06	18,02±0,23
	dg2/36	0.36 ng/µl	19,07±0,03	23,60±0,21	19,43±0,11	19,95±0,01
	dg2/54	0.54 ng/µl	26,25±0,06	25,20±0,32	21,61±0,61	24,33±0,24
ng-2	ng2/18	%18 (v/v)	19,07±1,69	24,56±0,23	20,42±0,04	21,30±0,05
	ng2/36	%36 (v/v)	26,38±0,06	27,84±0,18	24,06±0,02	24,77±0,15
	ng2/54	%54(v/v)	16,52±0,03	20,82±1,20	17,34±0,12	17,78±0,04

4.6.2.2. Rölatif Kantitasyon Verileri

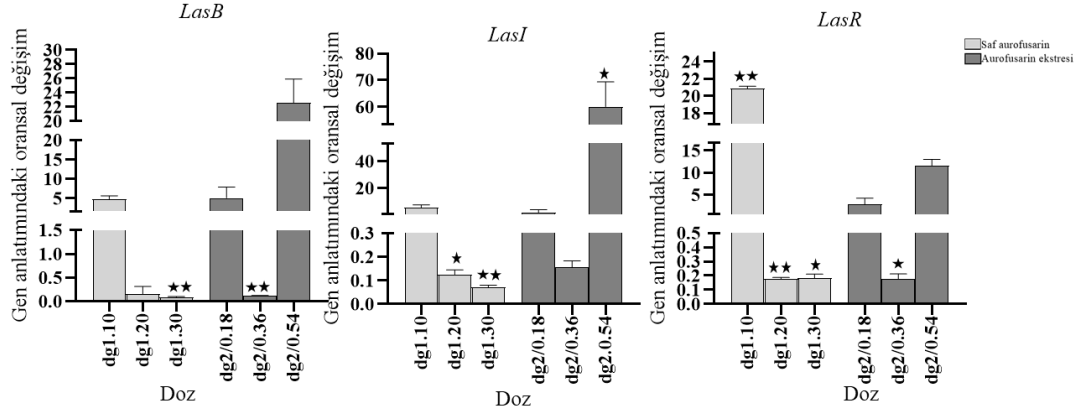
LasB, *LasI* ve *LasR* genleri, *RpoB* ile karşılaştırıldığında en yüksek gen anlatımı *LasI* geninde ng1.30’da (9,09E+00) belirlendi. En düşük gen anlatımı ise *LasB* geninde dg2/32’de (6,86E-02) bulundu. *LasB*, *RpoB*’ye göre dg2/72 hariç diğer tüm gruplarda down-regülasyon ile kontrol edildi. *LasI* ve *LasR* genleri ise *RpoB*’ye göre ng1.20, ng1.30, dg2/72, ve ng2/48 gruplarından up-regülasyon; diğer gruplarda ise down regülasyon ile kontrol edildi (Tablo 4.25).

Tablo 4.25: QS'den sorumlu genlere ait $2^{-\Delta Ct}$ değerleri QS'den sorumlu genlere ait $\sum Cp$ değerleri (dg-1 aurofusarin; dg-2 aurofusarin ekstresi ile hazırlanan deney grupları; ng-1 ve ng-2 DMSO ile hazırlanan normalizasyon grupları).

Aurofusarin ve DMSO Konsantrasyonu			<i>LasB</i>	<i>LasI</i>	<i>LasR</i>
dg-1	dg1.10	10 µg/µl	6,04E-02	8,44E-01	3,55E-01
	dg1.20	20 µg/µl	3,11E-02	4,79E-01	3,00E-01
	dg1.30	30 µg/µl	3,39E-02	6,53E-01	3,78E-01
ng-1	ng1.10	% 10 (v/v)	7,10E-03	1,13E-01	6,15E-02
	ng1.20	% 20 (v/v)	4,25E-01	3,78E+00	1,67E+00
	ng1.30	% 30 (v/v)	3,94E-01	9,09E+00	2,04E+00
dg-2	dg2/18	0.18 ng/µl	6,86E-02	4,71E-01	3,20E-01
	dg2/36	0.36 ng/µl	4,35E-02	7,82E-01	5,44E-01
	dg2/54	0.54 ng/µl	2,09E+00	2,65E+01	3,85E+00
ng-2	ng2/18	% 18 (v/v)	2,82E-02	5,44E-01	2,98E-01
	ng2/36	% 36 (v/v)	3,67E-01	5,01E+00	3,09E+00
	ng2/54	% 54 (v/v)	5,96E-02	5,69E-01	4,18E-01

4.7.1. qPZR Sonuçlarının İstatistiksel Analiz Bulguları

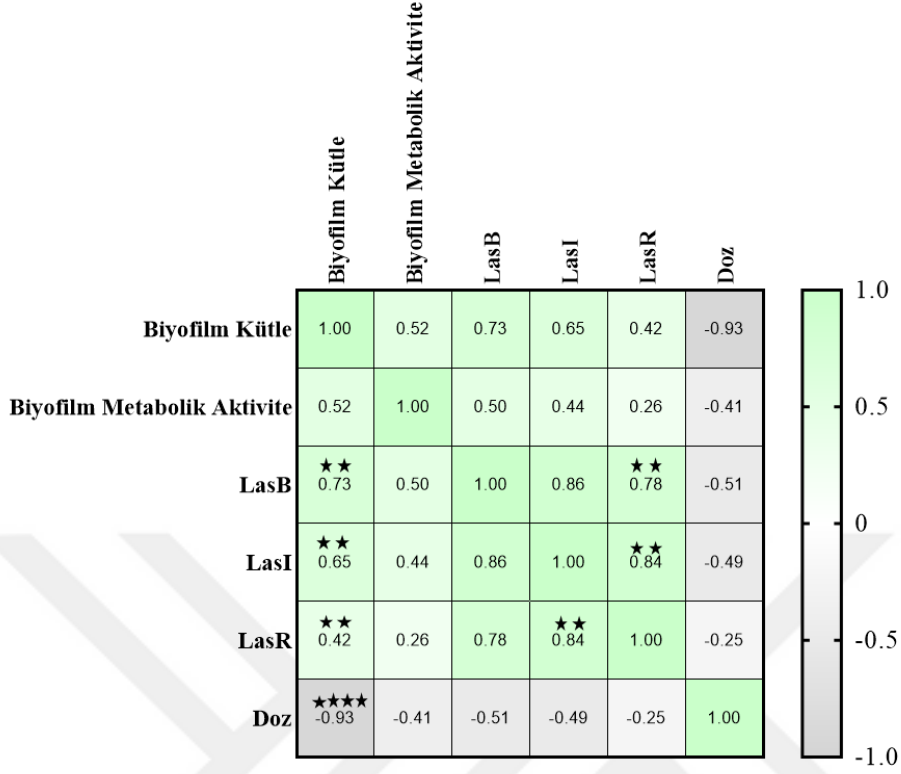
10 µg/µl saf aurofusarin *LasB* anlatımında kontrole göre yaklaşık 5 kat artışa, 20 µg/µl ise gen anlatımında 5 kat azalmaya neden oldu ancak bu değişimler anlamlı bulunmadı. 30 µg/µl aurofusarin içeren ortamda ise anlatım yaklaşık 11 kat azaldı ($p < 0,01$). 0,32 ng/µl ve 0,72 ng/µl aurofusarin ekstresi içeren besi yerinde *LasB* anlatımındaki artışlar anlamsızken 0,48 ng/µl'de belirlenen yaklaşık 10 katlık azalma anlamlıydı ($p < 0,01$). *LasI* anlatımında saf aurofusarinin 10 µg/µl'sindeki artış anlamsız; 20 µg/µl'de belirlenen 10 katlık ($p < 0,05$) ve 30 µg/µl'deki 15 katlık ($p < 0,01$) azalma anlamlıydı. 0,18 ng/µl aurofusarin içeren ekstre *LasI* anlatımında yaklaşık 60 kat artışa neden oldu ($p < 0,05$). 0,36 ng/µl ve 0,548 ng/µl gen anlatımını anlamlı şekilde değiştirmede. *LasR* anlatımını 10 µg/µl saf aurofusarin 10 kat artırdı ($p > 0,01$). Gen anlatımında 20 µg/µl ve 30 µg/µl saf aurofusarinin neden olduğu yaklaşık 10 katlık azalmalar da anlamlı bulundu (sırasıyla $p < 0,01$ ve $p < 0,05$). *LasR* anlatımı üzerinde 0,36 ng/µl aurofusarin içeren ekstrenin neden olduğu 10 katlık azalma anlamlı bulunurken ($p < 0,05$); 0,18 ng/µl ve 0,54 ng/µl aurofusarinin neden olduğu kat artışları anlamlı bulunmadı (Şekil 4.34).



Şekil 4.34: QS gen anlatımındaki kontrole göre gen anlatım değişimlerinin istatistiksel analizi. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Barlar standart hataları temsil etmektedir.

4.7. GEN ANLATIMI VE BİYOFİLM ARASINDAKİ İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNE YÖNELİK BULGULAR

Spearman analizi aurofusarin dozu ve biyofilm oluşumu arasında şiddetli bir negatif korelasyon olduğunu gösterdi ($r = -0,93$). Biyofilm kütlesi ile *LasB* ve *LasI* anlatımı arasında yüksek pozitif korelasyon ($r = 0,73$ ve $r = 0,65$); *LasR* anlatımı ile orta şiddetle pozitif korelasyon ($r = 0,42$) bulundu. Biyofilmdeki metabolik aktivite ile uygulanan aurofusarin dozu ve gen anlatımı arasında anlamlı ilişki kurulamadı. *LasB* ile *LasR* anlatımı arasında ($r = 0,78$) ve *LasI* ile *LasR* arasında ($r = 0,84$) yüksek pozitif korelasyon belirlendi (Şekil 4.35).



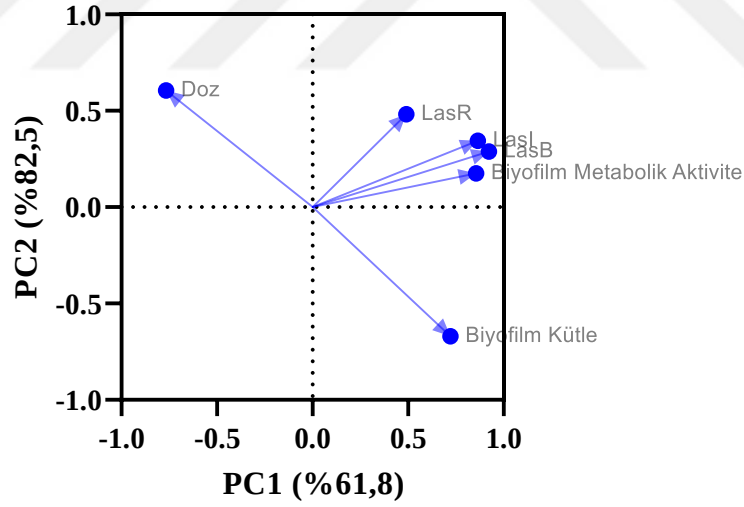
Şekil 4.35: QS gen anlatımı, aurofusarin, biyofilm oluşumu ve biyofilm metabolik aktivite analizi arasındaki ilişkiyi gösteren Spearman r değerleri (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) tabloda istatistiksel olarak anlamlı ilişki belirlenen ikili grupta sadece birinde yıldız işareti kullanılmıştır.

Verilerin temel bileşen analizinde (PCA), ilk iki temel bileşen varyasyonların sırasıyla %61,28 ve %21,31'ini oluşturdu. PC1 toplam varyasyon %61,28'ini açıkladı ve biyofilm metabolik aktivite (0,85), *LasB* anlatımı (0,92) ve *LasI* anlatımı (0,86) pozitif korelasyonları temsil etti. Aurofusarin dozu ise negatif korelasyonu (-0,76) temsil etti. PC2 toplam varyasyon %21,31'ini açıkladı ve aurofusarin dozu pozitif korelasyonu (0,60), biyofilm kütlesi ise negatif korelasyonu (-0,67) temsil etti (Tablo 4.26).

Tablo 4.26: Biyofilm analizinde temel bileşenlerdeki (PC) varyasyon değerleri.

	Temel Bileşenler	
	PC1	PC2
Öznitelik katsayısı	3.677	1.278
Varyans Oranı	61.28%	21.31%
Kümülatif Varyans Oranı	61.28%	82.59%
	Öznitelik Değerleri	
	PC1	PC2
Biyofilm Kütle	0.72	-0.67
Biyofilm Metabolik Aktivite	0.85	0.17
<i>LasB</i>	0.92	0.28
<i>LasI</i>	0.86	0.34
<i>LasR</i>	0.49	0.48
Doz	-0.76	0.60

Biyofilm metabolik aktivite verileri ile *LasB*, *LasI* ve *LasR* anlatımı bir arada kümelendi. Aurofusarin dozu ve biyofilm kütlesi ise farklı kümelerde tek başına bulundu (Şekil 4.36).

**Şekil 4.36:** QS gen anlatımı, aurofusarin, biyofilm oluşumu ve biyofilm metabolik aktivite analizi arasındaki ilişkiyi gösteren temel bileşen analizleri.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doktora tez çalışmasında, *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarında ortam koşullarının neden olduğu miselyum renklenmesindeki değişimlerin moleküler analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, aurofusarin biyosentez kümesinde yer alan gen hedefleri ve transkriptleri PZR temelli yöntemler aracılığıyla belirlenmiş biyosentez yolunun son ürünü olan aurofusarin ve öncülü rubrofusarin üretimi ise HPLC analizi ile ortaya konmuştur. Aynı zamanda aurofusarinin antimikrobiyal etkisi altı farklı referans bakteri suşu (*P. aeruginosa* PAO1 ATCC 15962, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 13833, *S. saprophyticus* DM17 ve *S. aureus* ATCC 25923) üzerinde test edilerek, biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi ise *P. aeruginosa* PAO1 suşunda araştırılmıştır.

Aurofusarin ve öncül metabolitleri, *F. graminearum* ve *F. culmorum*'un da dahil olduğu çok sayıda *Fusarium* türü tarafından sentezlenen, sırasıyla kiremit kırmızısı ve sarı tonlarında pigmentasyona sahip sekonder metabolitlerdir (Kim ve diğ., 2005; Malz ve diğ., 2005; Frandsen ve diğ., 2006; Jin ve diğ., 2010; Frandsen ve diğ., 2011; Frandsen ve diğ., 2016). İzole edilerek saflaştırılmış *Fusarium* türüne ait bir izolat farklı ortam koşullarında farklı miselyum pigmentasyonuna sahip olabilmekle birlikte aynı türe ait farklı izolatlar aynı ortam koşullarında bile farklı pigmentasyon sergileyebilmektedir. Aurofusarin biyosentez yolağı ile yapılan çalışmalarda, yolağın farklı aşamalarından sorumlu enzimleri kodlayan, genomda gen kümesi halinde bulunan genlerin işlevlerinin aydınlatılması hedeflenmiş, *F. graminearum* genomunda yolağa ait modelleme tekli ve/veya ikili delesyon mutantları elde edilerek yapılmıştır. Farklı araştırma gruplarının, mutantları elde ederek gerçekleştirdikleri çalışmalarında, delesyona uğratılan genin yolaktaki işlev sırasına bağlı olarak farklı miselyum renklerine sahip oldukları rapor edilmiştir (Kim ve diğ., 2005; Kim ve diğ., 2006; Frandsen ve diğ., 2006; Frandsen ve diğ., 2010). Westphal ve diğ. (2018), *F. graminearum*'da aurofusarin gen kümesinde bulunan ve yolak özgün transkripsiyon faktörünü şifreleyen *Gip2* geninin anlatım seviyesini arttırdıkları çalışmalarında, mutantlarda gen anlatımındaki artışın, sentezlenen aurofusarinin artışına yol açarak pigmentasyonu etkilediğini göstermişlerdir. Ancak aurofusarin üretimine yönelik elde edilen mutantlarla yapılan çalışmalarda, gen anlatımı seviye değişimlerinin miselyum renklenmesi üzerindeki etkisi araştırılmamıştır (Kim ve diğ., 2006; Frandsen ve diğ., 2006; Frandsen ve diğ., 2010; Lysøe ve diğ., 2011). Doktora tez çalışmasında ise farklı kültürleme koşullarında hem *F. graminearum* hem de *F. culmorum*'da aurofusarin biyosentez genlerinden

Pks12, *Gip6*, *Gip7* ve *Gip4* ile aurofusarin biyosentez yolağının düzenlenmesinde işlevsel olan genel transkripsiyon faktörünü şifreleyen *StuAP* geninin anlatım seviye değişimleri qPZR yaklaşımı kullanılarak incelenmiş ve hücrede sentezlenen aurofusarin ile rubrofusarin miktarı HPLC yöntemi ile belirlenmiştir. Bu kapsamda öncelikle, kültür koleksiyonunda yer alan 47 *F. graminearum* ve 24 *F. culmorum* izolatu 25°C’de (pH 5,6) kültürlenmiş ve kararlı pigment üreten izolatları taranmıştır. Seçilen izolatlar farklı kültürlenme koşullarında üretilerek aurofusarin biyosentezinden sorumlu enzimleri şifreleyen hedef genlerin anlatım seviye değişimleri araştırılmıştır. Gen anlatımı çalışmalarında pigmentasyondan sorumlu biyokimyasal yolaktaki özgün genler *F. graminearum*’a ait dizilim verileri temel alınarak ilk defa *F. culmorum* genomunda araştırılarak varlığı ortaya konmuştur. *Pks12*, *Gip6*, *Gip7* ve *StuAp*’nin kısmi fragmentlerine ait nükleotid dizi bilgisi, 7F (*F. graminearum*) ve 9F (*F. culmorum*) genomlarından çoğaltılan PZR ürünlerinden elde edilmiştir. Çoğaltılan genlere ait nükleotid dizilimleri NCBI’ya kayıtlı FcUK99 (*F. culmorum*) ve PH-1 (*F. graminearum*) referans genomlarıyla hizalanmış ve genlerin kısmi bölgelerinde tekli ikili hatta üçlü in-del bölgelerinin varlığı belirlenmiştir. Fragmentlerdeki SNP’lerin ise daha yaygın olduğu gösterilmiştir. *Pks12* geninde referans genoma kıyasla *F. graminearum*’da %20,3; *F. culmorum*’da ise %13,4 nükleotid çeşitliliği gözlenmiştir. *Gip7* genindeki çeşitlilik oranı *F. graminearum*’da %15,2; *F. culmorum*’da %16,2 iken bu oran *Gip4* geninde *F. graminearum* ve *F. culmorum* için sırasıyla %11 ve %35,6 olarak hesaplanmıştır. Tarla izolatlarında belirlenen bu varyasyonların genlerin işlevlerini etkilemedikleri bu izolatlarda üretilen aurofusarin ve rubrofusarinin HPLC analizi ile gösterilmesi ile ortaya konmuştur. *Gip6* genine ait kısmi fragment, F1 izolatu hariç tüm izolatların genomlarından çoğaltılabilmektedir. Ancak, 7F izolatından elde edilen ürünün yetersiz olması dizi analizini olumsuz etkilemiştir. 9F izolatının genomundan çoğaltılan kısmi fragment ise gen bankasına kayıtlı referans genoma (FcUK99) ait verilerle yüksek benzerlik sergilemiştir (%99,4). Hücrede spor oluşumu, patojenite, mikotoksin ve aurofusarin biyosentezi gibi pek çok sürecin düzenlenmesinde görevli olan genel transkripsiyon faktörünü şifreleyen *StuAp*’nin dizisinin *F. graminearum* izolatlarında yüksek benzerlik (%99,4) gösterdiği, *F. culmorum*’da ise bu dizilerin identik (%100) olduğu, yani tüm izolatlarda aynı nükleotid diziliminin taşındığı gösterilmiştir. Liu ve diğ. (2008), hücrede önemli yapısal ve işlevsel fonksiyonları olan proteinlerde, negatif seleksiyon baskısının sonucu olarak, evrimsel süreçte az sayıda amino asit değişimi gerçekleştiğini bildirmiştir. *StuAp* proteini de hücrede spor oluşumu, patojenite ve sekonder metabolizmayla ilişkili gen

anlatımının regülasyonu gibi birden fazla süreci kontrol eden bir genel transkripsiyon faktörüdür (Lysøe ve diğ., 2011). Bu nedenle, *StuAp*'deki yüksek dizi benzerliğinin, negatif seleksiyon baskısının sonucu olarak, daha az mutasyon birikmiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. *F. graminearum* tür kompleksinde, gen dizisinde gerçekleşen varyasyonların tolere edilebildiği ve varyasyonların gen işlevini etkilemediği, ancak *F. culmorum*'da varyasyonların tolere edilemediği ve negatif seleksiyon baskısı nedeniyle gen diziliminin identik olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmada kullanılan diğer izolatlardan 3F'de yalnızca *Gip6* ve *StuAp*; F1'de ise yalnızca *Gip7* ve *StuAp* genleri çoğaltılabilmektedir. Dünya genelinde farklı coğrafik bölgelerden saflaştırılan *F. graminearum* izolatları ile gerçekleştirilen çoklu lokus DNA dizilmesi ve moleküler markır temelli çalışmalar, *F. graminearum*'un filogenetik olarak birbirinden ayrılmış çok sayıda kladdan oluştuğunu ve tür kompleksi olduğunu ortaya koymuştur. Yli-Mattila ve diğ. (2009) ve Albayrak ve diğ. (2016) genotiplendirme çalışmalarında belirledikleri tür içi varyasyonun tür kompleksi üyelerinden kaynaklandığını vurgulamışlardır. Bununla birlikte, Yörük ve Albayrak (2009) ile Yörük ve diğ. (2016) gerçekleştirdikleri moleküler markır çalışmalarıyla Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilerek saflaştırılan *F. graminearum* ve *F. culmorum* türlerine ait izolatlar arasındaki genetik varyasyonun da %80'den daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Stadhouders ve diğ. (2010) PZR yöntemi için tasarlanan primerlerin hedef bağlanma bölgelerindeki olası varyasyonlar nedeniyle termal döngüler sırasında primer-hedef zincir kompleksinin kararlılığının bozulmasına ve reaksiyon etkinliğinin düşmesine yol açtığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada, 3F ve F1 izolatlarına ait genomik DNA'dan genlerin çoğaltılamamasının ve 7F genomundan *Gip6*'ya ait olan kısmi fragmentten yeterli ürün elde edilememesinin nedenlerinden bir tanesinin, Stadhouders ve diğ. (2010)'nin vurguladığı primer bağlanma bölge varyasyonları olabileceği düşünülmektedir. Doktora tez çalışma çıktıları Lind ve diğ. (2017)'nin, fungal sekonder metabolizmayla ilişkili genlerle yaptıkları karşılaştırmalı çalışmalarında, sekonder metabolizmaya ait gen kümelerinin yüksek derecede divergent olduğunu ve genler arasında çok sayıda nükleotid varyasyonunun taşınabildiğini bildirmeleri ile uyumlu bulunmuştur.

Bu çalışmada, KG'de mor, DG1 ve DG2'de yavruağzı, DG3'de ise sarı pigmentasyon sergileyen 3F izolatı ile DG1, DG2 ve DG3'de ise yavruağzı pigmentasyona sahip F1 izolatlarının bu ortam koşulunda aurofusarin üretmediği, yalnızca rubrofusarin

sentezleyebildiği HPLC analizleri ile belirlenmiştir. Bu izolatlarda yavruğazı pigmentasyonun rubrofusarin sentezi ile ilişkili olduğu PCA analizinde rubrofusarinin yavruağzı pigmentasyon ile bir arada kümelenmesiyle desteklenmiştir. Bununla birlikte KG şartlarında beyaz miselyumlara sahip olan F1'in rubrofusarin üretmediği belirlenmiştir. Çalışmada kapsamında 3F ve F1 izolatlarında, PZR ürünü elde edilememesine başlangıçta primer bağlanma bölgelerindeki mutasyonların neden olduğu düşünülmüş ve *Pks12*, *Gip6* ve *Gip7* genlerinin çoğaltımı için yeniden primer tasarlanmıştır. Ancak ikinci defa tasarlanan primerlerle de çoğaltım gerçekleştirilememiştir. İzolatlarda HPLC ile rubrofusarin belirlenmesine rağmen genlerin PZR ile çoğaltılamaması, null alel olasılığından ziyade genomda paralog genlerin rubrofusarin biyosentezini gerçekleştiren enzimleri şifrelediğini düşündürmüştür.

Deneme gruplarında kültür koşullarının pigmentasyona olan etkisi farklı sıcaklık ve pH değerlerinin uygulandığı beş deney grubunda taranmıştır. Medentsev ve diğ. (2005) tarafından bildirildiği gibi bu çalışmada da *Fusarium* izolatlarında düşük pH değerlerinde (pH 3,0) (DG4 ve DG5 için) aurofusarin sentezinin yapılmadığı morfolojik gözlemlerle belirlenmiştir. Diğer üç deney koşulunun (DG1, DG2 ve DG3) *Pks12*, *Gip6*, *Gip7*, *Gip4* ve *StuAp'nin* anlatım düzeylerindeki değişimlerine olan etkisi qPZR ile ilk defa araştırılmıştır. Kültür koşullarının genlerin anlatım düzeyleri üzerindeki etkisi kontrol grubu ile karşılaştırılarak irdelenmiştir. Benzer yaklaşım sentezlenen aurofusarin ve rubrofusarin miktar değişimlerinin HPLC yöntemi ile araştırılmasında da izlenmiş, aurofusarin biyosentezi ile değişen kültür koşulları arasındaki ilişki istatistiksel olarak ortaya konmuştur. Çeşitli araştırmacıların aurofusarin biyosentez kümesi ile ilgili gerçekleştirdikleri çalışmalarında ilgili genlerin anlatımı ya delesyon mutantlarında ya da yüksek anlatım yapan mutantlarda qPZR ile kontrol edilmiştir (Malz ve diğ., 2005; Frandsen ve diğ., 2006; Kim ve diğ., 2006; Frandsen ve diğ., 2011; Westphal ve diğ., 2018).

Mantarlarda da diğer organizmalarda olduğu gibi bireyler arasındaki genetik farklılıklar ile birlikte sıcaklık ve pH gibi çevresel faktörlerin de hücre döngüsü ve sekonder metabolit üretimi üzerinde etkili olduğu Calvo ve diğ. (2002), Bahn ve diğ. (2007) ve Lind ve diğ. (2017) tarafından rapor edilmiştir. Benzer şekilde bu çalışmada da her iki *Fusarium* türü için genotipik farklılıklarla birlikte kültürlenme koşullarındaki değişkenlerin etkisi ile sekonder metabolitlerden pigment üretiminin ve hücre döngüsünün etkilendiği belirlenmiştir. *F. culmorum* izolatlarından 9F 25 °C sıcaklıkta kiremit kırmızısı pigmentasyona sahipken 15 °C

sıcaklıkta F14 izolatı kiremit kırmızısı ve sarı; *F. graminearum* 88-1 izolatı ise kahverengi miselyum sergilemiştir. Bu koşullarda üç izolatta da tüm genlerin anlatım seviye değişimini belirlemeyi sağlayan Cp değerleri elde edilmiştir. KG’de 9F izolatında $3,685 \pm 0,002$ ppm aurofusarin ve $0,052 \pm 0,003$ ppm rubrofusarin; F14’de ise DG1’de $24,108 \pm 0,003$ ppm aurofusarin ve $1,567 \pm 0,002$ ppm rubrofusarin; 88-1’de $14,349 \pm 0,001$ aurofusarin ve $1,402 \pm 0,002$ rubrofusarin miktarları saptanmıştır. Ayrıca *F. culmorum*’da sentezlenen aurofusarin ve rubrofusarin miktarının, hücre döngüsünün fazına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği de belirlenmiştir (Gazdağlı ve Albayrak, 2022). Bu üç izolat arasında belirlenen aurofusarin ve rubrofusarin konsantrasyonundaki farkın, izolatların genetik özelliklerinin yanı sıra, kültürlenme koşullarındaki sıcaklık değişiminin neden olduğu hücre döngü hızı değişiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. 88-1 ve F14 izolatlarında DG1’de ölçülen bu aurofusarin konsantrasyonu tüm kontrol ve deney gruplarında, tüm izolatlar arasında en yüksek değerler arasında yer almıştır. Bu sonuç hem *F. culmorum* hem de *F. graminearum*’da yüksek miktarda aurofusarin sentezi için 15°C sıcaklık ve pH 5,6’nın uygun olduğunu göstermektedir.

KG ve DG3’de sarı miselyuma sahip 88-1 izolatında KG’de tüm genlerin (*Gip6* hariç) anlatım seviye değişimleri belirlenmiştir. 88-1’in KG’de $1,630 \pm 0,002$ ppm aurofusarin, DG3’de ise $0,058 \pm 0,004$ ppm rubrofusarin ürettiği saptanmıştır. Bu durumun, KG’de hücrede sentezlenen tüm rubrofusarin metabolitlerinin aurofusarine dönüştürülebilirken DG3’de dönüşümün gerçekleşmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü sentezlenen rubrofusarin *Gip4*’ün şifrelediği transmembran proteini ile hücre içinden hücre dışına pompalanmakta, ardından da *Gip1*, *Gip8*, *Gip3* ve *Gip9* tarafından şifrelenen hücre dışı enzim kompleksi tarafından iki rubrofusarin molekülünün dimerizasyon reaksiyonu kataliz edilerek aurofusarin biyosentezi tamamlanmaktadır (Frandsen ve diğ., 2006; Frandsen ve diğ., 2011). 88-1 izolatının DG3’de kurulan kültüründe rubrofusarin saptandığı halde aurofusarin belirlenmemesinin nedeni olarak, rubrofusarinin hücre dışına pompalanmaması veya rubrofusarinin hücre dışına pompalandığı halde hücre dışı enzim kompleksinin rubrofusarinden aurofusarin sentezini gerçekleştirmemesi düşünülmektedir. Hücre dışı enzim kompleksindeki enzimleri şifreleyen genlerin anlatımlarının analizi veya *Gip4* proteini ile birlikte hücre dışı enzim kompleksindeki proteinlerin Western blot analizi, elde edilen verinin yorumlanmasına katkı sağlayacaktır. KG ve DG3’de sarı renk veren H-11’de ve KG’de yavruağzı-sarı pigmentasyona sahip F14 izolatında *Gip6* dışındaki tüm genler çoğaltıldığı için Cp değerleri hesaplanmıştır. H-11 ve F14’ün KG kültürlerinin aurofusarin ya da rubrofusarin üretmedikleri

HPLC ile saptanmıştır. H-11 izolatının DG3 kültür koşullarında yalnızca aurofusarin ürettiği ($0,583 \pm 0.001$ ppm) belirlenmiştir. KG'de pembe, DG3'de ise sarı miselyuma sahip 7F'de her iki ortam koşulunda tez kapsamında çalışılan tüm genlerin anlatım yaptığı belirlenmiş olsa da aurofusarin ve rubrofusarin üretiminin olmadığı gösterilmiştir. Frandsen ve diğ. (2011), elde ettikleri delesyon mutantlarında aurofusarin biyosentez yolağında ara ürün olan YWA1 ve nor-rubrofusarin metabolitlerinin sarı renkteki pigmentasyondan sorumlu olduğunu bildirmiştir. Literatürdeki bu bulgu, 7F izolatının miselyumuna sarı rengi veren metabolitlerin YWA1 ve/veya nor-rubrofusarin olduğunu düşündürmüştür. Jin ve diğ. (2009) *F. graminearum*'da miselyumun turuncu-yavruğazı renklenmesinde aurofusarin ve öncül metabolitleri ile birlikte karotenoid ve öncüllerinin de rol oynadığını rapor etmişlerdir. Ancak *F. culmorum* türünde karotenoid biyosentezinin pigmentasyondaki rolleri ile ilgili literatürde henüz bir çalışma bulunmamaktadır. *Fusarium*'da pigmentasyonun moleküler analizi kapsamında hem aurofusarin hem de karotenoid pigmentasyonu ile ilişkili iki biyosentez yolağı ile ilgili doktora tez çalışmaları TÜBİTAK tarafından 216Z007 numaralı proje desteği alınarak başlatılmıştır. Genomik analizlerde PZR yaklaşımı kullanılarak *F. culmorum* (F14) genomunda karotenoid ile ilişkili genlerin taşındığı ilk defa proje kapsamında gösterilmiştir. Ancak projenin karotenoid ile ilgili iş paketlerinin gerçekleştirilmesi sürecinde yaşanan olumsuzluklar ve tez izleme komitesinin yönlendirmesi hem projede hem de doktora tez çalışmalarında tek bir biyosentez-aurofusarin biyosentezi- üzerinde odaklanılmasını gerektirmiştir. *F. culmorum* F14 izolatının KG'de sergilediği yavruğazı renklenmenin karotenoid pigmentasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

KG'de 88-1 ve H-11; DG1'de 7F ve 9F; DG2'de 88-1 ve H-11; DG2 ve DG3'de H-11 ve F14 izolatlarında aurofusarin sentezi HPLC analizi ile gösterilmiştir. Ancak bu izolatlarda *Gip6* geninin anlatımı belirlenememiştir. *Gip6*, aurofusarin biyosentez yolağının ikinci basamağında, PKS12'nin katalizlediği kondensasyon reaksiyonu ile sentezlenen sarı renkli YWA1 molekülünün dehidrasyonu ile bu ara metabolitin nor-rubrofusarine dönüşümünü katalizleyen hipotetik proteini şifrelemektedir. *F. graminearum* genomunda farklı sekonder metabolitlerin sentezinde görevli gen kümelerinde çok sayıda hipotetik protein kodlanmaktadır. Sind ve diğ. (2014) de bu hipotetik proteinin amino asit dizilimlerinin, tanımlanan proteinlerin amino asit dizilimlerine benzemediğini bildirilmişlerdir. Frandsen ve diğ. (2011), *Gip6*'nın şifrelediği ve dehidrataz aktivitesi gösteren hipotetik proteinin de diğer dehidrataz enzimlerinin ikincil yapısına benzemediğini rapor etmiştir. Aynı araştırmacılar, enzimin ikincil yapısının çeşitli

bakteri türlerinde (*Pseudomonas reinekei*, *Ralstonia eutropha*, *Streptomyces nogalater*, *S. aureus* ve *E. coli*) antrasiklin, aktinorhodin ve hem grubu gibi halka yapısına sahip subsratların degradasyonunda görevli enzimlerle yüksek derecede benzerlik gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Bu nedenle, *F. graminearum* ve *F. culmorum*'da *Gip6*'nın şifrelediği protein yerine aynı işlevdeki bir başka hipotetik proteinin aurofusarin biyosentezine katılmış olabileceği ya da PZR çoğaltımı için tasarlanan oligonuklaotid pirimerlerin bu tarla izolatının *Gip6* gen bölgesindeki varyasyonlardan dolayı null allel eldesine yol açmış olabileceği yorumuna gidilmiştir.

DG1 koşullarında kültürlen H-11 referansından ve DG3'de kültürlen 9F'den *Pks12* ve *Gip6* genlerine, DG2 ortamındaki 7F'de *Gip6* ile *Gip7* ve 9F'de *Pks12* ile *Gip7* genlerine ait Cp değerleri hesaplanamamış olsa da HPLC analizi bu gruplarda deney gruplarında hem aurofusarin hem de rubrofusarin pigmentlerinin üretildiğini belirlememizi sağlamıştır. Fg174 ve 11F izolatlarının genomunda *Pks12*, *Gip6*, *Gip7*, *Gip4* ve *StuAp* genlerinin bulunduğu PZR ile ortaya konmuş olsa da bu genlerin anlatım düzeylerine ait veriler elde edilememiştir. HPLC analizi 11F izolatında DG3'de hem aurofusarin hem de rubrofusarinin; KG, DG1 ve DG2'de ise sadece rubrofusarinin sentezlendiğini, Fg174 de ise DG1 ve DG2 koşullarında rubrofusarin üretildiğini belirlemeyi sağlamıştır. Tez çalışmasında biyokimyasal yolda görevli enzimleri şifreleyen genlerin anlatım seviyeleri belirlenerek dolaylı olarak sekonder metabolit sentezi hakkında bilgi sahibi olabileceği, ancak ilgili genin transkript (mRNA) konsantrasyonunun eşik değerinin altında kalması durumunun güvenilir veri eldesini sınırlayabileceği tecrübe edilmiştir. Forootan ve diğ. (2017) çalıştıkları örneklerle ait nukleik asit konsantrasyonunun qPZR'da saptanabilecek minimum değerin (İng., limit of quantification-LoQ) altında kalması nedeniyle ilgili genlere ait Cp değerini benzer şekilde belirleyememişlerdir. İzolatlarda aurofusarin ve ara metaboliti olan rubrofusarin üretimi belirlenen örneklerde mRNA transkript konsantrasyonunun qPZR saptama limitinin altında kalması nedeniyle *Pks12*, *Gip6* ve *Gip7* anlatım düzeylerinin belirlenememesi, kantitasyonda yaygın olarak kullanılan bu yöntemin ayırım etkinliğini sınırlamıştır. Bu tip çalışmalarda qPZR yerine droplet dijital pPZR gibi daha hassas kantitasyon yöntemlerinin kullanılması önerilmektedir.

pH ve sıcaklık değişiminin gen anlatımı ve aurofusarin biyosentezi üzerindeki etkisi her bir deney grubunda belirlenen Cp değerinin kontrolde belirlenen değerle ikili karşılaştırması ile değerlendirilmiştir. Çevresel koşulların aurofusarin ile rubrofusarin biyosentezi ve gen anlatımı

arasındaki ilişki lineer regresyon ve çoklu regresyon testleri ve temel bileşen analizi ile ortaya konmuştur. Öncelikle Genç ve Soysal (2018)'in çalışma bulgularını değerlendirdiği yaklaşıma benzer şekilde qPZR verilerinin normal dağılıma uyup uymadığı kontrol edilerek istatistiksel analizlerde kullanılacak yöntem seçilmiştir. Örneklem sayısı (n) otuzdan küçük olduğu için normal dağılım analizi güvenilir bir test olan Sharpio-Wilk testi kullanılarak yapılmıştır (Sharpio ve Wilk, 1965). Her bir genin dokuz izolatta kontrol ve deney gruplarında hesaplanan $2^{-\Delta C_t}$ verilerinin normal dağılıma uygunluğu ayrı ayrı test edilerek belirlenmiştir. Normal dağılıma uyan iki grubun karşılaştırmasında parametrik bağımlı örneklem t testi kullanılmıştır. Normal dağılıma uyan bir grup ile normal dağılıma uymayan bir grubun ve normal dağılıma uymayan iki grubun karşılaştırmasında non-parametrik Wilcoxon testi uygulanmıştır. Gen anlatımı, sentezlenen aurofusarin ve rubrofusarin miktarı ve çevre koşulları arasındaki ilişkiler ve istatistiksel açıdan anlamlılığı non-parametrik Spearman testi ile ortaya konmuştur.

Pks12 anlatımı, 15 °C pH 5,6 değerine sahip ortamda aynı pH değerine fakat daha yüksek sıcaklığa (25 °C) sahip ortama kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Genin, pH 7,0'de 25 °C'deki anlatımının 15 °C'ye kıyasla daha fazla anlatım yaptığı gösterilmiştir. Aflatoksin sentezinden sorumlu *PksA*'nın farklı ortam şartlarındaki anlatımını inceleyen Feng ve Leonard (1998), genin pH 7,0 besi ortamında 27 °C'de 37 °C sıcaklığa göre daha yüksek anlatım yaptığını; sterigmatosin sentezinden sorumlu poliketid sentazı şifreleyen *StcA*'nın ise 37 °C'de 30 °C sıcaklığa sahip ortama göre daha yüksek anlatım yaptığını ortaya koymuşlardır. Tez çalışmasından elde edilen bulgular, *Pks12* anlatımının da pH 7,0'de *StcA* ile benzer şekilde düşük sıcaklıkta (15 °C) yüksek sıcaklığa göre (25 °C) daha az anlatım yaptığını göstermiş, ancak asidik pH'da (pH 5,6) düşük sıcaklıkta (15 °C) yüksek sıcaklığa göre daha fazla anlatım yaptığını ortaya koymuştur. *Gip6* ve *Gip7* anlatım seviyeleri, farklı kültür koşullarında birbirine benzer profil sergilemiştir. Her iki genin de pH'sı 5,6 olan besi ortamında 15 °C'de 25 °C'de olduğundan daha yüksek anlatım yaptıkları belirlenmiştir. pH 7,0 olduğunda ise genlerin 25 °C'de 15 °C'dekinden daha yüksek anlatım değerine sahip olduğu gösterilmiştir. Aurofusarinin hücre içindeki biyosentez basamaklarını katalizleyen her üç genin anlatım profillerinin aynı ortam koşulunda birbirine benzer olması, gen kümesi halinde bulunan bu genlerin anlatımlarının ortak transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edildiğini bildiren Kim ve diğ. (2006) ile Lysøe ve diğ. (2010)'nin çalışmalarını desteklemektedir. Aurofusarin biyosentezinin regülasyonunda işlevsel olan genel transkripsiyon faktörünü şifreleyen *StuAp*'nin de *Pks12*, *Gip6* ve *Gip7*'de olduğu gibi pH değeri 5,6 olan ortamda 15 °C sıcaklıkta 25 °C'dekinden daha

yüksek anlatım yaptığı; pH 7,0'de ise 25 °C sıcaklıkta 15 °C'dekinden daha yüksek anlatım yaptığı bulunmuştur. Spearman korelasyon testi ile; *StuAp* anlatımı ile *Pks12* arasında şiddetli pozitif korelasyon ($r=0,86$); *Gip7* arasında da yüksek pozitif korelasyon ($r=0,68$) belirlenmiştir. *Gip6* anlatımı ile *StuAp* arasında anlamlı bir ilişki bulunmamış, genin anlatımı ile *Pks12* arasında da zayıf pozitif korelasyon belirlenmiştir. *Gip4* anlatımının da 15 °C'de pH değeri 5,6 olan besi ortamında en yüksek anlatım değerine ulaştığı belirlenmiş, ancak pH 7,0'de diğer genlerin aksine 15 °C'de 25 °C'dekinden daha yüksek anlatım yaptığı bulunmuştur. Kim ve diğ. (2008), rubrofusarinine özgün transmembran proteinini şifreleyen *Gip4*'ün delesyonunun aurofusarin sentezini etkilemediğini rapor etmiş, Frandsen ve diğ. (2011) ise bu durumu rubrofusarinin *F. graminearum* genomunda kodlanan 307 genel transmembran pompa proteinlerinden biriyle de hücre dışına taşıyor olabileceği şeklinde açıklamıştır. *Gip4* anlatımının, farklı sıcaklık ve pH parametrelerine *Pks12*, *Gip6* ve *Gip7* gibi yanıt vermemesinin nedeni, rubrofusarinin yalnızca *Gip4*'ün kodladığı transmembran proteininden değil, farklı proteinler aracılığıyla da hücre dışına taşıyor olması ile açıklanabilir.

Hücrede sentezlenen aurofusarin ve rubrofusarin miktarı ile pH ve sıcaklık parametreleri ile ayrı ayrı anlamlı bir ilişki kurulamamış olsa da 15 °C sıcaklık ve pH 5,6 değerlerinin bir arada uygulandığı DG1'de *Pks12*, *Gip7*, *Gip4* anlatımı ile orta şiddette ve *StuAp* ile zayıf korelasyon göstermiştir. Kontrol grubunda (25 15 °C, pH 5,6) aurofusarin biyosentezi ile *Pks12* anlatımı yüksek korelasyon ($r=0,6499$); DG2'de ise (15 °C, pH 7,0) *Gip4* anlatımı ile aurofusarin biyosentezi arasında ilişki kurulabilmiştir. Bu sonuç, sıcaklık ve pH'nın tek başına değil; pH'nın 5,6, sıcaklığın 15 °C olduğunda gen anlatımı ve pigment biyosentezinin anlamlı ölçüde etkilendiğini göstermiştir. PCA analizi ile elde edilen kümelerde pH ve sıcaklık değişkenlerinin bir arada gruplanması bu sonucu desteklemektedir.

Sentezlenen aurofusarin miktarı ile *Pks12*, *Gip7*, *Gip4* ve *StuAp* gen anlatım seviyeleri arasında orta şiddette korelasyon belirlenirken, *Gip6* genine ait Cp değeri, çoğu izolat ve deney koşulunda hesaplanamamış ve *Gip6* anlatımı ile aurofusarin biyosentezi arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Frandsen ve diğ. (2011), ikincil yapısı birbirine benzeyen farklı hipotetik proteinlerin, benzer kimyasal yapıdaki subsratlara bağlanabileceğini bildirmiştir. Tez kapsamında *Gip6* anlatımı belirlenemeyen izolatlarda, *Gip6* yerine ikincil yapısı *Gip6* geninin şifrelediği enzime çok benzer ve YWA1 ara ürününe bağlanabilen farklı bir enzimin biyosentez yolağında aktivite gösteriyor olabileceği düşünülmektedir. Forootan ve diğ. (2017), hücrede

çok düşük konsantrasyondaki mRNA'nın qPZR belirleme limitinin altında kaldığı durumlarda Cp belirlenemediğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada da, *Gip6* geninden Cp belirlenemeyen örneklerdeki durumun bir diğer nedeninin, gene ait mRNA konsantrasyonunun saptama çalışmadaki saptama limitinin altında kalması da olabileceği düşünülmektedir. PCA analizinde, *Gip6*'nın anlatım yaptığı izolatlarda genin anlatımı, *Pks12* ve sentezlenen aurofusarin miktarı yakın ilişkili bulunmuştur. Elde edilen bu bulgu, *PKS12*'nin ürünü, *Gip6*'nın şifrelediği hipotetik proteinin substratı olan YWA1 ile *Gip6* anlatımının da yakın ilişkili olduğunu göstermiştir. Rubrofusarin biyosentezi ile ise nor-rubrofusarinin rubrofusarine dönüşümünden sorumlu O-metiltransferaz enzimini şifreleyen *Gip7* anlatımı ile orta şiddette ters ($r=-0,4615$); *StuAp* anlatımı arasında ise zayıf ters korelasyon ($r=-0,3934$) belirlenmiştir. Peng ve diğ. (2021)'nin mantarlarda gen anlatımının substrat konsantrasyonuna bağlı olarak regüle edildiğini vurgulaması, *Gip7* anlatımının da hücrede artan rubrofusarin konsantrasyonuna bağlı olarak azalmış olabileceğini düşündürmüştür.

Hücre döngüsü ile aurofusarin biyosentez yolağının hücre içi basamaklarının katalizinden sorumlu enzimleri kodlayan *Pks12*, *Gip6* ve *Gip7* genlerinin anlatım profilleri ile sentezlenen aurofusarin ve rubrofusarin miktarı arasındaki ilişki, 9F izolatına ait kültürün 48., 72., 120. ve 168. saatlerinde gerçekleştirilen analizlerle ortaya konmuştur. Lag faza karşılık gelen 48. saatte ve büyük ölçüde beyaz miselyumlara sahip kültürde her üç genin de anlatım yaptığı ve miselyumda hem rubrofusarin ($13,443 \pm 0,001$ ppm) hem de aurofusarin sentezinin ($4,717 \pm 0,001$ ppm) gerçekleştiği gösterilmiştir. Üreme hızının en yüksek seviyeye ulaştığı 72. saatteki logaritmik fazda, sarı renkli miselyumlarda daha az rubrofusarin ($0,098 \pm 0,001$) ve aurofusarin ($2,355 \pm 0,001$) belirlenmiştir. Kültürde yer yer kiremit kırmızısı pigmentasyonun gözlemlendiği ve durağan fazın başladığı 120. saatte $4,742 \pm 0,002$ ppm aurofusarin; kültürün tamamen kiremit kırmızısı renk aldığı 168. saatte ise $27,350 \pm 0,003$ ppm aurofusarin ölçülmüştür. Gmoser ve diğ. (2017) mantarlarda pigment biyosentezinin oksidatif stres artışı ile doğrudan ilişkili olduğunu rapor etmesi, 168. saatte durağan faza geçen kültürde solunumun kısıtlanması ve besi ortamında biriken metabolik atıkların neden olduğu oksidatif stres artışının miselyumda daha fazla aurofusarin birikimini indüklediğini düşündürmüştür. 48., 72., 120. ve 168. saatlerde belirlenen gen anlatım seviyeleri, 72. saate karşılık gelen log fazda, *Pks12*, *Gip6* ve *Gip7* anlatımının, 48. ve 120. saatlere göre en düşük seviyede bulunduğunu, en yüksek anlatım değerine ise 120. saatte ulaşıldığını ortaya koymuştur. *Gip6* anlatım seviyesinde 168. saatteki düşüş, *Pks12* ve *Gip7*'ye göre daha fazla bulunmuştur. Bu sonuç, 168. saatte hücre içinde

YWA1 ve nor-rubrofusarin miktarının daha düşük olduğunu düşündürmüştür. Vujakovic ve diğ. (2017) *F. graminearum*'da, *Pks12* anlatım seviye değişimlerinin aurofusarin biyosentezi ve miselyum pigmentasyonu ile doğrudan ilişkili olduğunu rapor etmiştir. Bu çalışmada da ilk defa *F. culmorum*'da hem *Pks12*, hem de *Gip6* ve *Gip7* anlatım değişimlerinin aurofusarin biyosentezi ve miselyum renklenmesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Gazdağlı ve Albayrak, 2023). Cambaza (2018), *F. graminearum*'a ait referans suş üzerinde gerçekleştirdiği gözlemlerde, miselyumların kültür ortamında en yüksek koloni çapına ulaşarak kültür kabının tamamını kaplamasının ardından miselyumların kiremit kırmızısı renk aldığını bildirmiştir. Bu çalışmada ise 9F izolatının durağan faza daha erken girdiği, kültürün henüz maksimum koloni çapına ulaşmadan önce kiremit kırmızısı renk almaya başladığı gözlenmiştir. Brennan ve diğ. (2003), mantarlarda üreme hızını kültür koşulları ve organizmanın in vivo patojenitesiyle doğru ilişkili olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada kullanılan ve hastalıklı mısır bitkisinden saflaştırılan tarla izolatının literatürdeki laboratuvar suşlarına kıyasla patojenitesinin ve üreme hızının daha yüksek olmasıyla birlikte, miselyumda aurofusarin birikiminin de daha erken başlamış olduğu düşünülmektedir.

Organizmalarda, sekonder metabolizma üretiminden sorumlu genlerin anlatımları ve sekonder metabolit sentezi genellikle durağan fazla ilişkilendirilmiştir (Vrabl ve diğ., 2017). Ancak bu çalışmada aurofusarin biyosentezi ile ilişkili genlerin kültürün 48. saatinde bile anlatım yaptığı, hatta en yüksek anlatım değerine logaritmik fazda ulaştığı gösterilmiştir. HPLC verileri, lag fazda rubrofusarin miktarının aurofusarinden daha yüksek olduğunu, log fazdan itibaren aurofusarin sentezine bağlı olarak rubrofusarin miktarının giderek düştüğünü ortaya koymuştur. Farklı üreme fazlarında biyosentetik yolaktaki genlerin anlatım seviyeleri ile hücre içinde ve hücre duvarında biriken rubrofusarin ve aurofusarin miktarında belirlenen artış ve azalışların organizma tarafından sentezlenen diğer sekonder metabolitlerin senteziyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Jung ve diğ. (2006), $\Delta Pks12$ mutantlarında, ZEA biyosentez yolağında görevli *Pks4* ve *Pks13* anlatımında anlamlı bir artış olduğunu ayrıca ZEA sentezinin logaritmik fazda aurofusarin sentezinin ise durağan fazda yapıldığını ve bu iki metabolitin birbirine karşı antagonistik etkili olduğunu bildirmiştir. Doktora tez çalışması kapsamında log fazda aurofusarin biyosentez gen anlatımında belirlenen düşüş Jung ve diğ. (2006)'nin bulguları ile uyumlu bulunmuştur.

Bu tez çalışmasıyla ortam koşullarının aurofusarin biyosentez genlerinin anlatım düzeyinde değişime neden olduğu, dolayısıyla hücrede biriken aurofusarin ve rubrofusarin miktarının ve miselyum pigmentasyonunun bu değişimden etkilendiği ortaya konmuş ve istatistiksel analizlerle de doğrulanmıştır. Aurofusarin biyosentezi için en uygun kültür koşullarının 15 °C sıcaklık ve pH 5,6 olduğu belirlenmiştir. *F. graminearum* genomunda tanımlanan *Pks12*, *Gip6*, *Gip7* ve *Gip4* genlerinin homologlarının *F. culmorum*'da da aurofusarin biyosenteziyle ilişkili olduğu ilk defa doktora tez çalışması kapsamında araştırılarak ortaya konmuştur. Hücre içinde en yüksek rubrofusarinin hücre döngüsünün lag fazında; miselyumda en yüksek aurofusarinin durağan fazda biriktiği gösterilmiştir (Gazdağlı ve Albayrak, 2023). Bu sonuçlar, boyar madde kullanım potansiyeli bulunan ve antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu belirlenen bu iki metabolitin yüksek miktarda üretiminde çevresel koşulların ve biyoreaktörde fermentasyon süresinin belirlenmesinde önemli olacağı düşünülmektedir. Çalışma, farklı kültür koşullarının aurofusarin ve rubrofusarinin biyosentezi üzerindeki moleküler etkileri hakkında da önemli bilgiler sunmuştur.

Atanasoff-Kardjalieff ve Studt (2022), *Fusarium*'da sekonder metabolizmanın kontrolünde çevresel etmenlerin yanı sıra histon ve kromatin modifikasyonları gibi mekanizmaların önemli bir role sahip olduğunu ifade etmiştir. Liu ve diğ., (2015) histon metiltransferaz aktivitesi gösteren enzimi şifreleyen *Set1* geninin delesyonunun aurofusarin biyosentezini indüklediğini rapor etmiştir. Reyes-Dominguez ve diğ., (2011) ise heterokromatinlere bağlanan HEP1 proteininin şifrelediği *Hep1* geninin delesyon mutantın da aurofusarin biyosentezini indüklediğini bildirmiştir. Aynı araştırmacılar, kültür süresinin farklı zamanlarında gen anlatımının susturulması ve aktive edilmesinde histon modifikasyonlarının etkin olduğunu ifade etmiştir. Bunun yanına Atanasoff-Kardjalieff ve Studt (2022), histon metilasyonu ve asetilasyonu gibi gen anlatım düzeylerini etkileyen mekanizmaların sekonder metabolit üretimi üzerindeki fonksiyonunun henüz anlaşılmadığını bildirmiş, farklı histon modifikasyonlarının sekonder metabolit üretimi üzerindeki etkisini anlayabilmek adına genom çapında yapılacak çalışmalarla birlikte gen kümesindeki her bir genin fonksiyonunun detaylı olarak değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamıştır. Aynı zamanda sekonder metabolizma ile ilişki genlerin laboratuvar koşullarında anlatım yapmadığını, genlerin anlatımının indüklenmesi için organizmanın doğal koşullarının taklit edilmesi gerektiğini vurgulamıştır. Bu çalışmada ise aurofusarin sentezi ile ilişki genlerin laboratuvar koşullarında bile aktif şekilde anlatım yaptığı belirlenmiştir. Yalnızca hipotetik protein şifreleyen *Gip6* geninin anlatımı pek çok izolat ve

ortam koşulunda belirlenememiştir. Bu genin anlatımının dijital PZR gibi daha hassas yöntemlerle çalışılması ve gen anlatımının kontrolünde etkili olan epigenetik mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik çalışmaların gerçekleştirilmesi aurofusarin biyosentezinin aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

Aurofusarinin de arasında bulunduğu naptokuinon sınıfı bileşiklerin bakteri, maya ve filamentli mantar türlerine karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Ammar ve diğ., 1979; Baker ve diğ., 1989; Medentsev ve diğ., 1998). *F. solani* ve *F. oxysporum*'un sentezlediği naptokuinon metabolitlerin aside dirençli türlerden *Mycobacterium smegmatis* ve *M. rhodochrous*; Gram pozitiflerden *S. aureus*, *B. subtilis* ve Gram negatiflerden *E. coli* üzerinde üremeyi inhibe edici etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Ammar ve diğ., 1979; Baker ve diğ., 1989). Sondergaard ve diğ. (2016), aurofusarinin bağırsak mikrobiyotasında bulunan Gram pozitif bakterilerden *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* türlerine karşı antibakteriyal etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Tez çalışmasında, aurofusarinin antibakteriyal etkinliği Gram negatif türlerden *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC 15962), *P. aeruginosa* (ATCC 27853); Gram pozitiflerden *S. saprophyticus* (DM17) ve *S. aureus* (ATCC 25923) üzerinde sıvı besi ortamında dilüsyon metodu ile belirlenmiştir. Ticari aurofusarin *E. coli* ve *K. pneumoniae* üremesini yaklaşık %2; *S. aureus* ve *S. saprophyticus* üremesini ise yaklaşık %3,5 inhibe etmiştir. Metabolit *P. aeruginosa* (ATCC 27853) üremesinde %11 inhibisyona neden olmuştur. 9F kültüründen ekstre edilen ticari aurofusarin üreme üzerinde *E. coli*'de %2; *K. pneumoniae*'de %4; *S. aureus*, *S. saprophyticus* ve *P. aeruginosa* (ATCC 27853)'ya ait planktonik hücreler üzerinde de %1 inhibitör etki göstermiştir. Antibakteriyal etkinin analiz edildiği bu çalışmalarda, ticari aurofusarinin ve kültürden ekstre edilen aurofusarinin en yüksek çözünürlüğü saf DMSO ile elde edilmiştir. Çeşitli gruplarının DMSO'nun Gram negatif ve Gram pozitif türlerin üremesi üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmalarında, bileşeni %20 (v/v) oranında bulunduran ortamlarda Gram pozitif, %10 (v/v) bulunduran ortamda ise Gram negatif bakterilerde üremenin inhibe olduğu ve DMSO'nun bakteriler üzerinde mutajenik etki gösterdiği bildirilmiştir (Basch ve Gadebusch 1968; Cray ve diğ., 1987; Hakura ve diğ., 1993). Tez çalışmasında, DMSO'yu %11 (v/v) oranında içeren besi ortamında bakteri üremesinin inhibe olması, aurofusarinin bakteri üremesi üzerindeki etkisinin izlenmesinde kısıtlayıcı olmuştur. Aurofusarin gibi halkasal yapıdaki organik bileşenlerin sudaki çözünürlüklerinin artırılması amacıyla çözücünün asidik ya da bazik hale getirilmesi, çözücüye NaCl gibi iyonik tuzların eklenmesi gibi yaklaşımlar uygulanmaktadır (Soderberg, 2019). Aurofusarinin de

bakteri hücreleri üzerinde toksik etkisi DMSO'ya göre daha düşük çözücülerle çözünür hale getirilmesi, hücre kültürü çalışmalarında antibakteriyal etkinliğin daha doğru şekilde izlenmesine katkı sağlayacaktır.

Aurofusarinin biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi *P. aeruginosa* PAO1 üzerinde araştırılmıştır. Gram negatif türlerden *P. aeruginosa*, hücre içine giren antibiyotik ve diğer toksik ajanları hücre dışına pompalayan çok sayıda protein sistemine sahiptir (Blair ve diğ., 2015). Organizma bu sayede B-laktamlar, florokinolonlar ve aminoglikozitler dahil olmak üzere bir çok antibiyotiğe karşı oldukça dirençlidir. QS'in regüle ettiği biyofilm oluşturma yeteneğine sahip patojen, organik bileşenlerin bulunduğu yüzeylere tutunabilmektedir (Mena ve Gerba, 2009). Deredjian ve diğ. (2014), *P. aeruginosa* biyofilmlerinin topraktan ve su arıtma tesislerinden alınan örneklerde yaygın olarak bulunduğunu bildirmiştir. Geniş bir konak aralığına sahip olan ve özellikle bağışıklık sistemi düşük bireylerde enfeksiyona hatta ölüme neden olabilen bu türle mücadelede biyofilm oluşumu mekanizmasının hedeflenmesi önem taşımaktadır (Chanda ve diğ., 2017). Aurofusarinin ve aurofusarin ekstresinin biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi değerlendirilmeden önce, metabolitin üreme üzerinde anlamlı şekilde inhibisyona neden olan en düşük dozu belirlenmiş ve bu dozun %25, %50 ve %75'inin üreme eğrisi ve planktonik hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bakteri üremesini 40 µg/µl saf aurofusarin %4; 0,72 ng/µl aurofusarin içeren ekstre %40 oranında inhibe etmiştir. Üreme eğrisi analizleri, hem saf aurofusarinin hem de aurofusarin ekstresinin *P. aeruginosa* PAO1'e ait planktonik hücrelerin üreme eğrisi üzerinde anlamlı bir etkiye neden olmadıklarını ancak aurofusarin içermeyen kontrol grubunda, aurofusarin içeren deney gruplarına kıyasla hücre sayısının daha yüksek olduğunu göstermiştir. Planktonik hücrelerin proliferasyonu incelendiğinde, proliferasyonun 10 µg/µl saf aurofusarin ile %15; 20 µg/µl saf aurofusarin ile %10 azaldığı, 30 µg/µl aurofusarinin ise proliferasyonu anlamlı şekilde etkilemediği bulunmuştur. Proliferasyonun, 0,18 ng/µl aurofusarin içeren ekstre ile %40 azaldığı, 0,36 ng/µl ve 0,54 ng/µl aurofusarin içeren ekstre ile artmış olduğu gösterilmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular, planktonik hücrelerin metabolik aktiviteleri üzerinde aurofusarinin anlamlı bir düşüşe neden olmadığını ortaya koymuştur. Saf aurofusarin ile aurofusarin ekstresi, *F. culmorum* türüne ait 9F izolatından hazırlanmıştır. *F. culmorum*, aurofusarinin yanı sıra çok sayıda sekonder metaboliti de sentezlemektedir (Schmidt ve diğ., 2018). Saf aurofusarin ve aurofusarin ekstresinin üreme ve biyofilm oluşumu üzerinde farklı etki göstermesinin, izolat tarafından sentezlenen ve ekstre

içinde bulunması muhtemel diğer sekonder metabolitlerin sinerjik etkilerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

P. aeruginosa PAO1'in biyofilm kütle analizleri, 10 µg/µl saf aurofusarin bulunan ortamda biyofilm oluşumunun kontrole göre azaldığını; 20 µg/µl ve 30 µg/µl saf aurofusarinin ise biyofilm oluşumunu indüklediğini ortaya koymuştur. 0,32 ng/µl, 0,48 ng/µl ve 0,72 ng/µl aurofusarin içeren ekstreler biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir. *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumu *Las/Rhl* sistemi ile birlikte *GacS/GacA* ve *RetS/LadS* ikili sistemi tarafından regüle edilen karmaşık bir süreçtir (Rasamiravaka ve diğ., 2015). *Las* sistemindeki genlerden *LasI*, QS'de sinyal iletiminden sorumlu homoserin lakton molekülünü, *LasR* ise transkripsiyon aktivatör proteinini şifrelemektedir. *LasR*'nin şifrelediği transkripsiyon faktörü, aralarında elastaz enzimini şifreleyen *LasB*'nin de bulunduğu virulans genlerinin anlatımını indüklemekte biyofilm oluşumuyla birlikte virulans faktörlerinin sentezi başlamaktadır (Pearson ve diğ., 1997; Chanda ve diğ., 2017). Bu çalışma kapsamında saf aurofusarin ve aurofusarin ekstresi içeren ortamlarda, biyofilm oluşumuyla birlikte *LasB*, *LasI*, *LasR* anlatım düzeyleri de analiz edilmiştir. 20 µg/µl ve 30 µg/µl saf aurofusarin ile 0,48 ng/µl aurofusarin içeren ekstre *LasI*, *LasB* ve *LasR* anlatımında yaklaşık 10 kat azalmaya neden olmuştur. 10 µg/µl saf aurofusarin ile 0,32 ng/µl ile 0,72 ng/µl aurofusarin ekstresinin bulunduğu ortamda gen anlatımında artış belirlenmiştir. 0,48 ng/µl aurofusarin içeren ekstrede, 0,32 ng/µl ile 0,72 ng/µl aurofusarin içeren ekstreye göre daha düşük anlatımın belirlenmesinin nedeninin, bu ortam koşulunda ilgili genlere ait mRNA transkriptlerinin translasyonun ardından diğer ortamlara göre daha hızlı yıkıldığını düşündürmüştür. Gen anlatımı verileri ile biyofilm kütle ve biyofilm metabolik aktivite verileri arasındaki ilişkinin istatistik analizi, *LasB* ($r=0,73$) ve *LasI* ($r=0,65$) genleri ile biyofilm oluşumu arasında yüksek pozitif korelasyon, *LasR* ile orta şiddette pozitif korelasyon ($r=0,42$) olduğunu ortaya koymuştur. Aurofusarin dozunun artışıyla biyofilm oluşumunun inhibe edildiği, biyofilm kütlesi ile doz arasında şiddetli negatif korelasyon ($r=-0,93$) bulunmasıyla ortaya konmuştur. Hem saf aurofusarinin hem de aurofusarin ekstresinin biyofilmdeki hücrelerin metabolik aktivitelerinde anlamlı şekilde inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir. PCA analizinde, biyofilm metabolik aktivite verileri, *LasB*, *LasI* ve *LasR* anlatım verileri ile aynı grupta kümelenmiştir. Chanda ve diğ. (2017), linolenik asit ve tobramisin QS gen anlatımı ve biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada, linolenik asit ve tobramisin üremeyi inhibe eden en düşük dozun alt dozlarının QS'i kontrol eden genlerin anlatımında değişime neden olduğunu, bunun da hücrelerin metabolik aktivitesini etkilediğini

rapor etmişlerdir. *P. aeruginosa* olumsuz çevresel sinyallere yanıt olarak biyofilm oluşturmakta, biyofilm ve virulans faktörlerinin üretimi, *P. aeruginosa*'nın stres koşullarına adaptasyonunu ve hayatta kalma şansını arttırmaktadır (Garcia-Contreras ve diğ., 2015; Moradali ve diğ., 2017). Organizma, eksopolisakkaritlerle çevrili mikrokoloniler içerisinde bir yüzeye tutunarak oksidatif strese, besin ve oksijen yetersizliğine, metabolik atık birikimine ve antimikrobiyal ajanlara karşı çok daha dirençli hale gelmektedir (Leid, 2009; Olsen, 2015). Bu çalışmadan elde edilen bulgular, saf aurofusarinin organizmada biyofilm oluşumunu indüklediğini ortaya koymuştur. Aurofusarinin de hücrede oksidatif stres yol açabileceği ve bunun sonucu olarak ve organizmanın yanıt olarak biyofilm oluşturduğu düşünülmektedir. Bu nedenle organizmada aurofusarinin neden olduğu oksidatif stres cevabının araştırılması önem taşımaktadır.

Doktora tez çalışmasında, aurofusarin biyosentezinden sorumlu *F. graminearum* genomunda tanımlanmış olan *Pks12*, *Gip6*, *Gip7* ve *Gip4* genleri ilk defa *F. culmorum* genomundan çoğaltılmıştır. *Pks12*, *Gip6*, *Gip7* ve *Gip4* ile genel transkripsiyon faktörünü şifreleyen *StuAp* anlatımının pH ve sıcaklık değişimlerinden etkilendiği, gen anlatımındaki değişimlerin aurofusarin sentezini etkileyerek izolatlar arasında miselyum pigmentasyonunda değişikliklere neden olduğu ortaya konmuştur. Gen anlatımlarının, 15 °C sıcaklık ve 5,6 pH değerinde anlamlı şekilde arttığı ve bu koşulda sentezlenen aurofusarin miktarında da artış olduğu belirlenmiştir. Aurofusarinin, *P. aeruginosa*'da QS'den sorumlu genlerin anlatımlarını da etkileyerek biyofilm oluşumunu inhibe ettiği de gösterilmiştir. Tamamlanan doktora tez çalışmasından elde edilen bulgular, antibakteriyal etkiye sahip farklı tonlardaki pigment molekülleri ve/veya ara metabolitlerinin genomda manipülasyon yapılmaksızın bol miktarda üretilmesine yönelik biyoteknolojik çalışmalara temel oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

- Albayrak, G., Yörük, E., Gazdağlı, A., Sharifnabi, B., 2016, Genetic diversity among *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates based on ISSR markers, *Archieves of biological sciences*, 68 (2), 333-343.
- Al-Fakih, A.A., Almaqtri, W.Q.A, 2019, Overview on antibacterial metabolites from terrestrial *Aspergillus* spp., *Mycology*, 10 (4), 191-209.
- Ammar, M.S., Gerber, N.N., Mcdaniel, L., 1979, New antibiotic pigments related to fusarubin from *Fusarium solani* (mart.) sacc, *The journal of antibiotics*, 33 (7), 679-684.
- Ashley, J.N., Hobbs, B.C., Raistrick, H., 1937, Studies in the biochemistry of microorganisms LIII. the crystalline colouring matters of *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc. and related forms, *The biochemical journal*, 31, 385-397.
- Atanasoff-Kardjalieff, A.K., Studt, L., 2022, Secondary metabolite gene regulation in mycotoxigenic *Fusarium* species: a focus on chromatin, *Toxins*, 14 (2), 96.
- Atoui, A., El Khoury, A., Kallassy, M., Lebrihi, A., 2012, Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* by real-time PCR system and zearalenone assessment in maize, *International journal of food microbiolgy*, 154, 59-65.
- Azizan, S., Ng, C.L., 2016, Ungal Metabolites And their industrial importance: A brief review, *Malaysian journal of biochemistry and molecular biology*, 2, 15-23.
- Bahn, Y.S., Xue, C., Idnurm, A., 2007, Sensing the environment: lessons from fungi, *Nature review of microbiology*, 5, 57-69.
- Bai, A.J., Rai, V.R., 2015, *Quorum-Sensing systems in Pseudomonas*, Quorum sensing vs quorum quenching: a battle with end in sight. In: Kalia, V.C. (ed.), Chapter 8, Springer, India, 73-84.
- Baker, R.A., Tatum, J.H., Nemec, S., 1990, Antimicrobial activity of naphthoquinones from *Fusaria*, *Mycopathologia*, 111, 9-15.

- Bala, N., Aitken, E.A., Fechner, N., Cusack, A., Steadman, K.J., 2011, Evaluation of antibacterial activity of Australian basidiomycetous macrofungi using a high-throughput 96-well plate assay, *Pharmaceutical biology*, 49 (5), 492-500.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S.K., 2016, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review, *Journal of pharmaceutical analysis*, 6, 71-79.
- Basch, H., Gadebusch, H.H., 1968, *In vitro* antimicrobial activity of dimethylsulfoxide, *Applied microbiology*, 16 (12), 1953-1955.
- Bayram, O., Braus, G.H., 2012, Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins, *FEMS microbiology review*, 36 (1), 1-24.
- Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J.W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeier, S., Kwon, N.J., Keller, N.P., Braus, G.H., 2008, VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism, *Science*, 320 (5882), 1504-1506.
- Bladen, H., Mergenhagen, S., 1964, Ultrastructure of veillonella and morphological correlation of an outer membrane with particles associated with endotoxic activity, *Journal of bacteriology*, 88, 1482-1492.
- Blair, J.M., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., and Piddock, L.J., 2015, Molecular mechanisms of antibiotic resistance, *Nature reviews of microbiology*, 13, 42–51.
- Bok, J.W., Keller, N.P., 2004, LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp., *Eukaryotic cell*, 3 (2), 527-535.
- Bömke, C., Tudzynski, B., 2009, Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria, *Phytochemistry*, 70, 1876-1893.
- Breindenstein, E.B., de la Fuente-Núñez, C., Hancock, R.E., 2011, *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance, *Trends in microbiology*, 19, 419-426.

- Brennan, J., Fagan, B., van Maanen, A., 2003, Studies on in vitro growth and pathogenicity of european *Fusarium* fungi, *European Journal of Plant Pathology*, 109, 577-587.
- Brown, D.W., Salvo, J.J., 1994, Isolation and characterization of sexual spore spore pigments *Aspergillus nidulans*, *Applied environmental microbiology*, 60, 979-983.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., Keller, N.P., 2002, Relationship between secondary metabolism and fungal development, *Microbiology and molecular biology reviews*, 66 (3), 447-459.
- Cambaza, E., 2018, Comprehensive Description of *Fusarium graminearum* Pigments and Related Compounds, *Foods*, 7, 165-180.
- Chan, Y.A, Podevels, A.M., Kevany, B.M., Thomas, M.G., 2009, Biosynthesis of polyketide synthase extender units, *Natural product reports*, 26 (1), 90-114.
- Chanda, W., Joseph, T.P., Padhiar, A.A., Guo, X., Min, L., Wang, W., Lolokote, S., Ning, A., Cao, J., Huang, M., Zhong, M., 2017, Combined effect of linolenic acid and tobramycin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and quorum sensing. *Experimental and therapeutic medicine*, 14 (5), 4328-4338.
- Cole R.J., Schweikert M.A., Jarvis, B.B., 2003, Handbook of Secondary Fungal Metabolites Volume I, Academic Press, USA, ISBN: 0-12-179461-X.
- Cray, P.F., Cray, W.C. Anderson, G., 1987, Bacterial tolerance of 100% dimethyl sulfoxide, *Canadian journal of microbiology*, 34, 688-689.
- Cuomo, C.A., Guldener, U., Xu, J.R., Trail, F., Turgeon, B.G., Pietro, A.D., Walton, J.D., Ma, L.J., Baker, S.E., Rep, M., Adam, G., Antoniwi, J., Baldwin, T., Calvo, S., Chang, Y.L., Decaprio, D., Gale, L.R., Gnerre, S., Goswami, R.S., Koscak, K.H., Harris, L.J., Hilbrun, K., Kennell, J.C., Kroken, S., Magnuson, J.K., Mannhaupt, G., Mauceli, E., Mewes, H.W., Mitterbauer, R., Muehlbauer, G., Mensterkotter, M., Nelson, D., O'Donnell, K., Quellet, T., Qi, W., Quesneville, H., Roncero, M.I.G., Seong, K.Y., Tetko, I.V., Urban, M., Waalwijk, C., Ward, T.J., Yao, J., Birren, B.W., Kistler, H.C., 2007, The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization, *Science*, 317, 1400-1402.

- Das, M.C., Sandhu, P., Gupta, P., Rudrapaul, P., De U.C., Tribedi, P., Akhter, Y., Bhattacharjee, S., 2016, Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by vitexin: a combinatorial with azithromycin and gentamicin, *Science reports*, 6, 23347-23016.
- De Spiegelaere, W., Dern-Wieloch, J., Weigel, R., Schumacher, V., Schorle, H., 2015, Reference Gene Validation for RT-qPCR, a note on different available software packages, *Plos one*, 10 (3), e0122515.
- Deredjian, A., Colinon, C., Hien, E., Brothier, E., Youenou, B., Cournoyer, B., Dequiedt, S., Hartmann, A., Jolivet, C., Houot, S., Ranjard, L., Saby, N.P., Nazaret, S., 2014, Low occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in agricultural soils with and without organic amendment, *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 29 (4), 53-65.
- Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Shaner, G., Brown, D.W., Buechley, G., 2006, Field release of *Gibberella zeae* genetically modified to lack ascospores, *Proceedings of the 2006 National Fusarium Head Blight Forum*, 10-12 December 2006 Research Triangle Park, North Carolina, USA, Michigan State University, 39-44.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochemical bullutein*, 19, 11-15.
- Hakura A., Mochida, H., Yamatsu, K., 1993, Dimethyl sulfoxide (DMSO) is mutagenic for bacterial mutagenicity tester strains, *Mutation research*, 303, 127-133.
- Estrela, A.B., Abraham, W.R., 2016, Fungal metabolites for the control of biofilm infections, *Agriculture*, 6 (3), 1-26.
- Fair, J.D., Kormos, C.M., 2008, Flash column chromatograms estimated from thin-layer chromatography data, *Journal of chromatography a*, 1211 (1-2), 49-54.
- Firn, R.D., 2010, *Nature's Chemicals: The natural products that shaped our world*. Oxford University Press, Oxford, ISBN: 978-0-19-956683-9.
- Firn, R.D., Jones, C.G., 2000, The evolution of secondary metabolism - A unifying model. *Molecular microbiology*, 37 (5), 989-994.

- Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., Kubista, M., 2017, Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR), *Biomolecular detection and quantification*, 29, 12:1-6.
- Fox, E.M., Howlett, B.J., 2008, Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology, *Current opinion in microbiology*, 11 (6), 481-487.
- Frandsen, R.J., Nielsen, N.J., Maolanon, N., Sørensen, J.C., Olsson, S., Nielsen, J., Giese, H. 2006, The biosynthetic pathway for aurofusarin in *Fusarium graminearum* reveals a close link between the naphthoquinones and naphthopyrones, *Molecular microbiology*, 61, 1069-1080.
- Frandsen, R.J., Rasmussen, S.A., Knudsen, P.B., Uhlig, S., Petersen, D., Lysøe, E., Gotfredsen, C.H., Giese, H., Larsen, T.O., 2016, Black perithecial pigmentation in *Fusarium* species is due to the accumulation of 5-deoxybostrycoidin-based melanin, *Scientific reports*, 6, 26206-26219.
- Frandsen, R.J., Schütt, C., Lund, B.W., Staerk, D., Nielsen, J., Olsson, S., Giese, H., 2011, Two novel classes of enzymes are required for the Biosynthesis of Aurofusarin in *Fusarium graminearum*, *Journal of biological chemistry*, 286 (12), 10419-10428.
- Frandsen, R.J.N., Albertsen, K.S., Stougaard, P., Sørensen, J.L., Nielsen, K.F., Olsson, S., Giese, H., 2010, Methylenetetrahydrofolate reductase activity is involved in the plasma membrane redox system required for pigment biosynthesis in filamentous fungi, *Eukaryotic cell*, 9 (8), 1225-1235.
- García-Contreras, R., Nuñez-López, L., Jasso-Chávez, R., Kwan, B.W., Belmont, J.A., Rangel-Vega, A., 2015, Quorum sensing enhancement of the stress response promotes resistance to quorum quenching and prevents social cheating., *ISME Journal*, 9, 115-125.
- Gardiner, D.M., McDonald, M.C., Covarelli, L., Solomon, P.S., Rusu, A.G., Marshall, M., Kazan, K., Chakraborty, S., McDonald, B.A., Manners, J.M., 2012, Comparative pathogenomics reveals horizontally acquired novel virulence genes in fungi infecting cereal hosts. *Plos pathology*, 8, 1-21.

- Gazdağlı, A., Albayrak, G., 2023, Molecular analysis of the genes responsible for catalysing intracellular steps of aurofusarin biosynthesis in *Fusarium culmorum*, *Brazilian archives of biology and technology*, 66, 1-18.
- Genç ve Sosyal, 2018, Parametrik ve parametrik olmayan çoklu karşılaştırma testleri, *Black sea journal of engineering and science*, 1 (1), 18-27.
- Gilbert, K.B., Kim, T.H., Gupta, R., Greenberg, E.P., Schuster, M., 2009, Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor *LasR*, *Molecular microbiology*, 73 (6), 1072-1085.
- Gmoser, R., Ferreira, J.A., Lennartsson, P.R., 2017, Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. *Fungal biology and biotechnology*, 4, 4.
- Goswami, R.S., Kistler, H.C., 2004, Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular plant pathology*, 5 (6), 515-525.
- Han, J.W., Choi, G.J., Kim, B.S., 2018, Antimicrobial aromatic polyketides: a review of their antimicrobial properties and potential use in plant disease control. *World journal of microbiology and biotechnology*, 34 (11), 163-173.
- Hansen, F.T., Sørensen, J.L., Giese, H., Sondergaard, T.E., Frandsen, R.J., 2012, Quick guide to polyketide synthase and nonribosomal synthetase genes in *Fusarium*. *International journal of food microbiology*, 155, 128-136.
- Harwood, C.S., Fosnaugh, K., Dispensa, M., 1989, Flagellation of *Pseudomonas putida* and analysis of its motile behavior, *Journal of bacteriology*, 171 (7), 4063-4066.
- Hicks, J., Yu, J.H., Keller, N., Adams, T.H., 1997, *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA Galpha protein-dependent signaling pathway, *EMBO journal*, 16, 4916-4923.
- Hornok, L., Waalwijk, C., Leslie, J.L., 2007, Genetic Factors affecting sexual reproduction in toxigenic *Fusarium* species, *International journal of food microbiology*, 119, 54-58.
- Hranueli, D., , Nata, P., Borovika, B., Bogdan, S., Cullum, J., Waterman, P.H., 2001, Molecular Biology of Polyketide Biosynthesis, *Food technology biotechnology*, 39, 203-213.

- Jain, S., Akiyama, K., Mae, K., Ohguchi, T., Takata, R., 2002, Targeted disruption of a G protein alpha subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum*, *Current genetics*, 41, 407-413.
- Jain, S., Akiyama, K., Takata, R., Ohguchi, T., 2005, Signaling via the G protein a subunit FGA2 is necessary for pathogenesis in *Fusarium oxysporum*, *FEMS microbiology letters*, 243, 165-172.
- Jiang, J., Liu, X., Yin, Y., Ma, Z., 2011, Involvement of a velvet protein FgVeA in the regulation of asexual development, lipid and secondary metabolisms and virulence in *Fusarium graminearum*, *Plos one*, 6 (11), 1-15.
- Jimenez, P.N., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H., Quax, W. J., 2012, The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology and molecular biology reviews*, 76 (1), 46-65.
- Jin, J.M., Lee, J., Lee, Y.W., 2009, Characterization of carotenoid biosynthetic genes in the ascomycete *Gibberella zeae*, *FEMS Microbiology Letters*, 302, 197-202.
- Jung, S.Y., Kim, J.E., Yun, S.H., Lee, Y.W., 2006, Possible Negative Effect of Pigmentation on Biosynthesis of Polyketide Mycotoxin Zearalenone in *Gibberella zeae*, *Journal of microbiology and biotechnology*, 16 (9), 1392-1398.
- Kasahara, S., Nuss, D.L., 1997, Targeted disruption of a fungal G-protein beta subunit gene results in increased vegetative growth but reduced virulence, *Molecular plant-microbe interaction*, 10, 984-993.
- Keller, N.P., Hohn, T.M., 1997, Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi, *Fungal genetics and biology*, 21 (1), 17-29.
- Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W., 2005, Fungal secondary metabolism - From biochemistry to genomics, *Nature reviews microbiology*, 3 (12), 937-947.
- Khaldi, N., Collemare, J., Lebrun, M.H., Wolfe, K.H., 2008, Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi, *Genome biology*, 9 (1), 1-10.

- Kim, H., Woloshuk, C.P., 2008, Role of AREA, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize kernels and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*, *Fungal genetics and biology*, 45, 947-953.
- Kim, H.K., Lee, S., Jo, S.M., McCormick, S.P., Butchko, R.A.E., Proctor, R.H., Yun, S.H., 2013, Functional Roles of FgLaeA in Controlling Secondary Metabolism, Sexual Development, and Virulence in *Fusarium graminearum*, *Annual review of phytopathology*, 43, 437-458.
- Kim, J., Jin, J., Kim, H., Kim, J., Yun, S., Lee, Y., 2006, GIP2, a putative transcription factor that regulates the aurofusarin biosynthetic gene cluster in *Gibberella zeae*, *Applied environmental microbiology*, 72 (2), 1645-1652.
- Kim, J.E., Kim, J.C., Jin, J., Yun, S., Lee, Y.W., 2008, Functional characterization of genes located at the aurofusarin biosynthesis gene cluster in *Gibberella zeae*, *Plant pathology journal*, 24 (1), 8-16.
- Koch, B., Larsen, T.O., Hentzer, M., 2005, Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species, *Microbiology*, 151, 1325-1340.
- Kollef, M.H., Chastre, J., Fagon, J.Y., François, B., Niederman, M.S., Rello, J., Torres, A., Vincent, J.L., Wunderink, R.G., Go, K.W., Rehm, C., 2014, Global prospective epidemiologic and surveillance study of ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Critical care medicine*, 42, 2178-2187.
- Koo, H., Hayacibara, M.F., Schobel, B.D., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Park, Y.K., Vacca-Smith, A.M., Bowen, W.H., 2003, Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 52, 782-789.
- Lee W.S., Kommary L., 1976, New method for detecting in vitro inactivation of penicillins by *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 10, 664-656.
- Leid, J.G., 2009, Bacterial biofilms resist key host defenses, *Microbe*, 4, 66-70.

- Lind, A.L., Wisecaver, J.H., Lameiras, C., Wiemann, P., Palmer, J.M., Keller, N.P., Rodrigues, F., Goldman, G.H., Rokas, A., 2017, Drivers of genetic diversity in secondary metabolic gene clusters within a fungal species, *PLoS biology*, 15 (11), e2003583.
- Liu, J., Zhang, Y., Lei, X., 2008, Natural selection of protein structural and functional properties: a single nucleotide polymorphism perspective, *Genome biology* 9, R69.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method, *Methods*, 25, 402–408.
- Luckner, M., Nover, L., Böhm, M., 1977, Secondary metabolism and cell differentiation, Molecular biology biochemistry and biophysics. Springer Verlag, Berlin, ISBN: 978-3540080817.
- Lysøe, E., Pasquali, M., Breakspear, A., Kistler, H.C., 2011, The transcription factor FgStuAp influences spore development, pathogenicity, and secondary metabolism in *Fusarium graminearum*, *Molecular plant microbe interactions*, 24 (1), 54-67.
- Ma L.J., van der Does, H.C., Borkovich, K.A., Coleman, J.J., Daboussi, M.J. 2010, Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*, *Nature*, 464, 367-373.
- Ma, L.J., Geiser, D.M., Proctor, R.H., Rooney, A.P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D.M., Manners, J.M., Kazan, K., 2013, *Fusarium* pathogenomics, *Annual review of microbiology*, 67, 399-416.
- Malz, S., Grell, M.N., Thrane, C., Maier, F.J., Rosager, P., Felk, A., Albertsen, K.S., Salomon, S., Bohn, L., Schäfer, W., Giese, H., 2005, Identification of a gene cluster responsible for the biosynthesis of aurofusarin in the *Fusarium graminearum* species complex, *Fungal genetics and biology*, 42 (5), 420-433.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982, Molecular cloning: a laboratory manual, Cold spring harbor laboratory press, NY.
- Mann, T., Humbert, R., Dorschner, M., Stamatoyannopoulos, J., Noble, W.S., 2009, A thermodynamic approach to PCR primer design, *Nucleic acids research*, 37 (13), e95.

- Markel, S.G., Franc, L.J., 2003, Fusarium head blight inoculum: species prevalence and *Gibberella zeae*, *Plant disease*, 87, 814-820.
- Medentsev, A.G., Akimenko, V.K., 1998, Naphthoquinone metabolites of the fungi, *Phytochemistry*, 47 (6), 935-959.
- Medentsev, A.G., Arinbasarova, A.Y., Akimenko, V.K., 2005, Biosynthesis of naphthoquinone pigments by fungi of the genus *Fusarium*, *Applied biochemistry and microbiology*, 41 (5), 503-507.
- Mena, K.D., Gerba, C.P., 2009, Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water, *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 201, 71-115.
- Nash, S.M., Christou, T., Snyder, W.C., 1961, Existence of *Fusarium solani* f. sp. phaseoli as chlamydospores in soil, *Phytopathology*, 51, 308-312.
- Newton, G.G.F., Abraham, E.P., 1955, Cephalosporin C, A new antibiotic containing sulphur and D- α -aminoadipic acid, *Nature*, 175 (4456), 548-558.
- Olsen, I., 2015, Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance, *European journal of clinical microbial infection diseases*, 34, 877-886.
- Özer, N., Soran, H., 1991, Fusarium species of Turkey, Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi, 6, 259-271.
- Pearson, J.P., Pesci, E.C., Iglewski, B.H., 1997, Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes, *Journal of bacteriology*, 179 (18); 5756-5767.
- Parry, D.W., Jenkinson, P., Mcleod, L., 1995, Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals a review, *Plant pathology*, 44, 207-238.
- Peng, M., Khosravi, C., Lubbers, R.J.M., Kun, R.S., Pontes, M.V.A., Battaglia, E., Chen, C., Dalhuijsen, S., Daly, S., Lipzen, A., Ng, V., Yan, J., Wang, M., Visser, J., Grigoriev, I.V., Mäkelä, M.R., de Vries, R.P., 2021, CreA-mediated repression of gene expression occurs at low monosaccharide levels during fungal plant biomass conversion in a time and substrate dependent manner, *The cell surface*, 7, 100050.

- Proctor, R.H., Butchko, R.A.E., Brown, D.W., Moretti, A., 2007, Functional characterization, sequence comparisons and distribution of a polyketide synthase gene required for perithecial pigmentation in some *Fusarium* species, *Food additives & contaminants*, 24, 1076-1087.
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., Jaziri, Mondher, E.L., 2015, The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms, *BioMed research international*, 2015, 1-17.
- Rasmussen, T.B., Skindersoe, M.E., Bjarnsholt, T., Phipps, R.K., Christensen, K.B., Jensen, P.O., Andersen, J.B., 2005, Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by penicillium species, *Microbiology*, 151 (5), 1325-1340.
- Reyes-Dominguez, Y., Boedi, S., Sulyok, M., Wiesenberger, G., Stoppacher, N., Krska, R., Strauss, J., 2012, Heterochromatin influences the secondary metabolite profile in the plant pathogen *Fusarium graminearum*, *Fungal genetics and biology*, 49 (1), 39-47.
- Riedel, K., Boustie, J., Eberl, L., Berg, G., Grube, M., 2008, Effects of lichen secondary metabolites on bacterial functions and biofilm formation, *Planta medica*, 74 (9), 85-95.
- Sarlin, T., Yli-Mattila, T., Jestoi, M., Rizzo, A., Paavanen-Huhtala, S., Haikara, A., 2006, Real-time PCR for quantification of toxigenic *Fusarium* species in barley and malt, *European journal of plant pathology*, 114, 371-380.
- Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, G., Migheli Q., 2013, *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat, *Molecular plant pathology*, 14 (4), 323-341.
- Schmidt, R., Durling, M.B., de Jager, V., Menezes, R.C., Nordkvist, E., Svatos, A., Dubey, M., Lauterbach, L., Dickschat, J.S., Karlsson, M., Garbeva, P., 2018, Deciphering the genome and secondary metabolome of the plant pathogen *Fusarium culmorum*, *FEMS Microbiology ecology*, 94 (6), 078.
- Sharpio, S.S., Wilk, M.B., 1965, An analysis of variance test for normality (complete samples), *Biometrika*, 52 (3), 591-611.

- Shwab, E.K., Keller, N.P., 2008, Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes, *Mycological research*, 112 (2), 225-230.
- Sieber, C.M.K., Lee, W., Wong, P., Münsterkötter, M., Mewes, H. W., Schmeitzl, C., Varga, E., Berthiller, F., Adam, G., Güldener, U., 2014, The *Fusarium graminearum* genome reveals more secondary metabolite gene clusters and hints of horizontal gene transfer, *Plos one*, 9 (10), 1-21.
- Soderberg, T., 2019, *Organic Chemistry with a Biological Emphasis Volume I*, Chemistry Publications, ABD, 16.
- Sondergaard, T.E., Fredborg, M., Oppenhagen-Christensen, A.M., 2016, Fast Screening of Antibacterial Compounds from *Fusaria*, *Toxins*, 8 (12), 355-364.
- Soto-Aceves, M.P., Cocotl-Yañez, M., Merino, E., Castillo-Juárez, I., Cortés-López, H., González-Pedrajo, B., Díaz-Guerrero, M., Servín-González, L., Soberón-Chávez, G., 2019, Inactivation of the quorum-sensing transcriptional regulators lasr or rhlr does not suppress the expression of virulence factors and the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Microbiology*, 165 (4), 425-432.
- Stadhouders, R., Pas, S.D., Anber, J., Voermans, J., Mes, T.H., Schutten, M., 2010, The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay, *Journal of molecular diagnosis*, 12 (1):109-117.
- Studt, L., Wiemann, P., Kleigrew, K., Humpf, H.U., Tudzynski, B., 2012, Biosynthesis of fusarubins accounts for pigmentation of *Fusarium fujikuroi* perithecia, *Applied environmental microbiology*, 78: 4468–4480.
- Tag, A.J., Hicks, G., Garifullina, C., Ake, T.D., Phillips, M., Beremand, Keller, N.P., 2000, G-protein signalling mediates differential production of toxic secondary metabolites., *Molecular microbiology*, 38, 658-665.
- Thongkamngam T., Jaenaksorn T., 2017, *Fusarium oxysporum* (F221-B) as biocontrol agent against plant pathogenic fungi in vitro and in hydroponics, *Plant protection science*, 53, 85-95.

- Tian, J.F., Li, P.J., Li, X.X., Sun, P.H., Gao, H., Liu, X.Z., Huang, P., Tang, J.S., Yao, X.S., 2016, New antibacterial isocoumarin glycosides from a wetland soil derived fungal strain *Metarhizium anisopliae*, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 26, 1391-1396.
- Tobiasen, C., Aahman, J., Ravnholt, K.S., Bjerrum, M.J., Grell, M.N. and Giese, H., 2007, Nonribosomal peptide synthetase (NPS) genes in *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. pseudograminearum* and identification of NPS2 as the producer of ferricrocin. *Current genetics*, 51, 43–58.
- Tralamazza, S.M., Rocha, L.O., Oggenfuss, U., Correa, B., Croll, D., 2019, Complex Evolutionary Origins of Specialized Metabolite Gene Cluster Diversity Among the Plant Pathogenic Fungi of the *Fusarium graminearum* Species Complex, *Genome Biology and evolution*, 11 (11): 3106-3122.
- Valgas, C., de Souza, S.M., Smânia, E.F.A., Smânia Jr., Artur., 2007, Screening methods to determine antibacterial activity of natural products, *Brazilian journal of microbiology*, 38, 369-380.
- Vrabl, P., Schinagl, C.W., Artmann, D.J., Heiss, B., Burgstaller, W., 2019, Fungal Growth in Batch Culture - What We Could Benefit If We Start Looking Closer, *Frontiers in Microbiology*, 16 (10), 2391-2402.
- Vujanovic, V., Daida, M.A., Daida, P., 2017, qPCR assessment of aurofusarin gene expression in mycotoxigenic *Fusarium* species challenged with mycoparasitic and chemical control agents, *Biological control*, 109, 51-57.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelshoven, R., Neumann, C., Wettstein, D.V., Franken, P., Kogel, K.H., 2005, The endophytic fungus *piriformosporandica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield, *Proceedings of the national sciences*, 102, 13386-13391.
- Warren, C., Thomson, P.J., Arshad, A.P., Xuefang, G., Liu, M., Wendong, W., Sainyugu, L., Anhong, N., Jing C., Min, H., Mintao, Z., 2017, Combined effect of linolenic acid and

- tobramycin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and quorum sensing. *Experimental and therapeutic medicine*, 14: 4328-4338.
- Weber, G., Schörgendorfer, K., Schneider-Scherzer, E., Leitner, E., 1994, The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame, *Current genetics*, 26 (2), 120-125.
- Weismann, K., 2009, Introduction to Polyketide Biosynthesis, *Methods in enzymology*, 459 (B), 3-16.
- Westphal, K.R., Wollenberg, R.D., Herbst, F.A., Sørensen, J.L., Sondergaard, T.E., Wimmer, R., 2018, Enhancing the Production of the Fungal Pigment Aureofusarin in *Fusarium graminearum*, *Toxins*, 10 (11), 485-496.
- Wo, G., Jahnsen, S., Lorck, H., Roholt, K., Tybring, L., 1962, Fusidic acid, a new antibiotic, *Nature*, 193: 987-995.
- Wolf, J.C., Mirocha, C.J., 1973, Regulation of sexual reproduction in *Gibberella zeae* (*Fusarium roseum graminearum*) by zearelenone, *Canadian journal of microbiology*, 19, 725-734.
- Wong, P., Walter, M., Lee, W., 2011, FGDB: revisiting the genome annotation of the plant pathogen *Fusarium graminearum*, *Nucleic acids research*, 39, 637-639.
- Yli-Mattila, T., Gagkaeva, T., Ward, T.J., Aoki, T., Kistler, H.C., O'Donnell K., 2009, A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East, *Mycologia*, 101, 841–852.
- Yörük, E., 2009, *Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum* izolatlarının rapd markırlarına dayalı genetik tiplendirmesi, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Yörük, E., Albayrak, A., 2013, Genetic characterization of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by using random-amplified polymorphic DNA, *Genetics and molecular research*, 12 (2), 1360-1372.

- Yu, J., Butchko, R.A.E., Fernandes, M., 1996, Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene *aflR* from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*, *Current genetics*, 29, 549-555.
- Yu, J.H., Keller, N., 2005, Regulation of Secondary Metabolism in Filamentous Fungi, *Annual review of phytopathology*, 43 (1), 437-458.
- Zuber, S., Hynes, M.J., 2003, The G-protein α -subunit GasC plays a major role in germination in the dimorphic fungus *Penicillium marneffe*, *Genetics*, 164, 487-499.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Aylin GAZDAĞLI
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	https://yoksis.yok.gov.tr/menu/menu.zul

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Mezuniyet Yılı	14.06.2013

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Tezli Yüksek Lisans Programı

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler

- Gazdağlı A., Albayrak G., 2023, Characterization Of *cox3* And *Rnl* Genes Encoded In Mitochondria of *Fusarium graminearum*, Trakya Journal of Natural Sciences, 24(1).
- Gazdağlı, A., Yıldırım-Baştemur, G., Yörük, E., Perçin-Özkorucuklu, S. Albayrak, G., 2023, Molecular analysis of the genes responsible for catalysing intracellular steps of aurofusarin biosynthesis in *Fusarium culmorum*, Brazilian Archives of Biology and Technology, 66, 1-18.
- Yörük, E., Gazdağlı, A., Albayrak, G., (2014) Class B trichotecene genotyping in *Fusarium* species by PCR assay, Genetika Belgrade, 46(3):661-669.
- Yörük, E., Karlık, E., Gazdagli, A., Kayış, M., Kaya, F., Albayrak, G., (2015) Expression Analysis of *PKS13*, *FG08079.1* and *PKS10* Genes in *Fusarium*

- graminearum* and *Fusarium culmorum*, Iranian Journal of Biotechnology, 13(2):53-57.
- Yörük, E., Gazdağlı, A., Albayrak, G., Sharifnabi, B., (2016) Genetic Diversity Among *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* Isolates Based on ISSR Markers, Archives of Biological Sciences, 68(2):333-343.
- Gazdağlı, A., Sefer, Ö., Yörük, E., Varol, G.İ., Teker, T., Albayrak, G. (2018) Investigation of Camphor Effects on *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* at Different Molecular Levels 7(4): pp. 1-11.
- Albayrak, S., Albayrak, G., Terzi-Çelikkol, M., Gazdağlı, A., Yörük, E., Çağlar, S. (2019) The effects of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds on antioxidant enzyme activities in *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 from Istanbul Strait, 149, pp. 1-11.
- Yörük, E., Gazdağlı, A., Albayrak, G., (2017) Effects of Growth Conditions on *tri4* Gene Expression in *Fusarium culmorum*, Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpasa University, 34 (2), 91-97
- Yörük, E., Gazdağlı, A., Albayrak, G., 2012, Genotyping of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates by microsatellite markers, Eurobiotech 2012 Agriculture Symposium, , 12-14 April, Kayseri, Turkey, Journal of Biotechnology, S16
- Albayrak, S., Albayrak, G. , Gazdağlı, A., Yörük, E., Çelikkol Terzi, M., Çağlar, S. Investigation of the Effects of PAH Compounds on *Mytilus galloprovincialis* at Molecular Level. European Conference on Science, Art and Culture. 19-22 April 2018, Antalya, Turkey, pp: OP-087 (104)
- Gazdağlı, A., Albayrak, G., CAPS Marker Polymorphisms in *Fusarium culmorum*. 3-5 May 2018, Eskişehir, Turkey, in press
- Gazdağlı, A., Sefer, Ö., Yörük, E., Varol, G.İ., Albayrak, G., 2018, Investigation On The Terpinolene Effects In *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* (At Different Molecular Levels), Gece Publishing, pp. 33-42, ISBN: 978-605-288-613-7
- Gazdağlı, A., Albayrak, G., Characterization of *cox3* gene found in mitochondria of *Fusarium graminearum*, 4. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 24-28 Ağustos 2015, Afyon, Türkiye
- Yörük, E., Gazdağlı, A., Albayrak, G., Effects of growth conditions on *tri4* gene expression of *Fusarium culmorum*,. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 24-28 Ağustos 2015, Afyon, Türkiye
- Yörük, E., Gazdağlı, A., Karlık, E., Kayış, M., Kaya, F., Albayrak, G., 2013, Mycotoxin profiling of *Fusarium* spp. From Turkey || Second International Congress of the Molecular Biology Congress of the Molecular Biology Association of Turkey 2013, 22-23th November, Istanbul, Turkey, S78.
- Yörük, E., Gazdağlı, A., Albayrak, G., Geliştirilen Yeni Genik Mikrosatellit Markırlarının *Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum* İzolatlarında Analizi, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, İzmir, S314-315