



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LİNALOOL'ÜN *Fusarium graminearum*'DAKİ ETKİLERİNİN
HÜCRESEL GÖSTERİMİ**

Büşra Nur ÇETİN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK**

**II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Emre YÖRÜK**

Ağustos, 2021

İSTANBUL

Bu çalışma, 17.08.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

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

Prof. Dr. Ercan ARICAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Hızlan Hıncal AĞUŞ
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen Edebiyat 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 aboneli 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 32648 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübesi, sabrı ve sevgisiyle her daim bana destek olup yanımda olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK'a,

Yaptığım çalışmalar boyunca bana vakit ayıran, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Emre YÖRÜK'e,

Çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma,

İ.Ü. Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü saygı değer öğretim üyeleri başta olmak üzere eğitim hayatım boyunca üzerimde emeği olan tüm değerli hocalarıma,

Bu çalışmayı destekleyen İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve çalışmalarım süresince imkânlarından yararlandığım İ.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalına,

Gece, gündüz demeden her zaman yanımda olup destek olan sevdiklerime,

Teşekkür eder, en içten şükranlarımı sunarım.

Ağustos 2021

Büşra Nur ÇETİN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	2
2.1.BİTKİ PATOJENİ <i>FUSARIUM SPP</i>	2
2.1.1. <i>Fusarium graminearum</i>	4
2.2.STRESE YANIT MEKANİZMALARI.....	8
2.2.1.Reaktif Oksijen Türleri.....	8
2.2.1.1. <i>Antioksidan Savunma Sistemleri ve Oksidatif Stres</i>	10
2.2.2. Hücre Ölüm Mekanizmaları	12
2.3. ESANSİYEL YAĞLAR	13
2.3.1. MONOTERPENLER VE ETKİ MEKANİZMALARI	16
2.3.1.1. Linalool.....	17
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	21
3.1. KULLANILACAK SOLÜSYONLAR VE BESİ ORTAMLARININ HAZIRLANMASI, İZOLATLARIN YETİŞTİRİLMESİ.....	21
3.1.1. Besi Ortamlarının Hazırlanması.....	21
3.1.2. TBA Reaktifinin Hazırlanması	21
3.1.3. Fosfat Tamponunun Hazırlanması	22
3.1.4. Protein Derişimi Belirlemede Kullanılacak Tamponların Hazırlanması.....	22
3.1.5. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılacak Tamponun Hazırlanması.....	23
3.1.6. Fosfat Tamponu Tuzu Solüsyonunun Hazırlanması	23
3.1.7. Ao/EtBr Boyalarının Hazırlanması	23
3.1.8. Fungal Suşların Yetiştirilmesi.....	24

3.2. MİK DEĞERİNİN BELİRLENMESİ	24
3.3. WST-1 HÜCRE CANLILIK TESTLERİ	24
3.4. HÜCRE İÇİ LİPİD PEROKSİDASYON DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ	25
3.5. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ	25
3.6. ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ	25
3.6.1. Protein İzolasyonu ve Protein Derişiminin Belirlenmesi	26
3.6.2. Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....	26
3.6.3. Katalaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....	27
3.6.4. SOD Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....	27
3.7. FLORESAN MİKROSKOBUNDA HÜCRESEL GÖSTERİM.....	28
3.7.1. Hücre Fiksasyonu	28
3.7.2. Ao/EtBr Çift Boyama Deneyleri	28
3.7.3. H ₂ DCF-DA Analizleri	28
3.8. LİNALOOLÜN DON ÜRETİMİNE ETKİSİ.....	29
4. BULGULAR	30
4.1. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI.....	30
4.2. MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYONU DEĞERİNİN BELİRLENMESİ.....	30
4.3. WST-1 HÜCRE CANLILIK TESTLERİ	32
4.4. HÜCRE İÇİ LİPİD PEROKSİDASYON DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ	33
4.5. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ	34
4.6. ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ	36
4.6.1. Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....	36
4.6.2. Katalaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....	37
4.6.3. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü	38
4.7. FLORESAN MİKROSKOBUNDA HÜCRESEL GÖSTERİM.....	39
4.7.1. Ao/EtBr Çift Boyama Deneyleri	40
4.7.2. H ₂ DCF-DA Analizleri	41
4.8. LİNALOOLÜN DON ÜRETİMİNE ETKİSİ.....	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	44
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	71

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: <i>Fusarium</i> spp.'de değişken üreme döngüleri (Ma ve diğ., 2013). <i>F. graminearum</i> (Fg); <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol); <i>F. pseudograminearum</i> (Fp); <i>F. solani</i> f. sp. <i>pisi</i> (Fs); <i>F. verticillioides</i> (Fv).....	3
Şekil 2.2: <i>F. graminearum</i> tür kompleksinin yaşam döngüsü (Trail, 2009).....	7
Şekil 2.3: SOD enziminin kataliz ettiği reaksiyon.	9
Şekil 2.4: Geçiş metallerinin oto-oksidasyonu sonucu $O_2\bullet$ oluşumu. 1) Fe^{+2} 'nin oto-oksidasyonu. 2) Cu^{+} 'ın oto-oksidasyonu.....	9
Şekil 2.5: Geçiş metalleri varlığında $OH\bullet$ oluşumu. 1) Fenton reaksiyonu. 2)Haber-Weiss Reaksiyonu.	9
Şekil 2.6: Hücre içi ROS döngüsü. ETC'de bulunan ve geçiş metalleri içeren enzimler ile O_2 'nin etkileşimi sonucu $O_2\bullet$ oluşur. Oluşan $O_2\bullet$ SOD aracılığı ile H_2O_2 'ye, sonrasında ise KAT veya POD aracılığı ile O_2 'ye dönüştürülür. Ancak H_2O_2 , geçiş metalleri ile etkileşerek Haber-Weiss veya reaksiyonlarıyla güçlü bir ROS olan $OH\bullet$ 'a dönüştürülür. Oluşan $OH\bullet$, LH ile etkileşerek lipid peroksidasyonu sürecini başlatabilir. Lipid radikalleri, elektron donörü olarak indirgenmiş glutatyonu (GSH) kullanan glutatyon disülfid (GSSG) ile etkileşerek birbirlerine ve stabil bozunma ürünlerine dönüştürülmektedir (Yin, Xu ve Porter, 2011; Rama ve García, 2016).....	11
Şekil 2.7: Enzimatik oksidatif stres mekanizması. 1) SOD'un gerçekleştirdiği reaksiyon. 2) KAT'ın gerçekleştirdiği reaksiyon. 3 ve 4) GPx'in gerçekleştirdiği reaksiyonlar.	12
Şekil 2.8: MVA ve DCP/MEP yolağı ile terpenlerin biyosentezi (Connolly ve Hill, 1992).....	15
Şekil 2.9: Linaloolün biyosentezi ve oluşan enantiyomer yapıları.	18
Şekil 4.1: Kontrol ve deney gruplarının 7. gündeki petri görüntüsü. 1A: Sadece PDA besi ortamında üretilen PH-1 kontrol grubu, 2A: %0,15 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu, 3A: %0,30 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu, 4A: %0,45 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu, 5A: %0,60 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu.	31
Şekil 4.2: <i>F. graminearum</i> PH-1 suşunun 3., 5. ve 7., günlerde deney ve kontrol gruplarında üreme miktarı.	32
Şekil 4.3: <i>F. graminearum</i> PH-1 referans suşunda kontrol ve deney gruplarındaki % hücre canlılığı.	33

Şekil 4.4: <i>F. graminearum</i> PH-1 referans suşunda kontrol ve deney gruplarının 7 günlük kültürlerinden belirlenen MDA birikimindeki değişimlerinin grafiklerle gösterimi.	34
Şekil 4.5: <i>F. graminearum</i> PH-1 referans suşunda kontrol ve deney gruplarında hücre içi oksidasyon değerleri.....	35
Şekil 4.6: <i>F. graminearum</i> PH-1 referans suşunda kontrol ve deney gruplarında spesifik POD enzim aktiviteleri.....	37
Şekil 4.7: <i>F. graminearum</i> PH-1 referans suşunda kontrol ve deney gruplarında spesifik KAT enzim aktiviteleri.....	38
Şekil 4.8: <i>F. graminearum</i> PH-1 referans suşu kontrol ve deney gruplarında SOD enzim aktivitelerini ifade eden % inhibisyon değerleri.	39
Şekil 4.9: <i>F. graminearum</i> PH-1 referans suşunda kontrol ve deney gruplarında misel çapları.	40
Şekil 4.10: Ao/EtBr boyaması yapılan hücrelerin ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri. 1A: Sadece PDA besi ortamında üretilen PH-1 kontrol grubu, 2A: %0,15 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu, 3A: %0,30 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu, 4A: %0,45 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu*: Floresan mikroskobu.	41
Şekil 4.11: H ₂ DCF-DA boyaması yapılan hücrelerin ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri. 1A: Sadece PDA besi ortamında üretilen PH-1 kontrol grubu, 2A: %0,15 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu, 3A: %0,30 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu, 4A: %0,45 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu. *: Floresan mikroskobu.	42
Şekil 4.12: <i>F. graminearum</i> PH-1 kontrol ve deney gruplarından ve H-11'den elde edilen mikotoksin ekstraktlarının 356 nm UV ışık altındaki TLC plaka görüntüleri (ok işareti 0,28 R _f değerindeki DON spotunu göstermektedir).	43

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: <i>Fusarium</i> türlerinin mikotoksin üretme yeteneklerine göre gruplandırması (Shi ve diğ., 2016).....	4
Tablo 2.2: Bitkilerdeki EY’larda linaloolün enantiyomer yapılarının oranı ve kaynakları.	19
Tablo 3.1: Besi ortamlarına ait bileşenler ve miktarları, pH 5,6.	21
Tablo 3.2: Fosfat tamponun bileşen ve miktarları, pH 7,0.....	22
Tablo 3.3: Protein derişimi belirlemede kullanılacak tampon bileşenleri ve miktarları.	22
Tablo 3.4: SOD aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler.....	23
Tablo 3.5: Hücresel gösterim deneylerinde kullanılacak bileşenler ve miktarları.	23
Tablo 4.1: Polimerizasyonu tamamlanmamış PDA besiyerlerine linaloolün v/v olarak eklenmesi sonrası MİK değeri taraması deneylerinde radyal üreme çapları.....	31
Tablo 4.2: Linaloolün <i>F. graminearum</i> PH-1 suşunda % Hücre canlılığı üzerindeki etkisi (SH: standart hata).	33
Tablo 4.3: Linaloolün <i>F. graminearum</i> PH-1 suşunda hücre içi lipid peroksidasyonu üzerine etkisi (SH: standart hata).....	34
Tablo 4.4: <i>F. graminearum</i> PH-1 referans suşunda kontrol ve deney gruplarında hücre içi oksidasyon deneyinde elde edilen maksimum slope değerleri (SH: standart hata).	35
Tablo 4.5: Linaloolün <i>F. graminearum</i> PH-1 suşunda spesifik POD enzim aktiviteleri (SH: standart hata).	36
Tablo 4.6: Linaloolün <i>F. graminearum</i> PH-1 suşunda spesifik KAT enzim aktiviteleri (SH: standart hata).	37
Tablo 4.7: Linaloolün <i>F. graminearum</i> PH-1 suşunda spesifik SOD enzim aktivitelerini ifade eden % inhibisyon değerleri (SH: standart hata).....	38
Tablo 4.8: Linaloolün <i>F. graminearum</i> PH-1 suşunda doz artışına bağlı misel çapları (SH: standart hata).	40

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
Ao	: Akridin Turuncusu
Abs	: Absorbans
w	: Ağırlık
α	: Alfa
Cu	: Bakır
C	: Çözelti Konsantrasyonu
dk	: Dakika
rpm	: Dakikadaki devir sayısı, “Revolutions Per Minute”
Δ	: Delta
Fe	: Demir
EtBr	: Etidyum Bromür
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Glutasyon Disülfid
g	: Gram
v	: Hacim
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
OH•	: Hidroksil Radikali
l	: Işığın çözelti içinde katettiği yol
kg	: Kilogram
LH	: Lipidler
LOOH	: Lipid Hidroperoksit
LOO•	: Lipid Hidroperoksit reduced form
L•	: Lipid Radikali
L	: Litre
μL	: mikrolitre
μg	: mikrogram
mg	: Miligram
M	: Molar
mM	: Milimolar
ϵ	: Molar Absorpsiyon Katsayısı (L/mol/cm)

O₂	: Moleküler Oksijen
nm	: nanometre
R•	: Radikal
°C	: Santigrat Derece
cm²	: Santimetre Kare
½O₂	: Singlet Oksijen
H₂O	: Su
O₂•	: Süperoksit Radikali
W	: Watt
%	: Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi, “US Food & Drug Administration”
3ADON	: 3-Asetil Deoksinivalenol
15ADON	: 15-Asetil Deoksinivalenol
ECHA	: Avrupa Kimyasallar Ajansı, “European Chemicals Agency”
EFEÖ	: Avrupa Uçucu Yağlar Federasyonu, “European Federation of Essential oil”
XTT	: 2,3-Bis-(2-Metoksi-4-Nitro-5-Sülfofenil)-2H-Tetrazolyum-5-Karboksianilid, “2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide”
DXP	: 1-Deoksi-D-Ksilüloz-5-Fosfat
DON	: Deoksinivalenol
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol, “4',6-diamidino-2-phenylindole”
DMAPP	: Dimetilasilidifosfat
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromür, “3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-tetrazolium Bromide
ETS	: Elektron Taşıma Sistemi
FasL	: Fas Ligandı
FITC	: Floresan İzotiyosiyanat, “Fluorescein Isothiocyanate”
PBS	: Fosfat Tamponu Tuzu, “Phosphate Buffer Saline”
FB1	: Fumonisin B1
FB2	: Fumonisin B2
Fus-X	: Fusarenon X
FHB	: Fusarium Başak Yanıklığı, “Fusarium Head Blight”
GRAS	: Genel Olarak Güvenli, “generally recognised as safe”

GPP	: Geranilpirofosfat
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
4-HNE	: 4-hidroksinonenal
IC₂₅	: İnhibisyon Konsantrasyonunun %25'i, "25% inhibition concentration"
IC₅₀	: İnhibisyon Konsantrasyonunun %50'si, "50% inhibition concentration"
IC₇₅	: İnhibisyon Konsantrasyonunun %75'i, "75% inhibition concentration"
TLC	: İnce Kağıt Kromatografisi, "Thin Layer Chromatography"
IPP	: İzoprenildifosfat
KAT	: Katalaz
CST	: Karpel Tünel Sendromu, "Carpel Tunel Syndrome"
EC₅₀	: Mantar Büyümesinin %50 Engellendiği Konsantrasyon, "the Effective Concentration at which the Fungal Growth is Inhibited by 50%"
Mat	: Mating Type
MDA	: Malondialdehit, "Malondialdehyde"
MEP	: 2C-Metil-D-Eritritol-4-Fosfat
MVA	: Mevalonat
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
NEO	: Neosolaniol
NADP⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat, "Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate"
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat İndirgenmiş Form, "Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form"
NBT	: Nitroblue Tetrazolyum
NIV	: Nivalenol
OD	: Optik Densite
PDA	: Patates Dekstroz Agar
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri, "Reactive Oxygen Species"
SNA	: Sentetik Nutrient Agar
BSA	: Sığır Serum Albumin, "Bovine Serum Albumin"
SH	: Standart Hata
WST	: Suda Çözünebilir Tetrazolyum Tuzu, "Water Soluble Tetrazolium"
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi, "Single Nucleotide Polymorphism"
TBA	: Tiyobarbitürik Asit, "Thiobarbituric acid"
TBARS	: Tiyobarbitürik Asit Belirteci, "Thiobarbituric acid reactive substances"

TCA	: Trikloroasetik Asit, “Trichloroacetic acid”
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör- α , “Tumor Necrosis Factor- α ”
IFRA	: Uluslararası Koku Birliği, “The International Fragrance Association”
JECFA	: Uluslararası Ortak FAO/WHO Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi, “Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives”
NX-2	: Yeni Triketesen Mikotoksin-2, “new trichothecene mycotoxin-2”
NX-3	: Yeni Triketesen Mikotoksin-3, “new trichothecene mycotoxin-3”
ZEN	: Zearalenon



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LİNALOOL'ÜN *Fusarium graminearum*'DAKİ ETKİLERİNİN HÜCRESEL GÖSTERİMİ

Büşra Nur ÇETİN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Gülrüh ALBAYRAK

II. Danışman: Doç. Dr. Emre YÖRÜK

Yüksek lisans tezi kapsamında uçucu esansiyel yağ (EY) bileşenlerinin terpen alkolü bir fitokimyasalı olan linaloolün *Fusarium graminearum* PH-1 referans suşu üzerine etkileri hücresel düzeyde (oksidatif stres, apoptoz süreçleri ile hücre canlılığı ve mikotoksin üretimi ile ilişkili olarak) araştırıldı.

Linaloolün *F. graminearum* PH-1 referans suşu üzerindeki minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) 52,2 mg/L olarak bulundu. Deneylerde linalool içermeyen patates dekstrozu agar (PDA) besi ortamında yetiştirilen kültürler kontrol grubu olarak ifade edildi. Linaloolün radyal üremeyi maksimum inhibe eden konsantrasyonun %25, %50 ve %75'ine karşılık gelen IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ dozları sırasıyla 13,05 mg/L; 26,1 mg/L ve 37,15 mg/L olarak hesaplandı. Bu dozların radyal büyüme oranını azalttığı, azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu (p<0,0001) belirlendi. Linaloolün hücre canlılığı üzerine etkisi WST-1 testi ile belirlendi. IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ dozları canlı hücre sayısını kontrole göre sırasıyla %33,09; %76,44 ve %86,03 oranında azalttı (p<0,0001). Linaloolün lipid peroksidasyonu üzerine etkisi TBARS testi ile incelendi. Lipid peroksidasyonun IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ dozlarında kontrol grubuna göre sırasıyla %64,68; %145,16 ve %392,47 oranında arttığı belirlendi (p<0,0001). Linaloolün IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ dozlarının hücre içi oksidasyonu kontrol grubuna göre sırasıyla %467, %1477 ve %3523 oranında arttığı spektrofotometrik yöntemle ortaya kondu (p<0,0001). Linalool dozundaki artışa bağlı olarak peroksidaz (POD) enzim aktivitesinde IC₂₅ için %83,6; IC₅₀ için %213,7 ve

IC₇₅ için %407,7 artış olduğu gösterildi. Katalaz (KAT) enzim aktivite değeri artışları sırasıyla %180 (IC₂₅), %409 (IC₅₀) ve %1180 (IC₇₅) olarak hesaplandı. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivite artışları da %847 (IC₂₅), %1840 (IC₅₀) ve %2340 (IC₇₅) olarak belirlendi (p<0,0001). SOD aktivitesindeki şiddetli artışın, linaloolün oksidatif stresi arttırmasına bağlı olarak hücre içindeki H₂O₂ konsantrasyonunu arttırmasından kaynaklandığı düşünüldü. POD ve KAT aktivitesinin SOD'a göre düşük olması ve KAT aktivitesinin IC₇₅'teki artışı ise POD'un H₂O₂ açısından doyma noktasına ulaştığını düşündürdü. Işık mikroskobu incelemesinde, linaloolle muamele edilmiş PH-1 referans suşunda hücresel düzeyde farklılıklar izlendi. Linalool konsantrasyon artışı deney gruplarının hücre ve organellerinde kontrole göre şişmeye, miselyum yapısında kalınlaşmaya neden oldu. Ek olarak klamidospore-benzeri yapı oluşumları gözlemlendi. Stres etkisi spor oluşumunu baskıladı. Linalool tarafından tetiklenen oksidatif stres ve apoptotik etkiler sırasıyla 2',7'-diklorodihidroflorescein diasetat (H₂DCF-DA) boyaması ve akrinin turuncusu/etidyum bromür (At/EtBr) ikili boyaması kullanılarak floresan mikroskobunda hücresel düzeyde görüntüldü. Linalool konsantrasyonu artışına bağlı olarak oksidatif streste artışı H₂DCF-DA boyaması sonucu artan yeşil ışık şiddeti ile ortaya çıktı. Ayrıca, linaloolün neden olduğu deoksinivalenol (DON) mikotoksini üretim miktarı üzerindeki etkisi ince tabaka kromatografisi (ing., thin layer chromatography-TLC) ile gösterildi. DON mikotoksininin incelendiği 0,28 R_f değerinde spot gözlemlenmedi.

Yüksek lisans tezi kapsamında, aromatik bitki türlerinde çiçek aromasına sahip ve doğal olarak bulunan, monotermen bir EY bileşeni olan linalool fitokimyasalının çok düşük konsantrasyonda fungal büyümeyi inhibe ettiği *F. graminearum* PH-1 referans suşu üzerinde gösterildi. Linaloolün hücrelerde oksidatif strese bağlı olarak meydana getirdiği etkiler gerçek zamanlı olarak incelenerek hidrofobik yapıdaki EY'ların patojenik mantar türleri ile mücadelede güçlü bir antifungal ajan olarak kullanıma potansiyelini ortaya çıktı.

Ağustos 2021, 88 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Fusarium graminearum*, oksidatif stres, esansiyel yağ, antioksidan enzim.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

CELLULAR DISPLAY OF THE EFFECTS OF LINALOOL ON *Fusarium graminearum*

Büşra Nur ÇETİN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emre YÖRÜK

In this master thesis, the effects of linalool, which is a terpene alcohol phytochemical of volatile essential oil (EO) components on *Fusarium graminearum* PH-1 reference strain at the cellular level (associated with oxidative stress, apoptosis processes, cell viability and mycotoxin production).

The minimum inhibitory concentration (MIC) of linalool on the *F. graminearum* PH-1 reference strain was found as 52,2 mg/L. In the experiments, cultures without linalool addition was grown on potato dextrose agar (PDA) medium called as a control group. The IC₂₅, IC₅₀ and IC₇₅ doses of linalool corresponding to 25%, 50% and 75% of the concentration that maximally inhibits radial growth were calculated as 13,05 mg/L; 26,1 mg/L; and 37,15 mg/L. It was shown that these doses decreased the radial growth rate and the decrease was statistically significant ($p < 0,0001$). Effect of linalool on cell viability was determined via WST-1 test. IC₂₅, IC₅₀ and IC₇₅ doses reduced number of viable cells in the ratio of 33,09%; 76,44% and 86.03% (respectively) compared to the control group ($p < 0,0001$). The effect of linalool on lipid peroxidation was studied via TBARS test. It was measured that IC₂₅, IC₅₀ and IC₇₅ doses increased lipid peroxidation 64,68%; 145,16% and 392,47% (respectively) compared to the control group ($p < 0,0001$). Intracellular oxidation of linalool at IC₂₅, IC₅₀ and IC₇₅ doses was

demonstrated by spectrophotometric method, which increased by 467%, 1477% and 3523%, respectively, compared to the control group ($p < 0,0001$). It was shown that peroxidase (POD) enzyme activity increased by 83,6% for IC_{25} ; 213,7% for IC_{50} and 407,7% for IC_{75} depending on the increase in linalool dose. Catalase (KAT) enzyme activity value increases were calculated as 180% (IC_{25}), 409% (IC_{50}) and 1180% (IC_{75}), respectively. Superoxide dismutase (SOD) activity increases were also determined as 847% (IC_{25}), 1840% (IC_{50}) and 2340% (IC_{75}) ($p < 0,0001$). It was thought that the severe increase in SOD activity was due to the fact that linalool increased the H_2O_2 concentration in the cell due to increasing oxidative stress. The fact that POD and CAT activity were lower than SOD and the increase in CAT activity at IC_{75} suggested that POD had reached the saturation point in terms of H_2O_2 . In the light microscopy examination, differences at the cellular level were observed in the reference strain PH-1 treated with linalool. The increase in linalool concentration caused swelling in the cells and organelles of the experimental groups compared to the control, and thickened the mycelium structure. In addition, chlamidospore-like structure formations were observed. The stress effect suppressed spore formation. Oxidative stress and apoptotic effects induced by linalool were visualized at the cellular level in fluorescence microscopy using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCF -DA) staining and acridine orange/ethidium bromide (At/EtBr) dual staining, respectively. The increase in oxidative stress due to the increase in linalool concentration was revealed by increasing green light intensity as a result of H_2DCF -DA staining. In addition, the effect of linalool on the amount of deoxynivalenol (DON) mycotoxin production was demonstrated via thin layer chromatography (TLC). No spot was observed at an R_f value of 0,28; where DON mycotoxin was examined.

In the context of the master thesis, it was demonstrated that linalool; which have flower aroma, and naturally exist in aromatic plant species, is a compound of monoterpene EOs, inhibates fungal growth at very low concentrations on *F. graminearum* PH-1 reference strain. By simultaneously examined that the effects of linalool on cells due to oxidative stress, it was revealed that the potential of using hydrophobic EOs as a potent antifungal agent in the fight against pathogenic fungal species.

August 2021, 88 pages.

Keywords: *Fusarium graminearum*, oxidative stress, essential oil, antioxidant enzyme.

1. GİRİŞ

Fusarium graminearum dünya çapında küçük taneli tahıllarda *Fusarium* başak yanıklığına (ing., Fusarium Head Blight-FHB) neden olarak çok sayıdan ülkede ekonomik açıdan kayıplara yol açan ve ürettiği mikotoksinler sebebiyle insan ve hayvan sağlığını tehdit eden *Fusarium* ailesindeki en baskın, yaygın ve yıkıcı patojendir. Patojen ile mücadelede geleneksel olarak kullanılan esansiyel yağlar (EY) ise, özgün hücresel hedefleri olmaksızın hidrofobik yapıları ve sahip oldukları OH grupları ile hücrede oksidatif stres sonucu sitotoksik etki göstermektedir. Düşük konsantrasyonlarda yüksek antifungal etki göstermeleri sebebiyle, karışım formdaki EY bileşenlerinin saf formlarının etkileri günümüzde popüler bir araştırma konusudur. Özellikle de suda çözünerek hem ekonomik hem de çevreye toksik etkisi olmayan bileşenler ile çalışılması patojen ile mücadelede önemli bir yol olmaktadır (Bakkali ve diğ., 2008; Trail, 2009; da Cruz Cabral, Fernández Pinto ve Patriarca, 2013).

Gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışmasında EY bileşenlerinden ve monoterpen ailesinden olan linaloolün *F. graminearum* PH-1 referans suşu üzerinde etkili olduğu minimum inhibisyon konsantrasyonları belirlendi. Bu değerin %25 (IC₂₅), %50 (IC₅₀) ve %75 (IC₇₅)'ine karşılık gelen dozlarının uygulandığı kültürlerde linaloolün hücre canlılığına olan etkisi suda çözünebilir tetrazolyum tuzu (ing., Water Soluble Tetrazolium-WST) testi ile analiz edildi. Linaloolün lipid peroksidasyonu üzerine etkisi tiyobarbitirik asitin belirteç olarak kullanıldığı TBARS (ing., Thiobarbituric acid reactive substances) yöntemi ile incelendi. Linaloolün hücre içi oksidasyonu üzerine etkisi spektrofotometrik yaklaşımla 2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat (H₂DCF-DA) metodu ile incelenirken; antioksidan enzim aktiviteleri peroksidaz (POD), katalaz (KAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) miktarlarında meydana gelen değişimler ile incelendi. Oksidatif stres ve apoptoz süreçleri hücresel düzeyde floresan mikroskobu ile görüntülendi. Linaloolün deoksinivenol (DON) mikotoksini üretimi üzerindeki etkisi de ince tabaka kromatografisi (ing. thin layer chromatography-TLC) kullanılarak ortaya kondu. Tez kapsamında linaloolün *F. graminearum* PH-1 referans suşunda radyal üremeyi güçlü bir şekilde inhibe edebildiği hücresel düzeyde gerçek zamanlı belirlenerek hidrofobik yapıdaki bu EY'nin hücrede oksidatif strese bağlı olarak etkili olduğu ortaya kondu.

2. GENEL KISIMLAR

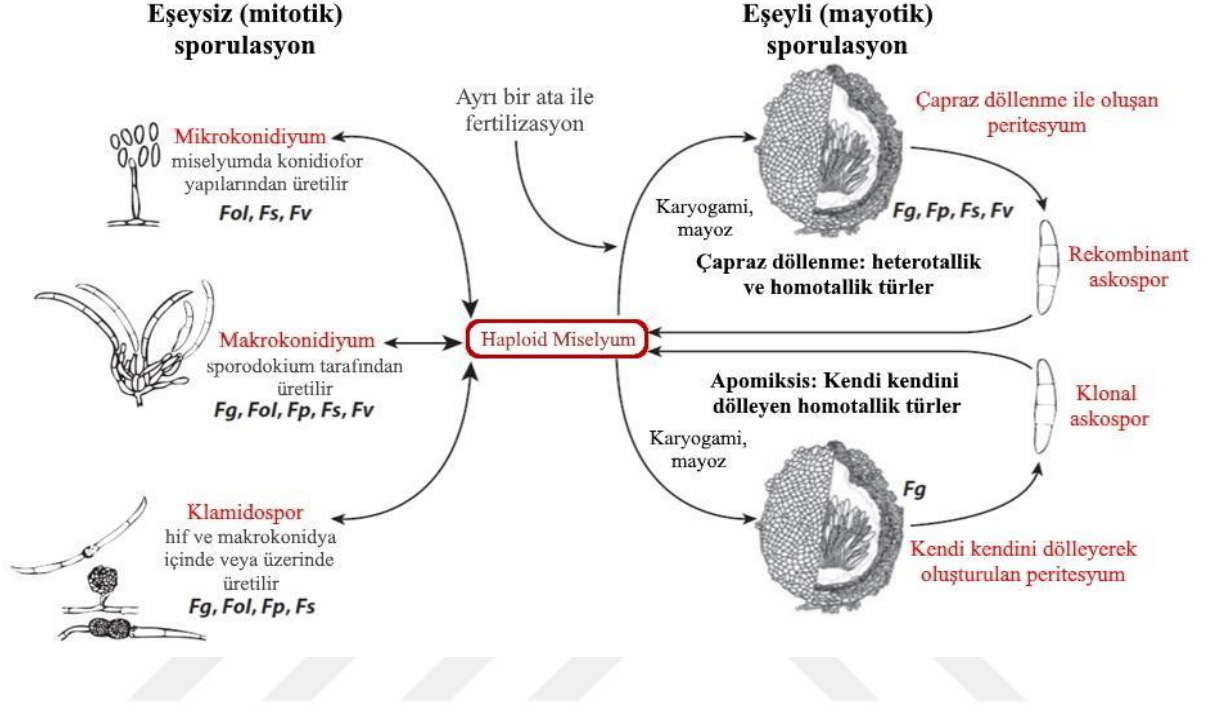
2.1.BİTKİ PATOJENİ *Fusarium spp.*

Filamentli mantar ailesinden toprak kaynaklı bitki patojeni olan *Fusarium spp.* rekabetçi saprofitik özelliğe sahip; buğday, arpa, yulaf, çavdar ve mısır gibi tahıl bitkileri ile şeker pancarı, keten, fasulye, bezelye, kuşkonmaz, kırmızı yonca, pırasa, çilek gibi farklı bitkilerde başlıca kök çürümesi ile FHB hastalıklarına neden olabilen, nemli ve yarı nemli habitatlarda etkili olan mantarlardır. Bu cins, içerisindeki 9 monotipik tür ve 60 alt türden oluşmaktadır. Resmi olarak adlandırılmamış 300'e yakın suşun olduğu da bildirilmektedir. Üreme özellikleri ile ilişkili olarak şimdiye kadar en az yedi isim (*Giberella*, *Nectria*, *Neocosmospora* vb.) verilmiş olan cins, karışıklığı önlemek için temelde *Fusarium* olarak adlandırılmıştır (Geiser ve diğ., 2013). *F. graminearum* başta olmak üzere pek çok filamentli mantar türü, evrensel olarak korunmuş biyolojik sistemleri ve üretim süreçlerindeki uygun maliyet ve kısa zamanlı üreme döngüleri nedeni ile model organizma olarak kullanılmaktadır (Brennan ve diğ., 2003; López-Berges ve diğ., 2010; Guo ve diğ., 2015; Stępień ve Lalak-Kańczugowska, 2020).

Fusarium türlerinde eşem tipi genomda taşınan eşemle ilişkili genlerin allelleri (*Mat1-1* ve *Mat 1-2*) göre tayin edilir. Eşem tipine göre mayotik (eşeyli-seksüel) ve üç tipi bulunan mitotik (eşeysiz-aseksüel) sporları üretirler (Şekil 2.1). Haploid miseller hem mayotik hem de mitotik sporulasyon süreçleri sonucunda oluşan spor yapılarından gelişir. Seksüel sporulasyonla üretilen askosporlar, peritesyum içerisinde askus kesesinde sekizli grup olarak yer alır. Homotallik türlerde eşem tipine ait hem *Mat 1-1* hem de *Mat 1-2* genleri bulunduğu için, klonal askospor dölünü (apomiksis), kendine döllenerek üretme yeteneğindedirler. Heterotallik türlerde ise eşem tiplerine ait genlerden yalnızca bir tanesi bulunmaktadır. Bunun sonucu olarak aynı türdeki iki ayrı mantarın sporlarına ait nukleusların birleştiği gözlenmiştir (Yun ve diğ., 2000; Kerényi ve diğ., 2004).

Fusarium türlerinde üç ana mitotik (eşeysiz) spor tipi tanımlanmıştır. Miselyumda basit spor oluşturan konidiyofor yapılarından küçük aseksüel sporlar (mikrokonidyum) üretilirken; uzun, kano şeklinde, septat sporlar (makrokonidyum) sporodokiyum adı verilen konidiyoforların ve/veya hava miselyumundaki konidiyofordaki yastık şeklindeki yapılardan üretilirler. Klamidosporlar ise hifin veya makrokonidyumun içinde veya üzerinde üretilen, sitolojik olarak kalın duvar yapısına sahip zorlu ortam koşullarına dirençli olan sporlardır. Hem eşeyli hem de

eşeyssiz üreme ile gerçekleşebilen yaşam döngüsü sırasında bitki dokularını enfekte edebilen ve sekonder metabolizma ürünü olan mikotoksinleri de taşıyan bu sporlar hava yoluyla yayılmaktadırlar (Ma ve diğ., 2013).



Şekil 2.1: *Fusarium* spp.'de değişken üreme döngüleri (Ma ve diğ., 2013). *F. graminearum* (Fg); *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol); *F. pseudograminearum* (Fp); *F. solani* f. sp. *pisi* (Fs); *F. verticillioides* (Fv).

Yaşam döngülerinde enfeksiyon sürecinin başlangıcında canlı bir konakçıya bulaşan türler biyotrofik, enfeksiyonun ilerlemesi ile konak hücrelere zarar vererek ölüme yol açanlar ise nekrotrofik olarak isimlendirilmektedir. Hemibiyotrofik olarak adlandırılan bazı türler ise yaşam çevrimlerinin farklı süreçlerinde biyotrofik ve nekrotrofik davranış gösterebilirler (Kerényi ve diğ., 2004). Konak özgünlüğü türden türe değişkenlik gösterir. Aynı konakta patojenik etkili olan türler genellikle aynı grup içerisinde adlandırılmaktadır. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* tek bir bitki türünde (örneğin domates) patojenik etki gösterebilirken (Baayen ve diğ., 2000); *F. graminearum* gibi tahılları hedefleyen konak aralığı sınırlı türler ile *F. culmorum* gibi geniş konak aralıklı (tahıllardan süs bitkilerine kadar geniş yelpazede) türler de bulunmaktadır (Özer, 1991; O'Donnell ve diğ., 1998).

Fusarium türleri metabolik etkinlikleri sırasında primer metabolizma ürünleri ile çok çeşitli sekonder metabolitleri de üretmektedirler. Bunlar arasında mikotoksin olarak adlandırılan grup hububatta önemli verim ve kalite kayıplarına neden olup hububatın hem insan hem de hayvanlar

için potansiyel bir sağlık tehlikesi olmasına neden olur. *Fusarium*'un major mikotoksinleri deoksinivalenol (DON), 3-asetil deoksinivalenol (3ADON), 15-asetil deoksinivalenol (15ADON), nivalenol (NIV) ve fusarenon X (Fus-X); T-2 toksini, HT-2 toksini, neosolaniol (NEO) ve diasetoksisirpenol (DAS); zearalenon (ZEN), fumonisin B1 (FB1), fumonisin B2 (FB2) ve fusarik asittir (Shi ve diğ., 2016). Bu mikotoksinler farklı grup ve altgruplar altında toplanarak incelenmektedirler (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: *Fusarium* türlerinin mikotoksin üretme yeteneklerine göre gruplandırması (Shi ve diğ., 2016).

Grup	Tür Adı	Major Mikotoksinleri	Ürettiği Diğer Mikotoksinler	
Grup I (Fusarik Asit)	Alt grup-I (Fusarik Asit ve Fumonisin)	<i>F. proliferatum</i>	FB1, FB2, Fusarik Asit	-
		<i>F. verticillioides</i>	FB1, FB2, Fusarik Asit	-
		<i>F. fujikuroi</i>	FB1, FB2, Fusarik Asit	-
		<i>F. solani</i>	FB1, FB2, Fusarik Asit	-
	Alt grup-II (Sadece Fusarik Asit)	<i>F. temperatum</i>	Fusarik Asit	-
		<i>F. subglutinans</i>	Fusarik Asit	-
		<i>F. musae</i>	Fusarik Asit	-
		<i>F. tricinctum</i>	Fusarik Asit	-
		<i>F. oxysporum</i>	Fusarik Asit	-
		<i>F. equiseti</i>	Fusarik Asit	-
		<i>F. sacchari</i>	Fusarik Asit	-
		<i>F. concentricum</i>	Fusarik Asit	-
		<i>F. andiyazi</i>	Fusarik Asit	-
		Grup II (Tip A Trikotasen)	<i>F. langsethiae</i>	T-2, HT-2, NEO, DAS
<i>F. sporotrichioides</i>	T-2, HT-2, NEO, DAS		-	
<i>F. polyphialidicum</i>	DAS		-	
Grup III (Tip B Trikotasen)	<i>F. culmorum</i>	NIV, Fus-X	T-2, HT-2, NEO, ZEN	
	<i>F. poae</i>	NIV, Fus-X	T-2, HT-2, NEO, DAS	
	<i>F. meridionale</i>	NIV, Fus-X	NEO, ZEN	
	<i>F. graminearum</i>	DON, 15ADON, 3ADON	ZEN	

2.1.1. *Fusarium graminearum*

F. graminearum, taksonomik olarak Ascomycota bölümü, Sordariomycetidae sınıfı, Hypocreales takımı, Nectriaceae ailesinin bir üyesidir ve tele morf ismi *Giberella zeae*'dir (Özer ve diğ., 1991; Goswami ve Kistler, 2004). Tele morf ismi populasyon terminolojisinde hala kullanılsa da günümüzde kararlaştırılarak tek ve en yaygın kullanılan ismi *F. graminearum*'dur (Samuels ve diğ., 2001; Leslie ve Bowden, 2008; Geiser ve diğ., 2013).

Sitolojik yöntemler ile gözlenebilen dört kromozomu "pulse filed" jel elektroforezinde görüntülenemeyecek kadar büyüktür (Taga ve diğ., 2003). *Fusarium*'un genom projesinden

elde edilen verilere göre, *F. graminearum* referans suşu olan PH-1'in genom boyutu 36,5 Mb, protein kodlama yapan gen sayısı 13.321 olarak belirlenmiştir. Farklı ırklarda da tüm genom, mitokondriyal genom ve tek nukleotid polimorfizmi (ing., single nucleotide polymorphism-SNP) analizine dayalı çalışmalar gerçekleştirilmiştir¹. Üreme döngüsünde homotallik askospor üretirler. Homotallik durumu, heterotallik ırklarda ayrı çekirdeklerde bulunan MAT lokusunun (idiomorflar) alternatif formlarının (*Mat1-1* ve *Mat1-2*) *F. graminearum*'daki aynı lokusta yan yana bulunmasından kaynaklanmaktadır (Yun ve diğ., 2000). İlk olarak *Aspergillus* türlerinde tanımlanmış Velvet protein kompleksinin transkripsiyon düzenleyici işlevleri ile *F. graminearum*'da seksüel askospor gelişiminde önemli olduğu ortaya konmuştur (Calvo ve diğ., 2016). Velvet proteinleri (VeA, VelB ve VelC) mantara özgü DNA-bağlanma bölgesi ile çok sayıda kompleks oluşturabilmektedir. Böylece iç ve dış sinyallere (ışık, osmotik stres vb.) yanıt oluşturmada birbirleri ve diğer proteinler ile etkileşime girebilmektedir. *F. graminearum*'da, delesyonlu VeA genine sahip suşlarda, hava hiflerinin oluşumunda ve DON biyosentezinde azalma gözlenmiştir (Jiang ve diğ., 2011; Merhej ve diğ., 2012).

F. graminearum tür kompleksine dahil olan üyeler, tip B trikotesen üreticileridir. İzolatlar, trikotesen üretme yeteneğine göre sınıflandırıldığında kemotip olarak adlandırılan 3 metabolit profili gözlenmiştir. 3ADON kemotipi DON'un üçüncü karbonuna konumlu oksijenle asetile 3ADON'u üretmektedir. 15ADON kemotipi DON'un on beşinci karbonuna konumlu oksijenle asetile olan 15ADON'u üretmektedir. NIV kemotipi NIV ve NIV'in karbon 4 asetile formu olan 4ANIV'i üretmektedir (Miller ve diğ., 1991). DON ve NIV üretiminde, bu mikotoksin grubunun üretiminden sorumlu biyosentetik yolağın enzimlerini kodlayan *Tri5* gen kümesinde yer alan *Tri7* ve *Tri13* genlerinin belirleyici olduğu ortaya konmuştur (Lee ve diğ., 2002). NIV üreticileri işlevsel *Tri7* ile *Tri13* genlerini taşıırken, DON üreticilerinde genlerin işlevsel olmayan kopyaları bulunmaktadır (Brown ve diğ., 2001). *Tri7* ve *Tri13* genlerindeki polimorfizm bu üç kemotipin etkin bir şekilde ayırt edilmesinde kullanılmaktadır (Chandler ve diğ., 2003; Jennings ve diğ., 2004; Wang ve diğ., 2008). Major ürettiği trikotesenlerin yanında *F. graminearum* tür kompleksine dahil olan üyeler, minör olarak ZEN ve Fusarin C mikotoksini de üretmektedir. Yapılan yeni çalışmalar, bazı üyelerin tip A trikotesenlerinden NX-2 (ing.,

¹ Uniprot.org. 2020, *Gibberella zeae* (Strain ATCC MYA-4620 / CBS 123657 / FGSC 9075 / NRRL 31084 / PH-1) (Wheat Head Blight Fungus) (*Fusarium graminearum*), <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000070720>, [Ziyaret Tarihi: 14 Mayıs 2021].

new trichothecene mycotoxin-2) ve NX-3 (ing., new trichothecene mycotoxin-3) ürettiğine işaret etmektedir (Desiardins ve diğ., 2007; Varga ve diğ., 2015; Munkvold, 2016).

F. graminearum dünya çapında küçük taneli tahıllarda FHB'ye neden olan *Fusarium* ailesindeki en baskın, yaygın ve yıkıcı patojendir. Tür kompleksi üyeleri hem eşeyli hem eşeysiz üreme yeteneğine sahiptir (Şekil 2.2). Kışı geçiren *F. graminearum* miselyumları ve sporları mahsullerde çoğalmakta ve başaklanma döneminde periteka, çok sayıda askosporu ortama salarken; makrokonidiyum antez süresince buğday başaklarını enfekte etmektedir (Trail, 2009). Bu sebeple enfeksiyonun iki farklı yolla başlayabileceği kabul edilmektedir. Enfeksiyon ksilem ve öz boyunca asemptomatik olarak ilerlemektedir. Kolonizasyon süreci ilerledikçe hücrelerde nekroz başlamaktadır. Bu aşamada klorenkimaların su ile dolmasıyla buğday ve arpa başakçıklarında gözlenen erken ağarma, hastalığın en önemli semptomlarından biridir. Patojen, gelişmekte olan hububatta kolonize olduğunda semptomlar çeşitlenir ve ilerleyerek tohum başının içine büzülmesine ve buruşmasına neden olmaktadır (Drakopoulos ve diğ., 2020). FHB'nin Saggittario, Tosunbey, Golia ve Yunak buğday çeşitlerinde dane ağırlığı ve karbonhidrat içeriğinde azalmaya da neden olduğu ortaya konmuştur (Mert Türk ve diğ., 2013).

kaydedilen kısa süreli bulantı ve kusma; diyare, karın ağrısı, baş ağrısı, baş dönmesi ve ateş yer almaktadır (Perkowski ve diğ., 1990). Domuz ve farelere uzun süreli DON uygulamasının apoptoz ve nekrozu arttırdığı gözlenmiştir (Sobrova ve diğ., 2010). Mikotoksinlerin insanlara, mikotoksine maruz kalan hayvanların ürünlerinin tüketilmesi ile de geçebildiği ortaya konmuştur (Zain, Bahkali ve Al-Othman, 2012; Marin, Ramos, Cano-Sancho ve Sanchis, 2013). ABD’de 1998-2000 yılları arasında *F. graminearum*’un neden olduğu mahsul kayıplarının neden olduğu zarar 2,7 milyar dolar olarak kayda geçmiştir (Nganje ve diğ., 2002).

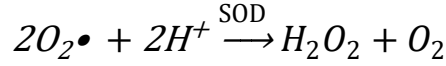
2.2.STRESE YANIT MEKANİZMALARI

2.2.1.Reaktif Oksijen Türleri

Oksijenli solunum yapan hücrelerde süperoksit radikali ($O_2^\bullet$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^\bullet$) başta olmak üzere oksijenin kısmi indirgenmesiyle oluşan radikal ve radikal olmayan oksijen türleri oluşur (Perrone ve diğ., 2008). Bu oksijen türleri, eşleşmemiş elektronları sebebiyle moleküler oksijenden daha güçlü reaktivite sergileyerek hücresel bileşenlere zarar verme kapasitesine de sahip olduklarından reaktif oksijen türleri (ing. reactive oxygen species-ROS) olarak adlandırılmaktadır. Prokaryotlarda hücre membranı, ökaryotlarda ise mitokondrideki aerobik metabolizmada, endoplazmik retikulum ve kloroplast gibi organellerde gerçekleşen elektron taşıma sistemi (ETS) süresince oluşturulmaktadır.

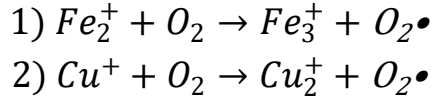
ROS’un temel kaynağı moleküler oksijendir (O_2). Hücre içerisinde bulunan geçiş metallerini (Fe, Cu vb.) içeren enzimlerle ETS’inde meydana gelen elektron kaçışları sonucu moleküler oksijene tek elektron transferi gerçekleştiğinde oksitlenme reaksiyonu meydana gelmektedir (Gutteridge, 1994). Moleküler oksijenin (O_2) eşleşmemiş elektronu ile etkileşimleri süperoksit radikalinin ($O_2^\bullet$) oluşumunda öncüdür. Mitokondride oluşan $O_2^\bullet$ yükünden dolayı membrandan geçemez, matrikste kalır. Ancak, ROS tanımında $O_2^\bullet$ kadar aktif olan hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen (1O_2) ve $OH^\bullet$ de yer almaktadır. Bu moleküller, mitokondride kalan $O_2^\bullet$ ’nin mitokondri dışına geçememesi sonucu gerçekleştiremediği zararın oluşmasında görev almaktadır (Kohen ve Nyska, 2002).

$O_2^\bullet$, yüksek derecede reaktif olmamasına karşın oldukça önemlidir. Bunun bir sebebi, hücre içinde iki $O_2^\bullet$ ’nin iki proton alması ile H_2O_2 ve O_2 oluşturmasıdır. Bu reaksiyon, SOD enzimi ile katalizlenir. Ayrıca bu süreç kendiliğinden de gerçekleşebilmektedir (Şekil 2.3) (Miao ve St. Clair, 2009).



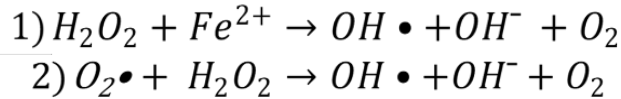
Şekil 2.3: SOD enziminin kataliz ettiği reaksiyon.

$O_2\bullet$ 'nin önemli olmasındaki bir diğer sebep ise, geçiş metallerinin indirgeyicisi olmasıdır. İndirgenmiş geçiş metallerinin (Fe^{+2} , Cu^+) oto-oksidasyonu sonucunda $O_2\bullet$ oluşmaktadır (Şekil 2.4) (Valko, Morris ve Cronin, 2005).



Şekil 2.4: Geçiş metallerinin oto-oksidasyonu sonucu $O_2\bullet$ oluşumu.
1) Fe^{+2} 'nin oto-oksidasyonu. 2) Cu^+ 'in oto-oksidasyonu.

H_2O_2 , serbest radikal olmadığı halde, serbest radikal oluşumunda önemli bir rol oynadığından ROS kapsamına girmektedir. Hücre içi H_2O_2 , geçiş metalleri (Fe^{+2} , Cu^+) varlığında Fenton reaksiyonu, $O_2\bullet$ varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu DNA, organel ve hücre zarı lipidleri, proteinler, aminoasitler, glukoz ve metallerle etkileşime girebilen en güçlü oksitleyici konumundaki $OH\bullet$ 'ni oluşturmaktadır (Şekil 2.5) (Cheeseman ve Slater, 1993).



Şekil 2.5: Geçiş metalleri varlığında $OH\bullet$ oluşumu.
1) Fenton reaksiyonu. 2) Haber-Weiss Reaksiyonu.

Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucunda meydana gelen $OH\bullet$ lipidler (LH) ile etkileşerek lipid radikallerini ($L\bullet$) oluştururlar (Volinsky ve Kinnunen, 2013). Bu ilk aşama, membran hasarları ile sonuçlanabilecek lipid peroksidasyonu sürecinin başlangıç aşaması olarak kabul edilmektedir. İlerleme aşamasında, $L\bullet$ 'ne O_2 eklenmesi sonucu lipid peroksit radikali ($LOO\bullet$) oluşur ve bu radikal ortamdaki herhangi bir diğer LH'den ayrılan hidrojen atomu ile birleşerek lipid peroksidasyonunun birincil ürünü olan lipid hidroperoksidi ($LOOH$) oluşturur. Sonuç aşamasında ise oluşan $L\bullet$ 'leri birbirleriyle reaksiyona girerek radikal olmayan ester, eter, aldehit, keton ve alkol gibi stabil bozunma ürünlerine dönüşmekte ve lipid stabilitesini negatif olarak etkilemektedir (Şekil 2.6) (Yin, Xu ve Porter, 2011).

2.2.1.1. Antioksidan Savunma Sistemleri ve Oksidatif Stres

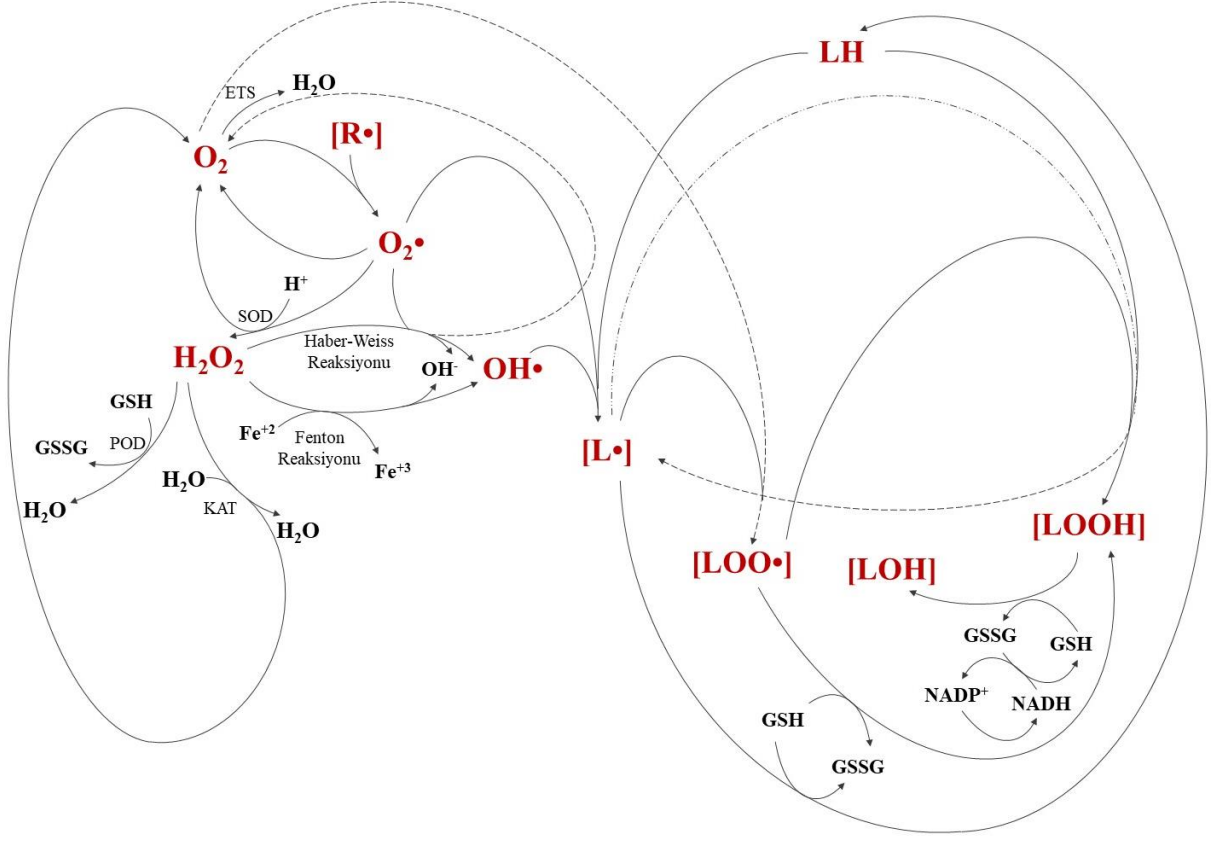
Hücrede redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin ve protein kinazların aktivasyonu başta olmak üzere çeşitli etkilere sahip olan ROS'un hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hücre içi redoks homeostazını sağlanması için düşük seviyede gerekli olduğu ortaya konmuştur (Dröge, 2002; Theopold, 2009; Bigarella ve diğ., 2014). Ancak bu moleküller, elektrona olan ilgileri sebebi ile hücre içerisinde yüksek konsantrasyonda bulunduklarında nükleik asitler, hücre içi proteinler ve membran lipitleri ile etkileşerek hücre içi hasar meydana getirebilmektedir. Özellikle DNA ile etkileşime girerek hem purin ve pirimidin bazlarına hem de deoksiriboz omurgasına zarar vererek mutasyon, karsinogenez ve yaşlanma mekanizmalarında etkili olan bu hasarların bütününe oksidatif stres denilmektedir (Ayer ve diğ., 2013; Halliwell ve Gutteridge, 2015; Brown ve diğ., 2017).

Yağda çözünür olduğundan oluştuğu yerden uzakta olan ve geçiş metalleri (Fe^{+2} , Cu^{+}) içeren hücresel membranlar ile etkileşerek $OH\cdot$ 'ni oluşturan H_2O_2 başlıca hücre içi hasardan sorumludur. En güçlü oksitleyici konumundaki $OH\cdot$ 'nin yarılanma ömrü 9^{-10} saniye olup, oluştuğu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden proton kopararak hücrede hasara neden olmaktadır (Yin, Xu ve Porter, 2011; Ayala, Muñoz ve Argüelles, 2014).

$OH\cdot$ 'nin lipidler ile etkileşiminden ortaya çıkan lipid peroksidasyonu sonucunda ikincil olarak üretilen aldehitlerden malondialdehit (MDA), propanal, heksanal ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) biyolojik olarak aktiftir (Esterbauer, Schaur ve Zollner, 1991). MDA, lipid peroksidasyonunun en mutajenik ürünü gibi görünürken, 4-HNE en toksik olandır (Esterbauer, Eckl ve Ortner, 1990). MDA, DNA ve proteinler gibi çoklu biyomoleküller ile reaksiyona girebilmekte, hücre içerisinde düzenleyici ve haberci olarak işlev gösterebilmektedir (García-Ruiz ve diğ., 2002; Blair, 2008; Wang, Lei ve Wang, 2014).

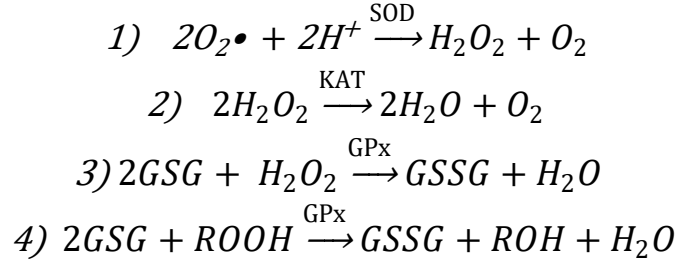
ROS'un hücre içerisinde meydana getirdiği hasarı, oksidasyonu önlemede veya azaltmada görevli sisteme antioksidan savunma sistemi denilmektedir. Oksidatif strese karşı sistemde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar hücrenin dengesini sağlamaktadır. Mekanizmalar; (i) önleyici mekanizmalar, (ii) onarım mekanizmaları, (iii) fiziksel savunmalar ve (iv) antioksidan savunmalar olarak 4 grup altında incelenmektedir. Enzimatik olmayan antioksidanlar askorbik asit (Vitamin C), α -tokoferol (Vitamin E), glutatyon (GSH),

karotenoidler, flavonoidler ve diğer antioksidanlar ile temsil edilmektedir (Cadenas, 1997). SOD, glutatyon peroksidaz (GPx) ve KAT enzimatik antioksidanlardandır.



Şekil 2.6: Hücre içi ROS döngüsü. ETC’de bulunan ve geçiş metalleri içeren enzimler ile O₂’nin etkileşimi sonucu O₂• oluşur. Oluşan O₂• SOD aracılığı ile H₂O₂’ye, sonrasında ise KAT veya POD aracılığı ile O₂’ye dönüştürülür. Ancak H₂O₂, geçiş metalleri ile etkileşerek Haber-Weiss veya reaksiyonlarıyla güçlü bir ROS olan OH•’a dönüştürülür. Oluşan OH•, LH ile etkileşerek lipid peroksidasyonu sürecini başlatabilir. Lipid radikalleri, elektron donörü olarak indirgenmiş glutatyonu (GSH) kullanan glutatyon disülfid (GSSG) ile etkileşerek birbirlerine ve stabil bozunma ürünlerine dönüştürülmektedir (Yin, Xu ve Porter, 2011; Rama ve García, 2016).

Enzimatik savunmaların hepsinin merkezinde, detoksifikasyon işlemi sırasında elektronları aktarırken farklı değerler alabilen bir geçiş metali vardır. SOD’un mitokondri ile sınırlı manganez formu ve sitosolde bulunan bakır ve çinko formu bulunmaktadır. Bu iki izoform ile O₂•’ni H₂O₂’e ve O₂’e dönüştürmektedir. H₂O₂ daha sonra, tetramerik bir selenoprotein olan KAT veya GPx aracılığıyla suya parçalanmaktadır (Şekil 2.7) (Burton ve Jauniaux, 2011).



Şekil 2.7: Enzimatik oksidatif stres mekanizması. 1) SOD'un gerçekleştirdiği reaksiyon. 2) KAT'ın gerçekleştirdiği reaksiyon. 3 ve 4) GPx'in gerçekleştirdiği reaksiyonlar.

2.2.2. Hücre Ölüm Mekanizmaları

Hücre ölüm mekanizmaları akla ilk apoptozu getirirse de otofaji ve nekroz da bulunmaktadır. Otofaji, hücresel lizozomal mekanizma kullanılarak sitoplazmik materyallerin degradasyonunu, otofajik vakuollerin oluşumunu, mitokondri, endoplazmik retikulumun ve golginin şişmesini içeren hücresel bir yıkım sürecidir (Denton ve Kumar, 2018). Hücrede temel besin maddesi kıtlığında otofajinin indüklenebildiği azot ve karbon fakiri besiyerlerinde yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir (Takeshige ve diğ., 1992; Moriyasu ve Ohsumi, 1996; Yoshimoto ve diğ., 2004). Hem prokaryot hem de ökaryotik hücrelerde stres durumunda 30'dan fazla *atg* (ing.; autophagy related genes-*atg*) geninin otofajinin programlı bir şekilde düzenlenmesinden sorumlu olduğu belirlenmiştir (Lee, Giordano ve Zhang, 2011).

Nekroz, hücre zarının yapısını kaybetmesi ile karakterize enflamatuvar bir hücre ölümü olarak sınıflandırılmaktadır (Green ve Llamby, 2015). Apoptoz ve otofaji göz önünde bulundurulduğunda nekroz sıralı ve programlanmış sinyal iletim yolları ile gerçekleşmez. Çok hücreli ökaryotik organizmalarda özellikle enfeksiyon, yüksek doz radyasyon, elektrik, kimyasal veya septik şok, yüksek basınç ve nekroza neden olabilir. Nekroz sırasında, hücre zarı bütünlüğü bozulur ve sitoplazmik bileşenler hücre dışına sızar. Nekroz, canlı hücre dokularında yer alan hücrelerde gerçekleştiği gibi *in vitro* hücre kültürlerinde de meydana gelmektedir (Bernd ve Rohrbach, 2016).

Apoptoz, sıkı bir şekilde düzenlenmiş ve yüksek düzeyde korunmuş hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde gerçekleşen programlı hücre ölümüdür. Çok hücreli organizmalarda, gelişim sırasında istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılmasında veya DNA hasarı sonucu potansiyel olarak zararlı hale gelen hücrelerin vücutta karsinogenezi başlatmadan ortadan kaldırılmasında görev alan programlı bir süreçtir (Pallepati ve Averill-Bates, 2012). Hücre

küçülmesi, zar yapısının düzensizleşmesi, kromatin yoğunlaşması ve nuklear parçalanma çok ve tek hücreli organizmalarda ortak gözlenen aşamalar, çok hücreli organizmalarda süreç komşu hücreler ya da makrofajlarca sindirilen apoptotik cisimlerin oluşması ile ilerler. Bu süreç programsız bir şekilde ilerleyen nekrozun aksine oldukça programlı, çevredeki hücre ve dokulara minimum hasar verecek şekilde gerçekleştirilmektedir (Nirmala ve Lopus, 2019). Fizyolojik ve patolojik olarak ele alındığında apoptozu düzenleyen 5 farklı yolak belirlenmiştir. En yaygın bilinenleri metabolik ve hipoksik stres ile tetiklenebilen insintrik (iç) yolak ve ölüm ligandları olarak bilinen FasL (ing., Fas Ligand-FasL) veya TNF- α (ing., tumor necrosis factor α -TNF- α) gibi dış uyaranlar ile tetiklenerek Bax kanalları üzerinden ilerleyen eksintrik (dış) yolaktır. Bu yolakların dışındaki yolaklar sırası ile DNA hasarı sonucu p53 ile aktive olan kaspaz-2 bağımlı yolak, kaspaz-3 aktivasyonu üzerinden ilerleyen granzim-B yolağı ve kaspaz bağımsız bir şekilde düzenlenen granzim-A yolağıdır (Grilo ve Mantalaris, 2019).

2.3. ESANSİYEL YAĞLAR

EY'lar, ilk olarak Asya ve Orta Doğu'da, sonrasında Kuzey Afrika ve Avrupa'da dini ritüellerde kullanılmış, halen kozmetik ve tıbbi amaçlı olarak etkin biçimde kullanılmaktadır. Eski Mısır'da ise bitkiler mumyalama işlemlerinde aromatik öz ve reçine üretimi için tercih edilmiştir. Bu işlemlerde çeşitli çözücülerle ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Uçucu yağ terimi ilk defa Alman doktor ve kimyager Paracelsus von Hohenheim (1493-1541) tarafından kullanılmıştır. Çeşitli bitki özleri ile EY'lar cüzzam hastalığı üzerinde denenmiştir. Uçucu yağların etkilerini incelendiği aromaterapi terimi ilk kez 1937'de Fransız kimyager ve parfümcü Rene Maurice Gattefosse tarafından kullanılmıştır. Rene, 1910 yılında saf lavanta yağını yanık cilt bölgesine uyguladığında ağrıyı hafiflettiğini, enfeksiyonu ve yara izi oluşumunu önlediğini ortaya koymuştur. Farklı esansiyel uçucu yağlar İkinci Dünya Savaşı sırasında semptomik ve travmatik durumlar için aktif olarak kullanılmıştır (Romane ve diğ., 2012).

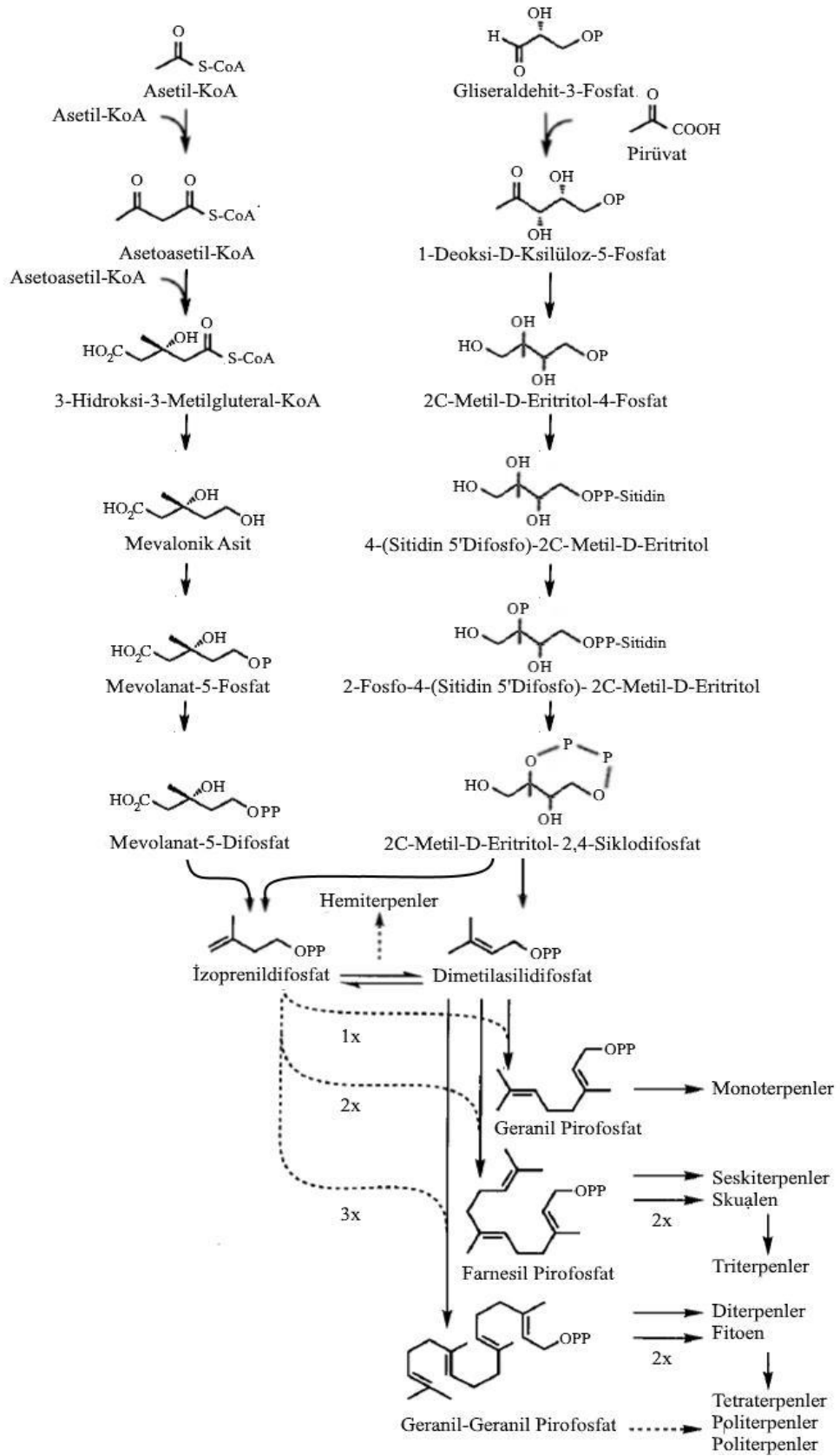
Avrupa Kimyasallar Ajansı (ing., European Chemicals Agency-ECHA), Avrupa Uçucu Yağlar Federasyonu (ing., European Federation of Essential oil-EFEO) ve Uluslararası Koku Birliği (ing., The International Fragrance Association-IFRA) bitkisel hammaddelerden buharla damıtma ya da ekspresyon yolu ile elde edilebilen ve çoğunlukla hidrokarbon içeren uçucu yağları, bitkiye özgü bir koku ve/veya tat özelliği taşıması sebebiyle EY olarak

tanımlamaktadır². Doğal habitatlarında uçucu yağların özellikle insektisit direncinde ve otçulların bitkilere karşı ilgisini azaltarak otçullara karşı bitkinin korunmasını desteklediği ortaya konmuştur. Bununla beraber uçucu yağlar çeşitli mikroorganizma ve böcekleri bitkiye çekerek polen ve tohumların taşınmasında görev almaktadırlar. EY bileşenleri terpenoid olmayan hidrokarbonlar ve terpenler olarak sınıflandırılmaktadır. Bu bileşenler tomurcuk, meyve, kök, odunsu doku veya kabuk dahil tüm bitki kısımlarında sentezlenebilir ve salgı hücreleri, kanallar, epidermis hücreleri veya trikomlarda depolanabilir. Buhar yolu ile ya da damıtma işlemi uygulanarak antibakteriyel, antimikrobiyal, antiseptik, aneljezik, sedatif, spazmolitik ve lokal anestezi amaçlı da kullanılmaktadırlar (Smith ve diğ., 2005).

EY’larda bulunan kısa zincirli alkoller ve aldehitler gibi terpenoid olmayan hidrokarbonlar, fosfolipidlerin ve yağ asitlerinin metabolik dönüşümü veya bozulması sonucu oluşmaktadır (Croteau ve Karp, 1991). Hidrokarbonlar karbon ve hidrojenden oluşmaktadır. Bazı terpenoid olmayan hidrokarbonlar oksijen, azot veya kükürt de içerebilmektedir. Doğal yollarla oluşan terpenler, izopren biriminden (C_5H_8) türetilen büyük bir hidrokarbon sınıfıdır. Terebent içerisindeki $C_{10}H_{16}$ bileşikler Kekule tarafından 1880’de terpenler olarak adlandırılmıştır (Niu ve Gilbert, 2004; Hyldgaard ve Meyer, 2012).

Terpenlerin biyosentezi, izoprenildifosfat (IPP) ve dimetilasilidifosfat (DMAPP)’ın mevalonat yolağı (MVA) ya da mevalonat-bağımsız yolağı (DXP, 1-Deoksi-D-Ksilüloz-5-Fosfat Yolağı)/MEP (2C-Metil-D-Eritritol-4-Fosfat Yolağı) ile başlamaktadır. Şekil 2.8’de gösterilen reaksiyonlar sonucu oluşan IPP ve DMAPP, monoterpenlerin öncüsü olan geranilpirofosfat (GPP) biyosentezine yol açar. GPP’nin yeniden düzenlenme, oksidasyon, indirgenme ve dehidrasyon gibi reaksiyonlara girmesi sonucu sayısız terpen türevi oluşturulur (Gershenzon ve Croteau, 1993). Tek başına bulunan izopren birimi hemiterpenlerdir (C_5H_8). Üç izopren biriminden oluşan terpenler seskiterpenler, dört izopren biriminden oluşanlar da diterpenler olarak isimlendirilmektedir. Genellikle diterpenlerden daha ağır terpenler EY’da bulunmamakla birlikte, prenol ve izovalerik asit gibi oksijen içeren hemiterpenlerin bulunduğu EY’da mevcuttur. 20.000’den fazla terpenin bitkiler tarafından sentezlendiği bilinmektedir (Connolly ve Hill, 1992).

² *Essential Oils* - ECHA, 2020, <https://echa.europa.eu/support/substance-identification/sector-specific-support-for-substance-identification/essential-oils>, [Ziyaret Tarihi: 14 Mayıs 2021].



Şekil 2.8: MVA ve DCP/MEP yolağı ile terpenlerin biyosentezi (Connolly ve Hill, 1992).

2.3.1. MONOTERPENLER VE ETKİ MEKANİZMALARI

Başlıca uçucu yağ bileşenleri terpenler ve polipropenoidler olarak iki ana grupta toplanır ve bileşenlerinin %90'ını oluşturan alt kategori monoterpenler olarak tanımlanmıştır (Loza-Tavera, 1999; Bakkali ve diğ., 2008). Monoterpenlerin bilinen 30'dan fazla iskeleti asiklik, siklik veya aromatik olarak yeniden düzenlenebilmektedir. Siklik monoterpenler halka sayısına bağlı olarak monosiklik ve bisiklik monoterpenler olarak sınıflandırılır (Griffin ve diğ., 1999; Sangwan ve diğ., 2001).

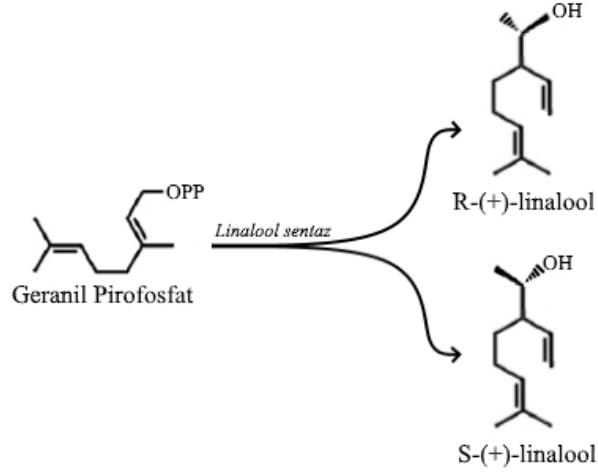
EY'ların koku ve tadın oluşumunu sağlayan bileşen oranları; bitki çeşidine, üretildiği organa, bitkinin yetiştiği coğrafi konuma, hasat mevsimine, kurutma biçimine ve ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak değişmektedir (Verma ve diğ., 2017). Çoğu EY enantiyomer yapısına sahiptir. Bu yapıların farklı oranları yağın etki ve koku profilini değiştirmektedir. Aynı bitkide üretilen farklı tür ya da enantiyomer yapıdaki EY'lar, birbirleri üzerine tekli etkilerinin toplamından daha yüksek bir etki sunarak sinerjetik, ya da birbirlerinin tekli etkilerinin toplamından daha düşük bir etki sunarak antagonistik etkileşim gösterebilmektedir (Bassolé ve Juliani, 2012).

OH grubuna sahip olan terpenoidler hidrojen bağları oluşturarak hücre içi işlevleri düzenleyen enzimler üzerinde etkilidirler. Membran enzimleri ile etkileşime girdiklerinde hücre duvarının sertlik ve bütünlüğünü değiştirmekte, hücre ve organel zarlarının geçirgenliğini de değiştirerek granülasyon ve zar yırtılmasına yol açmaktadırlar. Hücre zarını geçmeleri, hücre bileşikleriyle etkileşime girmeleri, hücre içi ve dışındaki enzimleri etkilemeleri hidrofobik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Sitoplazmik zar bütünlüğünün bozulması; hücre içi ozmotik basınç dengesizliği, hücre içi organellerin bozulması, sitoplazmik içeriklerin hücre dışına sızması ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Sahip oldukları katyonlar ile ATP üretim sistemindeki proton akışında ve hücre pH'sı üzerinde de etkilidirler (da Cruz Cabral ve diğ., 2013). Ergosterol, mayalarda ve hifli mantarlarda hücre zar bütünlüğünün korunması ve işlevinin gerçekleştirilmesi için gerekli olan temel steroldür. Membranın akışkanlığı, asimetrisi ve bütünlüğünün kontrolünün yanında, membrana bağlı enzimlerin çalışmasına katkıda bulunur (Weete ve Gandhi, 1996). EY'lerin lipid peroksidasyonunu indükleyerek ergosterol biyosentezine etki ettiği ve hücre membranının yapısını bozarak antifungal ajan olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur (Gao ve diğ., 2016).

2.3.1.1. Linalool

Linalool (3,7-dimetil-1,6-oktadien-3-ol), lavanta (*Lavandula sp.*) ve bergamot (*Citrus bergamia*) dahil olmak üzere fesleğen (*Perilla frutescens*), biberiye (*Rosmarinus officinalis L.*), adaçayı (*Salvia officinalis*) ve sakız (*Pistacia lentiscus*) gibi çeşitli aromatik bitki türlerinin çiçek aromasına sahip birincil uçucu EY bileşenlerinin terpen alkolü olan bir fitokimyasaldır. Çiçek kokularını oluşturan terpenoidlerin yaklaşık %70'i linalooldür (Stashenko ve Martínez, 2008).

Linalool hidroksile olan üçüncü karbonu sebebiyle enantiyoselektiftir. Linalool sentaz tarafından katalize edilen bir reaksiyon ile (S)-(+)-linalool (koriandrol) ve (R)-(+)-linalool (lisareol) olarak sentezlenir (Şekil 2.9). Endüstriyel üretim ile uçucu yağlardan izole edilen linaloolün enantiyomer bileşenlerinin oranı, ekstraksiyon tekniğine bağlı olarak değişkendir (Rothe, 1997). Enantiyomer yapı farkı, linaloolün farklı bitkilerdeki farklı koku profili ile ilişkilidir (Tablo 2.10). Birçok bitkide her iki linalool enantiyomeri bulunurken, birkaç türde sadece biri sentezlenir (Dudareva ve diğ., 1996; Cseke ve diğ., 1998). Koriandrol, turunçgillerde benzer bir aromadan sorumluyken meyveli, otsu, çiçeksi, tatlı bir koku profili sergiler. Lisareol ise lavanta ailesindeki bitkilerde odunsu bir koku profili oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar koriandrolün havadaki eşik değerinin lisareolden daha yüksek (3,5-4 kat) olduğunu ortaya koymuştur (Boelens ve diğ., 1993).



Şekil 2.9: Linaloolün biyosentezi ve oluşan enantiyomer yapıları.

Sentetik linalool vücut losyonları, şampuanlar, duş jelleri, sabunlar, kremler gibi çeşitli kozmetik ürünleri ile ev deterjanları, mobilya bakım ürünleri ve balmumlarının yanı sıra işlenmiş yiyecek ve içeceklerde koku ve aroma maddesi olarak da kullanılmaktadır (Matura ve diğ., 2005). Bu nedenle linaloolün dünya üzerinde yıllık tüketimi 1000 tonu aşmaktadır (Aprotosoie ve diğ., 2014). 1965 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (ing., US Food & Drug Administration-FDA) tarafından linalool, genel olarak güvenli olarak kategorize edilmiştir. Bunun sonucunda linalool; insan tüketimi için gıda maddelerinde tatlandırıcı ve katkı maddesi olarak, ayrıca hayvansal ilaçlarda, yemlerde ve ilgili ürünlerde bileşen olarak doğrudan kullanımı onaylanmıştır. Uluslararası ortak FAO/WHO gıda katkı maddeleri uzman komitesi (ing., Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives-JECFA) bireylerin vücut kütlesine oranla linaloolün bir günde 0,5 mg/kg oranında tüketimini kabul edilebilir olarak görmektedir³.

³ Morrill, S., 2020, *Biopesticides registration action document linalool*, https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/decision_PC-128838_10-Jun-08.pdf, [Ziyaret tarihi: 6 Haziran 2021]

Tablo 2.2: Bitkilerdeki EY’larda linaloolün enantiyomer yapılarının oranı ve kaynakları.

Biyolojik Kaynağı		Linalool Oranı (%), Karakteristik Enantiyomeri	Referanslar
<i>Aniba rosaeodora</i> (Gül Ağacı)	Odunsu Gövde	100; R(-)	(Chantraine ve diğ., 2009)
<i>Cinnamomum camphora</i> (Kâfur Ağacı)	Yaprak	66-94; R(-)	(Frizzo ve diğ., 2000)
<i>Cinnamomum camphora</i> (Kâfur Ağacı-Japonya/Tayvan)	Odunsu Gövde	90; R(-)	(Oyen ve diğ., 1999)
<i>Coriandrum sativum</i> (Kişniş)	Meyve	45-85; S(+)	(Özek ve diğ., 2010; Tsagkli ve diğ., 2012)
<i>Lavandula officinalis</i> (Lavanta)	Çiçek	25-38; R(-)	(Lis-Balchin, 2004; Özek ve diğ., 2010)
<i>Lavandula latifolia</i> (Portekiz Lavantası)	Çiçek	19-48; R(-)	(Lis-Balchin, 2004)
<i>Bursera delpechiana</i> (Linaloe Ağacı)	Odunsu Gövde	30; R(-)	(Theagarajan ve Prabhu, 1987; Yukawa ve diğ., 2006)
<i>Ocimum basilicum</i> (Fesleğen)	Yaprak	26-50; R(-)	(Tateo, 1989; Klimánková ve diğ., 2008; Chanotiya ve Yadav, 2009)
<i>Ocimum sanctum</i> (Kutsal Fesleğen)	Yaprak	26; S(+)	(Klimánková ve diğ., 2008; Khan ve diğ., 2010)
<i>Ocimum canum</i> (Afrika Mavi Fesleğeni)	Yaprak	25; S(+)	(Board, 2003)
<i>Cananga odorata</i> (Ylang-Ylang Bitkisi)	Çiçek	15-24; R(-)	(Benini ve diğ., 2010; Stashenko ve René, 2019)
<i>Citrus aurantium</i> (Turunç Ağacı)	Meyve	28-40; R(-)	(Surburg ve Panten, 2006; Ravid, 2008)
<i>Citrus sinensis</i> (Portakal)	Çiçek	15-32; S(+)	(Miguel ve diğ., 2008; Ravid, 2008)
<i>Origanum majorana</i> (Mercanköşk)	Topraküstü	30-40; S(+)	(Lis, Piter ve Góra, 2007)
<i>Salvia aurantium</i> (Adaçayı)	Topraküstü	10-21; Rasemik	(Sharopov ve Setzer, 2012)
<i>Laurus nobilis</i> (Defne)	Yaprak	16; R(-)	(Quijano ve Pino, 2007)
<i>Citrus bergamia</i> (Bergamot Bitkisi)	Meyve Kabuğu	9-17	(Bouzouita ve diğ., 2010; Baser ve Ozek, 2011)
<i>Hedychium species</i> (Zencefilgiller)	Kök ve/veya Yapraklar	<0,1–56%	(Sakhanokho ve Rajasekaran, 2019)
<i>Jasminum sambac</i> (Arap Yasemini Bitkisi)	Tomurcuk	6,3-10,6; R(-)	(Tamogami, Awano ve Kitahara, 2001; Edris, Chizzola ve Franz, 2007)

Parfüm, kozmetik ve gıda endüstrilerinde yaygın olarak kullanılması yanı sıra linalool bakterisit ve fungusit olarak da test edilmiştir (Blank ve diğ., 2007; Luz ve diğ., 2009; Bezerra ve diğ., 2013). *Sclerotium cepivorum* ve *F. oxysporum* f. *sp. dianthi*’de yapılan çalışmada, linaloolün MİK değeri saptanarak, *F. oxysporum* için mantar büyümesinin %50 inhibe eden konsantrasyon (EC₅₀) değeri 563,94 µL/L olarak gözlemlenmiş, böylece linaloolün antifungal etkisinin radyal büyümeyi etkilediği ortaya konmuştur (Pitarokili ve diğ., 2002). Dereotu, kişniş ve okaliptüs uçucu yağlarının tek tek ve karışık fraksiyonlarının antimikrobiyal aktivitesi incelendiğinde, linaloolün mayalarda ve Gram negatif bakterilerde antibakteriyel etkisi ortaya konmuştur (Delaquis, 2002). İnsanda bilek bölgesinde median sinirin sıkışması ile oluşan

Karpel Tünel Sendromu (ing., Carpal Tunnel Syndrome-CTS)'na sahip hastalar ile yapılan bir çalışmada, artmış ROS'un hastalarda sinoviyal hücre ve sinir hücresi ile çevre doku hücrelerinde oksidatif hasar meydana getirerek sinyal iletimini etkilemekte olduğu, bu hastalarda görülen klinik semptomların ortaya çıkışında ve/veya ilerlemesinde rol oynayabildiği ortaya konmuştur (Demirkol, 2010). Yapılan bir diğer çalışmada ise, CTS'li hasta grubu ve sağlıklı bireylerde, her iki çalışma grubunda da linaloolün güçlü antioksidan etkisi ortaya konarak, hastalık tedavisinde linaloolün potansiyel antioksidan ajan olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Seol ve diğ., 2016). Deney gruplarında uygulanan diyet sonucu beyinlerinde oksidatif stres seviyesi indüklenen kobay farelerinin beyinlerine intraperitoneal olarak uygulanan linaloolün, lipid peroksidasyonunu önlemek için E vitamini ve lipoik asit ile aynı olan antioksidan özelliklere sahip olduğu ortaya konmuş olup, doymamış yağ asitlerindeki oksidasyon reaksiyonundan kaynaklanan hasarın sınırlandırılmasında kullanılabileceği ve oksidatif hasarın komplikasyonlarının tedavisi için mevcut tedavilere tamamlayıcı olabileceği gösterilmiştir (Celik ve Ozkaya, 2002). Linaloolün tümörlü dokularda, hücre döngüsünde tümör baskılayıcı protein olarak görev alan p53'ü indüklediği sarkoma-180 solid tümör modelinde ortaya konmuştur (Jana ve diğ., 2014). Normal hücrelerde minimum toksite gösteren linaloolün, kanser hücrelerinde antikanser ajan olarak kullanılması, hedefli kemoterapötik ajanların yanında linalool gibi fitokimyasalların önemini ortaya koymuştur. Ayrıca linaloolün okaliptol ile kombine kullanılmasının da antikanser etkinlikte artışa yol açtığı tespit edilmiştir (Kladniew ve diğ., 2014).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILACAK SOLÜSYONLAR VE BESİ ORTAMLARININ HAZIRLANMASI, İZOLATLARIN YETİŞTİRİLMESİ

3.1.1. Besi Ortamlarının Hazırlanması

Kültürlerin üretilmesinde patates dekstroza agar (PDA), suşların canlandırılması ve stokların hazırlanmasında ise sentetik nutrient agar (SNA) besiy ortamları kullanıldı. PDA besiy ortamı, distile su içerisinde 39 g/L olacak şekilde final hacme tamamlanarak çözündürüldükten sonra 121°C ve 1,2 atmosfer basınç altında 15 dk boyunca otoklavlanarak steril edildi. SNA besiy ortamı ise distile su içerisinde Tablo 3.1’de verilen bileşenlerin uygun miktarlarda bir araya getirilerek hazırlandı. Besiy ortamları 121°C ve 1,2 atmosfer basınç altında 15 dk boyunca otoklavlanarak steril edildi.

Tablo 3.1: Besiy ortamlarına ait bileşenler ve miktarları, pH 5,6.

Patates Dekstroza Agar (PDA)	Bileşenleri	Miktarları (g/L)
	Patates dekstroza agar	39
Sentetik Nutrient Agar (SNA)	KH_2PO_4	1
	KCl	0,5
	KNO_3	1
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	0,2
	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	0,2
	Agar	20

3.1.2. TBA Reaktifinin Hazırlanması

Hücre içi lipid peroksidasyon değerlerinin ölçülmesi için kullanılan tiyobarbitürik asit (ing., thiobarbituric acid-TBA) reaktifi [0,25 M HCl; %15(w/v) trikloroasetik asit (ing., trichloroacetic acid-TCA); %0,375 (w/v) TBA] formülasyonunda sıcak su banyosunda TCA’nın çözündürülmesi ile hazırlandı.

3.1.3. Fosfat Tamponunun Hazırlanması

Enzim aktivite tayininde kullanılmak üzere hazırlanan fosfat tamponun içeriği Tablo 3.2’de belirtildi. Bileşenler finalde 0,1 M ve pH 7,0 olacak şekilde distile suda hazırlandı. Final hacme tamamlanan tampon 121°C ve 1,2 atmosfer basınç altında 15 dk boyunca otoklavlanarak steril edildi.

Tablo 3.2: Fosfat tamponun bileşen ve miktarları, pH 7,0.

	Bileşenleri	Miktarları
Fosfat Tamponu	NaH ₂ PO ₄	0,2 M
	Na ₂ HPO ₄	0,2 M

3.1.4. Protein Derişimi Belirlemede Kullanılacak Tamponların Hazırlanması

Protein derişiminin belirlenmesinde uygulanan Lowry metodu için kullanılan çözeltiler Waterborg ve Matthews (1984) tarafından yapılan çalışmaya uygun olarak Tablo 3.3’te verildi. Standart olarak kullanılan sığır serum albümini (BSA) uygulanacak yöntemin duyarlılık sınırlarına (100-8000 µg/mL) göre farklı derişimlerde (250, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 µg/mL) hazırlandı. Steril distile su ile 10 kat sulandırılmış 0,1 mL ham özüt ve 0,1 mL BSA üzerine 0,1 mL baz çözeltisi eklendi (Tablo 3.3). Elde edilen karışım, 10 dk boyunca kaynar su banyosunda inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar soğumaya bırakıldı. Karışımlara 1’er mL kompleks oluşturma reaktifi eklendi (Tablo 3.3). Karışım oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra üzerine 100 µL folin belirteci ilave edildi.

Tablo 3.3: Protein derişimi belirlemede kullanılacak tampon bileşenleri ve miktarları.

Çözeltiler	İçerik	Miktarları
Baz Çözeltisi	NaOH	2 N
A	Na ₂ CO ₃	%2 (w/v)
B	Cu ₅ O ₄ .5H ₂ O	%1 (w/v)
C	Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆ .2H ₂ O	%2 (w/v)
Kompleks Oluşturma Reaktifi	A, B, C	100 mL, 1 mL, 1mL
Folin Belirteci	Folin-Ciocalteau	1 N

3.1.5. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılacak Tamponun Hazırlanması

SOD enzim aktivitesi deneyinde kullanılan substrat tamponu ve katalizör içeriği Tablo 3.4'teki konsantrasyon ve içeriklerde distile suda hazırlandı.

Tablo 3.4: SOD aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler.

Çözeltiler	İçerik	Konsantrasyon
Substrat Tamponu	Na_2CO_3	1,5 M
	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$	200 mM
	NBT	2,5 mM
	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	3 mM
Katalizör	Fosfat Tamponu	50 mM
Folin Belirteci	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$	2 μM

3.1.6. Fosfat Tamponu Tuzu Solüsyonunun Hazırlanması

Hücrel gösterim deneylerinde kullanılan fosfat tamponu tuzu (ing., phosphate buffer saline-PBS) solüsyonu, $1\times$ konsantrasyonunda pH 7,2 olacak şekilde hazırlandı. Solüsyon içeriği Tablo 3.5'te verildi.

Tablo 3.5: Hücrel gösterim deneylerinde kullanılacak bileşenler ve miktarları.

	İçerik	Miktarları
Fosfat Tamponu Tuzu (PBS) (pH 7,2)	K_2HPO_4	1,1 g/L
	$\text{H}_2\text{KO}_4\text{P}$	0,32 g/L
	NaCl	8,5 g/L
	dH_2O	1 L

3.1.7. Ao/EtBr Boyalarının Hazırlanması

Akridin turuncusu (Ao) ve etidyum bromür (EtBr), ayrı ayrı final konsantrasyonları 1 mg/mL olacak şekilde $1\times$ PBS solüsyonunda çözdürüldü. Sonrasında 60 μL Ao ve 100 μL EtBr 840 μL $1\times$ PBS'e eklenerek boyalar hazır hale getirildi.

3.1.8. Fungal Suşların Yetiştirilmesi

Tez çalışması, Doç. Dr. Tapani Yli-Mattila (Turku Üniversitesi)'nin değerli katkıları ile İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonuna kazandırılan *F. graminearum* PH-1 suşu kullanılarak gerçekleştirildi. Stok olarak -80°C'den alınan suş PDA besi ortamında 7 gün boyunca 25°C'de %50 nem varlığında 7 gün süre ile kontrollü büyütme kabininde üretildi. Saklanacak suşun üretiminde ise SNA besi ortamı kullanıldı (Tablo 3.1).

3.2. MİK DEĞERİNİN BELİRLENMESİ

MİK değerinin belirlenebilmesi için besi ortamları iki ayrı grup halinde hazırlandı. Birinci grup besi ortamı ile linaloolün MİK değerinin saptanabilmesi için, polimerizasyonu tamamlanmamış PDA'ya Pitarokili ve diğ. (2002)'nin belirlediği MİK değeri baz alınarak logaritmik konsantrasyonlarda (%0,5-1,5 (v/v) değer aralığında olacak şekilde) linalool eklendi ve besi ortamları önceden 180°C'de 2 saat steril edilmiş cam petrilere aktarılarak sıvı formdaki besi ortamının polimerize olması sağlandı. İkinci grupta ise, önceden 180°C'de 2 saat steril edilmiş cam petrilere aktarılarak polimerizasyonu tamamlanmış PDA besi ortamlarının yüzeylerine linalool, steril cam baget kullanılarak yayıldı. Steril ve kültüre hazır bu besi ortamlarına PH-1 ekilerek koloniler 7 gün boyunca 25°C'de üretildi. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.3. WST-1 HÜCRE CANLILIK TESTLERİ

MİK değeri belirlenen linaloolün logaritmik olarak belirlenen IC₅₀ değerleri uygulanarak PH-1'deki canlılık üzerine etkisi WST-1 kimyasalı (Sigma Aldrich) ile incelendi. Radyal üreme gösteren hücre kültürlerinin dış sınırındaki 1 cm²'lik alanda bulunan hücreler 2 mL'lik propilen mikro tüp içinde 1 mL 1× PBS'de (Tablo 3.5) toplandı (Khan ve diğ., 2016). 96 kuyucuklu elisa plakasında 100 µL hacimle 1× PBS'te toplanmış hücreler ve 10 µL kullanıma hazır WST-1 kimyasalı pipetaj ile karıştırıldı ve karanlık etüvde 25°C'de 3 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Optik densite (OD) 450 nm'de spektrofotometre ile belirlendi. Kör örnek olarak tek başına 100 µL 1× PBS kullanıldı. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Tüm örnekler için yüzde hücre canlılığı, örnek absorbans değerinin kontrol grubu absorbans değerine oranlanması ile hesaplandı (Denklem 3.1). Elde edilen veriler tek yönlü ANOVA analizi ile analiz edildi.

$$(\% \text{ Hücre canlılığı}) = \frac{\text{Örnek absorbans değeri} \times 100}{\text{Kontrol absorbans değeri}} \quad (3.1)$$

3.4. HÜCRE İÇİ LİPİD PEROKSİDASYON DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ

Lipid peroksidasyonu, tiyobarbütirik asitin belirteç olarak kullanıldığı TBARS yöntemi ile belirlendi (Hodges ve diğ., 1999). Kültürlerden alınan 500'er µL örneğin üzerine 1 mL TBA reaktifi eklendi ve steril mikrosantrifüj tüplerinin içerisinde 15 dk kaynar su banyosunda bekletildi. Bu süre sonunda hücre kalıntılarından kurtulmak amacıyla 1000 rpm hızda 5 dk süre ile santrifüj yapıldı. Hazır hale gelen örneklerden ve standartlardan 200 µL alınarak spektrofotometre cihazı (BioTek® Instruments, ABD) ve KCjunior™ programı kullanılarak 535 nm'de spektrofotometrik ölçüm alındı. Reaksiyonun başlatılmasından itibaren spektrofotometrede okunan ilk ve son değerler kaydedilerek aktivite hesaplandı. Hesaplama formülü olarak $Abs = \epsilon \cdot C \cdot l$ kullanıldı (Misra ve Gupta, 2006). Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Elde edilen veriler tek yönlü ANOVA analizi ile analiz edildi. MDA içeriklerinin tespiti için kullanılan molar soğurma değeri $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dir (Denklem 3.2).

$$MDA \text{ Birikimi} = \frac{Abs}{\epsilon \times 0,1} \times 1000 \mu\text{g} / 1 \mu\text{g/mL} \quad (3.2)$$

3.5. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ

Mantar kültüründen alınan 1'er cm^2 'lik hücre kesiti 1'er mL $1 \times \text{PBS}$ içerisine kondu ve hücreler pipet ucu ile kaldırıldı. $1 \times \text{PBS}$ içerisinde çözündürülen hücreler yeni tüplere aktararak katı besisi ortamından uzaklaştırıldı. Boyamaya hazır olan bu hücrelere 1'er µL $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ eklendi ve hücreler 1 saat boyunca 25°C 'de inkübe edildi. Boyama işleminden sonra, hücreler iki kez $1 \times \text{PBS}$ ile yıkandı ve 200 µL $1 \times \text{PBS}$ ile süspanse edildi. Vortekslendikten sonra 96'lık siyah floresan plakasına 200'er µL yüklenerek 2 saat 10 dk'lık 14 kez 600 kinetik interval olacak şekilde kinetik okuma sağlandı. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Elde edilen veriler tek yönlü ANOVA analizi ile analiz edildi.

3.6. ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

Linaloolün önceki çalışmalarda gözlemlenen antifungal ve antioksidan etkileri göz önüne alınarak; *F. graminearum* PH-1 suşundaki antioksidanlardan POD, KAT ve SOD enzim aktivitelerindeki değişimin incelenmesi amaçlandı.

3.6.1. Protein İzolasyonu ve Protein Derişiminin Belirlenmesi

Fungal materyal 0,1 M fosfat tamponu (Tablo 3.2) ile havanda ezildi. Homojenat 4 °C’de 15000 rpm’de 30 dk santrifüj edildi. Ham özütü içeren üst sıvı POD, KAT ve SOD aktivitelerinin tayininde kullanıldı. Protein derişimi Lowry metodu ile Waterborg ve Matthews (1984)’a göre belirlendi (Tablo 3.3).

Derişimin belirlenmesinde standart olarak yöntemin duyarlılık sınırlarına (100-4000 µg/mL) uygun farklı konsantrasyonlardaki (250, 500, 1000, 2000, 4000 µg/mL) sığır serum albumin (ing. “bovine serum albumin-BSA”), kör örnek olarak da 0,1 M parçalama tamponu kullanıldı. Steril saf suda hazırlanmış ve 2 kez sulandırılmış 0,1 mL ham özüt ve standart üzerine 0,1 mL baz çözeltisi eklendi. Karışımlar 10 dk kaynar su banyosunda bekletildikten sonra oda sıcaklığına gelene kadar soğutuldu. Her bir karışıma 1’er mL kompleks oluşturma reaktifi eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Süre sonunda her bir örneğe tüp karıştırıcıda, 100’er µL folin belirteci eklendi ve tüpler oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Örneklerin 550 nm dalga boyundaki absorbans değerleri spektrofotometre cihazı (BioTek® Instruments, ABD) ve KCjuniorTM programı kullanılarak okundu. Protein derişimleri “Microsoft Excel 2016” programında X ekseninde BSA derişimleri ve Y ekseninde ise BSA karışımlarının 550 nm’de ölçülen absorbans değerleri olacak şekilde oluşturulan standart grafiğinden elde edilen eğim denkleminde R^2 formülü kullanılarak belirlendi.

3.6.2. Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Askorbat spesifik peroksidazlar, kloroplast ve sitozolde H_2O_2 ’nin ayrışmasında önemli bir rol oynamaktadır. Askorbik asit, H_2O_2 ’nin süpürülmesinde elektron vericisi olarak görev yapmaktadır. Aktivite ölçümü, 290 nm’de askorbik asidin tüketilme hızının ölçülmesi temeline dayanarak gerçekleştirildi. Kültürlerden elde edilen ham protein özütü (2 µL); 0,5 mM askorbik asit ve 0,5 mM H_2O_2 içeren 198 µL fosfat tamponuna (50 mM, pH 7,0) eklendi. Enzim aktivitesindeki artış spektrofotometrede 290 nm dalga boyundaki absorpsiyona bakılarak belirlendi. Bunun için 10 saniye aralıklarla 3 dk boyunca absorbans değerleri okundu. POD aktivitesi, spektrofotometre cihazı (BioTek® Instruments, ABD) ve KCjuniorTM programı kullanılarak 290 nm dalga boyunda reaksiyonun başlatılmasından itibaren okunan ilk ve son değerler kaydedilerek hesaplandı. Hesaplama formülü olarak $\Delta Abs = \epsilon \cdot C \cdot l$ kullanıldı (Misra ve

Gupta, 2006). Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Elde edilen veriler tek yönlü ANOVA analizi ile analiz edildi. Askorbatın molar soğurma katsayısı $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 'dir (Denklem 3.3).

$$SA = \frac{\Delta Abs}{\epsilon \times 0,1} \times 1000 \mu\text{g} / 1 \mu\text{g/mL} \quad (3.3)$$

3.6.3. Katalaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

KAT aktivitesi, hidrojen peroksidin yıkımının, spektrofotometrik olarak, 240 nm dalga boyundaki absorbans değerindeki değişimin izlenmesi temeline dayanan Cho ve diğ. (2000) yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla öncelikle 680 μL fosfat tamponu (50 mM; pH 7,2) ve 480 μL H_2O_2 (40 mM) içeren reaksiyon karışımı 30 °C'de 2,5 dk inkübe edildi. Enzimatik reaksiyon 40 μL ham protein özütünün bu karışıma eklenmesi ile başlatıldı. Spektrofotometre cihazı (BioTek® Instruments, ABD) ve KCjuniorTM programı kullanılarak 240 nm'deki absorbans değerindeki azalma 2 dk boyunca izlendi. Katalaz aktivitesi 1 mg ham protein özütünün 240 nm dalga boyunda dakikada okunan absorbans değerleri kullanılarak spesifik aktivitenin hesaplanması ile değerlendirildi. Hesaplamada formül olarak $\Delta Abs/dk = \epsilon \cdot C \cdot l$ kullanıldı (Misra ve Gupta, 2006). Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Elde edilen veriler tek yönlü ANOVA analizi ile analiz edildi. H_2O_2 'nin molar soğurma katsayısı $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 'dir (Denklem 3.4).

$$SA = \frac{\Delta Abs \backslash dk}{\epsilon \times 0,1} \times 1000 \mu\text{g} / 1 \mu\text{g/mL} \quad (3.4)$$

3.6.4. SOD Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Stres altında oluşan süperoksit radikalleri “nitroblue” tetrazolyum (NBT) ile reaksiyona girerek renkli formazon kristalleri oluşturmaktadır. Reaksiyon ortamında bulunan SOD enzimi süperoksit radikallerini ortamdaki uzaklaştırdığı için formazon oluşumu inhibe olmaktadır. SOD enziminin tüketildiği oksidatif stres durumunda, süpürülemeyen süperoksit radikalleri ile reaksiyona giren NBT oluşturduğu renkli formazon kristalleri ile kuvvetli ışımaya vermektedir. Elde edilen ışımaya hücredeki oksidatif stresle paralel olarak tüketilen SOD enziminin süperoksit radikallerini süpürmede yetersiz kalması sonucu % inhibisyon olarak ifade edilmektedir. SOD aktivitesini belirlemek için kültürlerden elde edilen ham protein özütünden 30 μL alınarak üzerine 2 mL substrat tamponu ve riboflavin eklendi (Tablo 3.4). Bu karışım 15 dk 15 W'lık floresan ışık altında bekletildi. Karışımın 560 nm dalga boyundaki absorbans değeri

spektrofotometre cihazında (BioTek® Instruments, ABD) ölçüldü (Sairam ve Srivastav, 2012). Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Tüm örnekler için % inhibisyon değeri, örnek absorbans değerinin, körün absorbans değerine oranlanması ve 100'den çıkarılmasına göre hesaplandı (Denklem 3.5). Elde edilen veriler tek yönlü ANOVA analizi ile analiz edildi.

$$(\% \text{ inhibisyon değeri} = 100 - [\frac{\text{Örnek Absorbans değeri} \times 100}{\text{Kör Absorbans değeri}}]) \quad (3.5)$$

3.7. FLORESAN MİKROSKOBUNDA HÜCRESEL GÖSTERİM

3.7.1. Hücre Fiksasyonu

Radyal üreme gösteren hücre kültürlerinin dış sınırındaki 1 cm²'lik alanda bulunan hücreler 2 mL'lik propilen mikro tüp içinde 1× PBS'de toplandı (Khan ve diğ., 2016). 1× PBS ile final hacmi 1,5 mL olan hücreler daha sonra sabit bir şekilde 90 µL %4 formaldehid ve 3 µL %0,1 Triton X-100 ile karanlık etüvde 25°C'de 15 dk boyunca geçirgen hale getirildi. Sabit ve boya geçirgen olan hücreler, 5 dk boyunca 14,000 rpm'de santrifüj edildi. Hücreler, bir kez 1,5 mL 1× PBS ile yıkayıp floresan mikroskopunda incelenmek üzere boya uygulamalarına hazır hale getirildi.

3.7.2. Ao/EtBr Çift Boyama Deneyleri

Boyama deneylerine hazır hücrelere 75 µL Ao/EtBr (60 µg/mL-100 µg/mL) ilave edildi ve hücreler 5 dk boyunca 25°C'de inkübe edildi. Boyama işleminden sonra, hücreler iki kez 1× PBS ile yıkandı ve 100 µL 1× PBS ile süspanse edildi. Çift boyama, GFP (Ao 502/526 nm, EtBr 510/595 nm) ve Texas RED (595/613 nm) filtreleri bulunan floresan mikroskop (Carl Zeiss, Almanya) ile incelendi. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.7.3. H₂DCF-DA Analizleri

Boyama deneylerine hazır hücrelere 1,5 µL H₂DCF-DA eklenmiş ve hücreler 1 saat boyunca 25°C'de inkübe edildi. Boyama işleminden sonra, hücreler iki kez 1× PBS ile yıkandı ve 100 µL 1× PBS ile süspanse edildi. Görüntülenmeye hazır hücreler FITC filtresi (494/518nm) bulunan floresan mikroskop (Carl Zeiss, Almanya) ile ROS tespitinde kullanıldı. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.8. LİNALOOLÜN DON ÜRETİMİNE ETKİSİ

Linaloolün *F. graminearum* PH-1 suşlarında mikotoksin üretimine etkisi ince tabaka kromatografisi (ing., thin layer chromatography-TLC) yöntemi ile test edildi. Deney iç kontrolü olarak 7 günlük PDA besiyerinde üretilen, DON kemotipinde olduğu bilinen *F. graminearum* H-11 suşu, kontrol ve deney gruplarından mikotoksin izolasyonu için 0,1'er gr süpürülen örnekler soğuk ve steril havan içerisinde 5 mL etil asetat ile homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası etil asetat çeker ocak içerisinde uçuruldu. Homojenat asetonitril (100 µl) ile süspanse edildi. Sabit faz olarak silika jel, hareketli faz olarak asetat:toluen (1:1), reaktif madde olarak etanol:alüminyum klorür (99:1) kullanıldı. Örnekler, DON referansı (Sigma/34134-2mL) ile 10 µL hacimde silika jele yüklendi. Silika jel cam şale içerisine konarak örnekler 30 dk yürütüldü. Silika jel kurutulup üzerine etanol:alüminyum klorür (99:1) karışımı sprey yardımıyla uygulandıktan sonra silika jel plakaları 365 nm'de UV ışık altında incelendi. Örneklerin *Rf* (ing. "retention factor") değerleri hesaplandı (Denklem 3.6). Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

$$Rf = \text{Örneğin yürüdüğü mesafe} / \text{Hareketli fazın yürüdüğü mesafe} \quad (3.6)$$

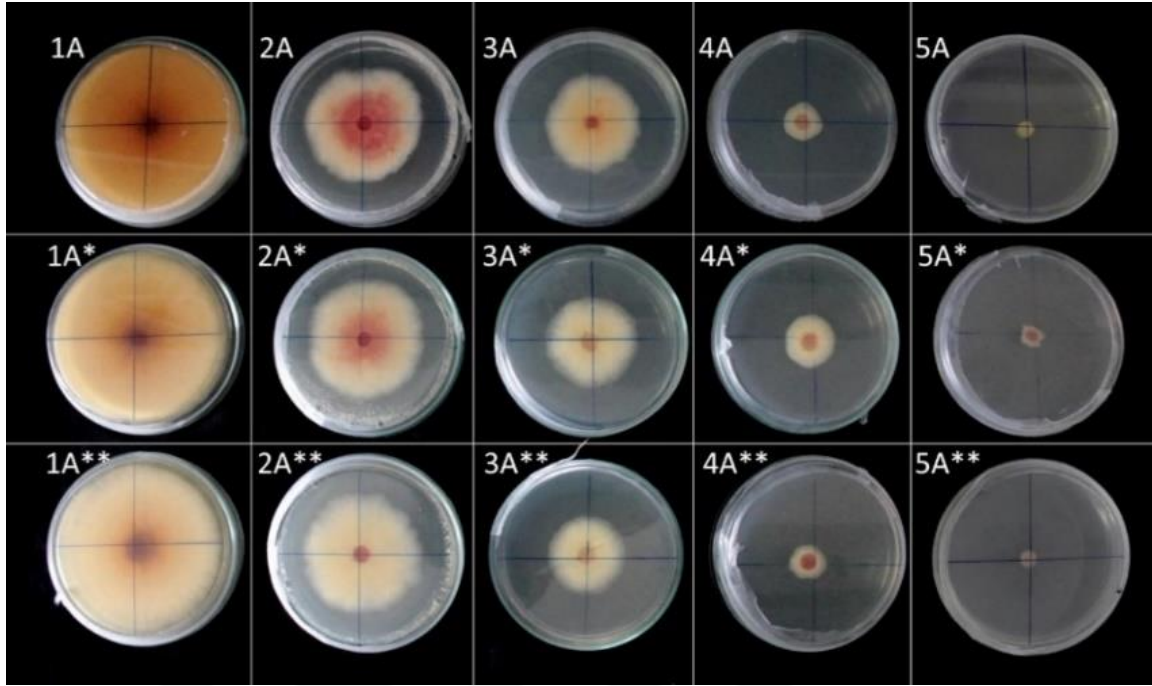
4. BULGULAR

4.1. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Gerçekleştirilen çoklu tekrarlar sonucunda, besi ortamlarına linalool konsantrasyonlarının %0,10 ve 1 (v/v) değerleri arasında logaritmik artış sağlanarak eklenmesine karar verildi. Ticari olarak satın alınan linaloole göre mg/L hesaplamaları yapıldı. Deney grupları bu derişimlerle oluşturuldu ve deney 3 tekrarlı gerçekteştirildi. Bu deneyler sonucunda IC₅₀ değerinin %0,30 (v/v) olduğu ortaya kondu. Linaloolün *F. graminearum*'daki hücresel etkilerinin incelenmesinde linaloolün su çözgeninde kontrol grubu ve bu değere göre oluşturulan IC₂₅ (%0,15; 13,05 mg/L), IC₅₀ (%0,30; 26,1 mg/L) ve IC₇₅ (%0,45; 39,15 mg/L) değerlerinde deney grupları ile çalışmalar gerçekteştirildi. Linaloolün kullanıma hazır PDA besi ortamına yayma yöntemi ile eklenmesi sonucu oluşturulan ikinci deney grubunda radyal üreme çapları açısından anlamlı bir sonuç gösterilemedi.

4.2. MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYONU DEğERİNİN BELİRLENMESİ

PH-1 için denenen %0,60 (v/v) konsantrasyonundaki linaloolün üremeyi inhibe ettiği ortaya kondu. Uygulanan ara konsantrasyonlarda (%0,15-0,60 (v/v)) aktif bileşiğin derişimi arttıkça aynı oranda PH-1'in radyal üreme çapında azalma gözlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Kontrol ve deney gruplarının 7. gündeki petri görüntüsü. 1A: Sadece PDA besi ortamında üretilen PH-1 kontrol grubu, 2A: %0,15 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu, 3A: %0,30 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu, 4A: %0,45 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu, 5A: %0,60 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu.

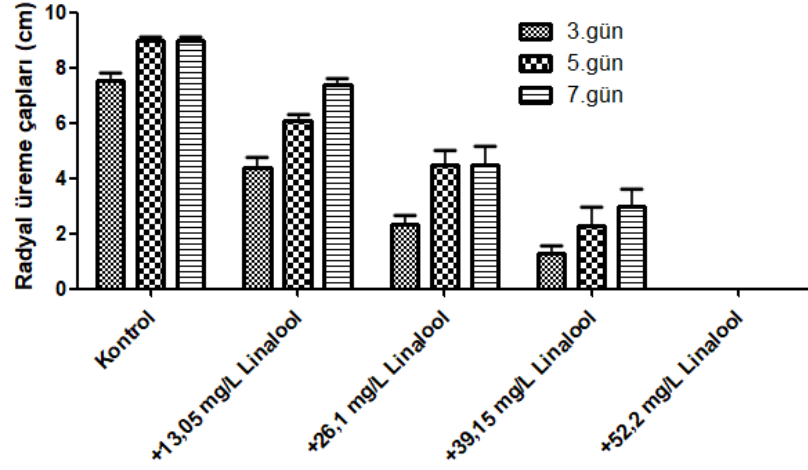
Deney grupları Tablo 4.1’de belirtildiği şekilde oluşturuldu. Kontrol grubu ve aktif bileşiğin inhibisyona yol açtığı IC_{25} , IC_{50} ve IC_{75} değerleri içeren ortamlardaki kültürlerin üreme çapları ölçüldü. Referans suşun 3., 5. ve 7. günlerdeki kaydedilen radyal üreme çapları ortalama değerleri hesaplanarak Tablo 4.1’de verildi.

Tablo 4.1: Polimerizasyonu tamamlanmamış PDA besiyerlerine linaloolün v/v olarak eklenmesi sonrası MİK değeri taraması deneylerinde radyal üreme çapları.

Uygulama	Radyal Üreme Çapları (cm)		
	3.gün	5.gün	7.gün
Kontrol	7,53±0,08	9	9
+13,05 mg/L Linalool	4,38±0,09	6,06±0,03	7,38±0,04
+26,1 mg/L Linalool	2,31±0,09	3,29±0,14	4,49±0,2
+39,15 mg/L Linalool	1,28±0,07	2,3±0,15	2,98±0,13
+52,2 mg/L Linalool	-	-	-

Linalool aktif bileşiğinin çok düşük konsantrasyonlarının fitopatojenin üremesi üzerindeki etkisi ortaya kondu, konsantrasyon artışı ile büyümenin inhibisyonu arasındaki ilişki de gösterildi.

Radyal üreme çap değerlerinin deney gruplarındaki etkisi oluşturulan grafikte değerlendirildi. Şekil 4.2, aktif bileşik olan linaloolün PH-1 suşunun üremesi üzerindeki etkisinin grafikte gösterimidir. IC₂₅ dozu kontrole göre inhibitör etki ortaya koydu (%18). Ancak en etkin inhibisyonun, IC₅₀'de olduğu, IC₂₅'e göre daha dramatik düşüşe (%39,15) yol açtığı saptandı. IC₇₅, IC₅₀'ye göre %33,63 oranında inhibisyona yol açtı.



Şekil 4.2: *F. graminearum* PH-1 suşunun 3., 5. ve 7. günlerde deney ve kontrol gruplarında üreme miktarı.

4.3. WST-1 HÜCRE CANLILIK TESTLERİ

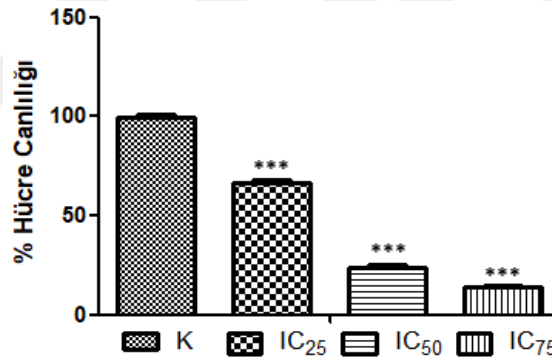
Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda linalool uygulanmış 7 günlük kültürlerden alınan *F. graminearum* PH-1 referans suşuna ait miselyumların WST-1 toksisite testi 3.3'teki yöntemine göre üç biyolojik tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi ve elde edilen veriler ortalama değerleri standart hatalarıyla birlikte Tablo 4.2'de sunuldu.

PH-1 suşunun PDA besi ortamı kültürlerinde hücre canlılığı %99,54±1.39; %0,15 (v/v), %0,30 (v/v) ve %0,45 (v/v) linalool dozları uygulanan (IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅) kültürlerde ise sırasıyla %66,6±1,61, %23,46±1,77 ve %13,91±0,67 olarak bulundu.

Tablo 4.2: Linaloolün *F. graminearum* PH-1 suşunda % Hücre canlılığı üzerindeki etkisi (SH: standart hata).

Tür	Suş	Uygulama	% Hücre Canlılığı $\pm$ SH
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Kontrol	99,54 $\pm$ 1,39
		IC ₂₅	66,6 $\pm$ 1,61
		IC ₅₀	23,46 $\pm$ 1,77
		IC ₇₅	13,91 $\pm$ 0,67

Artan linalool konsantrasyonunun *F. graminearum* PH-1 referansında canlı hücre sayısında azalmaya neden olduğu gösterildi. Canlı hücre sayısının IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ dozlarında kontrole göre sırasıyla %33,09; %76,44 ve %86,03 oranında azaldığı, en düşük canlı hücre sayısının IC₇₅ linalool dozu uygulanan grupta olduğu belirlendi. Tek yönlü ANOVA testine göre artan dozlar arasındaki canlı hücre sayısındaki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,0001$). Kontrol ve deney grupları ile canlı hücre sayısı değişimi Şekil 4.3'teki grafikte gösterildi.



Şekil 4.3: *F. graminearum* PH-1 referans suşunda kontrol ve deney gruplarındaki % hücre canlılığı.

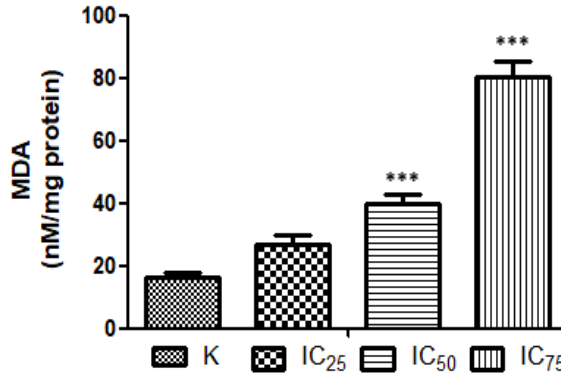
4.4. HÜCRE İÇİ LİPİD PEROKSİDASYON DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda linalool uygulanmış 7 günlük kültürlerden alınan PH-1 suşuna ait miselyumların hücre içi lipid peroksidasyon değerlerinin belirlenmesi deneyi 3.4'teki yöntemeye göre üç biyolojik tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi ve 532 nm'de elde edilen absorbans değerlerine bağlı olarak hesaplanan MDA konsantrasyonları Tablo 4.3'te sunuldu.

Tablo 4.3: Linaloolün *F. graminearum* PH-1 suşunda hücre içi lipid peroksidasyonu üzerine etkisi (SH: standart hata).

Tür	Suş	Uygulama	MDA Birikimi (nM/mg)±SH
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Kontrol	16,34±1,34
		IC ₂₅	26,91±2,7
		IC ₅₀	40,06±2,65
		IC ₇₅	80,47±4,85

PH-1 suşunun PDA besi ortamındaki kültürlerinde MDA birikimi 16,34±1,34; %0,15 (v/v), %0,30 (v/v) ve %0,45 (v/v) linalool dozları uygulanan (IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅) kültürlerde ise sırasıyla 26,91±2,7; 40,06±2,65 ve 80,47±4,85 nM/mg olarak hesaplandı. Artan linalool konsantrasyonuna paralel olarak *F. graminearum* PH-1 suşunda MDA birikiminde artış olduğu belirlendi. Kontrol grubuna göre IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ dozlarında sırasıyla %64,68; %145,16 ve %392,47 oranında arttığı, en yüksek seviyedeki MDA birikimi IC₇₅ linalool dozu uygulanan grupta olduğu belirlendi. Tek yönlü ANOVA testine göre artan dozlar arasındaki MDA birikimindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p<0,0001). Kontrol ve deney gruplarında MDA birikimindeki değişim şekil 4.4'teki grafikte gösterildi.



Şekil 4.4: *F. graminearum* PH-1 referans suşunda kontrol ve deney gruplarının 7 günlük kültürlerinden belirlenen MDA birikimindeki değişimlerinin grafikte gösterimi.

4.5. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ

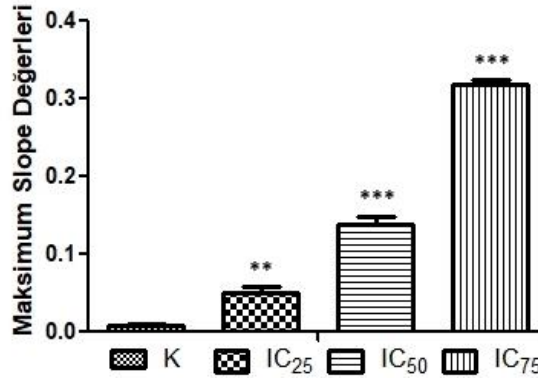
Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda linalool uygulanmış 7 günlük kültürlerden alınan PH-1 suşuna ait miselyumların hücre içi oksidasyon değerleri 3.5'teki yöntemle göre üç biyolojik tekrarlı olacak şekilde belirlendi ve elde edilen maksimum slope değerleri standart hatalarıyla

birlikte Tablo 4.4'te sunuldu. 2 saat 10 dk boyunca 600 kinetik interval okunması sonucu elde edilen maksimum slope değerleri kontrolde $0,0088 \pm 0,0007$; %0,15 (v/v), %0,30 (v/v) ve %0,45 (v/v) linalool dozları uygulanan (IC_{25} , IC_{50} ve IC_{75}) kültürlerde ise sırasıyla $0,0499 \pm 0,0085$; $0,1388 \pm 0,0086$ ve $0,3189 \pm 0,0044$ olarak hesaplandı.

Tablo 4.4: *F. graminearum* PH-1 referans suşunda kontrol ve deney gruplarında hücre içi oksidasyon deneyinde elde edilen maksimum slope değerleri (SH: standart hata).

Tür	Suş	Uygulama	Maksimum Slope $\pm$ SH
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Kontrol	$0,0088 \pm 0,0007$
		IC_{25}	$0,0499 \pm 0,0085$
		IC_{50}	$0,1388 \pm 0,0086$
		IC_{75}	$0,3189 \pm 0,0044$

Linalool konsantrasyonu artışı ile hücre içi oksidasyon değerlerinin paralel olarak arttığı tespit edildi. Kontrol grubuna göre IC_{25} , IC_{50} ve IC_{75} dozlarında sırasıyla %467, %1477 ve %3523 oranında maksimum slope değerlerinin arttığı, en yüksek seviyedeki hücre içi oksidasyonun IC_{75} grubunda olduğu belirlendi. Tek yönlü ANOVA testine göre artan dozlar ile hücre içi oksidasyon artışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,0001$). Kontrol ve deney gruplarında hücre içi oksidasyon değerlerinin değişimi Şekil 4.5'teki grafikte gösterildi.



Şekil 4.5: *F. graminearum* PH-1 referans suşunda kontrol ve deney gruplarında hücre içi oksidasyon değerleri.

4.6. ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

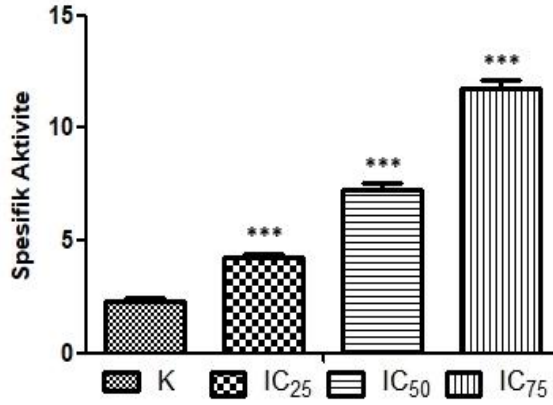
4.6.1. Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Kontrol ve deney gruplarında 7 gün boyunca üretilmiş kültürlerdeki POD enzim aktiviteleri 3.6.2'deki yöntemle göre belirlenerek üç biyolojik tekrardan elde edilen verilerin ortalama değerleri ve standart hataları hesaplanarak Tablo 4.5'da özetlendi. PH-1 suşunun PDA besi ortamında üretilmesi ile POD enzim aktivitesi $2,32 \pm 0,10$; $\%0,15$ (v/v), $\%0,30$ (v/v) ve $\%0,45$ (v/v) linalool dozları uygulanan (IC_{25} , IC_{50} ve IC_{75}) kültürlerde ise sırasıyla $4,26 \pm 0,11$, $7,28 \pm 0,25$ ve $11,78 \pm 0,36$ olarak bulundu.

Tablo 4.5: Linaloolün *F. graminearum* PH-1 suşunda spesifik POD enzim aktiviteleri (SH: standart hata).

Tür	Suş	Uygulama	Spesifik Aktivite $\pm$ SH
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Kontrol	$2,32 \pm 0,10$
		IC_{25}	$4,26 \pm 0,11$
		IC_{50}	$7,28 \pm 0,25$
		IC_{75}	$11,78 \pm 0,36$

Linalool konsantrasyonu artışı ile POD enzim aktivitesinin paralel olarak arttığı tespit edildi. Kontrol grubuna göre IC_{25} , IC_{50} ve IC_{75} dozlarında sırasıyla $\%83,6$; $\%213,7$ ve $\%407,7$ oranında spesifik aktivitenin arttığı, en yüksek seviyedeki POD aktivitesinin IC_{75} grubunda olduğu belirlendi. Tek yönlü ANOVA testine göre artan dozlar ile POD enzim aktivitesinin artışının istatistiki olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,0001$). Kontrol ve deney gruplarında spesifik aktivite değişimi Şekil 4.6'daki grafikte gösterildi.



Şekil 4.6: *F. graminearum* PH-1 referans suşunda kontrol ve deney gruplarında spesifik POD enzim aktiviteleri.

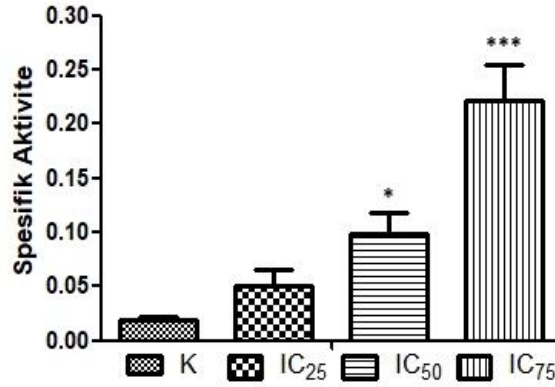
4.6.2. Katalaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Kontrol ve deney gruplarında 7 gün boyunca üretilmiş kültürlerdeki KAT enzim aktiviteleri 3.6.3'deki yöntemle göre belirlenerek üç biyolojik tekrardan elde edilen verilerin ortalama değerleri ve standart hataları hesaplanarak Tablo 4.6'da özetlendi. PH-1 suşunun PDA besi ortamında üretilmesi ile KAT enzim aktivitesi $0,021 \pm 0,004$; %0,15 (v/v), %0,30 (v/v) ve %0,45 (v/v) linalool dozları uygulanan (IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅) kültürlerde ise sırasıyla $0,059 \pm 0,018$; $0,107 \pm 0,023$ ve $0,269 \pm 0,014$ olarak bulunmuştur.

Tablo 4.6: Linaloolün *F. graminearum* PH-1 suşunda spesifik KAT enzim aktiviteleri (SH: standart hata).

Tür	Suş	Uygulama	Spesifik Aktivite $\pm$ SH
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Kontrol	$0,021 \pm 0,004$
		IC ₂₅	$0,059 \pm 0,018$
		IC ₅₀	$0,107 \pm 0,023$
		IC ₇₅	$0,269 \pm 0,014$

Linalool konsantrasyonu artışı ile KAT enzim aktivitesinde paralel olarak arttığı tespit edildi. Kontrol grubuna göre IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ dozlarında sırasıyla %180, %409 ve %1180 oranında spesifik aktivitenin arttığı, en yüksek seviyedeki KAT aktivitesinin IC₇₅ grubunda olduğu belirlendi. Tek yönlü ANOVA testine göre artan dozlar ile KAT enzim aktivitesinin artışının istatistiki olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,0001$). Kontrol ve deney gruplarında spesifik aktivite değişimi Şekil 4.7'deki grafikte gösterildi.



Şekil 4.7: *F. graminearum* PH-1 referans suşunda kontrol ve deney gruplarında spesifik KAT enzim aktiviteleri.

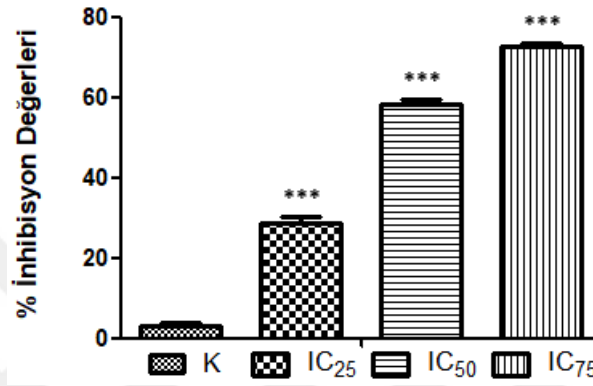
4.6.3. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Kontrol ve deney gruplarında 7 gün boyunca üretilmiş kültürlerdeki renkli formazon kristalleri 3.6.4'deki yöntemle göre ölçülerek üç biyolojik tekrardan elde edilen verilerin ortalama değerleri ve standart hataları hesaplanarak Tablo 4.7'da özetlendi. PH-1 suşunun PDA besi ortamında üretilmesi ile SOD enziminin tüketilmesine sonucu % inhibisyon olarak ifade edilen SOD aktivitesi kontrol grubunda $3,02 \pm 0,91$; %0,15 (v/v), %0,30 (v/v) ve %0,45 (v/v) linalool dozları uygulanan (IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅) kültürlerde ise sırasıyla $28,60 \pm 1,49$; $58,17 \pm 1,23$ ve $72,61 \pm 0,80$ olarak bulundu.

Tablo 4.7: Linaloolün *F. graminearum* PH-1 suşunda spesifik SOD enzim aktivitelerini ifade eden % inhibisyon değerleri (SH: standart hata).

Tür	Suş	Uygulama	% İnhibisyon Değerleri±SH
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Kontrol	3,02±0,91
		IC ₂₅	28,60±1,49
		IC ₅₀	58,17±1,23
		IC ₇₅	72,61±0,80

Linalool konsantrasyonu artışı ile % inhibisyon değerlerinin paralel olarak arttığı tespit edildi. Kontrol grubuna göre IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ dozlarında sırasıyla %847, %1840 ve %2304 oranında % inhibisyonun arttığı, en yüksek seviyedeki inhibisyonun IC₇₅ grubunda olduğu belirlendi. Tek yönlü ANOVA testine göre artan dozlar ile % inhibisyondaki artışının istatistiki olarak anlamlı olduğu belirlendi (p<0,0001). Kontrol ve deney gruplarında % inhibisyon değişimi Şekil 4.8'deki grafikte gösterildi.



Şekil 4.8: *F. graminearum* PH-1 referans suşu kontrol ve deney gruplarında SOD enzim aktivitelerini ifade eden % inhibisyon değerleri.

4.7. FLORESAN MİKROSKOBUNDA HÜCRESEL GÖSTERİM

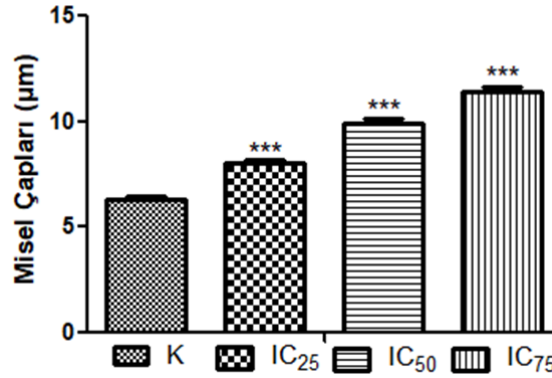
Linaloolün *F. graminearum* üzerindeki oksidatif ve apoptotik etkilerinin ortaya konulması için Ao/EtBr çift boyama ve H₂DCF-DA analizleri kontrol grubu, IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ deney gruplarında floresan mikroskobu kullanılarak gerçekleştirildi. Linalool konsantrasyonu artışı ile strese bağlı olarak organellerde ve hücre yapısında şişme, miselyum yapısında kalınlaşma ve klamidospore-benzeri yapıların geliştiği ortaya konuldu. Ancak, kontrol ve deney gruplarında spor oluşumu gözlemlenmedi.

Kontrol ve deney gruplarında 7 gün boyunca üretilmiş kültürlerdeki misel çapları ışık mikroskobunda incelenerek ölçüm alınmış ve 50'şer noktadan alınan ölçümlerden elde edilen verilerin ortalama değerleri ve standart hataları hesaplanarak Tablo 4.8'de özetlendi. PH-1 suşunun PDA besisi ortamında üretilmesi ile misel çaplarında gözlemlenen değerler kontrol grubunda 6,281±0,190 µm; %0,15 (v/v), %0,30 (v/v) ve %0,45 (v/v) linalool dozları uygulanan (IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅) kültürlerde ise sırasıyla 8,029±0,174, 9,933±0,238 ve 11,380±0,284 µm olarak bulundu.

Tablo 4.8: Linaloolün *F. graminearum* PH-1 suşunda doz artışına bağlı misel çapları (SH: standart hata).

Tür	Suş	Uygulama	Misel Çapları (µm) ±SH*
<i>F. graminearum</i>	PH1	Kontrol	6,281±0,190
		IC ₂₅	8,029±0,174
		IC ₅₀	9,933±0,238
		IC ₇₅	11,380±0,284

Linalool konsantrasyonu artışı ile misel çaplarının paralel olarak arttığı tespit edildi. Kontrol grubuna göre IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ dozlarında sırasıyla %27,8; %58,1 ve %81,1 oranında misel çaplarında artış olduğu ortaya kondu. Tek yönlü ANOVA testine göre artan dozlar ile misel çaplarındaki artışın istatistiki olarak anlamlı olduğu belirlendi (p<0,0001). Kontrol ve deney gruplarında misel çaplarındaki artış Şekil 4.9'daki grafikte gösterildi.

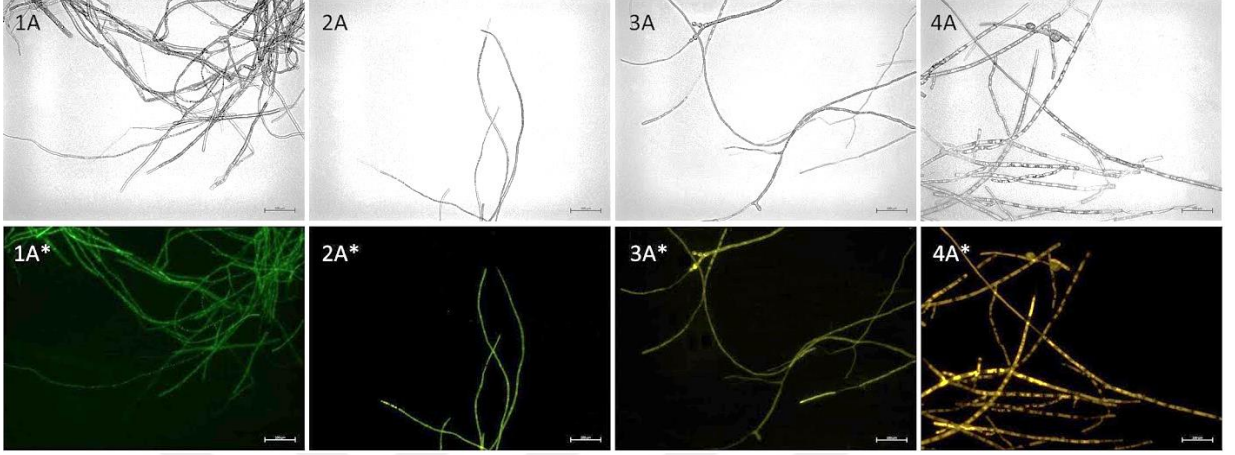


Şekil 4.9: *F. graminearum* PH-1 referans suşunda kontrol ve deney gruplarında misel çapları.

4.7.1. Ao/EtBr Çift Boyama Deneyleri

Sağlıklı hücrelerin zarlarından geçebilen Ao boyası hücrelerin floresan ışık altında yeşil renk ışıma yapmasını sağlamaktadır. EtBr ise sağlıklı hücrelerin zarlarından geçemezken, apoptotik sürece girmesinden dolayı zar geçirgenliği bozulan hücrelere girebilmekte ve hücrelerin floresan ışık altında kırmızı ışıma yapmasını sağlamaktadır. Ao/EtBr ikili boyamasında sağlıklı hücreler yeşil ışıma yaparken apoptoza giren hücreler hem Ao hem de EtBr'yi içerisine aldığından floresan ışık altında turuncu ışıma yapmaktadır. Ao/EtBr floresan mikroskobu görüntüleri (Şekil 4.10) incelendiğinde deney grubu hücrelerinin turuncu renk ışıma yaptığı,

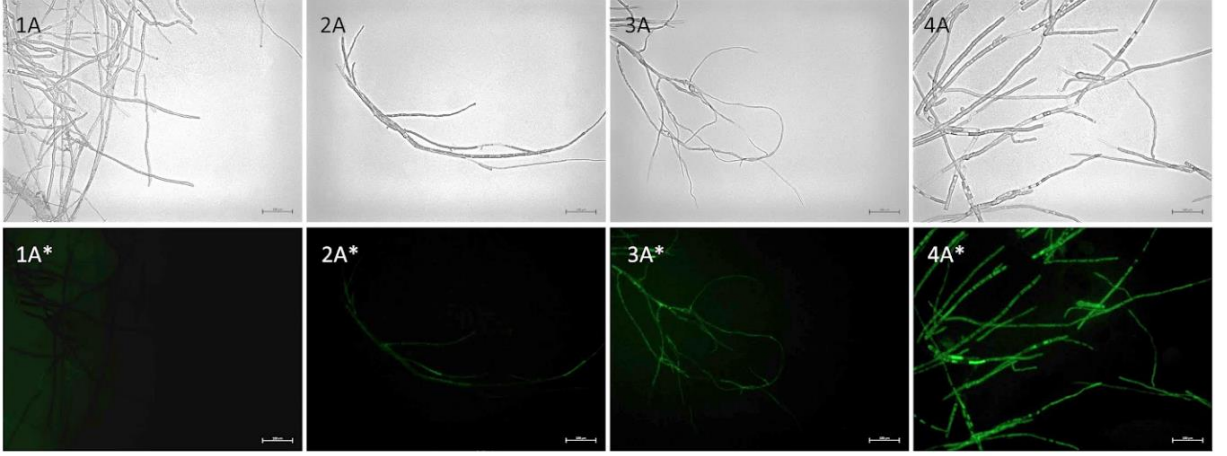
kontrol grubundaki hücrelerde ise yeşil renk ışıma yaptığı gözlemlendi ve fotoğraflandı. Bu doğrultuda linaloolün IC_{25} , IC_{50} ve IC_{75} konsantrasyonlarında apoptoza neden olduğu ve konsantrasyon artışı ile apoptotik aktivite arasında paralel bir ilişkinin olduğu ortaya kondu.



Şekil 4.10: Ao/EtBr boyaması yapılan hücrelerin ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri. 1A: Sadece PDA besi ortamında üretilen PH-1 kontrol grubu, 2A: %0,15 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu, 3A: %0,30 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu, 4A: %0,45 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu*: Floresan mikroskobu.

4.7.2. H_2DCF -DA Analizleri

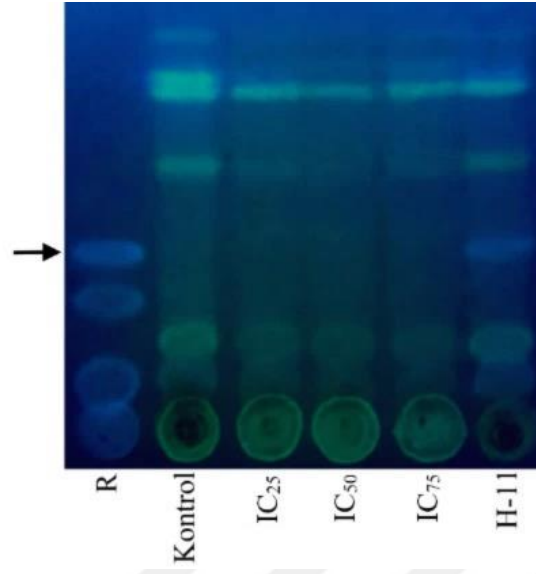
Hücre içi serbest radikalleri, ROS, hücrede ve çevresinde sürekli olarak üretilerek hücrenin yaşam döngüsünde pek çok sinyalizasyon yolağında mesajcı olarak görev yapmaktadır. Ancak ortamda koşulları sonucu oluşan stres sonucunda artan serbest radikaller oksidatif stres oluşturarak hücre lipid yapısı başta olmak üzere çeşitli organellere zarar verebilmektedir. H_2DCF -DA ortamda bulunan ROS ile reaksiyona girerek DCF-DA'ya çevrilmektedir. Hücre içi reaktif oksijen miktarı arttıkça ışıma miktarı da artmaktadır. Yeşil floresan ışıma yapıp görüntülenmeyi sağlayan, miselyumdaki oksidatif stres etkisiyle oluşan DCF-DA'dır. DCF-DA floresan mikroskobu görüntüleri (Şekil 4.11) incelendiğinde deney gruplarında linalool konsantrasyonuna bağlı olarak parlak yeşil bir ışıma gözlemlenirken kontrol gruplarından yeşil ışıma elde edilemedi. Bu doğrultuda, linalool konsantrasyonu artışıyla birlikte oksidatif stres oluştuğu ve stres düzeyinin de arttığı hücresel düzeyde de gösterildi ve fotoğraflandı. Konsantrasyon artışı ile oksidatif stresin anlamlı bir ilişkisinin olduğu ortaya kondu.



Şekil 4.11: H₂DCF-DA boyaması yapılan hücrelerin ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri. 1A: Sadece PDA besi ortamında üretilen PH-1 kontrol grubu, 2A: %0,15 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu, 3A: %0,30 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu, 4A: %0,45 (v/v) linalool içeren besi ortamında üretilen PH-1 deney grubu. *: Floresan mikroskobu.

4.8. LİNALOOLÜN DON ÜRETİMİNE ETKİSİ

TLC’de ticari DON mikotoksini *R_f* değerinin 0,28 olduğu belirlendi (Şekil 4.12). DON mikotoksini üreticisi olduğu bilinen *F. graminearum* H-11 suşundan elde edilen mikotoksin ekstresinde 0,28 *R_f* değerli spot gözlemlenmesi, pozitif kontrol olarak TLC’de belirlenebilecek kadar DON mikotoksini ürettiğini ortaya koydu. *F. graminearum* PH-1 referansının kontrol ve deney gruplarından elde edilen mikotoksin ekstresinde 0,28 *R_f* değerli bir spotun gözlenmemesi, PH-1’in DON mikotoksinini üretmediğini ve/veya TLC’de belirlenebilecek kadar üretmediğini ortaya koydu.



Şekil 4.12: *F. graminearum* PH-1 kontrol ve deney gruplarından ve H-11'den elde edilen mikotoksin ekstraktlarının 356 nm UV ışık altındaki TLC plaka görüntüleri (ok işareti 0,28 *R_f* değerindeki DON spotunu göstermektedir).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

EY'lar doğal olarak bulunan ve bitkilerin patojenik olarak istenmeyen mikroorganizmalara ve böceklerle karşı korunmasında aktif rol oynayan fitokimyasallardır. Yapılarında çok sayıda bileşen içerdikleri için, hücrede spesifik bir hedefleri bulunmasa da tipik olarak sahip oldukları OH grupları sayesinde hücrede membran yapılarını etkileyerek sitotoksik etki sağlamaktadırlar. Membran hasarı ve ilişkili olarak gerçekleşen oksidatif stres yanında hücre duvarına hasar vererek makromoleküllerin sızmasında ve hücresel parçalanmaya sebep olmaktadır (Bakkali ve diğ., 2008). Mevcut tez önerisinde esansiyel yağ bileşiklerinden linaloolün antifungal etkilerinin denendiği *Fusarium spp.* ise toprakta, tahıllarda, çeşitli organik koşullarda yayılan ve ağırlıklı olarak tahıllar, meyveler ve sebzeler tarafından barındırılan 80'den fazla fitopatojenik türü içeren mikroskobik filamentli mantar sınıfıdır. Bu türler belirli koşullar altında insan ve hayvan sağlığını tehdit edici mikotoksinler sentezleme yeteneğine sahiptir. Ürün verim kaybına ve FHB'ye neden olan *F. graminearum* ise dünya çapında küçük taneli tahılları tehdit eden en baskın ve yıkıcı patojendir (Trail, 2009). *F. graminearum* ile mücadelede EY'ların kullanımı önem kazanmaktadır (Gazdağlı ve diğ., 2018; Harčárová ve diğ., 2021; Teker ve diğ., 2021). Yapılan pek çok çalışma, EY'ların en büyük sınıfı olan monoterpenlerin potansiyel antifungal ajan olduklarını göstermektedir. Birbirleri ile antagonistik ve sinerjetik bir etkileşimleri bulunabilen EY bileşenlerinin saf formlarda etkilerinin incelendiği çalışmalar ise oldukça sınırlıdır. Gerçekleştirilen yüksek lisans projesinde çeşitli bitkilerde majör bileşen olan ve monoterpenler sınıfında bulunan linalool fitokimyasalının *F. graminearum* PH-1 referans suşu üzerindeki etkileri hücresel düzeyde araştırılmıştır.

Bir bileşenin etkilerinin doğada *in vivo* ya da laboratuvar koşullarında *in vitro* analizinde ilk ve en önemli basamak bileşenin çözündüğü çözücüdür. Bileşenin organik ya da inorganik çözücüler ile uygulanabilir olduğu durumlarda, bileşenin etkilerinin çözücü etkilerine göre yorumlanması gerekmektedir. Bu durum hem uygulama maliyetini hem de analiz sonucunu etkileyen bir faktördür. Yanıcı ve toksik olmayan, çevrenin kirlenmesine sebep olmayan ve maliyetin düşük kalmasını sağlayan suyun çözücü olarak kullanılabilmesi, bileşenin etkilerinin gözlemlenmesinde avantaj sağlamaktadır. Linalool suda nispeten çözünmektedir (25°C'de

1590 mg/L)⁴. Pitarokili ve diğ. (2002)'nin belirlediği MİK değeri baz alınarak hazırlanan deney gruplarında polimerizasyonu tamamlanmamış besiyerlerine 8,7 mg/L (%0,1 v/v) ile 87 mg/L (%0,1 v/v) aralığında linalool eklenmiş olup, besiyeri içerisinde linaloolün tamamen çözündüğü gözlenmiştir. Linaloolün besiyerleri hazırlamasında kullanılan suyun içerisinde çözünebilmesi sayesinde, deney süresince normalizasyon grubu kurulmasına gereksinim duyulmamıştır. Linalool içermeyen besiyerleri ile kurulan deney grubu kontrol grubu olarak ifade edilmiştir.

MİK, etkinliği tahmin edilen antifungal ajanların hücrelerdeki etkilerinin incelenmesinde saptanması gereken en önemli parametredir. Uygulanacak antifungal ajanın MİK değerinin düşük olması, uygulama süresince oluşabilecek yan etkilerin minimum tutulmasında ve maliyetin düşürülmesinde oldukça önemlidir. Üremenin inhibe edildiği minimum konsantrasyon saptandıktan sonra, bu değer logaritmik değerleri olan IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ kullanılarak oluşturulan deney gruplarında değişikliği incelenmek istenen parametreler değerlendirilir. Elde edilen sonuçlar konsantrasyon değişimi ve değerlendirilen etkilerin sürdürülebilirliği arasında da yorum yapma olanağı tanımaktadır. Tez çalışması kapsamında da linaloolün *F. graminearum* PH-1 referans suşu üzerindeki hücresel etkilerini incelemek üzere MİK değeri belirlenmiş, IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ dozları hesaplanmıştır. PDA besiyerinde uygulanan %0,60 (v/v) linalool konsantrasyonunun *F. graminearum* PH-1 referans suşunun üremesini inhibe ettiği belirlenmiştir (p<0,0001). Deney süresince ticari olarak kullanılan linaloolün konsantrasyonu ele alındığında, IC₅₀ grubunda uygulanan yağ derişiminin 26,1 mg/L olduğu hesaplanmıştır. Gao ve diğ. (2016) monoterpen ailesinden olan timol ile yaptıkları çalışmada, timolün PDA besiyerinde *F. graminearum* PH-1 referans suşu üzerindeki IC₅₀ değerinin 26,68 mg/L olduğunu rapor etmiştir. Gazdağlı ve diğ. (2018) Saf kamfor ile yapmış oldukları çalışmada, *F. graminearum* ve *F. culmorum*'da IC₅₀ değerinin 500 mg/L olduğunu saptamıştır. Daferera ve diğ. (2003) majör bileşeni linalool olarak saptanan (%25,5) lavanta yağı ile PDA besiyerinde yaptıkları çalışmada, *F. solani* var. *seruleum* türünde lavanta yağının IC₅₀ değerinin 520 mg/L olduğu rapor etmiştir. *F. solani* üzerinde yapılan bir diğer çalışmada ise, Hussain ve diğ. (2008) PDA besiyerinde majör bileşeni linalool olarak saptanan (%56,7-60,6) ve dört farklı mevsimde toplanan fesleğen bitkisi ile ticari saf linaloolü kullanarak IC₅₀ değerlerini sırası ile

⁴ National Center for Biotechnology Information, 2021, PubChem Annotation Record for LINALOOL, Kaynak: Hazardous Substances Data Bank (HSDB), <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/645>, [Ziyaret Tarihi: 12 Haziran 2021].

1350 mg/L; 2450 mg/L ve 800 mg/L olarak bulmuşlardır. Naveen Kumar ve diğ. (2016) *F. graminearum*'da major bileşeni ar-Turmeron olan zerdeçal yağı ile yaptıkları çalışmada, IC₅₀ değerini 1225 mg/L olarak bildirmiştir. Hamdani ve diğ., (2017) saf timol, karvakrol, öjanol ve mentol ile *F. oxysporum f. sp. dianthi*'de yaptıkları çalışmada, IC₅₀ değerlerini sırası ile 250 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L ve 2000 mg/L bulmuşlardır. Saf öjanol, metil öjanol ve östragol ile yapılan bir çalışmada ise (Khan ve diğ., 2010) *C. albicans*'da IC₅₀ değerleri sırası ile 250 mg/L, 175 mg/L ve 100 mg/L şeklinde hesaplanmıştır. Tüm bu çalışmalar hem linaloolün etkinliğinin karışım haldeki EY'lar içerisinde diğer bileşenler ile etkileşimi sonucu değişken olabileceğini hem de aynı cins içinde farklı türlerin (*F. graminearum* ve *F. solani* var. *seruleum*) linalool hassasiyetlerinin farklı olabileceğini ortaya koymuştur. Aynı zamanda tez çalışması kapsamında elde edilen IC₅₀ derişiminin önceki çalışmalarda kullanılan monoterpen derişimlerine göre düşük değerde olması, linaloolün antifungal etki süresince güçlü bir ajan görevi görebileceğini düşündürmüştür.

Antifungal ajanların etkileri incelenirken, uygulanan ajanın hücre canlılığı üzerindeki etkisi çeşitli sitotoksik testler ile incelenebilmektedir. Formazan tuzları [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromü, 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid ve WST-1] proliferasyona uğrayan hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi ile formazon kristallerine dönüşmektedir. Oluşan formazon tuzları spektrofotometrik olarak ölçülerek hücre canlılığı yüzde (%) değerleri belirlenebilmektedir (Erkekoğlu ve Baydar, 2021). Çeşitli mantar türleri ile yapılan bir çalışmada, WST ile hücre canlılığının mantarlarda da incelenebildiği ortaya konmuştur (Tsukatani ve diğ., 2014). Yapılan tez çalışması kapsamında, linaloolün hücre canlılığı üzerine etkisi WST-1 ile başarılı biçimde incelenmiştir. Linaloolün *F. graminearum* PH-1 referans suşu üzerinde, doz artışı ile yüzde (%) hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir. Canlı hücre sayısının IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ dozlarında kontrole göre sırasıyla %33,09; %76,44 ve %86,03 oranında azaldığı, en düşük canlı hücre sayısının IC₇₅ linalool dozu uygulanan grupta olduğu belirlenmiştir (p<0,0001). IC₂₅'e göre IC₅₀'deki canlı hücre sayısındaki güçlü düşüş Meletiadis ve diğ. (2000)'nin belirlediği gibi antifungal ajan konsantrasyonuna bağlı olarak canlı hücre sayısındaki azalışı ortaya koymaktadır. Bununla beraber IC₇₅ dozunda canlı hücre sayısındaki düşüş azalmıştır. Elde edilen bulgu, Kuhn ve diğ. (2003) tarafından bildirilen, doz artışı ile antifungal ajanların canlı hücre sayısını düşürdüğü ancak doz yükseldikçe bu düşüşün azaldığını belirttikleri çalışma bulgusu ile paraleldir. EY'ların mitokondriyal membran ve DNA üzerinde oluşturdıkları stres

ile hem mitokondriyal aktiviteyi arttırdığı hem de hücrede sitotoksik bir etki oluşturabilecekleri yapılan çalışmalarla da ortaya konmuştur (Bakkali ve diğ., 2005). Linaloolün de *F. graminearum* PH-1 suşunda mitokondri aktivitesini arttırmış olabileceği düşünülmüştür.

EY'ların antifungal ajan olarak kullanıldığı çalışmalarda, yağın ilk aşamada hücre zarı ve lipidleri ile etkileştiği düşünülmektedir. EY'ın, uygulanan hücreye girerken hücre zarındaki lipidler ile etkileşime giren OH grupları sayesinde lipid peroksidasyonu sürecini hızlandırabileceği ve oksidatif stresin ilk basamağının gerçekleşeceği öngörülmektedir. Bu basamaktan sonra ise, hücre içi stresin basamaklar halinde tüm hücre içi ve organellere, protein ve DNA üzerine yayıldığı yapılan çalışmalarca ortaya konmuştur (Fukumoto ve Mazza, 2000; Burt, 2004; Barbehenn ve diğ., 2005). Ayrıca, hücre içi oksidatif stresin artmasının bir etkisi olarak oluşan serbest ROS'lerinin de elektron dengesini bozarak lipid peroksidasyonunu ilerlettiği gözlenmiştir (Khan ve diğ., 2013). Lipid peroksidasyonunun incelenmesi için temelde üç yol izlenmektedir. Bunlar sırası ile oksijen alımının ölçülmesi, lipid yapısında bulunan hidroperoksitlerin ölçülmesi ve lipid peroksidasyonu sonucu oluşan aldehitlerin ölçülmesidir (Yarsan, 1998). Lipid peroksidasyonu süresince oluşan aldehitlerden biri olan MDA'nın TBA ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan kırmızı-pembe tonlarındaki ışıma, spektrofotometrik olarak ölçüm imkânı sağlayarak yorum yapılmasını sağlamaktadır (Aguilar Diaz De Leon ve Borges, 2020). Linalool ile yapılan tez çalışmasında, EY konsantrasyonuna paralel olarak *F. graminearum* PH-1 suşunda MDA birikiminde artış olduğu saptanmıştır. Kontrol grubuna göre IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ dozlarında sırasıyla %64,68; %145,16 ve %392,47 oranında artış olduğu, en yüksek seviyedeki MDA birikiminin IC₇₅ linalool dozu uygulanan grupta olduğu belirlenmiştir (p<0,0001). Esas bileşeni geraniol (%19,06) olan Palmarosa EY ile *F. graminearum* üzerinde yapılan bir çalışmada (Kalagatur ve diğ., 2018) konsantrasyon artışı ile MDA miktarı artışındaki paralellliği işaret etmektedir. Gao ve diğ., 2016'da yaptıkları çalışmada *F. graminearum* PH-1 suşunda 100 mg/L timol uygulanan deney grubunda MDA birikiminin %160 arttığını ortaya koymuştur. Linaloolün IC₅₀ değerinde (26,1 mg/L) MDA birikimini %145,16; IC₇₅ değerinde (39,15 mg/L) %392,47 arttırması, linaloolün timole göre lipid peroksidasyonu üzerinde çok daha kuvvetli bir etkisi olduğunu ortaya koymaktadır. Khan ve diğ. (2010b) saf öjanol, metil öjanol ve östragol ile yaptıkları çalışmada ise *C. albicans*'da EY'ların konsantrasyonuna bağlı olarak lipid peroksidasyonunda kuvvetli bir artış saptamıştır. Gao ve diğ. (2016)'nin lipid peroksidasyonundaki artışın hücre zarında bulunan NADPH

oksidazların ROS üretimini arttırması ile bağlantılı olduğunu belirtmesi, linaloolün de NADPH oksidazlar üzerine etkisi olabileceğini düşündürmüştür.

EY'lar ile yapılan çalışmalarda, membran yapılarının bozulması ve organellerinin şişmesi prooksidan aktivite ile oksidatif stresin artışı akıllara getirmektedir. Bunun sebebi olarak ilk etapta hidrofobik yapılarının hücre zar ve organelleriyle etkileşime girerek hücre içindeki radikallerin, sitokrom C'nin, kalsiyum iyonlarının ve proteinlerin yapı ve oranlarını değişmesidir. Sonuç olarak da membran yapısı anormal derecelerde etkilenmektedir. Tüm hücreyi etkileyen bu süreç, hücre içi oksidatif stresi de beraberinde getirmektedir (Sakagami ve Satoh, 1997; Cowan, 1999; Sakagami ve diğ., 1999; Fukumoto ve Mazza, 2000; Sakihama ve diğ., 2002; Burt, 2004; Barbehenn ve diğ., 2005). Hücre içi oksidatif stresin incelenmesinde pek çok metot mevcuttur. Hidrofobik yapıda ve floresan özelliği olmayan H₂DCF-DA molekülü hücre içinde bulunan esterase enzimleri tarafından hidroliz edilmektedir. Sonrasında ROT tarafından okside edilmesiyle floresan bir bileşik olan DCF-DA ortaya çıkmaktadır (LeBel ve diğ., 1992; Naveen Kumar ve diğ., 2016). Hücre içi reaktif oksijen molekülleri ile floresan ışımada paralel bir ilişki kurulmaktadır. Işıma hem floresan mikroskop ile hem de spektrofotometrik yöntemler ile incelenebilmektedir. Hücre içi oksidatif stresin filamentli mantarlarda H₂DCF-DA analizi ile incelendiği pek çok çalışmada mevcuttur (Liu ve diğ., 2010; Gazdağlı ve diğ., 2018; Kalagatur ve diğ., 2018; Yörük, 2018; Valenzuela-Cota ve diğ., 2019, Teker ve diğ., 2021). Tez çalışması kapsamında da linaloolün *F. graminearum* PH-1 referans suşunda kontrol ve deney gruplarında oluşturduğu oksidatif stres, hücresel düzeyde H₂DCF-DA boyası kullanılarak spektrofotometrik ölçümle analiz edilmiştir. PDA besiyerinde kültürlenmiş kontrol ve deney gruplarından alınmış 1'er cm²'lik alandaki hücreler H₂DCF-DA boyası ile boyanmıştır. Kontrol grubuna göre IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ dozlarında sırasıyla %467, %1477 ve %3523 oranında hücre içi oksidasyonun arttığı, en yüksek seviyedeki hücre içi oksidasyonun IC₇₅ grubunda olduğu belirlenmiştir. Kalagatur ve diğ., 2018 yılında yapmış olduğu çalışmada, esas bileşeni geraniol (%19,06) olan Palmarosa EY'nin konsantrasyon artışına bağlı olarak *F. graminearum*'da hücre içi oksidasyonunun artışı ortaya koymuştur. Major bileşeni ar-Turmeron olan zerdeçal yağı ile *F. graminearum* üzerinde yapılan çalışmada ise Naveen Kumar ve diğ. (2016) EY oranı ile hücre içi oksidasyonun paralel bir şekilde arttığını bildirmişlerdir.

Terpenlerin sahip oldukları fenolik hidroksil (OH) grupları ile hücre içi redoks dengesini etkileyerek prooksidan etkisi gösterip oksidatif stresi arttırdıkları ortaya konmuştur (Ultee ve diğ., 2002; Ben Arfa ve diğ., 2006; Veldhuizen ve diğ., 2006). Angelova ve diğ. (2005) yapmış oldukları çalışmada, endojen ROS uygulaması sonucu çeşitli filamentli mantarda enzimatik savunma sistemlerinin önemini ve enzim düzeylerinde aşağı ve yukarı düzenlenmeler olabileceğini göstermiştir. Hücre içi oksidatif stresin enzimatik savunma sistemlerine dahil olan SOD, POD ve KAT'ın bitki patojeni olan *F. graminearum*'da hem bitkiyi enfekte etme süresince hem de antifungal ajan uygulamaları sonucunda aktif rol alarak ROS dengesini sağladıkları bilinmektedir. Hücre içerisinde derişimi artan serbest radikallerin önce SOD ile H_2O_2 'ye, sonra da KAT ya da POD aracılığı ile suya parçalanması ile oksidatif stresin oluşması engellenmektedir (Dröge, 2002). Bu enzimlerin hücre içindeki seviyelerinin takibi ile hücre içi oksidatif stres ile ilgili bilgi edinilmektedir (Burton ve Jauniaux, 2011).

Peroksidazlar, elektron alıcıları olarak H_2O_2 veya organik hidroperoksitleri kullanarak çeşitli organik ve inorganik bileşiklerin oksidasyonunu katalize eden başlıca H_2O_2 parçalayıcı enzimlerdir. POD'un H_2O_2 'ye ilgisinin KAT'ten daha yüksek olduğu, bu sebeple de oksidatif stres durumunda hücre içi ROS seviyesinin dengelenmesinde oldukça önemli olduğu da yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Davletova ve diğ., 2005). Ortamda bulunan askorbik asit, elektron vericisi olarak görev yaparak indirgenmiş askorbatın oluşmasını sağlar (Heller ve Tudzynski, 2011). Yapılan tez çalışmasında, indirgenmiş askorbatın spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile hücre içi POD aktivitesi incelenmiştir. *F. graminearum* PH-1 referans suşunda linalool konsantrasyon artışına paralel olarak kontrol grubuna göre IC_{25} , IC_{50} ve IC_{75} dozlarında sırasıyla %83,6; %213,7 ve %407,7 oranında spesifik aktivitenin arttığı saptanmıştır. Benzer bir şekilde monoterpen ailesinin üyesi olan kamfor EY ile yapılan bir çalışmada Gazdağı ve diğ. (2018), doz artışına bağlı olarak POD aktivitesinin arttığını gen anlatımı düzeyindeki değişimi belirleyerek ortaya koymuştur.

POD gibi KAT da elektron alıcısı olarak H_2O_2 veya organik hidroperoksitleri kullanarak çeşitli organik ve inorganik bileşiklerin oksidasyonunu kataliz eden başlıca H_2O_2 parçalayıcı enzimlerdendir. Her ne kadar POD'un H_2O_2 'ye ilgisi KAT'tan yüksek olsa da POD'un ortamda bulunan H_2O_2 konsantrasyonundaki artışta doyum noktasına ulaşma süresi KAT'dan düşüktür. Bu sebeple POD düşük konsantrasyondaki H_2O_2 'ye yüksek ilgi gösterse de yüksek konsantrasyondaki H_2O_2 'ye yüksek ilgi gösterip suya parçalanmasında KAT büyük bir önem

taşımaktadır (Aslankoç ve diğ., 2020). Linaloolün *F. graminearum* PH-1 referans suşu üzerindeki oksidatif stres etkisi KAT seviyesinde de incelenmiştir. Kontrol grubuna göre linaloolün IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ dozlarında spesifik aktiviteyi sırasıyla %180,%409 ve %1180 oranında arttırdığı saptanmıştır. Gazdağlı ve diğ. (2018) kamfor aktif bileşiği konsantrasyonuna bağlı KAT aktivitesindeki artışı gen anlatımı düzeyindeki artışla göstermişlerdir.

SOD'lar hem mitokondride hem de sitozolde süperoksit radikalini (O₂•) hidrojen perokside (H₂O₂) ve moleküler oksijene (O₂) dönüştürerek antioksidan savunma sisteminin ilk basamağını oluşturmaktadır (Burton ve Jauniaux, 2011). Hücre içerisindeki artan ROS ile membran yapılarının bozulması, lipid peroksidasyonunun artması ve mitokondriyal aktivitenin yükselmesi sonucu redoks dengesinin kurulmasını sağlamak için SOD aktivitesi, oksidatif stresin incelenmesinde kilit rol oynamaktadır. Bu sebeple, linaloolün *F. graminearum* PH-1 suşu üzerindeki etkisi incelenirken SOD aktivitesi de analiz edilmiştir. Yüksek oksidatif stres sonucu SOD enziminin tüketilmesi, ışımaya şiddetinin artışı ile yorumlanmış ve bulgular % inhibisyon olarak ifade edilmiştir. IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ doz uygulamalarının SOD aktivitesini kontrol grubuna göre sırasıyla %847, %1840 ve %2304 oranında arttırdığı saptanmıştır.

Ayar-Kayali ve diğ. (2002)'nin *F. acuminatum* ile yaptığı çalışmanın aksine, gerçekleştirilen çalışmada saptanan SOD, KAT ve lipid peroksidasyonu seviyeleri arasındaki korelasyon, linaloolün hem lipid hem de hücre içerisinde oksidatif hasarı arttırarak antifungal etki sağladığını ortaya koymuştur. Linaloolün *C. albicans* üzerindeki etkisinin incelendiği bir başka çalışmada ise (Máté ve diğ., 2017) konsantrasyon artışına bağlı olarak lipid peroksidasyonu seviyesinde artış gözlenirse de hücre içi ROS seviyesinde düşüş meydana gelmiştir. Enzim aktiviteleri incelendiğinde ise, POD aktivitesinde konsantrasyon artışına bağlı olarak artış gözlenmiştir. SOD ve KAT aktivitelerinde ise önce düşüş sonrasında da artış saptanmıştır. Bu durum linaloolün lipid peroksidasyonunu ve hücre içindeki H₂O₂ konsantrasyonunu arttırması sonucu POD aktivitesini arttırdığını; POD'un H₂O₂ açısından doyma noktasına ulaştığında KAT aktivitesinin artışa geçtiğini düşündürmüştür. Khan ve diğ. (2010b) *C. albicans* üzerine yapmış oldukları bir diğer çalışmada ise saf öjanol, metil öjanol ve östragol EY'ların konsantrasyonuna bağlı olarak SOD ve KAT aktivitesinde kuvvetli bir artış gözlemişken, POD aktivitesinin kuvvetli artışın ardından düşüş eğilimine geçtiğini gözlemiştir. Bu durumda da Aslankoç ve diğ. (2020)'nin belirttiği gibi POD'un H₂O₂ açısından doyma noktasına ulaştığını düşündürmüştür. Yapılan tez çalışmasında linalool konsantrasyonu sonucu POD aktivitesine

göre aynı konsantrasyonlarda KAT aktivitesindeki artışın yüksek oluşu, oksidatif stres ile SOD aktivitesindeki kuvvetli artış sonucu yüksek miktarda oluşan H_2O_2 'nin detoksifikasyonunda POD'un yetersiz kaldığı ve KAT aktivitesinin yüksek oranlarda devam ettiğini göstermiştir.

Hem eşeyli hem de eşeysiz üreme döngülerinde üretilen sporlar, *Fusarium* türlerinin farklı uyaranlara maruz kalmasına karşılık çok çeşitli nişlerde hayatta kalarak fitopatojenin geniş alanlara yayılmasını sağlamaktadır. Bu uyaranlar arasında bakteri, virüs ve mantar gibi organizmaların neden olabileceği hasarlar ve sıcaklık, pH, besin kısıtlaması, oksidatif stres, ozmotik stres ve UV radyasyonundaki değişiklikler gibi biyotik ve abiyotik stresler bulunmaktadır (Aghchek ve Braus, 2018). *F. graminearum* bitki patojeni *in vitro* koşullarda, PDA besiyerinde spor üretmezken çeşitli stres koşulları ile karşılaştığında spor üretimini gerçekleştirmektedir (Wing ve diğ., 1995; Leslie ve Summerell, 2006; Seifert, 2006). Bu nedenle, *Fusarium spp.* ile mücadelede uygulanan antifungal ajanın meydana getirdiği stres sonucu spor üretiminin gözlenmemesi oldukça önemlidir. OH grubuna sahip terpenoidlerin hidrojen bağları oluşturarak hidrofobik yapı sayesinde hücre ve organel zarlarının geçirgenliğini etkiledikleri de bilinmektedir. Işık mikroskopisi görüntüleri incelendiği zaman, *F. graminearum* PH-1 referans suşunda kontrol ve deney gruplarının PDA besiyerinde linalool konsantrasyonu artışı ile strese bağlı olarak organellerde ve hücre yapısında şişme, miselyum yapısında kalınlaşma ve klamidospore-benzeri yapıların geliştiği ortaya konmuş ancak olgun spor yapıları gözlenmemiştir. Kontrol grubuna göre IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ dozlarında sırasıyla %27,8; %58,1 ve %81,1 oranında misel çaplarında artış olduğu ortaya konmuştur. Okaliptus yağı ile yapılan bir çalışmada, konsantrasyon artışı ile zar bütünlüğü bozulmasının *F. oxysporum*'da bağlantılı olduğu, şişmiş ve atipik klamidospore yapılarının oluştuğu ortaya konmuştur (Arango ve diğ., 2011). Gao ve diğ. (2016) monoterpen olan timolün ergostrol biyosentezine etki ederek *F. graminearum*'da membran bütünlüğünü bozduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca yapılan çalışmalar, zar bileşenlerinin kiral bileşenler içermesinden ötürü, izomer yapılarına sahip monoterpenler ile etkileşimde izomerler arası etkinin de farklı olabileceğini göstermiştir (Bernardini ve diğ., 2009). Dambolena ve diğ., 2008'da yaptıkları çalışmada mentol monoterpeni uygulanmış *F. verticillioides* suşunda membran yapısını bozduğunu (+)-mentolün (-) mentole göre zar lipidleri ile etkileşiminin ise daha güçlü olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan tez çalışması sırasında linalool konsantrasyonundaki artışın yol açtığı miselyum kalınlaşması ve klamidospore-benzeri yapı oluşumu, hücre membran yapısındaki bozulmayı işaret etmektedir. Ticari olarak satın alınan linalool (Sigma Aldrich,

#L2602) hem (S)-(+)-linalool (koriandrol) hem de (R)-(+)-linalool (lisareol) içeren rasemik bir bileşendir. İki izoformun ayrı ayrı incelenememesi, tez çalışmasında linaloolün kiral yapılarının *F. graminearum* üzerindeki etkisinin değerlendirilmesini sınırlandırmıştır.

Hidroforbik yapıdaki terpenler ile yapılan önceki çalışmalardan farklı olarak, gerçekleştirilen tez çalışmasında hücre içi ROS birikimi sonucu oluşan oksidatif stresin H₂DCF-DA analizi ile spektrofotometrik olarak ortaya konmasının yanı sıra hücresel düzeyde floresan mikroskopisi ile de görüntülenmiştir. *F. graminearum* PH-1 referans suşunda linalool konsantrasyon artışına paralel olarak kontrol grubuna göre IC₂₅, IC₅₀ ve IC₇₅ dozlarında ROS'a bağlı olarak yeşil ışımaya gözlenmiştir. Hücrelerde redoks dengesi durumunda var olan ROS'un oluşturabileceği soluk yeşil ışımaya göz önüne alınsa da doz artışına bağlı olarak ışımaya şiddetinin artışı spektrofotometrik H₂DCF-DA analizi ile uyum göstermiştir. Elde edilen bulgular, literatür ile paralellik göstermiştir. Kalagatur ve diğ. (2018) de yapmış oldukları çalışmada esas bileşeni geraniol (%19,06) olan Palmarosa EY uygulanmış *F. graminearum*'da konsantrasyon artışı ile ışımaya miktarının şiddetlendiğini bildirmiştir. Kamforun *F. graminearum* ve *F. culmorum*'da oksidatif stres etkisini inceleyen Gazdağlı ve diğ. (2018), spektrofotometrik H₂DCF-DA analizi ile paralel floresan mikroskopisi ile H₂DCF-DA analizini gerçekleştirerek EY uygulaması sonucu yeşil ışımaya şiddetinin arttığını görüntülemişlerdir. Naveen Kumar ve diğ. (2016)'da major bileşeni ar-Turmeron olan zerdeçal yağı ile *F. graminearum*'da yaptıkları çalışmada, konsantrasyon artışına paralel olarak yeşil ışımaya arttığını gözlemleyerek spektrofotometrik analizlerini desteklemişlerdir.

Hücre içi ROS seviyesinin artışı lipid sistemlerinde oluşan hasarın yanında DNA, RNA ve proteinler de tahrip olmaktadır. Bu süreç, spor çimlenmesi ve biyokütle üretimini inhibe ederek mantarlarda oksidatif stres aracılı apoptotik hücre ölümünü tetiklemektedir (Liu ve diğ., 2010; Kalagatur ve diğ., 2018). Apoptoz, mikroskobik olarak hücrede hematoksilen-eozin ve giemsa boyamaları ile ışık mikroskopisinde incelenebileceği gibi Ao/EtBr, 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), propidium iyodür, floresan izotiyosiyanat (FITC) boyaları ile floresan mikroskopisinde, elektron mikroskopisinde ve faz kontrast mikroskopisinde de incelenebilmektedir (Güleş ve Eren, 2008). Floresan mikroskopisinde hem sağlıklı hem de ölü hücrelerin içine girip DNA içerisine kenetlenerek yeşil ışımaya sağlayan Ao ile sadece ölü hücrelerin içine girip DNA içerisine kenetlenerek kırmızı ışımaya sağlayan EtBr boyalarının kullanıldığı Ao/EtBr çift boyama analizi yaygın olarak kullanılmaktadır. Yöntem hızlı ve

güvenilir olmasının yanında filamentli mantarlarda da kullanılmaktadır (Kosalec ve diğ., 2013; Leles ve diğ., 2013; Gazdağlı ve diğ., 2018; Yörük, 2018; Teker ve diğ., 2021). Yapılan tez çalışmasında linaloolün kontrollü hücre ölümü yoluyla etkili olduğu hücresel düzeyde Ao/EtBr ikili boyamasıyla analiz edilmiştir. Linalool konsantrasyonunun artışı ile paralel olarak yeşil ışımadan kırmızı ışımaya doğru geçişin gözlenmesi, WST-1 hücre canlılığı deneylerinin sonucu ile uyumlu bulunmuştur.

Dış ve iç mitokondriyal zarların geçirgenliğindeki değişiklikler apoptoz ve nekroz yoluyla hücre ölümüne yol açabilmektedir. Filamentli mantarlarda apoptoz dışında otofaji ve nekroz da gözlenmektedir. Otofajinin mantar büyümesi, hava hif üretimi, konid üretimi ve çimlenmesi ve bitkileri enfekte etme sürecinde önemli bir rol üstlendiği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Farklı filamentli mantarlarla yapılan çalışmalar, stres koşullarında bu sürecin otofajik hücre ölümü ile sonlandığını göstermiştir (Pinan-Lucarré, Balguerie ve Clavé, 2005; Veneault-Fourrey, 2006). *F. graminearum*'da ise otofaji stres koşulları altında hücre içi lizozom ve vakuollerle zar yapılarının yeniden düzenlenmesi sürecinden sorumludur (Lv ve diğ., 2017). Nekroz ise, filamentli mantarlarda hücre zarının ve duvarının parçalanması olarak tanımlansa da bu konuda yeterli çalışma mevcut değildir (Laporte ve diğ., 2006; Aryamloo ve diğ., 2019). Tez çalışması kapsamında linaloolün *F. graminearum*'da otofaji ve nekroz mekanizmaları üzerine etkisinin araştırılmamış olması hücresel ölüm mekanizmaları üzerindeki etkisinin değerlendirilmesini sınırlandırmıştır.

Filamentli mantarların oksidatif strese yanıt mekanizmaları arasında mikotoksin üretiminde artış, yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Ponts ve diğ., 2006; Reverberi ve diğ., 2010; Temme ve diğ., 2012; Yin ve diğ., 2013; Hayes ve diğ., 2014; Montibus ve diğ., 2015). Antifungal ajan uygulamalarında, tüketilmesi hem insan hem de hayvanlar için riskli ve toksik olan mikotoksin üretiminin baskılanması önemlidir. Yapılan tez çalışmasında, linaloolün *F. graminearum* PH-1 referans suşunda DON mikotoksininin üretimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ticari olarak temin edilen DON standartının TLC'deki *Rf* değeri 0,28 olarak hesaplanmıştır. Aynı yöntemin uygulandığı farklı çalışmalarda da DON *Rf* değeri 0,28 olarak bildirilmiştir (Gazdağlı ve diğ., 2018; Yörük ve Albayrak, 2019). Kontrol ve deney gruplarında DON mikotoksine ait *Rf* değerli (0,28) bir spot saptanmamıştır. Bu nedenle linaloolün PH-1 referans suşu üzerindeki DON üretimine etkisi analiz edilememiştir. Zengin besi ortamlarında *F. graminearum*'un trikotosen üretiminin çok az olduğu Ochiai ve diğ. (2007) tarafından

bildirmiştir. PH-1 referans suşunun PDA besi ortamı kültürlerinde DON üretiminin belirlenememesinin nedeni olarak kullanılan besi ortamının besleyici bakımından zengin olması ve suşun stres koşulunda dahi TLC’de belirlenebilecek kadar DON üretmediğini düşündürmüştür. Timol ve karvakrol ile yapılan bir çalışmada, konsantrasyon artışına bağlı olarak DON üretiminin azaldığı gen düzeyinde analiz edilmiştir (Lahooji ve diğ., 2010). Benzer bir şekilde esas bileşeni geraniol (%19,06) olan Palmarosa EY ile *F. graminearum* üzerinde yapılan bir çalışmada (Kalagatur ve diğ., 2018) konsantrasyon artışı ile DON üretiminde düşüş gözlemlenmiştir. DON dışında ZEN ve diğer tip-B trikotesenler ile yapılan çalışmalarda da EY’lar ile mikotoksin üretimi arasında negatif bir ilişki olduğunu ortaya konmuştur. Bununla birlikte, literatürde bazı EY’ların mikotoksinleri degrade edebildiği belirtilmiştir (Velluti ve diğ., 2004; Sumalan ve diğ., 2013; Xing ve diğ., 2014; Perczak ve diğ., 2019). Tez çalışması kapsamında DON üretim yolağından sorumlu enzimleri şifreleyen genlerin, gen anlatımı düzeyindeki farklılıklarının çalışılmamış olması, mikotoksin üretiminin analiz edilmesini sınırlandırmıştır.

Gerçekleştirilen yüksek lisans tezi kapsamında linaloolün *F. graminearum* PH-1 referans suşu üzerine etkileri hücresel düzeyde gösterilmiştir. Bu yüksek lisans tezinden elde edilen bulgular, farklı etki mekanizmalarına sahip EY’ların *Fusarium spp.*’deki etkilerinin hücresel düzeyde belirlenebileceğini ve bu bileşenlerin mikotoksin üretimi üzerine etkilerinin incelenebileceğini göstermiştir. Bu doğrultuda yapılacak çalışmalar sayesinde *Fusarium spp.* ile mücadele daha etkin bir şekilde yönlendirilebilecektir. Ayrıca gerçekleştirilen yüksek lisans tezi, linaloolün *Fusarium spp.*’deki etkilerinin araştırılmasına yönelik olarak yapılacak yeni çalışmalara temel oluşturma niteliğine sahiptir.

KAYNAKLAR

- Aghcheh, R. ve Braus, G., 2018, Importance of stress response mechanisms in filamentous fungi for agriculture and industry, *Stress response mechanisms in fungi*, 189-222.
- Aguilar Diaz De Leon, J. ve Borges, C., 2020, Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay, *Journal of visualized experiments*, 159.
- Angelova, M., Pashova, S., Spasova, B., Vassilev, S. ve Slokoska, L., 2005, Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat, *Mycological research*, 109(2), 150-158.
- Aprotosoiaie, A., Hăncianu, M., Costache, I. ve Miron, A., 2014, Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties, *Flavour and fragrance journal*, 29(4), 193-219.
- Arango, W., Ruíz, J. ve Pelaez, C., 2011, Fungicidal activity of *Eucalyptus tereticornis* essential oil on the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*, *Revista cubana de farmacia*, 45(2), 264-274.
- Aryamloo, P., Asgarian-Omran, H., Aslani, N., Hossein-Nataj, H., Shokohi, T., Badali, H., Nabili, M., Abdollahi Gohar, A. ve Moazeni, M., 2019, Cellular apoptosis: An alternative mechanism of action for caspofungin against *Candida glabrata*, *Current medical mycology*.
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E. ve Yılmaz, B., 2020, Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü - Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX), *SDÜ tıp fakültesi dergisi*.
- Ayala, A., Muñoz, M. ve Argüelles, S., 2014, Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 1-31.
- Ayar-Kayali, H., Ozer, N. ve Tarhan, L., 2002, Intracellular superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities and membrane lipid peroxide levels in *Fusarium acuminatum* upon environmental changes in a defined medium, *Archives of biochemistry and biophysics*, 400(2), 265-272.
- Ayer, A., Sanwald, J., Pillay, B., Meyer, A., Perrone, G. ve Dawes, I., 2013, Distinct redox regulation in sub-cellular compartments in response to various stress conditions in *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS ONE*, 8(6).
- Baayen, R., O'Donnell, K., Bonants, P., Cigelnik, E., Kroon, L., Roebroek, E. ve Waalwijk, C., 2000, Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease, *Phytopathology*, 90(8), 891-900.

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A. ve Idaomar, M., 2005, Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation research/genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 585(1-2), 1-13.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. ve Idaomar, M., 2008, Biological effects of essential oils – A review, *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Barbehenn, R., Cheek, S., Gasperut, A., Lister, E. ve Maben, R., 2005, Phenolic compounds in red oak and sugar maple leaves have prooxidant activities in the midgut fluids of *Malacosoma disstria* and *Orgyia leucostigma* Caterpillars, *Journal of chemical ecology*, 31(5), 969-988.
- Baser, K. ve Ozek, T., 2011, Composition of cold-pressed bergamot oil from turkey, *Journal of essential oil research*, 7(3), 341-342.
- Bassolé, I. ve Juliani, H., 2012, Essential oils in combination ve their antimicrobial properties, *Molecules*, 17(4), 3989-4006.
- Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N. ve Chalier, P., 2006, Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure, *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 149-154.
- Benini, C., Danflous, J., Wathelet, J. ve Jardin, P., 2010, L'ylang-ylang [*Cananga odorata* (Lam.) Hook. f. & Thomson]: une plante à huile essentielle méconnue dans une filière en danger, *Biotechnology, agronomy, society and environment*, 14(4), 693-705.
- Bernardini, C., D'Arrigo, P., Elemento, G., Mancini, G., Servi, S. ve Sorrenti, A., 2009, The possible role of enantiodiscrimination in bilirubin toxicity, *Chirality*, 21(1), 87-91.
- Bezerra, L.M.D., Ferreira, G.L.S., Silva, I.C.G. ve Castro R.D., 2013, Antibacterial *in vitro* activity of phytochemicals in dental biofilm microorganisms, *Revista brasileira de ciências da saúde*, 17, 79-84.
- Bigarella, C., Liang, R. ve Ghaffari, S., 2014, Stem cells and the impact of ROS signaling, *Development*, 141(22), 4206-4218.
- Blair, I., 2008, DNA Adducts with lipid peroxidation products, *Journal of biological chemistry*, 283(23), 15545-15549.
- Blank, A.F., Souza, E.M., Arrigoni-Blank, M.F., Paula, J.W.A. ve Alves, P.B., 2007, Basil: cultivate basil linalool type, *Pesquisa agropecuária brasileira*, 42, 1811-1813.
- Board, N., 2003, *The complete technology book of essential oils (Aromatic Chemicals)*.
- Boelens, M., Boelens, H. ve Gemert, L., 1993, Sensory properties of optical isomers, *Perfumer & flavorist*, 18(6), 1-16.
- Bouzouita, N., Omri, A., Kachouri, F., Casabianca, H. ve Chaabouni, M., 2010, Chemical composition of bergamot (*Citrus Bergamia* Risso) essential oil obtained by hydrodistillation, *Journal of chemistry and chemical engineering*, 4(4), 60-62.

- Brennan, J., Fagan, B., van Maanen, A., Cooke, B. ve Doohan, F., 2003, *European journal of plant pathology*, 109(6), 577-587.
- Brown, A., Cowen, L., Di Pietro, A. Quinn, J., 2017, Stress adaptation, *The fungal kingdom*, 463-485.
- Brown, D., McCormick, S., Alexander, N., Proctor, R. ve Desjardins, A., 2001, A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*, *Fungal genetics and biology*, 32(2), 121-133.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties ve potential applications in foods-a review, *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Burton, G. ve Jauniaux, E., 2011, Oxidative stress, *Best practice & research clinical obstetrics & gynaecology*, 25(3), 287-299.
- Celik, S. ve Ozkaya, A., 2002, Effects of intraperitoneally administered lipoic acid, vitamin e, and linalool on the level of total lipid and fatty acids in guinea pig brain with oxidative stress induced by H₂O₂, *BMB Reports*, 35(6), 547-552.
- Chandler, E., Simpson, D., Thomsett, M. ve Nicholson, P., 2003, Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*, *Physiological and molecular plant pathology*, 62(6), 355-367.
- Chanotiya, C. ve Yadav, A., 2009, Enantiomeric composition of (3R)-(-)- and (3S)-(+)-linalool in various essential oils of indian origin by enantioselective capillary gas chromatography-flame ionization and mass spectrometry detection methods, *Natural product communications*, 4(4), 563.
- Chantraine, J., Dhénin, J. ve Moretti, C., 2009, Chemical variability of rosewood (*Aniba rosaeodora Ducke*) essential oil in french guiana, *Journal of essential oil research*, 21(6), 486-495.
- Cheeseman, K. ve Slater, T., 1993, An introduction to free radical biochemistry, *British medical bulletin*, 49(3), 481-493.
- Cho, Y., Lee, E. ve Roe, J., 2000, A developmentally regulated catalase required for proper differentiation and osmoprotection of *Streptomyces coelicolor*, *Molecular microbiology*, 35(1), 150-160.
- Connolly, J. D. ve Hill, R. A., 1992, Dictionary of terpenoids, *Chapman and hall*, New York, USA.
- Cowan, M., 1999, Plant products as antimicrobial agents, *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Croteau R., Karp F., 1991, In: Müller PM, Lamparsky D (eds), *Perfumes: art, science and technology*, Elsevier, London, 101–126.

- Cseke, L., Dudareva, N. ve Pichersky, E., 1998, Structure and evolution of linalool synthase, *Molecular biology and evolution*, 15, 1491–1498.
- Da Cruz Cabral, L., Fernández Pinto, V. ve Patriarca, A., 2013, Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods, *International journal of food microbiology*, 166(1), 1-14.
- Daferera, D., Ziogas, B. ve Polissiou, M., 2003, The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis*, *Crop Protection*, 22(1), 39-44.
- Dambolena, J., López, A., Cánepa, M., Theumer, M., Zygadlo, J. ve Rubinstein, H., 2008, Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and thymol) on *Fusarium verticillioides* MRC 826 growth and fumonisin B1 biosynthesis, *Toxicon*, 51(1), 37-44.
- Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shengqiang, Z., Oliver, D., Coutu, J., Shulaev, V., Schlauch, K. and Mittler, R., 2005, Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*, *The plant cell*, 17(1), 268-281.
- Delaquis, P., 2002, Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils, *International journal of food microbiology*, 74(1-2), 101–109.
- Demirkol A., 2010, Karpel tünel sendromlu hastalarda total antioksidan kapasite ve oksidatif stresin araştırılması, Yayınlanmış Uzmanlık Tezi, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı.
- Denton, D. ve Kumar, S., 2018, Autophagy-dependent cell death, *Cell death & differentiation*, 26(4), 605-616.
- Devi, K., Nisha, S., Sakthivel, R. ve Pandian, S., 2010, Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane, *Journal of ethnopharmacology*, 130(1), 107-115.
- Drakopoulos, D., Kägi, A., Gimeno, A., Six, J., Jenny, E., Forrer, H., Musa, T., Meca, G. ve Vogelgsang, S., 2020, Prevention of *Fusarium* head blight infection and mycotoxins in wheat with cut-and-carry biofumigation and botanicals, *Field crops research*, 246.
- Dröge, W., 2002, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
- Dudareva, N., Cseke, L., Blanc, V.M. ve Pichersky, E., 1996, Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower, *Plant cell*, 8, 1137–1148.
- Edris, A., Chizzola, R. ve Franz, C., 2007, Isolation and characterization of the volatile aroma compounds from the concrete headspace and the absolute of *Jasminum sambac* (L.) Ait.

- (Oleaceae) flowers grown in Egypt, *European food research and technology*, 226(3), 621-626.
- Erkekoğlu, P., Baydar, T., 2021, Güncel *in vitro* sitotoksikite testleri, *Hacettepe university journal of the faculty of pharmacy*, 41(1), 45-63.
- Escrivá, L., Font, G. ve Manyes, L., 2015, *In vivo* toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: a review, *Food and chemical toxicology*, 78, 185-206.
- Esterbauer, H., Eckl, P. ve Ortner, A., 1990, Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors, *Mutation research/reviews in genetic toxicology*, 238(3), 223-233.
- Esterbauer, H., Schaur, R. ve Zollner, H., 1991, Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free radical biology and medicine*, 11(1), 81-128.
- Frizzo, C., Santos, A., Paroul, N., Serafini, L., Dellacassa, E., Lorenzo, D. ve Moyna, P., 2000, Essential oils of camphor tree (*cinnamomum camphora* nees & eberm) cultivated in southern brazil, *brazilian archives of biology and technology*, 43(3), 313-316.
- Fukumoto, L. ve Mazza, G., 2000, Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), 3597-3604.
- Gao, T., Zhou, H., Zhou, W., Hu, L., Chen, J. ve Shi, Z., 2016, The fungicidal activity of thymol against *Fusarium graminearum* via inducing lipid peroxidation and disrupting ergosterol biosynthesis, *Molecules*, 21(6), 770.
- García-Ruiz, I., de la Torre, P., Díaz, T., Esteban, E., Fernández, I., Muñoz-Yagüe, T. ve Solís-Herruzo, J., 2002, *Sp1* and *Sp3* transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen $\alpha 1(i)$ gene expression in cultured hepatic stellate cells, *Journal of biological chemistry*, 277(34), 30551-30558.
- Gazdağlı, A., Sefer, Ö., Yörük, E., Varol, G., Teker, T. ve Albayrak, G., 2018, Investigation of camphor effects on *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* at different molecular levels, *Pathogens*, 7(4), 90.
- Geiser, D., Aoki, T., Bacon, C., Baker, S., Bhattacharyya, M., Brandt, M., Brown, D., Burgess, L., Chulze, S., Coleman, J., Correll, J., Covert, S., Crous, P., Cuomo, C., De Hoog, G., Di Pietro, A., Elmer, W., Epstein, L., Frandsen, R., Freeman, S., Gagkaeva, T., Glenn, A., Gordon, T., Gregory, N., Hammond-Kosack, K., Hanson, L., Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Kistler, H., Kuldau, G., Leslie, J., Logrieco, A., Lu, G., Lysøe, E., Ma, L., McCormick, S., Migheli, Q., Moretti, A., Munaut, F., O'Donnell, K., Pfenning, L., Ploetz, R., Proctor, R., Rehner, S., Robert, V., Rooney, A., bin Salleh, B., Scandiani, M., Scauflaire, J., Short, D., Steenkamp, E., Suga, H., Summerell, B., Sutton, D., Thrane, U., Trail, F., Van Diepeningen, A., VanEtten, H., Viljoen, A., Waalwijk, C., Ward, T., Wingfield, M., Xu, J., Yang, X., Yli-Mattila, T. ve Zhang, N., 2013, One fungus, one name: defining the genus fusarium in a scientifically robust way that preserves longstanding use, *Phytopathology*, 103(5), 400-408.

- Gershenzon, J., ve Croteau, R.B., 1993, Terpenoid biosynthesis: The basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. *In lipid metabolism in plants*, T.S. Moore, Jr. (ed), Boca Raton, FL: CRC Press, 339-388.
- Green, D. ve Lambi, F., 2015, Cell death signaling, *Cold spring harbor perspectives in biology*, 7(12).
- Griffin, S., Wyllie, S., Markham, J. ve Leach, D., 1999, The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity, *Flavour and fragrance journal*, 14(5), 322-332.
- Grilo, A. and Mantalaris, A., 2019, Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective, *Biotechnology Advances*, 37(3), 459-475.
- Guo, L., Breakspear, A., Zhao, G., Gao, L., Kistler, H., Xu, J. ve Ma, L., 2015, Conservation and divergence of the cyclic adenosine monophosphate–protein kinase A (cAMP– PKA) pathway in two plant-pathogenic fungi: *Fusarium graminearum* and *F. verticillioides*, *Molecular plant pathology*, 17(2), 196-209.
- Gutteridge, J., 1994, Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection, *Chemico-biological interactions*, 91(2-3), 133-140.
- Güleş, Ö., Eren, Ü., 2008, Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler, *Yüzüncü yıl üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 19(2), 73-78.
- Halliwell, B., ve Gutteridge, J. M. 2015, Free radicals in biology and medicine, *Oxford university press*, USA.
- Hamdani, H., Remmal, A., Oukhouia, M., Sennouni, C. ve Jabeur, I., 2017, In-vitro study of anti-fusarium effect of thymol, carvacrol, eugenol and menthol, *Journal of plant pathology & microbiology*, 08(10).
- Harčárová, M., Čonková, E., Proškovcová, M., Váczi, P., Marcinčáková, D. ve Bujňák, L., 2021, Comparison of antifungal activity of selected essential oils against *Fusarium graminearum* in vitro, *Annals of agricultural and environmental medicine*.
- Hayes, B., Anderson, M., Traven, A., van der Weerden, N. ve Bleackley, M., 2014, Activation of stress signalling pathways enhances tolerance of fungi to chemical fungicides and antifungal proteins, *Cellular and molecular life sciences*, 71(14), 2651-2666.
- Heller, J. ve Tudzynski, P., 2011, Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease, *Annual review of phytopathology*, 49(1), 369-390.
- Hodges, D., DeLong, J., Forney, C. ve Prange, R., 1999, Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds, *Planta*, 207(4), 604-611.
- Hussain, A., Anwar, F., Hussain Sherazi, S. ve Przybylski, R., 2008, Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations, *Food chemistry*, 108(3), 986-995.

- Hyldgaard, M., Mygind, T. ve Meyer, R., 2012, Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components, *Frontiers in microbiology*, 3.
- Jana, S., Patra, K., Sarkar, S., Jana, J., Mukherjee, G., Bhattacharjee, S., Mandal, D. P., 2014, Antitumorigenic potential of linalool is accompanied by modulation of oxidative stress: An *in vivo* study in sarcoma-180 solid tumor model, *Nutr Cancer*, 66(5): 835-848.
- Jansen, C., von Wettstein, D., Schafer, W., Kogel, K., Felk, A. ve Maier, F., 2005, Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*, *Proceedings of the national academy of sciences*, 102(46), 16892-16897.
- Jennings, P., Coates, M., Turner, J., Chandler, E. ve Nicholson, P., 2004, Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from england and wales by PCR assay, *Plant Pathology*, 53(2), 182-190.
- Jiang, J., Liu, X., Yin, Y. ve 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).
- Kalagatur, N., Nirmal Ghosh, O., Sundararaj, N. ve Mudili, V., 2018, Antifungal activity of chitosan nanoparticles encapsulated with *Cymbopogon martinii* essential oil on plant pathogenic fungi *Fusarium graminearum*, *Frontiers in pharmacology*, 9.
- Kaushik, G., 2013, Effect of processing on mycotoxin content in grains, *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(12), 1672-1683.
- Kerényi, Z., Moretti, A., Waalwijk, C., Oláh, B. ve Hornok, L., 2004, Mating type sequences in asexually reproducing fusarium species, *Applied and environmental microbiology*, 70(8), 4419-4423.
- Khan, A., Ahmad, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L. ve Manzoor, N., 2010, *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity, *Research in microbiology*, 161(10), 816-823.
- Khan, A., Ahmad, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L. ve Manzoor, N., 2010b, Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids, *FEMS yeast research*, 11(1), 114-122.
- Khan, M., Ahmad, I. ve Cameotra, S., 2013, Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*, *AMB Express*, 3(1), 54.
- Khan, M., Sohrab, M., Rony, S., Tareq, F., Hasan, C. ve Mazid, M., 2016, Cytotoxic and antibacterial naphthoquinones from an endophytic fungus, *Cladosporium sp.*, *Toxicology reports*, 3, 861-865.

- Kladniew BR., Polo M., Villegas SM., ve diğ., 2014, Synergistic antiproliferative and anticholesterogenic effects of linalool, 1,8-cineole, and simvastatin on human cell lines, *Chemico-biological interaction*; 214: 57-68
- Klimánková, E., Holadová, K., Hajšlová, J., Čajka, T., Poustka, J. ve Koudela, M., 2008, Aroma profiles of five basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars grown under conventional and organic conditions, *Food chemistry*, 107(1), 464-472.
- Kohen, R. ve Nyska, A., 2002, Invited review: Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification, *Toxicologic pathology*, 30(6), 620-650.
- Kosalec, I., Kopjar, N. & Kremer, D., 2013, Antimicrobial activity of willowherb (*Epilobium angustifolium* L.) leaves and flowers, *Current drug targets*, 14(9), 986-991.
- Kuhn, D. M., Balkis, M., Chandra, J., Mukherjee, P. K. ve Ghannoum, M. A., 2003, Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism, *Journal of clinical microbiology*, 41(1), 506-508.
- Lambert, R., Skandamis, P., Coote, P. ve Nychas, G., 2001, A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol, *Journal of applied microbiology*, 91(3), 453-462.
- Lahooji, A., Mirabolfathy, M., ve Karami-Osboo, R., 2010, Effect of *Zataria multiflora* and *Satureja hortensis* essential oils, thymol and carvacrol on growth of *Fusarium gramineum* isolates and deoxynivalenol production, *Iranian journal of plant pathology*, 46.
- Laporte, C., Kosta, A., Klein, G., Aubry, L., Lam, D., Tresse, E., Luciani, M. ve Golstein, P., 2006, A necrotic cell death model in a protist, *Cell death & differentiation*, 14(2), 266-274.
- Lee, J., Giordano, S. ve Zhang, J., 2011, Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling, *Biochemical journal*, 441(2), 523-540.
- Lee, T., Han, Y., Kim, K., Yun, S. ve Lee, Y., 2002, *Tri13* and *Tri7* determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*, *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 2148-2154.
- Leles, S. M., Factori, R. & Rocha, C. L. M. S. C., 2013, In situ analysis of apoptosis in *Aspergillus nidulans* with ethidium bromide and acridine orange, *Genetics and molecular research*, 12(3), 2895-2901.
- LeBel, C., Ischiropoulos, H. ve Bondy, S., 1992, Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chemical research in toxicology*, 5(2), 227-231.
- Leslie, J. ve Bowden, R., 2008, *Fusarium graminearum*: When species concepts collide, *Cereal research communications*, 36(6), 609-615.
- Leslie, J. F., ve Summerell, B. A., 2006, The fusarium laboratory manual, *John Wiley & sons*.

- Lis-Balchin, M., 2004, *Handbook Of Herbs And Spices*, 2nd ed. Woodhead Publishing: Cambridge: K. V. Peter, 179-188.
- Lis, A., Piter, S. ve Góra, J., 2007, A comparative study on the content and chemical composition of essential oils in commercial aromatic seasonings, *Herba polonica*, 53(1), 21-26.
- Liu, P., Luo, L., Guo, J., Liu, H., Wang, B., Deng, B., Long, C. ve Cheng, Y., 2010, Farnesol induces apoptosis and oxidative stress in the fungal pathogen *Penicillium expansum*, *Mycologia*, 102(2), 311-318.
- López-Berges, M., Risipail, N., Prados-Rosales, R. ve Di Pietro, A., 2010, A nitrogen response pathway regulates virulence functions in fusarium oxysporum via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *The plant cell*, 22(7), 2459-2475.
- Loza-Tavera, H., 1999, Monoterpenes in essential oils, *Advances in experimental medicine and biology*, 49-62.
- Luz, J.M.Q., Morais, T.P.S., Blank, A.F. ve Oliveria, G.S., 2009, Content, yield and chemical composition of essential oil of basil in poultry litter doses, *Horticultura Brasileira*, 27, 39-353.
- Lv, W., Wang, C., Yang, N., Que, Y., Talbot, N. ve Wang, Z., 2017, Genome-wide functional analysis reveals that autophagy is necessary for growth, sporulation, deoxynivalenol production and virulence in *Fusarium graminearum*, *Scientific reports*, 7(1).
- Ma, L., Geiser, D., Proctor, R., Rooney, A., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D., Manners, J. ve Kazan, K., 2013, Fusarium pathogenomics, *Annual review of microbiology*, 67(1), 399-416.
- Marin, S., Ramos, A., Cano-Sancho, G. ve Sanchis, V., 2013, Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment, *Food and chemical toxicology*, 60, 218-237.
- Máté, G., Kovács, D., Gazdag, Z., Pesti, M. ve Szántó, Á., 2017, Linalool-induced oxidative stress processes in the human pathogen *Candida albicans*, *Acta biologica hungarica*, 68(2), 220-231.
- Matura, M., Skold, M., Borje, A., Andersen, K., Bruze, M., Frosch, P., Goossens, A., Johansen, J., Svedman, C., White, I. ve Karlberg, A., 2005, Selected oxidized fragrance terpenes are common contact allergens, *Contact dermatitis*, 52(6), 320-328.
- Mehdy, M., 1994, Active oxygen species in plant defense against pathogens, *Plant physiology*, 105(2), 467-472.
- Meletiadis, J., Meis, J. F., Mouton, J. W., Donnelly, J. P., & Verweij, P. E., 2000, Comparison of NCCLS and 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) methods of *in vitro* susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method, *Journal of clinical microbiology*, 38(8), 2949-2954.

- Merhej, J., Urban, M., Dufresne, M., Hammond-Kosack, K., Riscard-Forget, F. ve Barreau, C., 2011, The velvet gene, FgVe1, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*, *Molecular plant pathology*, 13(4), 363-374.
- Mert Türk, F., Kahrıman, F., Gencer, R., Egesel C.Ö., 2013, Fusarium başak yanıklığının buğdayda toplam protein ve karbonhidrat içeriğine etkisi., *YYÜ tarım bilimleri dergisi*, 23, 149-153.
- Miao, L. ve St. Clair, D., 2009, Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease, *Free radical biology and medicine*, 47(4), 344-356.
- Miguel, M., Dandlen, S., Figueiredo, A., Barroso, J., Pedro, L., Duarte, A. ve Faisca, J., 2008, Essential oils of flowers of *Citrus sinensis* and *Citrus clementina* cultivated in algarve, portugal, *Acta horticulturae*, (773), 89-94.
- Miller, J., Greenhalgh, R., Wang, Y. ve Lu, M., 1991, Trichothecene chemotypes of three fusarium species, *Mycologia*, 83(2), 121-130.
- Miron, D., Battisti, F., Silva, F., Lana, A., Pippi, B., Casanova, B., Gnoatto, S., Fuentefria, A., Mayorga, P. ve Schapoval, E., 2014, Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts, *Revista brasileira de farmacognosia*, 24(6), 660-667.
- Misra, N. ve Gupta, A., 2006, Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings, *Journal of plant physiology*, 163(1), 11-18.
- Montibus, M., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Barreau, C. ve Ponts, N., 2013. Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi, *Critical reviews in microbiology*, 41(3), 295-308.
- Moriyasu, Y. and Ohsumi, Y., 1996, Autophagy in Tobacco Suspension-Cultured Cells in Response to Sucrose Starvation, *Plant Physiology*, 111(4), 1233-1241.
- Munkvold, G., 2016, Fusarium species and their associated mycotoxins, *Methods in molecular biology*, 51-106.
- Naveen Kumar, K., Venkataramana, M., Allen, J., Chandranayaka, S., Murali, H. ve Batra, H., 2016, Role of *Curcuma longa* L. essential oil in controlling the growth and zearalenone production of *Fusarium graminearum*, *LWT - Food science and technology*, 69, 522-528.
- Nganje, W.E., Bangsund, D.A., Leistritz, F.L., Wilson, W.W. ve Tiapo, N.M., 2002, Estimating the economic impact of a crop disease: the case of Fusarium head blight in U.S. wheat and barley, *2002 National fusarium head blight forum proceedings*, East Lansing: Michigan State University, 275-281.
- Nirmala, J. ve Lopus, M., 2019, Cell death mechanisms in eukaryotes, *Cell biology and toxicology*, 36(2), 145-164.

- Niu, C. ve Gilbert, E., 2004, Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure, *Applied and environmental microbiology*, 70(12), 6951-6956.
- O'Donnell, K., Kistler, H., Cigelnik, E. ve Ploetz, R., 1998, Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies, *Proceedings of the national academy of sciences*, 95(5), 2044-2049.
- Ochiai, N., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Fujimura, M. & Kimura, M., 2007, Genetically engineered *Fusarium* as a tool to evaluate the effects of environmental factors on initiation of trichothecene biosynthesis, *FEMS microbiology letters*, 275(1), 53-61.
- Oyen, LPA 1999, Plant resources of south-east asia 19, essential-oil plants. Pogostemon Desf. in LPA Oyen & N Xuan Dung (eds), *Backhuys Publishers*, Leiden, 151-157.
- Özek, T., Tabanca, N., Demirci, F. ve E Wedge, D., 2010, Enantiomeric distribution of some linalool containing essential oils and their biological activities, *Records of natural products*, 4(4), 180-192.
- Özer, N. Ve Soran, H., 1991, "Fusarium species of Turkey", *Hacettepe üniversitesi eğitim fakültesi dergisi*, 6: 259-271.
- Quijano, C. ve Pino, J., 2007, Volatile compounds of copoazú (*Theobroma grandiflorum* Schumann) fruit, *Food chemistry*, 104(3), 1123-1126.
- Pallepati, P., ve Averill-Bates, D. A., 2012, Reactive oxygen species, cell death signaling and apoptosis, *Free radical biology and medicine*, 48(6), 749-762.
- Perczak, A., Juś, K., Marchwińska, K., Gwiazdowska, D., Waśkiewicz, A. ve Goliński, P., 2016, Degradation of zearalenone by essential oils under *in vitro* conditions, *Frontiers in microbiology*, 7.
- Perczak, A., Gwiazdowska, D., Marchwińska, K., Juś, K., Gwiazdowski, R. ve Waśkiewicz, A., 2019, Antifungal activity of selected essential oils against *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* and their secondary metabolites in wheat seeds, *Archives of microbiology*, 201(8), 1085-1097.
- Perrone, G., Tan, S. ve Dawes, I., 2008, Reactive oxygen species and yeast apoptosis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(7), 1354-1368.
- Pinan-Lucarré, B., Balguerie, A. ve Clavé, C., 2005, Accelerated cell death in *Podospora* autophagy mutants, *Eukaryotic cell*, 4(11), 1765-1774.
- Pitarokili, D., Couladis, M., Petsikos-Panayotarou, N. ve Tzakou, O., 2002, Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(23), 6688-6691.
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, M., Barreau, C. ve Richard-Forget, F., 2006, Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by

- oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*, *FEMS microbiology letters*, 258(1), 102-107.
- Rama, R. ve García, J., 2016, Excitotoxicity and oxidative stress in acute stroke, *Ischemic stroke – updates*.
- Rasooli, I., Rezaei, M. ve Allameh, A., 2006, Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*, *Food control*, 17(5), 359-364.
- Ravid, U., 2008, Enantiomeric distribution of odorous oxygenated monoterpenes in aromatic plants, *Selected topics in the chemistry of natural products*, 155-189.
- Reverberi, M., Ricelli, A., Zjalic, S., Fabbri, A. ve Fanelli, C., 2010, Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi, *Applied microbiology and biotechnology*, 87(3), 899-911.
- Rocha, O., Ansari, K. ve Doohan, F.M., 2005, Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review, *Food additives and contaminants*, 22: 369-378.
- Romane, A., Harrak, R., Bahri, F. 2012, Use thyme essential oils for the prevention of *Salmonellosis*. *Salmonella – A dangerous foodborne pathogen*, Barakat S.M. Mahmoud (ed.), 305-332.
- Rothe, M., 1997, Flavour Science. Recent Developments. A. J. Taylor and D. S. Mottram (eds), *The Royal Society of Chemistry, Food / Nahrung*, 41(5), 318-318.
- Sakagami, H. ve Satoh, K., 1997, Prooxidant action of two antioxidants: ascorbic acid and gallic acid, *Anticancer research*, 17(1A), 221-224.
- Sakagami, H., Oi, T. ve Satoh, K., 1999, Prevention of oral diseases by polyphenols (review), *In vivo (Athens, Greece)*, 13(2), 155-171.
- Sakhanokho, H. ve Rajasekaran, K., 2019, *Hedychium* essential oils: Composition and uses, *essential oil research, trends in biosynthesis, analytics*, industrial applications and biotechnological production, 49-60.
- Sakihama, Y., Cohen, M., Grace, S. ve Yamasaki, H., 2002, Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants, *Toxicology*, 177(1), 67-80.
- Samuels, G.J., Nirenberg, H.I. ve Seifert, K.A. 2001, Perithecial species of *Fusarium*, *Fusarium*, Paul E. Nelson Memorial Symposium, APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, 1-14.
- Sangwan, N., Farooqi, A., Shabih, F. ve Sangwan, R., 2001, *Plant Growth Regulation*, 34(1), 3-21.
- Seol, G., Kang, P., Lee, H. ve Seol, G., 2016, Antioxidant activity of linalool in patients with carpal tunnel syndrome, *BMC Neurology*, 16(1).

- Seifert K., 2006, Fuskey: *Fusarium* interactive key, *Agriculture and agri-food canada, Ottawa*, A42-66/1996E-IN, 17.
- Sharopov, F. ve Setzer, W., 2012, The essential oil of *Salvia sclarea* L. from Tajikistan, *Records of natural products*, 6(1), 75-79.
- Shi, W., Tan, Y., Wang, S., Gardiner, D., De Saeger, S., Liao, Y., Wang, C., Fan, Y., Wang, Z. ve Wu, A., 2016, Mycotoxigenic potentials of *Fusarium* species in various culture matrices revealed by mycotoxin profiling, *Toxins*, 9(1), 6.
- Smith, R.L., Cohen, S.M., Doull, J., Feron, V.J., Goodman, J.I., Marnett, L.J., Portoghese, P.S., Waddell, W.J., Wagner, B.M., Hall, R.L., Higley, N.A., Lucas-Gavin, C. ve Adams, T.B., 2005, A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils, *Food Chemical Toxicology*, 43, 345–363.
- Sumalan, R., Alexa, E. ve Poiana, M., 2013, Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and *Fusarium* mycotoxins production in wheat, *Chemistry central journal*, 7(1).
- Surburg, H. ve Panten, J., 2006, *Common fragrance and flavor materials*, 5th ed. Weinheim: WILEY-VCH.
- Stashenko, E. ve Rene Martínez, J., 2008, Sampling flower scent for chromatographic analysis, *Journal of separation science*, 31(11), 2022-2031.
- Stashenko, E. ve René Martínez, J., 2019, Study of essential oils obtained from tropical plants grown in Colombia, *Essential oils-oils of nature*, 19, 353.
- Stępień, Ł. ve Lalak-Kańczugowska, J., 2020, Signaling pathways involved in virulence and stress response of plant-pathogenic *Fusarium* species, *Fungal biology reviews*.
- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. and Ohsumi, Y., 1992, Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction, *Journal of cell biology*, 119(2), 301-311.
- Tamogami, S., Awano, K. ve Kitahara, T., 2001, Analysis of the enantiomeric ratios of chiral components in absolute jasmine, *Flavour and fragrance journal*, 16, 161-163.
- Tateo, F., 1989, The composition of various oils of *Ocimum basilicum* L., *Journal of essential oil research*, 1(3), 137-138.
- Teker, T., Sefer, Ö., Gazdağlı, A., Yörük, E., Varol, G. ve Albayrak, G., 2021, α -Thujone exhibits an antifungal activity against *F. graminearum* by inducing oxidative stress, apoptosis, epigenetics alterations and reduced toxin synthesis, *European journal of plant pathology*, 160(3), 611-622.
- Temme, N., Oeser, B., Massaroli, M., Heller, J., Simon, A., González Collado, I., Viaud, M. ve Tudzynski, P., 2012, BcAtf1, a global regulator, controls various differentiation processes and phytotoxin production in *Botrytis cinerea*, *Molecular plant pathology*, 13(7), 704-718.

- Theagarajan, K. ve Prabhu, V.V, 1987, Studies on *Bursera penicillata* oil fractionation and acetylation, *Indian perfumer*, 31, 155-158.
- Theopold, U., 2009, A bad boy comes Good, *Nature*, 461(7263), 486-487.
- Trail, F., 2009, For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era, *Plant physiology*, 149(1), 103-110.
- Tsagkli, A., Hancianu, M., Aprotosoiaie, A. ve Cioanca, O., 2012, Volatile constituents of romanian coriander fruit, *Records of natural products*, 6(2), 156-160.
- Tsukatani, T., Suenaga, H., Shiga, M. ve Matsumoto, K., 2014, A rapid microplate method for the proliferation assay of fungi and the antifungal susceptibility testing using the colorimetric microbial viability assay, *Letters in applied microbiology*, 59(2), 184-192.
- Ultee, A., Bennik, M. ve Moezelaar, R., 2002, The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*, *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1561-1568.
- Valenzuela-Cota, D., Buitimea-Cantúa, G., Plascencia-Jatomea, M., Cinco-Moroyoqui, F., Martínez-Higuera, A. ve Rosas-Burgos, E., 2019, Inhibition of the antioxidant activity of catalase and superoxide dismutase from *Fusarium verticillioides* exposed to a *Jacquinia macrocarpa* antifungal fraction, *Journal of environmental science and health, Part B*, 54(8), 647-654.
- Valko, M., Morris, H. ve Cronin, M., 2005, Metals, toxicity and oxidative stress, *Current medicinal chemistry*, 12(10), 1161-1208.
- Varga, E., Wiesenberger, G., Hametner, C., Ward, T., Dong, Y., Schöfbeck, D., McCormick, S., Broz, K., Stücker, R., Schuhmacher, R., Krska, R., Kistler, H., Berthiller, F. ve Adam, G., 2015, New tricks of an old enemy: isolates of *Fusarium graminearum* produce a type A trichothecene mycotoxin, *Environmental microbiology*, 17(8), 2588-2600.
- Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A., Turon, C. ve Marin, S., 2004, Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity conditions in maize grain, *Journal of applied microbiology*, 96(4), 716-724.
- Veldhuizen, E., Tjeerdsma-van Bokhoven, J., Zweijter, C., Burt, S. ve Haagsman, H., 2006, Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol, *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(5), 1874-1879.
- Veneault-Fourrey, C., 2006, Autophagic fungal cell death is necessary for infection by the rice blast fungus, *Science*, 312(5773), 580-583.
- Verma, R., Joshi, N., Padalia, R., Singh, V., Goswami, P., Kumar, A., Iqbal, H., Verma, R., Chanda, D., Chauhan, A. ve Saikia, D., 2017, Chemical composition and allelopathic, antibacterial, antifungal, and antiacetylcholinesterase activity of fish-mint (*Houttuynia cordata* Thunb.) from India, *Chemistry & biodiversity*, 14(10).

- Volinsky, R. ve Kinnunen, P., 2013, Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: from biophysics to physiology and molecular pathology, *FEBS journal*, 280(12), 2806-2816.
- Wang, J., Li, H., Qu, B., Zhang, J., Huang, T., Chen, F. ve Liao, Y., 2008, Development of a generic PCR detection of 3-Acetyldeoxynivalenol-, 15-Acetyldeoxynivalenol- and nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum* clade, *International journal of molecular sciences*, 9(12), 2495-2504.
- Wang, X., Lei, X. ve Wang, J., 2014, Malondialdehyde regulates glucose-stimulated insulin secretion in murine islets via TCF7L2-dependent Wnt signaling pathway, *Molecular and cellular endocrinology*, 382(1), 8-16.
- Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Goto, K. ve Hara-Kudo, Y., 2011, Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes, *BMC evolutionary biology*, 11(1), 322.
- Waterborg, J. ve Matthews, H., 1984, The lowry method for protein quantitation, *Proteins*, 1-4.
- Weete, J. ve Gandhi, S., 1996, Biochemistry and molecular biology of fungal sterols, *Biochemistry and Molecular Biology*, 421-438.
- Wing N, Burgess LW, Bryden WL, 1995. Cultural degeneration in two *Fusarium* species and its effects on toxigenicity and cultural morphology, *Mycol Res*, 99, 615–620.
- Wojtaszek, P., 1997, Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection, *Biochemical journal*, 322(3), 681-692.
- Xing, F., Hua, H., Selvaraj, J., Yuan, Y., Zhao, Y., Zhou, L. ve Liu, Y., 2014, Degradation of fumonisin B1 by cinnamon essential oil, *Food control*, 38, 37-40.
- Yarsan E., 1998, Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar, *Yüzüncü yıl üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 9(1), 89-95.
- Yin, H., Xu, L. ve Porter, N., 2011, Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis, *Chemical reviews*, 111(10), 5944-5972.
- Yin, W., Reinke, A., Szilágyi, M., Emri, T., Chiang, Y., Keating, A., Pócsi, I., Wang, C. ve Keller, N., 2013, bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*, *Microbiology*, 159, 77-88.
- Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T. ve Ohsumi, Y., 2004, Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy, *The plant cell*, 16(11), 2967-2983.
- Yörük, E., 2018, Tetraconazole leads to alterations in *Fusarium graminearum* at different molecular levels, *Applied ecology and environmental research*, 16, 6155-6167.

- Yörük, E. ve Albayrak, G., 2019, siRNA quelling of *tri4* and *tri5* genes related to deoxynivalenol synthesis in *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*, *Journal of environmental biology*, 40(3), 370-376.
- Yukawa, C., Imayoshi, Y., Iwabuchi, H., Komemushi, S. ve Sawabe, A., 2006, Chemical composition of three extracts of *Bursera graveolens*, *flavour and fragrance journal*, 21(2), 234-238.
- Yun, S. H., Arie, T., Kaneko, I., Yoder, O. C. ve Turgeon, B. G., 2000, Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella/Fusarium* species, *Fungal genetics and biology*, 31(1), 7-20.
- Zain, M., Bahkali, A. ve Al-Othman, M., 2012, Effect of chemical compounds on amino acid content of some *Fusarium* species and its significance to fungal chemotaxonomy, *Journal of saudi chemical society*, 16(2), 183-192.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Büşra Nur ÇETİN
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

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