



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PROTHIOCONAZOLE'ÜN *Fusarium*'UN REFERANS SUŞLARI
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN HÜCRESEL GÖSTERİMİ**

Mehmet ARSLAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK**

Eylül, 2020

İSTANBUL

Bu alışma, 24.09.2020 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. Bedia PALABIYIK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Emre YÖRÜK
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 34280 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübesi, bilgisi ve sevgisiyle her daim bana destek olup yanımda olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Gülrüh 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 başta Uzm. Tuğba TEKER ve Araş. Gör. Aylin GAZDAĞLI olmak üzere 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 Fonuna ve çalışmalarım süresince imkânlarından yararlandığım İ.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalına,

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

Teşekkür eder, en içten şükranlarımı sunarım.

Eylül 2020

Mehmet ARSLAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET.....	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	1
2.1. BİTKİ PATOJENİ <i>Fusarium</i> spp.....	2
2.1.1. <i>F. graminearum</i>	4
2.1.2. <i>F. culmorum</i>	5
2.2. <i>Fusarium</i> İLE MÜCADELE YÖNTEMLERİ	5
2.2.1. Biyolojik Kontrol Yöntemleri	5
2.2.2. Dirençli Bitkilerin Kullanımı	6
2.2.3. Fungisit ve Fungisit Aktif Bileşenleri	7
2.2.3.1. Hücre Solunumu İnhibe eden Fungisit Aktif Bileşenleri.....	8
2.2.3.2. Hücre Döngüsüne Etki Eden Fungisit Aktif Bileşenleri.....	9
2.2.3.3. Ergosterol Biyosentezi İnhibitörü Fungisit Aktif Bileşenleri	10
2.2.3.4. Protiokonazol.....	11
2.3. OKSİDATİF STRES	12
2.3.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Hücrede Meydana Getirdiği Hasarlar	13
2.3.1.1. Lipid Peroksidasyonu.....	13
2.3.1.2. Proteinlerin Yapı Değişimleri	14
2.3.1.3. DNA Hasarları.....	14
2.3.2. Antioksidan Savunma Sistemi	15
2.4. APOPTOZ	17
2.4.1. Kaspaza Bağlı Apoptoz	18
2.4.1.1. Ekstrinsik Yolak	18
2.4.1.2. İntrinsik Yolak.....	19

2.4.1.3. İnfaz Yolağı.....	19
2.4.2. Kaspazdan Bağımsız Apoptoz	20
3. MALZEME VE YÖNTEM	21
3.1. <i>Fusarium</i> REFERANS SUŞLARININ ÜRETİMİ	21
3.2. FUNGAL ÜREMİYİ İNHİBE EDEN PROTİKONAZOL DOZUNUN VE DOĞRUSAL BÜYÜME HIZININ BELİRLENMESİ	22
3.3. HÜCRESEL GÖSTERİM.....	22
3.3.1. Protikonazolün Spor Morfolojisine Etkisinin Işık Mikroskobunda İncelenmesi.....	22
3.3.2. Oksidatif Stresin Floresan Mikroskobu ile Hücresel Gösterimi	23
3.3.3. Apoptozun Floresan Mikroskobu ile Hücresel Gösterimi	23
3.4. PROTEİN İZOLASYONU VE PROTEİN DERİŞİMİNİN BELİRLENMESİ	24
3.5. ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ	24
3.5.1. KAT Aktivitesi Testi	25
3.5.2. SOD Aktivitesi Testi	25
3.6. HÜCRE TOKSİSİTE TESTİ	25
3.7. DON MİKOTOKSİN İZOLASYONU VE İNCE TABAKA KROMATOGRAFİSİ.....	26
4. BULGULAR.....	27
4.1. FUNGAL ÜREMENİN İNHİBİSYONU VE DOĞRUSAL BÜYÜME HIZLARI İLE İLGİLİ BULGULAR	27
4.2.1. Spor Morfolojisine Etkisinin Mikroskobik Gösterimi	31
4.2.2. Oksidatif Stresin Hücresel Gösterimi	33
4.2.3. Apoptozun Hücresel Gösterimi.....	34
4.3. PROTİKONAZOLÜN ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTE DEĞİŞİMLERİNE ETKİSİ İLE İLGİLİ BULGULAR	35
4.3.1. KAT Enzim Aktivite Bulguları.....	35
4.3.2. SOD Aktivite Bulguları	37
4.4. HÜCRE TOKSİSİTE TESTİ	39
4.5. PROTİKONAZOLÜN DON ÜRETİMİNE ETKİSİ İLE İLGİLİ BULGULAR.....	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	65

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: <i>Fusarium</i> spp.'de eşeyli ve eşeysiz üreme (Ma ve diğ., 2013).	4
Şekil 2.2: Protikonazol enantiyomerleri.	12
Şekil 2.3: Hücredeki reaktif oksijen türleri ve birbirlerine dönüşümü.	12
Şekil 2.4: Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonları.	13
Şekil 2.5: SOD'un gerçekleştirdiği reaksiyon.	15
Şekil 2.6: KAT'ın gerçekleştirdiği reaksiyon.	16
Şekil 2.7: GPx'in gerçekleştirdiği reaksiyonlar (ROOH: hidroperoksit, ROH: alkol GSSG: glutatyon disülfid).	16
Şekil 2.8: Kaspaza bağı apoptozun ekstrinsek ve intrinsek yolları.	20
Şekil 4.1: A) <i>F. graminearum</i> PH1 ve B) <i>F. culmorum</i> UK99 referans suşlarının kontrol, normalizasyon ve deney gruplarına ait 7 günlük kültürlerdeki üreme durumları.	28
Şekil 4.2: <i>F. graminearum</i> PH1 referansının kontrol, deney (A) ve normalizasyon gruplarının (B) 3, 5 ve 7 günlük kültürlerinde belirlenen radyal üreme çap değişimlerinin grafiklerle gösterimi.	31
Şekil 4.3: <i>F. culmorum</i> UK99 referansının kontrol, deney (A) ve normalizasyon gruplarının (B) 3, 5 ve 7 günlük kültürlerinde belirlenen radyal üreme çap değişimlerinin grafiklerle gösterimi.	31
Şekil 4.4: <i>F. culmorum</i> UK99 referans suşunun; A) SNB besi ortamında ürettiği makrokonid spor yapılarının, B) protikonazolün IC ₅₀ dozu uygulanmış CDB besi ortamında ürettiği makrokonid spor yapılarının ışık mikroskobu (Olympus BX-53) altında 10 X büyütme ile görüntüleri.	32
Şekil 4.5: SNB besi ortamı (kontrol) ve IC ₅₀ dozunda protikonazol içeren CDB besi ortamındaki <i>F. culmorum</i> UK99 kültürlerinin ürettiği makrokonid sporlarına ait boy ve çap ölçümlerinin ortalama değerlerinin istatistiksel analizinin grafiklerle gösterimi.	33

Şekil 4.6: (1) Kontrol ve (2) normalizasyon grupları ile birlikte, (3) IC ₂₅ ve (4) IC ₅₀ protiokonazol dozuna maruz kalan PH1 (A) ve UK99 (B) referans suşlarına ait miselyumların ve IC ₅₀ protiokonazol dozuna maruz kalan UK99 referansı tarafından üretilen makrokonid sporların H ₂ DCFDA boyaması sonucu ışık mikroskobunda sporların 10X ve hiflerin 20X büyütme objektifi ile gerçekleştirilen inceleme görüntüleri ve floresan mikroskobunda* FITC filtresi (494/518 nm) ile alınan floresan ışık görüntüleri.	34
Şekil 4.7: (1) Kontrol ve (2) normalizasyon grupları ile birlikte, (3) IC ₂₅ ve (4) IC ₅₀ protiokonazol dozuna maruz kalan PH1 (A) ve UK99 (B) referans suşlarına ait miselyumların At/EtBr boyaması sonucu ışık mikroskobunda 20X büyütme objektifi ile gerçekleştirilen inceleme görüntüleri ve floresan mikroskobunda* GFP (At 502/526 nm, EtBr 510/595 nm) ve Texas RED (595/613 nm) filtreleri ile alınan floresan ışık görüntüleri.	35
Şekil 4.8: A) <i>F. graminearum</i> PH1 B) <i>F. culmorum</i> UK99 referans suşlarının kontrol, normalizasyon ve deney gruplarının 7 günlük kültürlerinden belirlenen KAT aktivitesi değişimlerinin grafiklerle gösterimi.	37
Şekil 4.9: A) <i>F. graminearum</i> PH1 B) <i>F. culmorum</i> UK99 referans suşlarının kontrol, normalizasyon ve deney gruplarının 7 günlük kültürlerinden belirlenen SOD aktivitesi % inhibisyon değerlerinin grafiklerle gösterimi.	39
Şekil 4.10: A) PH1'in kontrol, normalizasyon ve deney gruplarındaki % hücre canlılığı B) UK99'un kontrol, normalizasyon ve deney gruplarındaki % hücre canlılığı.	40
Şekil 4.11: A) <i>F. graminearum</i> PH1 B) <i>F. culmorum</i> UK99 referanslarının kontrol, normalizasyon ve deney gruplarından elde edilen mikotoksin ekstraktlarının 356 nm UV ışık altındaki İTK plaka görüntüleri (ok işareti 0,28 Rf değerindeki DON spotunu göstermektedir).	41

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: <i>Fusarium</i> suşlarının üretiminde kullanılan besi ortamları ve içerikleri.	21
Tablo 3.2: Floresan görüntülemeye kullanılacak bileşenler ve derişimleri.....	23
Tablo 3.3: Protein derişiminin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler.	24
Tablo 3.4: SOD aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler.	25
Tablo 4.1: <i>F. graminearum</i> PH1 ve <i>F. culmorum</i> UK99 referans ırklarının kontrol (NK) grubunda ve MIK, IC ₂₅ ve IC ₅₀ dozlarında protikonazol eklenmiş deney gruplarının 3, 5 ve 7 günlük kültürlerinde ölçülen radyal üreme çaplarının ortalamaları ve standart hata (SH) değerleri.	29
Tablo 4.2: Protikonazolün IC ₂₅ , IC ₅₀ ve MIK dozlarını çözmede kullanılan aseton (v/v) içeren normalizasyon grubu için hazırlanan besi ortamında üretilen <i>Fusarium</i> suşlarından 3., 5. ve 7. günde ölçülen radyal üreme çaplarının ortalamaları ve standart hata (SH) değerleri.	30
Tablo 4.3: SNB besi ortamı (kontrol) ve IC ₅₀ dozunda protikonazol içeren CDB besi ortamında üretilen <i>F. culmorum</i> UK99 referansının makrokonid sporlarının ölçülen boy ve çaplarına ait ortalama değerleri (SH: standart hata).	32
Tablo 4.4: Kontrol, normalizasyon ve deney gruplarında 7 gün süre ile kültürlenmiş PH1 ve UK99 referanslarından belirlenen KAT enzim aktivitelerinin (ΔA_{240} /dk/mg protein) ortalama değerleri (SH: standart hata).	36
Tablo 4.5: Kontrol, normalizasyon ve deney gruplarında 7 gün süre ile kültürlenmiş <i>F. graminearum</i> PH1 ve <i>F. culmorum</i> UK99 referanslarından belirlenen SOD enzim aktivitelerini ifade eden % inhibisyon değerleri (SH: standart hata).	38
Tablo 4.6: Protikonazolün ve çözgeninin <i>F. graminearum</i> PH1 ve <i>F.culmorum</i> UK99 referans suşlarının % hücre canlılığı üzerindeki etkisi (SH: standart hata).....	39

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
α	: Alfa
°C	: Santigrat Derece
ΔA	: Absorbans Değişimi
cm ²	: Santimetre Kare
dk	: Dakika
g	: Gram
l	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Mikrogram
nm	: Mikrogram
rcf	: Göreceli Santrifüj Kuvveti "Relative Centrifugal Force"
rpm	: Dakikadaki devir sayısı, "Revolutions Per Minute"
Se	: Selenyum
UV	: Ultraviyole
μ g	: mikrogram
μ l	: Mikrolitre
W	: Watt
yy	: Yüzyıl

Kısaltmalar	Açıklama
AIF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
At	: Akridin Turuncusu
APAF1	: Apoptik Proteaz Aktifleştirici Faktör 1
ATP	: Adenozin Trifosfat
EtBr	: Etidyum Bromür
DMI	: Demetilasyon İnhibitörü

DON	: Deoksinivenol
ELISA	: Enzim İlintili İmmün Test, “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
ETS	: Elektron Taşıma Sistemi
FBY	: Fusarium Başak Yanıklığı
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
ITK	: İnce Tabaka Kromatografisi, “Thin Layer Chromatography”
KAED	: Kaspazla aktive edilen DNaz
KAT	: Katalaz
MDA	: Malondialdehit
MBK	: Metil-2-Benzimidazol Karbamat
MIK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
NBT	: Nitroblue Tetrazolium
PDA	: Patates Dekstroz Agar
PDB	: Patates Dekstroz Broth
Rf	: Alıkonma Faktörü “Retention Factor”
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SDHI	: Süksinat Dehidrogenaz İnhibitörü
SNA	: Sentetik Nutrient Agar
SNB	: Sentetik Nutrient Broth
BSA	: Sığır Setum Albumin, “Bovin Serum Albumin”
SOD	: Superoksit Dismutaz
TBA	: Tiyobarbitürik asit

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROTHIOCONAZOLE'ÜN *Fusarium*'UN REFERANS SUŞLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN HÜCRESEL GÖSTERİMİ

Mehmet ARSLAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK

Bu yüksek lisans tezi kapsamında azol fungusit aktif bileşeni protiokonazolün çeşitli bitki türlerinde hastalıklara neden olan *F. graminearum* PH1 ve *F. culmorum* UK99 referans suşları üzerindeki etkileri hücresel düzeyde (oksidatif stres, apoptoz, hücre canlılığı ve mikotoksin üretimi) araştırılmıştır.

Protiokonazolün minimum inhibitör konsantrasyonları (MIK) PH1 ve UK99 için sırasıyla 1,2 µg/ml ve 1 µg/ml olarak belirlendi. Deneylerde PDA besi ortamında yetiştirilen kültürler kontrol grubu olarak kullanılırken, protiokonazolün çözücüsü olan asetonu içeren besi ortamında yetiştirilen kültürler ise normalizasyon grubu olarak kullanıldı. Protiokonazolün IC₂₅ ve IC₅₀ dozları PH1 için sırasıyla 0,3 µg/ml ve 0,6 µg/ml, UK99 için ise 0,25 µg/ml ve 0,5 µg/ml olarak hesaplandı. Bu dozların her iki referansta da radyal büyüme oranlarını azalttığı belirlendi (p<0,001). Bu aktif bileşiğin spor üretimi üzerine etkisi, UK99 referansının czapek dox broth (CDB) besi ortamı kültürlerinde gözlemlendi. IC₅₀ dozu, kontrole göre makrokonid uzunluğunda (% 66) ve çapında (%123) artışa neden oldu (p<0,001). Protiokonazol tarafından tetiklenen oksidatif stres ve apoptotik etkiler sırasıyla 2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat (H₂DCFDA) boyaması ve akrinin turuncusu/etidyum bromür (at/etbr) ikili boyaması kullanılarak ters floresan mikroskopunda hücresel düzeyde görüntülendi. Protiokonazol dozundaki artışa bağlı olarak PH1'de katalaz (IC₂₅ için %105; IC₅₀ için %278) ve süperoksit dismutaz (IC₂₅ için %48; IC₅₀ için %103) aktivitesinin arttırdığı belirlendi (p<0,001). Benzer şekilde, bu iki dozun UK99'da süperoksit dismutaz (IC₂₅ için %38; IC₅₀ için %84) aktivitesinde artışa neden

oldukları saptandı ($p<0,001$). IC_{25} dozu bu referansda katalaz aktivitesinde anlamlı artışa (%52) neden oldu ($p<0,001$). Protiokonazolün hücre canlılığına etkileri WST-1 kullanılarak belirlendi. PH1 referansı için, protiokonazolün IC_{25} ve IC_{50} dozları hücre canlılığını sırasıyla %40,2 ve %53,82 oranında azalttı ($p<0,001$). IC_{25} ve IC_{50} protiokonazol dozları da UK99'un canlı hücre sayısını %25,33 ve %41,93 oranında azalttı ($p<0,001$). Ayrıca, protiokonazolün UK99 referans suşunda deoksinivalenol (DON) üretim miktarını azalttığı ince tabaka kromatografisinde (ITK) gösterildi.

Yüksek lisans tezi kapsamında, protiokonazolün *F. graminearum* PH1 ve *F. culmorum* UK99 referansları üzerindeki etkilerinin hücresel düzeyde gösterilmesi, fungisidal kimyasal bileşenlerin aktive ettiği farklı mekanizmaların bir hücrede gerçek zamanlı olarak izlenebileceğini ortaya koymuştur. Ek olarak, protiokonazolün DON üretimini baskıladığına ilişkin bulgular, halk sağlığının korumasında *Fusarium* fitopatojenleri ile mücadelede kullanılacak fungusit aktif bileşenlerinin içeriğinde mikotoksin üretimini baskılayan bir ajanın bulunmasının önemini göstermesi bakımından önemlidir.

Eylül 2020, 80 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Fusarium* spp., oksidatif stres, apoptoz, antioksidan enzim, mikotoksin

SUMMARY

M.Sc. THESIS

CELLULAR DISPLAY OF THE EFFECTS OF PROTHIOCONAZOLE ON *Fusarium* REFERENCE STRAINS

Mehmet ARSLAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK

In the context of this master thesis, the effects of the azole fungicide active ingredient prothioconazole on *F. graminearum* PH1 and *F. culmorum* UK99 reference strains causing diseases in various plant species were investigated at the cellular level (oxidative stress, apoptosis, cell viability and mycotoxin production).

The minimum inhibitory concentrations (MIC) of prothioconazole were determined as 1,2 µg/ml and 1 µg/ml for PH1 and UK99, respectively. In the experiments, reference cultures grown on PDA medium were represented as control group, while cultures grown on PDA containing acetone, the solvent of prothioconazole, were used as normalization group. The IC₂₅ and IC₅₀ doses of prothioconazole were calculated as 0,3 µg/ml and 0,6 µg/ml for PH1, 0,25 µg/ml and 0,5 µg/ml for UK99, respectively. These doses were determined to reduce radial growth rates in both references (p<0,001). The effect of this active ingredient on spore production was observed in UK99 reference grown on czapek dox broth (CDB) medium. The IC₅₀ dose caused an increase in macroconidia size (%66) and diameter (%123) compared to the control (p<0,001). Oxidative stress and apoptotic effects triggered by prothioconazole were visualized at cellular level under inverted fluorescence microscope using 2',7'dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) staining and acridine orange/ethidium bromide (ao/etbr) dual staining.. It was determined that catalase (for IC₂₅: %105; for IC₅₀: %278) and superoxide dismutase (for IC₂₅: %48; for IC₅₀: %103) activities increased in PH1

due to the increase in the concentration of prothioconazole ($p < 0,001$). Similarly, it was determined that these two prothioconazole doses caused an increase in superoxide dismutase (for IC_{25} : %38; for IC_{50} : %84) activity in UK99 ($p < 0,001$). The IC_{25} dose caused a significant increase in catalase activity (%52) in this reference strain ($p < 0,001$). The effect of prothioconazole on cell viability were detected by using WST-1. For PH1 reference, IC_{25} and IC_{50} prothioconazole doses reduced cell viability at the rate of 40.2% and 53.82%, respectively. IC_{25} and IC_{50} doses of protioconazole also reduced the viable cell count of UK99 by 25.33% and 41.93% ($p < 0.001$). In addition, protioconazole has been shown in thin layer chromatography (TLC) to reduce the amount of deoxynivalenol (DON) production in UK99 reference strain.

Within the scope of the master's thesis, demonstration of the influences of prothioconazole on *F. graminearum* PH1 and *F. culmorum* UK99 references in cellular level revealed that different mechanisms activated by fungicidal chemical compounds can be monitored in a cell, in real time. In addition, the findings that protioconazole inhibits the DON production are important in terms of demonstrating the importance of the presence of an agent that suppresses mycotoxin production in the composition of fungicidal active ingredients to be used in the fight against *Fusarium* phytopathogens in protecting public health.

September 2020, 80 pages.

Keywords: *Fusarium* spp., oxidative stress, apoptosis, antioxidant enzyme, mycotoxin

1. GİRİŞ

Fusarium türleri ekonomik öneme sahip bitkilerde hastalıklara neden olarak çok sayıda ülkede ekonomik açıdan büyük kayıplara yol açmaktadır. İnsanlar, uzun yıllar boyunca bitkilerin toprağa ekim sırasını değiştirerek, toprağı daha sık aralıklarla sürerek, sulama planlaması yaparak ve tarım arazilerinde bulunan yabancı otları ortadan kaldırarak *Fusarium* spp. ile mücadele etmeye çalışmıştır. Bu yaklaşımlar *Fusarium* türleri ile mücadelede sınırlı kalmış, bu fitopatojenlerin neden olduğu hastalıklar ve yol açtığı ekonomik kayıplar giderek artmıştır. Günümüzde; bu türlerin yol açtığı hastalıklara dirençli bitki çeşitleri geliştirilerek ve ekimleri teşvik edilerek; rizomda bu türlere antagonist etkili mikroorganizmaların yoğunluğu artırılarak; çeşitli aktif bileşenlerden oluşan fungusit uygulaması yapılarak *Fusarium* spp. ile mücadelede edilebilmektedir. Ancak en çok tercih edilen, en ekonomik ve en etkili olan yol fungusit uygulamasıdır (Van Der Kerk, 1969; Oros ve Ujváry, 1999; Geat ve Singh, 2016).

Gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışmasında fungusit aktif bileşeni olan prothioconazole'ün (protiokonazol) *F. graminearum* PHI ve *F. culmorum* UK99 suşları üzerinde etkili olan minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIK) belirlendi. Bu değerin %25 (IC₂₅) ve %50'sine (IC₅₀) karşılık gelen dozlarının uygulandığı kültürlerde oksidatif stres ve apoptoz süreçleri hücresel düzeyde ters floresan mikroskobu ile görüntülendi. Bu aktif bileşenin hücredeki önemli antioksidan enzimlerden katalaz (KAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) miktarında meydana getirdiği değişimler spektrofotometrik olarak izlendi. Ayrıca bu azol türevinin hücre canlılığına olan etkisi WST-1 analiziyle, deoksinivenol (DON) mikotoksini üretimi üzerindeki etkisi de ince tabaka kromatografisi (ITK) kullanılarak ortaya kondu. Tez kapsamında protikonazolün *F. graminearum* PH1 ve *F. culmorum* UK99'daki etkilerinin hücresel düzeyde belirlenmesi, farklı etki mekanizmasına sahip fungusit aktif bileşenlerinin *Fusarium* spp.'deki etkilerinin hücresel düzeyde incelenebileceğini göstermiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BİTKİ PATOJENİ *Fusarium spp.*

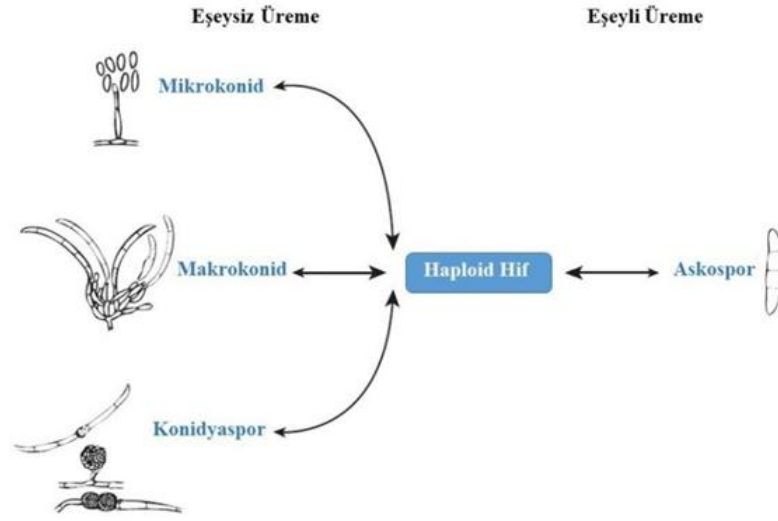
Fusarium spp. taksonomik olarak Ascomycota bölümünden, Sordariomycetidae sınıfının, Hypocreales takımının üyesidir (Nelson ve diğ., 1994). *Fusarium spp.*, küçük taneli tahıllarda, sebze ve meyvelerde, endüstriyel ve süs bitkilerinde, hayvan ve insanlarda çeşitli hastalıklara neden olabilmekte ve ayrıca ürettikleri mikotoksinleri ile de insan ve hayvan sağlığını tehdit edebilmektedir. Tarımda neden olduğu ürün kayıpları ve ürettikleri mikotoksinler yoluyla halk sağlığına olan etkileri nedeniyle bitki patojeni *Fusarium spp.* çalışmaların odak noktası olmuştur. Bu çalışmalarda; türlerin tanımlanması ve karakterizasyonu, mikotoksin üretiminin engellenmesi ve bitkilerde oluşturdukları hastalıklarla mücadele yöntemlerin geliştirilmesi üzerine odaklanılmıştır (Munkvold, 2017).

Toprakta bol miktarda bulunması, toprak yüzeyindeki ölü bitki kalıntılarının üzerinde yaşayabilmesi ve bitkiye kök gibi toprağa yakın kısımlarından bulaşması nedeniyle *Fusarium spp.* toprak kaynaklı fitopatojenler arasında gruplandırılmıştır. Bazı türleri (*F. culmorum*, *F. moniliforme*) çok çeşitli konak organizmalar üzerinde hastalık oluştururken, bazı türleri (*F. coeruleum*, *F. eumartii*) sadece belli bir konakta hastalık etmenidir. Hastalık belirtileri bitki ve bitki kısmına göre farklılık göstermektedir (Nelson ve diğ., 1994). *Fusarium spp.*'nin yayılması ve neden olduğu hastalıkların şiddeti; sıcaklık ve nemde meydana gelen değişimler, gübreleme, yabancı otlarla mücadele yöntemleri ve toprak biyotası gibi faktörlerden etkilenmektedir (Xu ve Nicholson 2009; Audenaert ve diğ., 2014). *Fusarium spp.*'nin çok farklı yüzeylerde üreyebilmesi, ürettikleri sporların hava olayları ile uzak mesafelere dağılması ve sporlarının olumsuz çevre koşullarında uzun süre hayatta kalması, bu cinsin farklı coğrafik bölgelere yayılmasına olanak sağlamıştır (Nelson ve diğ., 1994).

Bölmeli ve dallanan hif yapısına sahip olan *Fusarium spp.* aseksüel sporlar (mikrokonid, makrokonid ve klamidyasporlar) aracılığıyla eşeysiz olarak üremektedir (Şekil 2.1). Makrokonidler genelde hiflerden oluşan sporodosyum adı verilen özel yapılar içerisinde üretilmektedir. Eğimli ve bölmeli yapıya sahip olan makrokonid çok hücrelidir. Mikrokonid, hava hiflerinde, monofialidlerde ve polifialidlerde üretilmektedir. Oval ve tek bölmeye sahip olan mikrokonid genelde tek hücrelidir. Kalın bir hücre duvarına sahip olan klamidyaspor hiflerin uç kısımlarında tekli veya zincir halinde bulunmaktadır. Klamidyaspor uygun olmayan

çevre koşullarında *Fusarium* spp.'nin hayatta kalmasını sağlamaktadır. Aseksüel sporlar, uygun çevre şartları sağlandığında çimlenerek hifleri meydana getirmektedir (Nelson ve diğ., 1994; St-Germain ve diğ., 1996). *Fusarium* spp. eşeyli olarak üreme yeteneğine de sahiptir (Ma ve diğ., 2013). *Fusarium* spp.'de Mat 1-1 ve Mat 1-2 genlerinin bulunmasına bağlı olarak iki farklı eşem tipi vardır. Haploid genomlarında her iki eşem tipine ait genleri (Mat 1-1 ve Mat 1-2) birlikte bulunduran türler homotallik olarak adlandırılmaktadır. Bu türler farklı bir eşem tipindeki bireye ihtiyaç duymadan kendi içinde zigot oluşturarak eşeyli olarak üreyebilmektedir. Heterotallik türler ise sadece bir eşem tipine ait geni (Mat 1-1 veya Mat 1-2) haploid genomlarında bulundurmaktadır. Bu türler, sadece farklı eşem tipine sahip bireylere eşeyli olarak üreyebilmektedir (Yun ve diğ., 2000). *Fusarium* spp.'de hem homotallik hem heterotallik türler bulunmaktadır. Eşeyli üreme, erkek (anteridyum) hifin nukleusunun dışı (askogonyum) hife aktarılması ile iki hifin de nukleuslarını içeren hücrelerin (askus hücreleri) bulunduğu yeni bir hif (askogen hif) yapısının oluşmasıyla başlamaktadır (Trail, 2009). Nukleusların bir arada bulunduğu ancak birleşmediği evre dikaryotik evre olarak adlandırılmaktadır. Askus hücrelerindeki nukleuslar birleşerek zigotu meydana getirmektedir. Zigot, mayoz bölünme ile haploid sayıda kromozom içeren dört nukleus oluşturmaktadır. Nukleusların her birinin mitoz bölünme geçirmesi sonucunda zigot içerisinde sekiz haploid nukleus meydana gelmektedir. Her bir nukleusun bölmeler ile birbirinden ayrılması ile haploid sayıda kromozoma sahip sekiz askospor meydana gelmektedir (Şekil 2.1). Askosporların oluşumu ile diploid yaşam döngüsünden haploid yaşam döngüsüne geçilmektedir. (Ma ve diğ., 2013).

Fusarium mikotoksinleri fitopatojen tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir. Bitkilerin çoğu bu sekonder metabolitlerin fonksiyonel gruplarına (hidroksil, tiol, amino ve karboksil) malonil ve glikosil gibi bileşikler ekleyerek maskeli forma dönüştürmektedir. Bu sayede bitkiler mikotoksinlerin yıkıcı etkilerinden korunabilmektedir (Aldred ve Magan, 2004; Berthiller ve diğ., 2013). *Fusarium* spp. tarafından en çok üretilen mikotoksin grupları trikotesen (deoksinivalenol, nivalenol), fumonisin (fumonisin A1, fumonisin P1) ve zearalenondur (Munkvold, 2017). İnsan ve hayvanların bitkiler ve bitkisel ürünlerde bulunan bu mikotoksinlere maruz kalmaları kusma, iştahsızlık gibi sağlık sorunları yaşamalarına neden olurken, düzenli olarak uzun süre bu mikotoksinlere maruz kalmaları nörolojik bozukluklar, immün yetmezlik ve kanserle sonuçlanan ciddi sağlık sorunlarına yol açabilmektedir (Bennett ve Klich, 2003).



Şekil 2.1: *Fusarium* spp.'de eşeyli ve eşeysiz üreme (Ma ve diğ., 2013).

2.1.1. *F. graminearum*

F. graminearum arpa, buğday ve mısır gibi ekonomik öneme sahip küçük taneli tahıllarda yıkıcı etkilere sahip Fusarium Başak Yanıklığı (FBY) etmenidir (Matny, 2015). Bu fitopatojen tarafından üretilen sporlar, rüzgar, yağmur ve çeşitli böcek türleri tarafından taşınarak başağa ulaştırılmaktadır. Başağa ulaşan sporlar, uygun iklim koşullarında hızlı bir şekilde çimlenerek enfeksiyonu başlatmaktadır (Bai ve Shaner, 2004). Zamanla tüm başak boyunca yayılarak tanelerin büzüşmesine ve buruşmasına neden olmaktadır. (Champeil ve diğ., 2004). *F. graminearum* hemibiotrofik yaşam döngüsüne sahiptir. Yapılan çalışmalar *F. graminearum*'un bitkilerde, hastalığın başlangıç aşamalarında değil hastalığın ilerlediği süreçte nekrozlu dokular oluşturduğunu ortaya koymuştur (Kazan ve Gardiner, 2012).

F. graminearum yaşam döngüsünün büyük bir kısmını eşeysiz üreyerek geçirmekle birlikte eşeyli üreme yoluyla da çoğalabilmektedir. Bu türün oluşturduğu makrokonidler orak şeklinde veya düz yapıda olup, hafif kavisli dorsal yüzeye sahiptir. Makrokonidin orta bölgesi hafifçe şişmiş, uç kısımları ise bir nokta oluşturacak şekilde biçimlenmiştir. Genelde 5-6 adet bölmeye sahiptir. Mikrokonid oluşturmeyen *F. graminearum*'da nadiren klamidyaspor yapısı görülmektedir (Zemankoa ve Lebeda, 2001). *F. graminearum* homotallik bir türdür. Bu fitopatojen haploid genomunda Mat 1-1 ve Mat 1-2 genlerini bulundurduğundan dolayı farklı eşem tipindeki bireye ihtiyaç duymadan da eşeyli üreyebilmektedir (Trail, 2009).

2.1.2. *F. culmorum*

F. culmorum, arpa, buğday, yulaf gibi küçük taneli tahıllar başta olmak üzere şeker pancarı, fasulye, pırasa gibi çok çeşitli bitkilerde FBY, kök ve kök boğazı çürüklüğü gibi hastalıklara neden olan bitki patojenidir. Bu tür, toprak biyotasındaki diğer canlılarla yüksek rekabet kabiliyetine sahiptir (Hornok ve diğ., 2007; Scherm ve diğ., 2013). *F. culmorum*, bitkiye kökleri vasıtasıyla bulaşmaktadır. Bu fitopatojen bitkiye ilk bulaştığında kısa bir biyotrofik evrenin ardından, bitki savunma sistemini inhibe edici ve bitki hücre duvarını parçalayıcı enzimleri ile nekrotrofik evreye geçerek bitki dokularında ölümlere neden olmaktadır. Bu tür ayrıca hasat sonrası patojeni olarak da bilinmektedir. Uygun koşullarda saklanmayan ve işlenmemiş tahıl tanelerini de enfekte etmektedir (Scherm ve diğ., 2013).

F. culmorum eşeysiz olarak üremektedir. Bu türün ürettiği makrokonidler kavisli, ince çeperli, kısa, küt uçlu ve geniştir, genelde 3-5 bölme içermektedir. Bazı özel kültür koşulları dışında mikrokonid üretmemektedir (Wagacha ve Muthomi 2007). Oval veya küresel şekilli klamidyasporları hiflerin uç kısmında tek başına veya kümelenmiş halde bulunmaktadır.

2.2. *Fusarium* İLE MÜCADELE YÖNTEMLERİ

2.2.1. Biyolojik Kontrol Yöntemleri

Doğal ekosistemlerde *Fusarium* türlerinin neden olduğu hastalıklar nadiren salgın seviyesine ulaşmaktadır. Bunun nedeni, bu tür ekosistemlerde *Fusarium* spp. ile birlikte bulunan farklı mikroorganizmaların, *Fusarium* türlerinin üremesini ve yayılmasını sınırlandırıcı etkilere sahip olmasıdır. Bu mikroorganizmalar, ortamda bulunan besin ve mineraller için *Fusarium* spp. ile rekabet ederek, çeşitli sekonder metabolitler üreterek ve bitkinin savunma mekanizmalarını aktive ederek etkilerini göstermektedir. Antagonist etki gösteren bu mikroorganizmaların doğadan toplanarak *Fusarium* spp. üzerindeki etki mekanizmalarının belirlenmesi ve *Fusarium* spp.'nin kontrolünde etkin olarak kullanılması, *Fusarium* türleri ile biyolojik mücadele araştırmalarının odağını oluşturmaktadır (Schisler ve diğ., 2002a). Fungisitlerin bitkiler üzerinde uzun süreli kullanımının çevreye, insan ve hayvan sağlığına olumsuz etkileri vardır. Doğadan elde edildiklerinden bu mikroorganizmaların kullanımının insan ve hayvan sağlığına etkilerinin fungisitlere göre daha az olacağı düşünülmektedir (Xue ve diğ., 2009). Antagonist etki gösteren mikroorganizmalar, fungisitlerin yasal olarak kullanılamadığı hasat öncesi dönemde de kullanılabilir (Wegulo ve diğ., 2015). 21. yy'ın başından itibaren tarım

arazilerinde ve seralarda yapılan çalışmalar ile; *Bacillus* spp. (Schisler ve diğ., 2002b), *Pseudomonas* spp. (Schisler ve diğ., 2006), *Streptomyces* spp. (Palazzini ve diğ., 2007) gibi bakteri türlerinin ve *Trichoderma* spp. (Palazzini ve diğ., 2007), *Clonostachys* spp. (Xue ve diğ., 2014a,b), *Cryptococcus* spp. (Schisler ve diğ., 2011) gibi mantar türlerinin *Fusarium* spp.'ye antagonist etki gösterdiği ve bu mikroorganizmalarla *Fusarium* türlerinin biyokontrolünün mümkün olabileceği ortaya konmuştur. Antagonist etki gösteren mikroorganizmaların başağa uygulanması FBY'nin ilerlemesini yavaşlatmaktadır (Xue ve diğ., 2014b). Bu mikroorganizmalar toprak yüzeyinde bulunan biki kalıntılarının üzerine inokule edildiğinde *Fusarium* spp.'nin spor oluşturmalarını baskılamaktadır (Xue ve diğ., 2014a). Bir mikroorganizmanın biyokontrol ajanı olarak tanımlanması için bu türe ait çok sayıda birey taranmalıdır. Sera ve tarla uygulamalarında kullanılmak üzere yeterli sayıda mikroorganizma eldesi için doğru yetiştirme ortamı ve mikroorganizmaların uzun süreli muhafazasını sağlayacak, raf ömrünü uzatacak taşıyıcı ortam belirlenmelidir (Schisler ve diğ., 2004). *Fusarium* türleri ile mücadelede antagonist etki gösteren mikroorganizmaların kullanımı alternatif bir yöntem sağlasa da etki mekanizmaları hakkında sınırlı bilgi bulunması, saha çalışmalarında değişken sonuçlar vermesi ve hastalık kontrolünde fungusitler kadar etkili olamaması nedeniyle günümüzde yaygın olarak kullanılmamaktadır (Pirgozliev ve diğ., 2003; McMullen ve diğ., 2012).

2.2.2. Dirençli Bitkilerin Kullanımı

Fusarium spp. ile mücadelede, bu fitopatojenin neden olduğu hastalıklara dirençli bitkilerin kullanımı ekolojik ve ekonomik açıdan verimli bir yaklaşımdır. Çalışmalarda, bu hastalıklara daha dirençli bitkilerin geleneksel melezleme yöntemleriyle eldesi üzerine odaklanılmıştır (Pirgozliev ve diğ., 2003; Champeil ve diğ., 2004). Buğdayda FBY'ye karşı beş farklı direnç tipinin olduğu ortaya konmuştur. Enfeksiyonun başlamasına dirençli olanlar tip I, enfeksiyonun yayılmasına ve kolonize olmasına dirençli olanlar tip II, toksin birikmesine dirençli olanlar tip III, yüksek toksin konsantrasyonuna tolerans gösterenler tip IV ve başakta enfeksiyon oluşmasına dirençliler tip V olarak sınıflandırılmıştır (Schroeder ve Christensen, 1963; David Miller ve Arnison, 1986; Wang ve Miller, 1988). FBY'ye en fazla direnç gösteren Sumai 3 (Çin), Frontana (Brezilya) ve Nobeokabouzu-komugi (Japonya) gibi çeşitli buğday hatları tüm dünyada geleneksel melezleme çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Champeil ve diğ., 2004; Niwa ve diğ., 2014). Ancak, klasik melezleme çalışmaları, hem yüksek hastalık

direncine hem de yüksek ürün verimliliğine sahip bitki çeşitlerinin geliştirilmesinde yetersiz kalmaktadır. *Fusarium* türlerinin neden olduğu hastalıklarla ilişkili direnç genlerinin belirlenmesi ve genetik mühendisliği tekniklerinin kullanımı hastalık dirençli transgenik bitkilerin elde edilmesine olanak sağlamıştır. Bu alandaki genetik mühendisliği çalışmaları bitkinin antifungal özelliğe sahip protein ve sekonder metabolitlerinin üretiminin arttırılması, bir bitkideki dirençle ilişkili genlerin başka bir bitkiye aktarımı ve *Fusarium* türlerinin mikotoksin üretimini baskılayıcı veya mikotoksinleri yıkıcı ajanların bitki tarafından üretiminin sağlanması gibi uygulamaları kapsamaktadır (Champeil ve diğ., 2004).

Bitkilerdeki savunma ve direnç mekanizması; bitkinin bulunduğu büyüme aşamasına, sıcaklık ve nem gibi çevresel faktörlere ve bitkide bulunan dirençle ilişkili genlere bağlıdır. Çok sayıda faktörün bitkideki direnç mekanizmasını etkilemesi *Fusarium* türlerinin neden olduğu hastalıklara tamamen dirençli bitki türü eldesini sınırlamıştır. Bitkilerdeki hastalık direnç mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik olarak gerçekleştirilen ve bitki-patojen etkileşiminin moleküler düzeyde incelendiği çalışmaların bu hastalıklara daha dirençli bitkilerin geliştirilmesine olanak sağlayacağı düşünülmektedir (Bai ve Shaner, 2004).

2.2.3. Fungisit ve Fungisit Aktif Bileşenleri

Fungisit uygulaması *Fusarium* spp.'nin neden olduğu hastalıklarla etkili ve hızlı bir şekilde mücadele edilmesi, ürün kayıplarının en aza indirilmesi için uygulanan en etkili mücadele yöntemidir (Yang ve diğ., 2011; Wegulo ve diğ., 2015). Fungisitler, fitopatojenlerin öldürülmesinde veya üremelerinin kontrol altına alınmasında etkili olan fungisit aktif bileşenlerini içermektedir. Fungisit aktif bileşenleri, fitopatojenin birden fazla biyokimyasal yolağını inhibe edebildikleri gibi sadece tek bir biyokimyasal yolağı hedefleyen özgün etki mekanizmasına da sahip olabilmektedir. Özgün etki mekanizmasına sahip fungisit aktif bileşenlerin daha düşük dozları fitopatojenin kontrol altına alınmasında etkili olabilmektedir (Hermann ve Stenzel, 2019).

Fungisit aktif bileşenlerinin toprakta birikmesi hedef fitopatojenle mücadelenin yanında toprakta bulunan diğer mikroorganizmaların inhibisyonuyla da sonuçlanmaktadır (Yang ve diğ., 2011). Birden fazla etki mekanizmasına sahip fungisit aktif bileşenleri, özgün etki mekanizmasına sahip fungisit aktif bileşenlerine göre toprakta bulunan diğer mikroorganizmalara daha fazla zarar vermektedir. Tarım arazilerinde fungisitlerin gereğinden

fazla kullanımı, fitopatojenin aktif bileşen direnci geliştirmesi ile sonuçlanabilmektedir. Özgün etki mekanizmasına sahip fungusit aktif bileşenleri için bu olasılık daha yüksektir. Hem fitopatojenlerin aktif bileşen direnci geliştirmesini hem de toprakta bulunan diğer mikroorganizmaların zarar görmesini önlemek için fungusit içerisindeki aktif bileşen miktarları optimize edilmelidir (Hermann ve Stenzel, 2019).

2.2.3.1. Hücre Solunumu İnhibe eden Fungisit Aktif Bileşenleri

Özgün etki mekanizmasına sahip fungusit aktif bileşenleri, hedefledikleri biyokimyasal yollara göre sınıflandırılmaktadır (Nabi ve diğ., 2017). Hücre solunumunu hedefleyenler, mantarların solunum sisteminin çeşitli basamaklarını inhibe ederek etki gösterdiklerinden üç gruba ayrılmaktadır.

NADH oksidoredüktaz inhibitörü fungusit aktif bileşenleri, NADH oksidoredüktaz enziminin aktivitesini durdurarak elektronların elektron taşıma sistemine (ETS) girişini engelleyerek etkili olurlar. Elektron akışının durması, fitopatojenin ölümü ile sonuçlanmaktadır. Bu aktif bileşenler süs bitkilerinde meydana gelen hastalıklarda etkili olarak kullanılmaktadır (Nabi ve diğ., 2017). Ticari olarak temin edilebilen tek NADH oksidoredüktaz inhibitörü fungusit aktif bileşeni diflometorim, ilk defa 1997 yılında süs bitkilerindeki çeşitli mantar hastalıklarını tedavi etmek amacıyla piyasaya sürülmüştür (Fujii ve Takamura, 1998). NADH oksidoredüktaz inhibitörü etkili fungusit aktif bileşenleri hakkında sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır (Yang ve diğ., 2011). Bu aktif bileşenler, yüksek maaliyeti ve toprakta bulunan diğer mikroorganizmalara yüksek toksisite göstermeleri nedeniyle sınırlı kullanım alanına sahiptir (Kuck ve diğ., 2012).

Süksinat dehidrogenaz inhibitörü (SDHI) fungusit aktif bileşenleri, süksinat dehidrogenaz enzimini inhibe ederek işlevini yerine getirmesini engellemektedir. Süksinat dehidrogenaz enziminin inaktivasyonu, krebs döngüsünün aksamasına ve fitopatojenin ölümüne neden olmaktadır (Sierotzki ve Scalliet, 2013). Bu grubun ilk üyesi olan karboksin 1966 yılında kullanılmaya başlanmıştır (Von Schmeling ve diğ., 1966). Karboksine, az sayıda fitopatojen üzerinde etkili olduğundan sadece tohumların hastalıklardan korunmasında kullanılmıştır. 2003 yılı ve sonrasında başta boskalid olmak üzere çok sayıda geniş spektrumlu etkiye sahip SDHI fungusit aktif bileşeni piyasaya sürülmüştür (Sierotzki ve Scalliet, 2013). Süksinat dehidrogenaz çok sayıda canlıda bulunan bir enzimdir. SDHI fungusit aktif bileşenlerinin kullanımı fitopatojenlerin inhibasyonunun yanı sıra toprakta bulunan diğer mikroorganizmalara

ve bitkilere de toksik etki göstermekte, hayvan ve insan sağığına zarar vermektedir. Bu nedenle bu aktif bileşenlerin kullanımı sınırlandırılmıştır (Yang ve diğ., 2011).

Strobilurin fungusit aktif bileşenleri, sitokrom b ile sitokrom c1 arasındaki elektron transferini durdurmaktadır. ETS'deki elektron transferinin aksaması, hücre solunumunu durdurarak fitopatojenin ölümüne neden olmaktadır (Balba, 2007). İlk strobilurin fungusit aktif bileşeni, 1977 yılında Anke ve arkadaşları tarafından *Strobilurus tenacellus* mantarından izole edilmiştir (Anke ve diğ., 1977). Daha sonraki yıllarda çok sayıda strobilurin fungusit aktif bileşeni farklı mantar türlerinden de elde edilmiştir. Strobilurin fungusit aktif bileşenleri, *Blumeria graminis* ve *Erysiphe graminis* gibi fitopatojenlerin neden olduğu hastalıklarla mücadelede etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Balba, 2007). Yapılan çalışmalar, *Fusarium* spp.'nin neden olduğu hastalıklarla mücadelede strobilurin fungusit aktif bileşenlerinin antifungal etkisinin diğer fungusit aktif bileşenlerine göre daha düşük olduğunu ortaya koymuştur. (Cromey ve diğ., 2002; Chala ve diğ., 2003).

2.2.3.2. Hücre Döngüsüne Etki Eden Fungisit Aktif Bileşenleri

Mikrotübüller mitoz ve mayoz bölünme, hücre iskeletinin oluşturulması ve hücre içi madde taşınmasında görev almaktadır. Mikrotübüller, α ve β yapısındaki tubulin proteinlerinden oluşmaktadır. Metil-2-benzimidazol karbamat (MBK) fungusit aktif bileşenleri, β -tubuline bağlanarak mikrotübül oluşumunu inhibe etmektedir. Mikrotübül üretiminin durması fitopatojenin ölümüne neden olmaktadır. (Vela-Corcía ve diğ., 2018). MBK fungusit aktif bileşenlerinin en önemli avantajı seçici etki göstermeleridir. Yapılan çalışmalar bu aktif bileşenlerin bitki, hayvan ve insan hücrelerindeki mikrotübül oluşumunu etkilemediğini, sadece mantar hücrelerinde inhibisyon etkili olduklarını göstermiştir. Bu nedenle toprakta bulunan mantar dışındaki diğer mikroorganizmalara, bitki, hayvan ve insanlara zarar vermemektedirler. MBK fungusit aktif bileşenleri, 1970'lerin başında piyasaya sürülmüştür. Bu aktif bileşenler arpa, buğday, yulaf, üzüm, muz gibi çok sayıda bitkide meydana gelen hastalıklarla mücadelede yaygın olarak kullanılmıştır. Günümüze kadar *Fusarium* türleri dahil çok sayıda fitopatojen MBK fungusit aktif bileşenlerine direnç geliştirdiğinden kullanım alanı giderek daralmıştır. (Vela-Corcía ve diğ., 2018; Dos Santos ve diğ., 2019; Xu ve diğ., 2019).

2.2.3.3. Ergosterol Biyosentezi İnhibitörü Fungisit Aktif Bileşenleri

Mantarlar, bitki, hayvan ve insanlarda bulunmayan özgün sterollere sahiptir. Bu durum bitki, hayvan ve insanlara zararsız olan ve sadece mantarları etkileyen çok çeşitli kimyasal yapılara ve yüksek antifungal etkiye sahip fungusit aktif bileşenlerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Bir sterol olan ergosterol, mantar hücre zarının ana bileşenlerinden biridir (Rodrigues, 2018; Liu ve diğ., 2019). Demetilasyon inhibitörü (DMI) fungusit aktif bileşenleri, *cyp51* geni tarafından kodlanan 14 α -demetilaz enzimine bağlanarak enzimin katalitik aktivitesini inhibe etmektedir. 14 α -demetilaz, ergosterol biyosentezi sırasında 24-metilen-dihidrolano-sterolden metil grubu kopararak 4,4-dimetilergosta-8,14,24(28)-trien-3-ol oluşumunu sağlamaktadır. Bu enzimin inhibisyonu, ergosterol biyosentezinin durmasına yol açmakta, bu durum da hücre zarının geçirgenliğinin bozulması ile fitopatojenin ölümüne neden olmaktadır (Barrett-Bee ve Dixon, 1995; Stenzel ve Vors, 2019). Günümüzde ticari olarak temin edilebilen fungusitlerin %30'unda DMI fungusit aktif bileşenleri bulunmaktadır. Fitopatojenlerin neden olduğu hastalıkları hem tedavi edici hem de önleyici etkiye sahip olan DMI fungusitleri doğada uzun süre bozulmadan kalmaktadır. Bu aktif bileşenler fitopatojenlerle mücadelenin yanı sıra hayvan ve insanlarda hastalık yapan mantarlar üzerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. DMI fungusit aktif bileşenleri bitkide iletim demetlerini kullanarak tüm bitki kısımlarına ulaşabilmektedir (Hermann ve Stenzel, 2019). Fitopatojenler; 14 α -demetilazı kodlayan *cyp51* geninde meydana gelen mutasyonlar, *cyp51* geninin ve zararlı maddelerin hücreden uzaklaştırılmasında görevli taşıyıcı proteinleri kodlayan genlerin anlatımlarının artması aracılığıyla DMI fungusit aktif bileşenlerine karşı direnç geliştirebilmektedir. Tarım arazilerinde yapılan çalışmalar fitopatojenlerin genellikle DMI fungusit aktif bileşenlerine tamamen direnç kazanmadığını ancak sık uygulamalar sonucu duyarlılığını kaybeden bu patojenlerin daha yüksek doz uygulaması ile kontrol edilebildiğini ortaya koymuştur (Bolton ve diğ., 2012; Cools ve diğ., 2013; Ronis ve diğ., 2014; Zhang ve diğ., 2020)

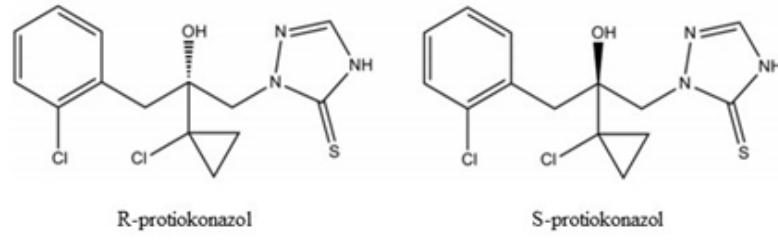
Azol fungusit aktif bileşenlerinin yapısında 1,2,3-triazol (C₂H₃N₃) halkası bulundurmaktadır. 1,2,3-triazol halkasının varlığı, bu aktif bileşenlerin diğer DMI fungusit aktif bileşenlerine göre daha yüksek antifungal etkiye sahip olmasını sağlamıştır. 1,2,3-triazol halkasına eklenen farklı gruplar aktif bileşiğin fiziksel özelliklerini ve fitopatojenlerde meydana getirdiği etkileri değiştirebilmektedir. Azol fungusit aktif bileşenlerinin keşfiyle, fitopatojenlerle mücadelede büyük ilerleme kaydedilmiştir. İlk azol fungusit aktif bileşeni olan triadimefon 1976 yılında

piyasaya sürülmüş ve daha sonraları yaprak beneği ve elma küllenmesi gibi hastalıklara karşı kullanılmıştır (Stenzel ve Vors, 2019).

2.2.3.4. *Protiokonazol*

Azol fungusit aktif bileşenlerinin en yeni üyesi olan protiokonazol ($C_{14}H_{15}ClN_3OS$) 2004 yılında Bayer CropScience tarafından Proline® adıyla piyasaya sürülmüştür. Bu aktif bileşenin IUPAC adı (RS)-2-[2-(1-klorosiklopropil)-3-(2-klorofenil)-2-hidroksipropil]-2,4-dihidro-1,2,4-triazol-3-tion'dur (Liu ve Ding, 2019). Protiokonazolün iki enantiyomer formu (R-protiokonazol ve S-protiokonazol) bulunmaktadır (Şekil 2.2). Kolon kromatografisi kullanılarak enantiyomerler birbirinden ayrılabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, R-protiokonazolün antifungal etkisinin S-protiokonazolden daha fazla olduğunu göstermiştir (Zhai ve diğ., 2019; Zhang ve diğ., 2019). Ticari olarak temin edilebilir olan protiokonazoller her iki enantiyomeri de eşit miktarda bulundurmaktadır (Stenzel ve Vors, 2019). Protiokonazol diğer azol fungusit aktif bileşenlerinden farklı olarak 1,2,3-triazolün kükürt eklenmiş formu olan 1,2,4-triazol-3-tion halkasını içermektedir. Bu halka yapısı protiokonazolün 14 α -demetilaza bağlanma mekanizmasının diğer azol fungusit aktif bileşenlerinden farklı olmasına neden olmaktadır (Parker ve diğ., 2011). Bu sayede protiokonazol, diğer azol fungusit aktif bileşeniyle çapraz direnç göstermemektedir. Protiokonazol, küçük taneli tahıllarda geniş spektrumlu etki göstermesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu aktif bileşen yaprak beneği (etmen: *Mycosphaerella graminicola* ve *Pyrenophora tritici-repentis*), elma küllenmesi (etmen: *Blumeria graminis*) ve Fusarium başak yanıklığı (etmen: *Fusarium* spp.) gibi çok sayıda hastalıkla mücadelede etkilidir (Stenzel ve Vors, 2019).

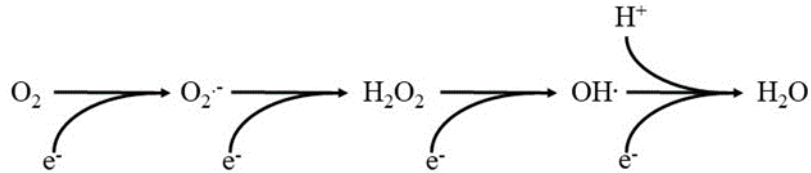
Protiokonazol ülkemizde Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından ruhsatlandırılmış 11 fungusitin aktif bileşenidir ve bu fungusitler; buğday, arpa, pamuk, mısır gibi çeşitli bitkilerde gözlenen farklı hastalıklarla mücadelede ve ayrıca son yıllarda azol grubu fungusit aktif bileşeni olan tebukonazol ile birlikte başak yanıklığı ve kök ve kök boğazı çürüklüğü ile mücadelede etkin olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.2: Protikonazol enantiyomerleri.

2.3. OKSİDATİF STRES

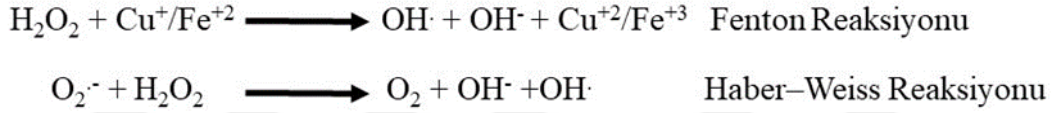
Oksijenli solunum yapan hücrelerde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip olan ve bu nedenle de yüksek reaktivite gösteren serbest radikaller oluşmaktadır. Serbest radikaller, radikal olmayan oksijen türleri ile birlikte hücrede reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılmaktadır. Prokaryotlarda hücre membranı, ökaryotlarda ise mitokondrideki oksijenli solunum, endoplazmik retikulum ve kloroplast gibi organallerde gerçekleşen reaksiyonlar sonucunda ROT oluşmaktadır. ROT ile ROT'un süpürülmesinden sorumlu antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin bozulması hücrede oksidatif strese neden olmaktadır (Burton ve Jauniaux, 2011). Toksik madde, ısı, iyonize ve iyonize olmayan ışınlar gibi çeşitli kimyasal ve fiziksel faktörler hücrelerdeki ROT miktarının artmasına yol açmaktadır. Maya ve mantarlarda yapılan çalışmalar oksidatif stresin hücre ölümlerine neden olduğunu göstermiştir (Aung-Htut ve diğ., 2011). Hücredeki en yaygın ROT; süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$)'dir (Cheeseman ve Slater, 1993; Thomas, 2000). Şekil 2.3'de ROT'ların birbirlerine dönüşümü özetlenmiştir.



Şekil 2.3: Hücredeki reaktif oksijen türleri ve birbirlerine dönüşümü.

Hücrede reaktivitesi yüksek olan oksijen ETS'de son elektron alıcısı olarak görev almaktadır. Elektronlar ETS boyunca tamamen verimli taşınmadığı için, ETS'de meydana gelen elektron sızıntıları moleküler oksijene (O_2) bir elektron eklenmesiyle $O_2^{\cdot-}$ 'nin oluşumu ile

sonuçlanmaktadır (Finaud ve diğ., 2006). Ökaryotik hücrelerde $O_2^{\cdot-}$ 'nin ana kaynağı mitokondridir. Normal şartlarda, hücreye alınan oksijenin %2'si mitokondride suya indirgenmek yerine $O_2^{\cdot-}$ 'ye dönüştürülmektedir. Yükü nedeniyle $O_2^{\cdot-}$ mitokondri membrandan geçemediği için matriksde kalmaktadır. $O_2^{\cdot-}$, SOD enzimi tarafından serbest radikal taşımayan ve daha az reaktiviteye sahip H_2O_2 'ye indirgenmektedir. Yüksüz olması sayesinde H_2O_2 hücre ve organel membranlarından geçebilmekte, ayrıca H_2O_2 hücrede sinyal iletim yollarında görev alabilmektedir. H_2O_2 , KAT ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimler tarafından H_2O 'ye çevirilmektedir. (Burton ve Jauniaux, 2011). Ancak Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları H_2O_2 'den $OH^{\cdot}$ radikali oluşumuna yol açmaktadır (Şekil 2.4) (Kehrer, 2000). $OH^{\cdot}$ radikali diğer ROT'a göre daha yüksek reaktiviteye sahip olduğundan hem hücrede oksidatif hasara yol açmakta hem de yakın çevredeki tüm biyolojik moleküllerle etkileşerek yapılarını bozmaktadır (Burton ve Jauniaux, 2011). $OH^{\cdot}$ 'yi süpüren bir antioksidan enzim bulunmamaktadır (Finaud ve diğ., 2006).



Şekil 2.4: Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonları.

2.3.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Hücrede Meydana Getirdiği Hasarlar

2.3.1.1. Lipid Peroksidasyonu

ROT (özellikle $OH^{\cdot}$), hücre zarında ve fazla miktarda çoklu doymamış yağ asidi yan zincirleri içeren organellerin yapısında bulunan lipidlerin peroksidasyonuna neden olmaktadır. ROT, yağ asidinin hidrokarbon yan zincirinden hidrojen atomunu kopararak lipid radikali ($L^{\cdot}$) oluşturmaktadır (Volinsky ve Kinnunen., 2013). Ortamda bulunan oksijen, $L^{\cdot}$ ile reaksiyona girerek lipid peroksil radikali ($LOO^{\cdot}$) oluşmasına neden olmaktadır. $LOO^{\cdot}$, komşu lipid molekülünden hidrojen atomu kopararak peroksidasyonun diğer lipitlere yayılmasını sağlamaktadır. Lipid peroksidasyonu, hücre membranının bütünlüğünün bozulmasına ve membrana bağlı proteinlerin aktivitesini kaybetmesine neden olmaktadır. (Negre-Salvayre ve diğ., 2008). E vitamini gibi antioksidanlar $LOO^{\cdot}$ 'ya hidrojen atomu vererek lipid peroksidasyonunu sonlandırmaktadır (Yin ve diğ., 2011). Lipid peroksidasyonu sonucunda

malondialdehit (MDA), propanal, heksanal gibi aldehitler oluşmaktadır. MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile kolayca reaksiyona girerek ışıma yapan bir kompleks oluşturması sebebiyle lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde belirteç olarak kullanılmaktadır (Aung-Htut ve diğ., 2011).

2.3.1.2. Proteinlerin Yapı Değişimleri

ROT hem hücrede serbest halde bulunan hem de proteinlerin yapısına katılan amino asitlerden hidrojen atomu kopararak amino asidin yapısında radikallerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu radikaller de oksijenle reaksiyona girmekte ve alkil, alkil peroksil, alkil peroksit gibi radikalleri meydana getirmektedir. Bu radikaller, aynı veya farklı proteinlerdeki amino asitlerle etkileşerek yeni radikalleri oluşturmaktadır. Oksidasyonun yayılması proteinlerin yapısında bozulmaya ve işlevlerini kaybetmelerine neden olmaktadır (Berlett ve Stadtman, 1997). Ayrıca ROT, sistein amino asidinin tiol grupları ile etkileşerek sistenin yapısında yüksek reaktiviteye sahip sülfenik asit yan zincirleri oluşturarak sülfenik asit ve sistein amino asitleri arasında disülfid bağları kurulmasına ve sonuçta proteinlerin anormal katlanmalarına neden olmaktadır (Ezraty ve diğ., 2017). Anormal katlanan proteinler işlevlerini gerçekleştirememekte, hücrede birikmekte ve hatta hücre ölümüne bile neden olabilmektedir. ROT'un proteinlere verdiği hasarlar Western Blot ve ELISA gibi yöntemler aracılığıyla belirlenebilmektedir (Burton ve Jauniaux, 2011).

2.3.1.3. DNA Hasarları

ROT, DNA çift ipliğinde yer alan nukleotidlerin baz ve deoksiriboz yapı taşlarıyla etkileşime girerek DNA'nın yapısında bozulmalara neden olmaktadır. Deoksiribozdaki C-H bağlarından hidrojen atomu kopararak karbon merkezli radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. (Aust ve Eveleigh, 1999; Cooke ve diğ., 2003). Deoksiribozdaki 4. ve 5. pozisyonunda meydana gelen karbon merkezli radikaller DNA'da iplik kırıklarına yol açmaktadır. ROT, pirimidin bazlarının karbon atomları arasında çift bağ oluşumunu tetikleyerek veya timinden hidrojen atomunun ayrılmasına yol açarak oluşturdıkları baz radikalleri ile nükleik asit yapı değişikliklerine neden olmaktadır (Aust ve Eveleigh, 1999). ROT'un histonların yapısında meydana getirdiği değişimler de kromatinin doğru katlanamamasına yol açarak DNA'nın onarımı ve transkripsiyonunda aksamaya neden olmaktadır. Mitokondri DNA'sı, ETS'ye olan yakınlığı, histon proteinlerinin bulunmaması ve az sayıda onarım mekanizmasına sahip olması nedeniyle ROT'a karşı savunmasızdır. Normal koşullarda mitokondri DNA'sında mutasyonlar yaygındır

ve nuklear DNA'ya göre on kata kadar daha fazla mutasyon meydana gelmektedir. Mitokondri DNA'sı, ETS enzimlerinin alt birimleri de dahil olmak üzere birçok proteini kodlamaktadır. Mitokondri DNA'sındaki mutasyonlar enerji üretiminin bozulmasına yol açarak oksidatif strese neden olmaktadır (Burton ve Jauniaux, 2011). ROT'un DNA'da meydana getirdiği hasarlar kapiler elektroforez, sıvı ve gaz kromatografisiyle belirlenebilmektedir (Guetens ve diğ., 2002).

2.3.2. Antioksidan Savunma Sistemi

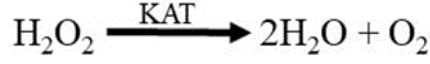
Hücrede ROT'un zararlı etkilerinin önlenmesinden antioksidan enzimler ve enzimatik olmayan antioksidanlar sorumludur. SOD, KAT ve GPx en önemli antioksidan enzimlerdir.

SOD, ROT'a karşı antioksidan enzim savunma sisteminin ilk basamağında bulunmaktadır. SOD yüksek reaktiviteye sahip $O_2^{\cdot-}$ 'yi O_2 ve H_2O_2 'ye çevirmektedir (Şekil 2.5). Bu antioksidan enzim mitokondri, kloroplast, peroksizom ve sitoplazmada bulunmaktadır. Hücrede iki temel SOD izoformu vardır. Sitoplazmada bulunan aktif bölgesinde bakır ve çinko metalleri taşıyan bakır-çinko SOD homodimer yapıdadır. Bakır SOD'un katalitik aktivitesine, çinko atomu ise enzimin kararlılığına katkı sağlamaktadır. Manganez SOD ise aktif bölgesinde manganez metali taşıyan heteromer yapılı izoformdur. SOD, ETS de dahil bir çok metabolik aktivite sonucu oluşan $O_2^{\cdot-}$ 'nin indirgenmesinden sorumlu olduğundan hücre içindeki en önemli antioksidan enzimlerden biridir (Bowler ve diğ., 1992).



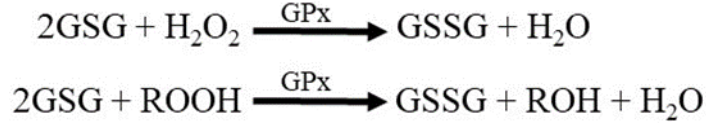
Şekil 2.5: SOD'un gerçekleştirdiği reaksiyon.

KAT, memeli hücrelerinin mitokondrileri hariç peroksizomlar başta olmak üzere çeşitli hücre kısımlarında bol miktarda bulunan, tetramerik yapılı, hem grubu taşıyan antioksidan enzimdir. ROT'a karşı savunma hattının ikinci basamağında görev alır (Chelikani ve diğ., 2004). Bu enzim, kendisine bağlı olan hem grubunun içerdiği demir atomunu kullanarak SOD tarafından üretilen H_2O_2 'nin H_2O ve O_2 'ye dönüşümünden sorumludur (Şekil 2.6) (Ighodaro ve diğ., 2018). Ayrıca KAT alkol, fenol ve formik asit gibi bileşiklerin hücreye zararsız hale getirilmesinde de görev almaktadır (Nordberg ve Arnér, 2001). Yüksek verimliliği ve hücre içerisindeki alkol, fenol gibi bileşiklerin metabolize edilmesindeki rolü nedeniyle KAT önemli bir antioksidan enzimdir (Lledías ve diğ., 1998).



Şekil 2.6: KAT'ın gerçekleştirdiği reaksiyon.

GPx, hidrojen vericisi olarak glutasyonu (GSH) kullanarak H_2O_2 'yi H_2O 'ya veya hidroperoksitleri alkollere çeviren bir antioksidan enzimdir (Şekil 2.7) (Ighodaro ve diğ., 2018). Sitoplazmada ve mitokondride yaygın olarak bulunmaktadır. GPx enziminin iki temel izoformu vardır. Aktif bölgesinde selenyum bulunduran selenyuma bağlı glutasyon peroksidaz (Se-GPx) izoformu, H_2O_2 ve organik hiperoksitlere karşı etkilidir. İkinci izoformu ise hidroperoksitlerin metabolize edilmesinde görev alan selenyum taşımayan GPx'dir (Cnubben ve diğ., 2001). GPx, hücrede oksidatif stres olmadığı durumlarda da H_2O_2 süpürücüsü olarak görev yaparken KAT sadece belli bir konsantrasyonun üstünde H_2O_2 varlığında (oksidatif stres durumunda) H_2O_2 süpürücüsü olarak görev almaktadır (Nordberg ve Arnér, 2001). GPx, oksidatif stres olmadığı koşullarda da aktif olması, lipid peroksidasyon ürünlerinin süpürülmesinde etkin bir şekilde görev alması nedeniyle önemli bir antioksidan enzimdir.



Şekil 2.7: GPx'in gerçekleştirdiği reaksiyonlar (ROOH: hidroperoksit, ROH: alkol GSSG: glutasyon disülfid).

ROT'un verdiği hasarları önlemede antioksidan enzimlere yardımcı C vitamini (askorbik asit), GSH, karetenoid ve α -tokoferol gibi çeşitli enzimatik olmayan antioksidan özellikteki bileşikler bulunmaktadır. Askorbik asit, O_2^- ve OH^- 'nin süpürülmesinde, membranın lipid peroksidasyonundan korunmasında, askorbat peroksidaz ile birlikte H_2O_2 'nin H_2O ve O_2 'ye çevirimi görev almaktadır (Ahmad ve diğ., 2010). Tiol grubu taşıyan GSH ise sitoplazmada ve organellerde ROT'un süpürülmesinde ve GPx ile H_2O_2 'nin yıkımında görev almaktadır (Millar ve diğ., 2003). Bitki ve alglerde bol miktarda bulunan α -tokoferol ise fotosentez sonrası oluşan O_2^- 'nin giderilmesinde işlevseldir (Ahmad ve diğ., 2010).

Hücrede meydana gelen oksidatif stres H_2DCFDA gibi boyalar kullanılarak floresan mikroskopunda hücresel düzeyde belirlenebilmektedir. H_2DCFDA hücrede ROT ile reaksiyona

girerek yeşil renkli ışıma yapmaktadır. Hücrede ROT miktarı arttıkça ışımanın şiddeti de artmaktadır. Ayrıca antioksidan enzimlerin miktarındaki artış belirlenerek hücrede oluşan oksidatif stres gösterilebilmektedir. Bu amaçla SOD, KAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerin substratları ile reaksiyona girmeleri sağlanarak enzimlerin miktarlarındaki değişimler spektrofotometrik olarak izlenebilmektedir (Haida ve Hakiman, 2019).

2.4. APOPTOZ

Programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz hücre döngüsünün devamlılığının sağlanması, hasarlı hücrelerin kontrollü biçimde ortadan kaldırılması, biyotik ve abiyotik strese uyum, homeostazın sağlanması, bağışıklık sisteminin işleyişinin sağlanması, embriyonik gelişim gibi birçok biyolojik süreçte önemli rol oynamaktadır (Elmore, 2007). Çok sayıda proteinin görev aldığı ve hücre tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilen bu süreç ile ilgili araştırmalar, sinyal mekanizmalarının aydınlatılması ve proteinlerin etki mekanizmalarının tanımlanması üzerine odaklanmıştır (Sharon ve diğ., 2009). Apoptoz programlı olarak yürütülen, enerjiye bağlı hücre ölümüdür (Zeiss, 2003). Hücre içerisindeki kaspaz proteinlerinin ve ATP'nin yetersiz olduğu durumlarda ilerleyen bu süreç diğer bir hücre ölümü süreci olan nekroza çevirebilmektedir (Denecker ve diğ., 2001).

Apoptoz sırasında hücresel düzeyde meydana gelen değişiklikler elektron mikroskopisi ile görüntülenebilmiştir (Hacker, 2000). Apoptoz sürecinin erken aşamasında, sitoplazmanın yoğunlaştığı ve organellerin birbirine yaklaştığı hücre büzülmesi ve kromatinlerin yoğunlaştığı piknoz, ve daha ileri aşamada nükleus membranının parçalandığı, DNA fragmentlerinin hücre içerisine dağıldığı karyoreksis ile organelleri ve DNA fragmentlerini içeren apoptotik cisimlerin meydana geldiği tomurcuklanma, hücresel düzeyde izlenen apoptoz aşamalarıdır (Kerr ve diğ., 1972; Kurosaka ve diğ. 2003; Sharon ve diğ., 2009). Hücrede meydana gelen apoptoz çeşitli yöntemler kullanılarak belirlenebilmektedir. Apoptotik süreçte oluşan DNA fragmentleri jel elektroforezi kullanılarak gösterilebilmektedir. Ayrıca akrinin turuncusu/etidyum bromür (at/etbr) ikili boyası gibi boyaların kullanımıyla apoptoz floresan mikroskopunda hücresel düzeyde görüntülenebilmektedir. At tüm hücrelerin membranından geçmekte ve yeşil renkli ışıma yapmaktadır. Etbr ise sadece hücre membranının geçirgenliği bozulmuş hücrelere girerek kırmızı renkli bir ışıma yapmaktadır. Sağlıklı hücrelerin membranından sadece at geçebildiğinden dolayı bu hücreler yeşil bir ışıma yaparken apoptoza girmiş hücrelerin membranlarından hem at hem de etbr geçerek hücre içine girdiğinden dolayı

bu hücreler turuncu ışıma yapmaktadır. Bu sayede apoptoza sağlıklı hücreler ile apoptoza giren hücreler arasında ayırım hücresel düzeyde ortaya konmaktadır (Martinez ve diğ., 2010) .

Mantarlarda, çeşitli çevresel etkiler veya üreme, yaşlanma, patojen-konak etkileşimi gibi süreçler apoptozu tetikleyebilmektedir. Mantarlardaki ana apoptotik süreçler memelilerdekine benzer olarak gerçekleştirilmektedir (Hamann ve diğ., 2008).

2.4.1. Kaspaza Bağlı Apoptoz

Kaspaza bağlı apoptoz, sistein proteaz ailesine ait olan kaspazların görev aldığı ekstrinsik veya intrinsik yollarla başlayıp infaz yolağıyla sonlanmaktadır. Özgün amino asit dizilerini tanıyarak proteinleri bu bölgelerden kesen kaspaz proteazları, proenzim olarak sentezlenen ve tanımlanmış 14 üyesi bulunan proteaz grubudur (Knobloch ve diğ., 2002). Öncü kaspazlar olarak gruplanmış kaspaz 8 ve -9 ekstrinsik ve intrinsik yollarla aktive edilmektedir. Kaspaz 3, -6 ve -7 ise öncü kaspazlar tarafından aktifleştirilmektedir (Zhang ve diğ., 2004). İntrinsik ve infaz apoptoz yollarında görev alan bazı proteinlerin homologları mantarlarda da tanımlanmıştır. Ekstrinsik apoptoz yolağında görevli proteinlerin homologlarının mantarlarda bulunmaması, mantarlarda ekstrinsik yolağın kullanılmadığının ya da henüz tanımlanmamış proteinler tarafından düzenlendiğinin göstergesi olabilir (Sharon,ve diğ., 2009). Homologları bulunmayan bazı memeli apoptotik proteinlerinin mantarda heterolog üretimi üzerine yapılan çalışmalar, bu proteinlerin mantarlarda apoptozu tetiklediğini ortaya koymuştur. Bu çalışmalar, memeli apoptotik proteinlerine işlevsel olarak benzer proteinlerin mantarlarda da bulunduğunu düşündürmüştür (Fröhlich ve Madeo, 2000; Polčic ve Forte, 2003; Hamann ve diğ., 2008).

2.4.1.1. Ekstrinsik Yolak

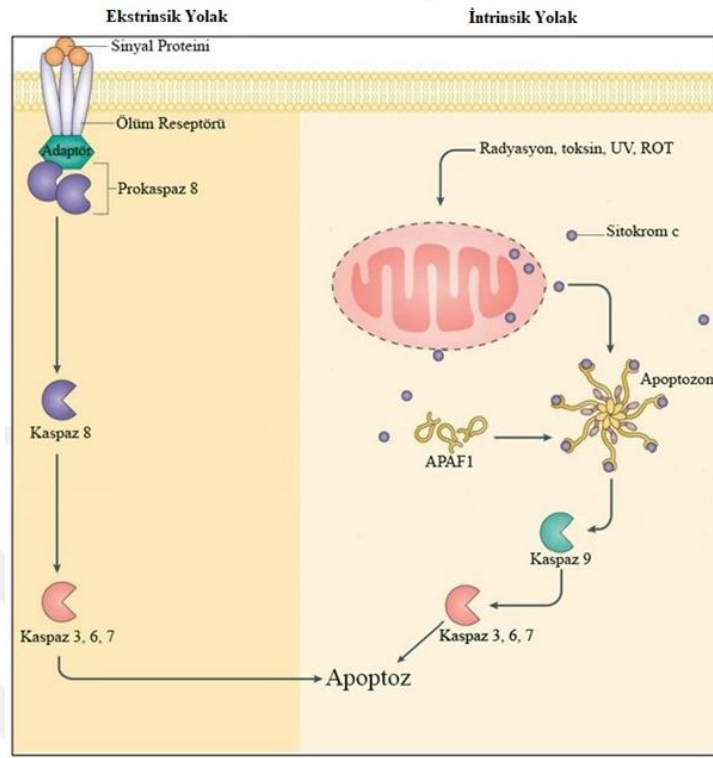
Ekstrinsik yolak, dış kaynaklı apoptotik sinyalinin hücre membranındaki ölüm reseptörleri tarafından hücre içine iletildiği bir süreçtir. Bu reseptörler, hücre membranının dış yüzeyindeki tanıma bölgesi ve hücre membranının iç yüzeyinde yer alan ölüm domeninden oluşmaktadır (Bossen ve diğ., 2006). Sinyal proteininin özgün tanıma bölgesine bağlanması, ekstrinsik yolağı başlatmaktadır. Tanıma bölgesine bağlanan sinyal proteinine özgü adaptör proteinler, ölüm domenine bağlanarak ölüm indükleyici sinyal kompleksini oluşturmaktadır. Adaptör proteinler, proenzim formunda bulunan kaspaz 8 (prokaspaz 8)'in ölüm indükleyici sinyal kompleksine bağlanarak aktifleşmesini sağlamaktadır. Aktifleşen kaspaz 8, cellat kaspazları aktifleştirerek infaz yolağının başlamasını sağlamaktadır (Şekil 2.8) (Kim ve diğ., 2004; Zhang ve diğ., 2004).

2.4.1.2. *İntrinsik Yolak*

İntrinsik yolağı, apoptozun mitokondriyal yolağı olarak da adlandırılmaktadır Apoptozu başlatan sinyal hücre içinde oluşmaktadır (D'Arcy, 2019). Bazı büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinler gibi ajanların yokluğu; toksin, ROT, UV gibi zararlı etkenlerin varlığı mitokondri membranında özel bir por yapısının oluşmasına neden olmaktadır. Mitokondride bulunan sitokrom c, bu pordan stoplazmaya geçmektedir (Cain ve diğ., 2002; Zhang ve diğ., 2004; Brenner ve Mark, 2009). Sitokrom c, apoptik proteaz aktifleştirici faktör 1'e (APAF1) bağlanarak APAF1'in yapısında değişikliğe neden olmaktadır. APAF1'in yapısında meydana gelen değişiklikler, APAF1'i diğer APAF1'lere ve kaspazlara bağlanabilir hala getirmektedir. APAF1'ler bir araya gelerek apoptozom adı verilen kompleksleri oluşturmaktadır (Acehan ve diğ., 2002). Apoptozomlar çok sayıda proenzim forumundaki kaspaz 9 (prokaspaz 9)'un bağlanıp aktifleşebileceği bölgeler içermektedir. Prokaspaz 9, apoptozama bağlanarak aktifleşmektedir. Aktifleşen kaspaz 9, cellat kaspazları aktifleştirerek infaz yolağının başlamasını sağlamaktadır (Şekil 2.8) (Elmore, 2007).

2.4.1.3. *İnfaz Yolağı*

Öncü kaspazlar tarafından aktifleştirilen cellat kaspazlar, infaz yolağını başlatmaktadır. Cellat kaspazlar, çeşitli endonukleazları ve proteazları aktifleştirerek hücredeki nukleik asitlerin ve proteinlerin parçalanmasını sağlamaktadır. Kaspaz 3 hücrede bulunan en önemli cellat kaspazdır. Kaspazla aktive edilen DNaz (KAED), apoptozu girmemiş bir hücrede inhibitörüne bağlı ve inaktif formda bulunmaktadır. Kaspaz 3, KAED inhibitöründen ayırarak aktifleşmesini sağlamaktadır. Aktifleşen KAED, nukleusdaki kromozomal DNA'yı parçalayarak kromatinin yoğunlaşmasına neden olmaktadır (Sakahira ve diğ., 1998). Kaspaz 3 apoptotik cisimlerin oluşmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca hücre iskeletinin parçalanmasına, hücre içi sinyal iletiminin ve hücre döngüsünün bozulmasına yol açmaktadır (Elmore, 2007).



Şekil 2.8: Kaspaza bağı apoptozun ekstrinsik ve intrinsik yolları.

2.4.2. Kaspazdan Bağımsız Apoptoz

Mitokondride bulunan bazı proteinler, kaspazları aktive etmeden de apoptozu başlatmaktadır. Evrimsel olarak korunmuş bir flavoprotein olan apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve G endonukleazı gibi proteinler, mitokondri membranının zarar görmesi sonucu veya intrinsik yolda olduğu gibi mitokondride özel bir por yapısı aracılığıyla stoplazmaya geçmektedir (Susin ve diğ., 1999). AIF ve G endonukleazı, nukleusa geçerek DNA'nın parçalanmasına neden olmaktadır (Zhang ve diğ., 2002; Cregan ve diğ., 2004; Tait ve Green, 2008).

Günümüzde farklı etki mekanizmalarına sahip çok sayıda fungusit aktif bileşenin *Fusarium* spp. üzerindeki etkili dozları araştırılarak ortaya konmuştur. Ancak bu bileşenlerin hücresel düzeyde yol açtıkları etkilerin gösterimi sınırlı kalmıştır. Gerçekleştirilen yüksek lisans tezinde fungusit aktif bileşeni olan protiokonazolün *F. graminearum* PH1 ve *F. culmorum* UK99 üzerindeki etkilerinin hücresel düzeydeki etkileri araştırılmış, mikotoksinlerden DON üretimi üzerine etkisi test edilerek halk sağlığının korunmasındaki rolü irdelenmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. *Fusarium* REFERANS SUŞLARININ ÜRETİMİ

Fungisit aktif bileşen etkisi Doç. Dr. Tapani Yli-Mattila (Turku Üniversitesi) ve Dr. Pierre Hellin'in (Louvain Katolik Üniversitesi) değerli katkıları ile İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonuna kazandırılan *F. graminearum* PH1 ve *F. culmorum* UK99 referans suşları üzerinde araştırıldı. Her iki referans suş örneklerine ait gliserol stokları sentetik nutrient agar (SNA) besi ortamı (Tablo 3.1) kullanılarak 25°C'de %50 nemde gündüz/gece (16/8 saat) döngülü büyütme kabininde 7 gün'de canlandırıldı. Suşlar, patates dekstroza agar (PDA) besi ortamında (Tablo 3.1) gündüz/gece (16/8 saat) döngülü büyütme kabininde 25°C'de % 50 nem varlığında 7 gün süre ile üretildi. Referans suşlar, spor morfolojisinin hücresel gösterimi için sentetik nutrient broth (SNB) ve czapek dox broth (CDB) besi ortamlarında, oksidatif stresin hücresel gösterimi için ise CDB besi ortamında 25°C'de 120 rpm hızda 7 gün süre ile üretildi.

Tablo 3.1: *Fusarium* suşlarının üretiminde kullanılan besi ortamları ve içerikleri.

Besi Ortamı	Bileşenler	Derişim (g/l)
Sentetik Nutrient Agar (SNA)	KH ₂ PO ₄	1
	KCl	0,5
	KNO ₃	1
	Glukoz	0,2
	Sukroz	0,2
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
	Agar	20
Sentetik Nutrient Broth (SNB)	KH ₂ PO ₄	1
	KCl	0,5
	KNO ₃	1
	Glukoz	0,2
	Sukroz	0,2
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Patates Dekstorz Agar (PDA)	Patates dekstroza özütü	15
	Agar	20
Czapek Dox Broth (CDB)	Sukroz	30
	KCl	0,5
	NaNO ₃	3
	Fe ₃ SO ₄	0,01
	K ₂ HPO ₄	1
	MgSO ₄	0,5

3.2. FUNGAL ÜREMEYİ İNHİBE EDEN PROTİKONAZOL DOZUNUN VE DOĞRUSAL BÜYÜME HIZININ BELİRLENMESİ

Saf protikonazol bileşiğinin (Sigma; 34232) *Fusarium* referans suşları üzerindeki minimum inhibitör konsantrasyonunu (MIK) belirlemek için farklı derişimlerde protikonazol içeren PDA besi ortamları (0,1-10 µg/ml) hazırlandı. Normalizasyon grubunu temsil eden kültürler, aktif bileşiğin çözündüğü derişimdeki çözgeni içeren besi ortamında (PDA) kültürlendi. Negatif kontrol ise sadece PDA besi ortamında kültürlenerek referans suşlarla kuruldu. Canlandırılıp zengin besi ortamında yukarıda anlatıldığı gibi üretilen kültürlerden 0,25 cm²'lik alandan miselyum örneği alındı ve deney grubu, normalizasyon grubu ve negatif kontrol gruplarının oluşturulması için ekim yapıldı. Kültürler 7 gün süre ile yukarıda belirtilen koşullarda inkübe edilerek fungal üreme sağlandı.

Protikonazolün *F. graminearum* PH1 ve *F. culmorum* UK99 referans suşlarında üremeyi durduran derişimi MIK değeri olarak kayıt edildi. MIK'ın %25 (IC₂₅) ve %50'si (IC₅₀) hesaplanarak bu derişimlerde protikonazol eklenmiş PDA'da, normalizasyon ve negatif kontrol grubunda üretilen kültürlerin 3., 5. ve 7. günlerinde radyal üreme çapları ölçüldü. Doğrusal büyüme hızlarını temsil eden ortalama değerler standart hataları ile birlikte hesaplandı. Deneyler üç biyolojik ve teknik tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.3. HÜCRESEL GÖSTERİM

3.3.1. Protikonazolün Spor Morfolojisine Etkisinin Işık Mikroskopunda İncelenmesi

Fusarium referans suşlarına ait IC₂₅, IC₅₀ deney grupları ile çözgen içeren normalizasyon kültürleri CDB sıvı besi ortamında negatif kontrol grubu ise SNB (Tablo 3.1) besi ortamında 25°C'de 120 rpm'de 7 sün süre ile kültürlendi. Miselyumların gazlı bez aracılığıyla tutulması ve sporları içeren süzütünün ayrılması sağlandı. Hücreler 13000 rpm'de 5 dk süre ile gerçekleştirilen santrifüjleme ile çöktürüldü. Hücre dışı kalıntılar 1,5 ml fosfat tamponu tuzu (PBS) (Tablo 3.2) ile iki kere yıkama işlemi ile uzaklaştırıldı. Hücreler 500 µl PBS'de % 4 paraformaldehid ve % 0,1 Triton X-100 ile 90 dk karanlıkta tutularak sabitlendi. Sabitleyici ajanlar 1,5 ml PBS ile yıkanarak (iki kere) uzaklaştırıldı. Sporlar 100 µl PBS'de süspanse edildikten sonra Olympus BX-53 ışık mikroskobu ile görüntülendi. Spor (100 adet) boy ve çapları "Olympus cellsens 1.9" programı yardımıyla ölçüldü.

3.3.2. Oksidatif Stresin Floresan Mikroskobu ile Hücresel Gösterimi

Fusarium referans suşlarının IC₂₅, IC₅₀ deney grupları ile kontrol ve normalizasyon kültürleri 10 ml CDB besi ortamında (Tablo 3.1) kuruldu ve 25°C’de 120 rpm hızdaki çalkalayıcı inkübatörde üretildi. Yedi günün ardından CDB’ye 10 µl (2,45 mg/ml) H₂DCFDA eklendikten sonra 25°C 120 rpm hızda 60 dk beklendi. Hücreler 13000 rpm’de 5 dk süre ile gerçekleştirilen santrifüjle çöktürüldü. Fazla boya 1,5 ml PBS (Tablo 3.2) ile iki kere yıkanarak uzaklaştırıldı. Görüntülemenin hemen öncesinde hücrelerin üzerine 100 µl PBS ve 100 µl glukoz (10 mM) eklendi. Protikonazolün hücrelerde meydana getirdiği oksidatif stres seviyeleri Carl Zeiss Axio Observer ters floresan mikroskobunda FITC filtresi (494/518 nm) ile yapılan inceleme sonucunda görüntülendi.

3.3.3. Apoptozun Floresan Mikroskobu ile Hücresel Gösterimi

Kontrol ve normalizasyon grupları ile IC₂₅, IC₅₀ derişimlerinde protikonazol eklenmiş PDA’da üretilen kültürler, 500 µl PBS ile ependorflara aktarıldı (Tablo 3.2). Elde edilen hücrelere % 4 paraformaldehid ve % 0,1 Triton X-100 eklendi. Hücreler karanlıkta oda sıcaklığında 90 dk süre ile inkübe edilerek sabitlendi. Sabitlenen hücreler, 13000 rpm’de 5 dk boyunca santrifüjlenerek çöktürüldü. Çökelti, ortamdaki hücre dışı kalıntıların ve sabitleyici ajanların uzaklaştırılması amacıyla 1,5 ml PBS ile iki kere yıkandı. Üzerine 100 µl PBS ve 5 µl at/etbr ikili boyası eklenerek (Tablo 2) oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Hücreler, fazla boyayı uzaklaştırmak amacıyla 1,5 ml PBS ile iki kere yıkandıktan sonra 100 µl PBS ile süspanse edildi. Protikonazolün apoptotik etkisi, ters floresan mikroskobunda GFP (At 502/526 nm, Etbr 510/595 nm) ve Texas RED (595/613 nm) filtreleri ile görüntülendi.

Tablo 3.2: Floresan görüntülemeye kullanılacak bileşenler ve derişimleri.

	Bileşenler	Derişim
Fosfat Taponu Tuzu	K ₂ HPO ₄	1,1 g/l
	KH ₂ PO ₄	0,32 g/l
	NaCl	8,5 g/l
At/EtBr	At	60 µg/ml
	EtBr	100 µg/ml

3.4. PROTEİN İZOLASYONU VE PROTEİN DERİŞİMİNİN BELİRLENMESİ

Deney, kontrol ve normalizasyon gruplarında üretilen suşların toplanan 0,5 gram miselyum örneği 0,1 M fosfat tamponu (0,1M Na₂HPO₄;0,1M NaH₂PO₄) eklenerek havanda homojenize edildi. Elde edilen homojenat, +4°C 15000 rpm’de 30 dk santrifüj edildi. Üst sıvı (ham özüt) protein derişiminin belirlenmesi, KAT ve SOD enzim aktivite tayinlerinde kullanıldı.

Protein derişimi, Lowry metodu kullanılarak belirlendi (Lowry ve diğ., 1951). 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 su ile 10 kat sulandırılmış 0,1 ml ham özüt ve 0,1 ml BSA üzerine 0,1 ml baz çözeltisi eklendi (Tablo 4). Normalizasyon 0,1 M fosfat tamponu ile yapıldı. 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 3.4). Karışım oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra üzerine 100 µl folin belirteci ilave edildi (Tablo 3.3). Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyonun ardından spektrofotometrede karışımın 550 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldü. “Microsoft Excel 2016” programı kullanılarak X ekseninde BSA derişimleri ve Y ekseninde ise BSA karışımlarının 550 nm’de ölçülen absorbans değerleri olacak şekilde bir standart grafiği ve bu grafiğin denklemi oluşturuldu. Grafiğin denklemi kullanılarak kontrol, normalizasyon ve deney gruplarının protein miktarları belirlendi.

Tablo 3.3: Protein derişiminin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler.

	Bileşenler	Derişim
Baz çözeltisi	NaOH	2N
A	Na ₂ CO ₃	%2 (w/v)
B	CuSO 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	%98 (v/v)
	B	%1 (v/v)
	C	%1 (v/v)
Folin Belirteci	Folin-Ciocalteu	1N

3.5. ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ

Çalışma kapsamında KAT ve SOD enzimlerinin aktivite değerleri ekstre edilen ham protein özütünde belirlendi.

3.5.1. KAT Aktivitesi Testi

KAT enzim aktivitesi H_2O_2 'nin derişiminin azalmasına bağlı olarak spektrofotometrik olarak 240 nm dalga boyunda okunan absorbans değerlerindeki değişim izlenerek belirlendi. Bu amaçla öncelikle 112,2 µl fosfat tamponu (50 mM; pH 7.2) ve 80 µl H_2O_2 (40 mM) içeren reaksiyon karışımı 30°C'de 2,5 dk inkübe edildi. Enzimatik reaksiyon, reaksiyon karışımına 6,8 µl ham özüt eklenerek başlatıldı. Enzim aktivitesi, 240 nm'de 2 dk boyunca absorbans ölçülerek belirlendi. KAT aktivitesi, 1 mg ham protein özütünün 240 nm dalga boyunda dakikada okunan toplam absorbans miktarı ($\Delta A_{240}/dk/mg$ protein) olarak ifade edildi.

3.5.2. SOD Aktivitesi Testi

Süperoksit radikali, nitroblue tetrazolium (NBT) ile reaksiyona girdiğinde renkli formazan kristallerini oluşturmaktadır. Reaksiyon ortamındaki SOD, süperoksit radikallerini uzaklaştırarak renkli formazan kristali oluşumunu engeller. SOD enzim aktivitesindeki değişim 560 nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin spektrofotometrik ölçümü ile belirlendi. SOD aktivitesini belirlemek için 3 µl ham özüt ve kör örnek (0,1 M fosfat tamponu) üzerine NBT içeren 197 µl substrat tamponu eklendi (Tablo 3.4). Karışım 15 dk boyunca 15 W floresan ışık altında bekletildikten sonra 560 nm'de absorbans ölçüldü. Tüm örnekler için % inhibisyon değeri, denklem (3.1)'den yararlanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon değeri} = \frac{\text{örnek absorbans değeri} \times 100}{\text{kör absorbans değeri}} \quad (3.1)$$

Tablo 3.4: SOD aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler.

	Bileşenler	Derişim
Substrat Tamponu	l-metionin	13 mM
	NBT	25 mM
	EDTA	0,1 mM
	Fosfat Tamponu	50 mM
	Riboflavin	2 µM

3.6. HÜCRE TOKSİSİTE TESTİ

WST-1 gibi tetrazolyum tuzları hücrede bulunan dehidrogenaz enzimleri ile suda çözünmeyen formazan kristallerine çevirilmektedir. Bu kristallerin miktarı, spektrofotometrik olarak

belirlenebilmektedir. Hücre sayısındaki değişim 450 nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin spektrofotometrik ölçümü ile belirlendi. IC₂₅, IC₅₀ dozlarında protiokonazol içeren PDA besi ortamında üretilen kültürlerden, kontrol ve normalizasyon gruplarından alınan 1cm²'lik kesitler 3 ml PBS'de (Tablo 3.2) çözdürüldükten sonra miselyum (100 µl) ve kör olarak kullanılacak 100 µl PBS üzerine 10 µl WST-1 eklenerek, 25°C 120 rpm'de 4 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 450 nm dalga boyunda spektral ölçüm alındı. Tüm örnekler için yüzde hücre canlılığı, denklem (3.2)'den yararlanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ hücre canlılığı} = \frac{\text{örnek absorbans değeri} \times 100}{\text{kontrol absorbans değeri}} \quad (3.2)$$

3.7. DON MİKOTOKSİN İZOLASYONU VE İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ

Protiokonazolün mikotoksin üretimi üzerindeki etkisi DON mikotoksini izole edilerek izlendi. Deney, kontrol ve normalizasyon gruplarında üretilen suşların toplanan 0,1 g miselyum örneği etil asetat (5 ml) ile homojenize edildi. Etil asetat 4°C'de 5000 xg'de 5 dk süre ile gerçekleştirilen santrifüj ile uzaklaştırıldı. Homojenat asetonitril (100 µl) ile süspanse edildi. İTK'de 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) ile birlikte 10 µl hacimde silika jele yüklendi ve 60 dk yürütüldü. Silika jel kurutuldu ve üzerine etanol:alüminyum klorür (99:1 (w/v)) karışımı sprey yardımıyla uygulandı. Silika jel plakaları 365 nm'de UV ışık altında incelendi. Örneklerin R_f (retention factor) değerleri denklem 3.3'den yararlanılarak hesaplandı.

$$R_f = \frac{\text{örneğin yürüdüğü mesafe}}{\text{hareketli fazın yürüdüğü mesafe}} \quad (3.3)$$

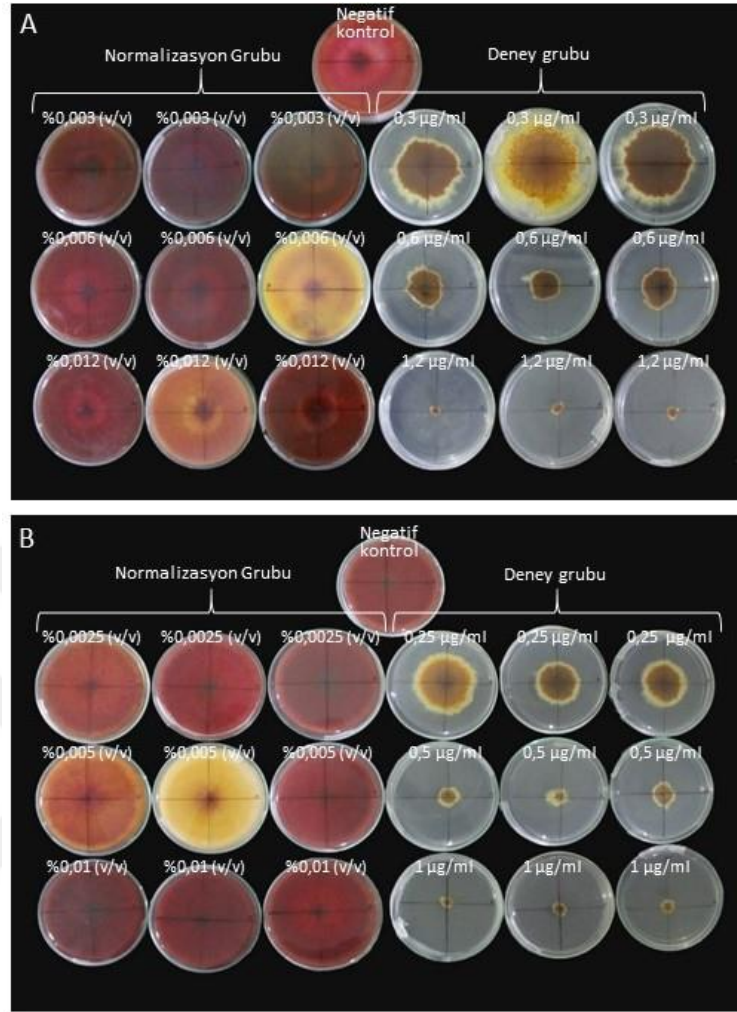
4. BULGULAR

4.1. FUNGAL ÜREMENİN İNHİBİSYONU VE DOĞRUSAL BÜYÜME HIZLARI İLE İLGİLİ BULGULAR

Protiokonazolün 0,1 µg/ml derişimi içeren PDA besi ortamındaki *F. graminearum* PH1 referansının kültürlerinde radyal üreme çapının ortalaması üçüncü günde 6,65 cm olarak ölçüldü. Beşinci günde çap ortalaması 9 cm değerine ulaştı. *F. culmorum* UK99 suşunda ise üçüncü günde ortalama değerin 7,7 cm olduğu ve beşinci günde yine 9 cm ortalama çap değerine ulaştığı kayıt altına alındı. Aktif bileşiğin bu derişiminin her iki referans suşun üremesi üzerinde etkisi olmadığı ortaya kondu. Bu değerler kontrol gruplarına ait ölçümlerle karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark olmadığı da gösterildi ($p>0,05$).

Besi ortamına eklenen 1 µg/ml derişimdeki protikonazolün, UK99 suşunun üremesini durdurduğu belirlendi. Protiokonazolün MIK değerlerinin UK99 referansı için 1 µg/ml olduğunu ortaya kondu. Bu derişimdeki aktif maddenin 7. günde PH1'in üremesini durdurmadığı, ancak üremeyi negatif kontrole göre % 80 oranında azalttığı belirlendi ($p<0,001$). PH1 suşunda üremeyi tamamen durduran protikonazol derişiminin ise 1,2 µg/ml olduğu denemelerle saptandı. Sonuç olarak protikonazolün MIK değerlerinin PH1 için 1,2 µg/ml olduğu ortaya kondu (Şekil 4.1).

Protiokonazolün IC_{25} ve IC_{50} değerleri PH1 için sırasıyla 0,3 µg/ml ve 0,6 µg/ml; UK99 için ise sırasıyla 0,25 µg/ml ve 0,5 µg/ml olarak hesaplandı. Aktif bileşiğin belirlenen derişimlerini içeren deney grupları ve aktif bileşiğin çözücüsünün bulunduğu normalizasyon grubunu temsil eden besi ortamında üretildiklerinde (PH1 için Şekil 4.1 A, UK99 için Şekil 4.1 B) ölçülen radyal üreme çapları (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2) MIK; IC_{25} ve IC_{50} dozlarının doğru dozlar olduğunu teyid etti.



Şekil 4.1: A) *F. graminearum* PH1 ve B) *F. culmorum* UK99 referans suşlarının kontrol, normalizasyon ve deney gruplarına ait 7 günlük kültürlerdeki üreme durumları.

Her iki referansın aktif madde uygulanmamış PDA besi ortamı kullanılarak hazırlanan kültürlerinde radyal üreme çapının beşinci günde 9 cm çapına ulaştığı, üçüncü günde PH1 referansının 7 cm, UK99'un ise 8 cm çapa sahip olduğu gözlemlendi (Tablo 4.1). Protiokonazol uygulamasının üremeyi azalttığı, aktif bileşik derişiminin artışı ile referansların radyal üreme çaplarında azalmanın olduğu ortaya kondu. Aktif bileşiğin IC₂₅ ve IC₅₀ derişimlerini içeren PDA besi ortamındaki radyal üreme çaplarının ortalamaları kontrol grubununkiler ile birlikte standart hata değerleri ile Tablo 4.1'de verildi. PH1 referansı IC₂₅ değerindeki protiokonazol varlığında üçüncü günde ortalama 4,75 cm, beşinci günde 6,7 cm ve yedinci günde de ancak 6,93 cm radyal üreme çapına ulaştı. IC₅₀ değerindeki protiokonazol varlığında radyal üreme üçüncü günde ortalama 2,6 cm, beşinci günde de 2,83 cm ve yedinci günde de 3,15 cm olarak

belirlendi. UK99 referansı IC₂₅ protiokonazol varlığında üçüncü günde 3,53 cm, beşinci günde 3,7 cm ve yedinci günde 4,6 cm radyal üreme çapına sahip iken, IC₅₀ protiokonazolde üçüncü günde 1,85 cm, beşinci günde de 2 cm ve yedinci günde 2,2 cm radyal çap değerlerini verdi. Protiokonazolün yedi günlük kültürlerinde kontrol grubu çap değerleri arasında fark olmayan (p>0,05) referanslardan UK99'da üremeyi daha fazla inhibe ettiği, sonuç itibarı ile aktif bileşiğin *F. culmorum* türünü *F. graminearum* türünden daha fazla etkilediği ortaya kondu.

Tablo 4.1: *F. graminearum* PH1 ve *F. culmorum* UK99 referans ırklarının kontrol (NK) grubunda ve MİK, IC₂₅ ve IC₅₀ dozlarında protiokonazol eklenmiş deney gruplarının 3, 5 ve 7 günlük kültürlerinde ölçülen radyal üreme çaplarının ortalamaları ve standart hata (SH) değerleri.

Tür	Suş	Grup	Derişim (µg/ml)	̄ Radyal Üreme Çapı ± SH (cm)		
				3. gün	5. gün	7. gün
<i>F. graminearum</i>	PH1	NK	-	7,00±0,20	9,00±0,00	9,00±0,00
		IC ₂₅	0,30	4,75±0,08	6,7±0,33	6,93±0,45
		IC ₅₀	0,60	2,60±0,23	2,83±0,18	3,15±0,20
		MİK	1,20	-	-	-
<i>F. culmorum</i>	UK99	NK	-	8,00±0,12	9,00±0,00	9,00±0,00
		IC ₂₅	0,25	3,53±0,29	3,70±0,28	4,60±0,28
		IC ₅₀	0,50	1,85±0,04	2,00±0,06	2,20±0,04
		MİK	1,00	-	-	-

Tez çalışması kapsamında protiokonazolün IC₂₅, IC₅₀ ve MİK'lerinin hazırlanmasında kullanılan aktif bileşiğin organik çözücüsünün referanslar üzerindeki etkisinin de araştırıldığı denemeler gerçekleştirildi. Yapılan hesaplamalar PH1 referansı için protiokonazolün sırasıyla % 0,003, % 0,006, % 0,012 (v/v) aseton kullanılarak; UK99 için de % 0,0025, % 0,005 ve % 0,01 (v/v) aseton kullanılarak çözüldüğünü ortaya koydu. Her iki referansın bu oranlarda çözücü içeren PDA besi ortamlarındaki 3, 5 ve 7 günlük kültürlerde ölçülen radyal üreme çaplarının ortalama değerleri ve hesaplanan standart hataları Tablo 4.2'de verildi.

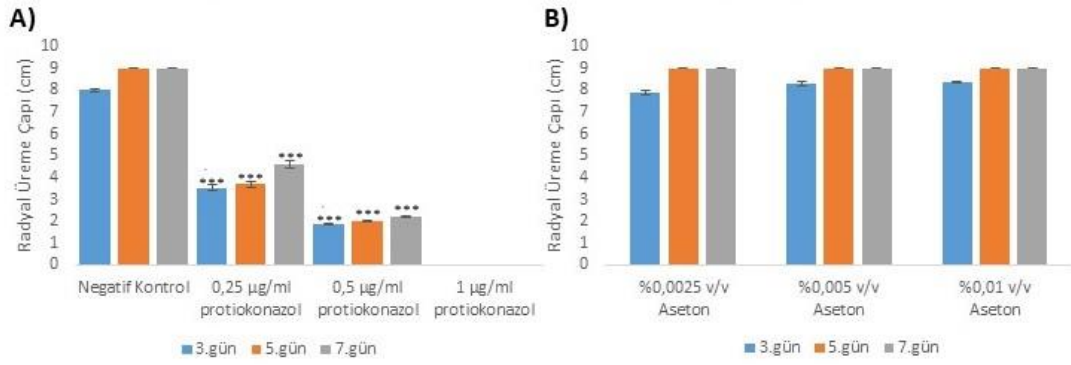
Tablo 4.2: Protiokonazolün IC₂₅, IC₅₀ ve MİK dozlarını çözmede kullanılan aseton (v/v) içeren normalizasyon grubu için hazırlanan besi ortamında üretilen *Fusarium* suşlarından 3., 5. ve 7. günde ölçülen radyal üreme çaplarının ortalamaları ve standart hata (SH) değerleri.

Suş	Grup	Derişim (%; v/v)	Radyal Üreme Çapı ± SH (cm)		
			3. gün	5. gün	7. gün
PH1	IC ₂₅	0,0030	6,45±0,21	9±0,00	9±0,00
	IC ₅₀	0,0060	7,00±0,09	9±0,00	9±0,00
	MİK	0,0120	6,45±0,09	9±0,00	9±0,00
UK99	IC ₂₅	0,0025	7,90±0,20	9±0,00	9±0,00
	IC ₅₀	0,0050	8,30±0,23	9±0,00	9±0,00
	MİK	0,0100	8,35±0,04	9±0,00	9±0,00

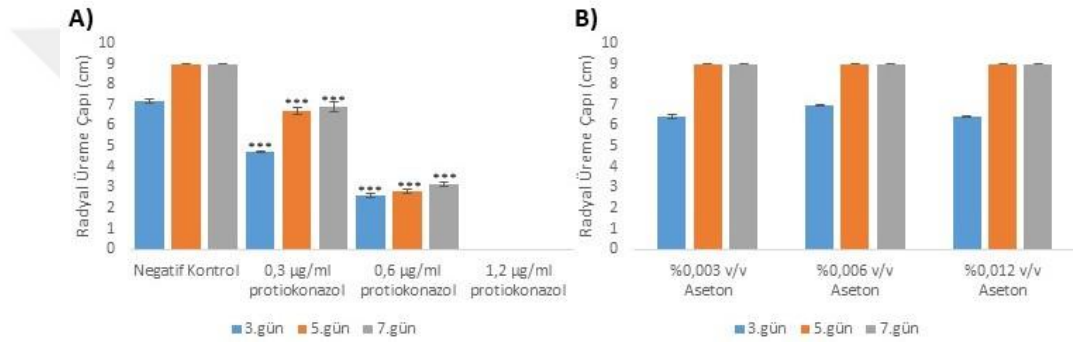
Gerçekleştirilen tüm denemelerde PH1 referansı için aktif bileşiğin, uygulanan IC₅₀ dozunun çözülmesinde kullanılan % 0,006 aseton derişimini, UK99 referansı için de % 0,005 aseton derişimini içeren deneme grupları çalışmanın normalizasyon grubunu temsil etti.

Veriler tek yönlü ANOVA testi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde hem PH1 (Şekil 4.2 A) hem de UK99 (Şekil 4.3 A) referanslarının deney gruplarındaki radyal üreme çaplarındaki azalışın kontrole göre ve ayrıca IC₂₅ ve IC₅₀ dozları arasındaki çap farkının anlamlı ($p < 0,001$) olduğunu da ortaya koydu. İstatistiksel analiz aynı zamanda IC₂₅, IC₅₀ ve MİK dozlarındaki protiokonazolü çözmek için kullanılan aseton derişimlerinin negatif kontrol grubuna göre hem PH1 (Şekil 4.2 B) hem de UK99 (Şekil 4.3 B) referanslarında radyal üreme çapını etkilemediği üç günde belirlenen ortalama çap değerleri arasındaki farkın da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p > 0,05$) gözlemlendi.

Aseton organik çözücüsünün hesaplanan oranlarda besi ortamına eklenmesi durumunda her iki referansın üremesi üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmadığı ortaya kondu. Bulgular protiokonazol çözgeninin fitopatojenin büyümesini etkilemediği gösterilirken, aktif bileşiğin *Fusarium* türlerinde büyüme inhibitörü etkisini ortaya koydu.



Şekil 4.2: *F graminearum* PH1 referansının kontrol, deney (A) ve normalizasyon gruplarının (B) 3, 5 ve 7 günlük kültürlerinde belirlenen radyal üreme çap değişimlerinin grafik gösterimi.

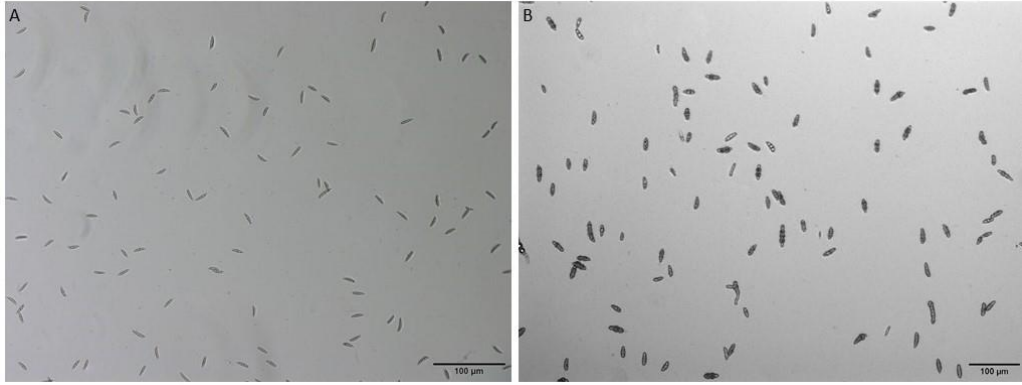


Şekil 4.3: *F culmorum* UK99 referansının kontrol, deney (A) ve normalizasyon gruplarının (B) 3, 5 ve 7 günlük kültürlerinde belirlenen radyal üreme çap değişimlerinin grafik gösterimi.

4.2. PROTİOKONAZOL ETKİSİNİN HÜCRESEL DÜZEYDE GÖSTERİMİ

4.2.1. Spor Morfolojisine Etkisinin Mikroskopik Gösterimi

Fusarium referans suşlarına ait IC₂₅, IC₅₀ deney grupları ile çözgen içeren normalizasyon kültürlerinin spor üretimi teşvik edildikten sonra ışık mikroskopunda yapılan gözlemler; PH1'in CDB besi ortamı kullanılarak hazırlanan hem deney hem de normalizasyon gruplarında spor üretmediği; UK99 referansının ise normalizasyon grubunda spor üretmediği, deney gruplarından ise sadece IC₅₀ dozunda protioikonazol içeren bu besi ortamında ürettiği ortaya koydu (Şekil 4.4). SNB besi ortamı kullanılarak kurulan kültürlerden elde edilen makrokonid sporlar kontrol grubu spor yapılarının görüntülenmesinde kullanıldı (bkz. 3.3.1). UK99'un IC₂₅ dozunun bu türde sporulasyonu engellediği, kullanılan IC₅₀ dozunda ise makrokonid spor yapılarının üretildiği ancak spor morfolojilerinde değişime neden olduğu saptandı.



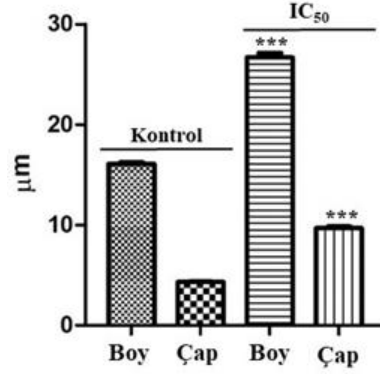
Şekil 4.4: *F. culmorum* UK99 referans suşunun; A) SNB besi ortamında ürettiği makrokonid spor yapılarının, B) protikonazolün IC₅₀ dozu uygulanmış CDB besi ortamında ürettiği makrokonid spor yapılarının ışık mikroskobu altında 10 X büyütme ile görüntüleri.

Görüntü alanı içerisinde rastgele seçilen 100 spora ait uzunluk ve çap değerleri ölçülüp ortalamaları hesaplandı. UK99'un kontrol spor boyunun 16,07 µm, çapının ise 4,33 µm olduğu, IC₅₀ doz uygulamasında ise spor boyunun 26,68 µm, çapının da 9,67 µm olduğu belirlendi. Protikonazol etkisi ile spor boylarında uzama, çaplarında ise genişleme meydana geldiği ortaya kondu. Spor boyları ve çaplarına ait ortalama değerler standart hataları ile birlikte Tablo 4.3'te verildi.

Tablo 4.3: SNB besi ortamı (kontrol) ve IC₅₀ dozunda protikonazol içeren CDB besi ortamında üretilen *F. culmorum* UK99 referansının makrokonid sporlarının ölçülen boy ve çaplarına ait ortalama değerleri (SH: standart hata).

Tür	Suş	Uygulama	Boy ± SH (µm)	Çap ± SH (µm)
<i>F. culmorum</i>	UK99	Kontrol (SNB)	16,07 ± 0,16	4,33 ± 0,036
		0,5 µg/ml protikonazol	26,68 ± 0,45	9,67 ± 0,16

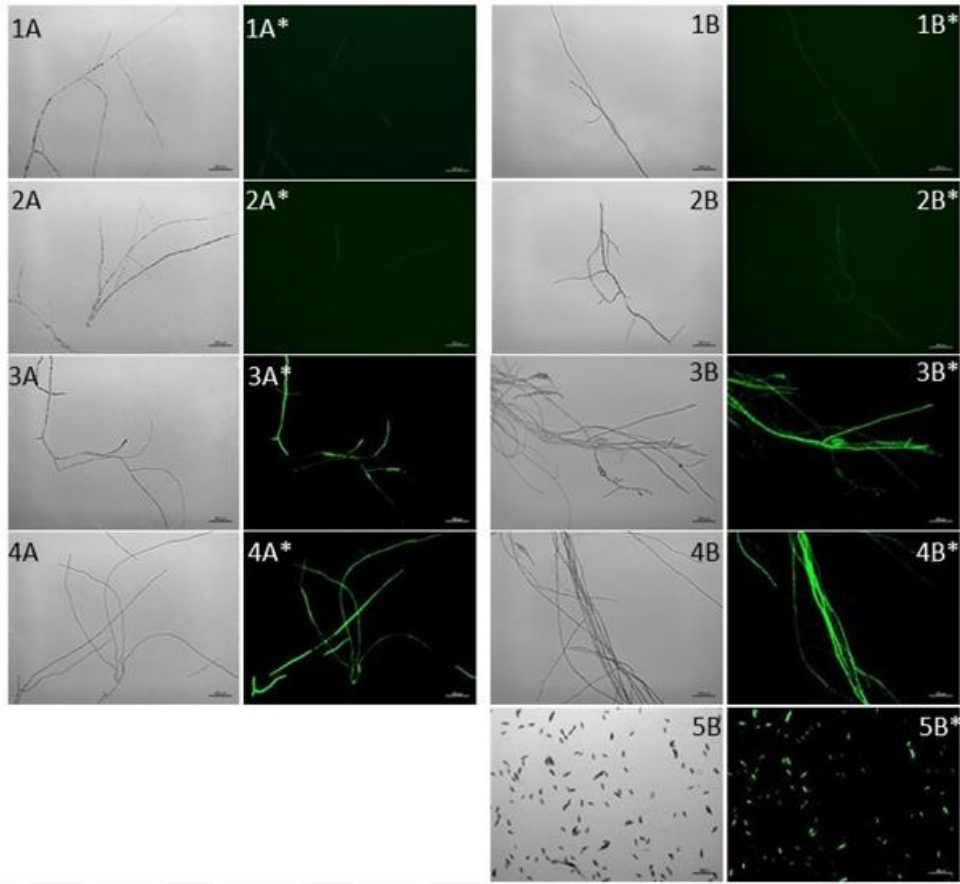
IC₅₀ dozundaki protikonazolün, UK99 referansının ürettiği makrokonid spor yapılarının uzunlukları ve çaplarında, kontrol grubu (SNB besi ortamında kültürlen) sporlarına göre, sırasıyla % 66 ve % 123 oranında artışa neden olduğu saptandı. Protikonazol konsantrasyonu etkisiyle UK99'un spor boyu ve çapındaki artışın, t testi analizi ile istatistiksel olarak anlamlı olduğu (p<0,001) da gösterildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: SNB besi ortamı (kontrol) ve IC₅₀ dozunda protikonazol içeren CDB besi ortamındaki *F. culmorum* UK99 kültürlerinin ürettiği makrokonid sporlarına ait boy ve çap ölçümlerinin ortalama değerlerinin istatistiksel analizinin grafikte gösterimi.

4.2.2. Oksidatif Stresin Hücresel Gösterimi

H₂DCFDA boyası oksidatif stres altındaki hücrenin, floresan mikroskopunda parlak yeşil ışımaya yapması aracılığıyla görüntülenmesini sağlamaktadır. Floresan ışımaya miktarı da oksidatif stres düzeyi artışı ile artmakta ve renk daha parlak gözlenmektedir. Gerçekleştirilen çalışmada her iki referansın normalizasyon ve negatif kontrol gruplarından toplanan miselyumların H₂DCFDA boyası ile muamelesinin ardından soluk yeşil ışımaya yapması, sadece deney gruplarından elde edilen parlak yeşil ışımaya aktif bileşiğin hücrelerde oksidatif strese yol açarak etkili olduğunu ortaya koydu (Şekil 4.6). Hem PH1 hem de UK99'da IC₅₀ dozu uygulamasındaki ışımaya miktarının IC₂₅'den fazla gözlenmesi artan aktif bileşik dozunun artan oksidatif stresle sonuçlandığının hücresel düzeyde göstergesidir.

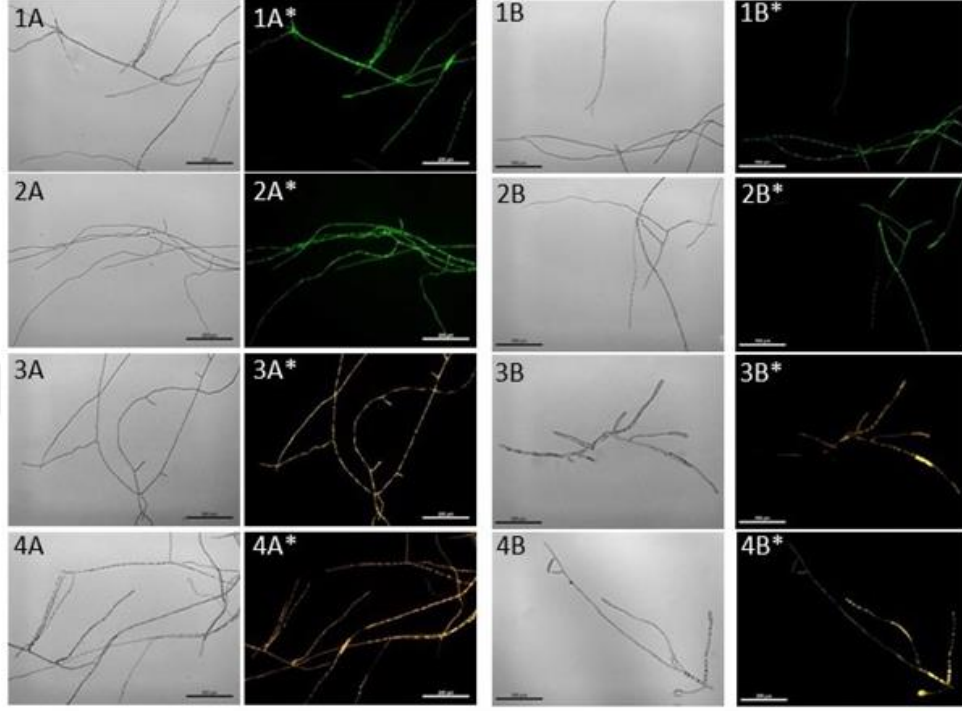


Şekil 4.6: (1) Kontrol ve (2) normalizasyon grupları ile birlikte, (3) IC_{25} ve (4) IC_{50} protiokonazol dozuna maruz kalan PH1 (A) ve UK99 (B) referans suşlarına ait miselyumların ve IC_{50} protiokonazol dozuna maruz kalan UK99 referansı tarafından üretilen makrokonid sporların H_2DCFDA boyaması sonucu ışık mikroskobunda sporların 10X ve hiflerin 20X büyütme objektifi ile gerçekleştirilen inceleme görüntüleri ve floresan mikroskobunda* FITC filtresi (494/518 nm) ile alınan floresan ışımaya görüntüleri.

4.2.3. Apoptozun Hücresel Gösterimi

At/etbr boyası apoptoz sürecine giden hücrenin floresan mikroskobu incelemelerinde turuncu renkte ışımaya yaparak ayırt edilmesini sağlamaktadır. Çalışma kapsamında protiokonazolün IC_{25} ve IC_{50} dozlarına maruz kalan hücrelerin at/etbr boyama yönteminden sonra floresan mikroskobu incelemesinde turuncu renk ışımaya yaptığı gözlemlendi (Şekil 4.7). Her iki protiokonazol dozunun (IC_{25} ve IC_{50}) da apoptotik süreci tetiklediği ortaya kondu. Normalizasyon grubundaki sadece aseton etkisinde bırakılmış hücrelerde ve kontrol grubunda apoptoz yolağının etkinleşmediği yeşil ışımaya yayımlamaları ile saptandı. Sonuç olarak

protiokonazol aktif bileşiminin hücreleri apoptotik sürece götürerek etkili olduğu hücresel düzeyde gösterildi.



Şekil 4.7: (1) Kontrol ve (2) normalizasyon grupları ile birlikte, (3) IC₂₅ ve (4) IC₅₀ protiokonazol dozuna maruz kalan PH1 (A) ve UK99 (B) referans suşlarına ait miselyumların at/etbr boyaması sonucu ışık mikroskobunda 20X büyütme objektifi ile gerçekleştirilen inceleme görüntüleri ve floresan mikroskobunda* GFP (At 502/526 nm, EtBr 510/595 nm) ve Texas RED (595/613 nm) filtreleri ile alınan floresan ışıma görüntüleri.

4.3. PROTİOKONAZOLÜN ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTE DEĞİŞİMLERİNE ETKİSİ İLE İLGİLİ BULGULAR

4.3.1. KAT Enzim Aktivite Bulguları

Kontrol, normalizasyon ve deney gruplarında 7 gün boyunca üretilmiş kültürlerdeki KAT enzim aktiviteleri 3.5.1'deki yöntemle göre belirlenerek üç biyolojik tekrardan elde edilen verilerin ortalama değerleri ve standart hataları hesaplanarak Tablo 4.4'de özetlendi. PH1 referansının PDA ve % 0,006 aseton içeren besi ortamındaki kültürlerinde KAT aktiviteleri sırasıyla $3,10 \pm 0,19$ ve $3,13 \pm 0,27$ $\Delta A_{240}/dk/mg$ protein olarak hesaplandı. 0,3 ve 0,6 $\mu g/ml$ protiokonazol (IC₂₅ ve IC₅₀) uygulanan kültürlerde ise aktiviteleri sırasıyla $6,38 \pm 0,22$ ve $11,73 \pm 0,63$ $\Delta A_{240}/dk/mg$ protein olarak bulundu.

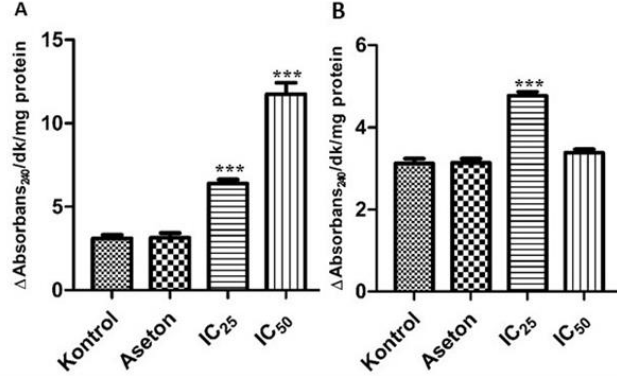
UK99 referansı için enzim aktiviteleri kontrol ve normalizasyon (% 0,005 aseton uygulanmış) gruplarına ait kültürlerle birlikte 0,25 ve 0,5 µg/ml protiokonazol uygulanmış kültürlerde sırasıyla 3,12±0,10; 3,13±0,09; 4,77±0,085 ve 3,38±0,072 ΔA₂₄₀/dk/mg protein idi.

Tablo 4.4: Kontrol, normalizasyon ve deney gruplarında 7 gün süre ile kültürlenmiş PH1 ve UK99 referanslarından belirlenen KAT enzim aktivitelerinin (ΔA₂₄₀ /dk/mg protein) ortalama değerleri (SH: standart hata).

Tür	Suş	Uygulama	Enzim Aktivitesi ± SH
<i>F. graminearum</i>	PH1	Negatif Kontrol	3,10 ± 0,19
		% 0,006 Aseton	3,13 ± 0,27
		0,3 µg/ml	6,38 ± 0,22
		0,6 µg/ml	11,73 ± 0,63
<i>F. culmorum</i>	UK99	Negatif Kontrol	3,12 ± 0,10
		% 0,005 Aseton	3,13 ± 0,09
		0,25 µg/ml	4,77 ± 0,085
		0,5 µg/ml	3,38 ± 0,072

F. graminearum PH1 referansında protiokonazol konsantrasyon artışına paralel olarak KAT aktivitesinde artış olduğu belirlendi. Kontrol grubuna göre IC₂₅ ve IC₅₀ dozlarında sırasıyla %105 ve %278 oranında artışın gerçekleştiği saptandı. En yüksek KAT aktivitesine IC₅₀ dozunda ulaşıldı. Tek yönlü ANOVA ile deney gruplarındaki katalaz aktivitesindeki artışın kontrole göre anlamlı olduğu ayrıca IC₂₅ ve IC₅₀ dozları arasındaki aktivite farkının da anlamlı olduğu belirlendi (p<0,001). Kontrol ile normalizasyon grupları arasındaki enzim aktivitesi farkı istatistiksel olarak anlamlı (p>0,05) bulunmadı. Uygulamalar ile enzim aktiviteleri arasındaki ilişki grafik halinde Şekil 4.8 A’da gösterildi.

F. culmorum UK99 referansında da protiokonazol KAT aktivitesinde artışa neden oldu. En yüksek enzim aktivitesine IC₂₅ dozunda ulaşıldı. IC₂₅ ve IC₅₀ dozlarındaki enzim aktivitesi değişim oranının kontrole göre sırasıyla %52 ve %8 olduğu belirlendi. Tek yönlü ANOVA kontrol grubuna göre IC₂₅ dozundaki KAT aktivitesi artışının anlamlı olduğunu ortaya koydu (p<0,001). Kontrol, normalizasyon ve IC₅₀ deney grupları arasındaki enzim aktivite farkının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (p>0,05) saptandı. Uygulamalar ile enzim aktivite değişimleri arasındaki ilişki Şekil 4.8 B’de grafikte gösterildi. Sonuç olarak aktif bileşiğin hücrelerde neden olduğu oksidatif stres etkisi, antioksidan enzimlerden KAT aktivitesi değişimleri ortaya konarak gösterildi.



Şekil 4.8: A) *F. graminearum* PH1 B) *F. culmorum* UK99 referans suşlarının kontrol, normalizasyon ve deney gruplarının 7 günlük kültürlerinden belirlenen KAT aktivitesi değişimlerinin grafikte gösterimi.

4.3.2. SOD Aktivite Bulguları

Kontrol, normalizasyon ve deney gruplarında 7 gün boyunca üretilmiş kültürlerdeki SOD aktiviteleri 3.5.2'deki'deki yöntemle göre belirlenerek üç biyolojik tekrardan elde edilen verilerin ortalama değerleri ve standart hataları hesaplanarak Tablo 4.5'te özetlendi. PH1 referansının PDA ve % 0,006 aseton içeren besi ortamındaki kültürlerinde % inhibisyon değerleri sırasıyla $8,42 \pm 0,17$ ve $8,4 \pm 0,14$ olarak hesaplandı. 0,3 ve 0,6 µg/ml protiokonazol (IC₂₅ ve IC₅₀) uygulanan kültürlerde ise sırasıyla $12,47 \pm 0,21$ ve $17,15 \pm 0,18$ olarak bulundu.

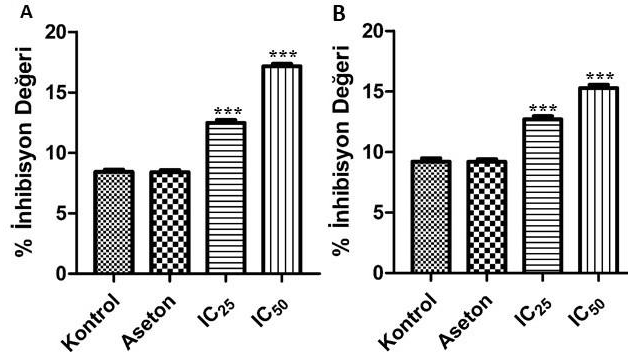
UK99 referansı için % inhibisyon değeri kontrol ve normalizasyon (% 0,005 aseton uygulanmış) gruplarına ait kültürlerle birlikte 0,25 ve 0,5 µg/ml protiokonazol uygulanmış kültürlerde sırasıyla $9,20 \pm 0,25$; $9,19 \pm 0,19$; $12,70 \pm 0,22$ ve $16,96 \pm 0,26$ olarak hesaplandı. Her iki referans suşta en yüksek % inhibisyon değerleri protiokonazolün IC₅₀ dozunun kullanıldığı kültürlerden elde edildi.

Tablo 4.5: Kontrol, normalizasyon ve deney gruplarında 7 gün süre ile kültürlenmiş *F. graminearum* PH1 ve *F. culmorum* UK99 referanslarından belirlenen SOD enzim aktivitesini ifade eden % inhibisyon değerleri (SH: standart hata).

Tür	Suş	Uygulama	% İnhibisyon±SH
<i>F. graminearum</i>	PH1	Negatif Kontrol	8,42 ± 0,17
		% 0,006 Aseton	8,40 ± 0,14
		0,3 µg/ml	12,47 ± 0,21
		0,6 µg/ml	17,15 ± 0,18
<i>F. culmorum</i>	UK99	Negatif Kontrol	9,20 ± 0,25
		% 0,005 Aseton	9,19± 0,19
		0,25 µg/ml	12,70 ± 0,22
		0,5 µg/ml	16,96 ± 0,26

F. graminearum PH1 referansında protiokonazol konsantrasyonu arttıkça SOD enzim aktivitesinde de artış olduğu, kontrole göre IC₂₅ dozunun %48 ve IC₅₀ dozunun da %103 oranında artışa neden olduğu saptandı. En yüksek SOD aktivitesine IC₅₀ deney grubunda ulaşıldı. Tek yönlü ANOVA ile deney gruplarının SOD aktivitesindeki artışın ve IC₂₅ ile IC₅₀ arasındaki SOD aktivite farkının anlamlı ($p < 0,001$) olduğu ortaya kondu. Kontrol ve normalizasyon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p > 0,05$) bir fark bulunmadı. Uygulamalar ile enzim aktivite değişimleri arasındaki ilişki Şekil 4.9 A’da grafiklerle gösterildi.

F. culmorum UK99 referansında da artan protiokonazol konsantrasyonunun SOD aktivitesinde artışa yol açtığı, kontrole göre IC₂₅ dozunda %38 IC₅₀ dozunda da %84 oranında artış olduğu belirlendi. En yüksek SOD aktivitesine IC₅₀ dozunda ulaşıldı. Deney gruplarındaki SOD aktivitesi artışının ve IC₂₅ ile IC₅₀ arasındaki SOD aktivite farkının tek yönlü ANOVA ile anlamlı ($p < 0,001$) olduğu gösterildi. Kontrol ve normalizasyon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p > 0,05$) bir fark bulunamadı. Uygulamalar ile enzim aktivite değişimleri arasındaki ilişki Şekil 4.9 B’de grafiklerle gösterildi. Sonuç olarak aktif bileşiğin hücrelerde neden olduğu oksidatif stres etkisi, antioksidan enzimlerden SOD aktivitesi % inhibisyon değerleri ortaya konarak gösterildi.



Şekil 4.9: A) *F. graminearum* PH1 B) *F. culmorum* UK99 referans suşlarının kontrol, normalizasyon ve deney gruplarının 7 günlük kültürlerinden belirlenen SOD aktivitesi % inhibisyon değerlerinin grafiklerle gösterimi.

4.4. HÜCRE TOKSİSİTE TESTİ

Kontrol, normalizasyon ve deney gruplarından alınan miselyumların WST-1 toksisite testi 3.6'daki yönteme göre üç biyolojik tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi ve elde edilen verilerin ortalama değerleri standart hatalarıyla birlikte tablo 4.6'da sunuldu.

PH1 suşunun PDA besi ortamı ve % 0,006 aseton içeren PDA'daki kültürlerinde hücre canlılığı sırasıyla %100±2 ve %98,88±1,74; 0,3 ve 0,6 µg/ml protikonazol dozları uygulanan (IC₂₅ ve IC₅₀) kültürlerde ise sırasıyla %59,8±1 ve %46±0,83 olarak bulundu.

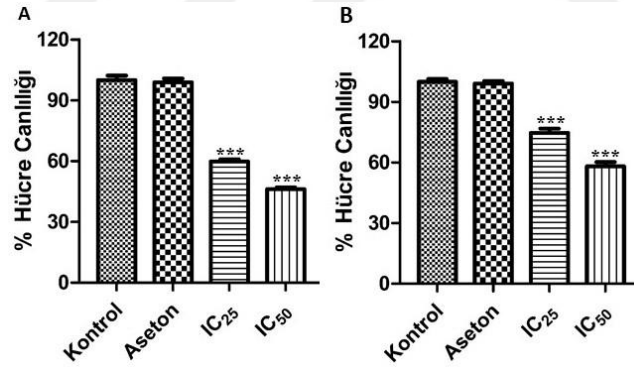
UK99 referansı için ise % hücre canlılık değerleri kontrol grubu için %100±1,17; % 0,005 aseton uygulanmış kültürler için %99,12±1,01; 0,25 µg/ml (IC₂₅) %74,67±1,99 ve 0,5 µg/ml (IC₅₀) protikonazol varlığında ise %58,07±2 olarak hesaplandı.

Tablo 4.6: Protikonazolün ve çözgeninin *F. graminearum* PH1 ve *F. culmorum* UK99 referans suşlarının % hücre canlılığı üzerindeki etkisi (SH: standart hata).

Tür	Suş	Uygulama	% Hücre Canlılığı ±SH
<i>F. graminearum</i>	PH1	Negatif Kontrol	100 ± 2
		% 0,006 Aseton	98,88 ± 1,74
		0,3 µg/ml	59,8 ± 1
		0,6 µg/ml	46 ± 0,83
<i>F. culmorum</i>	UK99	Negatif Kontrol	100 ± 1,17
		% 0,005 Aseton	99,12 ± 1,14
		0,25 µg/ml	74,67 ± 1,99
		0,5 µg/ml	58,07 ± 2

Artan protikonazol konsantrasyonunun PH1 referansında canlı hücre sayısında azalmaya neden olduğu gösterildi. Canlı hücre sayısının IC₂₅ ve IC₅₀ dozlarında kontrole göre sırasıyla %40,2 ve %53,82 oranında azaldığı, en düşük canlı hücre sayısının IC₅₀ protikonazol dozu uygulanan grubunda belirlendi. Tek yönlü ANOVA testine göre IC₂₅ ve IC₅₀ dozlarındaki canlı hücre sayısındaki azalışın ve IC₂₅ ile IC₅₀ arasındaki canlı hücre sayısı farkının anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,001$). Kontrol ve normalizasyon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p > 0,05$). Kontrol, normalizasyon ve deney grupları ile canlı hücre sayısı değişimi şekil 4.10 A'daki grafikte gösterildi.

Uygulanan aktif bileşik konsantrasyonu arttıkça UK99 referansında canlı hücre sayısında kontrole göre IC₂₅ ve IC₅₀ dozlarında sırasıyla %25,33 ve %41,93 oranında azalma gözlemlendi. En düşük canlı hücre sayısı, IC₅₀ dozunda belirlendi. Deney gruplarındaki canlı hücre sayısındaki azalışın ve IC₂₅ ile IC₅₀ dozları arasındaki canlı hücre sayısı değişiminin anlamlı olduğu ($p < 0,001$) tek yönlü ANOVA testi ile gösterildi. Kontrol ve normalizasyon grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ($p > 0,05$). Kontrol, normalizasyon ve deney grupları ile canlı hücre sayısı değişimi şekil 4.10 B'deki grafikte gösterildi.



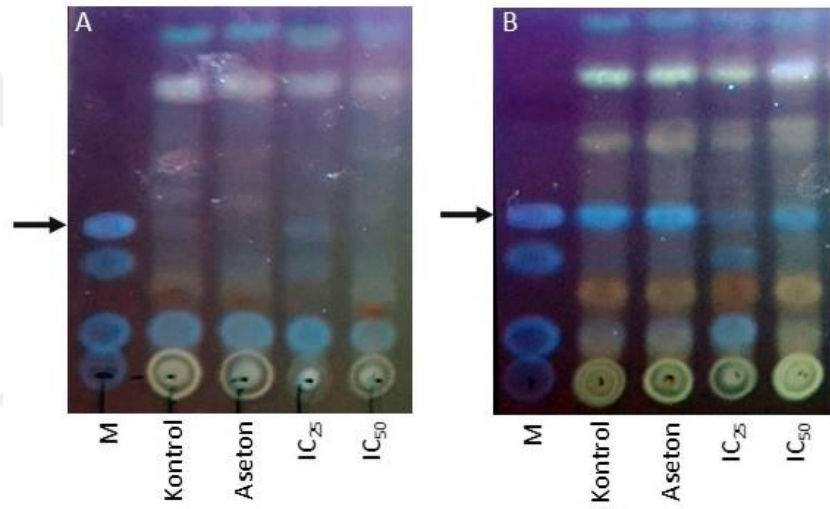
Şekil 4.10: A) PH1'in kontrol, normalizasyon ve deney gruplarındaki % hücre canlılığı B) UK99'un kontrol, normalizasyon ve deney gruplarındaki % hücre canlılığı.

4.5. PROTİOKONAZOLÜN DON ÜRETİMİNE ETKİSİ İLE İLGİLİ BULGULAR

ITK'de ticari DON mikotoksini Rf değerinin 0,28 olduğu belirlendi. *F. graminearum* PH1 referansının; kontrol, normalizasyon ve deney gruplarından edilen mikotoksin ekstresinde 0,28 Rf değerli bir spotun gözlenmemesi, PH1'in DON mikotoksinini üretmediğini ve/veya ITK'de belirlenebilecek kadar üretmediğini ortaya koydu (Şekil 4.11). Protikonazolün mikotoksin

üretimine etkisinin değerlendirilmesinde PH1 referans suşundan kullanışlı veriler elde edilmedi.

F. culmorum UK99 suşunun ürettiği DON mikotoksini; kontrol, normalizasyon ve deney gruplarında gözlenen 0,28 Rf değerine sahip spot ile ortaya kondu. Bu referans suşun kontrol ve normalizasyon gruplarına ait DON spotlarının parlaklığı arasında fark görülmedi. Ancak deney gruplarında parlaklığın azaldığı saptandı. IC₂₅ dozundaki spotun parlaklığın IC₅₀ dozuna göre daha az olduğu görüldü. Sonuç olarak protikonazolün *F. culmorum* türünde B-trikotesen mikotoksinlerinden DON'un üretimini inhibe etme potansiyeli bulunduğu belirlendi.



Şekil 4.11: A) *F. graminearum* PH1 B) *F. culmorum* UK99 referanslarının kontrol, normalizasyon ve deney gruplarından elde edilen mikotoksin ekstratlarının 356 nm UV ışık altındaki ITK plaka görüntüleri (ok işareti 0,28 Rf değerindeki DON spotunu göstermektedir).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yurdumuzda küçük taneli tahıllarda, süs bitkilerinde, çeşitli meyve ve sebzelerle FBY ve kök ve kök boğazı çürüklüğü başta olmak üzere birçok hastalığa yol açarak ürün kalitesini ve verimi düşüren *F. graminearum* ve *F. culmorum* fitopatojenleri ile fungusit uygulaması yoluyla mücadele edilmektedir. Geçmişten günümüze 200'ün üzerinde farklı fungusit aktif bileşeni çeşitli hastalıklara yol açan fitopatojenik mantarlarla mücadelede kullanılmıştır (Seiber ve Kleinschmidt, 2011). İlk uygulanan fungusitlerin fitopatojenler üzerindeki antifungal etkisi düşük olsa da, bir veya birden fazla aktif bileşen içeren bu bileşiklerin organizmalar üzerindeki inhibitör etkilerinin test edilmesi ve ayrıca mikroorganizma genomlarının dizilenmesi ile elde edilen genomik veriler, daha etkili yeni fungusit aktif bileşenlerinin geliştirilmesi ve uygulanabilmesine olanak sağlamıştır (Kuck ve diğ., 2012). 1970'lerin başında piyasaya sürülen DMI fungusit bileşenlerinin bir alt grubu olan azol fungusit aktif bileşenleri daha yüksek antifungal etkiye sahip olduğu için günümüzde *Fusarium* türlerinin de aralarında bulunduğu çeşitli mantarlarla mücadelede yaygın olarak kullanılmaktadır. Azol grubu fungusit aktif bileşenlerinin yüksek genetik çeşitliliğe sahip ve tür kompleksinden oluşan *F. graminearum* ile yüksek çeşitlilik gösteren *F. culmorum*'u inhibe eden etkili dozları belirlenerek bu patojenlerin yol açtığı hastalıklarla mücadeledeki etkinlikleri araştırılmıştır. Ancak bu aktif bileşenlerin *Fusarium spp.* üzerindeki hücresel etkileri ve fitopatojenlerin bu aktif bileşenlere geliştirdikleri direnç mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar sınırlı kalmıştır. (Snelders ve diğ., 2009; Shekhova ve diğ., 2017). Yapılan çalışmalar fitopatojenlerin azol fungusit aktif bileşenlerine duyarlılıklarında azalma olduğu rapor etmiştir (Bolton ve diğ., 2012; Hellin ve diğ., 2018). Gerçekleştirilen yüksek lisans projesinde azol fungusit aktif bileşeni olan protiokonazolün *F. graminearum* ve *F. culmorum* referans suşları (sırasıyla PH1 ve UK99) üzerindeki etkileri hücresel düzeyde araştırılmıştır.

Bir bileşiğin bir mikroorganizma üzerindeki etkisini araştırmada en önemli aşamlardan biri o bileşiğin uygun çözücüsünü belirlemektir. Çözücü, belli bir konsantrasyondaki bileşiği çözebilmeli ve besi ortamında homojen dağılmalıdır. İnsanlarda mantar hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan azol aktif bileşenlerinden flukonazol, mikonazol, ketokonazol ve tarım alanlarında etkili olan mantarlarla mücadelede kullanılan propikonazol, tebukonazol gibi azol fungusit aktif bileşenleri 5-50 mg/ml konsantrasyon aralığında saf etanol, dimetilsülfoksit (DMSO) ve asetonda çözülerek kullanılmıştır (Cope, 1980; Anséhn ve Nilson,

1984; Kjærstad ve diğ., 2010; Talas ve McDonald, 2015; Dbouk ve diğ., 2019; Želonková ve diğ., 2019; Zhu ve diğ., 2020). Diğer azol grubu bileşiklerin (tebukonazol, epoksikonazol ve metkonazol) aksine protikonazolün suda çözündüğüne ait bir bilgi literatürde bulunmamaktadır (Klix ve diğ. 2007). Yaptıkları çalışmalarında Wise ve diğ. (2011) ile Petkar ve diğ. (2017) protikonazolü sırasıyla 10 ve 100 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde asetonunda çözerek, Dubos ve diğ. (2011) ise 2,44 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde saf etanolde çözdürerek kullanmışlardır. Literatür bilgisi temel alınarak gerçekleştirilen yüksek lisans tezi kapsamında ise protikonazolün 10 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde saf DMSO, etanol ve asetondaki çözünürlüğü test edilmiştir (tek bir konsantrasyon denendiği için materyal ve metod ve bulgulara verilmemiştir). Protikonazolün bu konsantrasyonunun sadece saf asetonunda tamamen çözündüğü belirlendikten sonra *Fusarium* suşlarına uygulanan aktif bileşenle birlikte her deneme serisi için asetonun ilgili konsantrasyonunun etkisi de test edilmiştir. Çalışmada bu grup normalizasyon grubu olarak ifade edilmiştir.

Fitopatojenlerin kontrolünde kullanılacak fungusit aktif bileşenlerinin öncelikle MIK değerleri belirlenmekte ve bu şekilde fitopatojenlerin fungusit aktif bileşenlerine direnç geliştirme ihtimali azaltılmaktadır. MIK o türün referansı olarak kabul edilen suşlarında araştırılmakta, daha sonra üremeyi inhibe eden konsantrasyonun %25 ve 50 dozları tarla izolatlarına uygulanarak tarama çalışması yapılmaktadır. Tez çalışması kapsamında da protikonazolün *Fusarium* reseferanslarındaki hücresel etkilerini incelemek üzere MIK'leri belirlenmiş, IC₂₅ ve IC₅₀ dozları hesaplanmıştır. Uygulanan 0,1 µg/ml protikonazol konsantrasyonunun *Fusarium* referans suşlarının üremesini inhibe etmedi belirlenmiştir (p>0,05). Avozani ve diğ. (2014a) ise protikonazolün 0,1 µg/ml'dan daha düşük konsantrasyonlarının patates sukroz agar besi ortamında kültürlen *F. graminearum* izolatlarında üremeyi %50 inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Aynı aktif bileşen için belirlenen etkili konsantrasyon farkının kullanılan besi ortamı içeriği ile ilişkili olabileceği, ancak daha çok türün izolatlarının genotipik farklılığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. *F. graminearum* izolatları arasında azol fungusit aktif bileşenlerine duyarlılığın değişken olduğunun Talas ve McDonald (2015) tarafından bildirilmesi, genotipin, aktif bileşiğin etkili konsantrasyonun belirlenmesindeki önemini desteklemektedir.

Tez çalışması kapsamında PDA besi ortamına eklenen protikonazolün 1 µg/ml konsantrasyonunun PH1'in üremesini % 80 azalttığı, UK99'un ise üremesini tamamen

durdurduğu, 1,2 µg/ml protikonazol konsantrasyonunun ise PH1 üremesini tamamen durdurduğu saptanmıştır. Benzer şekilde, literatürde, *F. graminearum* izolatlarının azol fungusit aktif bileşenlerine *F. culmorum* izolatlarına göre daha dirençli olduğu bildirilmiştir. Bu durumun da, aktif bileşene daha fazla maruz kalan *F. graminearum* izolatlarında gelişen dirençten kaynaklandığı, direncin de eşeyli üreme yoluyla bireyler arasında daha hızlı yayıldığı görüşü paylaşılmıştır (Hellin ve diğ., 2017). Protikonazolün de aralarında olduğu fungusit aktif bileşenlerinin [protikonazol+trifloksistrobin (1:1), tebukonazol (1 µg/ml)] *F. graminearum* izolatlarının üremesini ihibe ettiği (%90,7 ve %83,16) Avozani ve diğ. (2014b) tarafından gösterilmiştir. Hellin ve diğ. (2018) de DMI fungusit aktif bileşeni olan proklorazın çok daha düşük konsantrasyonda (0,1 µg/ml) UK99'un üremesini engellediğini ortaya koymuşlardır. Çalışmada elde ettiğimiz bulgular literatür verileriyle uyumludur. Sonuç olarak protikonazol için MİK değerlerinin PH1 için 1,2 µg/ml, UK99 için de 1 µg/ml olduğu ortaya konmuştur. Liu ve diğ. (2010) PH1 referansında tebukonazolün PDA besi ortamında üremeyi %50 inhibe eden dozunu 2,42 µg/ml olarak belirlemiştir. Protikonazolün tez kapsamında belirlenen MİK (1,2 µg/ml) bulgusu, protikonazolün tebukonazole göre PH1 suşunda daha etkili olduğunu göstermiştir. Hellin ve diğ. (2018) UK99'da tebukonazol, epoksikonazol, propikonazol, difenokonazol gibi azol fungusit aktif bileşenleri ve yaygın kullanılan MBK fungusit aktif bileşeni karbendazimin MİK değerlerini 1 µg/ml olarak bulmuştur. Tez kapsamında protikonazolün UK99'daki MİK değerinin 1 µg/ml olarak belirlenmesi ve Hellin ve diğ. (2018)'in bulguları UK99'un *Fusarium* spp.'nin kontrolünde yaygın olarak kullanılan fungusit aktif bileşenlerine duyarlılığının benzer olduğunu düşündürmüştür. Koycu (2019) protikonazolün ve tebukonazolün Trakya bölgesinden topladığı *F. culmorum* izolatlarındaki MİK değerini 3 µg/ml olarak belirlemiştir. Yüksek lisans tezinde belirlenen MİK değerleri ile farklı *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarındaki MİK ve inhibisyon değerleri incelendiğinde hem *F. graminearum* hem de *F. culmorum* türleri içerisindeki farklı bireylerin protikonazol ve diğer azol fungusit aktif bileşenlerine karşı çok çeşitli duyarlılıklara sahip olduğu görülmüştür (Talas ve McDonald, 2015). Petkar ve diğ. (2017), karpuzdan izole ettiği yüz *F. oxysporum* suşlarında protikonazolün MİK değerlerini 3-5 µg/ml aralığında olduğunu bulmuş, Roberts ve diğ. (2020) protikonazolün *F. falciforme* ve *F. keratoplasticum* suşlarındaki MİK değerini 32 µg/ml olarak belirlemiştir. Tez bulguları ile Petkar ve diğ. (2017) ve Roberts ve diğ. (2020)'nin bulguları karşılaştırıldığında protikonazolün PH1 ve UK99'daki antifungal etkisinin bu çalışmalardaki *F. oxysporum*, *F. falciforme* ve *F. keratoplasticum*

türlerine göre daha fazla olduğunu görülmüş, protikonazolün *F. graminearum* ve *F. culmorum* üzerindeki antifungal etkisinin diğer *Fusarium* türlerine göre daha fazla olabileceği düşünülmüştür.

Fusarium spp. tarafından üretilen sporlar bu türlerin olumsuz çevre koşullarında hayatta kalmasını sağlar. Çeşitli hava olayları, böcek ve kuş gibi hayvanlar da sporların taşınmasına aracılık ederek fitopatojenlerin geniş alanlara yayılmasını sağlarlar (Gracia-Garza ve diğ., 1998). Bu nedenle *Fusarium* spp. ile mücadelede spor üretiminin baskılanması büyük önem taşımaktadır. Referans suşlardaki spor üretimi ilk olarak PDB besi ortamında araştırılmış, ışık mikroskopisi görüntüleri hem PH1'in hem de UK99'un normalizasyon ve deney gruplarının PDB besi ortamında spor üretmediğini göstermiştir. Her iki referans suş için denenen IC₇₅ (MIK değerinin %75'i) protikonazol dozunda da spor oluşumu gözlenmemiştir. *Fusarium* referanslarında spor üretimini teşvik etmek için PDB'ye göre daha fakir besi ortamı olan CDB kullanılmıştır. PH1'in normalizasyon ve deney gruplarının CDB besi ortamında da spor üretmediği saptanmıştır. UK99 referansının ise normalizasyon grubunda spor üretmediği, deney gruplarından ise sadece IC₅₀ dozunda protikonazol içeren besi ortamında makrokonid ürettiği, ancak makrokonidlerin morfolojisinde farklılıklar olduğu bu çalışmada belirlenmiştir. IC₅₀ dozundaki protikonazolün, UK99 referansının ürettiği makrokonid spor yapılarının uzunlukları ve çaplarında, kontrol grubu (SNB besi ortamında kültürlen) sporlarına göre, sırasıyla % 66 (p<0,001) ve % 123 (p<0,001) oranında artışa neden olduğu saptanmıştır. *F. graminearum* tarla izolatlarına uygulanan protikonazolün, uygulamadan 24 saat sonra miselyum ve sporlarda şişmeye yol açtığı Kerz-Möhlendick ve diğ. (2004) tarafından da gözlenmiştir. Fungusit aktif bileşenlerinin (propikonazol ve siprokonazol) yol açtığı spor yapı değişiminin membran geçirgenliğinin bozulmasından kaynaklandığı Stergiopoulos ve diğ. (2012) tarafından farklı bir türde (*Mycosphaerella graminicola*) gösterilmiştir. Protikonazolün IC₂₅ dozunun UK99'da sporulasyonu baskıladığı, IC₅₀ doz uygulamasında ise, makrokonid spor yapılarının üretildiği ancak makrokonid yapılarında literatüre benzer şekilde şişmenin olduğu, ek olarak kontrole göre uzamaya da neden olduğu gösterilmiştir. UK99'da IC₅₀ doz etkisiyle spor uzunluk ve çaplarındaki artışın; hücre membranının seçici geçirgenliğini kaybetmesi sonucu hücre içi ve dışı arasındaki ozmatik dengenin bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Farklı araştırmalarda oksidatif stresin bazı azol fungusit aktif bileşenleri için antifungal etki mekanizmasının bir parçası olduğu bildirilmiştir. Filamentli mantarlarda H₂DCFDA yöntemi hücredeki genel oksidatif stresin belirlenmesinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Shekhova ve diğ., 2017; Gazdağlı ve diğ., 2018; Yörük, 2018). Tez çalışması kapsamında da protikonazolün *Fusarium* referans suşlarında oluşturduğu oksidatif stres, hücresel düzeyde H₂DCFDA boyası kullanılarak gösterilmiştir. Referans suşlarının kontrol, normalizasyon ve deney grupları ilk olarak PDB besi ortamında kültürlenerek H₂DCFDA ile boyanmış, ancak her iki referans suşda da IC₂₅ ve IC₅₀ doz uygulamaları arasındaki floresan ışıma farkı -protikonazol etkisiyle miselyumların bir araya toplanmasına yol açtığı hücre yoğunluğunun fazla olması nedeniyle- net biçimde gösterilememiştir. Daha az hücre yoğunluğunun elde edildiği farklı bir besi ortamı (CDB) kullanıldığında deney grupları arasında ışıma farkı etkin biçimde görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır. H₂DCFDA, hücredeki ROT ile reaksiyona girerek floresan ışık altında yeşil ışımaya yol açmakta, ROT miktarı arttıkça ışıma şiddeti de artmaktadır. CDB besi ortamının kullanıldığı kültürlerin floresan mikroskopu görüntüleri incelendiğinde deney gruplarında oksidatif stresin meydana geldiği (parlak yeşil), kontrol ve normalizasyon gruplarında ise oksidatif stresin olmadığı (soluk yeşil) H₂DCFDA boyaması ile belirlenmiştir. Kontrol ve normalizasyon gruplarında soluk da olsa gözlenen hafif yeşil ışıma her hücrede bulunan ROT'lardan kaynaklanmaktadır. Her iki referans suşun IC₅₀ dozundaki ışıma miktarının IC₂₅'den fazla olduğu, artan protikonazol konsantrasyonunun oksidatif stresi arttırdığı belirlenmiştir. Bulgular, Yörük (2018) tarafından elde edilen bulgularla uyumludur. Yörük (2018) tetrakonazolün uygulanan IC₅₀ dozunun, IC₂₅ dozundan daha fazla oksidatif strese yol açtığını *F. graminearum*'da H₂DCFDA boyaması ile göstermiştir.

Azol aktif bileşenlerinin doz artışının mantar hücrelerinde oksidatif stres artışına yol açtığı farklı türlerde gösterilmiştir (Kobayashi ve diğ., 2002). Membranın seçici geçirgenliğinin bozulması sonucunda doz artışı ile doğru orantılı olarak dış ortama ATP geçişinden kaynaklı hücre içi ATP düzeyinin azaldığı; mitokondrilerin ATP kaybını telafi etmek amacıyla daha yoğun çalışmasının hücrede daha fazla ROT üretimine neden olduğu gösterilmiştir (Anséhn ve Nilsson 1984). Mitokondri aktivitesini sınırlayan bir ajanın kullanıldığı çalışmada, azol fungusit aktif bileşiğinin MİK değerinin arttığı, hücrede oksidatif stresin azaldığı bildirilmiştir (Shekhova ve diğ., 2017). Aktif bileşiğin MİK dozuna yakın dozlarında bile mitokondri yapısının korunduğu elektron mikroskopisi ile görüntülenmiştir (De Nollin ve Borgers 1975).

Çok sayıda fungusit aktif bileşiği hücredeki apoptotik mekanizmaları tetiklemek yerine nekroza neden olarak fitopatojenleri etkilemektedir. Ancak bu durum, fitopatojenlerin kullanılan aktif bileşiğe direnç geliştirmesi ile sonuçlanmaktadır. Nekrozla birlikte kontrollü ve programlanmış bir hücre ölümünü tetikleyen fungusit aktif bileşikler kullanıldığında fitopatojenlerin bu bileşiklere daha az direnç kazandıkları görülmüştür. At/etbr ikili boyama yöntemi apoptotik sürecin hücresel düzeyde hızlı ve güvenilir olarak belirlenmesini sağlamakta ve filamentli mantarlarda da etkili olarak kullanılmaktadır (Kosalec ve diğ., 2013; Leles ve diğ., 2013; Gazdağlı ve diğ., 2018; Yörük, 2018). Sağlıklı hücreler at boyasını alıp yeşil ışığa yaparken, apoptoza giren hücreler hem at hem de etbr'yi içerisine alacağından floresan ışık altında turuncu ışığa yapmaktadır. Bu çalışmada protikonazolün kontrollü ve programlanmış hücre ölümü yoluyla etkili olduğu hücresel düzeyde at/etbr ikili boyamasıyla ortaya konmuştur. Floresan mikroskopu görüntüleri her iki referansın da gruplarında apoptozun meydana geldiği turuncu ışığa ile; normalizasyon grubu olarak kullanılan asetonun apoptotik etkiye yol açmadığı yeşil ışığa ile hücresel düzeyde izlenmiştir. Bulgular, Yörük (2018) tarafından elde edilen bulgularla uyumludur. Yörük (2018) ikili boyama ile; tetrakonazolün *F. graminearum*'da apoptoza neden olduğunu, doz artışı ile apoptoza uğrayan hücre sayısı arasında ilişki olduğunu da göstermiştir (Yörük, 2018).

Ökaryotik hücrelerde oksidatif stres önemli bir apoptoz belirtici olarak kabul edilmektedir. ROT, apoptozun başlamasını sağlayan sinyal yolları aktive etmektedir (Madeo ve diğ., 1999). Phillips ve diğ. (2003), *Candida albicans* hücrelerinde azol fungusit aktif bileşenlerine benzer etki mekanizmasına sahip olan amfoterisin B'nin oksidatif stres hasarına yol açarak apoptozu tetiklediğini ortaya koymuşlardır. *Fusarium* türleri üzerindeki antifungal uygulamalarla ilgili yapılan araştırmalar ve tez kapsamında elde edilen bulgular bu antifungal ajanların hem oksidatif strese neden olduğu hem de apoptozu tetiklediğini göstermiştir (Wang ve diğ., 2014; Gazdağlı ve diğ., 2018; Yörük, 2018;). Sonuç olarak protikonazol uygulamasının da *Fusarium* referans suşlarında apoptoza neden olduğu tez çalışması kapsamında belirlenmiş, apoptozu tetikleyen etmenin oksidatif stres olabileceği desteklenmiştir. Hücre membranı geçirgenliğini bozan azol fungusit aktif bileşenleri hücrenin K^+ ve Ca^{+2} gibi iyonları kaybetmesine neden olmaktadır (Cope, 1980; Dufour, 1980; Anséhn ve Nilsson 1984). Hücredeki bu iyonların derişimlerdeki değişimlerin de apoptoza neden olduğu bilinmektedir (Wang ve diğ., 2014). Tez kapsamında iyon derişim değişimlerinin

araştırılmamış olması apoptozun hücredeki iyon dengesi kaynaklı olup olmadığının değerlendirilmesini sınırlamıştır.

Oksidatif stres varlığında KAT enzimi; belli bir konsantrasyonun üzerindeki H_2O_2 'yi süpürmektedir. KAT aktivitesindeki artış hücredeki oksidatif stresin göstergesi olarak kabul edilmektedir (Burton ve Jauniaux, 2011). Çalışma kapsamında protikonazol uygulanmış *Fusarium* referanslarında oksidatif stres KAT aktivitesi değişimi kapsamında da araştırılmıştır. PH1 referansında protikonazolün konsantrasyon artışına paralel olarak KAT aktivitesinde artış olduğu, kontrol grubuna göre IC_{25} ve IC_{50} dozlarında sırasıyla % 105 ($p<0,001$) ve % 278 ($p<0,001$) oranında artış meydana geldiği saptanmıştır. Protikonazol uygulamasının *F. graminearum*'da doz artışına paralel olarak hem hücrelerdeki hem hücreler arası ortamdaki H_2O_2 konsantrasyonunu arttırdığı Audenaert ve diğ. (2010) tarafından da gösterilmiştir. Yüksek lisans tezi kapsamında elde edilen sonuçlar ile Audenaert ve diğ. (2010)'nin bulguları paralellik göstermektedir. Protikonazol uygulaması PH1'de doz artışına bağlı olarak H_2O_2 miktarını arttırmış ve KAT aktivitesinin de yükselmesine neden olmuştur. Farklı çalışmalarda farklı aktif bileşen uygulamalarının *F. graminearum* ve *Saccharomyces cerevisiae*'de KAT aktivitesi artışına yol açtığı, doz artışıyla orantılı olarak enzim aktivitesinin de arttığı gösterilmiştir (Tongul ve Tarhan 2016; Gazdağlı ve diğ., 2018).

UK99'da IC_{25} ve IC_{50} dozlarındaki KAT aktivitesindeki artışın kontrole göre sırasıyla %52 ($p<0,001$) ve %8 ($p>0,05$) olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, protikonazolün tez kapsamında belirlenen IC_{25} dozuyla aynı konsantrasyondaki tebukonazolün *F. culmorum* izolatlarında KAT aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Hellin ve diğ., 2017). Farklı araştırmacılar belli bir doza kadar azol fungusit aktif bileşenlerinin KAT aktivitesini arttırdığını ancak daha yüksek dozların KAT aktivitesini azalttığını göstermişlerdir. Bu durumun azol fungusit aktif bileşenlerinin belli bir konsantrasyonun üstündeki değerlerinin KAT ile etkileşime girerek bu enzimin aktivitesini azaltmasından kaynaklanmış olabileceğini bildirmişlerdir (De Nollin ve diğ., 1977; Francois ve diğ., 2006; Ali ve diğ., 2017; Peng ve diğ., 2018; Martins ve diğ., 2019). Çalışmada protikonazolün IC_{50} dozu uygulandığında UK99'da KAT aktivitesi IC_{25} dozuna göre düşük olarak belirlenmiştir. Literatür bilgisine göre bu durumun aktif bileşik ile enzim arasında meydana gelen etkileşimden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Ancak yüksek lisans tezi kapsamında protikonazol ve KAT enzim etkileşiminin araştırılmasına yönelik bir çalışma gerçekleştirilmemiştir.

Hücredeki antioksidan savunma mekanizmasının ilk basamağında yer alan, hem mitokondri hem de sitoplazmada $O_2^{\cdot-}$ 'nin süpürülmesinden sorumlu olan SOD hücre için önemli bir antioksidan enzimdir (Burton ve Jauniaux, 2011). Bu nedenle protikonazol uygulanmış referans suşlarda SOD aktivitesinde meydana gelen değişimler de araştırılmıştır. Her iki *Fusarium* referansında da protikonazol dozunun artışına bağlı olarak SOD enzim aktivitesi artmıştır. PH1'de kontrole göre IC_{25} ve IC_{50} dozunda sırasıyla SOD aktivitesi %48 ($p<0,001$) ve %103 ($p<0,001$); UK99 referansında ise %38 ($p<0,001$) ve %84 ($p<0,001$) oranında artış meydana gelmiştir. Hücre membranı geçirgenliğinin bozulması, ATP kaybı, artan mitokondri aktivitesi, $O_2^{\cdot-}$ üretimini arttırmakta, bu durum da hücrede SOD enzim aktivitesinin artışına yol açmaktadır (Tongul ve Tarhan, 2016)

Referans suşların IC_{25} ve IC_{50} protikonazol dozlarındaki KAT ve SOD enzim aktivitelerindeki değişim birbirbirinden farklıdır. Antioksidan enzim aktivitelerindeki artış PH1 referansında daha fazladır. Protikonazol doz artışına bağlı olarak PH1 ve UK99 arasındaki SOD ve KAT aktivitesinin değişimin farklı olmasının nedeni; aynı antifungal ajanın farklı türlerde neden olduğu oksidatif stres miktarı ve türlerin oksidatif strese bağlı olarak verdikleri antioksidan cevabın farklı olmasından kaynaklanmaktadır (Mahl ve diğ., 2015). Linares ve diğ. (2013), aynı konsantrasyonda azol fungusit aktif bileşeni flukonazolün uygulandığı *Candida dubliniensis* izolatlarından dirençli olanların SOD ve KAT aktivitesinin daha fazla olduğunu belirlemiş, izolatların dirençli olmasının nedeninin antioksidan enzim aktivitelerine bağlı olduğunu bildirmiştir. PH1'deki antioksidan enzim aktivitelerinin UK99'dan fazla olması, PH1'in MIK değerinin UK99'a göre %20 fazla olmasına neden olmuş olabileceği düşünülmüştür.

Protikonazolün hücre canlılığına olan etkisi WST-1 yöntemi ile kolorimetrik ölçüm temelli metotla test edilmiştir. Her iki referans suş için de protikonazol doz artışının canlı hücre sayısını azalttığı belirlenmiştir (PH1 için canlı hücre sayısındaki azalışın kontrole göre IC_{25} ve IC_{50} dozlarında sırasıyla %40,2 ($p<0,001$) ve %53,82 ($p<0,001$); UK99'daki canlı hücre sayısındaki azalışın kontrole göre IC_{25} dozunda %25,33 ($p<0,001$), IC_{50} dozunda %41,93 ($p<0,001$) olduğu hesaplanmıştır). Her iki referansta da kontrole göre IC_{25} dozundaki canlı hücre sayısı azalışı, IC_{25} 'e göre IC_{50} dozundan fazla bulunmuştur. Benzer şekilde, Kuhn ve diğ., (2003) antifungal ajanların doz artışına paralel olarak hücre sayısını azalttığını ancak doz yükseldikçe hücre sayısında meydana gelen azalışın da düştüğünü bildirmiştir. Çoğu mantar cinsinde tetrozolyum tuzları ile canlı hücre sayısı ölçümü yapıldığında uygulanan antifungal

ajanların IC₂₅ ve IC₅₀ konsantrasyonlarında sırasıyla kontrole göre %25 ve %50'ye yakın oranlarda hücre sayısında azalma olduğu Meletiadiis ve diğ. (2000) tarafından da bildirilmiştir. Ancak yüksek lisans tezi kapsamında belirlenen PH1 IC₂₅ (%40,2) ve UK99 IC₅₀ (%41,93) dozlarındaki canlı hücre sayısı inhibisyonunun uygulanan doz ile aynı oranda olmadığı görülmektedir. WST-1 gibi tetrazolyum tuzlarının mitokondride yoğun olarak bulunan dehidrogenaz enzimleri tarafından formazan kristallerine çevrilmesinden yararlanılarak canlı hücre sayısı değişimi belirlenebilmektedir. Mitokondrinin daha etkin çalışmasına neden olan antifungal ajanlar hücrede formazan kristallerinin oluşumunu arttırmaktadır. Bu antifungal ajanların uygulandığı kültürlerin tetrazolyum tuzlarıyla canlı hücre sayısı ölçüldüğünde canlı hücre sayısındaki düşüş gerçek değerinden daha azmış gibi görünebilmektedir (Meletiadiis ve diğ., 2000). Azol fungusit aktif bileşenlerinin mitokondrinin daha etkin çalışmasına neden olduğu bilinmektedir (De Nollin ve Borgers 1975; Anséhn ve Nilsson 1984). UK99 IC₅₀ dozundaki canlı hücre sayısındaki düşüşün %50'den daha az olmasının (%41,93) IC₅₀ dozu uygulanmış UK99'da mitokondrinin daha etkin çalışmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

DON, insan ve hayvanlar tarafından tüketilen bitki ve bitkisel ürünlerde en fazla bulunan B-trikotosendir (Tarazona ve diğ., 2019). DON üreticisi olan *Fusarium* türlerini kontrol altına almak için uygulanan antifungal ajanların *Fusarium spp.*'nin yayılmasını önlemesinin yanısıra bu fitopatojenlerin DON üretimini baskılaması insan ve hayvan sağlığı açısından önemlidir. Bu nedenle protikonazol uygulamalarının referanslardaki DON üretimine etkisi de incelenmiştir. Ticari olarak temin edilen DON standartının ITK'deki Rf değeri 0,28 olarak hesaplanmıştır. Farklı çalışmalarda da aynı yöntem uygulanmış ve DON Rf değerinin 0,28 olduğu bildirilmiştir (Gazdağlı ve diğ., 2018; Yörük ve Albayrak 2019). PH1'in kontrol, normalizasyon ve deney gruplarında DON mikotoksinine ait Rf değerinde (0,28) ait bir spot saptanmamıştır. Bu nedenle protikonazolün PH1 üzerindeki DON üretimine etkisi incelenememiştir. *Fusarium* türlerinin bitki ile etkileşiminde bitki tarafından üretilen çeşitli antifungal ajanların ve ROT'un bu türlerde stres oluşturmaları sonucu bir stres cevabı olarak mikotoksin ürettiği bilinmektedir (Audenaert ve diğ. 2010). Ochiai ve diğ. (2007), zengin besi ortamlarında *F. graminearum*'un trikotosen üretiminin çok az olduğunu bildirmiştir. PH1 kontrol grubunun PDA besi ortamı kültürlerinde DON üretiminin belirlenememesinin nedeni kullanılan besi ortamının besleyici bakımından zengin olması ve suşun strese maruz kalmaması olabilir. Protikonazol uygulanmış PH1 suşunda trikotosen üretiminde görev alan tri5 geninin anlatımının kontrole göre arttığı ancak deney gruplarındaki üretilen DON miktarının ITK ile

belirlenebilecek sınırlar dışında kaldığı saptandı. Çalışmalar devam ettiğinden dolayı bulgular tez kapsamında paylaşılmadı. UK99'un kontrol, normalizasyon ve deney gruplarında DON standartıyla (0,28) aynı Rf değerine sahip spotlar gözlenmiş, deney gruplarındaki DON miktarının (UV ışık altındaki DON spotu parlaklığının) kontrol ve normalizasyon gruplarına göre azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca IC₂₅ protiokonazol dozundaki DON miktarının IC₅₀ dozuna göre daha az olduğu ortaya konmuştur. H₂O₂'nin *F. culmorum* izolatlarında DON üretimini arttırdığı ayrıca H₂O₂ ile birlikte katalaz eklenmesinin ise DON üretimini etkilemediğini gösterilmiştir (Ponts ve diğ., 2007). Protiokonazolün IC₅₀ dozunda DON miktarının IC₂₅ dozuna göre daha fazla olmasının nedeni IC₅₀ dozunda KAT aktivitesinin inhibisyonu sonucu H₂O₂ miktarının artmasına bağlı olarak DON üretiminin de artması olabileceği düşünülmüştür. *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarının kullanıldığı tarım arazilerinde yapılan çalışmalarda tebukonazol ve karbendazim gibi birçok fungusit aktif bileşenlerinin bu türlerin DON üretimini arttırırken, protiokonazolün ise DON üretimini azalttığını bildirilmiştir (Paul ve diğ., 2007; Edwards ve diğ. 2010; Haidukowski ve diğ., 2012; Zhang ve diğ., 2013).

Gerçekleştirilen yüksek lisans tezi kapsamında azol fungusit aktif bileşeni protiokonazolün *F. graminearum* PH1 ve *F. culmorum* UK99 referans suşları üzerine etkileri hücresel düzeyde gösterilmiştir. Bu yüksek lisans tezinden elde edilen bulgular, farklı etki mekanizmalarına sahip fungusit aktif bileşenlerin *Fusarium* spp.'deki etkilerinin hücresel düzeyde belirlenebileceğini ve bu aktif 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, protiokonazolün *Fusarium* spp.'deki etkilerinin araştırılmasına yönelik olarak yapılacak yeni çalışmalara temel oluşturma niteliğine sahiptir.

KAYNAKLAR

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X. & Akey, C. W., 2002, Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation, *Molecular Cell*, 9(2), 423-432.
- Ahmad, P., Jaleel, C. A., Salem, M. A., Nabi, G. & Sharma, S., 2010, Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(3), 161-175.
- Aldred, D. & Magan, N., 2004, Prevention strategies for trichothecenes. *Toxicology Letters*, 153(1), 165-171.
- Ali, M., Ahmed, M., Ahmed, S., Ali, S. I., Perveen, S., Mumtaz, M., Haider, S. M & Nazim, U., 2017, Fluconazole and its interaction with metal (II) complexes: SEM, Spectroscopic and antifungal studies, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(1).
- Anke, T., Oberwinkler, F., Steglich, W. & Schramm, G., 1977, The strobilurins-new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus* (PERS. ex FR.) SING. *The Journal of Antibiotics*, 30(10), 806-810.
- Anséhn, S. & Nilsson, L. 1984., Direct membrane-damaging effect of ketoconazole and tioconazole on *Candida albicans* demonstrated by bioluminescent assay of ATP, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 26(1), 22-25.
- Audenaert, K., Callewaert, E., Höfte, M., De Saeger, S., & Haesaert, G., 2010, Hydrogen peroxide induced by the fungicide prothioconazole triggers deoxynivalenol (DON) production by *Fusarium graminearum*, *BMC Microbiology*, 10(1), 112.
- Audenaert, K., Vanheule, A., Höfte, M. & Haesaert, G., 2014, Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment, *Toxins*, 6(1), 1-19.
- Aung-Htut, M. T., Ayer, A., Breitenbach, M. & Dawes, I. W., 2011, Oxidative stresses and ageing, *Aging Research in Yeast*, 13-54.
- Aust, A. E. & Eveleigh, J. F., 1999, Mechanisms of DNA oxidation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 222(3), 246-252.
- Avozani, A., Reis, E. M. & Tonin, R. B., 2014a. In vitro sensitivity reduction of *Fusarium graminearum* to DMI and QoI fungicides, *Summa Phytopathologica*, 40(4), 358-364.
- Avozani, A., Tonin, R. B., Reis, E. M., Camera, J. & Ranzi, C., 2014b, In vitro sensitivity of *Fusarium graminearum* isolates to fungicides, *Summa Phytopathologica*, 40(3), 231-247.
- Bai, G. & Shaner, G., 2004, Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight, *Annual Review of Phytopathology*, 42, 135-161.
- Balba, H., 2007, Review of strobilurin fungicide chemicals. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 42(4), 441-451.

- Barrett-Bee, K. & Dixon, G., 1995, Ergosterol biosynthesis inhibition: a target for antifungal agents, *Acta Biochimica Polonica*, 42(4), 465-479.
- Bennett, J. & Klich, M., 2003, Mycotoxins, *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497-516.
- Berlett, B. S. & Stadtman, E. R., 1997, Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313-20316.
- Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., Saeger, S. D., Haesaert, G., Karlovsky, P., Oswald, P. I., Seefelder, W., Speijers, G. & Stroka, J., 2013, Masked mycotoxins: A review, *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(1), 165-186.
- Bolton, M. D., Rivera-Varas, V., del Río Mendoza, L. E., Khan, M. F. & Secor, G. A., 2012, Efficacy of variable tetraconazole rates against *Cercospora beticola* isolates with differing in vitro sensitivities to DMI fungicides, *Plant Disease*, 96(12), 1749-1756.
- Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Bodmer, J. L., Gaide, O., Hertig, S., Ambrose, C., Tschopp, J. & Schneider, P., 2006, Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human, *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 13964-13971.
- Bowler, C., Montagu, M. V. & Inze, D., 1992, Superoxide dismutase and stress tolerance, *Annual Review of Plant Biology*, 43(1), 83-116.
- Brenner, D. & Mak, T. W., 2009, Mitochondrial cell death effectors. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6), 871-877.
- Burton, G. J. & Jauniaux, E., 2011, Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(3), 287-299.
- Cain, K., Bratton, S. B. & Cohen, G. M., 2002, The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex, *Biochimie*, 84(2-3), 203-214.
- Chala, A., Weinert, J. & Wolf, G. A., 2003, An integrated approach to the evaluation of the efficacy of fungicides against *Fusarium culmorum*, the cause of head blight of wheat, *Journal of Phytopathology*, 151(11-12), 673-678.
- Champeil, A., Doré, T. & Fourbet, J. F., 2004, Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains, *Plant Science*, 166(6), 1389-1415.
- Cheeseman, K. H. & Slater, T. F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481-493.
- Chelikani, P., Fita, I. & Loewen, P. C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(2), 192-208.
- Cnubben, N. H., Rietjens, I. M., Wortelboer, H., van Zanden, J. & Van Bladeren, P. J., 2001, The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10(4), 141-152.

- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M. & Lunec, J., 2003, Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *The FASEB Journal*, 17(10), 1195-1214.
- Cools, H. J., Hawkins, N. J. & Fraaije, B. A., 2013, Constraints on the evolution of azole resistance in plant pathogenic fungi, *Plant Pathology*, 62, 36-42.
- Cope, J. E., 1980, Mode of action of miconazole on *Candida albicans*: effect on growth, viability and K⁺ release, *Microbiology*, 119(1), 245-251.
- Cregan, S. P., Dawson, V. L. & Slack, R. S., 2004, Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death, *Oncogene*, 23(16), 2785-2796.
- Cromey, M. G., Parkes, R. A., Sinclair, K. I., Lauren, D. R. & Butler, R. C., 2002, Effects of fungicides applied at anthesis on Fusarium head blight and mycotoxins in wheat. *New Zealand Plant Protection*, 55, 341-346.
- D'Arcy, M. S., 2019, Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy, *Cell Biology International*, 43(6), 582-592.
- David Miller, J. & Arnison, P. G., 1986, Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of the Fusarium head blight resistant wheat cultivar Frontana, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8(2), 147-150.
- Dbouk, N. H., Covington, M. B., Nguyen, K. & Chandrasekaran, S., 2019, Increase of reactive oxygen species contributes to growth inhibition by fluconazole in *Cryptococcus neoformans*, *BMC Microbiology*, 19(1), 1-10.
- Denecker, G., Vercammen, D., Declercq, W. & Vandenabeele, P., 2001, Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(3), 356-370.
- De Nollin, S. & Borgers, M., 1975, Scanning electron microscopy of *Candida albicans* after in vitro treatment with miconazole, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7(5), 704-711.
- De Nollin, S., Van Belle, H., Goossens, F., Thone, F. & Borgers, M., 1977, Cytochemical and biochemical studies of yeasts after in vitro exposure to miconazole, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11(3), 500-513.
- Dos Santos, K. M., Tsuji, S. S., Câmara, M. P. S., Michereff, S. J. & Lopes, U. P., 2019. Sensitivity to methyl benzimidazole carbamate fungicides of *Botryosphaeriaceae* species from mango orchards in the Northeast of Brazil, *European Journal of Plant Pathology*, 153(1), 209-222.
- Dubos, T., Pasquali, M., Pogoda, F., Hoffmann, L. & Beyer, M., 2011, Evidence for natural resistance towards trifloxystrobin in *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology*, 130(2), 239-248.
- Dufour, J. P., Boutry, M. & Goffeau, A., 1980, Plasma membrane ATPase of yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 255, 5735-5741.

- Edwards, S. G. & Godley, N. P., 2010, Reduction of Fusarium head blight and deoxynivalenol in wheat with early fungicide applications of prothioconazole, *Food Additives and Contaminants*, 27(5), 629-635.
- Elmore, S., 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
- Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F. & Collet, J. F., 2017, Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria, *Nature Reviews Microbiology*, 15(7), 385.
- Finaud, J., Lac, G. & Filaire, E., 2006, Oxidative stress, *Sports Medicine*, 36(4), 327-358.
- Francois, I. E., Cammue, B., Borgers, M., Ausma, J., Dispersyn, G. D. & Thevissen, K., 2006, Azoles: mode of antifungal action and resistance development. Effect of miconazole on endogenous reactive oxygen species production in *Candida albicans*, *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 5(1), 3-13.
- Fröhlich, K. U. & Madeo, F., 2000, Apoptosis in yeast—a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS letters*, 473(1), 6-9.
- Fujii, K. & Takamura, S., 1998, Pyricut® (diflumetorim, UBF-002EC) a new fungicide for ornamental use, *Agrochemicals Japan*, 72, 14-15.
- Gazdağlı, A., Sefer, Ö., Yörük, E., Varol, G. İ., Teker, T. & Albayrak, G., 2018, Investigation of Camphor effects on *F. graminearum* and *F. culmorum* at different molecular levels, *Pathogens*, 7(4), 90.
- Geat, N., Singh, D., Singh, H. & Khirbat, S. K., 2016, Effect of non-conventional chemicals and synthetic fungicide on biochemical characteristics of Chilli against fruit rot pathogen *Colletotrichum capsici*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 10(1), 605-613.
- Gracia-Garza, J. A. & Fravel, D. R., 1998, Effect of relative humidity on sporulation of *Fusarium oxysporum* in various formulations and effect of water on spore movement through soil, *Phytopathology*, 88(6), 544-549.
- Guertens, G., Boeck, G. D., Highley, M., Van Oosterom, A. T. & De Bruijn, E. A., 2002, Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 39(4-5), 331-457.
- Hacker, G., 2000, The morphology of apoptosis, *Cell and Tissue Research*, 301(1), 5-17.
- Haida, Z. & Hakiman, M., (2019), A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities, *Food Science & Nutrition*, 7(5), 1555-1563.
- Haidukowski, M., Visconti, A., Perrone, G., Vanadia, S., Pancaldi, D., Covarelli, L., Balestrazzi, R. & Pascale, M., 2012, Effect of prothioconazole-based fungicides on Fusarium head blight, grain yield and deoxynivalenol accumulation in wheat under field conditions, *Phytopathologia Mediterranea*, 236-246

- Hamann, A., Brust, D. & Osiewacz, H. D., 2008, Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing, *Trends in Microbiology*, 16(6), 276-283.
- Hellin, P., Scauflaire, J., Van Hese, V., Munaut, F. & Legrève, A., 2017., Sensitivity of *Fusarium culmorum* to triazoles: impact of trichothecene chemotypes, oxidative stress response and genetic diversity, *Pest Management Science*, 73(6), 1244-1252.
- Hellin, P., King, R., Urban, M., Hammond-Kosack, K. E. & Legrève, A., 2018., The adaptation of *Fusarium culmorum* to DMI fungicides is mediated by major transcriptome modifications in response to azole fungicide, including the overexpression of a PDR transporter (FcABC1), *Frontiers in Microbiology*, 9, 1385.
- Hermann, D. & Stenzel, K., 2019, FRAC Mode-of-action Classification and resistance risk of fungicides, *Modern Crop Protection Compounds*, 2, 589-608.
- Hornok, L., Waalwijk, C. & Leslie, J. F., 2007, Genetic factors affecting sexual reproduction in toxigenic *Fusarium* species, *International journal of Food Microbiology*, 119(1-2), 54-58.
- Ighodaro, O. M. & Akinloye, O. A., 2018, First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287-293.
- Kazan, K., Gardinar, D. & Manners, J., 2012, On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 399-413.
- Kehrer, J. P., 2000, The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity, *Toxicology*, 149(1), 43-50.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British Journal of Cancer*, 26, 239-57.
- Kerz-Möhlendick, F., Häuser-Hahn, I., Dutzmann, S. & Suty-Heinze, A., 2004, Experience with DMI Fungicides for The Control Of FHB-Efficient Use Of Efficient Tools, *2nd International Symposium on Fusarium Head Blight*, 337.
- Kim, J. H., Lee, S. Y., Oh, S. Y., Han, S. I., Park, H. G., Yoo, M. & Kang, H. S., 2004, Methyl jasmonate induces apoptosis through induction of Bax/Bcl-XS and activation of caspase-3 via ROS production in A549 cells, *Oncology Reports*, 12(6), 1233-1238.
- Kjærstad, M. B., Taxvig, C., Nellemann, C., Vinggaard, A. M., & Andersen, H. R., 2010, Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals, *Reproductive Toxicology*, 30(4), 573-582.
- Klix, M. B., Verreet, J. A. & Beyer, M., 2007, Comparison of the declining triazole sensitivity of *Gibberella zeae* and increased sensitivity achieved by advances in triazole fungicide development, *Crop Protection*, 26(4), 683-690.

- Knoblach, S. M., Nikolaeva, M., Huang, X., Fan, L., Krajewski, S., Reed, J. C. & Faden, A. I., 2002, Multiple caspases are activated after traumatic brain injury: evidence for involvement in functional outcome, *Journal of Neurotrauma*, 19(10), 1155-1170.
- Kobayashi, D., Kondo, K., Uehara, N., Otokozawa, S., Tsuji, N., Yagihashi, A. & Watanabe, N., 2002. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(10), 3113-3117.
- Kosalec, I., Kopjar, N. & Kremer, D., 2013, Antimicrobial activity of willowherb (*Epilobium angustifolium* L.) leaves and flowers, *Current Drug Targets*, 14(9), 986-991.
- Koycu, N. D., 2019, Effect on *Fusarium culmorum* of fungicides used in wheat seed, *International Congress on Engineering and Life Science*, 593-601.
- Kuck, K. H., Leadbeater, A. & Gisi, U., 2012, FRAC mode of action classification and resistance risk of fungicides, *Modern Crop Protection Compounds*, 539-557.
- Kuhn, D. M., Balkis, M., Chandra, J., Mukherjee, P. K. & 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.
- Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N. & Kobayashi, Y., 2003, Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages, *The Journal of Immunology*, 171(9), 4672-4679.
- 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
- Linares, C. E. B., Giacomelli, S. R., Altenhofen, D., Alves, S. H., Morsch, V. M. & Schetinger, M. R. C., 2013, Fluconazole and amphotericin-B resistance are associated with increased catalase and superoxide dismutase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(6), 752-758.
- Liu, P., Luo, L., Guo, J., Liu, H., Wang, B., Deng, B., Long, C. & Cheng, Y., 2010, Farnesol induces apoptosis and oxidative stress in the fungal pathogen *Penicillium expansum*. *Mycologia*, 102(2), 311-318.
- Liu, H. & Ding, W., 2019, Enantiomeric separation of prothioconazole and prothioconazole-desthio on chiral stationary phases, *Chirality*, 31(3), 219-229.
- Liu, J. F., Xia, J. J., Nie, K. L., Wang, F. & Deng, L., 2019, Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(7), 98.
- Lledías, F., Rangel, P. & Hansberg, W., 1998, Oxidation of catalase by singlet oxygen. *Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10630-10637.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-27.

- Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D., M., Manners, J., M. & Kazan, K., 2013, *Fusarium* pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*, 67, 399-416.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H. & Fröhlich, K. U., 1999, Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *The Journal of Cell Biology*, 145(4), 757-767.
- Mahl, C. D., Behling, C. S., Hackenhaar, F. S., e Silva, M. N. D. C., Putti, J., Salomon, T. B., Alves, S., H., Fuentefria, A. & Benfato, M. S., 2015, Induction of ROS generation by fluconazole in *Candida glabrata*: activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 82(3), 203-208.
- Martinez, M. M., Reif, R. D. & Pappas, D., 2010, Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques, *Analytical Methods*, 2(8), 996-1004.
- Martins, D., Nguyen, D. & English, A. M., 2019, Ctt1 catalase activity potentiates antifungal azoles in the emerging opportunistic pathogen *Saccharomyces cerevisiae*, *Scientific Reports*, 9(1), 1-10.
- Matny, O. N., 2015, *Fusarium* head blight and crown rot on wheat & barley: losses and health risks, *Adv Plants Agric Res*, 2(1), 39.
- McMullen, M., Bergstrom, G., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D., Shaner, G. & Van Sanford, D., 2012, A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* head blight, *Plant Disease*, 96(12), 1712-1728.
- Meletiadiis, 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.
- Millar, A. H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J. L., Bartoli, C. G., Theodoulou, F. L. & Foyer, C. H., 2003, Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses, *Plant Physiology*, 133(2), 443-447.
- Munkvold, G. P., 2017, *Fusarium* species and their associated mycotoxins. *Mycotoxigenic Fungi*, 51-106.
- Nabi, S. U., Raja, W. H., Dar, M. S., Kirmani, S. N. & Magray, M. M., 2017, New generation fungicides in disease management of horticultural crops, *Indian Horticulture Journal*, 7(1), 01-07.
- Negre-Salvayre, A., Coatrieux, C., Ingueneau, C. & Salvayre, R., 2008, Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors, *British Journal of Pharmacology*, 153(1), 6-20.
- Nelson, P. E., Dignani, M. C. & Anaissie, E. J., 1994, Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species, *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4), 479-504.

- Niwa, S., Kubo, K., Lewis, J., Kikuchi, R., Alagu, M. & Ban, T., 2014, Variations for Fusarium head blight resistance associated with genomic diversity in different sources of the resistant wheat cultivar 'Sumai 3', *Breeding Science*, 64(1), 90-96.
- Nordberg, J. & Arnér, E. S., 2001, Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free radical biology and medicine*, 31(11), 1287-1312.
- 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.
- Oros, G. & Ujváry, I., 1999, Botanical fungicides: natural and semi-synthetic ceveratrum alkaloids, *Pesticide science*, 55(3), 253-264.
- Palazzini, J. M., Ramirez, M. L., Torres, A. M. & Chulze, S. N., 2007, Potential biocontrol agents for Fusarium head blight and deoxynivalenol production in wheat, *Crop Protection*, 26(11), 1702-1710.
- Parker, J. E., Warrilow, A. G., Cools, H. J., Martel, C. M., Nes, W. D., Fraaije, B. A., Lucas, C., A., Kelly, D. & Kelly, S. L., 2011, Mechanism of binding of prothioconazole to *Mycosphaerella graminicola* CYP51 differs from that of other azole antifungals, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1460-1465.
- Paul, P. A., Lipps, P. E., Hershman, D. E., McMullen, M. P., Draper, M. A. & Madden, L. V., 2007, A quantitative review of tebuconazole effect on Fusarium head blight and deoxynivalenol content in wheat, *Phytopathology*, 97(2), 211-220.
- Peng, C. A., Gaertner, A. A., Henriquez, S. A., Fang, D., Colon-Reyes, R. J., Brumaghim, J. L., & Kozubowski, L., 2018, Fluconazole induces ROS in *Cryptococcus neoformans* and contributes to DNA damage in vitro, *PLoS One*, 13(12).
- Petkar, A., Langston, D. B., Buck, J. W., Stevenson, K. L., & Ji, P., 2017, Sensitivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* to prothioconazole and thiophanate-methyl and gene mutation conferring resistance to thiophanate-methyl, *Plant Disease*, 101(2), 366-371.
- Phillips, A. J., Sudbery, I. & Ramsdale, M., 2003, Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 14327-14332.
- Pirgozliev, S. R., Edwards, S. G., Hare, M. C. & Jenkinson, P., 2003, Strategies for the control of Fusarium head blight in cereals, *European Journal of Plant Pathology*, 109(7), 731-742.
- Polčic, P. & Forte, M., 2003, Response of yeast to the regulated expression of proteins in the Bcl-2 family, *Biochemical Journal*, 374(2), 393-402.
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Richard-Forget, F. & Ouellet, T., 2007, Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with Tri genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*, *FEBS letters*, 581(3), 443-447.

- Roberts, D., Cotter, H. V. T., Cubeta, M. & Gilger, B. C., 2020, In vitro susceptibility of *Aspergillus* and *Fusarium* associated with equine keratitis to new antifungal drugs. *Veterinary Ophthalmology*.
- Rodrigues, M. L., 2018, The multifunctional fungal ergosterol, *MBio*, 9(5).
- Ronis, A., Jørgensen, L. N., Semaskiene, R., Gaurilcikiene, I. & Ramanauskiene, J., 2014, Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* isolates to demethylation-inhibiting (DMI) fungicides, *Zemdirbyste*, 101(2), 177-184.
- Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S., 1998, Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis, *Nature*, 391(6662), 96-99.
- Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M. & Migheli, Q., 2013, *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat, *Molecular Plant Pathology*, 14(4), 323-341.
- Schisler, D. A., Khan, N. I. & Boehm, M. J., 2002a, Biological control of *Fusarium* head blight of wheat and deoxynivalenol levels in grain via use of microbial antagonists, *Mycotoxins and Food Safety*, 53-69.
- Schisler, D. A., Khan, N. I., Boehm, M. J. & Slininger, P. J., 2002b, Greenhouse and field evaluation of biological control of *Fusarium* head blight on durum wheat, *Plant Disease*, 86(12), 1350-1356.
- Schisler, D. A., Slininger, P. J., Behle, R. W. & Jackson, M. A., 2004, Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases, *Phytopathology*, 94(11), 1267-1271.
- Schisler, D. A., Khan, N. I., Boehm, M. J., Lipps, P. E., Slininger, P. J. & Zhang, S., 2006, Selection and evaluation of the potential of choline-metabolizing microbial strains to reduce *Fusarium* head blight, *Biological Control*, 39(3), 497-506.
- Schisler, D.A., Slininger, P.J., Boehm, M.J. & Paul, P.A., 2011, Co-culture of yeast antagonists of *Fusarium* head blight and their effect on disease development in wheat, *Plant Pathology Journal*, 10(4) 128-137.
- Schroeder, H. W. & Christensen, J. J., 1963, Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 53(7-1), 831-838.
- Seiber, J. N., & Kleinschmidt, L. A., (2011), Contributions of pesticide residue chemistry to improving food and environmental safety: past and present accomplishments and future challenges, *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(14), 7536-7543.
- Sharon, A., Finkelstein, A., Shlezinger, N. & Hatam, I., 2009, Fungal apoptosis: function, genes and gene function, *FEMS Microbiology Reviews*, 33(5), 833-854.
- Shekhova, E., Kniemeyer, O. & Brakhage, A. A., 2017, Induction of mitochondrial reactive oxygen species production by itraconazole, terbinafine, and amphotericin B as a mode of action against *Aspergillus fumigatus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(11).

- Sierotzki, H. & Scalliet, G., 2013, A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides, *Phytopathology*, 103(9), 880-887.
- Snelders, E., Rijs, A. J., Kema, G. H., Melchers, W. J., & Verweij, P. E., 2009, Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles, *Applied and environmental microbiology*, 75(12), 4053-4057.
- Stenzel, K. & Vors, J. P., 2019, Sterol Biosynthesis Inhibitors, *Modern Crop Protection Compounds*, 2, 797-844.
- Stergiopoulos, I. & Dewaard, M. A., 2002, Activity of azole fungicides and ABC transporter modulators on *Mycosphaerella graminicola*, *Journal of Phytopathology*, 150(6), 313-320.
- St-Germain, G. & Summerbell, R. C., 1996, *Fusarium* identifying filamentous fungi, *Blackwell Science*, 122-123.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, M., Goodlett, D., R., Aebersold, R., Siderovski, D., P., Penninger, J., M. & Kroemer, G., 1999, Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718), 441-446.
- Tait, S. W. & Green, D. R., 2008, Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut, *Oncogene*, 27(50), 6452-6461.
- Talas, F. & McDonald, B. A., 2015, Significant variation in sensitivity to a DMI fungicide in field populations of *Fusarium graminearum*, *Plant Pathology*, 64(3), 664-670.
- Tarazona, A., Mateo, E. M., Gómez, J. V., Romera, D., & Mateo, F., 2019, Potential use of machine learning methods in assessment of *Fusarium culmorum* and *Fusarium proliferatum* growth and mycotoxin production in treatments with antifungal agents. *Fungal Biology*.
- Thomas, M. J., 2000, The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition*, 16(7-8), 716-718.
- Tongul, B., & Tarhan, L., 2016, Oxidant and antioxidant status in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to antifungal ketoconazole, *Process Biochemistry*, 51(12), 1984-1991.
- Trail, F., 2009, For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era, *Plant Physiology*, 149(1), 103-110.
- Van Der Kerk, G. J. M., 1969, The development of synthetic fungicides; trends and prospects, *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 75(1), 5-20.
- Vela-Corcía, D., Romero, D., de Vicente, A. & Pérez-García, A., 2018, Analysis of β -tubulin-carbendazim interaction reveals that binding site for MBC fungicides does not include residues involved in fungicide resistance, *Scientific Reports*, 8(1), 1-12.

- Volinsky, R. & Kinnunen, P. K., 2013, Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: from biophysics to physiology and molecular pathology, *The FEBS Journal*, 280(12), 2806-2816.
- Von Schmeling, B. & Kulka, M., 1966, Systemic fungicidal activity of 1,4-oxathiin derivatives, *Science*, 152(3722), 659-660.
- Wagacha, J. M. & Muthomi, J. W., 2007, *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat, *Crop Protection*, 26(7), 877-885.
- Wang, Y. Z. & Miller, J. D., 1988, Effects of *Fusarium graminearum* metabolites on wheat tissue in relation to Fusarium head blight resistance, *Journal of Phytopathology*, 122(2), 118-125.
- Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., & Wei, X., 2014, Farnesol induces apoptosis-like cell death in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*, *Mycologia*, 106(5), 881-888.
- Wegulo, S. N., Baenziger, P. S., Nopsa, J. H., Bockus, W. W. & Hallen-Adams, H., 2015, Management of Fusarium head blight of wheat and barley, *Crop Protection*, 73, 100-107.
- Wise, K. A., Bradley, C. A., Markell, S., Pasche, J., Delgado, J. A., Goswami, R. S. & Gudmestad, N. C., 2011, Sensitivity of *Ascochyta rabiei* populations to prothioconazole and thiabendazole, *Crop Protection*, 30(8), 1000-1005.
- Xu, C., Li, M., Zhou, Z., Li, J., Chen, D., Duan, Y. & Zhou, M., 2019. Impact of five succinate dehydrogenase inhibitors on DON biosynthesis of *Fusarium asiaticum*, causing Fusarium head blight in wheat. *Toxins*, 11(5), 272.
- Xu, X. & Nicholson, P., 2009, Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight, *Annual Review of Phytopathology*, 47, 83-103.
- Xue, A., Voldeng, H. & Savard, M., Fedak, G., 2009, Biological management of Fusarium head blight and mycotoxin contamination in wheat, *World Mycotoxin Journal*, 2(2), 193-201.
- Xue, A. G., Chen, Y. H., Sant'anna, S. M. R., Voldeng, H. D., Fedak, G., Savard, M. E., Längle, T., Zhang, J. X. & Harman, G. E., 2014a, Efficacy of CLO-1 biofungicide in suppressing perithecial production by *Gibberella zeae* on crop residues, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36(2), 161-169.
- Xue, A. G., Chen, Y., Voldeng, H. D., Fedak, G., Savard, M. E., Längle, T., Zhang, J. & Harman, G. E., 2014b, Concentration and cultivar effects on efficacy of CLO-1 biofungicide in controlling Fusarium head blight of wheat, *Biological Control*, 73, 2-7.
- Yang, C., Hamel, C., Vujanovic, V. & Gan, Y., 2011, Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms, *ISRN Ecology*, 2011.
- Yin, H., Xu, L. & Porter, N. A., 2011, Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis, *Chemical Reviews*, 111(10), 5944-5972.

- Yörük, E., 2018, Tetraconazole leads to alterations in *Fusarium graminearum* at different molecular levels, *Applied Ecology and Environmental Research*, 16, 6155-6167.
- Yörük, E., Albayrak, G., 2019, siRNA quelling of tri4 and tri5 genes related to deoxynivalenolsynthesis in *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Journal of Environmental Biology*, 40(3), 370-376.
- Yun, S. H., Arie, T., Kaneko, I., Yoder, O. C. & 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.
- Zeiss, C. J., 2003, The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice, *Veterinary Pathology*, 40(5), 481-495.
- Želonková, K., Havadej, S., Verebová, V., Holečková, B., Uličný, J. & Staničová, J., 2019, Fungicide tebuconazole influences the structure of human serum albumin molecule, *Molecules*, 24(17), 3190.
- Zemankoa, M. & Lebeda, A., 2001, *Fusarium* Species, their taxonomy, variability and significance, *Plant Protection Science*, 37(1), 25-42.
- Zhai, W., Zhang, L., Cui, J., Wei, Y., Wang, P., Liu, D. & Zhou, Z., 2019, The biological activities of prothioconazole enantiomers and their toxicity assessment on aquatic organisms, *Chirality*, 31(6), 468-475.
- Zhang, X., Chen, J., Graham, S. H., Du, L., Kochanek, P. M., Draviam, R., Guo, F., Nathaniel, P., D., Szabó, C., Watkins, S., C. & Clark, R. S., 2002, Intranuclear localization of apoptosis-inducing factor (AIF) and large scale DNA fragmentation after traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite, *Journal of Neurochemistry*, 82(1), 181-191.
- Zhang, X., Chen, Y., Jenkins, L. W., Kochanek, P. M. & Clark, R. S., 2004, Bench-to-bedside review: Apoptosis/programmed cell death triggered by traumatic brain injury, *Critical Care*, 9(1), 66.
- Zhang, L., Jia, X., Chen, C. & Zhou, M., 2013, Characterization of carbendazim sensitivity and trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* in Jiangsu Province of China, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 84, 53-60.
- Zhang, Z., Gao, B., He, Z., Li, L., Zhang, Q., Kaziem, A. E. & Wang, M., 2019, Stereoselective bioactivity of the chiral triazole fungicide prothioconazole and its metabolite, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 160, 112-118.
- Zhang, T., Cao, Q., Li, N., Liu, D. & Yuan, Y., 2020, Transcriptome analysis of fungicide-responsive gene expression profiles in two *Penicillium italicum* strains with different response to the sterol demethylation inhibitor (DMI) fungicide prochloraz, *BMC Genomics*, 21(1), 156.

Zhu, J., Zhang, L., Li, T., Ma, D., Gao, Y., Mu, W. & Liu, F., 2020, Baseline sensitivity of *Corynespora cassiicola* to metconazole and efficacy of this fungicide, *Crop Protection*, 130, 105056.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Mehmet ARSLAN
Doğum Yeri	Ordu
Doğum Tarihi	31.05.1994
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	05344141598
E-Posta Adresi	arslanmehmet1994@gmail.com
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 Biyoloji ve Genetik