



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



Yüksek Lisans Tezi

**TEBUKONAZOLÜN *Fusarium* REFERANS SUŞLARI ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN HÜCRESEL VE MOLEKÜLER GÖSTERİMİ**

Özlem SEFER

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK**

**II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Emre YÖRÜK**

Ağustos, 2021

İSTANBUL

Bu alışma, 3.08.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

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

Doç. Dr. Aslıhan TEMEL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Sibel YILMAZ
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversite
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 abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 36297 numaralı projesi ile desteklenmiştir

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

Bildiri

Sefer, Ö., Yörük, E., Albayrak, G. The Effects of Tebuconazole on Cellular and Molecular Level of *Fusarium* Reference Strains, II. International Agricultural, Biologica and Life Science Conference, 1-3 September 2020, Edirne E-congress, 243

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda desteğini ve sevgisini gördüğüm, bilgisini ve tecrübesini paylaşan değerli danışmanım Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK'a,

Lisans eğitimimden beri her zaman bilgisini ve tecrübesini paylaşan, sonsuz sabırla bana vakit ayıran değerli hocam Doç. Dr. Emre YÖRÜK'e,

Çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Uzm. Merve Seda İBİŞOĞLU ve Kübra ŞAHİN'e

Bu çalışmada projeyi destekleyen İ.Ü. Bilimsel Araştırma Fonuna ve çalışmalarım süresince imkanlarından yararlandığım İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi ile Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü saygıdeğer öğretim üyelerine,

Bana olan inançlarını ve sonsuz sevgisini her zaman hissettiren, desteklemekten vazgeçmeyen canım AİLEME,

En içten şekilde teşekkür eder, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Ağustos 2021

Özlem SEFER

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET.....	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. BİTKİ PATOJENLERİ.....	3
2.2. FUNGAL PATOJENLER.....	4
2.3. <i>Fusarium</i> TÜRLERİ	6
2.4. <i>Fusarium</i> TÜRLERİ İLE MÜCADELE.....	9
2.4.1. Uçucu Esansiyel Yağlar	9
2.4.2. Antagonistik Ajanların Kullanımı	10
2.4.3. Dirençli Bitki Elde Etme.....	11
2.4.4. Zirai İlaçların Kullanımı	12
2.5. ZİRAİ İLAÇLARIN ETKİ MEKANİZMASI	13
2.5.1. Tebukonazol	16
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	19
3.1. REFERANS SUŞLARIN ÜRETİMİ.....	19
3.2. TEBUKONAZOLÜN ETKİLİ DOZLARININ BELİRLENMESİ	20
3.3. GENOMİK DNA (gDNA) İZOLASYONU VE ANALİZİ.....	20
3.4. PRİMER TASARIMI	22
3.5. <i>cyp51A</i> GENİNİN PZR İLE ÇOĞALTIMI VE DİZİ ANALİZİ	22
3.6. APOPTOZUN HÜCRESEL GÖSTERİMİ.....	24
3.7. OKSİDATİF STRESİN HÜCRESEL GÖSTERİMİ.....	24
3.8. HÜCRELERİN PROLİFERASYON TESTİ	25
3.9. PROTEİN İZOLASYONU VE MİKAR TAYİNİ	25
3.10. KATALAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ	26

3.11. TOTAL RNA İZOLASYONU VE cDNA SENTEZİ	26
3.12. q-PCR ANALİZİ	27
4. BULGULAR	29
4.1. TEBUKONAZOLÜN FUNGAL BÜYÜMEYE ETKİSİ.....	29
4.2. gDNA İZOLASYONU VE ANALİZİ.....	31
4.3. TASARLANAN OLİGONUKLEOTİD PRİMERLER VE ÖZELLİKLERİ.....	31
4.4. <i>cyp51A</i> GENİ ÇOĞALTIMI VE SEKANS ANALİZİNE AİT BULGULAR	32
4.5. APOPTOZUN HÜCRESEL GÖSTERİMİ.....	35
4.6. OKSİDATİF STRESİN HÜCRESEL GÖSTERİMİ.....	36
4.7. TEBUKONAZOLÜN PROLİFERASYON ORANI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN GÖSTERİMİ.....	36
4.8. PROTEİN MİKTAR TAYİNİ İLE İLGİLİ BULGULAR.....	37
4.9. KATALAZ ENZİM AKTİVİTE BULGULARI	38
4.10. GEN ANLATIMI ANALİZİ BULGULARI.....	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	43
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	65

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Bir fungusun genelleştirilmiş yaşam döngüsü (Reece ve diğ., 2013)..... 4
- Şekil 2.2:** Tebukonazol'ün yapısal formülü..... 17
- Şekil 4.1:** Tebukonazol uygulamasının *F. graminearum* PH-1 (A) ve *F. culmorum* FcUK99 (B) referanslarının yedi günlük kültürlerinin doğal üremesinde neden olduğu azalmanın grafikte gösterilmesi. 29
- Şekil 4.2:** *F. graminearum* PH-1 (A) ve *F. culmorum* FcUK99 (B) referans suşlarının kontrol, normalizasyon (etanol içeren) ve artan konsantrasyonda tebukonazol uygulamasına maruz bırakılan kültürlerine ait yedinci gün üreme durumları..... 30
- Şekil 4.3:** *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUK99 izolatlarına ait gDNA izolasyonun jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kb DNA markır (Biomatik, Kanada). 31
- Şekil 4.4:** PH-1 ve FcUK99 referanslarından PZR ile çoğaltılan *cyp51A* geni ve saflaştırma ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri. 1: negatif kontrol, 2: 1 kb markır (Thermo, ABD), 3: PH-1 izolatının PZR ürünü, 4: PH-1 izolatına ait saflaştırma ürünü, 5: FcUK99 izolatının PZR ürünü, 6: FcUK99 izolatına ait saflaştırma ürünü..... 32
- Şekil 4.5:** *F. graminearum* PH-1 izolatına ait *cyp51A*-F primeri ile dizilenen kromatogram..... 33
- Şekil 4.6:** *F. graminearum* PH-1 suşunun *cyp51A* gen diziliminin ileri (mavi) ve geri (mor) primerlere ait okumalarının DNA Dragon yazılımı ile birleştirilmiş dizi. 33
- Şekil 4.7:** *F. graminearum* PH-1, *F. culmorum* FcUK99 ve veritabanına kayıtlı örnek aksesyonun. CYP51A proteinlerinin amino asit dizilimlerinin çoklu hizalama analizi. 34
- Şekil 4.8:** *F. culmorum* FcUK99 (1) ve *F. graminearum* PH-1 (2) suşlarında kontrol (a), normalizasyon (b) ve EC₅₀ doz uygulaması (c) yapılan deney gruplarının AO/EB boyaması sonucu ışık mikroskobu ve floresan mikroskop (*:TexasRED ve GFP filtreleri) görüntüleri..... 35
- Şekil 4.9:** *F. culmorum* FcUK99 (1) ve *F. graminearum* PH-1 (2) suşlarında kontrol (a), normalizasyon (b) ve EC₅₀ doz uygulaması (c) yapılan deney gruplarının DCF-DA boyaması sonucu ışık mikroskobu ve floresan mikroskop (*: FITCH filtresi) görüntüleri. 36
- Şekil 4.10:** Tebukonazol aktif bileşiğinin *F. graminearum* PH-1 (A) ve *F. culmorum* FcUK99 (B) referans ırklarının hücre canlılığına etkisinin grafikte gösterimi. 37

Şekil 4.11: Standart serilerinin miktarına bağlı absorbands değerlerinden elde edilen standart eğim grafiği.	38
Şekil 4.12: <i>F. graminearum</i> PH-1(A) ve <i>F. culmorum</i> FcUK99 (B) referans suşlarına ait kontrol, normalizasyon ve deney gruplarının katalaz enzim aktivitesi miktar ve değişimleri.	39
Şekil 4.13: 7 günlük <i>Fusarium</i> kültürlerinden elde edilen total RNA molekülleri.1: FcUK99 Kontrol, 2: FcUK99 Normalizasyon, 3: FcUK99 EC ₅₀ , 4: PH-1 Kontrol, 5: PH-1 Normalizasyon, 6: PH-1 EC ₅₀	40
Şekil 4.14: <i>F. graminearum</i> PH-1(A) ve <i>F. culmorum</i> FcUK99 (B) referans suşlarında tebukonazolün etkisi ile değişen <i>cyp51A</i> ve <i>mgvl</i> genlerinin anlatım profilleri.	41



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Dünya çapında fungusit direncinin ilk ortaya çıkış tarihleri ve direncin gelişmesi için gereken süreler (Brent ve Hollomon, 2007).....	13
Tablo 2.2: Dünyada kullanılan zirai ilaç sınıflandırması ve bazı kimyasal gruplar ile özellikleri.....	14
Tablo 2.2 (devam): Dünyada kullanılan zirai ilaç sınıflandırması ve bazı kimyasal gruplar ile özellikleri.....	15
Tablo 3.1: <i>Fusarium</i> izolatlarının üretilmesinde kullanılan besi ortamları ve içerikleri.	19
Tablo 3.2: TAE tamponuna ait bileşenler ve konsantrasyonları.....	21
Tablo 4.1: Tez çalışması boyunca kullanılan primerler ve özellikleri.....	32
Tablo 4.2: <i>F. graminearum</i> PH-1 ve <i>F. culmorum</i> FcUK99 referans suşlarına ait <i>cyp51A</i> gen dizilimlerinin ileri ve geri okumalarının veritabanlarındaki hit blastN analizleri (genom eşleşmesi kromozom: II).....	34
Tablo 4.3: Standart serisine ve izole edilen proteinlere ait absorbans değeri ile konsantrasyon miktarı.	38
Tablo 4.4: Referans <i>Fusarium</i> suşlarına ait kontrol, normalizasyon ve deney gruplarına ait katalaz enzim aktivite tayini.	38
Tablo 4.5: <i>Fusarium</i> suşlarının normalizasyon ve deney gruplarına ait ΔC_p ve $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri.....	41

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
α	: Alfa
β	: Beta
μ	: mikro
Δ	: Delta
$\pm$	: Standart Sapma
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat Derece
cm^2	: Santimetre Kare
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
M	: Molar
ng:	: Nanogram
g	: Gram
mg	: Miligram
μg	: Mikrogram
L	: Litre
μm	: Mikrometre
μL	: Mikrolitre
V	: Volt
A	: Amper
UV	: Ultraviyole
+	: Artı
-	: Eksi
>	: Büyüktür
<	: Küçüktür
rpm	: Dakikadaki devir sayısı, “Revolutions Per Minute”
bç	: Baz Çifti
nm	: Nanometre
U	: Ünite
Mb	: Megabaz

Kısaltmalar	Açıklama
EC₅₀	: Büyüme engelleyici %50 etkin konsantrasyon
AO	: Akridin turuncusu, “Acridine Orange”
EB	: Edityum Bromür
DCF-DA	: Dichlorofluorescein diacetate
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, “quantitative polymerase chain reaction”
ZEN	: Zearalenon
DON	: Deoksinivalenol
3-ADON	: 3- Asetildeoksinivalenol
15-ADON	: 15-Asetildeoksinivalenol
DAS	: Diasetoksycirpenol
NIV	: Nivalenol
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü, “The Food and Agriculture Organization”
Kİ	: Kinon İnhibitörü
DMİ	: Demetilasyon İnhibitörü
MBK	: Metil Benzimidazol Karmabat
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
gDNA	: Genomik Deoksiribonükleik Asit
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi, “National Center for Biotechnology Information”
PDA	: Patates Dekstroz Agar
PDB	: Patates Dekstroz Broth
SNA	: Sentetik Nutrient Agar
SNB	: Sentetik Nutrient Broth
RNA	: Ribonükleik Asit
OD	: Optik Densite
BSA	: Sığır Serum Albumin, “Bovin Serum Albumin”
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
IC₇₅	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun %75
IC₅₀	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun %50
IC₂₅	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun %25
LGR	: Doğrusal Üreme Oranı, “Linear Growth Rate”

R²	: Determinasyon Değeri
Cp	: Eşik Noktası, “Crossing point”
SOD	: Süperoksit dismutaz



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEBUKONAZOLÜN *Fusarium* REFERANS SUŞLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN HÜCRESEL VE MOLEKÜLER GÖSTERİMİ

Özlem SEFER

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Gülrüh ALBAYRAK

II. Danışman : Doç. Dr. Emre YÖRÜK

Bu yüksek lisans tezi kapsamında tarım alanlarında sıklıkla kullanılan tebukonazol aktif maddesinin *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUK99 referans suşlarında moleküler ve hücresel seviyedeki etkileri araştırılmıştır.

Bu amaçla referans suşlarının agar dilüsyon tekniği ile tebukonazol uygulanarak suşların üremesini %50 oranında düşüren etkili konsantrasyon (EC_{50}) değeri belirlendi. PH-1 suşunun EC_{50} değeri $0.94\mu\text{g/mL}$ iken FcUK99 suşunu EC_{50} değerinin $0.8\mu\text{g/mL}$ olduğu tespit edildi. *cyp51A* geninin varlığı ve dizilimi her iki izolatta dizilenerek dizi varyasyonu ile etki mekanizması arasındaki ilişki irdelendi. EC_{50} değerine göre aktif maddenin *Fusarium* türleri üzerinde hücre canlılığına etkisi WST-1 analizi ile araştırıldı ve PH-1 suşunda %57.43 oranında, FcUK99 suşunda %64.24 oranında canlılığın baskılandığı görüldü. Floresan mikroskop analizlerinde tebukonazolün apoptotik sürece katkısı akridin turuncusu/etidyum bromür (AO/EB) ikili boyaması yapılarak araştırılırken, oksidatif stres üzerindeki etkinliği ise 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) tekli boyaması ile incelendi. Bununla birlikte katalaz aktivitesinin *F. culmorum* ve *F. graminearum*'da sırasıyla 3.076 ve 4.062 kat arttığı tespit edildi. Aktif maddenin hedef geni olan *cyp51A* ile *Fusarium* türleri için elzem olan *mgv1* genlerinin anlatımında meydana gelen değişimler gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (ing., “quantitative polymerase chain reaction; qPCR,) ile araştırıldı. Ortalama E değeri 2.04 ± 0.03 olarak hesaplandı. *cyp51A* geninin anlatımının FcUK99 suşunda 7.426 ± 0.48 , PH-1

suşunda 15.47 ± 0.75 kat arttığı tespit edildi. *mgv1* geninin anlatımında da artış görülmüş olup FcUK99 için 3.056 ± 0.16 , PH-1 için ise 2.113 ± 0.04 kat olduğu hesaplandı. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, tebukanozolün apoptoz ve oksidatif stres oluşturarak *Fusarium* hücrelerine zarar verdiğini ve iki farklı türde bilinen inhibisyon mekanizması dışındaki hücresel ve moleküler etkilerini anlamamızı sağlayacak veri oluşturmuştur. Çalışmadan elde edilen bulgular, *Fusarium* patojenleriyle mücadelede kullanılacak stratejiler için değerli veriler sunmaktadır.

Ağustos 2021, 84 sayfa.

Anahtar kelimeler: Apoptoz, *Fusarium* spp., Gen Anlatım, Katalaz, Sitotoksisite, Tebukonazol

SUMMARY

M.Sc. THESIS

CELLULAR AND MOLECULAR DISPLAY OF THE EFFECT OF TEBUCONAZOLE ON *Fusarium* REFERENCE STRAINS

Özlem SEFER

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK

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

In the master thesis, the effect of tebuconazole active substance, which is frequently used in agricultural fields, on *F. graminearum* PH-1 and *F. culmorum* FcUK99 reference strains were investigated at molecular and cellular levels.

In this context, the effective concentration (EC₅₀) value, which reduces the growth by 50%, was determined by applying tebuconazole to reference strains with agar dilution technique. The EC₅₀ value was calculated 0.94µg/mL for the PH-1 strain while the EC₅₀ value for FcUK99 was detected 0.8µg/mL. After the presence of the *cyp51A* gene was determined and sequenced in both isolates, the relationship between the sequence variations and the mechanism of action of tebuconazole was examined. After the presence and sequence of the *cyp51A* gene were sequenced in both isolates and the relationship between sequence variation and mechanism of action was investigated. According to EC₅₀ value, the effect of active substance on cell viability on *Fusarium* species was investigated by WST-1 analysis. It was observed that cell viability was suppressed at a rate of 57.43% in PH-1 and 64.24% in FcUK99. In fluorescence microscopy analysis, the effect of tebuconazole on the apoptotic process was revealed by performing with acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) dual staining and on oxidative stress with 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) single staining. Moreover, it was determined that

catalase activity increased 3.076 and 4.062 times in *F. culmorum* and *F. graminearum*, respectively. Changes in expression of *cyp51A*, which is the target gene of the active substance, and *mgv1*, which is an essential for *Fusarium* species, were detected by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The average E value was calculated as 2.04 ± 0.03 . It was calculated that *cyp51A* gene expression increased 7.426 ± 0.48 fold in FcUK99 and 15.47 ± 0.75 fold in PH-1 strains. At the same time, increase in the expression of the *mgv1* was also detected. Values were found as 3.056 ± 0.16 fold for FcUK99 and 2.113 ± 0.04 fold for PH-1. The findings revealed that tebuconazole was effective on the viability of *Fusarium* species both by activating the apoptotic process and by causing oxidative stress. It also enabled us to understand the cellular and molecular mechanisms of this active compound beside its known inhibition effect. Therefore, the data obtained from the master's thesis has a high potential to be used in the fight against *Fusarium* pathogens in plant pathology field.

August 2021, 84 pages.

Keywords: Apoptosis, Catalase, Cytotoxicity, *Fusarium* spp., Gene Expression, Tebuconazole

1. GİRİŞ

F. graminearum ve *F. culmorum* dünya genelinde küçük taneli tahıllardan süs bitkilerine kadar farklı bitki türlerini enfekte ederek başak yanıklığı ve kök/kök boğazı çürüklüğü hastalıklarına yol açmaktadırlar. Sadece bitkilerde gözlenen hastalıklardan ve ekonomik kayıplardan sorumlu olmakla kalmadıkları, aynı zamanda ürettikleri mikotoksinleri aracılığı ile insan ve hayvan sağlığını da olumsuz etkiledikleri için bu iki *Fusarium* türü ile tarımsal alanlarda mücadele önem arz etmektedir (Özer ve Soran, 1991; Nelson ve diğ., 1994, Waalwijk ve diğ., 2003). Mücadele kapsamında; patojene dirençli bitki hatları geliştirilmekte, hastalıktan ari fide kullanılmakta, hastalık bulunduran bitkiler ekim alanlarından uzaklaştırılmakta, solarizasyon uygulanmakta, antogonistik etkili türler tanımlanmakta, kimyasal mücadeleden yararlanılmakta, bitki türevli kimyasal maddeler ve sentetik zirai ilaçlar kullanılmaktadır.

Mücadele yöntemlerinden birisi olan zirai ilaçla mücadele; düşük maliyeti, uygulama kolaylığı ve birden fazla bitki patojenine karşı etkili olabildiğinden en çok tercih edilen yaklaşımdır (Kimura ve diğ., 2007). Çok sık kullanılmasına karşın zirai ilaçların funguslar üzerindeki hücresel ve moleküler düzeydeki etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Gerçekleştirilen araştırmaların büyük çoğunluğu zirai ilaçlara karşı gelişen direncin belirlenmesi, populasyon içerisinde takibi, genel etki mekanizmasının anlaşılması ve insan sağlığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi üzerine yoğunlaşmıştır.

Bu yüksek lisans tezi kapsamında ise zirai ilaç olarak kullanılan tebukonazol aktif maddesinin *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUK99 suşlarının büyümesini %50 engelleyen etkin konsantrasyon (EC_{50}) değeri belirlendi, EC_{50} doz uygulamasının neden olduğu oksidatif stres ve apoptotik süreç hücresel düzeyde sırasıyla AO/EB ve DCF-DA boyamaları ile incelendi ve floresan mikroskopisi ile görüntülendi. Oksidatif stres etkisi değişen katalaz aktivitesi ile de gösterildi. Tebukonazolün proliferasyon üzerindeki toksik etkisi araştırıldı, ayrıca hedeflediği *cyp51A* geni ve hücre bütünlüğü ile üremeden sorumlu olan *mgv1* geninin anlatımında neden olduğu değişim gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (ing., “quantitative polymerase chain reaction; qPCR) ile analiz edildi. *cyp51A* genindeki varyasyonların direnç gelişimi ile ilişkisi polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılan gen bölgesine ait sekansların hizalama çalışmaları ile de irdelendi. Tebukonazolün *Fusarium* türleri üzerindeki hücresel ve moleküler

düzeydeki etkisinin belirlendiği yüksek lisans tezi, tebukonazolün ya da bu bileşiği içeren antifungallerin tarım arazilerinde kullanımına yönelik yönetim programlarına veri ve literatüre de katkı sağlanmıştır.



2. GENEL KISIMLAR

Fusarium türlerinin neden olduğu hastalıklar yaşanan iklim değişimi ile küresel bir problem haline gelmiştir. Zirai antifungal ilaçlar içerisinde yer alan tebukonazol, ülkemizde 1988 yılında ruhsatlandırılmıştır (<https://bku.tarim.gov.tr>)¹. O tarihten günümüze bitki patojenleri ile mücadelede etkin biçimde kullanılmaktadır. Zirai ilaç gruplarından triazol sınıfına dahil edilen tebukonazolün, CYP51 proteini ve ergosterol sentezini baskılayarak fungus üremesini sınırladığı bilinmektedir (Diao ve diğ. 2018). Ancak, literatürde tebukonazole maruz kalan patojenik türlerde hücresel düzeyde meydana getirdiği oksidatif stres, apoptoz ve özgün gen anlatım düzeylerinde neden olduğu değişimler hakkında detaylı bir bilgi yer almamaktadır.

Bu nedenle, yüksek lisans tezi kapsamında antifungal ajan olarak kullanılan tebukonazolün *Fusarium* referans suşları üzerindeki etki mekanizmaları hücresel ve moleküler düzeyde ilk kez araştırılmıştır. Aktif bileşiğin inhibe edici minimum konsantrasyonunun belirlenmesi ile fazla dozda kimyasal kullanılmayarak patojenlerin bu aktif bileşiğe karşı direnç kazanmasının önüne geçilmesi düşünülmektedir. Ayrıca etkin doz ile tebukonazolün kullanılacağı zirai ilaç kombinasyonlarının oluşturulmasında az miktar kimyasal ile etkin koruma sağlanmasını geliştirilecek stratejilere katkı sağlayacaktır.

2.1. BİTKİ PATOJENLERİ

Fitopatoloji, Yunancada “phton” (bitki), “pathos” (patoloji) ve “logos” (bilim) kelimelerinden türetilmiştir. Fitopatolojinin başlıca çalışma alanları; bitkileri enfekte eden organizmaların ve bu patojenlerin sebep olduğu bitki hastalıklarının tanımlanması, zarar düzeylerinin belirlenmesi ve onlara karşı mücadele stratejilerinin geliştirilmesidir.

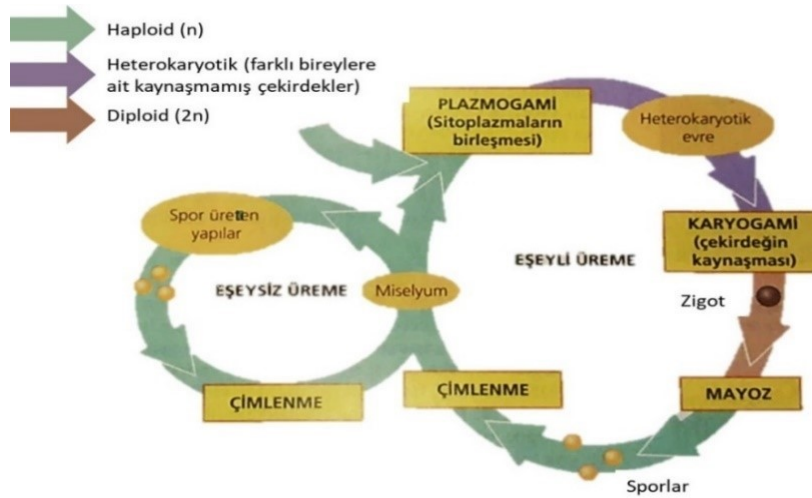
Bitkiler ekosistem içerisinde toprak ve iklim koşullarına bağlı olarak gelişimlerini ve üremelerini sürdürürler. Ancak tüm canlılar gibi bitkiler de biyotik ve abiyotik çevresel faktörler ile etkileşim içindedirler. Bitkilerde gözlenen çeşitli hastalıklar viroidler ve virüsler ile birlikte çeşitli prokaryotik ve ökaryotik organizma grupları tarafından meydana getirilir (Dyakov ve diğ., 2007; Karaca, 2018). Bir patojenin bitkilerde hastalık oluşturmaları sadece biyotik faktörlere bağlı değil, çevresel faktörlerin etkisine de bağlı olabilmektedir. Bitki

¹ <https://bku.tarim.gov.tr> [Ziyaret Tarihi 06.04.2021]

gelişimini olumsuz etkileyen abiyotik faktörler ortadan kalktığında patojenin yol açtığı hastalık etkisinin azaldığı hatta tamamen ortadan kalktığı, buna karşın hastalık etmeni organizmanın ortamdan uzaklaşması durumunda bile hastalığın iyileşmediği bilinmektedir (Karaca, 2018). Funguslar, bitki patojenleri içerisindeki en büyük grup olarak bilinmektedir ve bitki hastalıklarının %75'inden sorumludur (Prescott ve diğ., 1990; Agrios, 1997; Dickenson, 2003; Arıcı, 2018).

2.2. FUNGAL PATOJENLER

Funguslar mikroskop altında gözlenebilen küçük boyutlu tek hücreli olan mayadan, çok hücreli şapkaklı funguslara kadar geniş bir çeşitlilik gösteren ökaryotik organizmalardır. Klorofil taşımazlar. Hücre duvarına sahiptirler. Zarlı organelleri bulunur. Bazı hücreler birden fazla çekirdeğe sahip olabilir (Prescott ve diğ., 1990). Funguslar türün özelliğine ve ortam şartlarına bağlı olarak eşeyli ve/veya eşeysiz üreme gösterebilirler. Eşeysiz üreme; bölünme, tomucuklanma, spor oluşturma ve fragmantasyon şeklinde dört farklı tipte meydana gelebilir (Prescott ve diğ., 1990; Watkinson ve diğ. 2015). Funguslarda eşeyli üreme gametangiyogami ile gerçekleşir (Tutel ve Çırpıcı, 1999; Trail, 2009). Bu süreç, haploid yapıda hücrelerin kaynaşarak sitoplazmalarının birleşmesinin (plazmogami) ardından heterokaryotik evreye geçen çekirdeklerin birleşerek zigotu meydana getirmesi (karyogami) ile gerçekleşir. Diploid yapıdaki zigotun ($2n$) mayoz bölünme geçirerek haploid sayıda kromozom (n) taşıyan sporları oluşturmasını kapsar (Prescott ve diğ., 1990; Reece ve diğ., 2013) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Bir fungusun genelleştirilmiş yaşam döngüsü (Reece ve diğ., 2013).

Toprakta, tatlı sularda, havada ve hatta denizlerde yaşayan fungus türleri bilinmekle birlikte çoğunlukla karasal ortamda toprak habitatında yaygındırlar. Dünya genelinde günümüze kadar ortalama 100.000 fungus tanımlanmış ve bunlar arasından yaklaşık 10.000 türün bitkilerde hastalık etmeni olduğu bildirilmiştir (Arıcı, 2018). Bitki patojeni funguslar, yaşam döngüsünün büyük bir kısmını genellikle bitkiler veya bitki artıkları üzerinde geçirirler (Prescott ve diğ., 1990; Agrios, 1997; Mueller ve diğ., 2004). Konak organizmada gösterdikleri yaşam formlarına göre adlandırılırlar. Kendi yaşam döngüsü için besin ihtiyacını konak organizmanın dokularından sağlayan ancak konak organizmayı öldürmeyenler biyotrofik grup üyeleridir. Nekrotrofik grup ise kendi varlığını sürdürürken konak organizmanın ölümüne sebep olur. Her iki yaşam stratejisini benimseyen hemi-biyotrofik türler ise, bitki üzerinde önce biyotrofik yaşam biçimine sahipken yaşam döngüsünün ileri aşamalarında nekrotrofik özellik göstererek konak bitkinin ölümüne sebep olurlar (Dickenson, 2003; Arıcı, 2018).

Fungal hastalıklar tahıllardan, sebze ve meyvelere kadar çok çeşitli bitkilerde görülmektedir (Özer ve Soran, 1991). Türün neden olduğu hastalık semptomları fungusla enfekte bitkilerin belirli dokularında, organlarında veya bitkinin tamamında ortaya çıkar. Bitkilerde yaygın olarak görülen semptomlar; lekeler (ing., spots), solgunluk (ing., wilts), mantarlaşma (ing., blight), çürüklük (ing., rots), kanser (ing., cankers), geriye ölüm (ing., dieback), çökerten (ing., damping off), çökme (ing., decline), pas (ing., rusts), küf (ing., mildews) ve küllemedir (ing., powdery mildew) (Strange, 2003; Doohan, 2014). Temel besin kaynaklarından tahıllardaki en yaygın fungal hastalıklar; kök/kök boğazı çürüklüğü, sap ve yaprak hastalıkları, başak yanıklıkları olmak üzere üç başlık altında toplanabilir.

Bitkide hastalık yapan funguslar, bitkinin gelişimini olumsuz etkilemekle kalmaz birçoğu aynı zamanda hastalık sürecinde mikotoksin denilen çeşitli sekonder metabolitleri üretirler. Bitki patojeni türlerin ürettiği bu mikotoksinler sadece bitkileri etkilemez, mikotoksin bulaşmış ürünle beslenen insan ve hayvanların da sağlığını tehdit ederler (Oruç, 2005; Ismaiel ve Papenbrock, 2015; Arıcı, 2018). Ancak antibiyotik etki gösten bazı mikotoksinlerin insan sağlığını korumada faydalandığı da bilinmektedir (Brown ve Proctor, 2013). Funguslar tarafından 300'den fazla mikotoksinin üretildiği belirlenmiştir. Bunlar arasından aflatoksinler, sitrinin, patulin, penisilik asit, tenuazonik asit, okratoksin A, sitokalsinler, deoksinivalenol, moniliformin, enniatin, fumonisin, fusarin C, fusarik asit ve zearalenon tahılları kontamine eden mikotoksinler olarak kabul edilirler. Doğada sık görülen *Fusarium* türleri, çeşitli toksin üretme

yeteneğine sahip olması ve toksinleri aracılığı ile sağlık sorunlarına sebebiyet vermesinden dolayı mikotoksin üreten funguslar arasında en çok çalışılan türlerdendir (Yörük ve Albayrak, 2012; Munkvold, 2017).

2.3. *Fusarium* TÜRLERİ

Fusarium cinsi taksonomik olarak Ascomycota bölümünden, Sordariomycetidae sınıfının, Hypocreales takımının bir üyesidir (Özer ve Soran, 1991; Nelson ve diğ., 1994; Goswami ve Kistler, 2004). *Fusarium* türleri tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de özellikle ekonomik değere sahip tahıl ürünlerinde (arpa, buğday, mısır, pirinç, çavdar, yulaf gibi) yıkıcı hastalıkların etmeni olarak bilinse de çok çeşitli bitki türlerini de enfekte etmektedir (Windels, 2000; Waalwijk ve diğ., 2003; Goswami ve Kistler, 2004; Matny, 2015). Bu genusun 300'ün üzerinde türü rapor edilmiş, 80'i çok iyi tanımlanmış, 17 türün tarımsal alanlarda tahıllara etki eden patojenler olduğu rapor edilmiştir (Moretti, 2009; O'Donnell ve diğ., 2015; Yörük ve Yli-Mattila, 2019). *F. graminearum* ve *F. culmorum* dünya genelinde bitkilerde gözlenen kök/kök boğazı çürüklüğü ve başak yanıklığı hastalıklarının esas etmenleridir (Yli-Mattila, 2010; Scherm ve diğ. 2013).

Esas habitatı toprak olan *Fusarium* türleri nekrotrofik, biyotrof ve hemi-biyotrof yaşam biçimine sahip olabilmektedir. Bu türler nemli ve yarı nemli topraklarda yaygın bulunmasına karşın soğuk ve kurak bölgelerde de etkili olabilmektedir. Optimum üreme koşulları; 25-32°C sıcaklık, 5-7 pH aralığı olarak bilinmektedir (Özer ve Soran, 1991; Bai ve Shaner, 2004). Yaşanan iklim değişimi, uygulanan tarım rotasyonları ve kullanılan mücadele yöntemleri nedeni ile *Fusarium* türlerinin hipleri ve sporlarının yayılımı, gösterdikleri hastalık şiddeti değişmektedir (Brown ve Proctor, 2013; Munkvold, 2017). *Fusarium* türleri eşeyli ve eşeysiz üreme yeteneklerine sahiptir. Aseksüel spor olan makrokonidler, mikrokonidler ve kladosporeler uygun ortam koşullarında çimlenerek fungal yapıyı meydana getirmektedirler (Kerényi ve diğ., 2014; Waalwijk ve diğ., 2006). Eşeyli üremede ise bazı *Fusarium* türleri tarafından üretilen, eşem tipine sahip sporlar (askospor) birleşerek askus hücrelerini oluştururlar. Askus hücreleri plazmogami ve karyogami evrelerini takiben mayoz bölünmeye uğrayarak sekiz adet askospor meydana getirir (Şekil 2.1). Eşeyli üreyen *Fusarium* türleri genin iki farklı eşem alleline (*MAT1-1* ve *MAT1-2*) sahiptirler. Her iki allel tipine sahip türler homotallik (*MAT1-1* ve *MAT1-2*), eşem allellerinden sadece birini bulunduranlar ise

heterotallik (*MAT1-1* veya *MAT1-2*) olarak isimlendirilirler. Homotallik türler farklı eşem tipine ihtiyaç duymadan kendi ürettiği sporlar ile zigot oluşturbilme yeteneğindedirler. Heterotallik türler ise farklı eşem tipine sahip türlerin sporlarına ihtiyaç duyarak eşeyli ürerler (Kerényi ve diğ., 2014; Waalwijk ve diğ., 2006).

Fusarium türleri mikotoksin üretme yeteneğine sahip en önemli beş fungus cinsi içerisinde yer almaktadır (Gutleb ve diğ., 2002; Sabuncuoğlu ve diğ., 2008). En iyi bilinen *Fusarium* mikotoksinleri trikotesenler, fumonisinler (fumonisin A1, fumonisin P1), fusarin C, zearalenon (ZEN) ve gibberellik asittir. Mikotoksinlerin trikotesen sınıfı, daha iyi bilinen deoksinivalenol (DON), 3-asetildeoksinivalenol (3-ADON), 15-asetildeoksinivalenol (15-ADON), nivalenol (NIV), diasetoksyscirpenol (DAS), NX-2, HT-2 ve T-2 toksini içerir (Ismail ve Papenbrock, 2015). DON gibi mikotoksinlerin enfeksiyon sırasında bazı işlevleri olduğu bildirilmektedir. DON üretiminde görevli *tri5* genindeki varyasyon nedeniyle DON üretemeyen fungusların enfeksiyon kabiliyetinde azalma olduğu bildirilmiştir. DON ve ZEN'in de aralarında olduğu mikotoksinlerin, saprofitik aşamada diğer mikroorganizmaları hedeflemek için sentezlenebileceği gösterilmiştir. *Fusarium* türleri tarafından sentezlenen mikotoksinlerin tümünün rolü henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Mikotoksinlerin rolleri ve üretim yollarının aydınlatılmasının fungal hastalık yönetim stratejilerinin geliştirilmesinde önemli etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (Perincherry ve diğ., 2019)

Fusarium culmorum (W. G. Smith Sacc.) taksonomik olarak mitosporik Hypocreales ailesinin bir türü olup konak özgünlüğü göstermeksizin nekrotrofik bir yaşam döngüsüne sahiptir. Bitkilerde başak yanıklığı, solgunluk, kök/kök boğazı çürüklüğü ve külleme gibi çeşitli hastalıkların etmenidir (Özer ve Soran, 1991; Hornok ve diğ., 2007; Scherm ve diğ., 2013). Ülkemizde Marmara, Ege, Akdeniz, Karadeniz ve İç Anadolu Bölgesinde etkili olmaktadır (Miedaner ve diğ., 2001; 2008; Yörük ve Albayrak, 2012; Tok ve Arslan, 2016; Yörük ve diğ., 2016). *MAT1-1* ve *MAT1-2* eşem allellerinden sadece birini taşıdığı için eşeysiz ürer (Kerényi ve diğ., 2004). Ancak bu türün yaşam döngüsü sürecinde paraseksüel olarak ürettiği ve çift eşem allellini verdiği de rapor edilmiştir (Obanor ve diğ., 2010; Çepni ve diğ., 2013). *F. culmorum*'un etkili olduğu ekim alanlarındaki ürün kayıplarından sadece patojenik özelliklerinin değil aynı zamanda ürettiği mikotoksinlerinin de sorumlu olduğu gösterilmiştir (Bernardo ve diğ., 2007). Bu tür ürettiği mikotoksin tipine göre aurofusarin, butenolid,

klamidosporol, siklon radiol, enniatin, fusarin, moniliformin, ZEN, NIV, DON ve 3-ADON kemotiplerini göstermektedir (Jestoi, 2008; Pasquali ve Migheli, 2014; Munkvold, 2017).

Referans izolat olarak kabul edilen FcUK99 suşuna ait genom projesi gerçekleştirilmiş olsa da 3. faz çalışmaları devam etmektedir ve tüm genom dizilim bilgisine ait anotasyonu tamamlanmamıştır (Baldwin ve diğ., 2010; Scherm ve diğ., 2013, Urban ve diğ., 2016). Haploid kromozom sayısı $n=4$ olarak bildirilmiştir (Cuomo ve diğ., 2007). Ortalama genom boyutu 38.9 Mb olarak belirlenmiş olup %45 GC içeriğine sahip dizi bilgisi NCBI veri tabanında erişime açılmıştır (www.ncbi.nlm.nih.gov)².

F. graminearum (Schwabe) Netriaceae ailesinin bir üyesi olup hemi-biyotrof yaşam döngüsüne sahiptir. Konak seçici olan *F. graminearum* genellikle mısır, arpa ve buğday gibi tahıl türlerinde kök/kök boğazı çürüklüğü ile başak yanıklığı hastalıklarının etkenidir. Global olarak bakıldığında başak yanıklığının en başta gelen etmeni olarak bildirilmiş ve en önemli 10 bitki patojeninden biri olarak bilinmektedir (Bai ve Shaner, 2004; Goswami ve Kistler, 2004; Dean ve diğ., 2012). Dünya genelinde ve ülkemizde farklı bölgelerden rapor edilmiştir (Bernardo ve diğ., 2007; Yörük ve diğ. 2016). Eşeysiz ve eşeyli üreyebilen *F. graminearum* *MAT1-1* ve *MAT1-2* eşem allellerinin her ikisini de taşımaktadır (Kerényi ve diğ., 2004). Hemi-biyotrofik olduğundan yaşam döngüsünün farklı evrelerinde miselyum, askospor, makrokonidyum ve klamidospor formunda bitkiyi enfekte edebilmektedir. (Bai ve Shaner, 2004; Miedaner ve diğ., 2008). *F. graminearum* türleri aurofusarin, butenolid, klamidosporol, siklon radiol, ZEN, T-2, NX-2, DAS, fusarin, 3-ADON, 15-ADON, DON ve NIV mikotoksinlerini üretmektedirler (Pasquali ve Migheli, 2014; Munkvold, 2017).

Bu türün genom projesi 2006 yılında PH-1 ve GZ3639 suşunda tamamlanmıştır. Haploid kromozom sayısı $n=4$ 'tür. Kromozom sayısı diğer hifli funguslar ile genom dizisi çıkarılan diğer *Fusarium* türlerine göre azdır (Cuomo ve diğ., 2007). PH-1'in genom boyutu 36,1 Mb olarak belirlenmiş ve %48 GC içeriğine sahip olduğu rapor edilmiştir. Veritabanlarında 10000'in üzerinde eksprese dizi etiketlerinin (ing., expressed sequence tags; EST) yanı sıra, mikotoksin üretimi, replikasyon, transkripsiyon, hidroliz ve benzeri önemli biyokimyasal süreçlerle ilişkili karakterizasyonu yapılmış gen dizilim bilgisi mevcuttur. 13726 gen ve 17 pseudogen içerdiği tespit edilmiştir (Urban ve diğ., 2016; King ve diğ., 2017). Genom dizilimesi

² www.ncbi.nlm.nih.gov [Ziyaret Tarihi 06.04.2021]

yapılan iki suş arasında 10495 tek nukleotid polimorfizmi (ing., single nucleotide polymorphisms; SNP) belirlenmiştir.

2.4. *Fusarium* TÜRLERİ İLE MÜCADELE

Küresel ısınmanın sebep olduğu iklim değişiklikleri nedeniyle *Fusarium* türlerinin daha geniş alanlarda etkili oldukları rapor edilmiştir (Saharan ve diğ., 2004; 2007; 2008; Yli-Mattila ve diğ., 2013; Pasquali ve Migheli, 2014). Bunun bir sonucu olarak bu türlerin bitkilerde meydana getirdiği ürün kayıpları yıllar geçtikçe ciddi boyutlara ulaşmaktadır. FAO (ing., The Food and Agriculture Organization; FAO) istatistiklerine göre 2010 yılında dünya genelinde 30495 hg/ha tahıl ürünü elde edildiği bildirilirken 2019 yılında üretim miktarı 27615 hg/ha olarak bildirilmiştir (<http://www.fao.org/faostat>)³. *Fusarium* türleri patojeniteleri ile sadece bitkilere değil, ürettikleri mikotoksinleri aracılığıyla insan ve hayvanlarda sağlık problemlerine yol açmaktadır. Bu bağlamda *Fusarium* türleri ile mücadelede farklı yaklaşımlar denenmektedir. Kültürel mücadele olarak hastalıktan arı fide kullanımı, hastalıklı bitkilerin ekim alanlarından uzaklaştırılması, dayanıklı bitki çeşitlerinin geliştirilmesi, solarizasyon, kimyasal mücadele, antagonistik mikroorganizmaların kullanılması, zirai ilaçlarla kontrol sistemi ve uçucu esansiyel yağların kullanılması bulunmaktadır (Cook, 1993; Bai ve Shaner, 2004; Saharan, 2020; Gazdağlı ve diğ., 2018; Zabka ve Pavela, 2018).

2.4.1. Uçucu Esansiyel Yağlar

Uçucu esansiyel yağlar 17.500'den fazla aromatik bitki türü tarafından üretilen karmaşık doğal yapıları sekonder (ikincil) metabolitlerdir (Regnault-Roger ve diğ. 2012; Hancock ve diğ., 2015). Günümüze kadar 3000'den fazla esansiyel uçucu yağ tanımlanmıştır (Bassolé ve Juliani, 2012). Majör esansiyel yağlar, bitkilerde eser miktarlarda bulunan diğer bileşenlere göre oldukça yüksek konsantrasyondaki (%20-70) iki veya üç ana bileşikle karakterize edilirler. Bazı uçucu esansiyel yağ bileşenlerinin antibakteriyel ve antifungal özellikte olduklarının anlaşılması ile bu bileşikler antifungal ajan olarak kullanılmaya başlanmıştır (Villaverde ve diğ., 2014; Alonso-Gato ve diğ., 2021). Son yıllarda bitki türevli uçucu esansiyel yağların *Fusarium* türleri ile mücadelede kullanım potansiyelleri araştırılmaktadır (Sefer ve diğ., 2017; Gazdağlı ve diğ., 2018; Yörük et al., 2018; Zabka ve Pavela, 2018). Ancak yapılan çalışmalar genellikle

³ <http://www.fao.org/faostat> [Ziyaret Tarihi 09.04.2021]

bitkilerden elde edilmiş özütlerin uygulaması ve fungusun büyümesine etkisi ile kısıtlı kalmıştır. Saf halde uygulanamayan esansiyel uçucu yağların etkinliği hakkında yeterli bilgi edinilememiştir. Moleküler etki mekanizmalarına ait çalışmalar son yıllarda önem kazansa da geniş tarım arazilerinde etkin bir mücadele stratejisi olarak uygulanamamaktadır. Bu durum *Fusarium* türleri ile mücadeleyi sınırlandırmaktadır.

2.4.2. Antagonistik Ajanların Kullanımı

Bitki hastalıkları ile mücadelede sürekli kimyasal kullanılması çevre kirliliğine neden olmakta, gıdalardaki kalıntıları insan sağlığını tehdit etmektedir. Bu nedenlerden dolayı bitki hastalıklarına karşı insan sağlığını tehdit etmeyen, çevre dostu faydalı mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Biyokontrol ajanları ile, doğrudan veya dolaylı olarak, bitki fungal hastalıklar kontrol edilebilmektedir. Çeşitli toprak mikroorganizmaları, başak yanıklığı patojenleri dahil toprak kaynaklı bitki patojenlerinin kontrolünde etkinlik göstermiştir (Minuto ve diğ., 1995; Larkin ve Fravel, 1996; Arıcı, 2018). *Trichoderma* ve *Gliocladium* spp. gibi diğer biyokontrol funguslar, *Fusarium* spp. dahil olmak üzere çeşitli fungal patojenler için biyokontrol ajan olarak kullanılmıştır (Lumsden ve Locke, 1989; Harman, 1991; Lewis ve diğ., 1993; Taylor ve diğ., 1994). Biyokontrol ajanı etkili mikroorganizmalar etki mekanizmasına göre üç ana grupta incelenmektedir. (1) Direkt kullanılan biyokontrol ajanları, patojene karşı hifsel müdahale, antifungal karışımların salgılanması veya enzimler aracılığı ile etki eder. *Trichoderma harzianum*'un hastalık tehdidi oluşturan patojen funguslara karşı hidrolitik enzim salgıladığı ve patojenik türün hif yapısını bozarak biyolojik kontrol ajanı amacıyla sıkça kullanıldığı bilinmektedir (Taylor ve diğ., 2021). (2) Dolaylı kullanılan biyokontrol ajanları, patojenin konak ile etkileşim kurmasını fiziksel olarak engeller ya da patojenle aynı ortamda bulunduğu için besin rekabetine girerek hastalık etkisini azaltır. Bu duruma örnek olarak patojenite kuvveti güçlü olmayan *F. oxysporum* suşunun patojenite gücü yüksek olan diğer suşlarla rekabeti verilebilir. (3) Konak savunmasını indükleyen biyokontrol ajanları ise konağın kendi savunma mekanizmasını indükleyerek hastalık etmeni fungusa karşı savunma sağlar. *Fusarium* türleri ile mücadelede antagonist etki gösteren mikroorganizmaların kullanımı *Fusarium* türlerinin yarattığı hastalıklarla mücadele için alternatif bir yaklaşım sağlamaktadır. Ancak ekolojik niş içerisinde sürekli olarak bulunmalarının sağlanmasındaki dezavantajlar, etki mekanizmalarına dair kısıtlı bilgi, deneysel koşullarda etkili olan süreçlerin ekim alanlarındaki etkisinin düşük düzeyde kalması hastalık kontrolünde fungusitler kadar yaygın olarak kullanılmasının önüne geçmektedir (McMullen ve diğ., 2012).

2.4.3. Dirençli Bitki Elde Etme

Fitopatojenlerin neden olduğu hastalıklarla bu hastalıklara dirençli bitki çeşitleri geliştirilip ekimi sağlanarak da mücadele edilebilmektedir. *Fusarium* türleri ile mücadelede geliştirilen dirençli bitkilerin kullanımı ekonomik olarak yüksek kazanç sağlamıştır (Bai ve Shaner, 2004; Champeil ve diğ., 2004). Başak yanıklığı ile mücadele amacıyla 5 farklı direnç tipine sahip buğday çeşidi geliştirilmiştir (Mesterhazy ve diğ., 1995, 1999). Tip I dirençli bitkide enfeksiyonun başlaması engellenir. Tip II dirençte ise başaklar fungusla enfekte olur ancak sonraki süreçte enfeksiyonun ilerlemesi ve mantarın üremesi engellenir. Tip III ve tip IV direnç mekanizmasında, bitki patojenin ürettiği toksine ve toksin birikimine karşı direnç geliştirmiştir. Sonuncu direnç tipi ise enfeksiyonun bitkiye bulaşmasını engelleyen koruyucu özellikte olan tip V direnç olarak ifade edilmektedir (Bai ve Shaner, 2004; Saharan, 2020).

Buğday yetiştiricileri, dirençli çeşitler geliştirmek için esas olarak iki hat (Sumai 3 ve Ning 7840) kullanmıştır (Kolb ve diğ., 2001). 1970 yılında piyasaya sürülen Sumai 3 çeşidi, buğday genotipi Funo ve başak yanıklığına karşı dirençli Tayvanxiaomai hattının çaprazlanmasıyla geliştirilmiştir. Şimdiye kadar bildirilen başak yanıklığına dirençli kaynaklar; Ning 7840 ve Ning 894037, Japon çeşitleri Nobeokabozu ve Nyu Bai (Nyubai) veya Kore çeşidi Chokwang dirençli bitki eldesinde en sık kullanılan buğday hatlarıdır (Zhou ve diğ., 2003; Lin ve diğ., 2006; Yang ve diğ., 2005; Saharan, 2020). Sumai 3 dışında, 1994 yılında piyasaya sürülen Ernie çeşidi, Kuzey Amerika bölgesinde *Fusarium* başak yanıklığına karşı ümit verici bir diğer dirençli bitki kaynağıdır ve dirençli bitki geliştirme çalışmalarına dahil edilmektedir (Liu ve diğ., 2007). Tüm bu gelişmelere rağmen *Fusarium* türlerinin bitkiler üzerinde yarattığı yıkıcı etki için en sık tercih edilen uygulama dirençli bitki eldesi olamamıştır. Dirençli bitki elde edebilmek için direnç genlerinin belirlenmesi, bu genlerin elde edilerek başka bir bitkiye aktarılması ve böylece *Fusarium* türlerinin yarattığı yıkıcı etkiden kurtulması oldukça zaman, maliyet, iş gücü istemektedir. Ayrıca kısıtlı agronomi ve değişen iklim şartları ile *Fusarium* türlerinde gün geçtikçe artan genetik çeşitlilik dirençli bitki kullanımını kısıtlayan faktörlerdir (Bernardo ve diğ., 2007; Saharan, 2020).

2.4.4. Zirai İlaçların Kullanımı

Fusarium türlerinin neden olduğu hastalıkların tarım alanlarında önlenmesinde kimyasallar kullanılmaktadır. Fungal hastalıklara karşı kullanılan kimyasallara fungusit adı verilir. Fungusitler fungal büyümeyi durdurmak ve toksin üretimini azaltmak üzere kritik hücresel süreçleri etkileyen doğal, yarı sentetik veya sentetik aktif bileşenlerdir (Genet ve Jaworska, 2009; Geat ve Singh, 2016). Fungusitlerin uygulanma şekilleri hastalığın bitki üzerinde görüldüğü yere göre değişmektedir. Toprağa, tohuma, ilk sürgünlere, gövdeye veya bitkinin meyvelerine uygulanabilir. Uygulama kolaylığı ve ekonomik erişilebilirliği özellikleri tarım arazilerinde kullanım tercihlerinin başında gelmektedir (Doohan, 2014).

Fungusitler bitki dokusuna nüfuz etme stratejisi ve/veya etki mekanizmalarına bağlı olarak sınıflandırılmaktadır. Bitki dokusuna nüfuz etmeden patojenin yaşamsal faaliyetlerine ve üremesine etki eden fungusitlere koruyucu fungusit denir. Fungusu öldürmek için bitkinin dolaşım sistemine girerek ve bitki organları arasında taşınarak etkili olan fungusitlere sistematik fungusit denir. Son grup fungusitler ise eradaktif fungusitlerdir. Bu grupta bitki enfeksiyon etmeni ile etkileşim içindedir. Enfeksiyon gelişir ve fungal organizmanın üremesi, büyümesi veya yaşamsal faaliyeti uygulanan fungusitle inhibe edilir (Khachatourians ve Dilip, 2001; Kramer ve Schirmer, 2007; Doohan, 2014).

Günümüzde kullanılan fungusitlerin hedefleri, önemli biyolojik süreçlerden birincil derecede sorumlu proteinler veya onların kodlanmasından sorumlu genlerdir. Fungusitler önemli biyolojik süreçlere ait enzimlerin aktif bölgelerine ya da hedef bölgelerini bağlanarak etki gösterirler. Fungusitler ilgili bölgelere bağlanarak hücredeki mekanizmanın işleyişinde yer alan normal sürece ait bileşiklerin bağlanmasını engelleyerek biyokimyasal süreçlerin inhibisyonuna sebep olurlar (Genet ve Jaworska, 2009; Kretschmer ve diğ., 2009). Uygulanan zirai ilaçların funguslar üzerindeki etkinliğinin yıllar içinde azaldığı rapor edilmektedir. Bunun nedenleri; zirai ilaç hedefi olan gende meydana gelen mutasyonlar, fungusitin bağlandığı etkin bölgelerin yapı değişimleri, hedef proteinin yüksek düzeyde üretilmesi, alternatif metabolik yolak geliştirilmesi, fungusitin metabolik olarak parçalanması ve ATP-az bağımlı taşıyıcı proteinler aracılığı ile fungusitin hücreden atılması olarak gösterilmektedir (Brent ve Hollomon, 2007). Patojenlerin piyasaya sürülen fungusite karşı belirli kullanım süreci sonunda direnç kazanım oranlarında artış olduğu tespit edilmiştir. Direnç gelişim süreleri fungusit türlerine göre farklılık göstermektedir. Tablo 2.1’de farklı mekanizmalara etki eden zirai ilaçlara karşı

fungusların geliştirdiği ortalama direnç kazanım zamanı verilmiştir. Direnç gelişimi 2 ile 40 yıl arasında değişmektedir. Benzimidazol ve demetilasyon inhibitörleri dünya genelinde sıklıkla tercih edilen fungusitlerdir ve uygulama alanlarında fungusların 2-7 yıl arasında bu aktif bileşiklere direnç geliştirdikleri gösterilmiştir. Fungusların fungusitlere karşı direnç kazanımı, fungusit direnç yönetim planlarının geliştirilmesini sağlamıştır. Fungusit direnç yönetim hedefleri; direnç kazanım profillerinin belirlenmesi, etkisini yitiren fungusitin kullanımının engellenmesi, yeni fungusitlerin geliştirilmesi, direnç kazanımlarının dolayısı ile potansiyel olarak hastalıkların önüne geçilmeye çalışılmasını içermektedir. Zaman içinde etkisini kaybeden fungusitlerin yerine endüstriyel laboratuvarlar aracılığı ile yeni fungusit grupları geliştirilmeye devam edilmektedir. Genetik, biyokimya ve epidemiyoloji alanındaki temel araştırmalar, direnç gelişim riskini etkileyen faktörlerin aydınlatılmasını sağlamaktadır. Bu şekilde, düşük direnç geliştirme riski sunan metabolik süreçlerin inhibisyonunu içeren yeni fungusitler ile direnç yönetimi mümkün olmaktadır (Brent ve Hollomon, 2007).

Tablo 2.1: Dünya çapında fungusit direncinin ilk ortaya çıkış tarihleri ve direncin gelişmesi için gereken süreler (Brent ve Hollomon, 2007).

İlk görülme tarihi	Fungusit*/Fungusit Sınıfı	İlk kullanımdan direnç bildirimine kadar geçen süre (Yıl)	Referans
1960	Aromatik hidrokarbon	20	Eckert, 1982
1964	Organo-mercurials*	40	Noble ve diğ., 1966
1969	Dodine*	10	Gilpatrick, 1982
1970	Benzimidazol	2	Smith, 1988
1971	2-Amino-pirimidin	2	Brent, 1982
1971	Kasugamisin*	6	Kato, 1988
1976	Fosforotiolat	9	Kato, 1988
1980	Fenilamid	2	Staub, 1991
1982	Dikarboksimit	5	Lorenz, 1988
1982	Sterol Demetilasyon İnhibitörleri	7	De Waard, 1994
1985	Karboksanilit	15	Locke, 1986
1998	Strobilurin	2	Heaney ve diğ., 2000
2002	Melanin Biyosentez İnhibitörleri	2	Kaku ve diğ., 2003

2.5. ZİRAİ İLAÇLARIN ETKİ MEKANİZMASI

Çoğunluğu sentetik olarak üretilen zirai ilaçlar, funguslardaki solunum, sterol biyosentezi, hücre döngüsü gibi temel yaşamsal süreçleri hedefleyerek etkili olmaktadır (Seiber ve Kleinschmidt, 2011). Funguslara karşı kullanılan zirai ilaçlar, etki mekanizmalarına göre dokuz ana başlıkta sınıflandırılmaktadır (FRAC, 2020). Her grubun kendine ait etki mekanizması

bulunmakla birlikte bazı zirai ilaç gruplarının etkilediği yollar tam olarak açıklanamamıştır. Tablo 2.2’de zirai ilaçların etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması, etkiledikleri yollar ve genler ile direnç bildirim durumları verilmiştir (FRAC, 2020).

Tablo 2.2: Dünyada kullanılan zirai ilaç sınıflandırması ve bazı kimyasal gruplar ile özellikleri.

Hücrel Etkisi Sınıfı	Kimyasal Grubu	Direnç Durumu, İlişkili Gen Bilgisi ve Risk Durumu
Nükleik Asit Metabolizması	Fenil Amit	RNA polimeraz I yolağını etkiler. Çapraz direnç ve direnç durumu bilinmemektedir. Yüksek risklidir.
	Hidroksi (2-amino) Pirimidin	Adenozin deaminaz yolağını etkiler. Orta risklidir. Direnç ve çapraz direnç durumu külleme etkeni funguslarda bilinmemektedir.
	Heteroaromatikler	DNA/RNA sentezinde etki eder. Direnç bildirilmemiştir.
	Karboksilik asitler	DNA topoizomera II (giraz) etki eder. Bakteriyel direnç bildirilmiştir. Risk durumu bilinmemektedir.
Hücre İskeleti ve Motor Proteinler	Metil Benzimidazole Karbamat	Birçok fungal türde direnç bildirilmiştir. Dirençle ilgili birden fazla bölgede <i>β-tubulin</i> geninde mutasyon tespit edilmiştir. Pozitif ve negatif çapraz direnç bildirilmiştir. Yüksek risklidir.
	Benzamit	Düşük risklidir. Direnç bildirilmemiş ancak direnç yönetim çalışması gereklidir.
	Tiyazol karboksiamit	Direnç bildirilmemiştir.
	Fenilüreaz	<i>F. graminearum</i> türlerinde direnç bildirilmiştir. <i>miyosin-5</i> gen kodlamasındaki hedef bölge mutasyonları bilinmemektedir.
	Siyanoakrilat	Külleme etkeni funguslarda düşük hassaslık bildirilmiştir. Direnç yönetim çalışması gerekir.
Solunum	Aril-Fenil-Keton	
	NADH oksidoredüktaz	Direnç bildirilmemiştir.
	Süksinatdehidrogenas inhibitörü	Birçok fungus türünde direnç bildirilmiştir. <i>sdh</i> geninde birden fazla bölgede direnç kazandıran mutasyon tespit edilmiştir. Orta risklidir.
Amino asit ve protein sentezi	Kinon inhibitörleri	Birçok fungus türünde direnç bildirilmiştir. <i>cyt b</i> geninde tek bir amino asit değişimin direnç ile ilişkisi gösterilmiştir. Çapraz direnç bildirilmiştir.
	Anilino pirimidin	Bazı funguslarda direnç bildirim yapılmıştır. <i>cgs</i> geninde diren. Geliştiren mutasyon tespit edilmiştir.
Sinyal İletim	Protein sentezi (Ribozom sonlandırma ve başlatma)	Fungal ve bakteriyel direnç bildirilmiştir.
	Fenilpirol	Kinoksifen direnci bilinmemektedir. <i>os-1</i> , <i>os-2</i> , <i>hog1</i> ve <i>daf1</i> genlerine ait değişimlerin direnç gelişimi ile ilgisi bildirilmiştir.
Lipit Sentezi Taşıma/Membran Bütünlüğü	Dikarboksimit	
	Fosfotiolat	Spesifik bazı fungus türlerin direnç bilinmemektedir. Düşük risk taşır.
	Aromatik hidrokarbon heteroaromatik	Bazı fungus türlerinde direnç bildirilmiştir. Düşük risklidir.
Membranda Sterol Biyosentezi	Karbamat	Düşük risklidir. Direnç bildirilmemiş ancak direnç yönetim çalışması gereklidir.
	Demetilasyon İnhibitörleri	Demetilasyon inhibitör funguslarının aktivite spektrumlarında büyük farklılıklar vardır. Direnç, çeşitli fungus türlerinde bilinmemektedir. Çeşitli direnç mekanizmaları bilinmemektedir. <i>cyp51 (erg 11)</i> genindeki hedef bölge mutasyonları, ör. V136A, Y137F, A379G, I381V.

Tablo 2.2 (devam): Dünyada kullanılan zirai ilaç sınıflandırması ve bazı kimyasal gruplar ile özellikleri.

	Aminler	Külleme etkeni funguslarda düşük hassaslık bildirilmiştir. Direnç yönetim çalışması gerekir.
	Ketoreduktaz inhibitörleri	Düşük risklidir. Direnç yönetim çalışması gereklidir.
Hücre Duvarı Biyosentezi	Karboksilik asit amidler	Bazı fungus türleri için direnç bildirilmiştir. Düşük risklidir.
	Polioksin	Direnç bildirilmiştir. Orta risklidir. Direnç yönetim çalışması gereklidir.
Hücre Duvarında Melanin Sentezi	Melanin Biyosentez İnhibitörleri-Redüktaz	Bazı funguslara karşı direnç bildirilmiştir. Orta risklidir.
	Melanin Biyosentez İnhibitörleri-Poliketidsentaz	Direnç bildirilmemiştir.
	Melanin Biyosentez İnhibitörleri- Dehidrataz	Bazı funguslar için direnç bildirilmiştir. Orta risklidir.
		Direnç yönetim çalışması

Geniş spektrumlu olan bazı zira ilaç gruplarının patojen üzerinde hızlı ve güçlü etkili olması tarlada sıkça kullanılmasını sağlamıştır. En sık kullanılan üç zirai ilaç grubu; kinon inhibitörleri (Kİ), demetilasyon inhibitörleri (DMİ) ve metil benzimidazol karbamattır (MBK).

Kİ ilk olarak 1996 yılında sitokrom *bc1* enzim kompleksine bağlanarak bitki patojenlerinin solunumunu inhibe eden fungusitler olarak tarım alanlarında kullanılmaya başlanmıştır (Gisi ve diğ., 2002). Kİ, solunum sisteminde görev alan NADH oksidoredüktaz aktivitesini durdurup elektronların elektron taşıma sistemine girişini engelleyerek etkili olur (Nabi ve diğ., 2017). Tarım alanlarında kullanımına başlanmasından kısa bir süre sonra önemli bitki patojenlerinin tarla populasyonlarında Kİ'ne dirençli izolatlar tespit edilmiştir. Çoğu direnç gelişimi incelendiğinde *sitokrom b (cyt b)* geninin 143. amino asit pozisyonundaki glisinin alanine (G143A) değişimine yol açan bir mutasyon tespit edilmiştir. Ancak ilerleyen zamanlarda bu mutasyona ek mutasyon noktaları (F129L, G137R/E/V/S) da bildirilmiştir (Gisi ve diğ., 2002).

Sitokrom P450 sterol 14- α demetilaz (*cyp51/erg11*), zar akışkanlığının ve geçirgenliğinin düzenlenmesi için gerekli tüm ökaryotik organizmaların hücre zarlarının kritik bileşenleri olan sterollerin biyosentezinde temel bir enzimdir (Lepesheva ve Waterman, 2007). Funguslarda tanımlanan birçok sterol arasında ergosterol en çok bulunan ve fungal büyüme için gerekli olanıdır (Weete ve diğ., 2010). DMİ sterol biyosentez inhibitörleri veya ergosterol biyosentez inhibitörleri olarak da bilinir. 1969'da ilk kez tarım arazilerinde kullanılmaya başlanmasından bu yana çok sayıda DMİ aktif bileşenleri keşfedilmiş ve kullanıma sunulmuştur (Beresford, 2005). Azoller, azol halkasındaki nitrojen atomlarının sayısına göre iki gruba ayrılabilen siklik

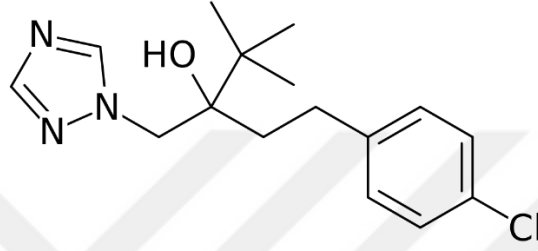
organik moleküllerdir: İmidazoller iki nitrojen atomu içerir ve triazoller üç nitrojen atomu içerir. DMİ grubu içerisinde en çok triazol sınıfı kullanılmaktadır. (Vandeputte ve diğ., 2012; Maertens, 2004). Azol ilaçları, *erg11/cyp51* geni olarak kodlanan lanosterol 14- α demetilaz anahtar enziminin inhibisyonu ile ergosterol biyosentetik yolunu durdurmayı hedefler. Bu inhibisyon, azol halkasının serbest nitrojen atomunun enzimin hem grubunun demir atomuna bağlanmasıyla gerçekleşir. 14- α demetilazın anahtar enziminin inhibisyonu, ergosterol biyosentezini aksatarak hücre zarının geçirgenliğini bozar. Hücre duvarı geçirgenliği bozulan patojen yaşamsal faaliyetini sürdüremez (Qian ve diğ., 2018; Stenzel ve Vors, 2019). DMİ'lerin uygulamaki hataları ve aşırı kullanımına bağlı patojen popülasyonunda direnç gelişimine yol açmıştır (Sanglard ve diğ. 1998). Fitopatojen funguslarda azollere karşı üç direnç mekanizması baskındır. Birinci mekanizmada, *cyp51* genindeki mutasyonların azol direncini sağladığı gösterilmiştir. İkinci direnç mekanizmasında *cyp51* geninin promotör bölgelerindeki eklemeler gen ekspresyonunda artışa ve direnç kazanımına yol açmıştır. Üçüncü mekanizma, membran taşıyıcılarını kodlayan genlerin aşırı anlatımı ile kimyasalın hücre dışına atılması sonucu kazanılmıştır (Cools ve diğ., 2013; Fan ve diğ., 2013). Val136, Tyr137, Leu305, Ala308, Ser312, Ile374 ve Phe511 amino asitleri azollerin *cyp51* genindeki seçici mutasyona uğrayan noktaları olduğu bilinmektedir (Qian ve diğ., 2018).

Mikrotübüller, ökaryotik hücrelerin temel yapısal bileşenleridir ve çekirdek ile hücre bölünmesi, organel taşınması, hücre hareketliliği ve hücre morfolojisinin korunmasında işlevseldir (Li ve Yang, 2007). MBK fungusitler, hastalık yönetiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. MBK fungusitlere direnç mekanizması, bir dizi farklı filamentli fungusda incelenmiştir. Benzimidazoller, esas olarak α ve β tubuline bağlanarak mitoz ve fungusun hücre iskeletine müdahale ederek etki gösterir (Davidse, 1986; Davidse 1988; Davidson ve diğ., 2006). Çoğu zaman benzimidazol toleransı, benzimidazol bağlanmasını azaltan β -*tubulin* genindeki mutasyonlardan kaynaklanır (Reijo ve diğ., 1994; Davidson ve diğ., 2006). 198. ve 200. amino asit değişimleri MBK fungusitleri için en iyi bilinen direnç mutasyon noktalarıdır.

2.5.1. Tebukonazol

Tebukonazol, bitki hastalığını kontrol etmek için direkt tohumlara veya spreyleme ile kullanılan geniş spektrumlu DMİ grubu içerisinde yer alan triazol fungusittir. IUPAC isimlendirmesi 1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-3-(1,2,4-triazol-1-ylmethyl) pentan-3-ol'dür. Kimyasal formülü $C_{16}H_{22}ClN_3O$ 'dir (Şekil 2.2). Renksizdir, kristalize haldedir ve belirgin bir kokusu

yoktur. Tebukonazol, 1981 yılında elde edilmiştir ve 1987 yılında da patentlenmiştir. 1,2,4-triazol türevlerinden biri olarak, ergosterol biyosentezini inhibe ederek külleme, kök/kök boğazı çürüklüğü ve yanıklık gibi hastalıklarla mücadelede etkin bir biçimde kullanılır (Homdork ve ark., 2000; Ma ve diğ., 2009). Hastalıkların önlenmesinde tarım arazisine ekilecek tohumların ekim öncesi veya ekimden sonraki 3 gün içerisinde tebukonazol uygulaması yapıldığında hastalığı önlemede %60'ın üzerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir (Mauler-Machnic ve Zahn, 1994).



Şekil 2.2: Tebukonazol'un yapısal formülü.

Dünya çapında kullanımı yaygın olmakla birlikte funguslarda en sık direnç gelişimi gözlenen zirai ilaç türüdür. Asya, Kuzey Amerika, Güney Amerika, Avrupa kıtalarındaki farklı ülkelerden *Fusarium* türlerinin tebukonazol direnci geliştirdiği bildirilmiştir (Beresford, 2005; Yin ve diğ., 2009; McMullen ve diğ., 2012; Spolti ve diğ. 2012, 2014; Hellin ve diğ. 2017; Anderson ve diğ., 2020)

Yurdumuzda başak yanıklığı kök/kök boğazı çürüklüğü etmeni olan *Fusarium* türleri ile farklı fungal proteinleri ve biyolojik süreçleri hedefleyen farklı aktif bileşenlerden oluşan ruhsatlı fungusitler kullanılmaktadır. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığına bağlı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Bitki Koruma Ürünleri Daire Başkanlığı tarafından ruhsatlandırılmış 26 farklı zirai ilaç içerisinde tebukonazol aktif maddesi ana kimyasal veya yardımcı kimyasal olarak kullanıldığı bilinmektedir (<https://bku.tarim.gov.tr>)⁴. Ülkemizde *Fusarium* türüne karşı yaygın olarak kullanılan ticari fungusitlere olan duyarlılık profilleri hakkında detaylı bilgi bulunmamakta ve tarama çalışmaları yürütülmemektedir. Bununla birlikte bazı fungusitlerin yarattığı morfolojik ve temel fizyolojik değişimlerin izlenmesi yönünde çalışmalar başlatılmış olup literatür bilgisi kısıtlıdır (Arslan ve Baykal., 2002; Köycü ve Fusun, 2018; Yörük ve diğ., 2018). Tez kapsamında tebukonazolün *F. graminearum* PH1 ve *F. culmorum* FcUK99'daki etkilerinin hücresel ve moleküler düzeyde araştırılması amaçlanırken, elde edilen verilerle tarla

⁴ <https://bku.tarim.gov.tr> [Ziyaret Tarihi: 09.04.2021]

izolatlarında gelişen direncin taranması için uygun bir sistemin kurulması, bu şekilde farklı etki mekanizmasına sahip fungusit aktif bileşenlerinin de *Fusarium* spp.'deki etkilerinin taranabilmesi için laboratuvarımızda model bir sistem kurulması hedeflendi.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. REFERANS SUŞLARIN ÜRETİMİ

Yüksek lisans tez çalışmasında tebukonazolün etkisi iki *Fusarium* türüne ait referans suşlarda araştırıldı. Referans suşlardan *F. graminearum* PH-1 Dr. Tapani Yli-Mattila'dan (Turku Üniversitesi), *F. culmorum* FcUK99 ise Dr. Pierre Hellin'den (Catholique de Louvain Üniversitesi) sağlandı. Referansların üretilmesinde patates dekstroz agar (PDA), patates dekstroz özütü (PDB) ve sentetik nutrient agar (SNA) besi ortamları kullanıldı. SNA -80°C'de uzun süreli saklanan gliserol stokların canlandırılması sürecinde etkin olarak kullanılırken rutin üretimler PDA ve PDB'de gerçekleştirildi. Besi ortamı bileşenleri Tablo 3.1'de verilen derişimlerde çözdürüldükten sonra, otoklavda 121°C'de 1.2 atm basınç altında 15 dakika boyunca steril edilerek kullanıldı.

Tablo 3.1: *Fusarium* izolatlarının üretilmesinde 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
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
	Glukoz	0.2
	Sukroz	0.2
	Agar	15
Patates dekstroz agar (PDA)	Patates dekstroz özütü	24
	Agar	15
Patates dekstroz özütü (PDB)	Patates dekstroz özütü	24

Gliserol stokların canlandırılması SNA besi ortamının ortasına konması ile başlatıldı. Deneme gruplarının kurulması ve alt kültürlemeler için ise SNA besi ortamında üretilen fungal kültürlerden alınan 0.25 cm²'lik miselyal plakların PDA/PDB besi ortama konması ile kültürler kuruldu. Üreme kontrollü büyütme kabinde (Daihan, Kore) 26±2°C'de 7 gün boyunca karanlıkta inkübe edildi. Sıvı kültürler de 0.25 cm²'lik fungal plakların (5-10 mL) PDB sıvı besi ortamına eklenmesi ile kuruldu ve 26±2°C'de 150 rpm hızda çalkalanarak 7 gün süre ile inkübe edilerek üretildi.

Uzun süreli saklamaya alınmak üzere SNA besi ortamında üretilen 7 günlük fungal kültürlere, Sınıf 2 hava akımlı steril kabin içerisinde (Nüve, Türkiye) 3 mL steril %15'lik gliserol eklendi.

Miselyumlar steril kürdan yardımı ile toplanarak stoklanmak amacıyla 2mL'lik tüplere aktarıldı. Stok tüpleri -20°C'de 24 saat boyunca bekletildi. Daha sonra -80°C'de saklanmaya alındı.

3.2. TEBUKONAZOLÜN ETKİLİ DOZLARININ BELİRLENMESİ

Zirai ilaç olarak kullanılan ticari tebukonazol (Hektaş, Türkiye) %100'lük etanol içerisinde 5mg/mL konsantrasyonunda çözündürüldü ve 0.22µm por çaplı filtre ile steril edilerek uygulandı. Deney grupları, tebukonazolün 0.5, 1, 1.5, 2, 3 µg/mL konsantrasyonlarını içeren PDA besi ortamı kullanılarak oluşturuldu. En yüksek konsantrasyonun uygulaması için zirai ilacın çözündürülmesinde gereken çözücü miktarı (%0.5) besiyeri ortamına eklenerek normalizasyon grubunu oluşturdu. Bu şekilde en yüksek çözgen miktarının uygulanması ile fungal üremeye etkisi de test edildi. Kontrol grubu, aktif bileşik ve çözgen içermeyen PDA besi ortamında üretilen referanslardan kuruldu.

7 günlük PDA kültürlerinden 0.25 cm²'lik miselyum plakları alınarak farklı konsantrasyonlarda tebukonazol içeren ve içermeyen PDA besi ortamlarının ortasına yerleştirildi. Üreme Bölüm 3.1'de verilen şartlarda sağlandı. Kontrol ve deney gruplarında inkübasyonun 4. ve 7. günlerinde doğrusal üreme hızını (ing., linear growth rate; LGR) temsil eden radyal üreme çap değerleri (mm/gün) ölçüldü (Irzykowska ve diğ., 2012). Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. PH-1 ve FcUK99 referanslarının büyümesini %50 engelleyen etkin konsantrasyon değeri (EC₅₀) elde edilen ortalama LGR değerleri kullanılarak hesaplandı. EC₅₀ değeri Alexander ve diğ. (1999)'nin formülüne göre hesaplandı (Denklem 3.1).

$$EC_{50} = x_1 + \frac{\%50 - y_1}{y_2 - y_1} \times (x_1 + x_2) \quad (3.1)$$

Formüle göre y₁: inhibisyonun %50'den az olduğu % değer, y₂: inhibisyonun %50'den fazla olduğu % değer, x₁: y₁'i veren konsantrasyon değeri ve x₂: y₂'yi veren konsantrasyon değerini ifade eder. Her iki referans için hesaplanan EC₅₀ değerleri ile deney grupları kuruldu.

3.3. GENOMİK DNA (gDNA) İZOLASYONU VE ANALİZİ

gDNA'lar 7 günlük kültürlerden toplanan miselyumdan SDS (ing., Sodium Dodecyl Sulfate) temelli klasik izolasyon yöntemi ile izole edildi (Doyle ve Doyle, 1987; Yörük ve diğ., 2016).

50-200mg ağırlığa sahip miselyum havanda havan eli aracılığı ile 700µL SDS tamponu (100mM Tris-HCl, 100mM EDTA, %1 SDS, 1M NaCl, %0.2 β-markaptaetanol) içerisinde parçalandı. Homojenat 1.5 mL'lik mikrotüplere alındıktan sonra üzerine 10 µL (10 mg/mL) RNaz A eklenerek 65°C'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. RNA'dan arındırılmış homojenata 700µL kloroform:izoamilalkol (24:1) eklenerek tüpler iyice karıştırıldı ve 1 dakika 13000 rpm hızda santrifüj edildi. Berrak üst sıvı yeni mikrotüpe aktarıldı ve üzerine aktarılan hacimde kloroform:izoamil alkol (24:1) eklendi. 13000 rpm'de 1 dakikalık santrifüjün sonrasında üst sıvı yeni bir mikrotüpe aktarıldı. Üzerine 1/10 hacim 3M NaOAc ve 2 hacim soğutulmuş %100 etanol eklenerek tüpler -20°C'de 1 saat bekletildi ve inkübasyonun sonunda 13000 rpm hızda 5 dakika boyunca gerçekleştirilen santrifüj ile genomik DNA'nın çöktürülmesi sağlandı. Santrifüj sonunda üst sıvı atıldı ve DNA pelleti %70'lik etanol ile yıkandı. Yıkamanın arkasından 5 dakika boyunca 13000 rpm'de çöktürme gerçekleştirilerek üst sıvı atılarak pellet kuruyana kadar bekletildi. Kurutma işlemi sonrasında DNA pelleti 50µL steril distile su içerisinde çözündürüldü.

İzole edilen gDNA'nın nitel analizi jel elektroforezi kullanılarak, nicel analizi ise spektrometrik ölçüm aracılığıyla gerçekleştirildi. Jel elektroforezinde %1'lik agaroz jel kullanıldı. Bu kapsamda 0.5 gram agaroz 50mL'lik 1× TAE tamponu (Tablo 3.2) içerisinde çözündürüldü. Agaroz jel içerisine polimerize olmadan önce 10mg/mL etidyum bromürden 5µL eklendi ve tarağı yerleştirilen jel kaseti içerisine dökülerek polimerize olması beklendi. gDNA örnekleri polimerize olan jelin kuyucuklarına 6× konsantrasyondaki yükleme boyası ile karıştırılarak yüklendi. 70 V ve 120 A sabit akımda 30 dakika boyunca yürütüldü.

Tablo 3.2: TAE tamponuna ait bileşenler ve konsantrasyonları.

Tampon	Bileşenler	Derişim
50× TAE Tamponu	Tris Bazı	2 M
	Glisial asetik asit	%5.71
	EDTA	0.05 M

gDNA'nın nicel analizi spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirildi. gDNA'ların 260 ve 280nm dalga boyundaki UV ışığı absorbands değerleri ölçüldü. 1 optik densite (OD) değeri çift iplikli DNA molekülünde 50µg/mL'ye karşılık geldiği için DNA konsantrasyonu Denklem 3.2'ye göre hesaplandı.

$$DNA \text{ konsantrasyonu } (\mu g/mL) = A_{260} \times 50 \times \text{sulandırım kat sayısı} \quad (3.2)$$

gDNA'ların saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerlerinin oranları (A_{260}/A_{280}) ile tayin edildi. Değer aralığı 1.75-1.85 olan gDNA'lar saf olarak kabul edildi (Maniatis ve diğ., 1982).

3.4. PRİMER TASARIMI

Tez çalışması kapsamında çoğaltılacak özgün gen dizilimlerine NCBI (ing., National Center Biotechnology Information) veritabanından ulaşıldı. *F. graminearum cyp51A* geni için JN416624.1, JN416625.1 aksesyonları, *F. culmorum cyp51A* geni için JN416616.1, JN416615.1 aksesyonları, *F. graminearum* ve *F. culmorum mgv1* genleri için de sırasıyla AF492766.1 ve LT598659.1 aksesyonlarından sekanslar elde edildi. *cyp51A* geninde hem genin tamamının çoğaltılmasını sağlayacak hem de gen anlatım analizlerinde kullanılacak ekzon hedefli primer çiftleri tasarlandı. *mgv1* geninde ise primer çifti gen anlatım analizinin gerçekleştirilmesi amacıyla tasarlandı. Bu kapsamda referans dizilerin FASTA formatları kopyalanarak "Primer3" çevrimiçi yazılımına aktarıldı. Ortalama %50 GC içeriği, yaklaşık 20 nükleotid uzunluğunda ve benzer Tm sıcaklık derecesinde (ortalama 60°C) primer çiftleri tasarlandı. Genlere ait tasarlanan ileri ve geri primer çiftlerinin "self-dimer", "hairpin" ve "hetero-dimer" oluşturma olasılıkları "OligoAnalyzer 3.1" programı ile çevrimiçi olarak kontrol edildi. ΔG değerleri +2 ile -6 kcal/mol değer aralığında olanlar çoğaltım amaçlı kullanılmak üzere seçildi. Tasarlanan primerler hizmet alımı ile sentezletildi.

3.5. *cyp51A* GENİNİN PZR İLE ÇOĞALTIMI VE DİZİ ANALİZİ

Tebukonazolün *cyp51A* geni üzerindeki etkisi genin çoğaltılıp dizilenmesi ile araştırıldı. Bu kapsamda *cyp51A* geni iki *Fusarium* referansının genomik DNA'larından, tasarlanan primer çiftleri kullanılarak PZR yöntemi ile çoğaltıldı. PZR bileşen karışımı 25µL hacimde olacak şekilde, 50 ng DNA, 1× tampon, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 10 pmol primer çifti, 1 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ile hazırlandı. Negatif kontrol grubu için PZR bileşenlerinden kalıp DNA yerine steril destile H₂O (dH₂O) kullanıldı. 94°C'de 5 dakikalık ön denarütasyon, 94°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye, 72°C'de 2 dakikalık 35 döngüden oluşan çoğaltımdan oluşan PZR koşulları 72°C'de 5 dakika olacak şekilde uygulanan son uzama aşaması ile

tamamlandı. Çoğaltım ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforeziyle 70V güç 120A sabit akımda altında 45 dakika yürütülmek suretiyle etidyum bromür kullanılarak boyandı ve UV ışık altında analiz edildi.

Yüksek hacimde gerçekleştirilen PZR ile elde edilen ve agaroz jel elektroforezinde yürütülen çoğaltım ürünleri agaroz jelden geri kazanılarak ticari kit (GeneMark Bio, Tayvan) yardımıyla saflaştırıldı. Bu kapsamda agaroz jelde fragment halinde gözlenen çoğaltım ürünleri bistüri ucu ile kesilerek mikrotüpe alındı. 400 µL bağlama tamponu eklenen tüpler iki dakikada bir karıştırılmak suretiyle 56 °C'de 10 dakika bekletildi. Eriyik sıvı filtreli toplama tüpüne aktarıldıktan sonra 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmenin ardından 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtreli tüpe 750 µL yıkama tamponu eklendi ve tekrar santrifüj aynı koşulda gerçekleştirildi. Santrifüj işlemi aynı şekilde tekrarlanarak kolon içerisindeki tamponun tamamen uzaklaştırılması sağlandı. Son aşamada 50 µL ayırıştırma tamponuyla yapılan santrifüjle saf DNA molekülleri elde edildi.

Saflaştırılan PZR ürünlerinin dizilemesinde *cyp51A* genine özgün tasarlanmış oligonukleotid primerler kullanıldı. Dizileme “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing” kiti (Amersham) kullanılarak Sanger dideoksi terminasyon yöntemine göre “ABI PRISM 310” genetik dizi analiz cihazında TrioGen şirketi tarafından yapıldı. Sekanslama sonuçları Chromas Lite yazılımı ile görüntülendi ve diziler FASTA formatına çevrildi. Nukleotid dizilimleri DNA Dragon yazılımı ile birleştirildi. Birleştirilen diziler NCBI'da blastN ile analiz edildi. Blast analizinde referans sekanslarla (LT222054.1, HG970333.1) eşleşmelerinde E değeri, bit skoru ve kaplama oranı değerleri baz alındı. Nukleotid değişim noktaları için gen içi ve gen dışı bölge ayrımı sağlandı. Dizileme ile elde edilen nukleotid dizi bilgisi ve referans diziler CLUSTAL W (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)⁵ programı ile hizalandı. SNP'lerin varlığı belirlendikten sonra dizileme ile elde edilen nukleotid dizisi amino asit dizisine çevrilerek tebukonazole direnç sağlayan amino asit değişimlerinin pozisyonları (136., 137., 297., 330., 379., 381. ve 384. amino asitler) hizalama ile analiz edildi.

⁵ <http://www.genome.jp/tools/clustalw/> [Ziyaret Tarihi: 18.03.2020]

3.6. APOPTOZUN HÜCRESEL GÖSTERİMİ

PDB besi ortamında 7 gün boyunca üretilen (bkz. Bölüm 3.1) *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUK99 referans suşlarına ait EC₅₀ değeri uygulanmış deney grubu, normalizasyon ve kontrol grubuna ait kültürlerin 1.5mL'si 10000 rpm hızda 5dk boyunca santrifüjlenerek hücreler çöktürüldü. Besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 1500µL 1× PBS (ing., phosphate buffered saline; 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄) ile iki kere yıkandıktan sonra 100µL PBS içinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonuna 5µL AO/EB (ing., acridine orange/ ethidium bromide, 60µgmL⁻¹/100µg mL⁻¹) floresan boyası eklendi. Boyanın hücrelere girmesi için oda sıcaklığında 5 dakika beklendi. İnkübasyon sonunda kullanılmayan boya 1× PBS (1.5mL) ile iki kere yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 100µL PBS ile süspanse edildi. Tebukonazolün neden olduğu apoptoz etkisi floresan mikroskopunda (Carl Zeiss Axio Observer, Almanya) Texas Red (595/613nm) ve GFP (AO 502/526nm, EB 510/595nm) filtreleri ile görüntülendi. Deneyler üç biyolojik ve üç teknik tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.7. OKSİDATİF STRESİN HÜCRESEL GÖSTERİMİ

7 gün boyunca PDB besi ortamında üretilen (bkz. Bölüm 3.1) *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUK99 referans suşlarına ait EC₅₀ değeri uygulanmış deney grubu, normalizasyon ve kontrol grubuna ait kültürlerin 2mL'si 10000 rpm hızda 5dk boyunca santrifüjlenerek hücreler çöktürüldü. Besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 500 µL 1× PBS ile süspanse edildi. Süspanse edilen hücrelere 30µL %4'lük formaldehit ve 1µL %0.1'lik Triton X-100 eklendi. Oda sıcaklığında 90 dakika boyunca beklenerek hücrelerin fiksasyonu sağlandı. Sabitlenen hücreler 13000 rpm hızda 5 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Fiksasyonda kullanılan kimyasallar 1× PBS (1.5mL) ile iki kere yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaştırıldı. Yıkanan hücreler 2mL 1× PBS ile çözdürüldü. Hücre süspansiyonuna 4µL (2.45 mg/mL) DCF-DA eklendi ve karanlık ortamda 25°C sıcaklık ve 120rpm hızdaki çalkalayıcıda 60 dakika inkübe edildi. Süre sonunda hücreler, 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Üst sıvı atıldıktan sonra 1× PBS (1.5mL) ile yıkama (iki kere) yapıldı. Boyanmış hücreler 100µL 1× PBS süspanse edilerek üzerine 1:1 hacimde 10mM glukoz eklendi. DCF-DA boyamaları üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Tebukonazolün *Fusarium* türleri üzerinde yarattığı oksidatif

stres etkisi floresan mikroskopunda (Carl Zeiss Axio Observer, Almanya) FITC filtresi (494/518 nm) kullanılarak incelendi.

3.8. HÜCRELERİN PROLİFERASYON TESTİ

F. graminearum PH-1 ve *F. culmorum* FcUK99 referans suşlarının EC₅₀ dozunda tebukonazol uygulanmış deney grupları, kontrol ve normalizasyon grupları PDA ortamında üretildi (bkz. Bölüm 3.1). Kültürlerden alınan 1cm²'lik miselyum plakları steril dH₂O'da çözdürülerek hücre süspansiyonları hazırlandı. 100 µL'lik hücre süspansiyonuna 1:10 (v/v) hacim WST-1 ('2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, Water Soluble Tetrazolium Salts 1-9') eklendi. Kör örnek 100µL dH₂O içerisine 10µL WST-1 eklenerek hazırlandı. 28°C'de 160rpm hızda 4 saat inkübasyon sonrası spektrofotometre ile UV ışığının 620nm ve 450nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldü. Arka plan ışıması 450nm dalga boyundaki absorbans değerlerinden 620nm dalga boyundaki absorbans değerleri çıkarılarak analiz dışı bırakıldı. Kontrol grupları ve deney grupları arasındaki oransal değişimler hesaplanarak hücre canlılığı % cinsinden verildi. WST-1 analizi 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Oransal değişimlerin bilimsel açıdan anlamlılık dereceleri Graphpad Prism 5.0 bilgisayar programı ile tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılarak hesaplandı.

3.9. PROTEİN İZOLASYONU VE MİKTAR TAYİNİ

PDA besi ortamında üretilen (bkz. Bölüm 3.1) her iki türe ait kontrol, normalizasyon ve deney gruplarından toplanan 200-500mg miselyum örnekleri, pH 7.0 olacak şekilde 0.1M'lık fosfat tamponunda (39 mL 0.2M NaH₂PO₄ + 61mL 0.2M Na₂HPO₄) havan yardımıyla parçalandı. Elde edilen homojenat 14000rpm'de +4°C'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen protein özütünü içeren üst sıvı yeni bir mikrotüpe aktarıldı. İzolasyon işlemleri 3 biyolojik tekrarlı olarak gerçekleştirildi İzole edilen protein miktarının belirlenmesi için BCA kiti (ABP Bioscience, Amerika) kullanıldı. Sığır serum albümin (ing., bovine serum albumin) serileri standart olarak kullanılmak üzere farklı konsantrasyonlarda (125, 250, 500, 1000, 2000µg/mL) hazırlandı. Miktar tayini yapılacak ham protein özütleri ve standartlardan 20µL eklenirken BCA reaktifi 200µL olarak kullanıldı. Kör okuma için 20µL fosfat tamponu üzerine 200µL BCA reaktifi eklendi. Standartlar, kör örnek ve izole edilen protein örnekleri 37°C'de 30 dakika karanlıkta bekletildikten sonra soğuması için 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.

İnkübasyon sonunda örneklerin spektrofotometrede 562nm dalga boyundaki absorbands değerleri ölçüldü. Standart serilerinin protein içeriğine (X eksen) karşılık gelen absorbands değerlerinden (Y eksen) yararlanılarak standart eğim grafiği ve grafiğe ait denklem Skanlt yazılımı ile elde edildi. İzole edilen proteinlerin miktarı hazırlanan standart eğim grafiği aracılığı ile $\mu\text{g/mL}$ cinsinden tayin edildi.

3.10. KATALAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Tebukonazolün neden olduğu oksidatif stres düzeyi, katalaz enzim aktivitesi değişimi izlenerek de araştırıldı. Katalaz aktivitesi, hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarının azalmasına bağlı olarak 240nm dalga boyunda alınan ölçümler sonucunda kontrol, normalizasyon ve deney gruplarında elde edilen absorbands değerlerine göre tayin edildi. Bu kapsamda 113 μL 50mM fosfat tamponu üzerine 40mM H_2O_2 eklenerek 30°C sıcaklıkta 2.5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 0.5mg/mL konsantrasyonda eşitlenmiş protein özütlerinden 7 μL reaksiyon karışımına eklendi ve 2 dakika boyunca 10 saniye aralıklı olacak şekilde 240nm dalga boyunda kinetik ölçüm alındı. 0.5mg/mL protein özütünün 240nm dalga boyunda alınan toplam absorbands değerleri sonucunda katalaz aktivitesi $\Delta A_{240}/\text{dak}/\text{mg}$ protein olarak belirlendi.

3.11. TOTAL RNA İZOLASYONU VE cDNA SENTEZİ

Total RNA izolasyonu iki türün 7 günlük kontrol, normalizasyon ve deney gruplarına ait kültürlerden monofazik bir bileşik olan Tripure (Roche, İsviçre) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu kapsamda 50-100 mg yaş ağırlıktaki miselyum 1mL Tripure yardımı ile havanda homojenize edildi. Homojenat 1.5mL'lik mikrotüpe aktararak 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Üzerine 200 μL kloroform eklenip tüpler birkaç kez ters-yüz edilerek nükleoprotein kompleksinin ayrışması için oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Faz ayrımı +4 °C'de 12000rpm hızda 15 dakika gerçekleştirilen santrifüjle sağlandı. Total RNA moleküllerinin bulunduğu en üst faz yeni bir mikrotüpe aktarıldı. Total RNA'lar, 500 μL 2-propanol eklenen tüpler 5 dakika oda sıcaklığında birkaç kez alt-üst edilerek karıştırılıp bekletildikten sonra +4°C sıcaklıkta 10000 rpm hızda 10 dakika gerçekleştirilen santirfuj ile çöktürüldü. Üst sıvı atılarak çökelti %75 etanol ile yıkandıktan sonra +4°C'de 7500 rpm hızda 5 dakika santrifüj yapıldı. RNA pelleti 50 μL lik RNaz A içermeyen steril dH₂O ile çözdürüldü.

İzole edilen total RNA moleküllerinin miktar ve saflık tayini spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlendi. Örneklerin 280nm ve 260nm dalga boylarında absorbans değerleri ölçüldü. $A_{260/280}$ oranının 1.85-2 arasında olması izole edilen total RNA moleküllerinin yüksek saflıkta olduğunu ifade etmektedir. 1 OD değeri tek iplikli RNA molekülünde 40µg/mL'ye karşılık gelmekte ve Denklem 3.3'e göre RNA konsantrasyonu hesaplanmıştır (Maniatis ve diğ., 1982).

$$RNA \text{ konsantrasyonu } \left(\mu \frac{g}{mL} \right) = A_{260} \times 40 \times \text{sulandırım kat sayısı} \quad (3.3)$$

Elde edilen RNA moleküllerinin niteliği %1'lik agaroz jel elektroforezinde analiz edildi. 70V güç 120A sabit akımda altında 45 dakika yürütme gerçekleştirildi. Jelin UV ışık altında görüntülenebilmesi için final konsantrasyonu 0.5µg/mL olacak şekilde etidyum bromür ile boyandı. İzole edilen RNA moleküllerinin durumu jel görüntüleme cihazı ile görüntülenerek fotoğraflandı.

qPCR uygulamasında kullanılmak üzere izole edilen total RNA moleküllerinden cDNA sentezi ticari kitin önerdiği (Takara, Japonya) protokole göre gerçekleştirildi. Protokole göre 0.5 µL Oligo dT primer (50 µM), 0.5 µL rastgele hekzamer (50 µM), 2 µL 5× PrimerScript Buffer, 0.5 µL PrimerScript RTase (200 U/µL), 4µg RNA'ya denk gelecek şekilde RNA eklendi ve total hacim 20 µL olacak şekilde RNaz A içermeyen dH₂O su ile tamamlandı. cDNA 37°C'de 20 dakikalık inkübasyonla sentezlendi. Revers transkriptaz enzim aktivitesi 85°C'de 5 dakika inkübasyonla durduruldu. Elde edilen cDNA'lar qPCR analizinde kullanılmak üzere ¼ oranında sulandırılarak kullanıldı.

3.12. q-PCR ANALİZİ

F. graminearum PH-1 ve *F. culmorum* FcUK99 referans suşlarından kurulan normalizasyon ve deney gruplarında *cyp51A* ve *mgv1* genlerinin anlatım analizleri, çift iplikli DNA molekülüne bağlanan Sybr Green I temelli floresan boya ile gerçekleştirildi. Çalışmada endojen gen olarak *β-tubulin* geni kullanıldı. Bileşenler; 1× Sybr Green karışımı (Takara, Japonya), 0.5 pmol/µL ileri ve geri primer, 1µg RNA'ya denk gelen cDNA eklenerek toplam 12µL olacak şekilde 96 kuyucuklu plakada bir araya getirildi. Çoğaltım reaksiyonu termal cihazda (Quant Studio 5, Thermo, Amerika) 95°C'de 5 dakika ön denatürasyon sonrası 40 tekrarlı 95°C'de 10 saniye, 58°C'de 15 saniye, 72°C 20 saniye uygulaması ile gerçekleştirildi ve 40°C 30 saniye soğutma

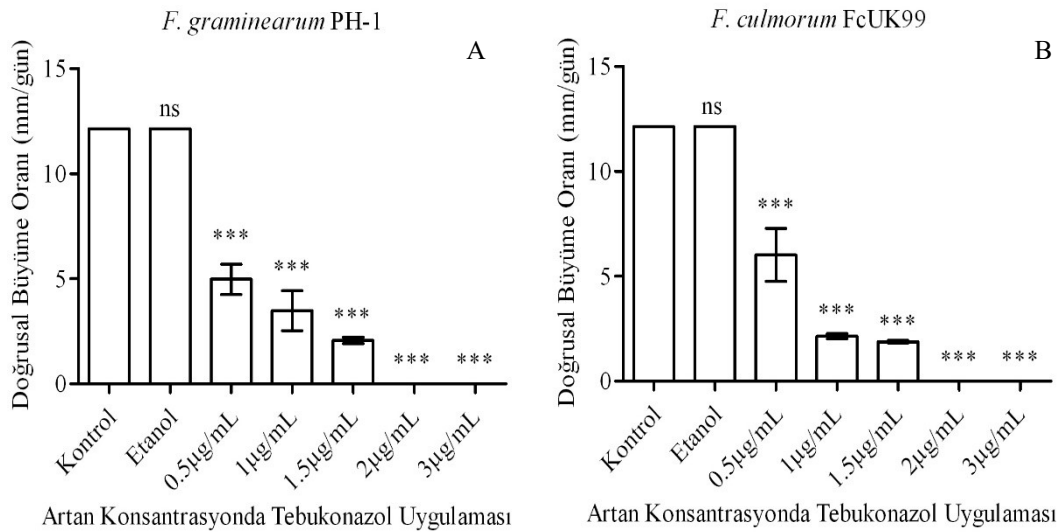
aşaması ile sonlandırıldı. Erime eğrisi analizleri için 95°C’de 15 saniye ve 60°C’de 1 dakikalık inkübasyon uygulandı. Standart grafikleri için ¼ oranında 4 logaritmik sulandırım serisi hazırlandı. Gen anlatım analizleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalizasyon değerine göre hesaplandı (Livak ve Schmittgen, 2001). Gen anlatımındaki oransal değişim değerleri saptandı. Normalizasyon ve deney gruplarının gen anlatımları arasındaki değişimlerin anlamlılığı istatistiksel olarak Graphpad Prism 5.0 programı Student’s T-Testi ile analiz edildi. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.



4. BULGULAR

4.1. TEBUKONAZOLÜN FUNGAL BÜYÜMEYE ETKİSİ

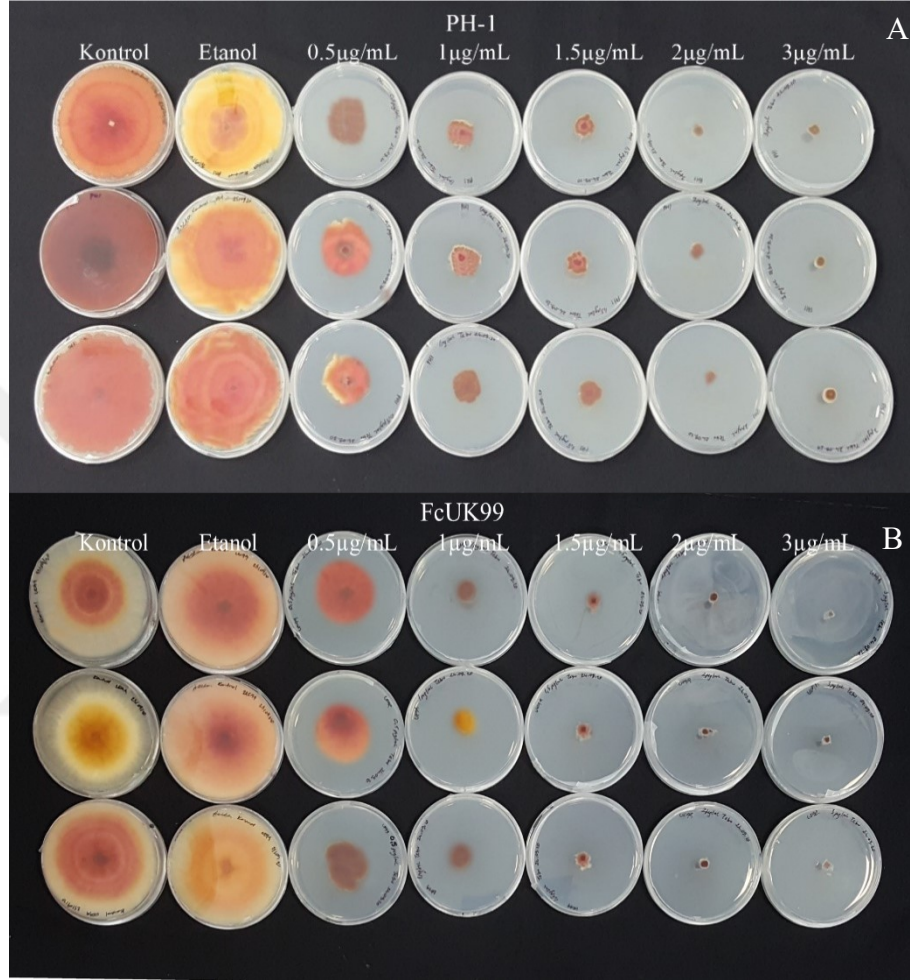
Tebukonazolün artan konsantrasyonlarının *Fusarium* referans suşlarının radyal üreme çapını azalttığı gözlemlendi. Aktif bileşiğin artan konsantrasyonlarının neden olduğu üreme çapındaki azalma, hem PH-1 hem FcUK99 referans suşlarında dördüncü ve yedinci günlerinde yapılan ölçümlerin mm/gün oranı anlamlı bulundu (***, $p < 0.001$). Her iki referans suşun deney gruplarının üreme profili Şekil 4.1’de paylaşıldı. 7. gün sonunda her iki referans suşun kontrol ve normalizasyon grupları petri kabının tüm yüzeyini kaplayacak şekilde 85mm çapında üreme gösterdi ve çözgenin fungal büyümeyi inhibe etmediği de istatistiksel olarak tespit edildi (ns, $p > 0.05$). Referans suşların kontrol ve normalizasyon gruplarının LGR değerleri ile artan konsantrasyonda tebukonazol uygulanan gruplardaki LGR değerleri karşılaştırıldığında azalmanın istatistiksel olarak anlamlı (***, $p < 0.001$) olduğu ortaya kondu.



Şekil 4.1: Tebukonazol uygulamasının *F. graminearum* PH-1 (A) ve *F. culmorum* FcUK99 (B) referanslarının yedi günlük kültürlerinin doğrusal üremesinde neden olduğu azalmanın grafikte gösterilmesi.

PH-1 referansının kontrol ve normalizasyon gruplarına ait yedi günün sonunda kültürlerde doğrusal üreme çapı 85 ± 00 mm olarak kaydedildi. Tebukonazol konsantrasyonu artışına bağlı olarak; 0.5µg/mL tebukonazol uygulamasında çap değeri 34.83 ± 2 mm, 1 µg/mL konsantrasyonda 24.33 ± 2.7 mm, 1.5 µg/mL olduğunda 14.50 ± 0.4 mm olarak hesaplandı. Tebukonazolün 2 µg/mL ve 3 µg/mL uygulamalarında ise üreme gerçekleşmedi (Şekil 4.2A). FcUK99’un kontrol ve normalizasyon gruplarında yedinci günde üreme çapı benzer şekilde

85±00 mm olarak ölçüldü. Radyal üreme çapı; 0.5µg/mL tebukonazol uygulanmasında 42.17±3.6 mm, 1 µg/mL konsantrasyonda 21.6±0.5 mm, 1.5 µg/mL dozunda 11.33±0.3 mm olarak hesaplandı. 2 µg/mL ve 3 µg/mL uygulamalarında üreme gerçekleşmedi (Şekil 4.2B).



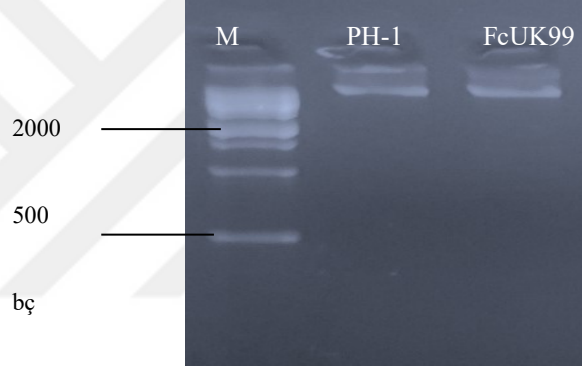
Şekil 4.2: *F. graminearum* PH-1 (A) ve *F. culmorum* FcUK99 (B) referans suşlarının kontrol, normalizasyon (etanol içeren) ve artan konsantrasyonda tebukonazol uygulamasına maruz bırakılan kültürlerine ait yedinci gün üreme durumları.

Yedinci günde kayıt altına alınan üreme çap verileri EC₅₀ hesaplamasında kullanılacak olan x_1 , x_2 , y_1 ve y_2 değerlerini verdi. *F. culmorum* FcUK99 suşu EC₅₀ hesaplamalarında %50'den fazla büyümeyi inhibe eden doz olarak 1.5 µg/mL seçilirken %50'den az büyümeyi inhibe eden doz olarak ise 0.5 µg/mL'ye ait veriler kullanıldı. Alexander ve diğ. (1999)'nin formülüne göre FcUK99 suşu için EC₅₀ değeri 0.8 µg/mL olarak belirlendi. *F. graminearum* PH-1 suşu hesaplamalarında da %50'den fazla büyümeyi baskılayan değer 1.5 µg/mL seçilirken %50'den az büyümeyi baskılayan değer 0.5 µg/mL olarak belirlendi. Bu konsantrasyonlara ait değerler

kullanılarak yapılan hesaplamada PH-1 suşuna ait EC_{50} değeri ise 0.94 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı.

4.2. gDNA İZOLASYONU VE ANALİZİ

İzole edilen gDNA'ların miktarları *F. graminearum* PH-1 suşu için 350 ng/ μL , *F. culmorum* FcUK99 suşu için 410 ng/ μL olarak hesaplandı. $A_{260/280}$ değerleri ise 1.75-1.85 aralığında tespit edildi. Maniatis ve diğ. (1982) bildirdiği kabul edilir saflık değerleri arasında olduğu belirlendi. İzolasyon sonucunda elde edilen gDNA'ların kalite ve bütünlüğü agaroz jel elektroforezi ile konreol edildi ve Şekil 4.3'de paylaşıldı. gDNA'lar PZR reaksiyonunda kullanılmak için 10ng/ μL olacak şekilde sulandırıldı.



Şekil 4.3: *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUK99 izolatlarına ait gDNA izolasyonun jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kb DNA markır (Biomatik, Kanada).

4.3. TASARLANAN OLİGONUKLEOTİD PRİMERLER VE ÖZELLİKLERİ

Tebukonazolün hedeflediği *cyp51A* ve *mgvl* genlerinin qPCR ile çoğaltımının sağlanması için intron ve ekzon bölgeleri belirlendikten sonra tasarlanan primer dizileri, *cyp51A* geninin tam boyda dizilenmesinde gerçekleştirilecek çoğaltım amacıyla tasarlanan oligonukleotid çifti ile birlikte Tablo 4.1'de verildi. *cyp51A*F/R primer çiftinin GC içeriği ortalama %50, hairpin yapısı için ΔG değeri 0.7 ile 1.48 arasında, self dimer yapısı için ΔG değeri -6.14 ile -0.96 olarak hesaplanırken primer çifti arasında oluşabilecek heterodimer yapısı için ΔG değerlerinin -6.01 ile -0.96 aralığında olduğu tespit edildi. *cyp51A*T/R primer çifti OligoAnalyzer 3.1 çevrimiçi programı aracılığı ile ortalama %GC içeriği %52.5, self-dimer ΔG değeri -3.9 ile -1.47, hairpin ΔG değeri -0.88 ile +0.51, primer çiftleri arası heterodimer ΔG değeri -6.24 ile -1.57 arasında

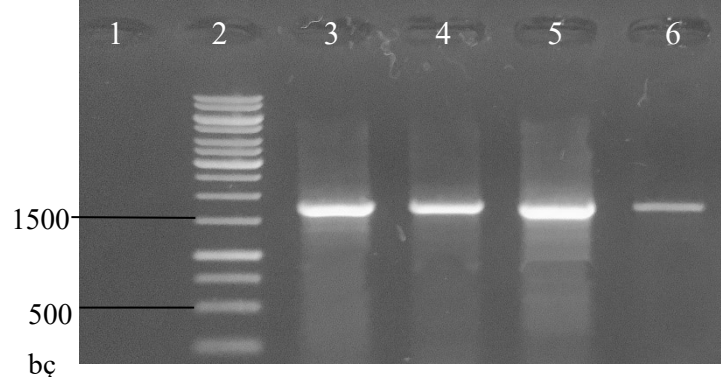
olduğu hesaplandı. Ortalama %GC oranı, self-dimer, hairpin ve heterodimer ΔG değerleri mgvrtF/R primer çifti için hesaplandı ve sırasıyla %53, -4.61 ile -0.96, -1.43 ile 0.25 ve -4.67 ile -1.47 olduğu tespit edildi.

Tablo 4.1: Tez çalışması boyunca kullanılan primerler ve özellikleri.

No	Hedef Gen	Primerin Amacı	Primer	Primer Dizisi (5'-3')	Ürün Boyutu (bp)	Çalışma Sıcaklığı
1	<i>cyp51A</i>	Dizileme	cyp51aF cyp51aR	GGGTCTTGGTAGCACTCTTT TCCTACGCTCCCATCGAATAA	1534	55°C
2	<i>cyp51A</i>	qPCR	cyp51artF cyp51artR	CAGAGCAAAGGAGGAGGTTG CTCCAATGCAGCGATGTCTA	119	57°C
3	<i>mgv1</i>	qPCR	mgvrtF mgvrtR	AGGTTCAACGATTCCGACAG GACCATTACCCTGAGGCAGA	100	57°C

4.4. *cyp51A* GENİ ÇOĞALTIMI VE SEKANS ANALİZİNE AİT BULGULAR

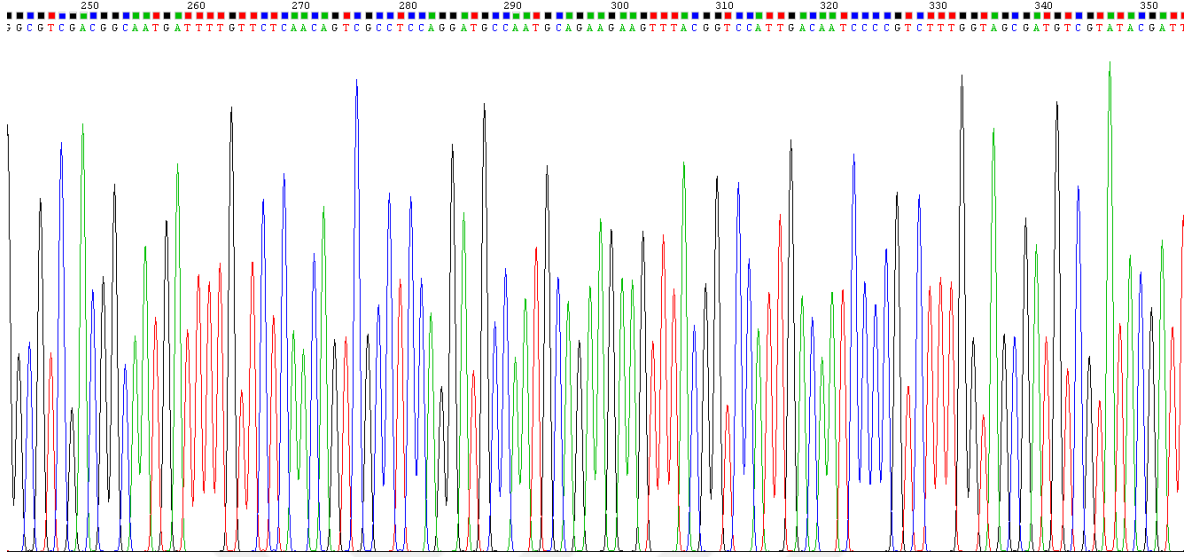
cyp51A genine ait 1 No'lu primer çifti kullanılarak (Tablo 4.1) *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUK99 izolatlarından elde edilen PZR ürünleri (1534 bp) ve saflaştırılan ürünler agaroz jel elektroforezinde görüntüledi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: PH-1 ve FcUK99 referanslarından PZR ile çoğaltılan *cyp51A* geni ve saflaştırma ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri. 1: negatif kontrol, 2: 1 kb markır (Thermo, ABD), 3: PH-1 izolatının PZR ürünü, 4: PH-1 izolatına ait saflaştırma ürünü, 5: FcUK99 izolatının PZR ürünü, 6: FcUK99 izolatına ait saflaştırma ürünü.

cyp51A genine ait 1534 baz çifti (bp) uzunluğundaki çoğaltım ürünlerinin dizilim bilgileri, yüksek kalitede sinyal pikleri içeren kromatogramlar Chromas Lite bilgisayar programı

aracılığı ile elde edildi. Yüksek pik ve dolu kutucuk içerecek şekilde her primerden ortalama 600 nukleotidlik ham okuma kaydedildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: *F. graminearum* PH-1 izolatına ait cyp51A-F primeri ile dizilenen kromatogram.

Genin ileri ve geri primerlerinden alınan okumalar DNA Dragon programı ile karşılaştırıldığında hem PH-1 suşundan hem FcUK99 suşunda 1269 bç okuma elde edildi (Şekil 4.6).

```

CTATTGTATCAGCAGCTTCCTCGAAGGCCGACGAGCCTCCACTAGTTTTCCACTGGTTC
CCTTTCTTTGGAAACGCAGTCGCTTACGGCCTGGACCCTTGTGGCTTCTTTGAGAAAGTGC
CGAGAGAAGGTAGACACTGATACATATTCTTTGACTCCAACATCTAACTCCTCTTTTAGC
ACGGAGACGTCTTCACCTTTATCTTATTTCGGTCGAAAAATCGTCGCTTGCCTTGGCGTCG
ACGGCAATGATTTTGTCTCAACAGTCGCCTCCAGGATGCCAATGCAGAAAGAGTTTACG
GTCCATTGACAATCCCCGTCTTTGGTAGCGATGTCGTATACGATTGTCCCAACTCGAAGC
TCATGGAACAAAAAGAGTTTGTCAAGTTTGGCCTTACGCAAAAAGCACTCGAGTCACACG
TCCAGTTAATCGAGCGAGAGGTTCTTGACTACGTGAAAAGTATCCATCCTTTTCTGGCA
GAACATGACACCATCGATGTCCCCAAGGCAATGGCTGAGATAACAATCTTTACTGCCTCAC
GTTCTTTGCAAGGTGAGGAAGTTTCGGAGAAAAGTCACTGCCGAGTTTGGCTGCTGTATC
ACGATCTTGACCTTGGATTTAGACCTGTCAACTTTCTGTTTCCATGGTTGCCACTGCCTC
ACAACCGAAAAACGAGATGCTGCTCATATAAAGATGCGGGAAGTCTATATGGATATCATCA
ACGATCGAAGAAAAAGGGGCATTGCAACAGAAAGATGGTACTGATATGATAGCCAACTTGA
TGGGCTGCACTTACAAGAACGGACAGCCTGTTCTGACAAGGAAATCGCCACATGATGA
TTACTCTACTCATGGCAGGCCAGCACTCTTCATCTTCTGCCAGTTCTTGGATCGTGCTGC
ACCTTGCTTCTTCTCCCGACATTACCGAAGAAGTCTACCGAGGAGCAGCTCGTAAATTTGA
GCGTTAAACGGTGCTCTACCTCCCTTCAGTACTCTGACCTTGACAAGCTCCCTCTTCTCC
AGAACGTCGTCAAGGAGACTCTCCGCGTCCACTCTTCCATCCACTCAATCCTGCGGAAAG
TCAAAGAGACCCATGCAAGTTCCCAATTCCCCTTACACGATCACTACAGACAAAAGTCATCA
TGGCTTCACCTACAGTTACCGCGATGAGTGAAGAGTACTTCGAGAACGCCAAAAACATGGA
ACCTCATCGATGGGACAAACAGAGCAAAAGGAGGAGGTTGACACTGAAAGATGTCATCGACT
ATGGATATGGGGCTGTGTCTAAAGGAACGAAGAGCCCGTACTTGGCCTTTGGTGCCGGTA
GACATCGCTGCATTGGAGAGAAGTTTGCCTATGTCAACTTGGGTGTCATTGTTGCTACTT
TGGTGCGCAACTTCAGACTTTTCGACCATTGATGGAAGACCTGGAGTCCCAGAGACAGACT
ATACTTCTT

```

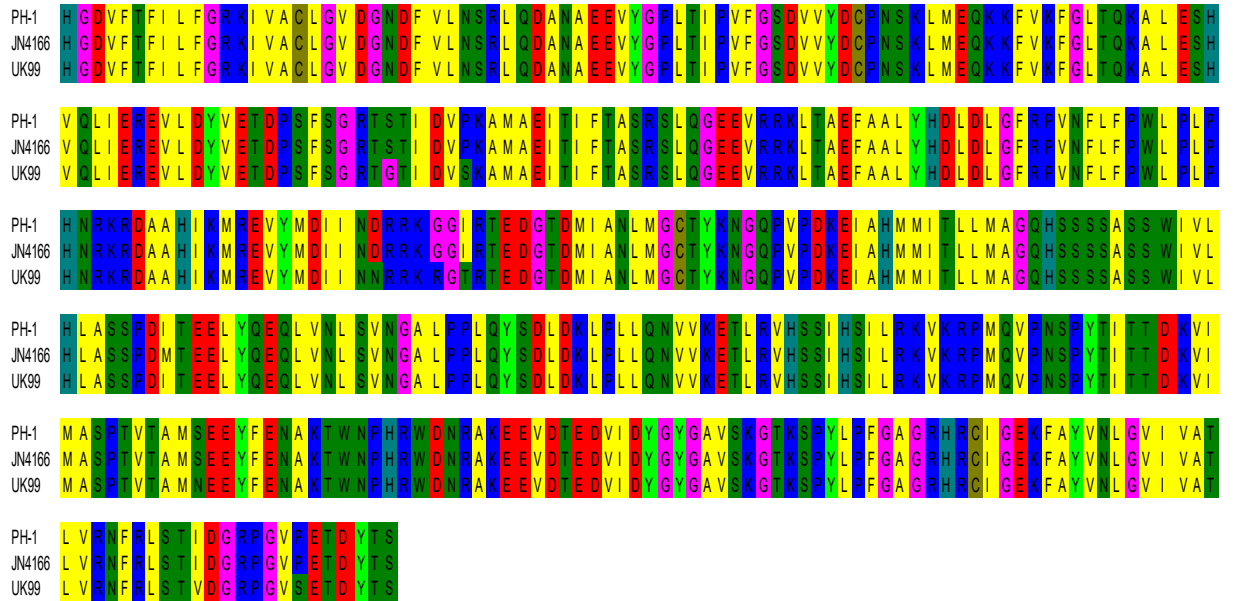
Şekil 4.6: *F. graminearum* PH-1 suşunun *cyp51A* gen diziliminin ileri (mavi) ve geri (mor) primerlere ait okumalarının DNA Dragon yazılımı ile birleştirilmiş dizi.

NCBI nukleotid veri tabanında bulunan *F. graminearum* ve *F. culmorum* türlerine ait dizilim bilgileri (LT222054.1 ve HG970333.1) ile dizileme sonuçları hizalandığında en düşük benzerlik yüzdesi %96.89 ile geri primerin *F. culmorum* FcUK99 suşunda, %98.6 ile en yüksek benzerlik değeri *F. culmorum* FcUK99 suşunda ileri primer ile elde edildi. Bit Skor verileri de 2276-2344 değer aralığındaydı (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUK99 referans suşlarına ait *cyp51A* gen dizilimlerinin ileri ve geri okumalarının veritabanlarındaki hit blastN analizleri (genom eşleşmesi kromozom: II).

Suş	Okuma	Hit benzerlik	Bit skoru	E değeri	% Benzerlik	Aksesyon
PH-1	İleri	<i>F. graminearum</i>	2307	0.0	%97.04	LT222054.1
PH-1	Geri	<i>F. graminearum</i>	2279	0.0	%97.81	HG970333.1
FcUK99	İleri	<i>F. culmorum</i>	2276	0.0	%98.6	LT598660
FcUK99	Geri	<i>F. culmorum</i>	2344	0.0	%96.89	LT598660

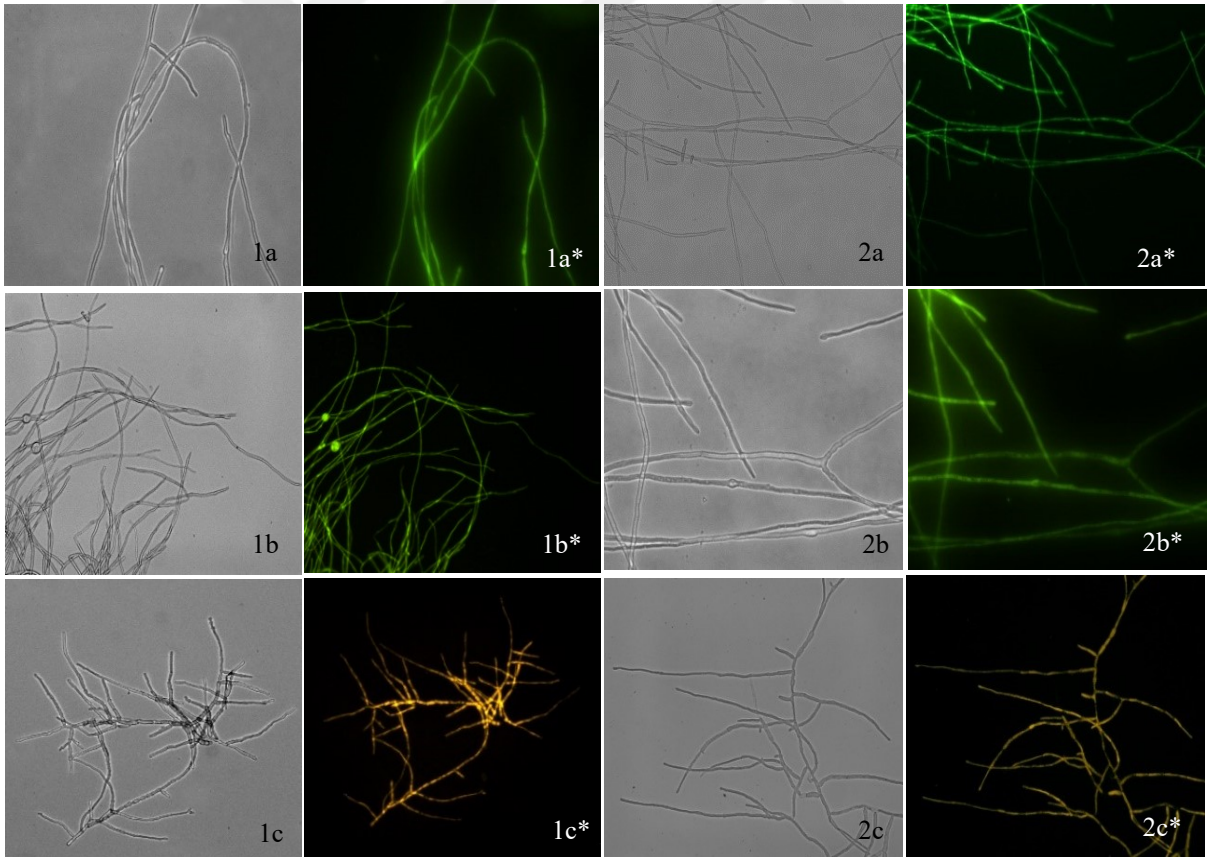
Direnç kazanım durumlarının tespiti için referans dizilerle karşılaştırma yapıldığında; *cyp51A* geninde değişimlerle ilgili olduğu bildirilmiş olan 136., 137., 297., 330., 379., 381. ve 384. amino asitlerin kodlanmasından sorumlu pozisyonlarda SNP olmadığı ortaya koyuldu (Şekil 4.7). Referans suşlarda tebukonazolün hedeflediği *cyp51A* geninde polimorfizm saptanmadı. Referans suşların EC₅₀ dozu uygulandığında tebukonazole duyarlılığı *cyp51A* genindeki direnç kazanımına yönelik bir değişimin gerçekleşmemiş olduğu gösterilerek desteklendi.



Şekil 4.7: *F. graminearum* PH-1, *F. culmorum* FcUK99 ve veritabanına kayıtlı örnek aksesyonun. CYP51A proteinlerinin amino asit dizilimlerinin çoklu hizalama analizi.

4.5. APOPTOZUN HÜCRESEL GÖSTERİMİ

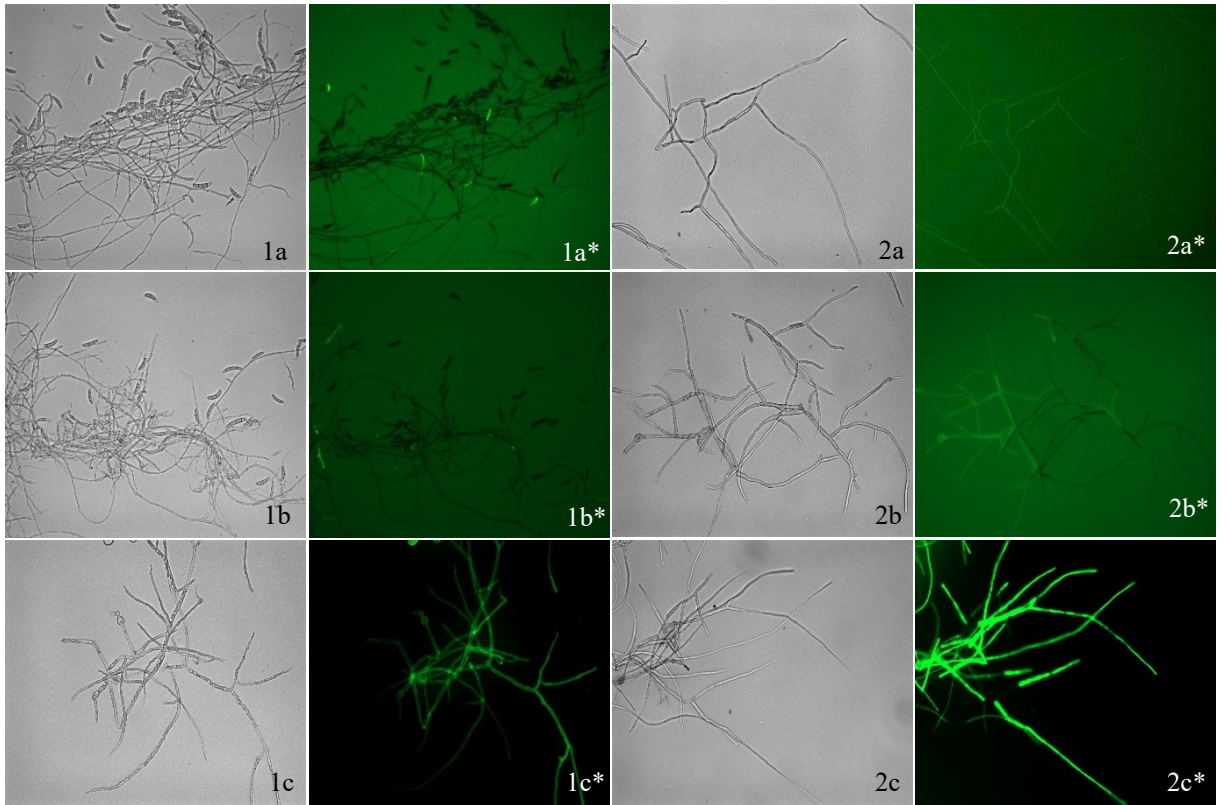
AO boyası sağlıklı ve apoptoza uğramış hücrelerin her ikisini, EB ise sadece apoptoza uğrayan hücrelerin hücre duvarlarından hücre içine sızarak apoptotik etkinliğin gözlenmesini sağlamaktadır. Apoptotik hücrelerin ayrımı ikili AO/EB boyaması ile gerçekleştirildiğinde hücreler apoptotik evreye göre sarıdan turuncuya geçen ışımlar yaparak seçilmektedir. EC_{50} tebukonazol uygulanmış AO/EB ile boyanmış referans suşların deney grubunda hücrelerden floresan mikroskop altında sarıdan turuncuya geçen farklı skalada ışımlar alındı (Şekil 4.8). Kontrol ve normalizasyon grubunda ise hücreler sadece yeşil ışımaya yayımladı. İkili boyama ile deney gruplarında apoptoz sürecinin tetiklendiği kontrol ve normalizasyon grubunda ise apoptotik sürecin etkin olmadığı hücresel düzeyde gösterildi. Tebukonazol uygulamasının her iki *Fusarium* referansında apoptotik süreci başlattığı ispatlandı ve toksisite deney sonuçları (bkz. Bölüm 4.8) ile de bu durum desteklendi.



Şekil 4.8: *F. culmorum* FcUK99 (1) ve *F. graminearum* PH-1 (2) suşlarında kontrol (a), normalizasyon (b) ve EC_{50} doz uygulaması (c) yapılan deney gruplarının AO/EB boyaması sonucu ışık mikroskobu ve floresan mikroskop (*:TexasRED ve GFP filtreleri) görüntüleri.

4.6. OKSİDATİF STRESİN HÜCRESEL GÖSTERİMİ

Deney gruplarındaki tebukonazolün neden olduğu stres koşuluna bağlı olarak artan reaktif oksijen türleri, DCF-DA floresan boyası uygulaması sonucu floresan mikroskobu altında verdiği yeşil ışıma ile hücresel düzeyde gösterildi. Normalizasyon ve kontrol gruplarında yeşil ışıma gözlenmeyerek hücrelerde DCF-DA boyasını aktifleştirecek düzeyde reaktif oksijen türleri bulunmadığını belirlemeyi sağladı (Şekil 4.9). Elde edilen bulgular tebukonazolün her iki *Fusarium* türünün referans suşlarında oksidatif stresi tetikleyerek de etkili olduğunu göstermesi bakımından önemli bulundu.



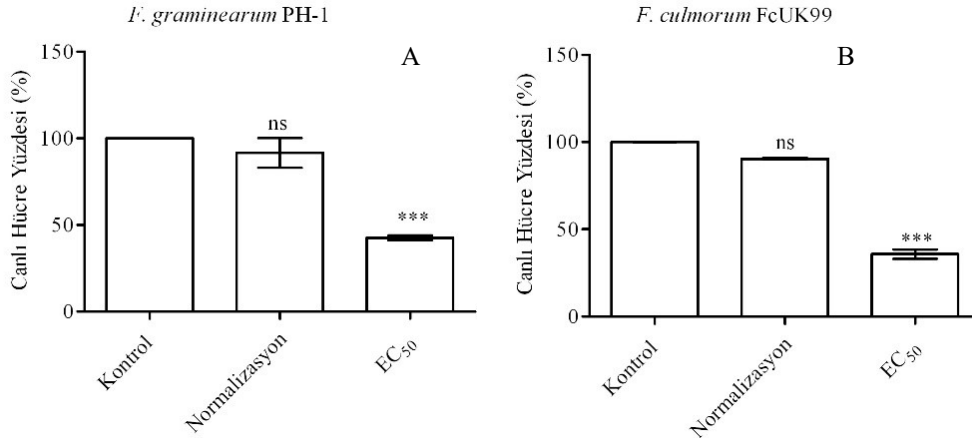
Şekil 4.9: *F. culmorum* FcUK99 (1) ve *F. graminearum* PH-1 (2) suşlarında kontrol (a), normalizasyon (b) ve EC₅₀ doz uygulaması (c) yapılan deney gruplarının DCF-DA boyaması sonucu ışık mikroskobu ve floresan mikroskop (*: FITCH filtresi) görüntüleri.

4.7. TEBUKONAZOLÜN PROLİFERASYON ORANI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN GÖSTERİMİ

Tebukonazolün hücre proliferasyonuna etkisinin gösterilmesi amacıyla üç tekrarlı olacak şekilde kontrol, normalizasyon ve EC₅₀ değeri uygulanmış PH-1 ve FcUK99 suşlarına ait kültürlerde gerçekleştirilen WST testinden elde edilen absorbans değerleri aktif bileşiğin hücre

canlılığına olan etkisini % cinsinden belirlemeyi sağladı. *F. culmorum* FcUK99 suşunun kontrol gruplarının spektrofotometrik ölçüm değeri (Ortalama $A_{450-620}=1.34\pm0.008$) %100 canlılık olarak standardize edildiğinde normalizasyon (Ortalama $A_{450-620}=1.22\pm0.06$) ve EC_{50} deney gruplarında (Ortalama $A_{450-620}=0.57\pm0.01$) hücre canlılığı sırası ile 92.49 ± 0.299 ve 35.76 ± 1.54 olarak belirlendi. Tek yönlü ANOVA analizi ile kontrol-normalizasyon grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (ns, $p>0.05$), kontrol ve tebukonazol uygulanmış (EC_{50}) gruplar arasındaki farkın ise istatistiksel olarak anlamlı (***, $p<0.001$) olduğu gösterildi (Şekil 4.10A).

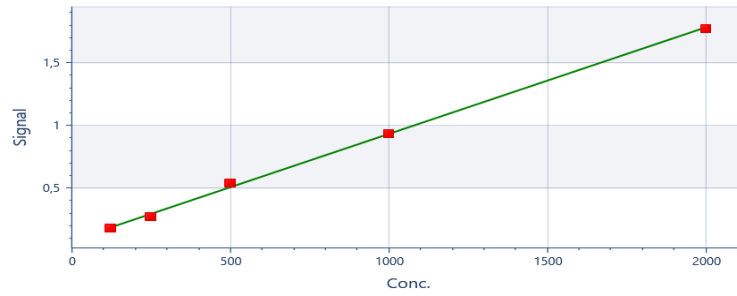
F. graminearum PH-1 suşunun da kontrol grubundan alınan spektrofotometrik ölçüm sonucu %100 canlılık kabul edilerek standardize edildiğinde etanol grubu ile EC_{50} deney grubu için hücre canlılığı sırasıyla 91.63 ± 4.93 ve 42.57 ± 0.77 olarak hesaplandı. Elde edilen değerlerin tek yönlü ANOVA analizi yapıldığında kontrol ve normalizasyon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi (ns, $p>0.05$). Kontrol ve EC_{50} grupları arasında ise farkın anlamlı olduğu hesaplanan p değeri ($p<0.001$) ile gösterildi (Şekil 4.10B).



Şekil 4.10: Tebukonazol aktif bileşiğinin *F. graminearum* PH-1 (A) ve *F. culmorum* FcUK99 (B) referans ırklarının hücre canlılığına etkisinin grafikte gösterimi.

4.8. PROTEİN MİKTAR TAYİNİ İLE İLGİLİ BULGULAR

Kontrol, normalizasyon ve deney gruplarından izole edilen total proteinlerin miktarının hesaplanması için oluşturulan standardın duyarlılık sınırları 125-2000 μ g/mL arasında olup her standart için 562nm’de spektrofotometrik ölçüm alınarak oluşturulan standart grafiği Şekil 4.11’de verildi.



Şekil 4.11: Standart serilerinin miktarına bağlı absorbens değerlerinden elde edilen standart eğim grafiği.

Standart eğri grafiğın determinasyon değeri (R^2) 0,999 olarak belirlendi ($y = 0,000829355x + 0,07975$, $R^2: 0,999$). İzole edilen proteinlerden alınan absorbens değerleri ve denklem aracılığı ile hesaplanan miktarı Tablo 4.3'te özetlendi.

Tablo 4.3: Standart serisine ve izole edilen proteinlere ait absorbens değeri ile konsantrasyon miktarı.

Örnek	Absorbans Değeri (nm)	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)
Seri 1	0,175	125,0
Seri 2	0,267	250,0
Seri 3	0,526	500,0
Seri 4	0,910	1000
Seri 5	1,733	2000
Kontrol FcUK99	1,006	1117
Normalizasyon Fc UK99	0,628	661,3
EC ₅₀ FcUK99	1239	1416
Kontrol PH1	1,595	1827
Normalizasyon PH1	0,996	1105
EC ₅₀ PH1	1004	1112

4.9. KATALAZ ENZİM AKTİVİTE BULGULARI

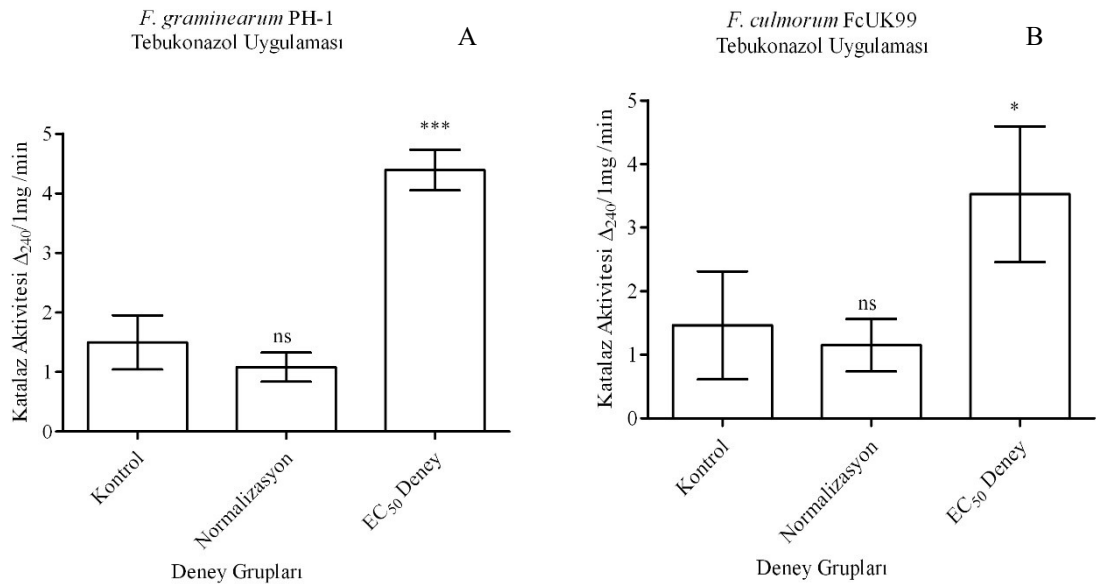
Kontrol, normalizasyon ve deney gruplarına ait proteinlerden katalaz enzim aktiviteleri üç biyolojik tekrardan elde edilen verilerin ortalama değerleri ve standart hesaplanarak Tablo 4.4 oluşturuldu.

Tablo 4.4: Referans *Fusarium* suşlarına ait kontrol, normalizasyon ve deney gruplarına ait katalaz enzim aktivite tayini.

Suş	Deney grubu	Katalaz Aktivitesi $\Delta A_{240}/\text{dk/mg}$
<i>F. culmorum</i> FcUK99	Kontrol	1.46 $\pm$ 0.49
	Normalizasyon	1.14 $\pm$ 0.23
	EC ₅₀	3.52 $\pm$ 0.61
<i>F. graminearum</i> PH-1	Kontrol	1.49 $\pm$ 0.26
	Normalizasyon	1.08 $\pm$ 0.14
	EC ₅₀	4.39 $\pm$ 0.19

F. culmorum FcUK99 suşunda kontrol ve normalizasyon grubunda katalaz enzim aktivitesi sırasıyla ortalama 1.464 ve 1.149 $\Delta A_{240}/dk/mg$ olarak hesaplandı. Tek yönlü ANOVA analizinde kontrole göre normalizasyon grubunda saptanan aktivite azalışının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (ns, $p>0.05$). EC_{50} konsantrasyonunda tebukonazol uygulanmış deney grubunda katalaz enzim aktivitesi ortalama 3.535 $\Delta A_{240}/dk/mg$ olarak belirlendi. Tek yönlü ANOVA analizi ile gerçekleştirilen; EC_{50} konsantrasyon uygulanmış deney grubu ile kontrol grubu ve deney grubu ile normalizasyon grupları arasındaki karşılaştırma, katalaz enzim aktivitesindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı (*, $p<0.05$) olduğunu ortaya koydu (Şekil 4.12A).

F. graminearum PH-1 referans suşunda kontrol ve normalizasyon örneklerinin katalaz enzim aktivite ortalama değerleri sırasıyla 1.498 ve 1.081 $\Delta A_{240}/dk/mg$ olarak hesaplandı. EC_{50} uygulanmış deney grubunda ortalama katalaz enzim aktivitesi 4.392 $\Delta A_{240}/dk/mg$ olarak belirlendi. Kontrole göre normalizasyon grubundaki enzim aktivite azalışının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (ns, $p>0.05$) tek yönlü ANOVA ile ortaya kondu. EC_{50} konsantrasyon uygulanmış deney grubu ile kontrol grubu ve EC_{50} konsantrasyon uygulanmış deney grubu ile normalizasyon grupları arasında belirlenen katalaz enzim aktivite artışının istatistiksel olarak anlamlı (***, $p<0.001$) olduğu gösterildi (Şekil 4.12B).

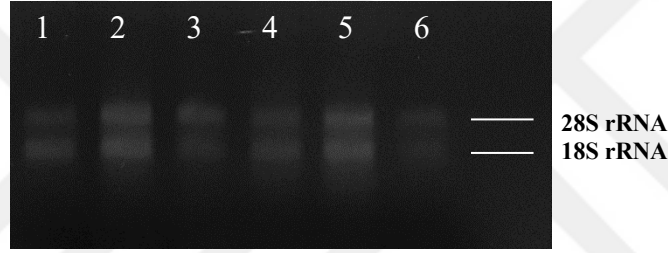


Şekil 4.12: *F. graminearum* PH-1(A) ve *F. culmorum* FcUK99 (B) referans suşlarına ait kontrol, normalizasyon ve deney gruplarının katalaz enzim aktivitesi miktar ve değişimleri.

Her iki *Fusarium* türünde tebukonazol uygulamasına bağlı olarak artan katalaz enzim aktivitesi ile mikroskobik incelemelerde gözlenen hücre içindeki oksidatif stres artışının uyumlu olduğu, hücresel düzeyde belirlenen ışımadan katalaz enzim aktivite artışının sorumlu olabileceği belirlendi.

4.10. GEN ANLATIMI ANALİZİ BULGULARI

Fusarium referans kültürlerinin kontrol, normalizasyon ve deney gruplarından izole edilen total RNA'ların saflık değeri aralığı 1.86-1.97 olarak, miktarları da 250-750ng/μL olarak hesaplandı. Ayrıca total RNA moleküllerinin cDNA çevrimine uygun kalite ve bütünlükte olduğu da agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: 7 günlük *Fusarium* kültürlerinden elde edilen total RNA molekülleri. 1: FcUK99 Kontrol, 2: FcUK99 Normalizasyon, 3: FcUK99 EC₅₀, 4: PH-1 Kontrol, 5: PH-1 Normalizasyon, 6: PH-1 EC₅₀.

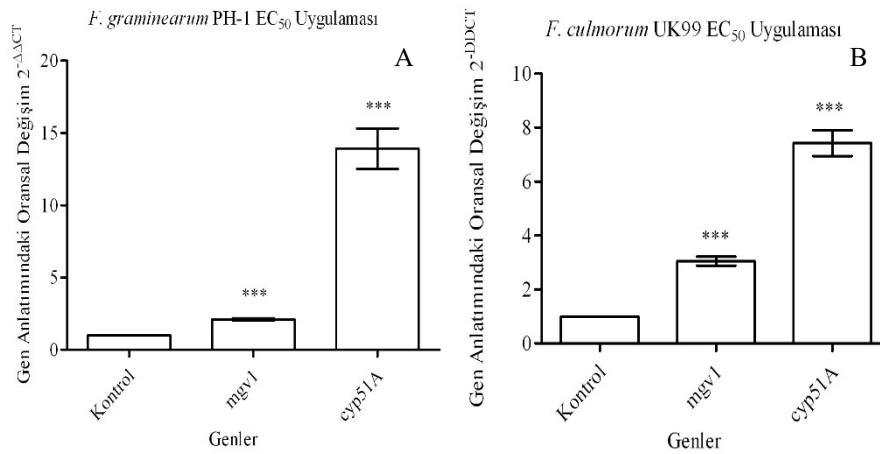
Tebukonazolün deney gruplarında neden olduğu gen anlatım değişimleri normalizasyon grubundaki gen anlatım düzeyi ile gerçekleştirilen kıyaslama ile belirlendi. qPCR analizinde ortalama E değeri 2.04 ± 0.03 olarak saptandı. Ortalama erime eğrisi endojen gen için 0.983 ± 0.0011 , *mgvl* için 0.984 ± 0.0012 ve *cyp51A* geni için 0.987 ± 0.0015 olarak belirlendi. Analiz için kullanılan üç gene ait Cp (ing., crossing point) değerleri normalizasyon ve deney gruplarına ait tüm setlerden kaydedilirken negatif kontrollere ait kuyucuklarda okuma gerçekleşmedi.

β -*tubulin*, *cyp51A* ve *mgvl* genlerinin her iki izolattan elde edilen ortalama Cp ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri Tablo 4.5'te verildi. Gen anlatımındaki oransal değişim saptandı. Genlerin üç biyolojik tekrarlı-üç teknik tekrarlı olarak gerçekleştirilen tüm deney setlerinde en düşük Cp değeri 18.23 ile PH-1 suşunun *cyp51A* geninde, en yüksek Cp değeri 25.19 ile PH-1 suşunun *mgvl* geninde olduğu belirlendi.

Tablo 4.5: *Fusarium* suşlarının normalizasyon ve deney gruplarına ait ΔC_p ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.

İzolat	Grup	Ortalama C_p			$2^{-\Delta\Delta CT}$	
		<i>B-tubulin</i>	<i>mgv1</i>	<i>cyp51a</i>	<i>mgv1</i>	<i>cyp51A</i>
PH-1	Normalizasyon	21.81±0.17	21.76±0.04	22.71±0.04	2.11±0.04	15.47±0.75
	EC ₅₀	25.05±0.07	23.93±0.07	22.01±0.19		
FcUK99	Normalizasyon	20.56±0.08	19.46±0.06	20.67±0.22	3.05±0.16	7.426±0.48
	EC ₅₀	22.93±0.05	23.49±0.05	20.67±0.22		

Normalizasyon bulgularına göre; deney setleri normalizasyon grubu ile kıyaslandığında $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri *mgv1* geni için *F.culmorum* FcUK99 izolatında 3.056 ± 0.16 , *F. graminearum* PH-1 izolatında 2.113 ± 0.04 olarak belirlendi. *cyp51A* genine ait $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri *F.culmorum* FcUK99 izolatında 7.426 ± 0.48 , *F. graminearum* PH-1 izolatında ise 15.47 ± 0.75 olarak analiz edildi. Gen anlatımlarında yaşanan bu değişimlerin istatistiksel açıdan anlamlılığı Student's T-Testi kontrol edildiğinde (Şekil 4.14); tebukonazol etkisi ile *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUK99 suşunda meydana gelen *mgv1* ve *cyp51A* gen anlatım düzeyi artışlarının istatistiksel olarak anlamlı olduğu (***, $p<0.001$) tespit edildi.



Şekil 4.14: *F. graminearum* PH-1(A) ve *F. culmorum* FcUK99 (B) referans suşlarında tebukonazolün etkisi ile değişen *cyp51A* ve *mgv1* genlerinin anlatım profilleri.

Elde edilen sonuçlara göre; EC₅₀ doz uygulaması ile *cyp51A* geninin en yüksek gen anlatım seviyesi *F. graminearum* PH-1 izolatından saptandı. *mgv1* geninin en yüksek gen anlatım seviyesi ise *F. culmorum* FcUK99 izolatında gözlemlendi. *F. culmorum* FcUK99 suşu için uygulanan EC₅₀ doz değerinin *F. graminearum* türüne göre daha düşük olması izolatın tebukonazole hassasiyetini ortaya koydu. Bu hassasiyete bağlı olarak ise *mgv1* genini anlatımının arttığı belirlendi.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yurdumuzda tahıl tarımı yapılan alanlardaki çeşitli hastalıklardan sorumlu olan *Fusarium* türleri ile mücadele geçmişten günümüze devam etmektedir. Değişen iklim koşulları ile uygulanan mücadele yöntemlerinin etkisiz kalması global bir sorun haline gelmiştir. Gerçekleştirilen yüksek lisans tezinde başak yanıklığı ve kök/kök boğazı çürüklüğü hastalıklarına sebep olan *F. graminearum* ve *F. culmorum* türleri ile mücadelede kullanılan tebukonazol aktif bileşeninin, bu iki tür üzerindeki etkisi hücresel ve moleküler düzeyde araştırılmıştır. Bu kapsamda tebukonazolün referans suşlarda meydana getirdiği; proliferasyon seviyesindeki değişimler izlenmiş, apoptoz ve oksidatif stres etkisi hücresel düzeyde ortaya konmuş, oksidatif stres etkisi enzimatik aktivite testleri ile desteklenmiş, aktif bileşenin etki mekanizmasında hedeflediği gende yol açabileceği dizi varyasyonu taraması gerçekleştirilmiş ve son olarak da özgün genlerde yol açtığı anlatım düzey değişimleri ortaya konmuştur. Elde edilen bulguların *Fusarium* türlerinin tebukonazol zirai ilacına maruz bırakıldığında; dolaylı ya da doğrudan etkilenen mekanizmalarının ortaya konmasına, hastalık tedavisi ve hastalıklardan korunmada yeni stratejiler geliştirilerek ekonomik kayıpların önüne geçilebilmesi ve ayrıca tebukonazolün *Fusarium* türleri üzerindeki etkisinin taranmasında kullanılacak hedeflerin belirlenmesine katkı sağlama potansiyeli bulunmaktadır.

Başak yanıklığı ve kök/kök boğazı çürüklüğü tarım alanlarında sıklıkla karşılaşılan hastalıklar arasında yer almalarına rağmen hastalığa neden olan etmenler ile etkili mücadelede başarı kaydedilememektedir. İlgili hastalıklar aynı agro-ekolojik bölgelerden uzun yıllardır bildirilmektedir (Bai ve Shaner, 2004; Goswami ve Kistler, 2004; Çepni ve diğ., 2013; Matny, 2015; Yörük ve diğ., 2016; Yörük ve diğ., 2018). *Fusarium* türlerinin yüksek düzeyde genetik çeşitlilik barındırması, iklim koşullarında yaşanan değişim, özgün ve uygulandığı zaman her bölgede kesin sonuç getiren bir fungusitin bulunmayışı, kontrolsüz zirai ilaç kullanımına bağlı gelişen direnç, mücadele etkinliğini sınırlandırmaktadır (Saharan ve diğ., 2004; Bernardo ve diğ., 2007; Brent ve Hollomon, 2007; Mieadener ve diğ., 2008; Saharan, 2020). Dünyada ve ülkemizde *F. graminearum* ve *F. culmorum* patojenleri ile mücadelede en çok tercih edilen yöntem, kolay temin edilebilirlik ve düşük maliyetten dolayı fungusit etkili aktif bileşik ve kombinasyonlarının uygulamasıdır (Spolti ve diğ., 2014). Günümüzde fitopatojenlerle mücadelede kullanılan 200'ün üzerinde farklı fungusit türevidir (Seiber ve Kleinschmidt, 2011). DMİ grubu fungusitleri, ergosterol sentezi için gerekli bir enzim olan 14 α -demetilaza

(CYP51) özgün olarak bağlanarak mantar büyümesini engellemektedir (Ziogas ve Malandrakis, 2015). Bu grup içerisinde yer alan triazoller, diğer aktif bileşenlere kıyasla daha yüksek etkinlikleri nedeniyle başak yanıklığı ve kök/kök boğazı çürüklüğü hastalıklarını yönetmede en yaygın kullanılan fungusitlerdir (Mesterhazy, 2003). Triazol sınıfından olan tebukonazol, uzun yıllardır tarım alanlarında kullanılmaktadır. Patojende gelişen dirençle ilgili gerçekleştirilen çalışmalarda çoğunlukla *F. graminearum* türü üzerinde yoğunlaşılmasına karşın moleküler düzeydeki mekanizmalar hakkındaki bilgiler hala çok sınırlıdır (Hellin ve diğ., 2018). Yüksek lisans tezi kapsamında tebukonazolün farklı konsantrasyonları *F. graminearum* ve *F. culmorum* referans izolatlarına uygulandığında 2µg/mL tebukonazolün her iki referans suşun üremesini durduğu görülmüştür ($p < 0.001$). Bu iki türün referans suşlarına uygulanan tebukonazolün artan konsantrasyona bağlı olarak büyüme oranını baskılayan etkin konsantrasyonunun %50 değeri FcUK99 için 0.8µg/mL, PH-1 için ise 0.94µg/mL olarak bulunmuştur. Hellin ve diğ. (2017) *F. culmorum* türünün 2005-2013 yılları arasında toplanan 107 izolatı taradıkları çalışmalarında EC₅₀ değer aralığını 0.14-1.53 µg/mL olarak bildirmiştir. Her iki referansta saptanan EC₅₀ değerlerinin, gerçekleştirilen popülasyon çalışmasından elde edilen değer aralığı içerisinde olduğu görülmektedir. Literatürde *F. graminearum* ve *F. culmorum* popülasyonlarında aynı türün bireylerinin zirai ilaçlara gösterdiği direnç düzeyinin farklı olabileceği bildirilmiştir (Yin ve diğ., 2009; Spolti ve diğ., 2014; Talas ve McDonald, 2015; Hellin ve diğ., 2018). Tebukonazolün referans suşlar üzerindeki EC₅₀ değerinin tespiti, patojenin bu zirai ilaca karşı geliştirdiği direncin taranmasında referans aralığı olarak alınmakta, aynı zamanda aktif bileşiğin tarım arazilerinde uygulanacağı doz ve kombinasyonlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Aynı cinse ait türler arasında EC₅₀ değerlerinin farklı bulunması bu türlerin yaşam döngülerindeki farklılığa bağlı olabilmektedir. Ek olarak, *F. culmorum* türünün eşem tiplerinden sadece birine sahip olması, *F. graminearum*'un ise her iki eşem tipini barındırması genetik çeşitliliği artış sağlamakta, genetik çeşitlilik de uygulanan kimyasala karşı geliştirilen dirençte rol oynayarak fungusla mücadelede dezavantaja neden olabilmektedir (Hellin ve diğ., 2017). PH-1 referansında, daha yüksek EC₅₀ değerlerinin (0.94 µg/mL) belirlenmesi, *F. graminearum* türünün *F. culmorum*'a göre sahip olduğu bu genetik çeşitlilikten kaynaklanmış olabilmektedir.

Yüksek lisans tezi, “Zirai İlaçların Aktif Bileşiklerinin *Fusarium* Türlerindeki Antifungal Etkilerinin Hücresel Gösterimi ve Direnç Seviyelerinin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması” başlıklı 119Z366 numaralı TÜBİTAK-1001 projesi kapsamında *F.*

graminearum ve *F. culmorum* türlerinde gerçekleştirilecek direnç taramasında izlenecek yolun belirlendiği ön çalışmadır.

Tez çalışmasında aktif bileşiğin hücresel ve moleküler etkisi sadece referans suşlarla inceleneceği için %50 etkin konsantrasyon değeri belirlenerek etkisi incelenmiştir. TÜBİTAK 1001 çalışmasında ise kimyasalın fungus üzerindeki etkisinden ziyade belirli bir populasyonda direnç kazanım durumu taraması ve etkisi gözleneceği için üremenin görülmeyeceği en düşük konsantrasyon olan minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK), inhibisyon konsantrasyonunun %75 (IC₇₅), %50 (IC₅₀) ve %25'ine (IC₂₅) karşılık gelen konsantrasyonları hesaplanmıştır. Yin ve diğ. (2009) tebukonazolün genetik çeşitliliğe etkisini, Hellin ve diğ. (2017) tebukonazolün oksidatif strese yol açmasını ve Diao ve diğ. (2018) tebukonazolün toksin üretimine etkisini araştırırken deneylerde EC₅₀ değerini kullanmışlardır. Yörük ve diğ. (2018) çalışmasında *Fusarium* türlerinin tiyofanatmetile karşı direnç kazanım durumunu incelerken tüm izolatlar için IC₅₀ değerini tespit etmiştir. Tez çalışmasından elde edilen EC₅₀ verileri hem *F. graminearum* hem de *F. culmorum* için TÜBİTAK projesi kapsamında gerçekleştirilecek tarama çalışmalarında başlangıç için uygulanabilecek hedef konsantrasyon bilgisini iki tür bazında da vermiştir. Tüm izolatlarda tarama çalışmalarına başlanmadan önce referans izolatlarda pilot tarama testleri yapılmış ve pilot taramada tez çalışması kapsamında bulunan EC₅₀ konsantrasyonu, EC₅₀ değerinin üst ve alt konsantrasyonları uygulanarak PH-1 ve FcUK99 suşları için MİK ve IC₇₅, IC₅₀ ve IC₂₅ değerleri analiz edilmiştir. *F. graminearum* PH-1 için MİK, IC₇₅, IC₅₀ ve IC₂₅ değerleri sırasıyla 1.75 µg/ml, 1.31 µg/ml, 0.875 µg/ml ve 0.437 µg/ml olarak belirlenmiştir. *F. culmorum* FcUK99 için ise aynı sırayla 1.2 µg/ml, 0.9 µg/ml, 0.6 µg/ml, 0.3 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Direnç tarama testlerinde IC₅₀ doz uygulamasının tebukonazolün fungus üzerindeki etkinliğini belirlemede çok daha etkili olduğu, net sonuçlara ulaşılmasını sağladığı tespit edilmiştir. TÜBİTAK projesi ve tez çalışması kapsamında her iki tür için saptanan IC₅₀ ve EC₅₀ dozlarında *F. graminearum* türünün konsantrasyon bilgisi *F. culmorum*'a göre daha yüksek değerlerde olduğu görülmektedir. 1001 proje verilerine göre yaklaşım farklı olsa da elde edilen veriler, sahip olduğu yüksek genetik çeşitlilikten ve seksüel rekombinasyondan dolayı *F. graminearum* türünün *F. culmorum*'a göre daha yüksek IC₅₀ doz uygulamasını gerektirdiğini doğrulamaktadır (Miedaner ve diğ., 2001, 2008).

Mantarlar; hedef gen duplikasyonu, mutasyon etkisiyle hedef proteinin değişimi, hedef genin aşırı anlatımı, fungusit detoksifikasyonu ve fungusitin hücre dışına taşınması olmak üzere beş farklı yolla fungusitlere karşı direnç geliştirmektedir (Lucas ve diğ., 2015; Ziogas ve Malandrakis, 2015). Gerçekleştirilen direnç çalışmaları, *F. graminearum* populasyonlarının triazollere direnç seviyelerinin aktif bileşiğin piyasaya sürülmesinden günümüze kademeli olarak arttığını göstermiştir (Klix ve diğ., 2007; Sun ve diğ., 2014). *F. graminearum*'un genomunda, *cyp51* geninin üç paralog kopyası bulunmaktadır (Liu ve diğ., 2011; Fan ve diğ., 2013; Qian ve diğ., 2018). Bu üç *cyp51* geninin (*Fgcyp51A*, *Fgcyp51B* ve *Fgcyp51C*) ürünü olan polipeptitler %61.65 amino asit dizi benzerliğine sahip olup farklı işlev üstlenirler. *Fgcyp51B*, geninin ürünü yapısal protein olarak iş görmekte ve esas olarak sterol 14 α -demetilasyondan sorumlu enzimi kodlar. Ancak, azol duyarlılığındaki rolü belirsizdir (Alcazar-Fuoli ve diğ., 2008; Yin ve diğ., 2009; Talas ve McDonald, 2015). Canlılık için gerekli olmayan *Fgcyp51A*'nın ergosterol azlığında gen anlatımının indüklendiği ve azol duyarlılığı ile yakın ilişkili olduğu bildirilmektedir (Mellado ve diğ., 2005; Liu ve diğ., 2011; Fan ve diğ., 2013). Sterol 14 α -demetilazı kodlamakta görev almayan *Fgcyp51C*'nin buğday başaklarında hastalığın görülmesinde etkin virulans faktörü olarak iş gördüğü belirlenmiştir. *Fgcyp51C* paralogu, yalnızca *Fusarium* türlerinde sık bulunan ve gen dizisi ile diğer türlerden ayrımını sağlayan filogenetik belirteç olarak kullanılmaktadır (Fernández-Ortuño ve diğ., 2010; Fan ve diğ., 2013; Qian ve diğ., 2018). Tez çalışması kapsamında azol duyarlılığı ile yakın ilişkili olduğundan, her iki türe ait referans genomlarında *cyp51A* geninin dizi varyasyonu araştırılmıştır. Her iki türe ait genin nükleotid dizisi dizilenmiş, veri tabanlarında kayıtlı *F. culmorum* için LT598660, *F. graminearum* için LT222054.1 ve HG970333.1 aksesyonları ile yüksek benzerlik göstermiş olup (%98.6-96.89) tebukonazole direnç ile ilişkilendirilmiş özgün amino asit pozisyonlarında farklılık görülmemiştir. İki referans suşun *cyp51A* genine ait tüm amino asit dizisinde yapılan karşılaştırmada ise üç farklı noktada amino asit değişimi tespit edilmiştir. Bu değişimler referans izolatların triazol direnci taşımamasını ifade etmekle birlikte, türler arasındaki farklı EC₅₀ değerlerine sebep olabileceği düşünülmektedir. Yin ve diğ. (2009) yaptığı çalışmada *F. avenaceum* ve *F. graminearum* izolatları arasında tür bazında farklılık olabileceği gibi bu farklılıkların triazol direncine sebep olup olmadığı irdelemiştir. Bununla birlikte *cyp51* gen dizilim çeşitliliğinin farklı türlerdeki triazol direnç seviye aralıklarının belirlenmesinde rol oynadığını ortaya koymuşlardır.

Farklı besi ortamları, farklı bileşik ilavesi (camphor, H₂O₂ vb.), farklı ortam koşulları ve zirai ilaçlar gibi stres oluşturan etkenlerin funguslarda oksidatif stresi arttırdığı bilinmektedir (Leiter ve diğ., 2005; Ponts ve diğ., 2009; Gazdağlı ve diğ., 2018). Oksidatif stresin varlığı DCF-DA uygulaması ile hem floresan mikroskop analizleri hem de spektrofotometrik ölçümler aracılığıyla tespit edilmektedir (Kaneko ve Ishii, 2009; Dananjaya ve diğ., 2017). Hücrelerde reaktif oksijen türleri arttıkça DCF-DA boyası ile reaksiyona girerek floresan mikroskop altında daha şiddetli yeşil ışımaya yol açmaktadır. Ortamda reaktif oksijen türlerinin miktar artışına bağlı olarak ışmanın da kuvveti artmaktadır. Reaktif oksijen türleri normal hücresel süreçler sırasında da üretilmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında test edilen kontrol ve normalizasyon gruplarının yaşamsal faaliyetleri sırasında üretilen az miktardaki reaktif oksijen türleri DCF-DA boyamaları ile çok soluk bir ışmanın görüntülenmesine yol açmıştır. Deney gruplarında ise tebukonazol uygulamasının *Fusarium* türlerinde neden olduğu artan oksidatif stres düzeyi yüksek ışmanın gözlenmesini sağlamıştır. PH-1 referans suşuna ait deney grubunda FcUK99 suşunun deney grubuna kıyasla daha fazla ışıma hücresel düzeyde görüntülenmiştir. PH-1 suşuna uygulanan EC₅₀ dozunun (0.94µg/mL) FcUK99'dan daha yüksek değerde olması (0.8µg/mL) ışıma farkını açıklamaktadır. Benzer şekilde Yörük (2018), tetrakonazolün *Fusarium* spp. üzerindeki oksidatif stres etkisini incelediği çalışmasında artan konsantrasyonla doğru orantılı şekilde ışmanın arttığını ve canlı hücre sayısında azalmanın olduğunu bildirmiştir.

Literatür bilgisine göre reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile organizmalarda fizyolojik ve morfolojik seviyelerde olumsuz etkiler görülmüştür (Leiter ve diğ., 2005, Ponts ve diğ., 2009). Hücre içi reaktif oksijen türlerinin birikimi, proteinler, lipidler, nükleik asitler dahil olmak üzere bazı biyopolimerlerin oksidasyonu ve mitokondri gibi hücresel membranların ve organellerin yıkımı ile hücreler üzerinde ciddi etkilere neden olabilmektedir (Klyubin ve diğ., 2000). Oksidatif stres kaynaklı hücrelerde hasarların artması sonucu temel fizyolojik süreç olan programlanmış hücre ölümü yani apoptoz aktifleşir (Madeo ve diğ., 1999; Slater ve diğ., 1995; Leiter ve diğ., 2005). Apoptotik süreç membran bütünlüğünün bozulması, vakuol oluşumunun artması, nukleusun parçalanması şeklinde hücresel yapı değişimlerine yol açar. Bu yapılar ışık mikroskobu altında görüntülenmektedir. Ek olarak apoptotik fungal hücrelerdeki genomik DNA fragmentasyonu da görüntülenerek apoptozun etkisi moleküler düzeyde incelenebilmektedir. AO/EB ikili floresan boyaması ile hücrelerde apoptozun varlığı görüntülenebilmektedir (Gazdağlı ve diğ. 2018; Yörük, 2018; Yörük ve diğ., 2018). AO ayırım

yapmaksızın hem sağlıklı hem de apoptotik hücelere tutunur ve hücelerin floresan mikroskop altında yeşil ışımaya vermesini sağlar. AO/EB ikili boyamasında ayırıcı işaretleme EB ile gerçekleştirilir. EB, apoptotik sürece girmiş olan hücelerin zarar gören membran duvarlarından geçerek hücre içine girer ve floresan mikroskop altında sarıdan tan rengine geçen hatta kırmızıya dönük ışımaya neden olur. Bu çalışmada da tebukonazol uygulanmamış kontrol grubu ve çözgenin dahil edildiği normalizasyon gruplarında çok soluk yeşil ışımaya gözlenmiş, bu ışımaya sağlıklı hücelerden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Tebukonazol uygulanmasına bağlı olarak oksidatif stres düzeyi yüksek olan deney gruplarında, apoptotik süreç AO/EB boyaması aracılığıyla görüntülenmiştir. Tebukonazol uygulamasını takiben gerçekleştirilen toksisite deneyleri ile aktif bileşenin hücelere üzerindeki yüksek toksik etkisinin apoptotik süreci başlattığı gösterilmiştir. CYP51/ERG11, hücre zarlarının kritik bileşenleri olan sterollerin biyosentezinde temel bir enzimdir. Sterol demetilasyon inhibitörü olan tebukonazolün sterol biyosentezinden sorumlu olan *cyp51A* genine etki ederek hücre zarında neden olduğu değişimin apoptotik süreci tetiklediği düşünülmektedir. Bu düşünce mevcut tez projesinde AO/EB boyamalarından elde edilen sonuçlar ve Shishatskaya ve diğ. (2018) çalışması ile desteklenmektedir.

Oksidatif stres varlığında sadece apoptotik süreç etkilenmez aynı zamanda enzim aktivitelerinde de değişim gerçekleşmektedir. Bu bağlamda ortamda reaktif oksijen türlerinin artması ile apoptoz indükleyici faktörler hücrede aktifleşir (Leiter ve diğ., 2005). Antioksidan enzimlerden olan süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz, katalaz, glutatyon redüktaz hücrenin ilk savunma hattıdır ve hücrenin birincil antioksidanlarını oluşturur. SOD, süperoksitleri H_2O_2 'yi ayırır, ardından askorbat peroksidaz, indirgeyici olarak askorbat kullanarak H_2O_2 'yi detoksifiye eder. Katalaz ise H_2O_2 'nin kendisini herhangi bir indirgeyici kullanmadan detoksifiye eder. Hassas türlerde antioksidan enzim seviyesinin düşük düzeyde olması, oksidatif stresin yatkınlığının nedeni olabilir, çünkü ilk savunma hattının olmaması, hassas türlerde genellikle stres altında gözlenen yüksek reaktif oksijen türlerinin üretimine ve toksisiteye yol açabilir (Asselbergh ve diğ., 2008; Atkinson ve Urwin, 2012). Kısaca katalaz enzim aktivitesi, *Fusarium*'un antioksidan savunma ağında çok önemli bir rol oynamaktadır (Ponts ve diğ., 2009). Yapılan tez çalışmasında referans izolatlarına uygulanan tebukonazol uygulamasına bağlı olarak katalaz aktivitesinin değişimi araştırılmıştır. PH-1 suşunda katalaz aktivitesi kontrol ve normalizasyon grubu için sırasıyla 1.498 ± 0.261 ve 1.081 ± 0.140 $\Delta A_{240}/dk/mg$ olarak hesaplanmıştır. Tebukonazol uygulaması ile PH-1 suşunda katalaz

aktivite miktarı $4.392 \pm 0.195 \Delta A_{240}/dk/mg$ olarak hesaplanmıştır. FcUK99 suşunun kontrol ve normalizasyon gruplarında katalaz aktivitesi sırasıyla 1.464 ± 0.490 ve $1.149 \pm 0.237 \Delta A_{240}/dk/mg$ olarak tespit edilmiştir. FcUK99 suşunun tebukonazol ile muamele edilmesi sonucunda katalaz aktivitesi $3.525 \pm 0.615 \Delta A_{240}/dk/mg$ olarak belirlenmiştir. FcUK99 izolatına $0.8 \mu g/mL$ EC_{50} tebukonazol uygulanan deney grubunda katalaz enzim aktivitesi %306 kat artarken, $0.94 \mu g/mL$ EC_{50} tebukonazol uygulaması ile PH-1 izolatının deney grubunda ise %406 kat arttığı belirlenmiştir. Katalaz enzim aktiviteleri, uygulanan kimyasal miktarına karşılık gelecek şekilde doğru orantılı olarak $\Delta A_{240}/dk/mg$ değerinde artmıştır. Çalışma sonucunda tebukonazol uygulamasına bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin ve H_2O_2 miktarı artarak bu durum katalaz aktivitesinin de artışına neden olmuştur. Ayrıca artan katalaz aktivitesinin mikroskopik incelemelerde gözlenen hücre içindeki oksidatif stres artışını desteklediği ve artan ışımadan katalaz enzim aktivite artışının da rol oynadığı ortaya konmuştur. Yüksek lisans tezi kapsamında elde edilen sonuçlar Angelova ve diğ. (2005) tarafından yapılan 12 farklı mantar türüne ait izolatlarda H_2O_2 uygulamasına bağlı olarak gelişen (%300'e kadar) katalaz enzim aktivitesinin artışını içeren bulgular ile paralellik göstermektedir. Bitki türevli esansiyel yağ bileşikleri, triazol grup üyeleri ve H_2O_2 gibi çeşitli kimyasal uygulamalarının *Fusarium* türlerinde enzimatik aktivite artışına neden olduğu farklı çalışmalarda da gösterilmiştir (Angelova ve diğ., 2005; Hellin ve diğ., 2017; Gazdağlı ve diğ., 2018).

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), sodium 3,3'-[1(phenylamino)carbonyl]-3,4-tetrazolium]-3is(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate (XTT) ve WST 1/3/4/5/8/9 hücre proliferasyon analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bir stres koşulu ile karşılaşmış memeli hücre kültürlerinde CC_{50} ve IC_{50} değerlerinin tespitinde sıklıkla MTT ve XTT testleri tercih edilmektedir (Yadav ve diğ., 2014; Adan ve diğ., 2016). Buna karşın fungal alemde ise CC_{50} , IC_{50} ve EC_{50} değerleri agar dilüsyon tekniği ile tespit edilmekte ve Tsukatani ve diğ. (2014) 18 farklı mantar grubunda WST-8'e dayalı olarak hücre proliferasyonunu başarılı bir şekilde analiz etmişlerdir. Bu nedenle mevcut çalışmada ilk defa tebukonazol etkisine maruz bırakılmış *Fusarium* spp.'de toksisite testleri WST-1 ile gerçekleştirilmiştir. Agar dilüsyon tekniği ile elde edilen EC_{50} değerlerine çok yakın bir sitotoksik baskılama WST-1 analizleri sonucunda görülmüştür. Her iki referans suş içinde tebukonazol uygulamasına bağlı canlı hücre sayısının kontrol ve normalizasyon grubuna göre düşük olduğu görüldü. Tebukonazol uygulaması ile PH-1 suşunda canlı hücre yüzdesi 42.57 ± 0.77 , FcUK99 suşunda ise 35.76 ± 1.54 değerlerine düşmüştür. Elde edilen veriler

EC₅₀ tebukonazol uygulamasının *Fusarium* spp. üzerinde gelişimi nicelik ve nitelik olarak %50'den daha fazla etkilediğini ispat etmektedir. Teker ve diğ. (2021) gerçekleştirdiği çalışmada potansiyel antifungal olarak kullanılan bir diğer aktif bileşen α -thujonun *F. graminearum* türünde toksisiteye neden olduğu ve %75 oranında proliferasyonu baskıladığı tespit edilmiştir.

Tez çalışmasında tebukonazolün referans suşlara etkisi sadece hücresel düzeyde değil moleküler düzeyde qPCR analizi ile de araştırılmıştır. Bu amaçla tebukonazol uygulanmış ve çözgen içeren örneklerde *cyp51A* ve *mgv1* genlerinin anlatımı β -*tubulin* geninin anlatımına göre normalize edilmiştir. Ergosterol sentezi ve dolayısıyla da triazol direnciyle ilişkili *cyp51A* anlatımında her iki türde de anlamlı seviyede artış ($p<0.001$) görülmüştür. *cyp51* genlerinin aşırı anlatımı, çok sayıda tür için bildirilen ortak bir direnç mekanizmasıdır (Cools ve diğ., 2012; Lucas ve diğerleri, 2015; Ziogas ve Malandrakis, 2015). *cyp51A* geninin aşırı anlatım yapması sterol 14a-demetilaz seviyelerini yükseltir ve böylece zara bağlanan taşıyıcı proteinlerin sayısı arttığı için triazollerin hücre dışına aktarılacak etkisinin azaldığı, fungusa direnç sağladığı bilinmektedir (Ziogas ve Malandrakis, 2015). Yapılan bu çalışmada *cyp51A* gen ekspresyonu, tebukonazol uygulamasını takiben artmıştır. Ancak gen anlatımındaki bu artışın referans suşlara triazol direncini taşımasını sağlayacak seviyede etki etmediği LGR analizleri ve *cyp51A* dizileme çalışmasında elde edilen verilerle paralellik göstermektedir. Gen anlatımı, radyal üreme ve sekanslama verileri mevcut suşlardaki triazol hassasiyetini göstermektedir. *cyp51A* gen anlatımlarındaki kat artış farkı (FcUK99 için 7.426 ± 0.48 , PH-1 için 15.47 ± 0.75) uygulanan triazol miktarına bağlı olarak farklı seviyelerde gözlenmiştir. Ayrıca kontrol gruplarına göre sporulasyon ve vejetatif üremeyle ilişkili *mgv1* genindeki artış da (FcUK99 için 3.056 ± 0.16 , PH-1 için ise 2.113 ± 0.04) tebukonazolün referans suşlarda meydana getirdiği fizyolojik değişimlerin önemli bir göstergesidir. PH-1 suşuna kıyasla FcUK99 suşunda *mgv1* geninin yüksek gen anlatım seviyesi göstermesi ve uygulanan EC₅₀ doz değerinin *F. graminearum* türüne göre daha düşük olması izolatin tebukonazole hassasiyetini ortaya koymuştur. Tiyoanetatmetil aktif bileşiğinin de üreme profillerine göre seçilmiş (farklı vejetatif kapasiteye sahip) *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarında *mgv1* geninde 2.196 ± 0.01 artışa neden olduğu Yörük ve diğ. (2018) göstermiştir. Tebukonazol uygulamasına bağlı ergosterol sentezinin sekteye uğraması ve hücresel bütünlüğün bozulması ile alakalı olarak *mgv1* gen anlatımında artış görülmüştür. Ek olarak, Yörük ve diğ. (2018) verileri ile mevcut çalışmanın gen anlatım profilleri karşılaştırıldığında; β -*tubulin* proteinini hedefleyen

tiyofanatmetilin, tebukonazole göre daha az etkili bir ajan olduğu görülmektedir. Ayrıca Yörük ve diğ. (2018) gerçekleştirdikleri çalışmada sadece morfolojik ve transkriptomik testler üzerine yoğunlaşmışlardır. Tez kapsamında ise benzer yaklaşımlara ek olarak hücresel, sitotoksik ve enzimatik analizler gerçekleştirilerek moleküler düzeyde daha detaylı analizler gerçekleştirilmiştir.

Triazol direnç seviyelerinin araştırıldığı çalışmalar genellikle EC_{50} değerlerinin belirlenmesi, *cyp51A* anlatımı, *cyp51A* sekans farklılıklarının belirlenmesi ve analitik metodlar ile sınırlı kalmıştır. Buna karşın fitopatojende triazol uygulamasına bağlı meydana gelen fizyolojik, genetik, epigenetik, sitotoksik ve diğer moleküler genetik değişimler hakkında bilgi birikimi literatürde mevcut değildir. Bu çalışmada ilk defa tebukonazol uygulanmış iki farklı *Fusarium* türünde farklı fizyolojik ve moleküler parametreler (enzimatik, oksidatif stres, apoptoz, gen anlatım ve proliferasyon) kullanılmıştır. Tebukonazolün göreceli olarak düşük seviyedeki EC_{50} değerleri tespit edilmiş, apoptoz ve oksidatif stresin varlığı fluoresan mikroskopu ve enzim aktivite aracılığıyla gösterilmiş, yaşamsal süreçlerden sorumlu genlerdeki varyasyonların yol açtığı fizyolojik değişimler gen anlatımı aracılığıyla ortaya konulmuş ve toksisite seviyesi gösterilmiştir. Tebukonazolün *Fusarium* türleri üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olduğu ve bu etkinin sistematik bir şekilde meydana geldiği ispat edilmiştir. Elde edilen veriler ileriki çalışmalar için umut vaat eder nitelikte olup tarama çalışmaları için yol gösterici hedefler ortaya konmuştur. Tebukonazol uygulanan *Fusarium* türlerinde doğrudan veya dolaylı yoldan etkilenen mekanizmaların ortaya konulmasına ek olarak *in planta* ve *in vivo* doğrulama analizlerinin de yapılması bu çalışmayı destekler nitelikte olacaktır. Ayrıca daha fazla *Fusarium* genusuna ait tür ve izolatlarla yapılacak ileri çalışmalardan elde edilebilecek veri birikimi, hastalıklardan korunmada ve mücadelede yeni stratejiler geliştirmede kullanılarak ekonomik kayıpların önüne geçilmesi için kaynak sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

- Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y., 2016, Cell proliferation and cytotoxicity assays, *Current pharmaceutical biotechnology*, 17(14), 1213-1221.
- Agrios, N. H., 1997, Plant pathology. 4.ed., *New York: Academic Press*, California.
- Alcazar-Fuoli, L., Rodriguez-Tudela, J. L., & Mellado, E., 2008, Antifungal drug resistance in molds: Clinical and microbiological factors, *Current Fungal Infection Reports*, 2(1), 36-42.
- Alexander, B., Browse, D. J., Reading, S. J., & Benjamin, I. S., 1999, A simple and accurate mathematical method for calculation of the EC₅₀, *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 41(2-3), 55-58.
- Alonso-Gato, M., Astray, G., Mejuto, J.C., Simal-Gandara, & J., 2021, Essential Oils as Antimicrobials in Crop Protection, *Antibiotics* 10, 34. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010034>.
- Anderson, N. R., Freije, A. N., Bergstrom, G. C., Bradley, C. A., Cowger, C., Faske, T., ... & Wise, K. A., 2020, Sensitivity of *Fusarium graminearum* to metconazole and tebuconazole fungicides before and after widespread use in wheat in the United States. *Plant Health Progress*, 21(2), 85-90.
- Angelova, M.B., Pashova, S.B., Spasova, B.K., Vassilev, S.V., & Slokoska L.S., 2005, Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat, *Mycological research*, 109(2), 150-158.
- Arıcı, E. Ş., 2018, *Ökaryotik Bitki Patojenleri*, Ziraat Mühendisliğinde Bitki Koruma, In: Yaşar, B. (ed.), 14. Bölüm, Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayın, Isparta, ISBN: 978-605-83004-4-6, 139-148.
- Arslan, Ü., Baykal, N., 2002, Kök ve kökboğazı fungal patojenlerine karşı bazı buğday çeşitlerinin reaksiyonları ve tohum koruyucu fungusitlerin *Fusarium culmorum* (w.g.sm.) sacc.'a etkisi, *Uludağ Üniviversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16, 69-76.
- Asselbergh, B., De Vleeschauwer, D., & Hofte, M., 2008, Global switches and fine-tuning—ABA modulates plant pathogen defense, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(6), 709-719.
- Atkinson, N.J., & Urwin, P.E., 2012, The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field, *Journal of experimental botany*, 63(10), 3523-3543.
- Bai, G., & Shaner, G., 2004, Management and resistance in wheat and barley to fusarium head blight, *Annual Review of Phytopathology*, 42, 135-161.
- Baldwin, T.K., Urban, M., Brown, N. & Hammond-Kosack, K.E., 2010, A role for topoisomerase I in *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* pathogenesis and sporulation, *Molecular plant-microbe interactions*, 23, 566–577.

- Bassolé, I.H.N., & Juliani, H.R, 2012, Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties, *Molecules*, 17, 3989–4006.
- Beresford, R. M., 2005, DMI (demethylation inhibitor) management strategy, *Pesticide resistance: prevention and management strategies*, 21-25.
- Bernardo, A., Bai, G., Guo, P., Xiao, K., Guenzi, A. C., & Ayoubi, P., 2007, *Fusarium graminearum*-induced changes in gene expression between *Fusarium* head blight-resistant and susceptible wheat cultivar, *Functional and Integrative Genomics*, 7, 69-77.
- Brent, K. J., 1982, Case study 4: Powdery mildews of barley and cucumber, *Fungicide Resistance in Crop Protection*, In: Dekker, J. & Georgopoulos, S. G. (ed), 4, Pudoc, Wageningen.
- Brent, K. J., & Holloman, D. W., 2007, *Fungicide resistance in crop Pathogens: how can it be managed? FRAC Monograph No. 1*, Fungicide Resistance Action Committee, Brussels, ISBN 90-72398-07-6.
- Brown, D. W., & Proctor, R. H., 2013, *Fusarium*, Caister Academic Press, USA.
- 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.
- Cook, R.J., 1993, Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens, *Annual review of phytopathology*, 31(1), 53-80.
- Cools, H. J., and Fraaije, B. A., 2012, Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control, *Pest management science*, 69(2), 150-155.
- 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.
- Cuomo, C. A., Guldener, U., Xu, J. R., Trail, F., Turgeon, B. G., Pietro, A. D., Walton, J. D., Ma, L. J., Baker, S. E., Rep, M., Adam, G., Antoniw, J., Baldwin, T., Calvo, S., Chang, Y. L., Decaprio, D., Gale, L. R., Gnerre, S., Goswami, R. S., Koscak, K. H., Harris, L. J., Hilbrun, K., Kennell, J. C., Kroken, S., Magnuson, J. K., Mannhaupt, G., Mauceli, E., Mewes, H. W., Mitterbauer, R., Muehlbauer, G., Mensterkotter, M., Nelson, D., O'Donnell, K., Quellet, T., Qi, W., Quesneville, H., Roncero, M. I. G., Seong, K. Y., Tetko, I. V., Urban, M., Waalwijk, C., Ward, T. J., Yao, J., Birren, B. W., Kistler, H. C., 2007, The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization, *Science*, 317, 1400-2.
- Çepni, E., Tunalı, B., & Gürel, F., 2013, Genetic diversity and mating types of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* originating from different agro-ecological regions in Turkey, *Journal of basic microbiology*, 53(8), 686-694.
- Dananjaya, S. H. S., Erandani, W. K. C. U., Kim, C. H., Nikapitiya, C., Lee, J., & De Zoysa, M., 2017, Comparative study on antifungal activities of chitosan nanoparticles and

- chitosan silver nano composites against *Fusarium oxysporum* species complex, *International journal of biological macromolecules*, 105, 478-488.
- Davidse, L.C., 1986, Benzimidazole fungicides: mechanisms of action and biological impact, *Annual review of phytopathology*, 24(1), 43-65.
- Davidse, L.C., 1988, *Benzimidazole fungicides: mechanisms of action and resistance*. Modern selective fungicides, In: Delp CJ (ed.), 25–27, American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA.
- Davidson, R. M., Hanson, L. E., Franc, G. D., & Panella, L., 2006, Analysis of β -tubulin gene fragments from benzimidazole-sensitive and-tolerant *Cercospora beticola*, *Journal of Phytopathology*, 154(6), 321-328
- De Waard, M. A., 1994, *Resistance to fungicides which inhibit sterol 14-demethylation*, an historical perspective, In BCPC Monograph, 60, 3-10.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D., 2012, The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology, *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.
- Diao, X., Han, Y., & Liu, C., 2018, The fungicidal activity of tebuconazole enantiomers against *Fusarium graminearum* and its selective effect on DON production under different conditions, *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(14), 3637-3643.
- Dickenson, M., 2003, *Molecular plant pathology*, 1st ed., Bios Scientific Publishers, London, ISBN 1 85996 044 8.
- Doohan, F., 2014, Fungal Pathogens of Plants, Fungi: Biology and Applications-Second Edition, Kavanagh, K. (ed.), Vol. 12, A John Wiley & Sons, Ltd., Publication, 313-345, ISBN 978-0-470-97710-1
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, 19, 11-15
- Dyakov, T. Y., Dzhavakhly, V. G., & Korpela, T., 2007, *Comprehensive and Molecular phytopathology*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Eckert, J. W., 1982, Case study 5: *Penicillium* decay of citrus fruits, *Fungicide Resistance in Crop Protection*, In: Dekker, J. & Georgopoulos, S. G. (ed), 5, Pudoc, Wageningen, 231-250.
- Fan, J., Urban, M., Parker, J. E., Brewer, H. C., Kelly, S. L., Hammond-Kosack, K. E., Fraaije, B. A., Liu, X., & Cools, H. J., 2013, Characterization of the sterol 14 α -demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific CYP 51 function, *New Phytologist*, 198(3), 821-835.
- Fernández-Ortuño, D., Loza-Reyes, E., Atkins, S. L., & Fraaije, B. A., 2010, The *CYP51C* gene, a reliable marker to resolve interspecific phylogenetic relationships within the

Fusarium species complex and a novel target for species-specific PCR, *International journal of food microbiology*, 144(2), 301-309.

- Fungicide Resistance Action Committee. (2020). FRAC Code List 2020: fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action (including FRAC Code numbering). Fungicide Resistance Action Committee, Croplife International. URL https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2020-finalb16c2b2c512362eb9a1eff00004acf5d.pdf?sfvrsn=54f499a_2 , [Ziyaret Tarihi: 2 Ocak 2021].
- Gazdağlı, A., Sefer, Ö., Yörük, E., Varol, G., Teker, T., & Albayrak, G., 2018, Investigation of Camphor Effects on *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* at Different Molecular Levels, *Pathogens*, 7(4), 90.
- Geat, N., & Singh, D., 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.
- Genet J. L., & Jaworska G., 2009, Baseline sensitivity to proquinazid in *Blumeria graminis* f. *sp. tritici* and *Erysiphe necator* and cross-resistance with other fungicides, *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 65(8), 878-884.
- Gilpatrick, J. D, 1982, Case study 2: Venturia of pome fruits and *Monilinia* of stone fruits. *Fungicide Resistance in Crop Protection*, In: Dekker, J. & Georgopoulos, S. G. (ed), Pudoc, Wageningen, 195-206.
- Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., & McCaffery, A., 2002, Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides, *Pest Management Science*, 58(9), 859-867
- Goswami, R. S., & Kistler, H. C., 2004, Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crop, *Molecular plant pathology*, 5(6), 515-525
- Gutleb, A. C., Morrison, E., & Murk, A. J., 2002, Cytotoxicity assay for mycotoxins produced by *Fusarium* strains, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11(3-4), 309-320.
- Hancock, R.D., Hogenhout, S., & Foyer, C.H., 2015, Mechanisms of plant-insect interaction. *Journal of experimental botany*, 66(2), 421-424.
- Harman, G. E., 1991, Seed treatments for biological control of plant disease, *Crop protection*, 10(3), 166-171.
- Heaney, S. P., Hall, A. A., Davis, S. A., & Olaya, G., 2000, Resistance to fungicides in the QoI-STAR cross-resistance group: current perspective, In The BCPC Conference: Pests and diseases, 13-16 November 2000, Hilton Metropole Hotel Brighton, UK, British Crop Protection, Volume 2, Proceedings of an international conference held, (pp. 755-762). Council

- 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.
- Homdork, S., Fehrmann, H., & Beck, R., 2000, Effects of field application of tebuconazole on yield, yield components and the mycotoxin content of *Fusarium*-infected wheat grain, *Journal of phytopathology*, 148(1), 1-6.
- Hornok L., Waalwijk C., Leslie Jf., 2007, Genetic factors affecting sexual reproduction in toxigenic *Fusarium* species, *International Journal of Food Microbiology*, 119, 54-58.
- Irzykowska, L., Weber, Z., Bocianowski, J., 2012, Comparision of *Claviceps purpurea* populations originated from experimental plots or fiedls of rye, *Open Life Sciences*, 7(5), 839-849.
- Ismail, A. A. & Papenbrock, J., 2015, Mycotoxins: Producing fungi and mechanisms of phytotoxicity, *Agriculture*, 5(3), 493-537.
- Jestoi, M., 2008, Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin—A review, *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(1), 21-49.
- Kaku, K., Takagaki, M., Shimizu, T., & Nagayama, K., 2003, Diagnosis of dehydratase inhibitors in melanin biosynthesis inhibitor (MBI-D) resistance by primer-introduced restriction enzyme analysis in scylatone dehydratase gene of *Magnaporthe grisea*, *Pest Management Science*, 59: 843-846.
- Kaneko, I., & Ishii, H., 2009, Effect of azoxystrobin on activities of antioxidant enzymes and alternative oxidase in wheat head blight pathogens *Fusarium graminearum* and *Microdochium nivale*, *Journal of General Plant Pathology*, 75(5), 388-398.
- Karaca, G., 2018, Paraziter Olmayan Bitki Hastalıkları, Ziraat Mühendisliğinde Bitki Koruma, Yaşar, B. (ed.), 12. Bölüm, Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayın, Isparta, ISBN: 978-605-83004-4-6, 121-129.
- Kato, T., 1988, *Resistance experiences in Japan*, Fungicide Resistance in North America, In: Delp, C. J. (ed.), 16-18, American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA.
- Kerényi, Z., Moretti, A., Waalwijk, C., Olah, B., & Hornok, L., 2004, Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4419-4423
- Khachatourians, G. G., & Dilip, K., 2001, Agriculture and Food Production, Elsevier Science & Technology, Amsterdam, Netherlands.

- Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., & Fujimura, M., 2007, Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecen pathways gene and evolution, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 71, 2105-2123.
- King, R., Urban, M., & Hammond-Kosack, K.E., 2017, Annotation of *Fusarium graminearum* (PH-1) version 5.0., *Genome Announcements*, 5(2), e01479-16.
- 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.
- Klyubin, I. V., Kirpichnikova, K. M., Ischenko, A. M., Zhakhov, A. V., & Gamaley I. A., 2000, The role of reactive oxygen species in membrane potential changes in macrophages and astrocytes, *Membrane & cell biology*, 13(4), 557-566.
- Kolb, F.L., Bai, G.H., Muehlbauer, G.J., Anderson, J.A., Smith, K.P., & Fedak, G., 2001, Host plant resistance genes for *Fusarium* head blight: mapping and manipulation with molecular markers, *Crop Science*, 41(3), 611-619
- Köycü, N. D., & Sukut, F., 2018, Buğdayda *Fusarium culmorum*'a Ruhsatlı Olmayan Fungisitlerin Patojen Üzerine Etkisi, *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(2), 26-35.
- Kramer, W., Schirmer, U., 2007, *Modern Crop Protection Compounds*, Vol II, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany
- Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A. S., Fillinger, S., Mernke, D., Schoonbeek, H. J., Pradier, J. M., Leroux, P., De Waard, M., & Hahn, M., 2009, Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*, *PLoS pathogens*, 5(12); e1000696.
- Larkin, R. P., & Fravel, D. R., 1996, Efficacy of various biocontrol organisms in the control of *Fusarium* wilt of tomato, *Phytopathology*, 86:S83.
- Leiter, É., Szappanos, H., Oberparleiter, C., Kaiserer, L., Csernoch, L., Pusztahelyi, T., Emri, T., Pócsi, I., Salvenmoser, W., & Marx, F., 2005, Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2445-2453.
- Lepesheva, G.I., & Waterman. MR., 2007, Sterol 14a-demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 1770, 467–477.
- Lewis, J. A., Papavizas, G. C., & Hollenbeck, M. D., 1993, Biological control of damping-off of snapbeans caused by *Sclerotium rolfii* in the greenhouse and field with formulations of *Gliocladium virens*., *Biological Control*, 3(2), 109-115.
- Li, M., & Yang, Q., 2007, Isolation and characterization of a β -tubulin gene from *Trichoderma harzianum*, *Biochemical genetics*, 45(7-8), 529-534.

- Lin, F., Xue, S.L., Zhang, Z.Z., Zhang, C.Q., Kong, Z.X., Yao, G.Q., Tian, D.G., Zhu, H.L., Li, C.J., & Cao, Y., 2006, Mapping QTL associated with resistance to Fusarium head blight in the Nanda2419/Wangshuibai population, *Theoretical and Applied Genetics*, 112(3), 528-535.
- Liu, S., Abate, Z., Lu, H., Musket, T., Davis, G., & McKendry A., 2007, QTL associated with Fusarium head blight resistance in the soft red winter wheat ernie, *Theoretical and applied genetics*, 115(3), 417-427.
- Liu, X., Yu, F., Schnabel, G., Wu, J., Wang, Z., & Ma, Z., 2011, Paralogous *cyp51* genes in *Fusarium graminearum* mediate differential sensitivity to sterol demethylation inhibitors, *Fungal Genetics and Biology*, 48, 113–123.
- Livak, J. K., & Schmittgen, T. D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, *Methods*, 25, 402-8.
- Locke, T., 1986, *Current incidence in the UK of fungicide resistance in pathogens of cereals*, Proceedings 1986 British Crop Protection Conference, Pests & Diseases, 781-786.
- Lorenz, G., 1988, Dicarboximide fungicides: history of resistance development and monitoring methods. Modern selective fungicides, In: Delp CJ (ed.), 45-51, American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA.
- Lucas J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A., 2015, The Evolution of Fungicide Resistance, *Advances in applied microbiology*, 90, 29-92. doi: 10.1016/bs.aambs.2014.09.001
- Lumsden, R. L., & Locke, J. C., 1989, Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* with *Gliocladium virens* in soilless mix, *Phytopathology*, 79:361-366.
- Ma, H., Song, J., Huang, T., LU, X., Xu, K., & Sun, X., 2009, Molecular structure, theoretical calculation and thermodynamic properties of tebuconazole, *Chinese Journal of Chemistry*, 27(6), 1035-1040.
- 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, *Journal of Cell Biology*, 145(4), 757-767.
- Maertens J. A., 2004, History of the development of azole derivatives, *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 1–10.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., & Sambrook, J., 1982, Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, ISBN: 0-87969-136-0.
- Matny, O. N., 2015, Fusarium head blight and crown rot on wheat & barley: losses and health risks, *Advances in Plants & Agriculture Research*, 2(1), 39.
- Mauler-Machnik, A., & Zahn, K., 1994, Ear fusarioses in wheat - New findings on their epidemiology and control with Folicur (Tebuconazole), *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer, Leverkusen*, 47: 133-160.

- 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.
- Mellado, E., Garcia-Effron, G., Buitrago, M. J., Alcazar-Fuoli, L., Cuenca-Estrella, M., & Rodriguez-Tudela, J. L. 2005. Targeted gene disruption of the 14 α -sterol demethylase (*cyp51A*) in *Aspergillus fumigatus* and its role in azole drug susceptibility. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2536-2538.
- Mesterhazy, A. 1995, Types and components of resistance to Fusarium head blight of wheat. *Plant Breeding*, 114(5), 377–386. doi:10.1111/j.1439-0523.1995.tb00816.x
- Mesterhazy A, Bartok T, Mirocha CG, Komorozy R., 1999, Nature of wheat resistance to Fusarium head blight and role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breed* 118(2), 7–110.
- Mesterhazy, A., 2003, “Control of fusarium head blight of wheat by fungicides,” in Fusarium Head Blight of Wheat and Barley, In: K. J. Leonard & W. R. Bushnell (ed.), American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA.
- Miedaner, T., Schilling, A. G., Geiger, H. H., 2001, Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries, *Journal of Phytopathology*, 149(11-12), 641-648.
- Miedaner, T., Cumagun, C. J. R., Chakraborty, S. 2008. Population genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*, *Journal of Phytopathology*, 156, 129-139
- Minuto, A., Migheli, Q., and Garabaldi, A. 1995. Evaluation of antagonistic strains of *Fusarium* spp. in the biological and integrated control of *Fusarium* wilt of cyclamen. *Crop Protection*, 14(3), 221-226.
- Moretti, A., 2009, Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and splitters, *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 117, 7-13.
- Mueller, G. M., Foster. M. S. & Bills, G. F., 2004. *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Science & Technology, Amsterdam, Netherlands.
- 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.
- 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.

- Noble, M, Maggarvie, Q D, Hams, A F and Leaf, L L, 1966, Resistance to mercury of *Pyrenophora avenae* in Scottish seed oats. *Plant Pathology* 15: 23-28.
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Robert, V. A., Crous, P. W., Geiser, D. M., Kang, S. 2015, DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions, *Phytoparasitica*, 43(5), 583-595.
- Obanor, F., Erginbas-Orakci, G., Tunalı, B., Nicol, J. M., Chakraborty, S. 2010, *Fusarium culmorum* is a single phylogenetic species based on multilocus sequence analysis, *Fungal Biology*, 114(9), 753-765.
- Oruç, H.H., 2005, Mikotoksinler ve tanı yöntemleri, *Uludağ university journal of veterinary and medicine*, 24 (1-2-3-4), 105-110.
- Özer, N., Soran, H. 1991, *Fusarium* species of Turkey, *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 6, 259-271.
- Pasquali M.& Migheli, Q., 2014, Genetic approaches to chemotype determination in type B-trichothecene producing *Fusaria*, *International Journal of Food Microbiology*, 189, 164-182.
- Perincherry, L., Lalak-Kańczugowska, J., & Stępień, Ł., 2019, *Fusarium*-produced mycotoxins in plant-pathogen interactions. *Toxins*, 11(11), 664.
- Ponts, N., Couedelo, L., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, M.-N., Barreau, C., & Richard-Forget, F., 2009, *Fusarium* response to oxidative stress by H₂O₂ is trichothecene chemotype-dependent. *FEMS Microbiology Letters*, 293(2), 255-262. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01521.x
- Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D., A., 1990, *Microbiology*, Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, 0-697-00246-2.
- Qian, H., Du, J., Chi, M., Sun, X., Liang, W., Huang, J., & Li, B., 2018, The Y137H mutation in the cytochrome P450 *FgCYP51B* protein confers reduced sensitivity to tebuconazole in *Fusarium graminearum*, *Pest management science*, 74(6), 1472-1477.
- Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., & Jackson, R. B. (2014). *Campbell biology* (No. s 1309). Boston: Pearson.
- Regnault-Roger C., Vincent C., Arnason J.T., 2012., Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes World, *Annual review of entomology*, 57, 405-424.
- Reijo, R.A, Cooper, E.M., Beagle, G.J., Huffaker, T.C., 1994, Systematic mutational analysis of the yeast *b-tubulin* gene. *Molecular Biology of the Cell*, 5(1), 29-43.
- Sabuncuoğlu, S. A., Baydar, T., Giray, B., Şahin, G., 2008, Mikotoksinler: toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması, *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 28(1) 63-92.

- Saharan, M. S., Kumar, J., Nagarajan, S., 2004, Fusarium head blight (FHB) or head scab of wheat- a review. *Proceedings of the National Academy of Sciences India*, 3, 255-268.
- Saharan, M.S., Naef, A., Kumar, J., Tiwari R., 2007, Characterization of variability among isolates of *Fusarium graminearum* associated with head scab of wheat using DNA markers. *Current Science*, 230-235.
- Saharan, M. S., Naef, A., 2008, Detection of genetic variation among Indian wheat head scab pathogens (*Fusarium* spp./isolates) with microsatellit markers. *Crop Protection* 27, 1148-1154.
- Saharan, M.S. 2020, Current status of resistant source to Fusarium head blight disease of wheat: a review. *Indian Phytopathology*, 73(1), 3-9. <https://doi.org/10.1007/s42360-019-00186-x>
- Sanglard, D., Ischer, F., Koymans, L., Bille, J., 1998, Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14-demethylase (*CYP51 A1*) from azole-resistant *Candida albicans* to clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(2), 241-253.
- Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, G., Migheli Q., 2013, *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular plant pathology*, 14 (4), 323-341.
- Sefer, Ö., Yörük, E., Develi, E.S., Sezer, A.S., Konukcu, Z., 2017, 2,4-Dimetilpirol'ün Başak Yanıklığı Hastalığı Etmeni *Fusarium culmorum*'un Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, *International Journal of Secondary Metabolites*, 4(2): 103-113.
- Seiber, J. & Kleinschmidt, L., 2011, Contributions of pesticide residue chemistry to improving food vand environmental safety: past and present accomplishments and future challenges, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7536-7543.
- Shishatskaya, E., Menzyanova, N., Zhila, N., Prudnikova, S., Volova, T., & Thomas, S., 2018, Toxic effects of the fungicide tebuconazole on the root system of *Fusarium*-infected wheat plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 400-407.
- Slater, A. F., Stefan, C., Nobel, I., van den Dobbelsteen D. J., & Orrenius. S., 1995, Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicology letters*, 82, 149-153.
- Smith, C M 1988, *History of benzimidazole use and resistance*, Modern selective fungicides, In: Delp CJ (ed.), 23-24, American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA.
- Spolti, P., Jorge, B. C. D., & Del Ponte, E. M., 2012, Sensitivity of *Fusarium graminearum* causing head blight of wheat in Brazil to tebuconazole and metconazole fungicides. *Tropical Plant Pathology*, 37(6), 419-423.
- Spolti, P., Del Ponte, E. M., Dong, Y., Cummings, J. A., & Bergstrom, G. C., 2014, Triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate, *Plant disease*, 98(5), 607-613.

- Staub, T., 1991, Fungicide resistance: practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use, *Annual Reviews of Phytopathology* 29, 421-442.
- Stenzel, K. & Vors, J. P., 2019, Sterol Biosynthesis Inhibitors, *Modern Crop Protection Compounds*, 2, 797-844.
- Strange, R.N., 2003, Introduction to plant pathology, Wiley, West Sussex, 047084972X
- Sun, H. Y., Zhu, Y. F., Liu, Y. Y., Deng, Y. Y., Li, W., Zhang, A. X., & Chen, H. G., 2014, Evaluation of tebuconazole for the management of *Fusarium* head blight in China, *Australasian Plant Pathology*, 43(6), 631-638. doi: 10.1007/s13313-014- 0309-4.
- 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. Doi: 10.1111/ppa.12280
- Taylor, A. G., Harman, G. E., & Nielsen, P. A., 1994, Biological seed treatments using *Trichoderma harzianum* for horticultural crops. *HortTechnology*, 4(2), 105-109.
- Taylor, L., Gutierrez, S., McCormick, S. P., Bakker, M. G., Proctor, R. H., Teresi, J., Kurtzman, B., Hao, G., & Vaughan, M. M., 2021, Use of the volatile trichodiene to reduce *Fusarium* head blight and trichothecene contamination in wheat. *Microbial Biotechnology*. 1-15. doi:10.1111/1751-7915.13742.
- Teker, T., Sefer, Ö., Gazdağlı, A., Yörük, E., Varol, G. İ., & Albayrak, G., 2021, α -Thujone exhibits an antifungal activity against *F. graminearum* by inducing oxidative stress, apoptosis, epigenetics alterations and reduced toxin synthesis, *European Journal of Plant Pathology*, 160(3), 611-622.
- Tok, F. M., Arslan, M., 2016, Distribution and genetic chemotyping of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* populations in wheat fields in the eastern Mediterranean region of Turkey, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 30(2): 254-260.
- Trail, F., 2009, For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era, *Plant Physiology*, 149, 103-10
- Tsukatani, T., Suenaga, H., Shiga, M., & Matsumoto, K., 2014, A rapid microplate method for the proliferation assay of fungi and the antifungal susceptibility testing using the colorimetric microbial viability assay, *Letters in applied microbiology*, 59(2), 184-192.
- Tutel, B., & Çırpıcı, A., 1999, *Sporlu bitkiler sistematigi laboratuvar kılavuzu*, Çantay Kitabevi, İstanbul, 975-404-295-0.
- Urban, M., King, R., Andongabo, A., Maheswari, U., Pedro, H., Kersey, P., & Hammond-Kosack, K., 2016, First draft genome sequence of a UK strain (UK99) of *Fusarium culmorum*, *Genome Announcements*, 4(5), e00771-16.
- Vandeputte, P., Ferrari, S., & Coste, A.T., 2012, Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections, *International Journal of Microbiology*, Article ID 713687, 1-26. doi:10.1155/2012/713687

- Villaverde, J.J., Sevilla-Morán, B., Sandín-España, B., López-Goti, C., & Alonso-Prados, J.L., 2014, Biopesticides in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No. 1107/2009, *Pest management science*, 70(1), 2-5.
- Watkinson, S. C., Boddy, L., & Money, N., 2015, *The fungi*, Academic Press, USA.
- Waalwijk, C., Kastelein, P., De Vries, I., Kerenyi, Z., Lee, T. V. D., & Hesselink, T., 2003, Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands, *European Journal of Plant Pathology*, 109, 743–54.
- Waalwijk, C., Keszthelyi, A., van der Lee, T., Jeney, A., de Vries, I., Kerenyi, Z., Mendes, O., & Hornok, L., 2006, Mating type loci in *Fusarium*: structure and function, *Mycotoxin research*, 22(1), 54-60.
- Weete, J.D., Abril, M., & Blackwell, M., 2010, Phylogenetic distribution of fungal sterols, *PLoS ONE*, 5(5), e10899.
- Windels, C. E., 2000, Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: changing farms and rural communities in the Northern Great Plains, *Phytopathology*, 90(1), 17-21.
- Yadav, K., Singhal, N., Rishi, V., & Yadav, H. (2014). Cell Proliferation Assays, In: *eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester*. DOI: 10.1002/9780470015902.a0002566
- Yang Z, Gilbert J, Fedak G, & Somers D.J., 2005, Genetic characterization of *QTL* associated with resistance to *Fusarium* head blight in a doubled-haploid spring wheat population, *Genome*, 48(2), 187–196.
- Yin, Y., Liu, X., Li, B., & Ma, Z., 2009, Characterization of sterol demethylation inhibitor-resistant isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* collected from wheat in China, *Phytopathology*, 99(5), 487-497.
- Yli-Mattila, T., 2010, Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in northern europe and asia, *Journal of Plant Pathology*, 92(1), 7-18
- Yli-Mattila, T., Rämö, S., Hietaniemi, V., Hussien, T., Carlobos-Lopez, A., & Cumagun, C. 2013. Molecular quantification and genetic diversity of toxigenic *Fusarium* species in Northern Europe as compared to those in Southern Europe, *Microorganisms*, 1(1), 162-174
- Yörük, E., & Albayrak, G., 2012, Chemotyping of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by PCR Assay, *Mycopathologia*, 173, 53-61
- Yörük, E., Tunalı, B., Kansu, B., Ölmez, F., Uz, G., Zümrüt, I.M., Sarıkaya, A., & Meyva, G. 2016, Characterization of high-level deoxynivalenol producer *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates caused head blight and crown rot diseases in Turkey, *Journal of Plant Diseases and Protection*, 123, 177-186
- Yörük E., Sefer Ö., Tunalı B., Kansu B., Sharifnabi B., & Yli-Mattila T., 2018, Thiophanate methyl susceptibility and alterations in *tri5*, *Mgv1* and *StuA* expression among *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates, *Journal of Plant Pathology*, 100, 447–455.

- Yörük, E., 2018, Tetraconazole leads to alterations in *Fusarium graminearum* at different molecular levels, *Applied Ecology and Environmental Research*, 16(5), 6155-6167. http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1605_61556167
- Yörük, E. & Yli-Mattila, T., 2019, Class B-trichothecene profiles of *Fusarium* species as causal agents of head blight, *Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology*, Elsevier, 347-376.
- Zabka, M., & Pavela, R., 2018, *Fusarium* Genus and Essential Oils, In Natural Antimicrobial Agents, In: Mérillon, J.M., Riviere C. (eds), 19, Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67045-4_5.
- Zhou, W.C., Kolb, F.L., Bai, G.H., Domier, L.L., Boze, L.K., & Smith, N.J, 2003, Validation of a major QTL for scab resistance with SSR markers and use of marker-assisted selection in wheat, *Plant Breed*, 122, 40–46.
- Ziogas, B. N., & Malandrakis, A. A., 2015, *Sterol Biosynthesis Inhibitors: C14 Demethylation (DMIs)*, in Fungicide Resistance in Plant Pathogens: Principles and a Guide to Practical Management, Ishii, H., & Hollomon, D., W. (ed.), 13, Springer, Tokyo, 119–145.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Özlem Sefer
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☐ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat 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

Makale ve Bildiriler	
Makaleler	
Teker, T., Sefer, Ö., Gazdağlı, A., Yörük, E., Varol, G. İ., & Albayrak, G. 2021. α-Thujone exhibits an antifungal activity against <i>F. graminearum</i> by inducing oxidative stress, apoptosis, epigenetics alterations and reduced toxin synthesis. European Journal of Plant Pathology, 160:611–622, https://doi.org/10.1007/s10658-021-02269-w. Gümüş, D., Yüksek, F. K. Y., Gülşen, U. Z., Sefer, Ö., Yörük, E., & Küçüker, M. 2021. Urine influences growth and virulence gene expressions in Uropathogenic <i>E. coli</i>: a comparison with nutrient limited medium. Clinical and Experimental Health Sciences, 11(2), 209-214. Tufan F., Keleş, E.N., Sefer, Ö., Eraslan, M., Sefalı, S., Güngör, Ö., Yörük, E. 2020. Determining WRKY Transcription Factors Related to Salinity Stress Response	

- in Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Anadolu Journal of Agricultural Sciences*, 35(1): 1-7.
- Gümüş, D., Yüksek, F. K., **Sefer, Ö.**, Yörük, E., Uz, G., & Küçüker, M. A. 2019. The roles of hormones in the modulation of growth and virulence genes' expressions in UPEC strains. *Microbial pathogenesis*, 132, 319-324.
- Tunalı, B., Yörük, E., **Sefer, Ö.**, Kansu, B., & Sharifnabi, B. 2019. First Report on Identification of *Fusarium graminearum* Species Complex Members from Turkey and Iran. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(7), 1040-1045.
- Yörük E., **Sefer Ö.** 2018. FcMgv1, FcStuA and FcVeA Based Genetic Characterization in *Fusarium culmorum* (W.G. Smith). *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 19(1): 63-69, DOI: 10.23902/trkjnat.334792
- Gazdağlı, A., **Sefer, Ö.**, Yörük, E., Varol, G.İ., Teker, T., Albayrak, G. 2018. Investigation of Camphor Effects on *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* at Different Molecular Levels. *Pathogens*, 7 (4): 90.
- Yörük, E., Keleş, E.N., **Sefer, Ö.**, Eraslan, M. 2018. Salinity and Drought Stress Investigations on Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars Planted in Turkey. *Journal of Environmental Biology*, 39 (6): 943-950. DOI: 10.22438/jeb/39/6/MRN-700
- Yörük, E., **Sefer, Ö.**, Tunalı, B., Kansu, B., Sharifnabi, B., & Yli-Mattila, T. 2018. Thiophanate methyl susceptibility and alterations in tri5, Mgv1 and StuA expression among *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates. *Journal of Plant Pathology*, 100: 447-455. doi.org/10.1007/s42161-018-0094-y
- Yörük, E., **Sefer, Ö.** 2018. Polymorphisms in FgMgv1, FgStuA and FgVeA genes associated with growth of *Fusarium graminearum*. *Researches on Science and Art in 21st Century Turkey*, Volume 1, Chapter 40: 358-366. Gece Kitaplığı, Hasan Arapgirlioğlu, Atilla Atık, Robert L. Elliott, Edward Turgeon, 9786052880623
- Gazdağlı, A., **Sefer, Ö.**, Yörük, E., Varol, G.İ., Albayrak, G. Investigation on the terpinolene effects in *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* (at different molecular levels). *Academic studies in Science and Mathematics*, First Edition, 2018, Chapter3: 33- 42. Gece Kitaplığı, Türkiye, Adeyinka Temitope AINA, Aykur DEMİRÇALI. ISBN: 978-605-288-613-7
- İriç, B., Dere, N., **Sefer, Ö.**, Yörük, E. *Cercospora beticola* genotiplendirilmesinde polimeraz zincir reaksiyonu temelli yaklaşımlar. *Bilim, Eğitim ve Sanat Araştırmaları*, 1. Basım, 2018, Chapter 6: 101-114. Nobel Yayıncılık, Türkiye., Ali YAKAR, Hüseyin TOPAKLI, ISBN: 978-605-7928-28-3
- Sefer, Ö.**, Yörük, E., Tetrakonazol'un *Fusarium culmorum* üzerindeki moleküler seviyedeki etkileri. *Fen Bilimleri ve Matematik Alanında Akademik Çalışmalar*,

Birinci Baskı, 2018, Bölüm 3: 39-48. Gece Kitaplığı, Türkiye, Adeyinka Temitope AINA, Aykur DEMİRÇALI. ISBN: 978-605-288-620-5.

Yörük, E., **Sefer, Ö.**, Sezer, A. S., Konukcu, Z., & Develi, E. S. 2018. Eugenol'ün *Fusarium culmorum* Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 8(2), 215-221.

Sefer, Ö., Yörük, E., Develi, ES, Sezer, AS, Konukcu, Z, 2017. 2,4-Dimetilpirol'ün Başak Yanıklığı Hastalığı Etmeni *Fusarium culmorum*'un Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, International Journal of Secondary Metabolites, International Journal of Secondary Metabolite, 4(2): 103-113.

Zümrüt, IM, Develi, ES, **Sefer, Ö.**, Yörük, E. 2016 Tahıl Patojeni *Fusarium culmorum*'da Genetik Tiplendirme Yaklaşımları, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 14(2): 1-16.

Sefer, Ö., Yörük, E., Develi, ES, Zümrüt, IM, Sezer, AS, Konukcu, Z, Kaempferol'ün Başak Yanıklığı Etmeni *Fusarium culmorum*'un Üremesi ve Toksin Üretimi Üzerine Olan Etkileri, Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 12(1): 12-28. (2017)

Yörük E., **Sefer Ö.** 2017. *Fusarium graminearum* Tür Kompleksi Üyelerinin Tanımlanmasında Çoklu Lokus Genotiplendirme Analizleri. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 15(2):14-25

Bildiriler

Yörük, E., **Sefer, Ö.** “Beta-tubulin sequence based genetic diversity in *Fusarium graminearum* isolates from Turkey”, International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species 2017, 3-5 April, Antalya, S:212

Sefer, Ö., Yörük, E., “Beta-tubulin sequence based genetic diversity in *Fusarium culmorum* isolates from Turkey”, International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species 2017, 3-5 April, Antalya, S:176.

Sefer, Ö., Yörük, E., Develi, ES, Zümrüt, IM, Sezer, AS, Konukcu, Z, “Effects of Kaempferol on Growth and Toxin Production in *Fusarium culmorum*”, 2nd Balkan Agriculture Congress 2017, 16-18 May, Tekirdag, S:51

Yörük, E., **Sefer, Ö.**, Sezer, AS, Konukcu, Z, Develi, ES, “Investigation of Eugenol Effects at Growth and Transcriptomic Levels in *Fusarium culmorum*”, 2nd Balkan Agriculture Congress 2017, 16-18 May, Tekirdag, S:29

Yörük, E., Keleş, E.N., **Sefer, Ö.**, Eraslan, M. Salinity and drought stress investigations on barley (*Hordeum vulgare* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars planted in Turkey, International Natural and Health Science Conference 2017, 19-21 Oct, Antalya, 218-220.

- Sefer, Ö.,** Yörük, E. Polymorphisms in FgMgv1, FgStuA and FgVeA genes associated with growth of *Fusarium graminearum*, International Natural and Health Science Conference 2017, 19-21 Oct, Antalya, 242-244.
- Sefer, Ö.,** Eraslan, M., Sefalı S., Keleş E.N., Güngör Ö., Tufan F., Yörük, E. Determining WRKY Transcription Factors Related to Salinity Stress Response in Wheat (*Triticum aestivum* L.), European Conference on Science, Arts and Culture, 19-22 April, 2018, Antalya, pp-012
- Yörük, E., **Sefer, Ö.,** Tunali, B., Meyva, G., Demiray K. Eugenol lead to enzymatic, epigenetics, apoptotic and transcriptomics alterations on *Cercospora beticola*. IX International Scientific Agriculture Symposium AGROSYM 2018, 4-7 October, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 685.
- Sefer, Ö.,** Yörük, E., Tunali, B., Kansu, B., Sharıfnabı, B., Yıl-Mattıla, T. Thiophanate methyl susceptibility and alterations in gene expression of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates. . IX International Scientific Agriculture Symposium AGROSYM 2018, 4-7 October, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 714.
- Gümüş, D., Yüksek Kalaycı, F., **Sefer, Ö.,** Yörük, E., Uz, G., Küçük Anç, M. PT225 A Study on Expression Levels of Some Genes in *Mar regulon* in the presence of Urine. 8th Congress of European Microbiologists FEMS 2019, 7-11 July, Glasgow, Scotland, 938.
- Yüksek Kalaycı, F., Gümüş, D., **Sefer, Ö.,** Yörük, E., Uz, G., Küçük Anç, M. PT303 The Effects of Human Urine on Growth and Gene Expressions in UPEC. 8th Congress of European Microbiologists FEMS 2019, 7-11 July, Glasgow, Scotland, 2019.
- Sefer, Ö.,** Yörük, E., Albayrak, G. The Effects of Tebuconazole on Cellular and Molecular Level of *Fusarium* Reference Strains, II. International Agricultural, Biological And Life Science Conference, 1-3 September 2020, Edirne E-congress, 243.
- Sefer, Ö.,** İbişoğlu, M.S., Yılmaz, S., Yörük, E. Genome Wide and Gene Specific Epigenetic Analysis in *Fusarium* Species, IV. International Eurasian Agriculture and Natural Sciences Congress, 30-31 October 2020, ONLINE, 85.