



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YAYGIN OLARAK KULLANILAN ANTİFUNGAL AJANLARIN
Fusarium TÜRLERİNİN GENOMİK KARARSIZLIĞI ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Beliz YÜKSEKTEPE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK**

Ocak, 2023

İSTANBUL

Bu alışma, 11.01.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

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

Prof. Dr. Ercan ARICAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Erkan RAYAMAN
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

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

Proje Destekleri

Bu tez, 119Z366 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.



ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam süresince değerli bilgileri ve tavsiyeleri ile bana yol gösteren, her daim sabırla beni çalışmaya teşvik eden sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK'a,

İ.Ü. Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü mensubu değerli öğretim üyeleri başta olmak üzere, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca üzerimde emeği olan bütün saygıdeğer hocalarıma,

Çalışmalarım süresince sorularımı cevapsız bırakmayan, hatalarımı düzeltmemi sağlayan ve her daim yanımda olan başta Uzm. Tuğba TEKER ve Uzm. Mehmet ARSLAN olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma,

Bu çalışmayı destekleyen TÜBİTAK'a ve çalışmalarım süresince imkanlarından yararlandığım İ. Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'na,

Hayatım boyunca bana her türlü desteği sağlayan, her an yanımda hissettiğim canım aileme,

Yüksek lisans eğitimim süresince, daima bana destek olan ve bu dönemi benim için kolaylaştıran tüm dostlarıma,

Teşekkürü borç bilir, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Ocak 2023

Beliz YÜKSEKTEPE

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	2
2.1. <i>Fusarium</i> spp.....	2
2.1.1. <i>F. graminearum</i>	4
2.1.1. <i>F. culmorum</i>	5
2.2 <i>Fusarium</i> spp. İLE MÜCADELE	6
2.2.1. Tebukonazol	7
2.2.2. Karbendazim.....	8
2.2.3. Fludioksonil	8
2.3. GENOMİK KARARSIZLIK	9
2.3.1. Genomik Kararsızlığı Etkileyen Faktörler	9
2.3.1.1. <i>Mutasyon</i>	9
2.3.1.2 <i>Epigenetik değişimler</i>	10
2.4 DNA METİLASYONU	11
2.4.1 DNA Metilasyonunun Tespitinde Kullanılan Yöntemler.....	13
2.4.1.1 <i>CRED-RA</i>	14
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	16
3.1. <i>Fusarium</i> REFERANS SUŞLARININ ÜRETİMİ VE AKTİF BİLEŞEN UYGULAMALARI	16
3.2. gDNA İZOLASYONU VE ANALİZİ.....	17
3.3. CRED-RA	18
4. BULGULAR.....	21
4.1 <i>Fusarium</i> REFERANS SUŞLARININ ÜRETİMİ	21

4.3 CRED-RA ANALİZİ BULGULARI	22
4.3.1 Tebukonazolün Neden Olduğu Genomik Dizi Kararsızlığı ve Polimorfizm Bulguları	22
4.3.2 Karbendazimin Neden Olduğu Genomik Dizi Kararsızlığı ve Polimorfizm Bulguları	26
4.3.3 Fludioksonilin Neden Olduğu Genomik Dizi Kararsızlığı ve Polimorfizm Bulguları	30
4.3.4 Tebukonazol ile Karbendazimin İkili Uygulamasının Neden Olduğu Genomik Dizi Kararsızlığı ve Polimorfizm Bulguları	33
4.3.5 Tebukonazol ile Fludioksonilin İkili Uygulamasının Neden Olduğu Genomik Dizi Kararsızlığı ve Restriksiyon Polimorfizmi Bulguları	35
4.3.6 Karbendazim ile Fludioksonilin İkili Uygulamasının Neden Olduğu Genomik Dizi Kararsızlığı ve Restriksiyon Polimorfizmi Bulguları	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	40
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ	59

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: <i>Fusarium</i> spp.’nin bitki üzerindeki enfeksiyon döngüsü (Wulff ve diğ., 2010).....	2
Şekil 2.2: <i>F. graminearum</i> ’un eşeyli ve eşeysiz üreme evreleri (Davis, 2000).	4
Şekil 2.3: <i>F. culmorum</i> ’un üreme evreleri (Davis 2000).....	6
Şekil 2.4: Epigenetik değişimlerin üç temel mekanizması (Görsel BioRender ile oluşturuldu).....	11
Şekil 2.5: DNMT’nin katalize ettiği 5mC oluşumu ile gen anlatımının susturulması (Görsel BioRender ile oluşturuldu).	12
Şekil 2.6: Fitopatojenik mantarlarda DNA metilasyonunun oluşumu (Görsel BioRender ile oluşturuldu).....	13
Şekil 2.7: CRED-RA analizinin temel anlatımı; A) restriksiyon enzimi kesimi, B) PZR sonrası çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (Görsel BioRender ile oluşturuldu).....	14
Şekil 4.1: Tebukonazol, karbendazim, fludioksonil ve bu maddelerin ikili kombinasyonlarının uygulandığı <i>F. graminearum</i> PH-1 ve <i>F. culmorum</i> FcUK99 referans suşlarının 7. gündeki üreme profili.	21
Şekil 4.2: CRED-RA analizlerinde kullanılan deney gruplarına ait gDNA’ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: λ +Hind3 (Thermo Scientific, SM0101, ABD). T+F: Tebukonazol+karbendazim (MIC ₂₅ + MIC ₂₅), T+F: Tebukonazol+fludioksonil (MIC ₂₅ + MIC ₂₅), K+F: Karbendazim+fludioksonil.	22
Şekil 4.3: Kontrol, %0.026 (v/v) aseton ve tebukonazol uygulanmış PH-1’in OPB-10 primeri ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kbp (Thermo Scientific, SM0311, ABD), K:-Kesim yapılmamış, <i>Hpa</i> II: <i>Hpa</i> II ile kesim yapılmış, <i>Msp</i> I: <i>Msp</i> I ile kesim yapılmış.	22
Şekil 4.4: Kontrol, %0.018 (v/v) aseton ve tebukonazol uygulanmış FcUK99’un OPA-07 primeri ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kbp (Thermo Scientific, SM0311, ABD), K:-Kesim yapılmamış, <i>Hpa</i> II: <i>Hpa</i> II ile kesim yapılmış, <i>Msp</i> I: <i>Msp</i> I ile kesim yapılmış.	24
Şekil 4.5: Kontrol, %0.420 (v/v) aseton ve karbendazim uygulanmış PH-1’in OPB-10 primeri ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kbp (Thermo Scientific, SM0311, ABD), K:-Kesim yapılmamış, <i>Hpa</i> II: <i>Hpa</i> II ile kesim yapılmış, <i>Msp</i> I: <i>Msp</i> I ile kesim yapılmış.	26
Şekil 4.6: Kontrol, %0.420 (v/v) aseton ve karbendazim uygulanmış FcUK99’un OPA-01 primeri ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kbp (Thermo Scientific, SM0311, ABD), K:-Kesim yapılmamış, <i>Hpa</i> II: <i>Hpa</i> II ile kesim yapılmış, <i>Msp</i> I: <i>Msp</i> I ile kesim yapılmış.	28

- Şekil 4.7:** Kontrol, %0.006 (v/v) aseton ve fludioksonil uygulanmış PH-1'in OPA-04 primeri ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kB (Thermo Scientific, SM0311, ABD), K:-Kesim yapılmamış, *HpaII*: *HpaII* ile kesim yapılmış, *MspI*: *MspI* ile kesim yapılmış.30
- Şekil 4.8:** Kontrol, %0.006 (v/v) aseton ve fludioksonil uygulanmış *FcUK99*'un OPA-07 primeri ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kB (Thermo Scientific, SM0311, ABD), K:-Kesim yapılmamış, *HpaII*: *HpaII* ile kesim yapılmış, *MspI*: *MspI* ile kesim yapılmış.32
- Şekil 4.9:** A) Kontrol, %0.148 (v/v) aseton ve tebukonazol+karbendazim uygulanmış PH-1'in OPA-07 primeri kullanılarak; B) Kontrol, %0.146 (v/v) aseton ve tebukonazol+karbendazim uygulanmış *FcUK99*'un OPB-07 primeri ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kB (Thermo Scientific, SM0311, ABD), K:-Kesim yapılmamış, *HpaII*: *HpaII* ile kesim yapılmış, *MspI*: *MspI* ile kesim yapılmış.34
- Şekil 4.10:** A) Kontrol, %0.011 (v/v) aseton ve tebukonazol+fludioksonil uygulanmış PH-1'in OPA-03 primeri kullanılarak; B) Kontrol, %0.008 (v/v) aseton ve tebukonazol+karbendazim uygulanmış *FcUK99*'un OPB-07 primeri ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kB (Thermo Scientific, SM0311, ABD), K:-Kesim yapılmamış, *HpaII*: *HpaII* ile kesim yapılmış, *MspI*: *MspI* ile kesim yapılmış.36
- Şekil 4.11:** Kontrol, %0.142 (v/v) aseton ve tebukonazol+fludioksonil uygulanmış A) PH-1'in OPA-05 primeri kullanılarak; B) *FcUK99*'un OPA-07 primeri ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kB (Thermo Scientific, SM0311, ABD), K:- Kesim yapılmamış, *HpaII*: *HpaII* ile kesim yapılmış, *MspI*: *MspI* ile kesim yapılmış.38

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Mutasyon çeşitleri (Clancy, 2008).....	10
Tablo 3.1: <i>F. graminearum</i> PH-1 ve <i>F. culmorum</i> UK99 referans suşlarına uygulanan antifungal ajanlar ve konsantrasyonları.	16
Tablo 3.2: Tebukonazol, karbendazim, fludioksonilin ve ikili uygulamalar için kullanılan en yüksek çözücü (aseton) konsantrasyonları.	17
Tablo 3.3: CRED-RA analizinde kullanılan primerler ve özellikleri.	19
Tablo 3.4: PZR bileşenleri.	19
Tablo 3.5: PZR koşulları.	19
Tablo 3.6: Metilasyon tiplerinin belirlenmesi (Liu ve diğ., 2009; Karan ve diğ., 2012).	20
Tablo 4.1: Tebukonazolün MIC ₂₅ , MIC ₅₀ ve MIC ₇₅ dozlarının PH-1’de neden olduğu GTS ve polimorfizmin % değerleri.....	23
Tablo 4.2: Tebukonazolün MIC ₂₅ , MIC ₅₀ ve MIC ₇₅ dozu uygulanmış PH-1 ve kontroldeki metilasyon tiplerinin yüzde dağılımı.	23
Tablo 4.3: Tebukonazolün MIC ₂₅ , MIC ₅₀ ve MIC ₇₅ dozu uygulanmış PH-1 ve kontroldeki metilasyon profillerinin yüzde dağılımı.....	24
Tablo 4.4: Tebukonazolün MIC ₂₅ , MIC ₅₀ ve MIC ₇₅ dozlarının <i>FcUK99</i> ’da neden olduğu GTS ve polimorfizmin % değerleri.	25
Tablo 4.5: Tebukonazolün MIC ₂₅ , MIC ₅₀ ve MIC ₇₅ dozu uygulanmış <i>FcUK99</i> ve kontroldeki metilasyon tiplerinin yüzde dağılımı.	25
Tablo 4.6: Tebukonazolün MIC ₂₅ , MIC ₅₀ ve MIC ₇₅ dozu uygulanmış <i>FcUK99</i> ve kontroldeki metilasyon profillerinin yüzde dağılımı.....	26
Tablo 4.7: Karbendazimin MIC ₂₅ , MIC ₅₀ ve MIC ₇₅ dozlarının PH-1’de neden olduğu GTS ve polimorfizmin % değerleri.....	27
Tablo 4.8: Karbendazimin MIC ₂₅ , MIC ₅₀ ve MIC ₇₅ dozu uygulanmış PH-1 ve kontroldeki metilasyon tiplerinin yüzde dağılımı.	27
Tablo 4.9: Karbendazimin MIC ₂₅ , MIC ₅₀ ve MIC ₇₅ dozu uygulanmış PH-1 ve kontroldeki metilasyon profillerinin yüzde dağılımı.....	28
Tablo 4.10: Karbendazimin MIC ₂₅ , MIC ₅₀ ve MIC ₇₅ dozlarının <i>FcUK99</i> ’da neden olduğu GTS ve polimorfizmin % değerleri.	29

Tablo 4.11: Karbendazimin MIC ₂₅ , MIC ₅₀ ve MIC ₇₅ dozu uygulanmış <i>FcUK99</i> ve kontroldeki metilasyon tiplerinin yüzde dağılımı.	29
Tablo 4.12: Karbendazimin MIC ₂₅ , MIC ₅₀ ve MIC ₇₅ dozu uygulanmış <i>FcUK99</i> ve kontroldeki metilasyon profillerinin yüzde dağılımı.....	29
Tablo 4.13: Fludioksonilin MIC ₂₅ , MIC ₅₀ ve MIC ₇₅ dozlarının PH-1’de neden olduğu GTS ve polimorfizmin % değerleri.....	31
Tablo 4.14: Fludioksonilin MIC ₂₅ , MIC ₅₀ ve MIC ₇₅ dozu PH-1 ve kontroldeki metilasyon tiplerinin yüzde dağılımı.	31
Tablo 4.15: Fludioksonilin MIC ₂₅ , MIC ₅₀ ve MIC ₇₅ dozu PH-1 ve kontroldeki metilasyon profillerinin yüzde dağılımı.	31
Tablo 4.16: Fludioksonilin MIC ₂₅ , MIC ₅₀ ve MIC ₇₅ dozlarının <i>FcUK99</i> ’da neden olduğu GTS ve polimorfizmin % değerleri.	32
Tablo 4.17: Fludioksonilin MIC ₂₅ , MIC ₅₀ ve MIC ₇₅ dozu uygulanmış <i>FcUK99</i> ve kontroldeki metilasyon tiplerinin yüzde dağılımı.	33
Tablo 4.18: Fludioksonilin MIC ₂₅ , MIC ₅₀ ve MIC ₇₅ dozu uygulanmış <i>FcUK99</i> ve kontroldeki metilasyon profillerinin yüzde dağılımı.....	33
Tablo 4.19: Tebukonazol+karbendazim uygulamasının (MIC ₂₅ +MIC ₂₅) PH-1 ve <i>FcUK99</i> ’da neden olduğu neden olduğu GTS ve polimorfizmin % değerleri.....	34
Tablo 4.20: Tebukonazol+karbendazim uygulanmış PH-1 ve <i>FcUK99</i> ile kontrollerindeki metilasyon tiplerinin yüzde dağılımı.	35
Tablo 4.21: Tebukonazol+karbendazim uygulanmış PH-1, <i>FcUK99</i> ve kontrollerindeki metilasyon profillerinin yüzde dağılımı.....	35
Tablo 4.22: Tebukonazol+fludioksonil uygulamasının (MIC ₂₅ +MIC ₂₅) PH-1 ve <i>FcUK99</i> ’da neden olduğu neden olduğu GTS ve polimorfizmin % değerleri.....	36
Tablo 4.23: Tebukonazol+fludioksonil uygulanmış PH-1, <i>FcUK99</i> ve kontrollerindeki metilasyon tiplerinin yüzde dağılımı.	37
Tablo 4.24: Tebukonazol+fludioksonil uygulanmış PH-1 ve <i>FcUK99</i> ile kontrollerindeki metilasyon profillerinin yüzde dağılımı.....	37
Tablo 4.25: Karbendazim+fludioksonil uygulamasının (MIC ₂₅ +MIC ₂₅) PH-1 ve <i>FcUK99</i> ’da neden olduğu neden olduğu GTS ve polimorfizmin % değerleri.....	38
Tablo 4.26: Karbendazim+fludioksonil uygulanmış PH-1 ve <i>FcUK99</i> ile kontrollerindeki metilasyon tiplerinin yüzde dağılımı.	39
Tablo 4.27: Karbendazim+fludioksonil uygulanmış PH-1, <i>FcUK99</i> ve kontrollerindeki metilasyon profillerinin yüzde dağılımı.....	39

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
°C	: Derece Santigrat
A	: Amper
bç	: Baz Çifti
dk	: Dakika
kB	: Kilobaz
M	: Molar
Mb	: Megabaz
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
pH	: Hidrojen Potansiyeli, “potential of Hydrojen”
pmol	: Pikomol
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı, “revolutions per minute”
spp	: Türleri
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
v	: Hacim
V	: Volt
α	: Alfa
β	: Beta
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre

Kısaltmalar	Açıklama
5mC	: 5-metilsitozin
C	: Sitozin
CRED-RA	: Çift Restriksiyon Enzim Kesimi ve Rastgele Çoğaltım, “Coupled Restriction Enzyme Digestion-Random Amplification”
CYP450	: Sitokrom P450
DIM-2	: Deficient in Methylation-2
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DNMT	: DNA Metil Transferaz
DON	: Deoksinivalenol
G	: Guanin
gDNA	: Genomik DNA
GTS	: Genomik Dizi Kararlılığı, “Genomic Template Stability”
HK	: Histidin Kinaz
MIC	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu, “Minimum Inhibitory Concentration”
NIV	: Nivalenol
OD	: Optik Yoğunluk, “Optical Density”
P	: Fosfat
PDA	: Patates Dektroz Agar
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SAM	: S-adenozilmetiyonin
SNA	: Spezieller Nährstoffarmer Agar
U	: Urasil

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YAYGIN OLARAK KULLANILAN ANTİFUNGAL AJANLARIN *Fusarium* TÜRLERİNİN GENOMİK KARARSIZLIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Beliz YÜKSEKTEPE

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Gülrüh ALBAYRAK

Yüksek lisans tezinde üç antifungal bileşenin tekli ve ikili kombinasyonlarının bitki patojenlerinden *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUK99 referanslarının genomik kararlılığına etkisi çift restriksiyon enzim kesimi ve rastgele çoğaltım (CRED-RA) yöntemi ile araştırıldı.

Tebukonazol, karbendazim, fludioksonilin ve bu maddelerin ikili kombinasyonlarına maruz kalan PH-1 ve FcUK99'un genomik dizi kararlılığını sırasıyla %79.629-100 ve %75.925-100 oranında korunduğu tespit edildi. Fludioksonil her iki referans suşta da en yüksek genomik dizi kararlılığına yol açtı. Tebukonazol+karbendazim ikili uygulaması her iki *Fusarium* türünde genomik dizi kararlılığını en az etkilediği ortaya kondu. PH-1'de *HpaII* polimorfizminin %9.836-32.584, *MspI* polimorfizminin %10-26.966; FcUK99'da *HpaII* polimorfizminin %6.451-43.956, *MspI* polimorfizminin %6.521-43.956 olduğu tespit edildi. *F. graminearum* ve *F. culmorum* 'un tip IV metilasyonunu baskın olarak taşıdığı gözlemlendi. Antifungal ajanların uygulandığı deney grupları kontrole göre kıyaslandığında; tip II ve tip III metilasyon taşıma oranındaki değişimin tip I ve tip IV'e göre daha fazla olduğu tespit edildi. Tebukonazol ve fludioksonilin MIC₇₅ dozları PH-1'de, tebukonazolün MIC₅₀ ve fludioksonilin MIC₂₅ dozları da FcUK99'da DNA metilasyonunu arttırdı. Karbendazimin tüm dozları DNA metilasyonu seviyesini FcUK99'da arttırırken, PH-1'de azalttı. İkili uygulamalar her iki suşta DNA metilasyonunu azalttı.

Çalışmada kullanılan üç antifungal ajanın hem *F. graminearum* PH-1 hem de *F. culmorum* FcUK99 referans genomlarında genetik varyasyonlarla birlikte epigenetik modifikasyonlar aracılığıyla da genomik kararsızlığa yol açtığı ortaya kondu. Yüksek lisans tez çalışması çıktılarının, antifungal ajan aracılı *Fusarium* spp. ile mücadele stratejilerine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Ocak 2023, 75 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Fusarium*, Tebukonazol, Karbendazim, Fludioksonil, Genomik Kararsızlık



SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION of the EFFECTS of COMMONLY USED ANTIFUNGAL AGENTS on GENOMIC INSTABILITY of *Fusarium* SPECIES

Beliz YÜKSEKTEPE

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK

Effects of single and double combinations of three antifungal agents on the genomic stability of *F. graminearum* PH-1 and *F. culmorum* FcUK99 references among plant pathogens were investigated by coupled restriction enzyme digestion-random amplification (CRED-RA) method within the scope of the master's thesis.

It was determined that PH-1 and FcUK99, exposed to tebuconazole, carbendazim, fludioxonil and their double combinations, preserved the genomic template stabilities by 79.629-100% and 75.925-100%, respectively. Fludioxonil caused in the highest genomic template instability in both reference strains. It was revealed that tebuconazole + carbendazim dual application, had the least effect on genomic sequence stability in both *Fusarium* species. It was determined that the *Hpa*II polymorphism was 9.836-32.584% and the *Msp*I polymorphism was 10-26.966%, in PH-1; the *Hpa*II polymorphism was 6.451-43.956%, and the *Msp*I polymorphism was 6.521-43.956% in FcUK99. It was observed that *F. graminearum* and *F. culmorum* predominantly carried type IV methylation. When the experimental groups which applied antifungal agents were compared to the control groups; it was determined that there were more changes in type II and type III methylation ratio than type I and type IV. MIC₇₅ doses of tebuconazole and fludioxonil increased DNA methylation in PH-1, MIC₅₀ of tebuconazole and MIC₂₅ of fludioxonil doses increased DNA methylation in FcUK99. It was determined that all doses of

carbendazim increased the DNA methylation level in *FcUK99* and decreased it in PH-1. Dual treatments reduced DNA methylation in both strains.

It was revealed that the three antifungal agents used in the study caused genomic instability through epigenetic modifications along with genetic variations in both *F. graminearum* PH-1 and *F. culmorum* *FcUK99* reference genomes. It is thought that the outputs of the master's thesis will contribute to the strategies of combating *Fusarium* spp. mediated by antifungal agents.

January 2023, 75 pages.

Keywords: *Fusarium*, Tebuconazole, Carbendazim, Fludioxonil, Genomic Instability



1. GİRİŞ

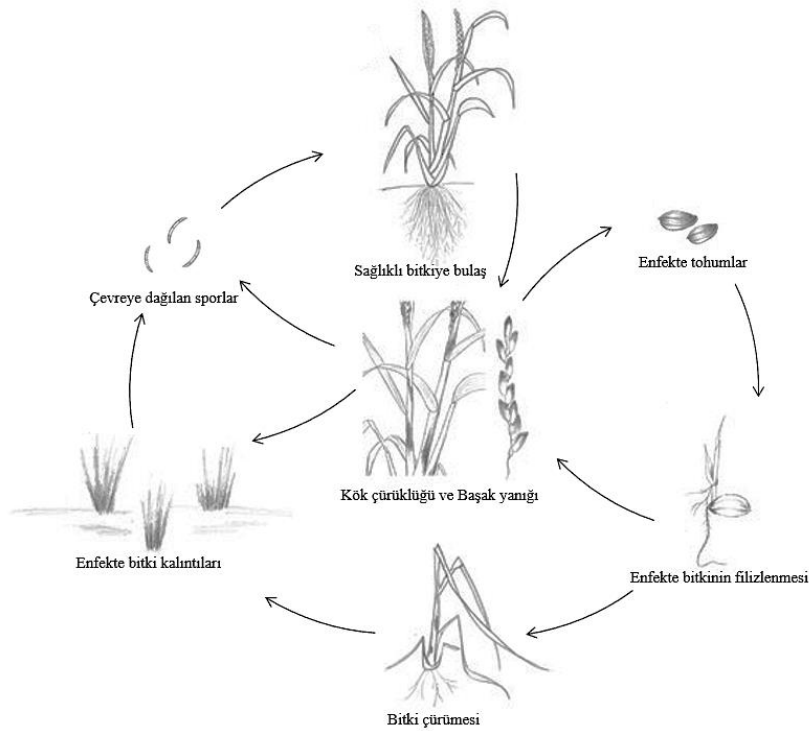
Fusarium spp., temel gıda üretiminde kullanılan ekonomik olarak değeri olan bitkileri (arpa, buğday, mısır) enfekte ederek mahsül üretimini önemli derecede azaltan bitki patojenleridir. Tahıl verimini azaltmasının yanı sıra ürettikleri mikotoksinlerin bitki, hayvan ve insan sağlığını tehdit etmesiyle pek çok ülkede ekonomik açıdan büyük kayıplara neden olmaktadır. Mikotoksin üretiminin artışı *Fusarium* spp.'nin yayılmasını hızlandırmakta ve neden olduğu hastalıkların şiddetini arttırmaktadır (Desjardins ve Proctor, 2007; Wagacha ve Muthomi, 2007). Çevre koşullarına karşı yüksek toleransa sahip *Fusarium* türlerinin çeşitliliği, sebep olduğu hastalıklarla toplum sağlığını etkilemesi ve ekonomik kayıplara yol açması bu cinse karşı mücadeleyi zorunlu hale getirmiştir (Parry ve diğ., 1995; Leslie ve diğ., 2006; Walkowiak ve diğ., 2016). Dünyada ve ülkemizde bu cins ile mücadele yöntemi olarak fungusit kullanımı yaygındır. Ülkemizde, *F. graminearum* ve *F. culmorum* en yaygın *Fusarium* türleri olarak tespit edilmiştir (Tunali ve diğ., 2006). Filamentli mantarlarda yapılan çalışmalar DNA metilasyonundaki artışın ağırlıklı olarak gen anlatımını baskıladığını ortaya konmuştur. Çevre koşullarının değişimi *F. graminearum*'da DNA metilasyonu değişimlerine yol açarken aynı zamanda sekonder metabolitlerin üretim profilini etkilemektedir (Gardiner ve diğ., 2009; Zhu ve diğ., 2015; Li ve diğ., 2017; Bewick ve diğ., 2019).

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında tebukonazol, karbendazim, fludioksonilin ve bu maddelerin ikili kombinasyonlarının uygulandığı *F. graminearum* ve *F. culmorum* referans suşlarında restriksiyon bölgelerindeki DNA metilasyonu değişimleri ve genomik kararsızlığa olan etkisi CRED-RA analizleri ile incelendi. Çalışmada elde edilen bulgular ile DNA metilasyonu oranının değişimi ve metilasyon tipleri belirlendi. *F. graminearum* ve *F. culmorum*'da yaygın kullanılan antifungal ajanların DNA metilasyonu değişimine olan etkisinin incelenmesi, bu maddelerin yol açabileceği etkilerin değerlendirilmesine katkı sağlayacaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. *Fusarium* spp.

İlk olarak 1821 yılında Link ex Gray tarafından tanımlanan *Fusarium* genusunun başta tahıl bitkileri olmak üzere çok sayıda bitki türünü enfekte eden bir bitki patojenidir. *Fusarium* cinsi taksonomik olarak Ascomycota bölümünden, Sordariomycetidae sınıfının, Hypocreales takımının bir üyesidir bununla birlikte biyotrofik, nekrotrofik ve hemi-biyotrofik yaşam döngüsüne sahip eşeyli ve/veya eşeysiz üreme gösteren türleri bulunmaktadır (Goswami ve Kistler, 2004). Bu cinse ait türlerin doğal habitatı topraktır ve 5.0-7.0 pH değer aralığı, 24-32°C sıcaklık aralığı bu türler için optimum yaşam koşullarını oluşturur. Bununla birlikte düşük pH ve sıcaklık değerlerinde de üreyebildikleri bilinmektedir (Özer ve Soran, 1991; Doohan ve diğ., 1999; Yörük ve Albayrak, 2014). Küresel iklim değişimi ile birlikte giderek yayılmakta olan bu türler farklı iklimsel özellikler taşıyan bölgelerden de rapor edilmişlerdir (Yli-Mattila ve diğ., 2013; Pasquali ve Migheli, 2014). Şekil 2.1’de *Fusarium* spp.’nin bitkilerdeki enfeksiyon döngüsünü göstermektedir.



Şekil 2.1: *Fusarium* spp.'nin bitki üzerindeki enfeksiyon döngüsü (Wulff ve diğ., 2010).

Fusarium spp., hasat öncesi buğday ve diğer küçük taneli tahıllarda başak yanıklığına ve kök ve kökboğazı çürüklüğü başta olmak üzere çeşitli bitki hastalıklarına neden olmaktadır (Desjardins ve Proctor, 2007). Sıcak ve soğuk iklim şartlarına adapte olabilen bu mantar cinsi başta tahıl bitkileri olmak üzere birçok bitkide enfeksiyon sürecinde çeşitli mikotoksinleri üretmektedirler (Larone, 1995; Walkowiak ve diğ., 2016). Mikotoksinler, mantarlar tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir. *Fusarium* spp. tarafından en çok üretilen mikotoksin grupları trikotesen [deoksinivalenol (DON), nivalenol (NIV)], fumonisin (fumonisin A1, fumonisin P1) ve zearalenondur (Miller ve diğ., 1991; Audenaert ve diğ., 2014; Munkvold, 2017). Bu patojenik türlerin yayılması; toprak biyotası, yabani otlarla mücadele yöntemleri ve hava koşullarındaki değişimler gibi faktörlerden etkilenmekte olup bitki ve bitki kısımlarına göre farklılık göstermektedir (Nelson ve diğ., 1994; Xu ve Nicholson 2009; Audenaert ve diğ., 2014). Mikotoksin üretiminin artışı *Fusarium* spp.'nin yayılmasını hızlandırmakta ve neden olduğu hastalıkların şiddetini arttırmaktadır. Dolayısıyla hem mahsülün üretimini önemli derecede düşürmekte hem de mikotoksinlerin bitkide birikmesi sonucu tüketildiği takdirde hayvan ve insan sağlığını tehdit etmektedir (Wagacha ve Muthomi, 2007).

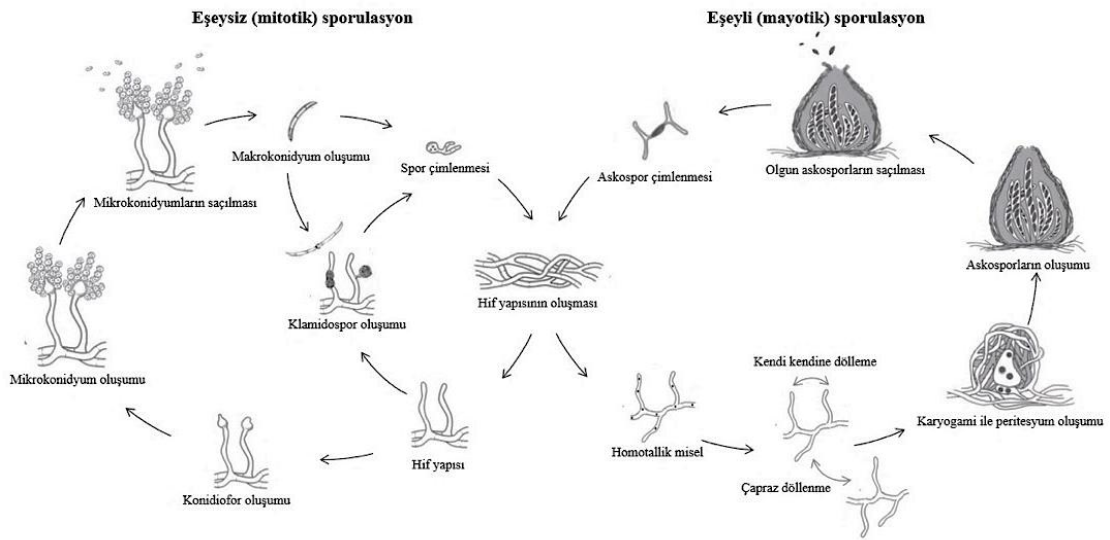
Hifli mantarlarda olduğu gibi *Fusarium* türlerinde de eşeysiz üreme konidiaosporlar aracılığıyla gerçekleştirilir (Tutel ve Çırpıcı, 1999). *Fusarium* spp. ürettikleri sporlar ile olumsuz çevre koşullarına karşı dayanıklı olması ve bu sporların rüzgar ile uzak mesafelere dağılması bu cinsin farklı coğrafik bölgelere yayılmasına olanak sağlamaktadır (Nelson ve diğ., 1994). Eşeyli olarak da üreyebilen *Fusarium* türleri Mat 1-1 ve Mat 1-2 allellerini taşıma durumuna göre iki eşem tipini bulundurur (Ma ve diğ., 2013). Her iki eşem allelini genomunda bulunduran türler homotallik, sadece bir eşem allelini genomunda taşıyanlar ise heterotallik olarak isimlendirilmektedir. Homotallik türler kendi içinde zigot oluşturup eşeyli üremeyi gerçekleştirebilirken heterotallik türler için eşeyli üreme için farklı eşem tipi taşıyan organizmalara gereksinim duyar (Yun ve diğ., 2000).

Ülkemizde buğday (*Triticum aestivum* L.), arpa (*Hordeum vulgare* L.) ve mısır (*Zea mays* L.) gibi ana besin kaynağı tahılları enfekte ederek başak yanıklığı ve kök/gövde çürüklüğü hastalıklarıyla ekonomik kayıplara yol açan *F. graminearum* ve *F. culmorum* en yaygın *Fusarium* türleri olarak tespit edilmiştir (Tunali ve diğ., 2006).

2.1.1. *F. graminearum*

F. graminearum, 1884'te İngiltere'de başak yanıklığına sebep olan fitopatojen olarak tanımlanmıştır (Stack, 2003). Dünya çapında, başta ana besin kaynağı tahıllar olmak üzere birçok bitkide sebep olduğu hastalıklarla ekonomik olarak yıkıcı etkiler oluşturan *F. graminearum*'a ülkemizde de çeşitli bölgelerde rastlanmaktadır (Tunalı ve diğ., 2006; Del Ponte ve diğ., 2017). Bu türün üremesi için bağıl nemin %50'den fazla olduğu koşullarda, en uygun sıcaklık 20-32°C ve ideal pH değeri 3.7-6 aralığındadır (Trail ve diğ., 2002; Beyer ve Verreet, 2005; Yörük ve Yli-Mattila, 2019). 4 kromozom ve gen bölgesi içeren pseudomoleküle sahip *F. graminearum* referans ırkı PH-1'in genomu 36.3006 Mb (mega baz) uzunluğunda 13140 protein kodlayan gen içermektedir.¹

Ülkemizdeki farklı tarım alanlarından izole edilerek kültürlen *F. graminearum* izolatlarının ürettikleri en yaygın mikotoksin grubu trikotesenler olup, DON ve NIV bu grup içerisindeki en yaygın mikotoksinlerdir. Ülkemizde *F. graminearum* izolatları DON üreticisi olarak rapor edilmiş olasılar da ilk defa 2012 yılında NIV üreticileri bildirilmiştir (Yörük ve Albayrak, 2012; Yüksektepe ve diğ., 2022).



Şekil 2.2: *F. graminearum*'un eşeyli ve eşeysiz üreme evreleri (Davis, 2000).

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=fusarium%2Bgraminearum> [Ziyaret tarihi: 29.11.2022].

Şekil 2.2’de gösterildiği gibi, homotallik olan *F. graminearum* askosporlarla eşeyli üreyebildiği gibi makrokonidyum ve klamidospore üreterek de eşeysiz olarak üreyebilmektedir (Trail ve diğ., 2002; Beyer ve Verreet, 2005). Askosporların yapısı daha küçük ve hafif olduğundan makrokonidyumlara göre yayılma hızı ve alanı dolayısıyla da bitkileri enfekte etme hızı daha fazladır (Sutton, 1982). Mayoz bölünme ile birlikte genetik çeşitliliğin artması da askosporları ve oluşturduğu bireyleri daha dirençli hale getirerek hastalık şiddetini etkilemektedir (Schmale ve Bergstrom, 2010).

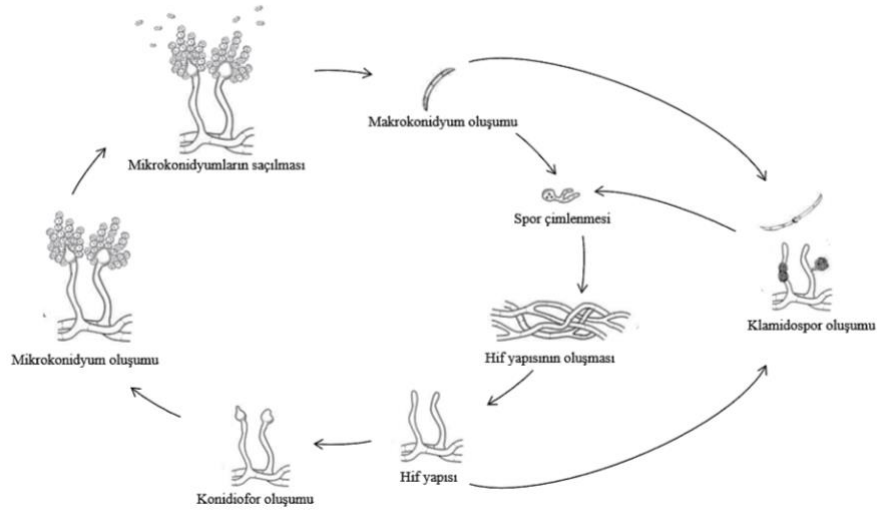
2.1.1. *F. culmorum*

F. culmorum sadece bitkilerde neden olduğu hastalıklarla değil ürettiği mikotoksinleri ile de dünya genelinde buğday üretiminde büyük kayıplara yol açmaktadır (Wagacha ve Muthomi, 2007). Bitkilere topraktan bulaşarak kontamine eden nekrotrofik yaşam döngüsüne sahip bu türün üremesi için ideal sıcaklık 24-32°C, uygun pH değeri ise 5-7 aralığındadır (Trail ve diğ., 2002). 4 kromozom ve gen bölgesi içeren pseudomoleküle sahip *F. culmorum* referans ırkı FcUK99’un genomu 37.6587 Mb uzunluğunda 11911 protein kodlayan gen içermektedir.²

Ülkemizdeki farklı tarım alanlarından izole edilerek kültürlen *F. culmorum* izolatlarının yaygın mikotoksin grubu trikotesenlerden DON ve NIV’dir. Her ikisini de üreten bireyler olsa da çok daha toksik olan NIV (Minervini ve diğ., 2004) üreticisine nadiren rastlanmaktadır (Mert-Türk ve Gencer, 2013; Yüksektepe ve diğ., 2022).

Şekil 2.3’te gösterildiği gibi *F. culmorum* heterotallik olmasına karşın eşeysiz ürettiği bilinmektedir (Mishra ve diğ., 2003; Kerényi ve diğ., 2004). Bu türün bireylerinde üreme mitotik sporlar aracılığıyla sağlanır. Eşeysiz üremeyi sağlayan bu sporlar miselyumdan farklılaşan konidiaspor (makrokonidyum ve mikrokonidyum) ve çevresel koşullara daha dayanıklı hiflerden veya makrokonidyumdan farklılaşan klamidosporlardır (Ma ve diğ., 2013; Scherm ve diğ., 2013).

² <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=fusarium%2Bculmorum%2B> [Ziyaret tarihi: 29.11.2022]



Şekil 2.3: *F. culmorum*'ün üreme evreleri (Davis 2000).

2.2 *Fusarium* spp. İLE MÜCADELE

Fusarium spp. mikrobiyotaya yayılarak bitkileri enfekte etmesi sonucu hem mahsül verimini düşürerek hem de ürettikleri mikotoksinlerin bitki, hayvan ve insan sağlığını tehdit etmesiyle pek çok ülkede ekonomik açıdan büyük kayıplara neden olmaktadır. *Fusarium* spp. fitopatojen olarak bilinse de hayvanlarda da enfeksiyonlara neden olan türlerinin olması, çevre koşullarına karşı yüksek toleransa sahip olması ve türlerin kendi arasında bile genetik çeşitliliği fazla iken farklı türlerin aynı hastalığa sebep olabilmesi; bu cinse karşı mücadele için bilimsel çalışmaları önemli hale getirmiştir (Larone, 1995; Parry ve diğ., 1995; Bai ve Shaner, 2004; Leslie ve diğ., 2006; Saharan ve Naef, 2008; Walkowiak ve diğ., 2016).

Uzun yıllar boyunca uygulanan kimyasal veya biyolojik mücadele alternatiflerine başvurulmadan fiziksel tarım uygulamaları ve sulama yöntemleri kullanılarak *Fusarium* spp. ile mücadele edilmeye çalışılmış, ancak bu yaklaşımlar da yetersiz kalmıştır. Mücadelede biyolojik yöntemler kullanılmaya başlandığında klasik melezleme ile mahsul verimi yüksek, dirençli bitkiler elde edilememiş; rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilen mahsul verimi yüksek, dirençli bitkiler ise *Fusarium* türlerinin sebep olduğu hastalıklara engel olamamıştır. Bunun sebebi yüksek adaptasyon yeteneğine sahip *Fusarium* spp. karşısında çevre koşullarından etkilenen çok çeşitli direnç mekanizmalarına sahip bitkilerin yetersiz kalmasıdır (Pirgozliev ve diğ., 2003; Champeil ve diğ., 2004; Niwa ve diğ., 2014).

Fungusitler temel etki mekanizmalarına göre doğrudan ya da dolaylı olmak üzere hücre solunumunu, protein sentezi ve hücrenin membran sistemlerinde ergosterol biyosentezini inhibe edenler ve hücre döngüsünü etkileyenler olmak üzere sınıflandırılmaktadır (Nabi ve diğ., 2017). *Fusarium* spp. ile mücadelede fungusitler düşük maliyet, yüksek etki aralığı ve çok çeşitli olmaları nedeni ile yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Yapılan çalışmalarda farklı etki mekanizmalarına sahip tebukonazol, protiokonazol ve dikloran gibi pek çok fungusitin *Fusarium* spp. üzerinde etkili olduğu ortaya konmuştur (Bosca ve diğ., 1998; Menegola ve diğ., 2006; Parker ve diğ., 2011; Zhou ve diğ., 2016).

2.2.1. Tebukonazol

Tebukonazol [(RS)-1-(4-Klorofenil)-4,4-dimetil-3-(1H, 1,2,4-triazol-1-ilmetil) pentan-3-ol] bitkinin vejetatif kısımları tarafından hızla emilen azol türevi bir fungusittir. Tebukonazolün de üyesi olduğu triazol fungusitler; dışarıdan alınan ilaçların veya kimyasal maddelerin metabolize edilmesinde, oksidasyon-redüksiyon tepkimelerinde görev alan ve mantarlarda hücre duvarlarının oluşumunda rol oynayan sitokrom P450 (CYP450) enzimlerinin inhibisyonunu gerçekleştirmektedir (Gonzalez ve Gelboin, 1992). Tebukonazol, prokloraz ve protikanazol-tebukonazol karışımının fitopatojenik mantarlarda ergosterol biyosentezini, CYP450 protein ailesinin 51 alt ailesi üyelerinden *cyp51* geninin kodladığı 14- α -demetilaz enziminin çalışmasını engelleyerek inhibe ettiği ortaya konmuştur (Wyand ve Brown, 2005; Blandino ve diğ., 2006; Leroux ve diğ., 2007; Luo ve Schnabel, 2007; Lechoczki-Krsjak ve diğ., 2008). Bu inhibisyon sonucunda lanosterol-ergosterol dönüşümü engellenmektedirler (Menegola ve diğ., 2006).

Liu ve diğ. (2010) *F. graminearum* ile yapmış oldukları transkriptomik çalışmada, tebukonazolün ergosterol biyosentezini ve hücre metabolizmasını düzenleyen genlerin anlatım seviyelerini değiştirdiğini, bununla beraber transkripsiyonu düzenleyen genleri de etkileyerek genomik kararlılıktan sorumlu yolları etkilediğini ortaya koymuştur. Tebukonazol uygulamasının *F. culmorum* üzerinde yapıldığı bir çalışmada, antifungal ajan ile muamele edilmiş hücrelerin hücre duvar bütünlüğünde incelme ve bozulma ile birlikte sitoplazmasında nekrotik parçacıklar gözlenmiştir. Sitokimyasal analizler ile miselyumlarda olduğu gibi konidyum yapılarında da hücre duvarında bulunan kitin ve β -1,3-glukanın seviyesinde düşüş olduğu gösterilmiştir (Kang ve diğ., 2001).

2.2.2. Karbendazim

Karbendazim [metil (1*H*-1,3-benzimidazol-2-yl) karbamat] fungusitleri mantarlarda mitozu ve hücre bölünmesini inhibe etmektedir (Seiler, 1975). Karbendazim, benzimidazol sınıfı fungusitler arasında en yaygın kullanılan antifungal ajanlardan biridir (Tortella diğ., 2013; Devi ve diğ., 2015).

Temel bileşeni α - ve β -tubulin olan mikrotübüller; hücre morfolojisinin korunması, hücre bölünmesi ve hücre içi taşıma gibi birçok aktiviteden sorumludur (Niwa ve diğ., 2013). Yapılan araştırmalarda, karbendazimin mikrotübüllerde β -tübüline bağlanarak polimerizasyonlarını inhibe ettiği ve dinamik kararsızlığa neden olduğu ortaya konmuştur (Davidse, 1986; Gupta ve diğ., 2004; Rathinasamy ve Pvea, 2006; Koo ve diğ., 2009).

Zhou ve diğ. (2020b) *F. graminearum* ile yaptıkları çalışmada β 2-tubulinin izositrat dehidrogenaz alt birim 3 (IDH3) ile etkileşime girerek DON biyosentezini baskıladığını ayrıca karbendazimin bu etkileşimi azaltarak DON üretimini arttırdığını bildirmişlerdir.

2.2.3. Fludioksonil

Fludioksonil [3-Cyano-4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-y1)pyrrole], fenilpirol sınıfı fungusitlerden en yaygın kullanılan antifungal ajanlardan biridir. Yapılan çalışmalarla fludioksonilin grup III histidin kinazlar (HK) aracılığı ile hücrenin ozmotik basınç dengesini koruyan yüksek ozmolariteli gliserol (ing., high osmolarity glycerol) sinyal yolağının aktivitesini arttırdığı ortaya konmuştur (Yoshimi ve diğ., 2005; Jacob ve diğ., 2015; Jacob ve Brandhorst, 2020; Bersching ve Jacob, 2021). HK çok adımlı fosforil iletim sistemine (ing., multistep phosphorelay systems) dahil olduğundan ökaryotik hücrelerde sinyal transdüksiyonunu doğrudan etkilemektedir (Jacob ve Thines, 2017).

F. graminearum'da fludioksonilin prosimidon ve iprodion fungusitleri ile çapraz dirence yol açarken, tebukonazol ve karbendazim direncini etkilemediği gösterilmiştir (Zhou ve diğ., 2020b). Graiet ve diğ. (2022) memeli hücrelerinde yaptığı çalışmada; fludioksonilin hücre iskeletinin dağılmasına, oksidatif stresin artışına ve buna bağlı apoptozun indüklenmesine, uygulanan konsantrasyon dozuna bağlı olarak da DNA hasarında artışa yol açtığı gözlenmiştir.

2.3. GENOMİK KARARSIZLIK

Genom bir hücrenin kromozomlarında ve organellerinde taşınan tüm nükleotid dizisi olarak adlandırılır. Genetik materyalin nesilden nesile veya somatik hücreler arasında aktarımı tüm organizmaların ortak özelliğidir ve bu aktarım sırasında kararlılığının korunması son derece büyük önem taşır. Genetik materyalin replikasyonu veya transkripsiyonu sırasında oluşan hatalar onarım mekanizmaları tarafından düzeltilmek üzere kontrol edilmektedir. Düzeltilemeyen hatalar genomik kararsızlığa, genomdaki değişikliklerin birikimi de genomik evrime yön verir. Genetik materyalin aktarımı sırasında oluşan dizi değişimleri mutasyon, mutasyon olmaksızın gen anlatımındaki değişiklikler epigenetik değişimler olarak isimlendirilir. Mutasyonların kalıtsal olarak taşındığı, epigenetik değişikliklerin ise dizi bilgisine etki etmemesinden dolayı taşınmadığı yaygın bir görüş olsa da, yapılan çalışmalar epigenetik değişikliklerin de jenerasyonlar arası aktarılabilirdiğini ortaya koymuştur (Stankiewicz ve Lupski, 2002; Casadesús, ve Noyer-Weidner, 2013; Temizkan, 2014; Kovslchuk, 2021).

2.3.1. Genomik Kararsızlığı Etkileyen Faktörler

Epigenetik faktörler ve mutasyonların sonucu olarak ortaya çıkan genomik kararsızlık genomda ya da gen anlatımında değişiklik oluşma ihtimalini arttırmaktadır (Broaddus ve diğ., 2021).

2.3.1.1. Mutasyon

Organizmaların genomlarındaki nükleotid dizi değişimlerini temsil eden mutasyon, bitkilerde gerçekleştirilen çaprazlama çalışmaları sırasında belirlenen varyasyonları tanımlamak için ilk defa 1901 yılında Hugo de Vries tarafından kullanılmıştır (De Vries, 1904). DNA'nın önemli işlevlerinden replikasyon veya transkripsiyon süreçleri sırasında meydana gelen spontan değişimlerden ve mutajenik etkili ajanlardan kaynaklanabilir³. DNA mutasyonları üç ana grup altında incelemek mümkündür (Clancy, 2008). Tek bir nükleotidde gerçekleşen değişimin yol açtığı nokta mutasyonunun popülasyondaki bireylerin en az %1'inde görüldüğü durumlar tek nükleotid polimorfizmi⁴ (ing., single nucleotide polymorphism) olarak tanımlanmaktadır. Kromozomların kırılması ile oluşan ve kromozom yapı değişimine sebep olan mutasyonların

³ <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Mutation> [Ziyaret tarihi: 30.11.2022]

⁴ http://genome.wellcome.ac.uk/doc_WTD020780.html

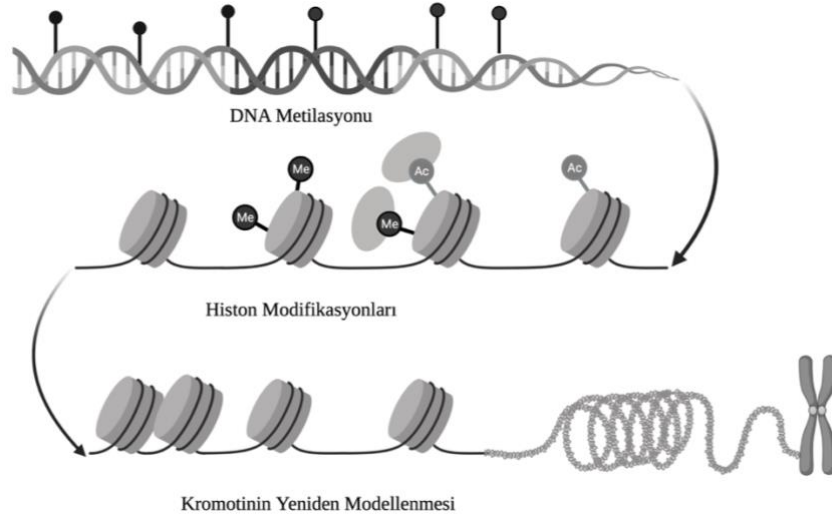
sonucunda, genin kodlama dizilerinde değişimlere, gen bölgelerinin kaybına (delesyon), transkripsiyon yoğunluğunun değişimine sebep olarak; hayvanlarda hastalıklara ve fenotipte kalıcı değişimlere yol açar (Clancy, 2008; Temizkan, 2014; Berdan ve diğ., 2018). Kopya sayısı varyasyonları, genomdaki belirli bir bölgenin tekrar sayısının bireyden bireye farklılık göstermesi olarak tanımlanmaktadır. Kopya sayısındaki değişimi bireyler arası fenotipik varyasyonu da arttırdığı ve genom evrimini hızlandırdığı düşünülmektedir (Sebat ve diğ., 2004; Aitman ve diğ., 2006).

Tablo 2.1: Mutasyon çeşitleri (Clancy, 2008).

Mutasyonun Kategorisi	Mutasyonun Sınıfı	Mutasyonun Tanımı
Nokta Mutasyonları	Substitüsyon (tranzisyon ve transversiyon)	Bir nükleotidin değişimine (Purin -> purin, primidin -> primidin; purin -> primidin, primidin -> purin) sebep olur.
	İnsersiyon	Replikasyon sırasında DNA dizisine bir nükleotidin eklenmesidir. Çerçeve kaymasına sebep olur.
	Delesyon	Replikasyon sırasında diziye bir nükleotidin eksilmesidir. Çerçeve kaymasına sebep olur.
Kromozomda Gerçekleşen Mutasyonlar	Inversiyon	Kromozomun bir parçasının ayrılıp ters olarak yerine yerleşmesidir. Kromozom yapı değişimine sebep olur.
	Delesyon	Kromozomun bir parçasının tamamen eksilmesidir. Kromozom yapı değişimine sebep olur.
	Duplikasyon	Kromozomun bir parçasının çoğalmasdır. Kromozom yapı değişimine sebep olur.
	Translokasyon	Kromozomun bir parçasının başka bir kromozoma ya da aynı kromozomda başka bir bölgeye eklenmesidir. Kromozom yapı değişimine sebep olur.
Kopya Sayısı Varyasyonu	Gen Amplifikasyon	Bir gen bölgesinin ardışık olarak tekrarlanmasıdır.
	Trinükleotid Tekrarı	DNA ipliğinde üç nükleotidin ardışık tekrarlanmasıdır.

2.3.1.2 Epigenetik değişimler

Genetik kodlamada değişiklik olmaksızın gen anlatımında meydana gelen ve kalıtılabilir değişimlerden epigenetik mekanizmalar sorumludur (Casadesús ve Noyer-Weidner, 2013). Epigenetik değişimler; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatinin yeniden modellenmesi olmak üzere üç temel mekanizmadan kaynaklanmaktadır (Şekil 2.4).

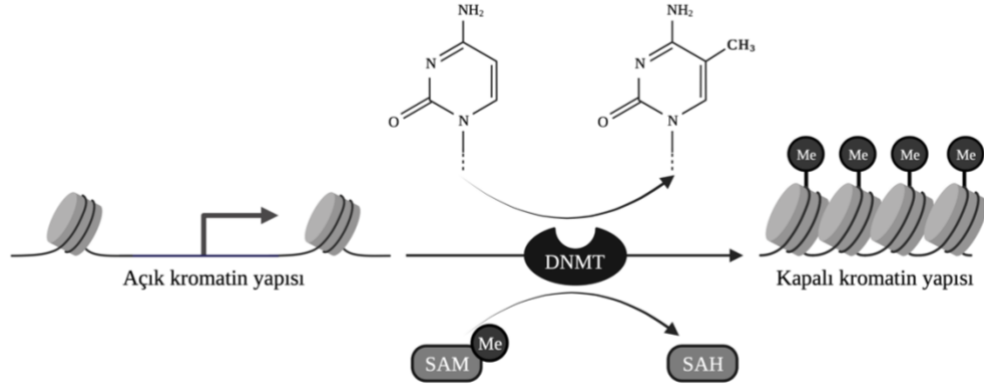


Şekil 2.4: Epigenetik değişimlerin üç temel mekanizması (Görsel BioRender ile oluşturuldu).

Kromatinin yeniden modellenmesi kovalent histon modifikasyon kompleksleri ve ATP'ye bağımlı kromatini yeniden modelleyen kompleksler tarafından kontrol edilir (Teif ve Rippe, 2009). Histon modifikasyonları, histon proteinlerinin aminoasit yan zincirlerinde gerçekleşen modifikasyonlar ve kovalent histon modifikasyonları (asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ubikuitinasyon) olarak iki gruba ayrılır (Weaver, 2011). Kovalent histon modifikasyonlarından metilasyon genellikle transkripsiyonun baskılanmasından, asetilasyon ise transkripsiyonun teşvik edilmesinden sorumludur (Eichler ve Sankoff, 2003). DNA metilasyonu CpG (Sitozin, C; Fosfat, P; Guanin, G) dinukleotidlerinin bulunduğu DNA bölgelerindeki C'e metil transferaz enzimi ile bir metil grubunun eklenmesi ile gerçekleşir (Jaenisch ve Bird, 2003).

2.4 DNA METİLYASYONU

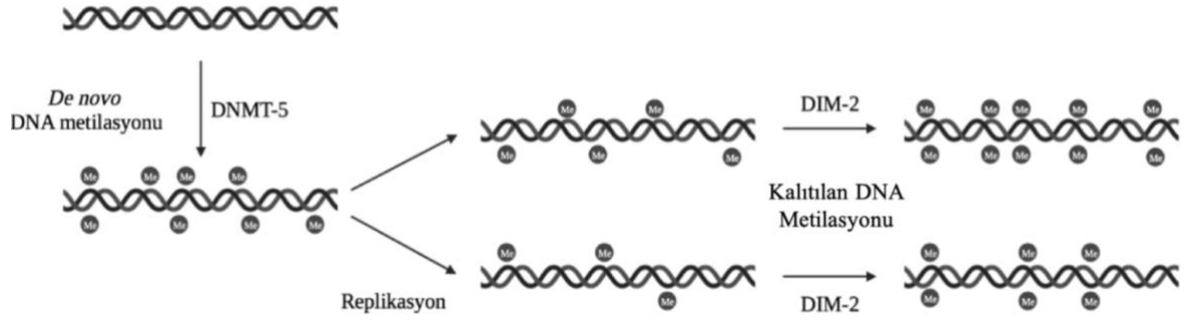
DNA metilasyonu, DNA metil transferaz (DNMT) enzimleri tarafından kataliz edilen, sitozinin primidin halkasının 5. pozisyonunda yer alan karbona S-adenozilmetiyoninden (SAM) bir metil grubu aktararak 5-metilsitozini (5mC) oluşturulan (Şekil 2.5) modifikasyon tipidir (Bird, 2002; Suziki ve Bird, 2008). Metilasyon ilk olarak Rollin Hotchkiss tarafından 1948'de tanımlanmıştır (Moore ve diğ., 2013).



Şekil 2.5: DNMT'nin katalize ettiği 5mC oluşumu ile gen anlatımının susturulması (Görsel BioRender ile oluşturuldu).

DNA metilasyonu, ökaryotik genom yapısını düzenleyen temel bir epigenetik modifikasyon türüdür. Genellikle transkripsiyonu yapılan gen bölgelerinde genin promotöründe, transpozal elementlerin (TEs) ve tekrarlı dizilerin yoğun olduğu bölgelerde bu modifikasyona rastlanmaktadır (Su ve diğ. 2011; Zhong ve diğ., 2013). DNA metilasyonu, DNA'ya bağlanan proteinler ile DNA dizisi arasındaki etkileşimi değiştirerek gen ekspresyonunu, genomik damgalanmayı (ing., imprinting) ve genomik kararlılığı etkileyerek birçok biyolojik aktivitenin işleyişini değiştirmektedir (Bird, 2002; Suziki ve Bird, 2008; Howlett ve diğ., 2015; Bartels ve diğ., 2018). Filamentli mantarlarda yapılan transkriptom ve metilom çalışmaları DNA metilasyonunun daha ağırlıklı olarak gen ekspresyonunu susturduğunu ortaya koymuştur (Rountree ve Selker 1997; Faugeron, 2000; Zemach ve diğ., 2010; Bewick ve diğ., 2019).

Fitopatojenik mantarlar DNMT-1 (ing., DNA methyltransferase-1) homoloğu olan DIM-2 (ing., deficient in methylation-2) ve DNMT-5 (ing., DNA methyltransferase-5) enzimlerine sahiptir (Bewick ve diğ., 2019; He ve diğ., 2020). DNA metilasyonu, ilk defa gözlenen (ing., *de novo*) ve kalıtılan (ing., *maintainance*) olmak üzere iki temel grupta incelenebilir (Şekil 2.6). *De novo* DNA metilasyonunda 5mC oluşumu DNMT-5 ile kataliz edilirken, kalıtılan DNA metilasyonunda ağırlıklı olarak CpG dizilerinin bulunduğu bölgede replikasyondan sonra karşı zincirdeki C'e metil grubu DIM-2 tarafından eklenir (Bird, 1999; He ve diğ., 2020).



Şekil 2.6: Fitopatojenik mantarlarda DNA metilasyonunun oluşumu (Görsel BioRender ile oluşturuldu).

2.4.1 DNA Metilasyonunun Tespitinde Kullanılan Yöntemler

DNA metilasyonunu tespiti için sodyum bisülfid uygulaması, 5mC antikorları ile afinite saflaştırılması ve endonükleaz kesimi (ing., endonuclease digestion) olmak üç temel yöntem kullanılmaktadır (Laird, 2010).

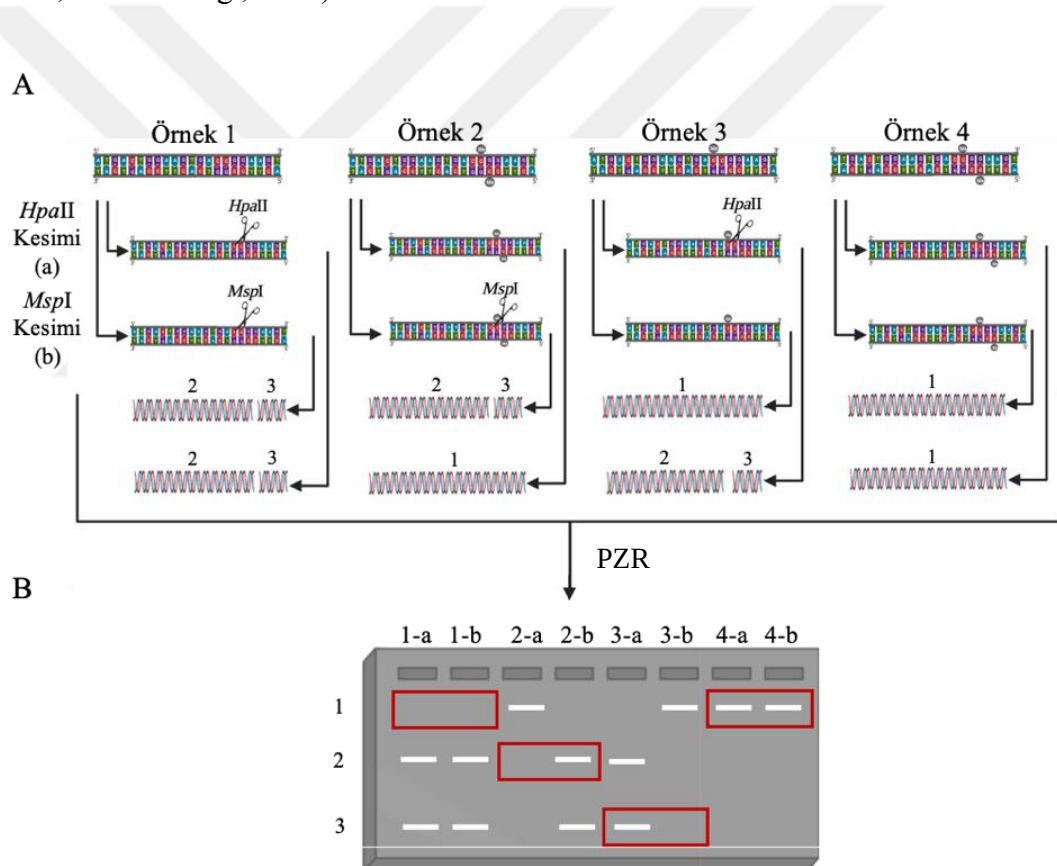
Sodyum bisülfid uygulamasında, aktif bileşik genomik DNA (gDNA)'da metillenmemiş C'den amin grubunu uzaklaştırıp hidroksit (OH) grubunu bağlayarak C-U (Urasil, U) dönüşümüne yol açar (Susan ve diğ., 1994). Bu dönüşüm gerçekleştikten sonra metilasyon oranının belirleneceği DNA bölgesi uygun primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldıktan sonra dizilenerek analiz edilir. Analizde metillenmemiş C'ler T (Timin, T) olarak dizilenecektir (Clarck ve diğ., 2006). Afinite saflaştırmasına bağlı proteomik yöntemde 5mC'ye özgü antikorlar veya metil bağlayıcı proteinler kullanılarak metillenme profili oluşturulur (Cross ve diğ. 1994). Antikor ile işaretlenen bölgeler çeşitli şekilde analiz edilebilir; immün çöktürme (ing., immunoprecipitation) ile genel bir profil oluştururken, elde edilen ürünlerin profili DNA mikroçip (ing., microarray) ve dizileme gibi çok daha seçici yöntemlerle özgün olarak elde edilir (Laird, 2010; Song ve diğ., 2011).

Endonükleaz kesimi temelli yöntemlerde, restriksiyon tanıma bölgelerinde oluşan DNA metilasyonlarını belirlemek adına, özgün bir bölgeyi tanıyarak tanıma bölgesinin içinden kesim yapan tip II restriksiyon endonükleazları kullanılmaktadır (Laird, 2010). Bu yöntemlerde kullanılan tip II restriksiyon endonükleazları, özgün bölgeyi tanıyıp aynı noktadan kesim yapan izoşizomerler (*HpaII* ve *MspI*) ve aynı bölgeyi tanıyıp farklı noktalardan kesim yapan neoşizomerler (*XmaI* ve *SmaI*) olarak iki grupta incelenebilir (Kusano ve diğ., 1995). Restriksiyon endonükleazı kesimi temelli CRED-RA; restriksiyon endonükleazı kesimi ve

ardından gDNA'nın rastgele bölgelerinin çoğaltımı ile elde edilen bant profillerinden % polimorfizm oranları ve metilasyon tiplerinin belirlendiği bir analiz yöntemidir (Bird ve Southern 1978; Liu ve diğ., 2009; Sahin ve diğ., 2014).

2.4.1.1 CRED-RA

gDNA, sıralı CpG dizilerinden oluşan CpG adaları (ing., CpG island) olarak adlandırılan bölgeler içerir (Cross ve diğ., 1994). CRED-RA, CpCpGpG bölgelerini tanıyan ve CpC'den keserek yapışkan uç oluşturan restriksiyon endonükleazları olan *HpaII* ve *MspI* kullanılarak DNA metilasyonunun belirlenmesini sağlayan PZR temelli bir yöntemdir (Reyna-López ve diğ., 1997; Sahin ve diğ., 2014).



Şekil 2.7: CRED-RA analizinin temel anlatımı; A) restriksiyon enzimi kesimi, B) PZR sonrası çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (Görsel BioRender ile oluşturuldu).

HpaII ve *MspI*'in aktivitesi CpCpGpG bölgesindeki 5mC'nin konumuna göre farklılık göstermektedir. Şekil 2.7 A'da gösterildiği gibi *HpaII* CpCpGpG'nin herhangi bir C'de metil grubu var ise kesim yapamaz ancak bu metilasyon DNA'nın tek zincirindeyse kesim yapabilir.

MspI, dıştaki C'de metil grubu var ise kesim yapamaması ile *HpaII*'den ayrılır (McClelland ve diğ., 1994; Zhao ve diğ., 2015).

gDNA ile yapılan kesim sonrası agaroz jel elektroforezi ile kesim ürünleri arasındaki fark belirlenemez. Bu nedenle uygun primerlerin kullanımı ile genomdaki rastgele bölgelerin etkin biçimde çoğaltımını sağlayan PZR uygulanarak metilasyonun değerlendirilmesini için bant profilleri görüntülenebilir. Rastgele bölgelerin çoğaltımında GC % değeri %50'nin üzerinde olan tek bir 10-mer oligonükleotid primer kullanılır. Primerin çift iplikli DNA'da karşılıklı ters konumda bağlanması standart PZR'ye göre daha düşük (35-39°C aralığında) sıcaklık uygulaması ile sağlanır (Bird ve Southern, 1978). Elde edilen çok sayıdaki çoğaltım ürünü dinamik bantlama profillerini oluşturduğundan çeşitli analizlere olanak sağlamaktadır (Şekil 2.7 B).

Literatür taramasında, *F. graminearum* ve *F. culmorum* ile yapılan hücresel düzeyde morfolojik çalışmalara (Kang ve diğ., 2001), transkriptomik (Zhou ve diğ., 2020a) ve proteomik analizler (Zhou ve diğ., 2020b) ile çeşitli antifungal ajanların (tebukonazol, karbendazim, fludioksonilin, α -thujone, camphor vb.) bu organizmalar üzerindeki etki mekanizmalarına ait birçok veri toplanmıştır (Gazdağlı ve diğ., 2018; Teker ve diğ., 2021). Ancak bu çalışmalar antifungal aktif bileşenlerin genomik kararsızlığa olan etkilerini anlamada sınırlı kalmışlardır (Gazdağlı ve diğ., 2018; Teker ve diğ., 2021). TÜBİTAK 119Z366 numaralı araştırma projesi kapsamında günümüze kadar tarım alanlarında yaygın olarak kullanılmış olan tebukonazol, karbendazim ve fludioksonil aktif bileşenlerinin *F. graminearum* ve *F. culmorum* referans suşları ve tarla izolatları üzerindeki etkisi genomik, transkriptomik, antioksidan aktivite, toksisite, apoptoz, toksin üretimi ve gerçekleştirilen bu yüksek lisans tez çalışması ile de referans suşların genomik kararlılık ve DNA metilasyonu değişimleri düzeyinde araştırılmıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. *Fusarium* REFERANS SUŞLARININ ÜRETİMİ ve AKTİF BİLEŞEN UYGULAMALARI

Yüksek lisans tez çalışmasında, Doç. Dr. Tapani Yli-Mattila (Turku Üniversitesi) ve Dr. Pierre Hellin'in (Louvain Katolik Üniversitesi) katkıları ile İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonuna kazandırılan *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* UK99 referans suşlarında tebukonazol, karbendazim ve fludioksonil antifungal ajanlarının yol açtığı DNA metilasyonu değişimleri ve genomik kararsızlığa olan etkisi incelendi. Her iki referans suşun gliserol stokları SNA (alm., Spezieller Nährstoffarmer Agar; SNA: KH_2PO_4 1 g/L, KCl 0.5 g/L, KNO_3 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, Glukoz 0.2 g/L, Sukroz 0.2 g/L, Agar 20 g/L) kullanılarak $25 \pm 2^\circ\text{C}$, %50 nem koşullu gündüz/gece (16/8 saat) döngülü iklimlendirme kabiniinde yedi gün süre ile canlandırıldı. Kontrol grupları patates dekstroza agar (PDA: Patates Dekstroz Özütü 15 g/L, Agar 20 g/L) besi ortamında ve deney grupları TÜBİTAK tarafından desteklenen 119Z366 numaralı proje kapsamında agar dilüsyon yöntemi ile belirlenen minimum inhibitör konsantrasyon (ing., minimum inhibitory concentration; MIC) değerleri esas alınarak (Tablo 3.1) hazırlanan PDA besi ortamında gündüz/gece (16/8 saat) döngülü iklimlendirme kabiniinde $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de %50 nem varlığında yedi gün süre ile üretildi (Irzykowska ve diğ., 2013).

Tablo 3.1: *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* UK99 referans suşlarına uygulanan antifungal ajanlar ve konsantrasyonları.

Antifungal Ajan	Tür	Referans Suş	Deney Grubu	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)
Tebukonazol	<i>F. graminearum</i>	PH-1	MIC ₂₅	0.437
			MIC ₅₀	0.875
			MIC ₇₅	1.31
	<i>F. culmorum</i>	FcUK99	MIC ₂₅	0.3
			MIC ₅₀	0.6
			MIC ₇₅	0.9
Karbendazim	<i>F. graminearum</i>	PH-1	MIC ₂₅	0.35
			MIC ₅₀	0.7
			MIC ₇₅	1.05
	<i>F. culmorum</i>	FcUK99	MIC ₂₅	0.35
			MIC ₅₀	0.7
			MIC ₇₅	1.05
Fludioksonil	<i>F. graminearum</i>	PH-1	MIC ₂₅	0.112
			MIC ₅₀	0.225
			MIC ₇₅	0.337
	<i>F. culmorum</i>	FcUK99	MIC ₂₅	0.112
			MIC ₅₀	0.225
			MIC ₇₅	0.337

Tablo 3.1 (devam): *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* UK99 referans suşlarına uygulanan antifungal ajanlar ve konsantrasyonları.

Antifungal Ajan	Tür	Referans Suş	Deney Grubu	Konsantrasyon (µg/mL)
Tebukonazol+Karbendazim	<i>F. graminearum</i>	PH-1	MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.437;0.35
	<i>F. culmorum</i>	FcUK99	MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.3;0.35
Tebukonazol+Fludioksonil	<i>F. graminearum</i>	PH-1	MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.437;0.112
	<i>F. culmorum</i>	FcUK99	MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.3;0.112
Karbendazim+Fludioksonil	<i>F. graminearum</i>	PH-1	MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.35;0.112
	<i>F. culmorum</i>	FcUK99	MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.35;0.112

Antifungal ajanlar ortak çözücü olan aseton kullanılarak çözdürüldükten sonra besi ortamına eklenerek homojen olarak dağılması sağlandı. Kullanılan aseton miktarları TÜBİTAK tarafından desteklenen 119Z366 numaralı proje kapsamında belirlenen konsantrasyonlar esas alınarak (Tablo 3.2) uygulandı.

Tablo 3.2: Tebukonazol, karbendazim, fludioksonilin ve ikili uygulamalar için kullanılan en yüksek çözücü (aseton) konsantrasyonları.

Tür	Referans Suş	Antifungal Ajan	Aseton derişimi (%v/v)
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Fludioksonil	0.006
		Tebukonazol+Fludioksonil	0.011
		Tebukonazol	0.026
		Karbendazim+Fludioksonil	0.142
		Tebukonazol+Karbendazim	0.148
		Karbendazim	0.420
<i>F. culmorum</i>	FcUK99	Fludioksonil	0.006
		Tebukonazol+Fludioksonil	0.008
		Tebukonazol	0.018
		Karbendazim+Fludioksonil	0.142
		Tebukonazol+Karbendazim	0.146
		Karbendazim	0.420

3.2. gDNA İZOLASYONU ve ANALİZİ

gDNA izolasyonu TNES (pH 7.5; Tris 50 mM, NaCl 0.4 M, EDTA 100 mM (pH 8), SDS 0.5%) tamponu ve Doyle ve Doyle (1987) protokolü izlenilerek antifungal ajan uygulanmayan kontrol grupları ile tebukonazol, karbendazim, fludioksonil ile birlikte bu maddelerin ikili kombinasyonları (tebukonazol+karbendazim, tebukonazol+fludioksonil, karbendazim+fludioksonil) ile oluşturulan deney gruplarının yedi günlük kültürlerinden izole edildi. Bu amaçla kültürlerden toplanan 50 mg yaş ağırlığa sahip miselyumlar porselen havanda sıvı azot ile mekanik olarak parçalandı. Havana 500 µL TNES tamponu eklenerek parçalama işlemine devam edilerek homojenat suspanse edildi. Örnekler 1.5 mL'lik steril propilen mikrotüpte toplandı ve üzerlerine 350 µL LiCl (8M) eklenerek karıştırıldı. Faz ayrımı sağlamak için tüplere 700 µL kloroform:izoamilalkol (24:1) eklendikten sonra 13000 rpm'de 1 dk süre ile santrifüj edildi. Üst sıvı steril mikrotüpe aktarılarak 10 µL RNazA (Roche®, 10109169001,

İsviçre; 10 mg/ml) eklendikten sonra 65°C’de 30 dk inkübe edildi. Eşit hacimde kloroform:izoamilalkol (24:1) eklendikten sonra 13000 rpm’de 1 dk süre ile santrifüj edilerek faz ayrımı sağlandı. Üst sıvı steril bir mikrotüpe aktarıldıktan sonra üzerine 1/10 hacim NaOAc (3M) ve 2:1 (v/v) hacim saf etanol (-20°C) eklenerek -70°C’de 30 dk bekletildi. 13000 rpm’de 1 dk santrifüjden sonra üst sıvı uzaklaştırılarak gDNA pelleti 50 µL çift distile su (ddH₂O) içinde çözdürüldü.

gDNA’nın nitel ve nicel analizi elektroforetik ve spektrofotometrik yöntemlerle gerçekleştirildi. gDNA örnekleri ve standart DNA (Lambda DNA/HindIII; Thermo Scientific, SM0101, ABD), yükleme tamponu (SIGMA, SLCD2996, ABD) ile karıştırılarak; EtBr eklenen %1’lik agaroz jele [0.5 g agaroz, 50 mL 1× tris-asetik asit-EDTA (TAE)] uygulandıktan sonra elektroforez, 70 V ve 120 A sabit güç altında gerçekleştirildi. Örneklerin gDNA’larının bütünlüğü ile bitlikte görece miktarları, standart DNA fragmanlarına ait değerlerle transilluminatörde UV ışığı altında karşılaştırılarak kontrol edildi. gDNA örneklerinin 260 ve 280 nm dalga boylarındaki UV ışığını absorbans değerleri spektrofotometre cihazında ölçüldü ve DNA miktarları denklem (3.1)’den yararlanılarak hesaplandı.

$$\text{DNA } (\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times \text{sulandırım oranı} \times \text{OD (optik densite, 50 } \mu\text{g/mL)} \quad (3.1)$$

gDNA’ların çoğaltıma uygun saflıkta olduğunu kontrol etmek için 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri oranları (A_{260}/A_{280}) hesaplandı (Maniatis ve diğ., 1982).

3.3. CRED-RA

Tebukonazol, karbendazim, fludioksonil ve bu maddelerin ikili kombinasyonlarının uygulamalarının *F. graminearum* ve *F. culmorum* referans suşlarında kontrol gruplarına göre DNA metilasyonuna ve genomik kararlılığına etkisi araştırıldı.

CRED-RA yönteminde; madde uygulaması etkisi ile genom boyunca oluşan metilasyon profilleri farklılığı incelendi. Kontrol ve deney gruplarına ait gDNA’lar (250 ng DNA) 20 µL toplam hacimde 10U *Hpa*II (New England BioLabs®, R0171S, ABD) restriksiyon endonükleaz enzimi ve 1× tamponun (NEBuffer, New England BioLabs®, R0171S, ABD) varlığında 37°C’de 1 saat inkübe edilerek kesim reaksiyonu tamamlandı. Restriksiyon enzimlerinin inaktivasyonu için mikrotüpler 60°C’de 20 dk bekletildi. Aynı protokol 20 µL toplam hacimde kontrol ve deney gruplarına ait gDNA’lar (250 ng DNA), *Msp*I (New England BioLabs®,

R0106S, ABD) restriksiyon endonükleaz enzimi ve 1× tamponu (NEBuffer, New England BioLabs®, R0106S, ABD) ile uygulandı. Restriksiyon enzimi ile muamele edilen ve kesim yapılmamış gDNA'ların PZR'si, 10-mer oligonükleotidler (Tablo 3.3) kullanılarak Tablo 3.4'te verilen bileşenler ile Tablo 3.5'te verilen koşullarda termal döngü cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 3.3: CRED-RA analizinde kullanılan primerler ve özellikleri.

Primer	Dizi (5'-3')	%GC	Primer	Dizi (5'-3')	%GC
OPA-01	CAGGCCCTTC	70	OPA-08	GTGACGTAGG	60
OPA-03	AGTCAGCCAC	60	OPB-06	TGCTCTGCCC	70
OPA-04	AATCGGGCTG	60	OPB-07	GGTGACGCAG	70
OPA-05	AGGGGTCTTG	60	OPB-10	CTGCTGGGAC	70
OPA-07	GAAACGGGTG	60	OPC-5	GATGACCGCC	70

Tablo 3.4: PZR bileşenleri.

Bileşen	Son Konsantrasyon	Bileşen	Son Konsantrasyon
gDNA	50 ng	Primer	10 pmol
PZR tamponu	1×	Taq DNA polimeraz	1U
MgCl ₂	2.5 mM	ddH ₂ O	-
dNTP	0.4 mM	Toplam hacim:	25 µL

Tablo 3.5: PZR koşulları.

Sıcaklık	Süre	Döngü
94 °C	2 dk	1
94 °C	1.5 dk	4
37 °C	1.5 dk	
72 °C	3 dk	
94 °C	1 dk	36
37 °C	1.5 dk	
72 °C	2 dk	
72 °C	10 dk	1

Antifungal ajanların genomik dizi kararlılığı (ing., genomic template stability; GTS) üzerindeki etkisi ile neden olduğu metilasyon tipleri restriksiyon endonükleaz kesimi yapılmamış kontrol ve deney gruplarına ait gDNA'ların CRED-RA analizinden elde edilen çoğaltım ürünleri analizlerine göre gerçekleştirildi.

PZR çoğaltım ürünleri ve fragment boyutları bilinen standart DNA (1 kB; Thermo Scientific, SM0311, ABD), yükleme tamponu (SIGMA, SLCD2996, ABD) ile birlikte EtBr eklenen %1.7'lik agaroz jele (1.19 g agaroz, 70 mL 1× TAE) uygulandı ve 1 saat 15 dk süre ile 65 V ve 120 A sabit güçte elektroforez gerçekleştirildi. Fragment boyutları standart DNA'ya göre belirlenen çoğaltım ürünleri UV transilluminatörde görüntülendi. Fragmentin varlığı için "1",

yokluğu ise “0” ile skorlama yapılarak DNA kararlılığı ve çeşitliliği hesaplandı. Doz uygulanmış her bir örnekteki ortalama polimorfik bant sayısı (a) ve kontroldeki toplam bant sayısı (n) denklem 3.2’ye göre hesaplanarak genomik dizi kararlılığı, denklem 3.3’e göre hesaplanarak % polimorfizm tespit edildi (Harshitha ve Nair, 2020).

$$\% \text{ GTS} = (1 - \frac{a}{n}) \times 100 \quad (3.2)$$

$$\% \text{ Polimorfizm} = \frac{a}{n} \times 100 \quad (3.3)$$

Metilasyon tipleri Liu ve diğ. (2009) ile Karan ve diğ. (2012)’nin çalışmaları temel alınarak, tablo 3.6’da gösterildiği gibi değerlendirildi ve metilasyon oranları denklem 3.4-3.6’ya göre hesaplandı.

$$\text{Metilasyon oranı (\%)} = \frac{\text{Tip II} + \text{Tip III} + \text{Tip IV}}{\text{Tip I} + \text{Tip II} + \text{Tip III} + \text{Tip IV}} \times 100 \quad (3.4)$$

$$\text{Yarı metilasyon oranı (\%)} = \frac{\text{Tip II}}{\text{Tip I} + \text{Tip II} + \text{Tip III} + \text{Tip IV}} \times 100 \quad (3.5)$$

$$\text{Tam metilasyon oranı (\%)} = \frac{\text{Tip III} + \text{Tip IV}}{\text{Tip I} + \text{Tip II} + \text{Tip III} + \text{Tip IV}} \times 100 \quad (3.6)$$

Tablo 3.6: Metilasyon tiplerinin belirlenmesi (Liu ve diğ., 2009; Karan ve diğ., 2012).

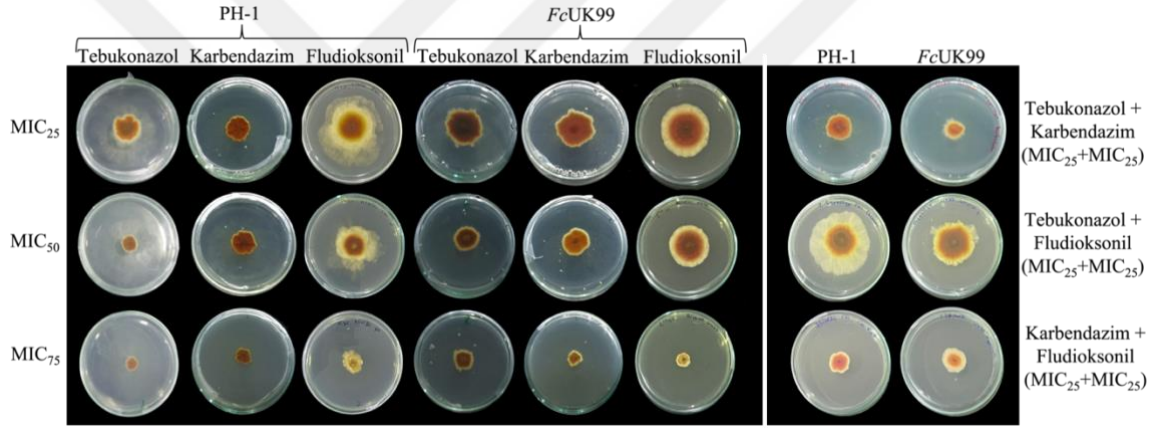
Metilasyon Tipi	Metilasyon Profili	Restriksiyon Enzimi Aktivitesi		Beklenen Skorlama Profili			Metilasyon Profili
		HpaII	MspI	Kesim yapılmamış	HpaII *	MspI *	
Tip I	CCGG	+	+	1	0	0	Metilasyon yok
Tip II	<u>C</u> CGG <u>CC</u> GG	+	-	0	0	1	Yarı metilasyon
Tip III	CC <u>CGG</u>	-	+	0	1	0	Tam metilasyon
Tip IV	<u>CC</u> CGG <u>CC</u> GG	-	-	0	1	1	Tam Metilasyon

Restriksiyon endonükleazlarının aktif durumu “+”, inaktif durumu “-” olarak belirtildi. *uygulanan kesim enzimi.

4. BULGULAR

4.1 *Fusarium* REFERANS SUŞLARININ ÜRETİMİ

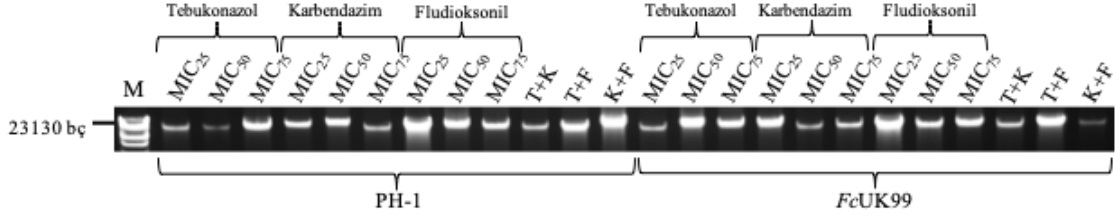
119Z366 numaralı TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında tebukonazol, karbendazim, fludioksonil aktif bileşiklerinin belirlenen MIC₂₅, MIC₅₀, MIC₇₅ dozları ile ikili uygulama dozlarını (MIC₂₅+MIC₂₅) içeren PDA besi ortamında yetiştirilen *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUK99 referans suşlarının 7. gündeki üreme profilleri Şekil 4.1’de verildi. Belirlenen üreme profilleri TÜBİTAK projesinde gerçekleştirilen doz uygulamasından elde edilen profiller ile bire bir uyumlu bulunduğundan analizler her iki referansın bu kültürlerinden gerçekleştirildi.



Şekil 4.1: Tebukonazol, karbendazim, fludioksonil ve bu maddelerin ikili kombinasyonlarının uygulandığı *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* FcUK99 referans suşlarının 7. gündeki üreme profili.

4.2 gDNA İZOLASYONU İLE İLGİLİ BULGULAR

Tebukonazol, karbendazim, fludioksonilin tekli, bu maddelerin ikili kombinasyonlarının uygulandığı kültürlerden ve kontrollerinden izole edilen gDNA’ların 260 nm dalga boyundaki spektrofometik ölçümlerinden hesaplanan DNA miktarları 500-1000 ng/µL değer aralığında belirlendi. gDNA’ların OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranından belirlenen saflık düzeyleri 1.8-2.00 değerleri arasında bulundu. %1’lik agaroz jel elektroforezi görüntüleri ile izole edilen gDNA’ların bütünlüğünü koruduğu, CRED-RA analizinde kullanabilecek kalitede olduğu görüntülendi (Şekil 4.2).

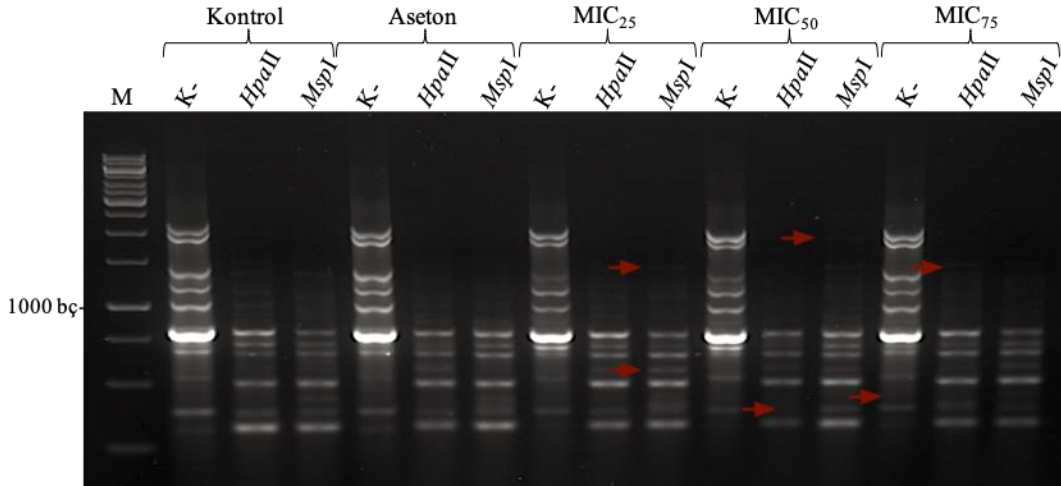


Şekil 4.2: CRED-RA analizlerinde kullanılan deney gruplarına ait gDNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: λ +Hind3 (Thermo Scientific, SM0101, ABD). T+F: Tebukonazol+karbendazim (MIC₂₅+ MIC₂₅), T+F: Tebukonazol+fludioksonil (MIC₂₅+ MIC₂₅), K+F: Karbendazim+fludioksonil.

4.3 CRED-RA ANALİZİ BULGULARI

4.3.1 Tebukonazolün Neden Olduğu Genomik Dizi Kararsızlığı ve Polimorfizm Bulguları

Tebukonazolün MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozlarına maruz bırakılan *F. graminearum* PH-1 referans suşunun gDNA'sının CRED-RA analizlerinden toplam 281 fragment çoğaltıldı. OPA-01 ve OPA-03 primerleri en yüksek bantlama profilinin (39) çoğaltımını sağlarken, OPB-06 primerinden en az sayıda çoğaltım ürünü (9) tespit edildi. OPB-10 primerinin kullanıldığı PZR çoğaltımından elde edilen bant profili Şekil 4.3'te verildi.



Şekil 4.3: Kontrol, %0.026 (v/v) aseton ve tebukonazol uygulanmış PH-1'in OPB-10 primeri ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kb (Thermo Scientific, SM0311, ABD), K-:Kesim yapılmamış, *HpaII*: *HpaII* ile kesim yapılmış, *MspI*: *MspI* ile kesim yapılmış.

Tebukonazol uygulamalarının PH-1’de sebep olduğu % GTS değeri, MIC₂₅ için 8, MIC₅₀ için 17, MIC₇₅ için 13 polimorfik bant dikkate alınarak hesaplandı. % GTS değerinin en düşük olduğu (%87.500) doz MIC₅₀ olarak belirlendi. % polimorfizm hesaplamalarında *HpaII* kesim ürünlerinden MIC₂₅ için 24, MIC₅₀ için 29, MIC₇₅ için 21 ve *MspI* kesim ürünlerinden MIC₂₅ için 27, MIC₅₀ için 20, MIC₇₅ için 24 polimorfik bant değerlendirildi. En yüksek *HpaII* polimorfizmi değeri (%28.713) MIC₅₀, *MspI* polimorfizmi (%24.107) değeri ise MIC₂₅ doz uygulamasının neden olduğu belirlendi. Tebukonazolün farklı konsantrasyonlarının PH-1’de sebep olduğu % GTS değerleri ile *HpaII* ve *MspI* kesim profillerinin analizinden elde edilen % polimorfizm değerleri Tablo 4.1’de verildi.

Tablo 4.1: Tebukonazolün MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozlarının PH-1’de neden olduğu GTS ve polimorfizmin % değerleri.

Tür	Suş	Doz	Derişim (µg/mL)	%GTS	% Polimorfizm	
					<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>
<i>F. graminearum</i>	PH-1	MIC ₂₅	0.437	94.118	23.762	24.107
		MIC ₅₀	0.875	87.500	28.713	17.857
		MIC ₇₅	1.31	90.441	20.792	21.429

Tablo 3.6’daki skorlama profiline göre belirlenen metilasyon tiplerinin, tebukonazolün MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozu uygulanmış PH-1 ve kontroldeki yüzde dağılımı Tablo 4.2’de verildi. PH-1’de kontrole göre tip I ve -II metilasyon oranında en çok değişime tebukonazolün MIC₂₅ dozu, tip III’de MIC₇₅ dozu ve tip IV’de MIC₅₀ dozu etkili oldu. Kontrole göre tebukonazolün MIC₂₅ ve MIC₅₀ dozları PH-1 genomunda tip I, -II ve -III metilasyon değerlerini arttırırken tip IV değerini azalttı; MIC₇₅ dozu ise tip II ile -III metilasyon değerinde artışa, tip I ile -IV değerlerinde azalmaya neden oldu.

Tablo 4.2: Tebukonazolün MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozu uygulanmış PH-1 ve kontroldeki metilasyon tiplerinin yüzde dağılımı.

Tür	Suş	Grup	Tebukonazol derişim (µg/mL)	% Değer			
				Tip I	Tip II	Tip III	Tip IV
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Kontrol	0	54.400	5.200	0.800	39.600
		MIC ₂₅	0.437	56.652	6.867	2.146	34.335
		MIC ₅₀	0.875	56.048	6.452	3.226	33.871
		MIC ₇₅	1.31	53.785	5.578	5.179	35.458

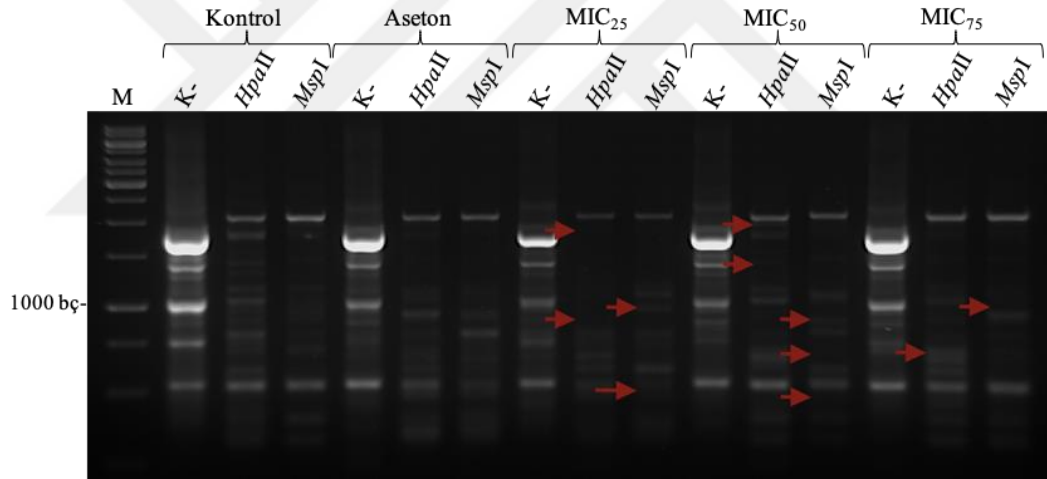
Tebukonazolün farklı konsantrasyonlarının PH-1’de sebep olduğu yarı metilasyon yüzdeleri Denklem 3.5’e göre MIC₂₅ için 9, MIC₅₀ için 9, MIC₇₅ için 1 bant profili dikkate alınarak; tam metilasyon yüzdeleri ise Denklem 3.6’ya göre MIC₂₅ için 73, MIC₅₀ için 90, MIC₇₅ için 91 bant profili dikkate alınarak hesaplandığında en yüksek ve en düşük % değerleri sırasıyla tam metilasyon için MIC₇₅ ve MIC₂₅, yarı metilasyon için MIC₂₅ ve MIC₇₅ dozlarında belirlendi

(Tablo 4.3). Tebukonazolün MIC₂₅ ve MIC₅₀ dozları PH-1'in restriksiyon bölgelerindeki metillenmeyi kontrole göre arttırırken, MIC₇₅ dozunun ise azalttığı tespit edildi.

Tablo 4.3: Tebukonazolün MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozu uygulanmış PH-1 ve kontroldeki metilasyon profillerinin yüzde dağılımı.

Tür	Suş	Grup	Tebukonazol derişim (µg/mL)	% Metilasyon Profili		
				Genel	Tam	Yarı
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Kontrol	0	45.600	40.400	5.200
		MIC ₂₅	0.437	43.348	36.481	6.867
		MIC ₅₀	0.875	43.725	37.247	6.478
		MIC ₇₅	1.31	46.215	40.637	5.578

Tebukonazolün MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozları uygulanan *F. culmorum* FcUK99 referans suşunun gDNA'sının CRED-RA analizlerinden toplam 219 çoğaltım ürünü elde edildi. En yüksek bant sayısı (34) OPA-07 primerinin kullanıldığı (Şekil 4.4), en az bant sayısı (10) ise OPB-06 primerinin kullanıldığı PZR analizinde tespit edildi.



Şekil 4.4: Kontrol, %0.018 (v/v) aseton ve tebukonazol uygulanmış FcUK99'un OPA-07 primeri ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kb (Thermo Scientific, SM0311, ABD), K-:Kesim yapılmamış, HpaII: HpaII ile kesim yapılmış, MspI: MspI ile kesim yapılmış.

Tebukonazol uygulamalarının FcUK99'da sebep olduğu % GTS değeri, MIC₂₅ ve MIC₅₀ için 5, MIC₇₅ için 3 polimorfik bant dikkate alınarak hesaplandığında MIC₂₅ ve MIC₅₀ genomik dizi kararlılığını en çok etkileyen dozlar olarak belirlendi ve etki değeri % 4.717 (100-% GTS) olarak hesaplandı. % polimorfizm hesaplamalarında HpaII kesim ürünlerinden MIC₂₅ için 25, MIC₅₀ için 22, MIC₇₅ için 28 ve MspI kesim ürünlerinden MIC₂₅ için 24, MIC₅₀ için 18, MIC₇₅ için 19 polimorfik bant değerlendirildi. En yüksek % polimorfizmi değerlerine HpaII ve MspI için sırasıyla (%30.435) MIC₇₅ ve (%26.966) MIC₂₅ doz uygulamalarının neden olduğu

belirlendi. Tebukonazolün farklı konsantrasyonlarının *FcUK99*'da sebep olduğu % GTS değerleri ile *HpaII* ve *MspI* kesim profillerinin analizinden elde edilen % polimorfizm değerleri Tablo 4.4'te verildi.

Tablo 4.4: Tebukonazolün MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozlarının *FcUK99*'da neden olduğu GTS ve polimorfizmin % değerleri.

Tür	Suş	Doz	Derişim (µg/mL)	%GTS	% Polimorfizm	
					<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>
<i>F. culmorum</i>	<i>FcUK99</i>	MIC ₂₅	0.3	95.283	27.174	26.966
		MIC ₅₀	0.6	95.283	23.913	20.224
		MIC ₇₅	0.9	97.169	30.435	21.348

Skorlama profiline (Tablo 3.6) göre belirlenen metilasyon tiplerinin, tebukonazolün MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozu uygulanmış *FcUK99* ve kontroldeki yüzde dağılımı Tablo 4.5'te verildi. *FcUK99*'da kontrole göre tip I ve -IV metilasyon oranında en çok değişime tebukonazolün MIC₂₅ dozu, tip III'de MIC₅₀ dozu ve tip IV'de MIC₇₅ dozu etkili oldu. Kontrole göre karbendazimin MIC₂₅ dozu *FcUK99* genomunda tip I, -II ve -III metilasyon değerlerini artırırken tip IV değerini azalttı; MIC₅₀ tip II ve -III metilasyon değerini artırırken tip I ve -IV değerini azalttı; MIC₇₅ dozu ise tip I ile -III metilasyon değerini artırırken tip II ile -IV değerlerini azalttı.

Tablo 4.5: Tebukonazolün MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozu uygulanmış *FcUK99* ve kontroldeki metilasyon tiplerinin yüzde dağılımı.

Tür	Suş	Grup	Tebukonazol derişim (µg/mL)	% Değer			
				Tip I	Tip II	Tip III	Tip IV
<i>F. culmorum</i>	<i>FcUK99</i>	Kontrol	0	51.961	2.941	4.412	40.686
		MIC ₂₅	0.3	55.677	4.865	4.865	34.595
		MIC ₅₀	0.6	51.471	4.412	8.824	35.294
		MIC ₇₅	0.9	53.061	0.510	6.122	40.306

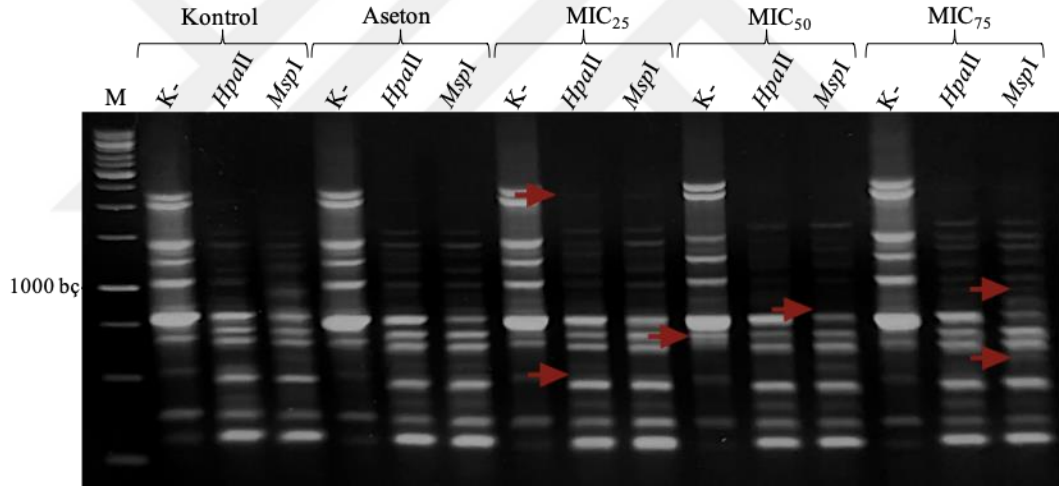
Tebukonazolün *FcUK99*'da sebep olduğu tam ve yarı metilasyon yüzdeleri MIC₂₅ ve MIC₅₀ için 16, MIC₇₅ için 14 bant profili; tam metilasyon ise MIC₂₅ için 85, MIC₅₀ için 92, MIC₇₅ için 102 bant profili dikkate alınarak hesaplandığında en yüksek ve en düşük değerler sırasıyla tam metilasyon için MIC₇₅ ve MIC₂₅, yarı metilasyon için MIC₂₅ ve MIC₇₅ dozlarında belirlendi (Tablo 4.6). Tebukonazolün MIC₅₀ dozu *FcUK99*'un restriksiyon bölgelerindeki metillenmeyi kontrole göre artırırken, MIC₂₅ ve MIC₇₅ dozlarının azalttığı tespit edildi.

Tablo 4.6: Tebukonazolün MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozu uygulanmış *FcUK99* ve kontroldeki metilasyon profillerinin yüzde dağılımı.

Tür	Suş	Grup	Tebukonazol derişim (µg/mL)	% Metilasyon Profili		
				Genel	Tam	Yarı
<i>F. culmorum</i>	<i>FcUK99</i>	Kontrol	0	48.039	45.098	2.941
		MIC ₂₅	0.3	44.324	39.459	4.865
		MIC ₅₀	0.6	48.529	44.118	4.412
		MIC ₇₅	0.9	46.939	46.429	0.510

4.3.2 Karbendazimin Neden Olduğu Genomik Dizi Kararsızlığı ve Polimorfizm Bulguları

Karbendazimin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozları uygulanan *F. graminearum* PH-1 referans suşunun gDNA'sının CRED-RA analizlerinden toplam 238 çoğaltım ürünü elde edildi. En yüksek bant sayısı (36) OPB-10 primerinin (Şekil 4.5) en az bant sayısı (15) ise OPB-06 primerinin kullanıldığı çoğaltım reaksiyonundan tespit edildi.



Şekil 4.5: Kontrol, %0.420 (v/v) aseton ve karbendazim uygulanmış PH-1'in OPB-10 primeri ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kbp (Thermo Scientific, SM0311, ABD), K-:Kesim yapılmamış, *HpaII*: *HpaII* ile kesim yapılmış, *MspI*: *MspI* ile kesim yapılmış.

Karbendazim uygulamalarının PH-1'de sebep olduğu % GTS değeri, MIC₂₅ için 2, MIC₅₀ için 15, MIC₇₅ için 4 polimorfik bant dikkate alınarak hesaplandı. % polimorfizm hesaplamalarında *HpaII* kesim ürünlerinden MIC₂₅ için 20, MIC₅₀ için 29, MIC₇₅ için 23 ve *MspI* kesim ürünlerinden MIC₂₅ ve MIC₅₀ için 21, MIC₇₅ için 22 polimorfik bant değerlendirildi. % GTS değerinin en düşük olduğu (%87.394) ve *HpaII* kesimiyle belirlenen % polimorfizmin en yüksek olduğu (%31.183) doz MIC₅₀ olarak tespit edildi. *MspI* kesimi ile tespit edilen en yüksek polimorfizm %24.444 olarak MIC₇₅ doz uygulamasında belirlendi. Antifungal ajanın

farklı konsantrasyonlarının PH-1’de sebep olduğu % GTS değerleri ile *HpaII* ve *MspI* kesim profillerinin analizinden elde edilen % polimorfizm değerleri Tablo 4.7’de verildi.

Tablo 4.7: Karbendazimin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozlarının PH-1’de neden olduğu GTS ve polimorfizmin % değerleri.

Tür	Suş	Doz	Derişim (µg/mL)	%GTS	% Polimorfizm	
					<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>
<i>F. graminearum</i>	PH-1	MIC ₂₅	0.35	98.319	21.505	23.333
		MIC ₅₀	0.7	87.394	31.183	23.333
		MIC ₇₅	1.05	96.639	24.731	24.444

Skorlama profiline (Tablo 3.6) göre belirlenen metilasyon tiplerinin, karbendazimin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozu uygulanmış PH-1 ve kontroldeki yüzde dağılımı Tablo 4.8’de verildi. PH-1’de kontrole göre tip I ve -III metilasyon oranında en çok değişime karbendazimin MIC₇₅ dozu, tip II’de MIC₂₅ dozu ve tip IV’de MIC₅₀ dozu etkili oldu. Kontrole göre karbendazimin MIC₂₅ dozu PH-1 genomunda tip I, -III ve -IV metilasyon değerlerini arttırırken tip II değerini azalttı; MIC₅₀ dozu tip I, -II ve -III metilasyonun değerini arttırırken tip IV değerini azalttı. MIC₇₅ dozu ise tip I ile -II metilasyon değerinde artışa, tip III ile -IV değerlerinde azalışa neden oldu.

Tablo 4.8: Karbendazimin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozu uygulanmış PH-1 ve kontroldeki metilasyon tiplerinin yüzde dağılımı.

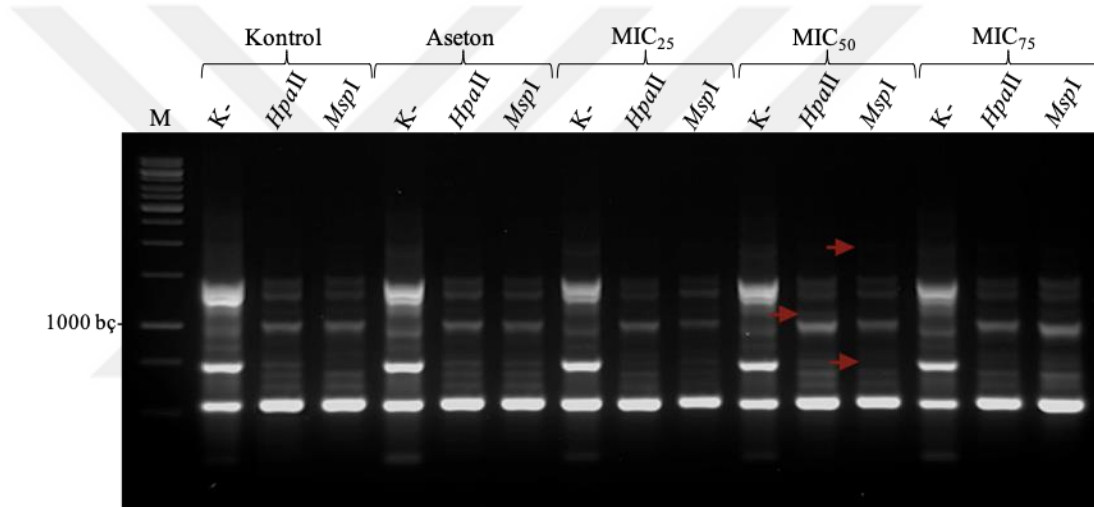
Tür	Suş	Grup	Karbendazim derişim (µg/mL)	% Değer			
				Tip I	Tip II	Tip III	Tip IV
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Kontrol	0	52.995	4.147	5.530	37.327
		MIC ₂₅	0.35	53.363	1.794	6.726	38.117
		MIC ₅₀	0.7	53.535	5.556	5.556	35.354
		MIC ₇₅	1.05	54.378	6.912	2.765	35.945

Karbendazimin farklı konsantrasyonlarının PH-1’de sebep olduğu yarı metilasyon yüzdeleri MIC₂₅ için 4, MIC₅₀ için 11, MIC₇₅ için 15 bant profili dikkate alınarak Denklem 3.5’e; tam metilasyon yüzdeleri ise MIC₂₅ için 100, MIC₅₀ için 81, MIC₇₅ için 84 bant profili dikkate alınarak Denklem 3.6’ya göre hesaplandı. En yüksek ve en düşük değerler sırasıyla tam metilasyon için MIC₂₅ ve MIC₇₅, yarı metilasyon için MIC₇₅ ve MIC₂₅ dozlarında belirlendi (Tablo 4.9). Karbendazimin PH-1’in restriksiyon bölgelerindeki metillenmeyi kontrole göre arttırdığı tespit edildi.

Tablo 4.9: Karbendazimin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozu uygulanmış PH-1 ve kontroldeki metilasyon profillerinin yüzde dağılımı.

Tür	Suş	Grup	Karbendazim derişim (µg/mL)	% Metilasyon Profili		
				Genel	Tam	Yarı
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Kontrol	0	47.005	42.857	4.147
		MIC ₂₅	0.35	46.637	44.843	1.794
		MIC ₅₀	0.7	46.465	40.909	5.556
		MIC ₇₅	1.05	45.622	38.710	6.912

Karbendazimin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozları uygulanan *F. culmorum* FcUK99 referans suşunun gDNA'sının CRED-RA analizlerinden toplam 194 çoğaltım ürünü elde edildi. OPA-01 primerinden (Şekil 4.6) en yüksek (31), OPB-06 primerinden en düşük çoğaltım ürünü (8) elde edildi.



Şekil 4.6: Kontrol, %0.420 (v/v) aseton ve karbendazim uygulanmış FcUK99'un OPA-01 primeri ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kB (Thermo Scientific, SM0311, ABD), K-:Kesim yapılmamış, *HpaII*: *HpaII* ile kesim yapılmış, *MspI*: *MspI* ile kesim yapılmış.

Karbendazim uygulamalarının FcUK99'da sebep olduğu % GTS değeri, MIC₅₀ için 9, MIC₇₅ için 1 polimorfik bant dikkate alınarak (MIC₂₅ uygulamasından polimorfik bant çoğaltılmadı) hesaplandığında % GTS değerinin en düşük (%95.743) olduğu doz MIC₅₀ olarak belirlendi. Polimorfizm hesaplamalarında *HpaII* kesim ürünlerinde MIC₂₅ için 10, MIC₅₀ için 18, MIC₇₅ için 17 ile *MspI* kesim ürünlerinde MIC₂₅ için 9, MIC₅₀ için 10, MIC₇₅ için 23 polimorfik bant değerlendirildi. *HpaII* ve *MspI* kesimlerinde en yüksek polimorfizm değerlerine sırasıyla MIC₅₀ (%29.032) ve MIC₇₅ (%38.983) doz uygulamaları neden oldu. Karbendazimin FcUK99'da sebep olduğu % GTS değerleri ile *HpaII* ve *MspI* kesim profillerinin analizinden elde edilen % polimorfizm değerleri Tablo 4.10'da verildi.

Tablo 4.10: Karbendazimin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozlarının *FcUK99*'da neden olduğu GTS ve polimorfizmin % değerleri.

Tür	Suş	Doz	Derişim (µg/mL)	%GTS	% Polimorfizm	
					<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>
<i>F. culmorum</i>	<i>FcUK99</i>	MIC ₂₅	0.3	95.283	27.174	26.966
		MIC ₅₀	0.6	95.283	23.913	20.224
		MIC ₇₅	0.9	97.169	30.435	21.348

Skorlama profiline göre belirlenen metilasyon tiplerinin, karbendazimin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozu uygulanmış *FcUK99* ve kontroldeki yüzde dağılım değerleri Tablo 4.11'de verildi. *FcUK99*'da kontrole göre tip I, -III ve -IV metilasyon oranında en çok değişime karbendazimin MIC₂₅ dozu, tip II'de ise MIC₇₅ dozu etkili oldu. Kontrole göre karbendazimin MIC₂₅ dozu *FcUK99* genomunda tip II, -III ve -IV metilasyon değerlerini artırırken tip I değerini azalttı. MIC₅₀ dozu tip II ve -III metilasyon değerini artırırken tip I ve -IV değerini azalttı. MIC₇₅ dozu ise tip II metilasyon değerinde artışa diğer üç tip metilasyon değerlerinde azalmaya neden oldu.

Tablo 4.11: Karbendazimin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozu uygulanmış *FcUK99* ve kontroldeki metilasyon tiplerinin yüzde dağılımı.

Tür	Suş	Grup	Karbendazim derişim (µg/mL)	% Değer			
				Tip I	Tip II	Tip III	Tip IV
<i>F. culmorum</i>	<i>FcUK99</i>	Kontrol	0	63.006	1.156	2.890	32.948
		MIC ₂₅	0.35	59.669	1.657	4.972	33.702
		MIC ₅₀	0.7	61.963	2.454	3.067	32.515
		MIC ₇₅	1.05	60.452	5.085	2.260	32.203

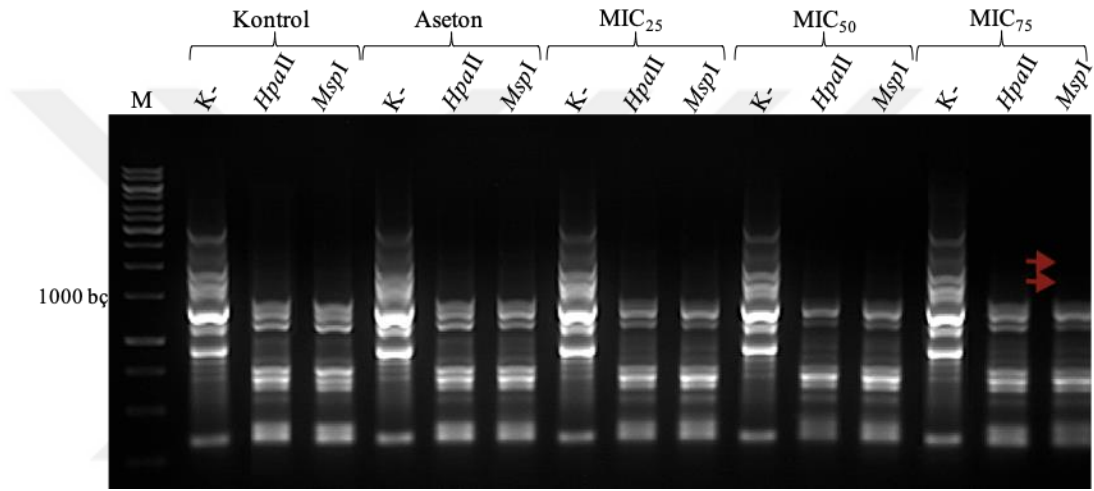
Karbendazimin *FcUK99*'da sebep olduğu yarı metilasyon yüzdeleri MIC₂₅ için 3, MIC₅₀ için 4, MIC₇₅ için 9 bant profili; tam metilasyon yüzdeleri ise MIC₂₅ için 70, MIC₅₀ için 58, MIC₇₅ için 61 bant profili dikkate alınarak hesaplandığında en yüksek ve en düşük değerler sırasıyla tam metilasyon için MIC₂₅ ve MIC₇₅, yarı metilasyon için MIC₇₅ ve MIC₂₅ dozlarında belirlendi (Tablo 4.12). Karbendazim *FcUK99* genomunda hedef restriksiyon bölgelerinde metillenmeyi kontrole göre arttırdı.

Tablo 4.12: Karbendazimin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozu uygulanmış *FcUK99* ve kontroldeki metilasyon profillerinin yüzde dağılımı.

Tür	Suş	Grup	Karbendazim derişim (µg/mL)	% Metilasyon Profili		
				Genel	Tam	Yarı
<i>F. culmorum</i>	<i>FcUK99</i>	Kontrol	0	36.994	35.838	1.156
		MIC ₂₅	0.35	40.331	38.674	1.657
		MIC ₅₀	0.7	38.037	35.583	2.454
		MIC ₇₅	1.05	39.548	34.463	5.085

4.3.3 Fludioksonilin Neden Olduğu Genomik Dizi Kararsızlığı ve Polimorfizm Bulguları

Fludioksonilin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozları uygulanan *F. graminearum* PH-1 referans suşunun gDNA'sının CRED-RA analizlerinden toplam 209 çoğaltım ürünü elde edildi. Şekil 4.3'te OPA-04 primerinin kullanıldığı PZR'den elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü paylaşıldı. En yüksek bant sayısı (30) OPA-01 primerinin, en az bant sayısı (14) OPA-05 primerinin kullanıldığı çoğaltım reaksiyonundan tespit edildi.



Şekil 4.7: Kontrol, %0.006 (v/v) aseton ve fludioksonil uygulanmış PH-1'in OPA-04 primeri ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kB (Thermo Scientific, SM0311, ABD), K-:Kesim yapılmamış, *HpaII*: *HpaII* ile kesim yapılmış, *MspI*: *MspI* ile kesim yapılmış.

Fludioksonil uygulamalarının PH-1'de sebep olduğu % GTS değeri, MIC₂₅ için 5, MIC₅₀ için 6, MIC₇₅ için 22 polimorfik bant dikkate alınarak hesaplandı. % polimorfizm hesaplamalarında *HpaII* kesim ürünlerinden MIC₂₅ için 10, MIC₅₀ için 9, MIC₇₅ için 11 ve *MspI* kesim ürünlerinden MIC₂₅ ve MIC₅₀ için 8, MIC₇₅ için 13 polimorfik bant değerlendirildi. % GTS değerinin en düşük olduğu (%79.629) ve her iki enzim kesiminden elde edilen % polimorfizm değerlerinin en yüksek olduğu (%15.714-16.250) dozun MIC₇₅ olduğu tespit edildi. Antifungal ajanın farklı konsantrasyonlarının PH-1'de sebep olduğu % GTS değerleri ile *HpaII* ve *MspI* kesim profillerinin analizinden elde edilen % polimorfizm değerleri Tablo 4.13'te verildi.

Tablo 4.13: Fludioksonilin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozlarının PH-1’de neden olduğu GTS ve polimorfizmin % değerleri.

Tür	Suş	Doz	Derişim (µg/mL)	%GTS	% Polimorfizm	
					<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>
<i>F. graminearum</i>	PH-1	MIC ₂₅	0.112	95.370	14.286	10
		MIC ₅₀	0.225	94.444	12.587	10
		MIC ₇₅	0.337	79.629	15.714	16.250

Skorlama profiline göre belirlenen metilasyon tiplerinin, fludioksonilin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozu uygulanmış PH-1 ve kontroldeki yüzde dağılımı Tablo 4.14’te verildi. PH-1’de kontrole göre tip I, ve -IV metilasyon oranında en çok değişime fludioksonilin MIC₇₅ dozu, tip II’de MIC₂₅, tip III’de MIC₅₀ dozu etkili oldu. Kontrole göre fludioksonilin MIC₂₅ dozu PH-1 genomunda tip I, -III ve -IV metilasyon değerlerini arttırırken tip II değerini azalttı; MIC₅₀ dozu tip I ve -II metilasyon değerini arttırırken tip III ve -IV değerini azalttı; MIC₇₅ dozu ise tip II, -III ile -IV metilasyon değerinde artışa, tip I değerlerinde azalmaya neden oldu.

Tablo 4.14: Fludioksonilin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozu PH-1 ve kontroldeki metilasyon tiplerinin yüzde dağılımı.

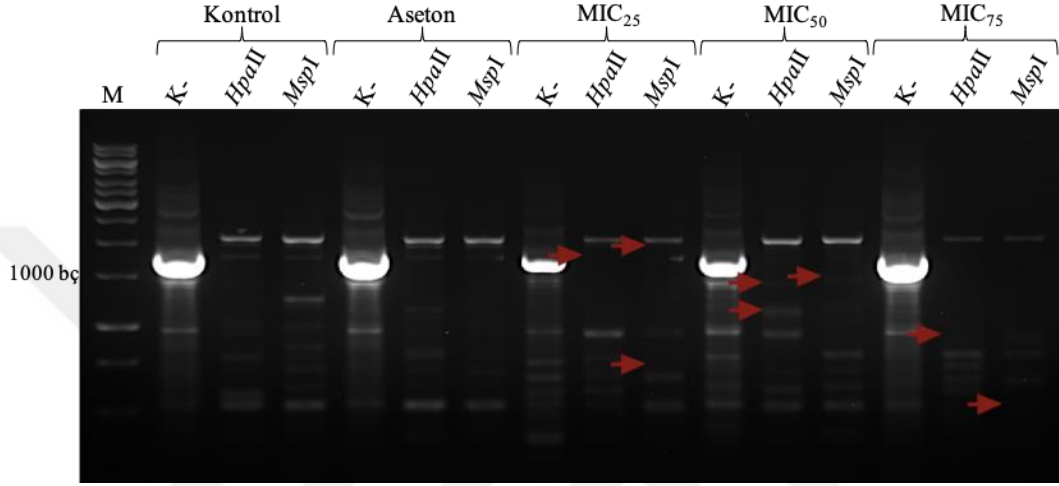
Tür	Suş	Grup	Fludioksonil derişim (µg/mL)	% Değer			
				Tip I	Tip II	Tip III	Tip IV
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Kontrol	0	54.000	11.000	6.000	29.000
		MIC ₂₅	0.112	55.851	7.979	6.383	29.787
		MIC ₅₀	0.225	55.615	12.299	3.209	28.877
		MIC ₇₅	0.337	50.286	12.571	6.286	30.857

Fludioksonilin farklı konsantrasyonlarının PH-1’de sebep olduğu yarı metilasyon yüzdeleri MIC₂₅ için 15, MIC₅₀ için 23, MIC₇₅ için 22 bant profili dikkate alınarak Denklem 3.5’e; tam metilasyon ise MIC₂₅ için 78, MIC₅₀ için 60, MIC₇₅ için 65 bant profili dikkate alınarak Denklem 3.6’ya göre hesaplandı. En yüksek ve en düşük değerler tam metilasyon için sırasıyla MIC₇₅ ve MIC₅₀, yarı metilasyon için MIC₇₅ ve MIC₂₅ dozlarında belirlendi (Tablo 4.15). Fludioksonilin MIC₇₅ dozu PH-1’in restriksiyon bölgelerindeki metillenmeyi kontrole göre arttırırken, MIC₂₅ ve MIC₅₀ dozunun ise azalttığı belirlendi.

Tablo 4.15: Fludioksonilin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozu PH-1 ve kontroldeki metilasyon profillerinin yüzde dağılımı.

Tür	Suş	Grup	Fludioksonil derişim (µg/mL)	%Metilasyon Profili		
				Genel	Tam	Yarı
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Kontrol	0	46.000	35.000	11.000
		MIC ₂₅	0.112	44.149	36.170	7.979
		MIC ₅₀	0.225	44.385	32.086	12.299
		MIC ₇₅	0.337	49.714	37.143	12.571

Fludioksonilin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozları uygulanan *F. culmorum* FcUK99 referans suşunun gDNA'sının CRED-RA analizlerinden toplam 241 çoğaltım ürünü elde edildi, OPB-07 primeri ile çoğaltımı sonucu elde edilen bant profili Şekil 4.8'de verildi. En yüksek bant sayısı (28) OPA-04 primerinin kullanıldığı, en az bant sayısı (19) ise OPB-06 primerinin kullanıldığı PZR analizinde tespit edildi.



Şekil 4.8: Kontrol, %0.006 (v/v) aseton ve fludioksonil uygulanmış *FcUK99*'un OPA-07 primeri ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kbp (Thermo Scientific, SM0311, ABD), K-: Kesim yapılmamış, *HpaII*: *HpaII* ile kesim yapılmış, *MspI*: *MspI* ile kesim yapılmış.

Fludioksonilin uygulamalarının *FcUK99*'da sebep olduğu % GTS değeri, MIC₂₅ için 26, MIC₅₀ için 13, MIC₇₅ için 11 polimorfik bant dikkate alınarak hesaplandı. % GTS değerinin en düşük olduğu (%75.925) doz MIC₂₅ olarak belirlendi. % polimorfizm hesaplamalarında *HpaII* kesim ürünlerinden MIC₂₅ için 20, MIC₅₀ için 21, MIC₇₅ için 40 ve *MspI* kesim ürünlerinden MIC₂₅ için 23, MIC₅₀ için 25, MIC₇₅ için 40 polimorfik bant değerlendirildi. % polimorfizmin en yüksek olduğu (%43.956) doz MIC₇₅ olarak tespit edildi. Antifungal ajanın farklı konsantrasyonlarının *FcUK99*'da sebep olduğu % GTS değerleri ile *HpaII* ve *MspI* kesim profillerinin analizinden elde edilen % polimorfizm değerleri Tablo 4.16'da verildi.

Tablo 4.16: Fludioksonilin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozlarının *FcUK99*'da neden olduğu GTS ve polimorfizmin % değerleri.

Tür	Suş	Doz	Derişim (µg/mL)	%GTS	% Polimorfizm	
					<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>
<i>F. culmorum</i>	<i>FcUK99</i>	MIC ₂₅	0.112	75.925	21.978	25.275
		MIC ₅₀	0.225	87.963	23.077	27.472
		MIC ₇₅	0.337	89.915	43.956	43.956

Skorlama profiline göre belirlenen metilasyon tiplerinin, fludioksonilin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozu uygulanmış *FcUK99* ve kontroldeki yüzde dağılımı Tablo 4.17’de verildi. *FcUK99*’da kontrole göre tip I metilasyon oranında en çok değişime fludioksonilin MIC₇₅ dozu, tip II’de MIC₂₅, tip III ve -IV’de MIC₅₀ dozu etkili oldu. Kontrole göre fludioksonilin MIC₂₅ dozu *FcUK99* genomunda tip III ve -IV metilasyon değerlerini arttırırken tip I ve -II değerini azalttı; MIC₅₀ dozu tip I ile -IV metilasyonun değerini arttırırken tip II ile -III değerini azalttı; MIC₇₅ dozu ise tip I metilasyon değerinde artış ile tiplere ait değerlerde azalmaya neden oldu.

Tablo 4.17: Fludioksonilin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozu uygulanmış *FcUK99* ve kontroldeki metilasyon tiplerinin yüzde dağılımı.

Tür	Suş	Grup	Fludioksonil derişim (µg/mL)	% Değer			
				Tip I	Tip II	Tip III	Tip IV
<i>F. culmorum</i>	<i>FcUK99</i>	Kontrol	0	51.923	4.327	4.808	38.942
		MIC ₂₅	0.112	49.754	2.956	7.389	39.901
		MIC ₅₀	0.225	52.475	3.960	1.485	42.079
		MIC ₇₅	0.337	56.085	4.233	3.704	35.979

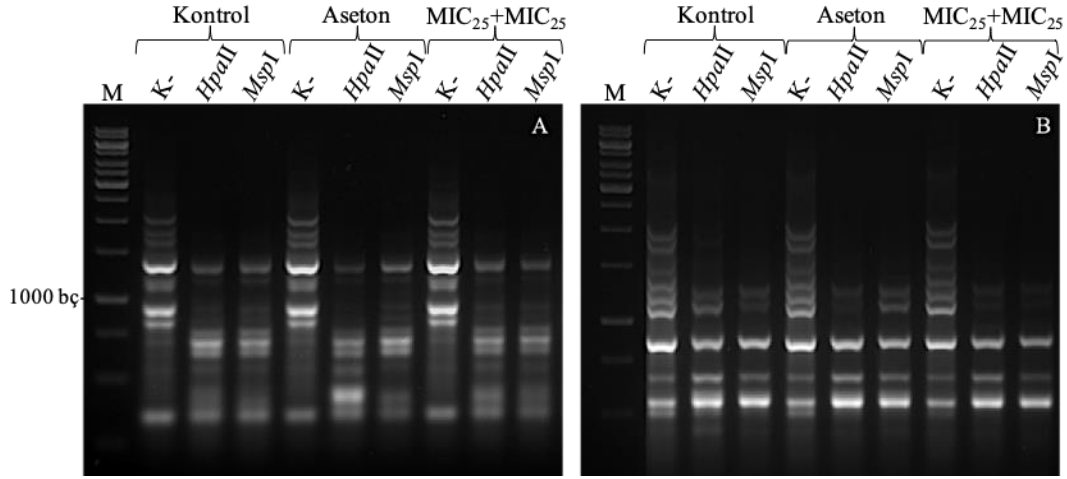
Fludioksonilin farklı konsantrasyonlarının *FcUK99*’da sebep olduğu yarı metilasyon yüzdeleri MIC₂₅ için 6, MIC₅₀ ve MIC₇₅ için 8 bant profili; tam metilasyon yüzdeleri ise MIC₂₅ için 96, MIC₅₀ için 88, MIC₇₅ için 75 bant profili dikkate alınarak hesaplandı. En yüksek ve en düşük değerler tam metilasyon için sırasıyla MIC₂₅ ve MIC₇₅, yarı metilasyon için MIC₇₅ ve MIC₂₅ dozlarında belirlendi (Tablo 4.18). Fludioksonilin MIC₂₅ dozu *FcUK99*’un restriksiyon bölgelerindeki metillenmeyi kontrole göre arttırırken, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozları azalttı.

Tablo 4.18: Fludioksonilin MIC₂₅, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozu uygulanmış *FcUK99* ve kontroldeki metilasyon profillerinin yüzde dağılımı.

Tür	Suş	Grup	Fludioksonil derişim (µg/mL)	%Metilasyon Profili		
				Genel	Tam	Yarı
<i>F. culmorum</i>	<i>FcUK99</i>	Kontrol	0	48.077	43.750	4.327
		MIC ₂₅	0.112	50.246	47.291	2.956
		MIC ₅₀	0.225	47.525	43.564	3.960
		MIC ₇₅	0.337	43.915	39.683	4.233

4.3.4 Tebukonazol ile Karbendazimin İkili Uygulamasının Neden Olduğu Genomik Dizi Kararsızlığı ve Polimorfizm Bulguları

Tebukonazol ve karbendazim bileşiklerinin MIC₂₅ dozlarının kombine uygulandığı PH-1 referansının CRED-RA analizinden toplamda 229, *FcUK99* referansından 207 çoğaltım ürünü elde edildi. PH-1’in OPA-07 primeri ile *FcUK99*’un OPB-07 primeri ile çoğaltımı sonucu elde edilen bant profilleri Şekil 4.8’de verildi. En yüksek bant sayısı (36) OPA-07 primeri en az bant sayısı (11) ise OPB-06 primeri kullanılarak çoğaltılan ürünlerinde gözlemlendi.



Şekil 4.9: A) Kontrol, %0.148 (v/v) aseton ve tebukonazol+karbendazim uygulanmış PH-1'in OPA-07 primeri kullanılarak; B) Kontrol, %0.146 (v/v) aseton ve tebukonazol+karbendazim uygulanmış FcUK99'un OPB-07 primeri ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1000 bp (Thermo Scientific, SM0311, ABD), K-: Kesim yapılmamış, HpaII: HpaII ile kesim yapılmış, MspI: MspI ile kesim yapılmış.

PH-1 genomunun restriksiyon polimorfizmi % değeri *HpaII* ve *MspI* kesim ürünlerinden sırasıyla 29 ve 10 polimorfik bant, % GTS değeri 4 polimorfik bant değerlendirilerek hesaplandı. *FcUK99* genomu için *HpaII* ve *MspI* kesim ürünlerinden sırasıyla 27 ve 23, % GTS değeri için de 3 farklı bant profili değerlendirildi. İkili uygulamanın *F. graminearum*'da genomik dizi kararlılığını azaltırken, *F. culmorum*'da % polimorfizmi arttırdığı tespit edildi (Tablo 4.19).

Tablo 4.19: Tebukonazol+karbendazim uygulamasının ($MIC_{25}+MIC_{25}$) PH-1 ve *FcUK99*'da neden olduğu neden olduğu GTS ve polimorfizmin % değerleri.

Tür	Suş	Doz	Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	%GTS	% Polimorfizm	
					<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>
<i>F. graminearum</i>	PH-1	$MIC_{25}+MIC_{25}$	0.437;0.35	96.491	32.584	10.752
<i>F. culmorum</i>	<i>FcUK99</i>		0.3;0.35	97.247	34.615	30.666

Skorlama profiline göre belirlenen metilasyon tiplerinin, tebukonazol+karbendazim uygulamasının her iki referans suşta ve kontrollerindeki yüzde dağılım değerleri Tablo 4.20'de verildi. PH-1'de tebukonazol+karbendazim uygulaması kontrole göre en çok tip II, *FcUK99*'da ise tip III metilasyon oranında değişime neden oldu. Tebukonazol+karbendazim uygulaması kontrole göre PH-1 genomunda tip I, -III ve -IV metilasyon değerlerini arttırırken tip II değerini azalttı; *FcUK99* genomunda ise tip I ile -IV metilasyon değerinde artış, tip II ile -III değerinde azalmaya neden oldu.

Tablo 4.20: Tebukonazol+karbendazim uygulanmış PH-1 ve *FcUK99* ile kontrollerindeki metilasyon tiplerinin yüzde dağılımı.

Tür	Suş	Grup	Tebukonazol+Karbendazim derişim (µg/mL)	% Değer			
				Tip I	Tip II	Tip III	Tip IV
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Kontrol	0	53.023	5.581	3.721	37.674
		MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.437;0.35	53.555	2.370	3.791	40.284
<i>F. culmorum</i>	<i>FcUK99</i>	Kontrol	0	54.229	6.965	8.458	30.348
		MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.3;0.35	59.016	2.186	2.732	36.066

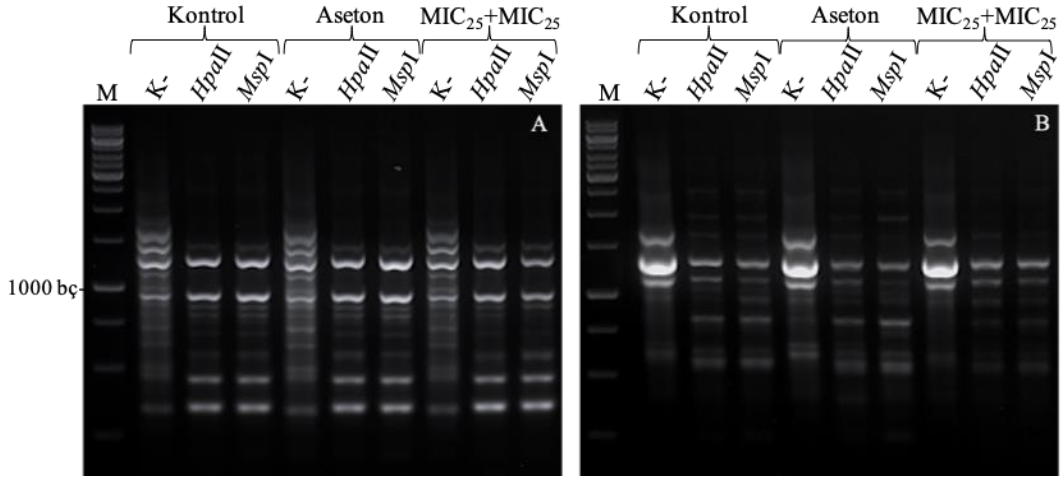
İkili doz uygulamasının PH-1 ve *FcUk99*'da sebep olduğu yarı metilasyon yüzdeleri PH-1 için 5, *FcUK99* için 4 bant profili dikkate alınarak Denklem 3.5'e; tam metilasyon yüzdeleri ise PH-1 için 93, *FcUK99* 71 bant profili dikkate alınarak Denklem 3.6'ya göre hesaplandı (Tablo 4.21). Tebukonazol+karbendazimin MIC₂₅ doz kombinasyonunun restriksiyon bölgelerindeki metillenmeyi kontrole göre PH-1'de arttırırken, *FcUk99*'da azalttığı ortaya kondu.

Tablo 4.21: Tebukonazol+karbendazim uygulanmış PH-1, *FcUK99* ve kontrollerindeki metilasyon profillerinin yüzde dağılımı.

Tür	Suş	Grup	Tebukonazol+Karbendazim derişim (µg/mL)	%Metilasyon Profili		
				Genel	Tam	Yarı
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Kontrol	0	46.977	41.395	5.581
		MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.437;0.35	46.445	44.076	2.370
<i>F. culmorum</i>	<i>FcUK99</i>	Kontrol	0	45.771	38.806	6.965
		MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.3;0.35	40.984	38.798	2.186

4.3.5 Tebukonazol ile Fludioksonilin İkili Uygulamasının Neden Olduğu Genomik Dizi Kararsızlığı ve Restriksiyon Polimorfizmi Bulguları

Tebukonazol ile fludioksonilin MIC₂₅ dozlarının kombine uygulandığı PH-1 referansının CRED-RA analizinden toplam 269 ve *FcUK99* referansından 220 çoğaltım ürünü elde edildi, PH-1'in OPA-03 primeri ile çoğaltımı sonucu elde edilen bant profili ve *FcUK99*'un OPB-07 primeri ile çoğaltımı sonucu elde edilen bant profili Şekil 4.10'da verildi. En yüksek bant sayısı (32) OPA-07 primerinin en az bant sayısı (13) ise OPA-08 primerinin kullanıldığı PZR analizlerinden tespit edildi.



Şekil 4.10: A) Kontrol, %0.011 (v/v) aseton ve tebukonazol+fludioksonil uygulanmış PH-1'in OPA-03 primeri kullanılarak; B) Kontrol, %0.008 (v/v) aseton ve tebukonazol+karbendazim uygulanmış *FcUK99*'un OPB-07 primeri ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kB (Thermo Scientific, SM0311, ABD), K-: Kesim yapılmamış, *HpaII*: *HpaII* ile kesim yapılmış, *MspI*: *MspI* ile kesim yapılmış.

PH-1 genomunun *HpaII* ve *MspI* kesim reaksiyonlarından 16 polimorfik bant elde edildi. Aktif bileşenlerin MIC₂₅ dozlarının kombine uygulandığı ancak enzim kesimine maruz bırakılmayan PH-1 gDNA'sının bantlama profili ile kontrolün bantlama profili arasında fark bulunmadığı için % GTS değeri 100 olarak belirlendi. *FcUK99* gDNA'sının hem *HpaII* hem de *MspI* kesim ürünlerinden 6, % GTS değeri hesabında da 2 polimorfik bant değerlendirildi. Tebukonazol+fludioksonilin MIC₂₅ dozlarının ikili uygulaması *F. culmorum*'da genomik dizi kararlılığını azaltırken, *F. graminearum*'da % polimorfizm değerini arttırdığı tespit edildi (4.22).

Tablo 4.22: Tebukonazol+fludioksonil uygulamasının (MIC₂₅+MIC₂₅) PH-1 ve *FcUK99*'da neden olduğu neden olduğu GTS ve polimorfizmin % değerleri.

Tür	Suş	Doz	Derişim (µg/mL)	%GTS	% Polimorfizm	
					<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>
<i>F. graminearum</i>	PH-1	MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.437;0.112	100	12.903	13.008
<i>F. culmorum</i>	<i>FcUK99</i>		0.3;0.112	98.387	6.451	6.521

Skorlama profiline göre belirlenen metilasyon tiplerinin, tebukonazol+fludioksonil uygulamasının her iki referans suşta ve kontrollerindeki yüzde dağılımı Tablo 4.23'te verildi. PH-1'de tebukonazol+fludioksonil uygulaması kontrole göre en çok tip II, *FcUK99*'da ise tip I metilasyon oranında değişime neden oldu. Kontrollere göre tebukonazol+fludioksonil uygulaması PH-1 genomunda tip I ve -II metilasyon değerlerini arttırırken tip III ve -IV değerini

azalttı; *FcUK99* genomunda ise tip I metilasyonun değerinde artış, tip II, -III ve -IV değerlerinde azalmaya neden oldu.

Tablo 4.23: Tebukonazol+fludioksonil uygulanmış PH-1, *FcUK99* ve kontrollerindeki metilasyon tiplerinin yüzde dağılımı.

Tür	Suş	Grup	Tebukonazol+Fludioksonil derişim (µg/mL)	% Değer			
				Tip I	Tip II	Tip III	Tip IV
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Kontrol	0	51.341	1.149	1.533	45.977
		MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.437;0.112	52.344	4.297	1.172	42.188
<i>F. culmorum</i>	<i>FcUK99</i>	Kontrol	0	56.364	1.364	1.818	40.455
		MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.3;0.112	57.277	0.939	1.408	40.376

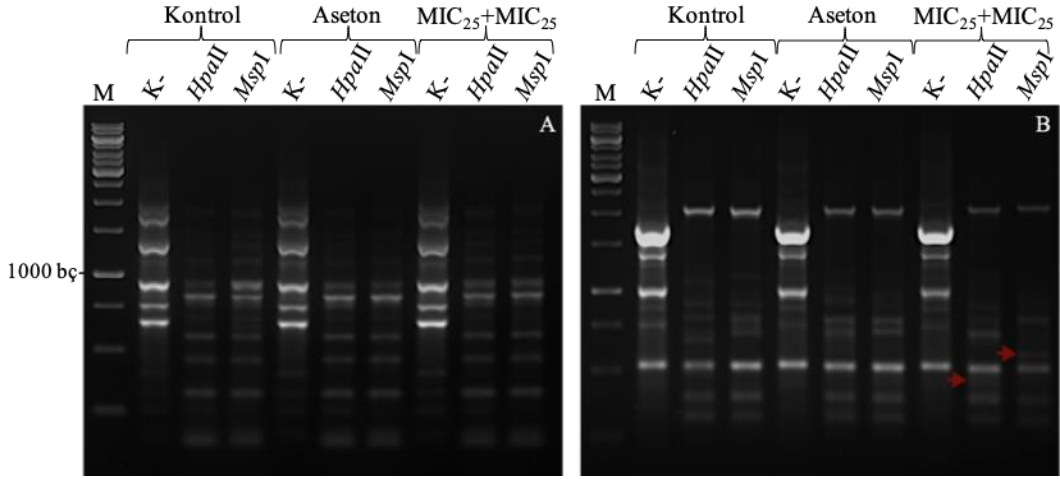
İkili doz uygulamasının PH-1 ve *FcUK99*'da sebep olduğu yarı metilasyon yüzdeleri PH-1 için 11, *FcUK99* için 2 bant profili dikkate alınarak Denklem 3.5'e; tam metilasyon yüzdeleri ise PH-1 için 111, *FcUK99* 89 bant profili dikkate alınarak Denklem 3.6'ya göre hesaplandı (Tablo 4.24). Tebukonazol+fludioksonilin ikili uygulamasının her iki referans suşun genomunda da restriksiyon kesim bölgelerinde metillenmeyi kontrole göre azalttığı ortaya kondu.

Tablo 4.24: Tebukonazol+fludioksonil uygulanmış PH-1 ve *FcUK99* ile kontrollerindeki metilasyon profillerinin yüzde dağılımı.

Tür	Suş	Grup	Tebukonazol+Fludioksonil derişim (µg/mL)	%Metilasyon Profili		
				Genel	Tam	Yarı
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Kontrol	0	48.659	47.510	1.149
		MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.437;0.112	47.656	43.359	4.297
<i>F. culmorum</i>	<i>FcUK99</i>	Kontrol	0	43.636	42.273	1.364
		MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.3;0.112	42.723	41.784	0.939

4.3.6 Karbendazim ile Fludioksonilin İkili Uygulamasının Neden Olduğu Genomik Dizi Kararsızlığı ve Restriksiyon Polimorfizmi Bulguları

Karbendazim ile fludioksonilin MIC₂₅ dozlarının kombine uygulandığı PH-1 referansının CRED-RA analizinden 268 ve *FcUK99* referansından 221 çoğaltım ürünü elde edildi. PH-1'in OPA-05 primeri ile çoğaltımı sonucu elde edilen bant profili ve *FcUK99*'un OPA-07 primeri ile çoğaltımı sonucu elde edilen bant profili Şekil 4.11'de verildi. En yüksek bant sayısı (32) OPA-07 primerinin, en az bant sayısı (13) ise OPA-08 primerinin kullanıldığı PZR ile çoğaltıldı.



Şekil 4.11: Kontrol, %0.142 (v/v) aseton ve tebukonazol+fludioksonil uygulanmış A) PH-1'in OPA-05 primeri kullanılarak; B) *FcUK99*'un OPA-07 primeri ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1000 bp (Thermo Scientific, SM0311, ABD), K-: Kesim yapılmamış, *HpaII*: *HpaII* ile kesim yapılmış, *MspI*: *MspI* ile kesim yapılmış.

PH-1 genomunun restriksiyon polimorfizmi % değeri *HpaII* ve *MspI* enzim kesiminden elde edilen sırasıyla 12 ve 14 polimorfik bant, % GTS değeri tek polimorfik bant kullanılarak hesaplandı. *FcUK99* genomu için *HpaII* ve *MspI* kesim reaksiyonundan elde edilen sırasıyla 9 ve 13 farklı bant profili değerlendirildi. Aktif bileşenlerin MIC₂₅ dozlarının kombine uygulandığı ancak enzim kesimi yapılmayan *FcUK99* gDNA'sının bant profili ile kontrolün bantlama profili arasında değişiklik belirlenmedi (% GTS= 100). Karbendazim+fludioksonilin birlikte uygulanması *F. graminearum*'da genomik dizi kararlılığını azalttı, *F. culmorum*'da % polimorfizmi arttırdı (Tablo 4.25).

Tablo 4.25: Karbendazim+fludioksonil uygulamasının (MIC₂₅+MIC₂₅) PH-1 ve *FcUK99*'da neden olduğu neden olduğu GTS ve polimorfizmin % değerleri.

Tür	Suş	Doz	Derişim (µg/mL)	%GTS	% Polimorfizm	
					<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>
<i>F. graminearum</i>	PH-1	MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.35;0.112	99.265	9.836	11.765
<i>F. culmorum</i>	<i>FcUK99</i>		0.35;0.112	100	10.227	15.116

Skorlama profiline göre belirlenen metilasyon tiplerinin, karbendazim+fludioksonil uygulamasının her iki referans suşta ve kontrollerindeki yüzde dağılımı Tablo 4.26'da verildi. Her iki referans suş için karbendazim+fludioksonil uygulaması kontrole göre en çok tip IV metilasyon oranında değişime neden oldu. Kontrollere göre tebukonazol+fludioksonil uygulaması PH-1 ve *FcUK99* genomunda tip I, -II ve -III metilasyon değerlerini arttırırken tip IV değerini azalttı.

Tablo 4.26: Karbendazim+fludioksonil uygulanmış PH-1 ve *FcUK99* ile kontrollerindeki metilasyon tiplerinin yüzde dağılımı.

Tür	Suş	Grup	Karbendazim+Fludioksonil derişim (µg/mL)	% Değer			
				Tip I	Tip II	Tip III	Tip IV
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Kontrol	0	52.107	1.149	2.299	44.444
		MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.35;0.112	52.896	1.544	3.475	42.085
<i>F. culmorum</i>	<i>FcUK99</i>	Kontrol	0	58.333	0.926	1.852	38.889
		MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.35;0.112	59.155	0.939	1.878	38.028

İkili doz uygulamasının neden olduğu yarı metilasyon PH-1 için 4, *FcUK99* için 2 bant profili dikkate alınarak Denklem 3.5'e; tam metilasyon ise PH-1 için 118, *FcUK99* 85 bant profili dikkate alınarak Denklem 3.6'ya göre hesaplandı (Tablo 4.27). Tebukonazol+karbendazim uygulamasının restriksiyon bölgelerindeki metillenmeyi kontrole göre PH-1 ve *FcUk99*'da azalttığı ortaya kondu.

Tablo 4.27: Karbendazim+fludioksonil uygulanmış PH-1, *FcUK99* ve kontrollerindeki metilasyon profillerinin yüzde dağılımı.

Tür	Suş	Grup	Karbendazim+Fludioksonil derişim (µg/mL)	%Metilasyon Profili		
				Genel	Tam	Yarı
<i>F. graminearum</i>	PH-1	Kontrol	0	47.893	46.743	1.149
		MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.35;0.112	47.104	45.560	1.544
<i>F. culmorum</i>	<i>FcUK99</i>	Kontrol	0	41.667	40.741	0.926
		MIC ₂₅ +MIC ₂₅	0.35;0.112	40.845	39.906	0.939

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Fitopatojenik *Fusarium* türleri insan toplumlarının çoğunluğunun temel besin grubunu oluşturan tahıllardan arpa, buğday, mısır ve pirinç başta olmak üzere çeşitli bitki türlerini enfekte ederek farklı hastalıklara yol açmakla kalmaz, enfekte olan bitkileri tüketen insan ve hayvanlarda da önemli sağlık sorunlarına neden olurlar. Çevre koşullarına karşı yüksek toleransa sahip *Fusarium* spp.'de tür içi genetik çeşitliliğin yüksek olması ve farklı *Fusarium* türlerinin aynı hastalığa sebep olabilmesi; bu cinse karşı mücadeleyi zorunlu hale getirmiştir (Parry ve diğ., 1995; Leslie ve diğ., 2006; Walkowiak ve diğ., 2016). Dünyada ve ülkemizde mücadelede en yaygın olarak kullanılan yöntem fungusit kullanımıdır. Günümüzde 200'ün üstünde antifungal ajan ve T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı verileri⁵ 2000'nin üstünde antifungal ajanın çoklu kombinasyonunun ruhsatlı olarak kullanıldığını göstermektedir. *Fusarium* spp. ile mücadelede en çok tercih edilen fungusitlerden üçü tebukonazol, karbendazim ve fludioksonildir (Zhou ve diğ., 2020a; Zhou ve diğ., 2020b; de Chaves, 2022). Ülkemizde tebukonazol ve fludioksonil içeren toplamda 203 ruhsatlı zirai ilaç¹ bulunmaktadır. 01.01.2018 tarihi itibarıyla karbendazim içerikli ilaçların zirai kullanımı sonlandırılrsa⁶ da farklı ülkelerde hala yasal olarak kullanılmaktadır (de Chaves, 2022). TÜBİTAK 1001 projesi (119Z366) kapsamında yaygın olarak kullanılan antifungal ajanlardan tebukonazol, karbendazim ve fludioksonilin *F. graminearum* PH-1 referans suşu ve tarla izolatları ile *F. culmorum* FcUK99 referans suşu ve tarla izolatları üzerindeki etkileri genomik ve transkriptomik düzeyde incelenmiştir. Ülkemizde farklı bölgelerden izole edilen *F. graminearum* ve *F. culmorum* tarla izolatlarında tebukonazole ve karbendazime karşı direncin geliştiği saptanmıştır. Tarım alanlarında tebukonazolün aktif olarak hala kullanılması tekli ve diğer aktif bileşenlerle kombine uygulama dozlarının düzenlenmesi gerekliliğini; karbendazimin ise tekli ya da bu aktif bileşiği içeren diğer ilaçların illegal olarak hala kullanıldığını düşündürmüştür. Sonuç olarak yurdumuzda karbendazimin geçmiş dönemde kullanımına bağlı olarak ortaya çıkmış ve günümüzde devam eden kullanımıyla çıkabilecek etkilerinin tarlaya uygulanan diğer antifungal bileşiklerin etkileri ile birlikte araştırılması oldukça önemlidir. Çeşitli çalışmalarda *F. graminearum* ve *F. culmorum*'un bu iki antifungal ajana karşı direnç geliştirdiğinin farklı araştırmacılar tarafından da bildirilmiş olması sorunun

⁵ <https://bku.tarimorman.gov.tr/BKURuhsat/Index> [Ziyaret tarihi: 10.12.22]

⁶ <https://aydin.tarimorman.gov.tr/Duyuru/205/Carbendazim-Aktif-Madde-Kullaniminin-Sonlandirilmesi> [Ziyaret tarihi: 10.12.22]

sadece yurdumuz için değil global öneme sahip olduğunu göstermesi bakımından önemlidir (Paul ve diğ., 2019, Zhou ve diğ., 2020a; Zhou ve diğ., 2020b).

TÜBİTAK destekli proje kapsamında gerçekleştirilen yüksek lisans tezinde tebukonazol, karbendazim, fludioksonil ve bu aktif bileşenlerin ikili uygulamalarının *F. graminearum* ve *F. culmorum* referans suşlarında yol açtığı restriksiyon bölgelerindeki DNA metilasyonu değişimleri ile birlikte iki türün genomik kararsızlığına olan etkisi araştırılmıştır. Tez çalışmasındaki uyguma dozları PH-1 ve FcUK99 referans suşlarında proje kapsamında belirlenmiştir. Fludioksonil suda az çözünen, tebukonazol ile karbendazim ise suda çözünen bileşiklerdir (Wypych ve Wypych, 2015). Bu nedenle üç aktif bileşik için en uygun ortak çözücü olarak seçilen asetonun uygulamalarda kullanılacak olan konsantrasyonları 1001 projesi kapsamında çözünen her bir aktif bileşiğe göre hesaplanmıştır. Çözücünün olası etkileri ise, aktif bileşenlerin çözdürülmesinde kullanılan en yüksek aseton konsantrasyonlarını içerecek şekilde oluşturulan normalizasyon gruplarında değerlendirilmiştir. Tez çalışmasında kontrol-IC₇₅⁷ ile aseton-IC₇₅⁸ ve kontrol-IC₂₅+IC₂₅⁹ ile aseton-IC₂₅+IC₂₅¹⁰ grupları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p < 0.05$) bulunmadığından, tüm analizler için deney grupları kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır.

Genomda meydana gelen mutasyonlar ve epigenetik değişimler organizmalarda genomik kararsızlığa yol açmaktadır (Broaddus ve diğ., 2021). Gazdağlı ve diğ. (2018) kamforun *F. graminearum* ve *F. culmorum*'da epigenetik değişimlerden DNA metilasyonunu teşvik ederek genetik kararsızlığa yol açtığını göstermişlerdir. Tez çalışması kapsamında seçilen üç antifungal ajanın bu iki türün referans suşlarında yol açtığı genetik kararsızlık da benzer şekilde taranmış, bileşiklerin neden oldukları DNA metilasyonu CRED-RA yöntemi ile taranmıştır. Bu yaklaşımda gDNA'ların restriksiyon endonükleazları kesimi ile elde edilen DNA fragmentleri ile kesim yapılmamış gDNA'lar PZR ile çoğaltılmıştır. Standart çoğaltım için tasarlanan primer (~20-mer oligonükleotid) çiftlerine göre çok daha kısa olan GC içeriği %50'nin üzerinde olan primerlerin (10-mer oligonükleotid) kullanıldığı PZR'de, tek primerin daha düşük sıcaklık derecelerinde (<50°C) genomda birden fazla rastgele bölgelere bağlanma olanağı sağlandığından, çok sayıda ve dinamik bantlama profili elde edilebilmektedir (Sahin ve diğ., 2014). Analiz, gözlenen bir çoğaltım ürününün diğer örneklerdeki varlığı ve/veya yokluğunun

⁷ MIC₇₅ dozu uygulanmış örnek sonuçlarının, madde uygulanmamış kontrol'e göre değerlendirilmesi.

⁸ MIC₇₅ dozu uygulanmış örnek sonuçlarının, ilgili aseton konsantrasyonu uygulanmış normalizasyon grubuna göre değerlendirilmesi.

⁹ İkili antifungal ajan uygulanmış örnek sonuçlarının, madde uygulanmamış kontrol'e göre değerlendirilmesi.

¹⁰ İkili antifungal ajan uygulanmış örnek sonuçlarının, ilgili aseton konsantrasyonu uygulanmış normalizasyon grubuna göre değerlendirilmesi.

değerlendirildiği skorlama yaklaşımıyla gerçekleştirilmektedir. Aynı boyutta olup çok düşük miktarda olduğundan silik gözlenen DNA fragmentlerinin analizde skorlamaya alınması polimorfik bantların daha hassas analizini sağlarken yöntemin tekrarlanabilirlik özelliğini sınırlamaktadır. Çok sayıda çoğaltım ürünü eldesini sağladığından bu yöntem, mutasyonların belirlenmesine ve DNA polimorfizminin değerlendirilmesine olanak sağladığı ve düşük maliyetli olduğu için tercih edilmektedir (Atienzar ve Jha, 2006). Tez çalışmasında silik gözlenen bantların çoğaltım ürünlerinin skorlamasına dahil edilmesi çalışmanın sınırlılığını oluşturmuştur. Analizlerde kontrol grubuna göre farklılık gösteren bantlar polimorfik bant olarak değerlendirilmiş, restriksiyon kesimi olmaksızın gDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı PZR sonrası oluşan bant profilindeki polimorfik olanlar ile % GTS değeri hesaplanmıştır.

Tebukonazol, karbendazim, fludioksonilin ve bu bileşenlerin ikili uygulamalarına maruz kalan *F. graminearum* referans suşu PH-1'de genomik dizi kararlılığı %79.629-100 oranında korunurken, *F. culmorum* referans suşu FcUK99'un genomik dizi kararlılığı %75.925-100 oranında korunmuştur. Tebukonazol+fludioksonil ikili uygulamasında PH-1'in, karbendazimin MIC₂₅ dozu ile karbendazim+fludioksonil ikili uygulamalarında ise FcUK99'un genomik kararlılığını koruduğu (%100) saptanmıştır. Her iki referans suşta da en yüksek genomik dizi kararsızlığına (100 - % GTS) yol açan madde fludioksonil olmuştur; MIC₇₅ dozu PH-1'de %20.371, MIC₂₅ dozu ise FcUK99'da %24.075 oranında genomik dizi kararsızlığına yol açmıştır. Bu değerler; Yörük (2018) tarafından tetrakonazol uygulanan *F. graminearum*'daki %86.73 genomik dizi kararlılığı ve Teker ve diğ. (2021) tarafından α -thujone uygulanan *F. graminearum*'daki %89.33 genomik dizi kararlılığı değerlerinden daha düşük bulunmuştur. Tezde yüzsek dozda fludioksonil uygulamasının tetrakonazol ve α -tujona göre *F. graminearum*'da daha yüksek genomik dizi kararsızlığına yol açtığı da ortaya konmuştur. Gazdağlı ve diğ. (2018) kamfor etkisine maruz bırakılan *F. graminearum* ve *F. culmorum*'da genomik dizi kararlılığının %66.27-97.60 aralığında korunduğunu göstermişlerdir. Bu değerler, tez çalışmasında tekli kullanılan antifungal ajanların ve bu maddelerin ikili kombinasyonlarının her iki türde de kamfora göre daha düşük oranda genomik dizi kararsızlığına neden olduğunu göstermektedir. Tebukonazol ve karbendazimin tekli uygulama dozlarının PH-1'de FcUK99'a göre daha çok genomik dizi kararsızlığına yol açtığı belirlenmiştir. Tebukonazol, karbendazim ve fludioksonilin her iki tür için tekli uygulama dozlarının neden olduğu genomik dizi kararsızlığı ortalaması %0-15.371 değer aralığında, bu bileşiklerin ikili uygulamalarının neden olduğu genomik dizi kararsızlığı ise %0-3.509 değer aralığında bulunmuştur. Elde edilen bu

veriler iki türde de çalışmada kullanılan bileşiklerin tekli uygulamalarının, ikili uygulamalara göre daha yüksek genomik dizi kararsızlığına yol açtığını göstermiştir.

Antifungal ajan uygulamalarından sonra gerçekleştirilen CRED-RA analizi ile oluşturulan bant profillerinde % polimorfizm değerleri, Harshitha ve Nair (2020)'in de kullandığı, polimorfik bant sayılarının total bant sayılarına oranlanarak elde edilen hesaplama yaklaşımı ile belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan tüm antifungal ajanların ve ikili kombinasyonları; *F. graminearum* (PH-1)'da %9.836-32.580 *HpaII* polimorfizmi ile %10-24.444 *MspI* polimorfizmine, *F. culmorum* (FcUK99)'da %6.451-43.956 *HpaII* polimorfizmi ile %6.521-43.956 *MspI* polimorfizmine neden olmuştur. PH-1 için en düşük *HpaII* polimorfizm değerine karbendazim+fludioksonil maruziyeti, en yüksek değere ise tebukonazol+karbendazim maruziyeti yol açmıştır. En düşük *MspI* polimorfizmi fludioksonilin MIC₂₅ ve MIC₅₀ dozlarından, en yüksek polimorfizm karbendazimin MIC₇₅ dozundan elde edilmiştir. FcUK99'da en düşük *HpaII* ve *MspI* polimorfizm değerleri tebukonazol+fludioksonil ikili uygulaması, en yüksek değer ise fludioksonilin MIC₇₅ doz uygulaması yol açmıştır. Aynı restriksiyon endonükleazları ile çalışan Gazdağlı ve diğ. (2018), kamforun MIC₅₀ dozunun *F. graminearum*'da %55.50 *HpaII* ve %38.50 *MspI* polimorfizmini; *F. culmorum*'da ise %2.86 *HpaII* ve %18.34 *MspI* polimorfizmini bildirmişlerdir. Kamforun MIC₅₀ dozuna göre tez çalışmasında kullanılan antifungallerin ve ikili kombinasyonlarının tüm dozlarının *F. graminearum*'da daha az polimorfizme yol açtığı ortaya konmuştur. α -tujonun MIC₅₀ dozu uygulanmış *F. graminearum* ile yapılan bir başka çalışmada da Yörük (2018) *HpaII* ve *MspI* polimorfizm değerlerini sırasıyla %28.92 ve %36.42 olarak bildirmiştir. α -tujonun MIC₅₀ dozuna göre karbendazimin MIC₅₀ dozu ve karbendazim+tebukonazol uygulamasının daha yüksek *HpaII* polimorfizmine yol açtığı, tüm dozların ise daha az *MspI* polimorfizmine sebep olduğu ortaya konmuştur. Tez çalışması kapsamında tekli antifungal ajan uygulamalarından fludioksonilin her dozu FcUK99'da PH-1'e göre daha fazla polimorfizme yol açmıştır. Antifungal ajanların ikili kombinasyonlarında ise tebukonazol+karbendazim uygulaması her iki suşta da fludioksonilli kombinasyonlara göre daha fazla % polimorfizme sebep olmuştur. Tebukonazol+karbendazim uygulaması ile fludioksonilin MIC₂₅ ve MIC₅₀ doz uygulamaları karşılaştırıldığında ikili uygulama ile iki suşta da daha yüksek polimorfizm oranları elde edilmiştir.

Genom boyunca hedef restriksiyon bölgelerindeki metilasyon tipleri; restriksiyon endonükleazları ile elde edilen DNA fragmentlerine ait çoğaltım ürünlerinin oluşturduğu bant profilindeki aynı boyuttaki bantların varlığına göre tanımlanmıştır. *HpaII* ve *MspI* endonükleazlarının kesim profilleri çift zincirli DNA'nın her iki zincirindeki veya tek ipliğindeki hedef bölge metilasyon tipini belirlemeye olanak sağlamaktadır (McClelland ve diğ., 1994; Reyna-López ve diğ., 1997). Bu enzimlerin hedef aldığı CpCpGpG bölgelerindeki C'lerin metillenmemiş formları tip I, DNA tek zincirinin C'lerinde metillenmiş formu tip II, sadece içteki C'nin her iki zincirde de metillenmiş formu tip III ve çift zincirin her iki dış C'inde gözlenen formu tip IV metilasyon olarak değerlendirilir (Zhao ve diğ., 2015). DNA'nın hedef bölgelerdeki çift zincirde gerçekleşen metilasyon, tam metilasyon; tek zincirinde gerçekleşen ise yarı metilasyon olarak adlandırılmaktadır (Karan ve diğ., 2020). Tez çalışması kapsamında yapılan analizlerde *F. graminearum* ve *F. culmorum*'un genomunda tip IV metilasyon formunun baskın olarak taşındığı gözlemlendi. Elde edilen bulgu aynı *Fusarium* türlerinde tip IV metilasyonunun baskın olduğunu bildiren iki çalışma bulgusu ile uyumlu bulundu (Gazdağlı ve diğ., 2018; Teker ve diğ., 2021). Bu iki çalışmadan farklı olarak, tez kapsamında, *F. graminearum* ve *F. culmorum*'un taşıdığı metilasyon tiplerinin oranları ile birlikte tebukonazol, karbendazim, fludioksonilin ve bu bileşenlerin ikili uygulamalarının sebep olduğu metilasyon tip değişimleri de belirlendi. Tebukonazol, karbendazim, fludioksonil ve ikili uygulamalara ait deney gruplarında kontrole göre; tip II ve tip III metilasyon taşıma oranında tip I ve tip IV'e göre daha fazla değişim olmuştur.

F. graminearum ve *F. culmorum* için kontrole göre en fazla tip I metilasyon oranında artış tebukonazolün MIC₂₅ doz uygulamasında belirlenmiştir. Tip I metilasyonunda en fazla azalma *F. graminearum* için fludioksonilin MIC₇₅, *F. culmorum* için ise karbendazimin MIC₂₅ uygulamasında tespit edilmiştir. Aktif madde uygulamaları ayrı ayrı ele alındığında; tebukonazolün MIC₂₅ dozu her iki suşta da kontrole göre metilasyonu azaltmıştır. Karbendazimin tüm dozlarının PH-1'de metilasyonu azaltırken; *FcUK99*'da restriksiyon bölgelerindeki metillenmeyi arttırdığı belirlenmiştir. Fludioksonilin MIC₅₀ dozu her iki suşta da kontrole göre metilasyonu azaltmıştır. Tüm ikili uygulamaların her iki suşta da tip I metilasyon değerini arttırdığı, yani hedef bölgelerdeki metilasyonu azalttığı bulunmuştur.

F. graminearum için kontrole göre en fazla tip II metilasyon oranında artış karbendazimin MIC₇₅, azalma ise MIC₂₅ doz uygulamasında belirlenmiştir. *F. culmorum*'da kontrole göre en

fazla tip II metilasyon oranı artışı karbendazimin MIC₇₅ dozundan, azalması ise tebukonazolün MIC₇₅ uygulamasından kaynaklanmıştır. Tanıma bölgesindeki C'den metil grubunun ayrılması (bu durumda tip I metilasyonu oranında artış gözlenir) veya aynı bölgedeki karşı zincirde bulunan C'ne yeni bir metil grubu eklenmesi (bu durumda tip IV metilasyonu oranında artış gözlenir) sonucunda tip II metilasyonunun oranında azalmayı açıklamaktadır (McClelland ve diğ., 1994; Karan ve diğ., 2012). Aktif madde uygulamaları ayrı ayrı ele alındığında; tebukonazolün her iki suşta da tip II metilasyon oranında artışa (IC₇₅ dozu uygulanmış *FcUK99* hariç) sebep olmuştur. MIC₇₅ dozu uygulanmış *FcUK99*'un metilasyon profili incelendiğinde; kontrole göre tip II metilasyonu azalırken, tip IV metilasyonunda göreceli olarak değişim (<%0.5) ve tip I'deki artış tebukonazolün bu dozunun *FcUK99*'da DNA metilasyonunu azalttığını ortaya koymuştur. Tebukonazolün her iki suşta da tip III metilasyon oranında artışa, tip IV metilasyon oranında ise azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir. Karbendazimin her iki suşta da tip II metilasyon oranında doza bağlı artışa (IC₂₅ dozu uygulanmış PH-1 hariç) sebep olduğu, bununla birlikte; PH-1'in taşıdığı tip I metilasyon oranını arttırdığı gösterilmiştir. *FcUK99*'da karbendazimin MIC₅₀ ve MIC₇₅ doz uygulamasının sebep olduğu metilasyon profili incelendiğinde; kontrole göre tip II metilasyonu artarken, tip IV metilasyonu göreceli olarak değişmiş (<%0.5), tip I'deki azalma ile DNA metilasyonunun artmış olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu değişimin, madde etkisiyle daha önce bu bölgede var olmayan metilasyondan, yani *de novo* metilasyonun gerçekleşmiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Karbendazim uygulamalarında her iki suşta da tip III'te doza bağlı azalma olduğu ancak kontrol ile kıyaslandığında MIC₇₅ uygulamaları dışında tip III'ü arttırdığı ortaya konmuştur. Fludioksonilin MIC₂₅ dozunun kontrole göre PH-1 genomunda tip II'yi azaltırken tip I ve tip IV'ü arttırdığı, MIC₅₀ ve MIC₇₅ dozlarının ise sadece tip II'yi arttırdığı gözlenmiştir. *FcUK99*'da ise doza bağlı tip II metilasyonunu arttırdığı ancak kontrol ile kıyaslandığında tip II'yi azalttığı bulunmuştur. Bununla birlikte MIC₅₀ uygulamasında kontrole göre meydana gelen tip III azalması tip I ve tip IV'teki artış ile kıyaslandığında çift zincirin iç C'lerinde olan metillenmeye ek dış C'de de metilasyon olduğu sonucunu desteklemektedir. İkili uygulamalardan tebukonazol+karbendazim iki referans suşta da kontrole göre tip II'yi azaltırken tip I'i arttırmıştır. Bu uygulama ile *FcUK99*'un taşıdığı tip II ve tip III metilasyonunun azalma oranı tip I ve tip IV ile karşılaştırılmış; tam metilasyonun korunduğu, yarı metilasyonun azaldığı, buna bağlı olarak da bu uygulamanın tek zincirde gerçekleşen DNA metilasyonunu azalttığı ortaya konmuştur. Bu aktif bileşenlerin tekli uygulamalarından farklı

olarak ikili uygulamasının DNA metilsayonunda azalma ile sonuçlandığı söylenebilir. Fludioksonil'in PH1'deki ikili uygulamalarının neden olduğu metilasyon tiplerindeki değişimler incelendiğinde, tebukonazol+fludioksonil uygulamasının tip II metilasyonun oranını arttırdığı ve tip IV oranını azalttığı tespit edilmiştir. Bu durum tam metilasyonlu çift zincirdeki metillenmiş C'lerden birinde metil grubunun ortadan kalktığı şeklinde yorumlanabilir. Tebukonazol+fludioksonil uygulamasının *FcUK99*'un metilasyon profilinde kontrole göre meydana gelen değişim anlamlı bulunmamıştır (<%1). Karbendazim+fludioksonil ikili uygulamasının kontrole göre tip I, tip II ve tip III'te artışa, tip IV'de ise azalmaya yol açtığı gözlenmiştir. Bu metillenme profilinde, tip III ve tip IV'ün eş zamanlı değişiminde, kesim bölgesindeki her iki zincirde metillenme olması ve her iki C'den dışta olanların metil grubunu kaybetmesi etkili olmaktadır. Fludioksonil'in ikili uygulamaları *FcUK99*'un metilasyon profilinde kontrole göre düşük miktarda (<%1) değişime yol açmıştır. Harshitha ve Nair (2020)'in prednizonun *F. oxysporum* üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmalarında aktif bileşiğin kontrol gruplarına göre tip I ve tip II metilasyon oranlarını arttırdığını, tip III ve tip IV metilasyon oranlarını düşürdüğünü rapor etmişlerdir.

Tini ve diğ. (2021) *F. graminearum*'da gerçekleştirdikleri genomik tarama çalışmasında, DNA metilasyonu tarafından düzenlenen, kodlama yapan ve transkripsiyonu düzenleyen 1024 bölgeyi belirlemişlerdir. DNMT'lerin aktivitesinin artması ile DNA metilasyonunda artış, DNA demetilazların etkisi sonucu DNA metilasyonunda azalma meydana gelmektedir (Steward ve diğ., 2002; He ve diğ., 2020). DNA metilasyonundaki artış, heterokromatin yapısını daha kararlı hale getirerek gen transkripsiyonunu baskılayıcı bir etki gösterebileceği gibi, DNA metilasyonundaki azalma heterokromatin yapısını daha kararsız hale getirerek transkripsiyonel aktiviteyi artırabilir (Rountree ve Selker, 2010). Filamentli mantarlarda yapılan transkriptom ve metilom çalışmaları DNA metilasyonunun ağırlıklı olarak gen anlatımını baskıladığını ortaya koymuştur (Zemach ve diğ., 2010; Mishra ve diğ., 2011; Bewick ve diğ., 2019). Çevre koşullarının değişimi DNA metilasyonu değişimlerine yol açarken aynı zamanda sekonder metabolitlerin üretim profilini de etkilemektedir (Gardiner ve diğ., 2009). Bu durum DNA metilasyonunun sekonder metabolit üretimi ile ilgili gen bölgelerinin anlatımını düzenlemesiyle ilişkilendirilebilir (Zhu ve diğ., 2015; Li ve diğ., 2017). Bonner ve diğ. (2021) DNA metilasyonundaki azalmanın *F. graminearum*'da spor üretimini baskıladığı; trikotesen, fusaoktaksin ve zearalenon üretimi ile ilgili sinyal yollarının aktivesini arttırdığını bildirmiş, patojenin bitkiyi enfekte etme hızı artarken (virülans), üretilen sekonder metabolitlerindeki (15-

ADON) azalmayı DNA metilasyonundaki artış ile ilişkilendirmişlerdir. Ayrıca, DNA metilasyonu artışının *F. graminearum*'da hücre gelişimini ve patojenite seviyesini etkilediğini ortaya koymuşlardır. 119Z366 numaralı TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında tebukonazol, karbendazim, fludioksonilin ve bu maddelerin ikili uygulamalarının PH-1 ve *FcUK99*'da spor oluşumunu engellediği tespit edilmiştir. Spor oluşumunun baskılanmasında antifungal ajanların neden olduğu metilasyon profili değişiminin rol almış olabileceği tez kapsamından elde edilen verilerle desteklenmiştir.

Liu ve diğ. (2010) yaptıkları çalışmada, *F. graminearum*'da tebukonazolün ergosterol biyosentezini ve hücre metabolizmasını düzenleyen genlerin anlatım seviyelerini değiştirdiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde yüksek lisans tez çalışmasında da tebukonazolün MIC₇₅ dozunun PH-1'de neden olduğu metilasyon artışı antifungal ajanın etki mekanizmasındaki gen anlatımı seviye değişimleri ile ilişkili bulunmuştur. Kang ve diğ. (2001) *F. culmorum*'da tebukonazolün, miselyumlarda hücre duvarında bulunan kitin ve β -1,3-glukanın seviyesindeki azalmayı, morfolojik ve sitokimyasal analizler ile göstermişlerdir. Bonner ve diğ. (2021) de DNA metilasyonunun *Fusarium* türlerinde fenotipi etkilediğini bildirmektedir. Tez çalışmasında belirlenen, *FcUK99*'da tebukonazolün MIC₅₀ dozunun sebep olduğu metilasyon oranındaki artış, tebukonazolün antifungal etki mekanizmalarından biri olan hücre metabolizmasını düzenleyen genlerin transkripsiyonunda neden oldukları baskılanmayı destekler niteliktedir.

Yüksek lisans tezi çıktıları ve TÜBİTAK proje çıktıları bir arada değerlendirildiğinde, DNA metilasyonu artışının sonucu olarak; virulansın artabileceği, sekonder metabolitlerin üretiminin baskılanabileceği gen anlatımındaki azalma ile hücre metabolizmasının etkilenebileceği sonucuna ulaşılmıştır. Tebukonazol, karbendazim, fludioksonilin ve bu maddelerin ikili uygulamalarının *F. graminearum* ve *F. culmorum* referans suşlarının üremesini inhibe ettiği, spor üretimini baskıladığı 119Z366 numaralı TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında bildirilmiştir. Kullanılan antifungal ajanların tekli uygulamalarında belirli dozların DNA metilasyonunu arttırdığı ancak ikili uygulamaların her iki suş için de DNA metilasyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan antifungal ajanların çoklu kullanımı *Fusarium* spp. ile mücadelede tercih edilse de referans suşlarda DNA metilasyon seviyesini azaltması bakımından negatif etki oluşturabileceğinden diğer antifungal ajan etkileşimleri için yeni denemelerin yapılarak etkinliklerinin değerlendirilmesi önerilmektedir. Karbendazimin tüm

dozlarının *FcUK99*'da metilasyon seviyesini arttırdığı, PH-1'de ise azalttığı belirlenmiştir. Karbendazimin *F. graminearum*'da mikotoksin üretimini arttırma ihtimalinin de bulunduğu göz önüne alınarak bu fitopatojenle mücadelede kullanılmalıdır. Tebukonazol ve fludioksonilin tekli uygulamalarında; MIC₇₅ dozları PH-1'de DNA metilasyonunda artışı tetiklemiş, *FcUK99*'da tebukonazolün MIC₅₀ ve fludioksonilin MIC₂₅ dozu metilasyon seviyesini arttırmıştır. Söz konusu dozların *Fusarium* spp. ile mücadelede kullanılması durumunda sekonder metabolitlerden mikotoksin üretimini baskılayarak da mücadeleyi destekleyeceği düşünülmektedir.

Gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışması kapsamında yaygın kullanılan antifungal ajanların ve bu maddelerin ikili kombinasyonlarının *F. graminearum* ve *F. culmorum* referans suşlarında yol açtığı restriksiyon bölgelerindeki DNA metilasyonu değişimleri araştırılmış, metilasyon tiplerinin % değişimi değerlendirilmiş ve genomik kararsızlığa olan etkisi ortaya konmuştur. Elde edilen bulgular, antifungal ajanların genomik dizi kararlılığını ve genomdaki metilasyon seviyelerini değiştirerek genomik kararsızlığa yol açtığını göstermiş, değişime sebep olabilecek etkenler tartışılmıştır. Yüksek lisans tez çalışmasından elde edilen çıktılar literatüre katkı sağlayacak; *F. graminearum* ve *F. culmorum*'da genomik kararsızlığın sebep olduğu değişimlerin inceleneceği transkriptomik, proteomik ve diğer ileri düzey yeni projelere temel oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

- Aitman, T. J., Dong, R., Vyse, T. J., Norsworthy, P. J., Johnson, M. D., Smith, J. & Cook, H. T., 2006, Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans, *Nature*, 439(7078), 851-855.
- Atienzar, F. A. & Jha, A. N., 2006, The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 613(2-3), 76-102.
- Audenaert, K., Vanheule, A., Höfte, M. & Haesaert, G., 2014, Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment, *Toxins*, 6(1), 1-19.
- Bai, G. & Shaner, G., 2004, Management and resistance in wheat and barley to FHB, *Annual Review of Phytopathology*, 42, 135-161.
- Bartels, A., Han, Q., Nair, P., Stacey, L., Gaynier, H., Mosley, M., Huang, Q.Q., Pearson, J.K., Hsieh, T.F. & An, Y.C., 2018, Dynamic DNA methylation in plant growth and development, *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 21-44.
- Berdan, E., Rosenquist, H., Larson, K. & Wellenreuther, M., 2018, Inversion frequencies and phenotypic effects are modulated by the environment: insights from a reciprocal transplant study in *Coelopa frigida*, *Evolutionary Ecology*, 32(6), 683-698.
- Bersching, K. & Jacob, S., 2021, The molecular mechanism of fludioxonil action is different to osmotic stress sensing, *Journal of Fungi*, 7(5), 393.
- Bewick, A. J., Hofmeister, B. T., Powers, R. A., Mondo, S. J., Grigoriev, I. V., James, T. Y. & Schmitz, R. J., 2019, Diversity of cytosine methylation across the fungal tree of life, *Nature Ecology & Evolution*, 3(3), 479-490.
- Beyer, M., & Verreet, J. A., 2005, Germination of *Gibberella zeae* ascospores as affected by age of spores after discharge and environmental factors, *European Journal of Plant Pathology*, 111(4), 381-389.
- Bird, A. P. & Southern, E. M., 1978, Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*, *Journal of Molecular Biology*, 118(1), 27-47.
- Bird, A., 1999, DNA methylation *de novo*, *Science*, 286(5448), 2287-2288.
- Bird, A., 2002, DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes & Development*, 16, 6-21.
- Blandino, M., Minelli, L. & Reyneri, A., 2006, Strategies for the chemical control of FHB: effect on yield, alveographic parameters and deoxynivalenol contamination in winter wheat grain, *European Journal of Agronomy*, 25(193), 201.

- Bonner, C., Sproule, A., Rowland, O., Overy, D., & Subramaniam, R., 2021, DNA Methylation is responsive to the environment and regulates the expression of biosynthetic gene clusters, metabolite production and virulence in *Fusarium graminearum*, *Frontiers in Fungal Biology*, 1, 614-633.
- Bosca, F., Mirvea, M. A., Serrano, G. & Vargas, F., 1998, Photochemistry and photobiological properties of dicloran, a postharvest fungicide with photosensitizing side effects, *Photochemistry and Photobiology*, 67(5), 532–537.
- Broadbuss, V. C., Ernst, J. D., King Jr, T. E., Lazarus, S. C., Sarmiento, K. F., Schnapp, L. M. & Gotway, M. B., 2021, Murray & Nadel's textbook of respiratory medicine e-book, *Elsevier Health Sciences*, 235-263
- Casadesús, J. & Noyer-Weidner, M., 2013, *Epigenetics*, Brenner's Encyclopedia of Genetics, In: Maloy, S.R. & Hughes, K.T., (ed.), Chapter 5, Elsevier/Academic Press, Amsterdam, ISBN: 9780123749840, 2763-2814.
- Champeil, A., Doré, T. & Fourbet, J. F., 2004, FHB: 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.
- Clancy, S., 2008, Genetic mutation, *Nature Education*, 1(1), 187.
- Clark, S. J., Statham, A., Stirzaker, C., Molloy, P. L. & Frommer, M., 2006, DNA methylation: bisulphite modification and analysis, *Nature Protocols*, 1(5), 2353-2364.
- Cross, S. H., Charlton, J. A., Nan, X. & Bird, A. P., 1994, Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column, *Nature Genetics*, 6(3), 236-244.
- Davidse L. C., 1986, Benzimidazole Fungicides: mechanism of action and biological impact, *Annual Review of Phytopathology*, 24, 43-65.
- Davis, R. H., 2000, *Neurospora: contributions of a model organism*, Oxford University Press, 13.
- de Chaves, M. A., Reginatto, P., da Costa, B. S., de Paschoal, R. I., Teixeira, M. L. & Fuentefria, A. M., 2022, Fungicide resistance in *Fusarium graminearum* species complex, *Current Microbiology*, 79(2), 1-9.
- De Vries, H., 1904, Species and varieties, *Their Origin by Mutation: Lectures Delivered at the University of California*.
- Del Ponte, E. M., Valent, B. & Bergstrom, G. C., 2017, A special issue on FHB and wheat blast, *Tropical Plant Pathology*, 42(3), 143-145.
- Desjardins, A.E., & Proctor, R.H. 2007, Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins, *International Journal of Food Microbiology*, 119, 47-50.

- Devi, P. A., Paramasivam, M. & Prakasam, V., 2015, Degradation pattern and risk assessment of carbendazim and mancozeb in mango fruits, *Environmental monitoring and assessment*, 187(1), 1-6.
- Doohan, F. M., Weston, G., Rezanoor, H. N., Parry, D. W. & Nicholson, P., 1999, Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of Tri5 by *Fusarium* species in vitro and in planta, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 3850-3854.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.
- Eichler, E. E. & Sankoff, D., 2003, Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution, *Science*, 301, 793-797.
- Faugeron, G., 2000, Diversity of homology-dependent genesilencing strategies in fungi, *Current Opinion in Microbiology*, 3, 144–148.
- Gardiner, D., Osborne, S., Kazan, K., & Manners, J., 2009, Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*, *Microbiology* 155, 3149–3156.
- 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.
- Gonzalez, F.J. & Gelboin, H.V., 1992, Human cytochromes P450: evolution and cdna-directed expression, *Environmental Health Perspectives*, 98, pp. 81–85.
- Goswami, R.S. & Kistler, H.C., 2004, Heading for Disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crop, *Molecular Plant Pathology*, 5(6), 515-525.
- Graiet, I., Hamdi, H., Abid-Essefi, S. & Eyer, J., 2022, Fludioxonil, a phenylpyrrol pesticide, induces cytoskeleton disruption, DNA damage and apoptosis via oxidative stress on rat glioma cells, *Food and Chemical Toxicology*, 170, 113-464.
- Gupta K., Bishop J., Peck A., Brown J., Wilson L. & Pvea D., 2004, Antimitotic antifungal compound benomyl inhibits brain microtubule polymerization and dynamics and cancer cell proliferation at mitosis by binding to a novel site in tubulin, *Biochemistry*, 43(21), 6645–6655.
- Harshitha, K. & Nair, R. A., 2020, Evaluation of DNA methylation changes by CRED–RA analysis following prednisone treatment of endophyte *Fusarium oxysporum*, *Indian Journal of Microbiology*, 60(2), 254-258.
- He, C., Zhang, Z., Li, B. & Tian, S., 2020, The pattern and function of DNA methylation in fungal plant pathogens, *Microorganisms*, 8(2), 227.
- Honda, S., Lewis, Z., Shimada, K., Fischle, W., Sack, R. & Selker, E., 2012, Heterochromatin protein 1 forms distinct complexes to direct histone deacetylation and DNA methylation, *Nature Structure & Molecular Biology*, 19, 471–477.

- Howlett, B.J., Lowe, R.G.T., Marcroft, S.J., & van deWouw, A.P., 2015, Evolution of virulence in fungal plant pathogens: exploiting fungal genomics to control plant disease, *Mycologia*, 107, 441–451.
- Irzykowska, L., Bocianowski, J. & Baturo-Cieśniewska, A., 2013, Association of mating-type with mycelium growth rate and genetic variability of *Fusarium culmorum*, *Open Life Sciences*, 8(7), 701-711.
- Jacob, S. & Brandhorst, T. T., 2020, The mechanism of phenylpyrrole fungicides cannot be explained by a stearic effect upon triosephosphate isomerase alone, *Osf Preprints*, 1.
- Jacob, S. & Thines, E., 2017, Multistep phosphorelay in fungi: The enigma of multiple signals and a limited number of signaling pathways, *Mycological Progress*, 16(11), 1007-1013.
- Jacob, S., Foster, A. J., Yemelin, A. & Thines, E., 2015, High osmolarity glycerol (HOG) signalling in *Magnaporthe oryzae*: identification of MoYPD1 and its role in osmoregulation, fungicide action and pathogenicity, *Fungal Biology*, 119(7), 580-594.
- Jaenisch, R. & Bird, A., 2003, Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nature Genetics*, 33(3), 245-254.
- Kang, Z., Huang, L., Krieg, U., Mauler-Machnik, A. & Buchenauer, H., 2001, Effects of tebuconazole on morphology, structure, cell wall components and trichothecene production of *Fusarium culmorum* in vitro, *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 57(6), 491-500.
- Karan, R., DeLeon, T., Biradar, H. & Subudhi, P. K., 2012, Salt stress induced variation in DNA methylation pattern and its influence on gene expression in contrasting rice genotypes, *PloS One*, 7(6), e40203.
- Kerényi, Z., Moretti, A., Waalwijk, C., Oláh, B. & Hornok L., 2004, Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4419-4423.
- Koo, B. S., Park, H. & Kalme, S., 2009, A- and B-tubulin from phytophthora capsici KACC 40483: molecular cloning, biochemical characterization and antimicrotubule screening, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(3), 513– 524.
- Kovalchuk, I., 2021, *Genome stability: an evolutionary perspective*, Genome Stability: From Virus to Human Application (Second Edition), In: Kovalchuk, I. & Kovalchuk, O. (ed.), Chapter 1, Academic Press, ISBN: 978-0-323-85679-9, 1-19.
- Kusano, K., Naito, T., Handa, N. & Kobayashi, I., 1995, Restriction-modification systems as genomic parasites in competition for specific sequences, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(24), 11095-11099.
- Laird, P. W., 2010, Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis, *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 191-203.

- Larone, D.H., 1995, Medically important fungi: a guide to identification, 3rd Ed. Asm Press, Washington, ISBN: 978-1555810917.
- Lechoczki-Krsjak, S., Toth, B., Kotai, C., Martonosi, I., Farady, L., Kondrak, L., Szabo-Hever, A. & Mesterhazy, A., 2008, Chemical control of FHB in wheat with different nozzle types and fungicides, *Cereal Research Communications*, 36, 677–681.
- Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M. & Walker, A. S., 2007, Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*, *Pest Management Science* 63, 688–698.
- Leslie, J.F. & Summerell, B.A., 2006, *The Fusarium laboratory manual*, Manhattan, ISBN: 978-0-8138-1919-8.
- Li, Y., He, Y. Z., Li, X., Fasoyin, O. E., Hu, Y. L., Liu, Y. J., Yuan, J., Zhuang, Z. H. & Wang, S. H., 2017, Histone methyltransferase aflrmtA gene is involved in the morphogenesis, mycotoxin biosynthesis, and pathogenicity of *Aspergillus flavus*, *Toxicon*, 127, 112–121.
- Liu, X., Jiang, J., Shao, J., Yin, Y. & Ma, Z., 2010, Gene transcription profiling of *Fusarium graminearum* treated with an azole fungicide tebuconazole, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 1105–1114.
- Liu, W., Yang, Y. S., Li, P. J., Zhou, Q. X., Xie, L. J. & Han, Y. P., 2009, Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices, *Journal of Hazardous Material*, 161, 878–883.
- Luo, C. X. & Schnabel, G., 2007, The cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase gene is a demethylation inhibitor fungicide resistance determinant in *Monilinia fructicola* field isolates from Georgia, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 359–366.
- Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D., M., Manners, J., M. & Kazan, K., 2013, *Fusarium* pathogenomics, *Annual Review of Microbiology*, 67, 399–416.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J., 1982, *Molecular cloning: a laboratory manual*, New York.
- McClelland, M., Nelson, M. & Raschke, E., 1994, Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases, *Nucleic Acids Research*, 22(17), 3640–3659.
- Menegola, E., Broccia, M. L., Di Renzo, F. & Giavini, E., 2006, Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphogenic effects, *Reproductive Toxicology*, 22(2), 186–195.
- Mert-Türk, F. & Gencer, R., 2013, Distribution of the 3-AcDON, 15-AcDON, and NIV chemotypes of *Fusarium culmorum* in the North-West of Turkey, *Plant Protection Science*, 49(2), 57–64.

- Miller, J. D., Greenhalgh, R., Wang, Y. Z. & Lu, M., 1991, Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species, *Mycologia*, 83, 121-130.
- Minervini, F., Fornelli, F. & Flynn, K. M., 2004, Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line, *Toxicol Vitro*, 18, 21–28.
- Mishra, P., Baum, M. & Carbon, J., 2011, DNA methylation regulates phenotype-dependent transcriptional activity in *Candida albicans*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 11965–11970.
- Mishra, P. K., Fox, R. T. V. & Culham, A., 2003, Inter-simple sequence repeats and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and long-range dispersal in *Fusarium culmorum*, *Annals of Applied Biology*, 143, 291–301.
- Moore, L. D., Le, T. & Fan, G. P., 2013, DNA methylation and its basic function, *Neuro Psycho Pharmacology*, 38, 23–38.
- 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), 1-7.
- Nelson, P. E., Dignani, M. C. & Anaissie, E. J., 1994, Taxonomy, Biology and clinical aspects of *Fusarium* species, *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4), 479-504.
- Niwa, S., Kubo, K., Lewis, J., Kikuchi, R., Alagu, M. & Ban, T., 2014, Variations for FHB resistance associated with genomic diversity in different sources of the resistant wheat cultivar ‘sumai 3’, *Breeding Science*, 64(1), 90-96.
- Niwa, S., Takahashi, H. & Hirokawa, N., 2013, β -Tubulin mutations that causes severe neuropathies disrupt axonal transport, *The EMBO Journal*, 32(10), 1352-1364.
- Özer, N. & Soran, H., 1991, *Fusarium* species of Turkey, *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 6, 259-271.
- Parker, J. E., Warrilow, A. G., Cools, H. J., Martel, C. M., Nes, W. D., Fraaije, B. A., Lucas, C., A., Kelly, D. & Kelly, S. L., 2011, Mechanism of binding of prothioconazole to *Mycosphaerella graminicola* Cyp51 differs from that of other azole antifungals, *Applied & Environmental Microbiology*, 77(4), 1460-1465.
- Parry, D. W., Jenkinson, P. & Mcleod, L., 1995, *Fusarium* Ear Blight (Scab) in small grain cereals-a review, *Plant Pathology*, 44, 207-238.
- Pasquali, M. & Migheli, Q., 2014, Genetic approaches to chemotype determination in type B-trichothecene producing Fusaria, *International Journal of Food Microbiology*, 189, 164-182.

- Paul, P. A., Salgado, J. D., Bergstrom, G., Bradley, C. A., Byamukama, E., Byrne, A. M. & Yabwalo, D., 2019, Integrated effects of genetic resistance and prothioconazole+tebuconazole application timing on FHB in wheat, *Plant Disease*, 103(2), 223-237.
- Pirgozliev, S. R., Edwards, S. G., Hare, M. C. & Jenkinson, P., 2003, Strategies for the control of FHB in cereals, *European Journal of Plant Pathology*, 109(7), 731-742.
- Rathinasamy, K. & Pvea, D., 2006, Suppression of microtubule dynamics by benomyl decreases tension across kinetochore pairs and induces apoptosis in cancer cells, *The FEBS Journal*, 273(17), 4114-4128.
- Reyna-López, G. E., Simpson, J. & Ruiz-Herrera, J., 1997, Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms, *Molecular and General Genetics MGG*, 253(6), 703-710.
- Rountree, M. R. & Selker, E. U., 1997, DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in *Neurospora crassa*, *Genes & Development*, 11, 2383-2395.
- Rountree, M. & Selker, E., 2010, DNA methylation and the formation of heterochromatin in *Neurospora crassa*, *Heredity*, 105, 38-44.
- Saharan, M. S. & Naef, A., 2008, Detection of genetic variation among indian wheat head scab pathojens (*Fusarium* Spp./Isolates) with microsatellit markers, *Crop Protection*, 27, 1148-1154.
- Sahin, K., Yilmaz, S. & Gozukirmizi, N., 2014, Changes in human sirtuin 6 gene promoter methylation during aging, *Biomedical Reports*, 2(4), 574-578.
- Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M. & Migheli, Q., 2013, *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat, *Molecular plant pathology*, 14(4), 323-341.
- Schmale, D. G. & Bergstrom, G. C., 2010, Fusarium Head Blight (FHB) or scab, *APSnet*, 78(4), 122.
- Sebat, J., Lakshmi, B., Troge, J., Alexander, J., Young, J., Lundin, P. & Wigler, M., 2004, Large-scale copy number polymorphism in the human genome, *Science*, 305(5683), 525-528.
- Song, C. X., Szulwach, K. E., Fu, Y., Dai, Q., Yi, C., Li, X. & He, C., 2011, Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine, *Nature Biotechnology*, 29(1), 68-72.
- Stack, R.W., 2003, *History of FHB with emphasis on North America*, In FHB of Wheat and Barley, In: Leonard, K.J. & Bushnell, W.R. (ed.), APS Press, St. Paul, 1-34.
- Stankiewicz, P. & Lupski, J. R., 2002, Genome architecture, rearrangements and genomic disorders, *Trends Genetics*, 18, 74-82.

- Steward, N., Ito, M., Yamaguchi, Y., Koizumi, N. & Sano, H., 2002, Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress, *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37741-37746.
- Su, Z. X., Han, L. & Zhao, Z. M., 2011, Conservation and divergence of DNA methylation in eukaryotes: new insights from single base-resolution DNA methylomes, *Epigenetics*, 6, 134–140.
- Susan, J. C., Harrison, J., Paul, C. L. & Frommer, M., 1994, High sensitivity mapping of methylated cytosines, *Nucleic Acids Research*, 22(15), 2990-2997.
- Sutton J. C., 1982, Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*, *Canadian Journal of Plant Pathology* 4, 195–209.
- Suzuki, M. M. & Bird, A., 2008, DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics, *Nature Reviews Genetics*, 9, 465–476.
- Teif, V. B. & Rippe, K., 2009, Predicting nucleosome positions on the DNA: combining intrinsic sequence preferences and remodeler activities, *Nucleic Acids Research*, 37(17), 5641-5655.
- 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.
- Temizkan, G., 2014, *Moleküler Genetik*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, ISBN: 978-605-335-021-7.
- Tini, F., Beccari, G., Marconi, G., Porceddu, A., Sulyok, M., Gardiner, D. M. & Covarelli, L., 2021, Identification of putative virulence genes by DNA methylation studies in the cereal pathogen *Fusarium graminearum*, *Cells*, 10(5), 1192.
- Tortella, G. R., Mella-Herrera, R. A., Sousa, D. Z., Rubilar, O., Briceño, G., Parra, L. & Diez, M. C., 2013, Carbendazim dissipation in the biomixture of on-farm biopurification systems and its effect on microbial communities, *Chemosphere*, 93(6), 1084-1093.
- Trail, F., Xu, H., Loranger, R. & Gadoury, D., 2002, Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*), *Mycologia*, 94, 181–189.
- Tunali, B., Ozseven, I., Buyuk, O., Erdurmus, D. & Demirci, A., 2006, FHB and deoxynivalenol accumulation of wheat in Marmara region and reactions of wheat cultivars and lines to *F. graminearum* and *F. culmorum*, *Plant Pathology Journal*, 23(3), 68-74.
- Tutel, B. & Çirpıcı, A., 1999, Sporlu bitkiler sistematığı laboratuvar kılavuzu, Çantay Kitabevi, İstanbul, ISBN: 975-404-295-0.

- Wagacha, J. M. & Muthomi, J. W., 2007, *Fusarium culmorum*: infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat, *Crop Protection*, 26(7), 877-885.
- Walkowiak, S., Rowle, O., Rodrigue, N. & Subramaniam, R., 2016, Whole genome sequencing and comparative genomics of closely related FHB fungi: *Fusarium Graminearum*, *F. Meridionale* and *F. Asiaticum*, *BMC Genomics*, 17(1).
- Weaver, R., 2011, Chapter 4, Ebook: Molecular Biology, 256-258.
- Wulff, E. G., Sørensen, J. L., Lübeck, M., Nielsen, K. F., Thrane, U. & Torp, J., 2010, *Fusarium* spp. associated with rice *Bakanae*: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity, *Environmental Microbiology*, 12, 649–657.
- Wyand, R. A. & Brown, J. K. M., 2005, Sequence variation in the CYP51 gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides, *Fungal Genetics Biology*, 42, 726– 735.
- Wypych, A., & Wypych, G., 2015, Databook of biocides, *Elsevier*, 35,140-343
- Xu, X. & Nicholson, P., 2009, Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight, *Annual Review of Phytopathology*, 47, 83-103.
- Yli-Mattila, T., Rämö, S., Hietaniemi, V., Hussien, T., Carlobos-Lopez, A. L. & Cumagun, C. J. R., 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.
- Yoshimi, A., Kojima, K., Takano, Y. & Tanaka, C., 2005, Group III histidine kinase is a positive regulator of Hog1-type mitogen-activated protein kinase in filamentous fungi, *Eukaryotic Cell*, 4(11), 1820-1828.
- Yörük, E., 2018, Tetraconazole leads to alterations in *Fusarium graminearum* at different molecular levels, *Applied Ecology and Environmental Research*, 16(5), 6155-6167.
- Yörük, E. & Albayrak, G., 2012. Chemotyping of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by PCR assay, *Mycopathologia*, 173, 53–61.
- Yörük, E. & Albayrak, G., 2014, Tri4 and tri5 gene expression analysis in *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates by qPCR, *Plant Pathology Journal (Faisalabad)*, 13(2), 133-138.
- Yörük, E. & Yli-Mattila, T., 2019, Class B-trichothecene profiles of fusarium species as causal agents of head blight, *In Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology*, 347-376.
- Yun, S. H., Arie, T., Kaneko, I., Yoder, O. C. & Turgeon, B. G., 2000, Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella/Fusarium* species, *Fungal Genetics and Biology*, 31(1), 7-20.

- Yüksektepe, B., Sefer, Ö., Varol, G. İ., Teker, T., Arslan, M., Çetin, B. N. & Albayrak, G., 2022, Identification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* isolates via conventional and molecular methods, *European Journal of Biology*, 81(1), 107-116.
- Zemach, A., McDaniel, I. E., Silva, P. & Zilberman, D., 2010, Genome-Wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation, *Science*, 328, 916–919.
- Zhao, Y., Chen, M., Storey, K. B., Sun, L. & Yang, H., 2015, DNA methylation levels analysis in four tissues of sea cucumber *Apostichopus japonicus* based on fluorescence-labeled methylation-sensitive amplified polymorphism (F-MSAP) during aestivation, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 181, 26-32.
- Zhong, S., Fei, Z., Chen, Y. R., Zheng, Y., Huang, M., Vrebalov, J., McQuinn, R., Gapper, N., Liu, B. & Xiang, J., 2013, Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening, *Nature Biotechnology*, 31, 154–159.
- Zhou, F., Li, D. X., Hu, H. Y., Song, Y. L., Fan, Y. C., Guan, Y. Y. & Li, C. W., 2020a, Biological characteristics and molecular mechanisms of fludioxonil resistance in *Fusarium graminearum* in China, *Plant Disease*, 104(9), 2426-2433.
- Zhou, Y., Xu, J., Zhu, Y., Duan, Y. & Zhou, M., 2016, Mechanism of action of the benzimidazole fungicide on *Fusarium graminearum*: interfering with polymerization of monomeric tubulin but not polymerized microtubule, *Phytopathology*®, 106(8), 807-813.
- Zhou, Z., Duan, Y. & Zhou, M., 2020b, Carbendazim-resistance associated β 2-tubulin substitutions increase deoxynivalenol biosynthesis by reducing the interaction between β 2-tubulin and IDH3 in *Fusarium graminearum*, *Environmental Microbiology*, 22(2), 598-614.
- Zhu, Y., Xu, J., Sun, C., Zhou, S., Xu, H. & Nelson, D., 2015, Chromosome-level genome map provides insights into diverse defense mechanisms in the medicinal fungus *Ganoderma sinense*, *Scientific Reports*, 5, 11087.

ÖZGEÇMİŞ

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	12.07.2019

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

Makale ve Bildiriler
Yüksektepe, B., Sefer, Ö., Varol, G. İ., Tekler, T., Arslan, M., Çetin, B. N. & Albayrak, G., 2022, Identification of <i>Fusarium graminearum</i> and <i>Fusarium culmorum</i> isolates via conventional and molecular methods, <i>European Journal of Biology</i> , 81(1), 107-116.