



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

KARBENDAZİMİN DNA METİLASYONU ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN *Fusarium*'da ARAŞTIRILMASI

Şule İNAN KENAR

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK

Haziran, 2024

İSTANBUL

Bu çalışma, 27.06.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

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

Prof. Dr. Sibel YILMAZ
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Fatma Elif ÇEPNİ
YÜZBAŐIOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

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

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 39280 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleri ile bana ışık tutan, sonsuz sevgi ve hoşgörüsüyle beni her zaman destekleyen, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım değerli danışman hocam Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK'a

Lisans ve yüksek lisans eğitimimde emekleri bulunan İ.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü mensubu tüm saygıdeğer öğretim üyelerine,

Tez çalışmam boyunca sorularıma her zaman cevap veren ve yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen başta Dr. Öğr. Üyesi Tuğba TEKER ve Uzm. Mehmet ARSLAN olmak üzere bütün çalışma arkadaşlarıma,

Bu projeyi destekleyen İ.Ü. Bilimsel Araştırma Fonuna ve çalışmalarım süresince tüm imkanlarımdan yararlandığım İ.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanlığı'na,

Eğitim hayatım boyunca manevi destekleri ile beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan canım arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemi sağlayan, bana gösterdikleri anlayış ve fedakarlıkları ile her daim yanımda olan canım aileme ve sevgili eşime,

En içten şekilde teşekkür eder, sonsuz sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Haziran 2024

Şule İNAN KENAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	2
2.1. EPİGENETİK.....	2
2.1.1. DNA metilasyonunu belirleme yöntemleri.....	4
2.1.1.1. Bisülfıt Dizileme Yöntemi	6
2.1.1.2. ELISA Yöntemi.....	7
2.2. BİTKİ PATOJENİ MANTARLAR.....	8
2.2.1. <i>Fusarium</i> cinsi.....	9
2.2.2. <i>F. culmorum</i>	11
2.3. <i>Fusarium</i> ile MÜCADELEDE FUNGUSİT KULLANIMI	12
2.3.1. Karbendazim	13
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	15
3.1. <i>F. culmorum</i> REFERANS SUŞUNUN <i>in vitro</i> ÜRETİMİ	15
3.2. FcUK99 ÜREMESİNİ İNHİBE EDEN MİNİMUM KARBENDAZİM KONSANTRASYONUN BELİRLENMESİ.....	15
3.3. KARBENDAZİM ETKİSİNİN FLORESAN MİKROSKOBU ile HÜCRESEL GÖSTERİMİ.....	16
3.4. GENOMİK DNA İZOLASYONU ve ANALİZİ.....	16
3.5. SODYUM BİSÜLFİT DÖNÜŞÜMÜ.....	18
3.6. HEDEF GEN SEÇİMİ ve PRİMER TASARIMI.....	19
3.7. <i>B2-tubulin</i> GENİNİN PZR ile ÇOĞALTILMASI	21
3.8. BİSÜLFİT DİZİLEME ANALİZİ.....	21
3.9. DNA METİLASYONUNUN TÜM GENOM DÜZEYİNDE BELİRLENMESİ	22

4. BULGULAR	25
4.1. KARBENDAZİMİN FUNGAL ÜREME ÜZERİNDEKİ ETKİSİNE İLİŞKİN BULGULAR.....	25
4.2. KARBENDAZİMİN FcUK99 ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN HÜCRESEL GÖSTERİMİ.....	26
4.3. <i>B2-tubulin</i> GENİNİN ÇOĞALTIMINA AİT BULGULAR	28
4.4. BİSÜLFİT DİZİLEME BULGULARI	29
4.5. TÜM GENOM DÜZEYİNDEKİ DNA METİLASYONUNA İLİŞKİN BULGULAR.....	35
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	38
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Epigenetik düzenlemelerin üç temel mekanizmasının gösterimi (Yan ve diğ., (2010)'dan alıntılanarak düzenlenmiştir). 2
- Şekil 2.2:** DNMT tarafından C'ye metil grubunun transfer edilmesi ile 5mC oluşum mekanizmasının gösterimi (Luczak ve diğ., (2006)'dan alıntılanarak düzenlenmiştir). 3
- Şekil 2.3:** Mantarlarda kalıtılan ve *de novo* DNA metilasyon oluşumunu gösteren şema (Yu ve diğ., (2011)'den alıntılanarak düzenlenmiştir). 4
- Şekil 2.4:** Sodyum bisülfid uygulaması ile C'nin U'ya dönüşümünün gösterimi (von Meyenn, (2022)'den alıntılanarak düzenlenmiştir). 4
- Şekil 2.5:** Sodyum bisülfid dönüşümü sonrası ileri ve geri primer çiftleri kullanılarak PZR ile kodlanan (İplik A) ve kalıp (İplik B) DNA ipliklerinin çoğaltımı (Gahlaut ve diğ., (2002)'den alıntılanarak düzenlenmiştir). 6
- Şekil 2.6:** ELISA yönteminin çeşitlerinin gösterimi (Boster Bio, (2024)'ten alıntılanarak düzenlenmiştir). 8
- Şekil 2.7:** *Fusarium* türlerinde eşeyli ve eşeysiz üreme (Ma ve diğ., (2013)'ten alıntılanarak düzenlenmiştir). 11
- Şekil 4.1:** *F. culmorum* UK99 referans suşunun kontrol grubu ve 0.7 µg/mL (MİK₂₅) ve 1.4 µg/mL (MİK₅₀) konsantrasyonunda karbendazim uygulanan deney gruplarına ait (A) 4 ve (B) 7 günlük kültürlerdeki üreme profilleri. 25
- Şekil 4.2:** Artan dozlarda karbendazim uygulanmış *F. culmorum* UK99 referans suşunun 7 günlük kültürlerinin doğrusal büyüme oranlarındaki azalmanın grafikte gösterimi. ****: p<0.0001. 26
- Şekil 4.3:** *F. culmorum* UK99 suşunun (1) kontrol grubu ile (2) MİK₂₅ ve (3) MİK₅₀ dozlarında karbendazim uygulanan deney gruplarının at/etbr ikili boyaması sonucu ışık mikroskobunda 20× büyütme objektif ile inceleme sonrası alınan görüntüleri ve floresan mikroskobunda* GFP (At 502/526 nm, EtBr 510/595 nm) ve Texas RED (595/613 nm) filtreleri ile elde edilen görüntüleri. 27
- Şekil 4.4:** Kontrol ve deney gruplarından izole edilen gDNA'ların agaroz jel elektroforezi sonrası UV ışık altındaki görüntüleri. S: λHindIII Standart DNA (Thermo Scientific, SM0101, ABD), K: Kontrol. 28
- Şekil 4.5:** Sodyum bisülfid uygulaması yapılmayan gDNA'ların Tub2 primer çiftinin kullanıldığı PZR analizi ile çoğaltımı sonucu elde edilen β2-tubulin genine ait 1312 bp boyutundaki DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. S: 1 kb

Standart DNA (SM0311,Thermo Scientific, ABD), K: Kontrol, NK: Negatif Kontrol.....	29
Şekil 4.6: Tub2-bs-1 ve Tub2-bs-2 primer çiftlerinin kullanıldığı bisülfid özgün PZR ile $\beta 2$ - <i>tubulin</i> geninden çoğaltılan sırasıyla 311 bç ve 307 bç boyutundaki DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. S: 100 bç'lik Standart DNA (SM0241,Thermo Scientific, ABD), K: Kontrol, NK: Negatif Kontrol.	29
Şekil 4.7: FcUK99 suşunun $\beta 2$ - <i>tubulin</i> geninin kısmi bölgesinin Tub2 ileri primerinin kullanıldığı Sanger dizileme yönteminden elde edilen nukleotid dizi bilgisine ait kromatogram.	30
Şekil 4.8: FcUK99 suşunun sodyum bisülfid uygulanan gDNA'larının kodlanan DNA ipliğinden çoğaltılan $\beta 2$ - <i>tubulin</i> geninin Tub2-bs-1 (A) ileri ve (B) geri primerleri ile Sanger dizileme yönteminden elde edilen nukleotid dizi bilgilerine ait kromatogram.	31
Şekil 4.9: Kodlanan ipliğin kalıp olarak kullanıldığı PZR'de Tub2-bs-1 ileri ve geri primerlerinin çoğalttığı $\beta 2$ - <i>tubulin</i> geninin kısmi dizilimlerinin hizalama analizi. * identik nukleotidler temsil etmektedir. BS+: Bisülfid uygulanmış. i: İleri primer. g: Geri primer.	31
Şekil 4.10: Bisülfid uygulanmayan kontrol grubundan izole edilen DNA örneğine ait $\beta 2$ - <i>tubulin</i> geninin ileri primer ile elde edilen dizi bilgisinin referans gen dizisi ile karşılaştırılma analizi. BS-: Bisülfid uygulanmamış.	32
Şekil 4.11: $\beta 2$ - <i>tubulin</i> genine ait sodyum bisülfid dönüşümü yapılan kontrol grubunun gDNA'larının (A) kodlanan ve (B) kalıp DNA ipliğine özgün primerler ile çoğaltımı sonrası elde edilen dizilim bilgileri ile sodyum bisülfid uygulamasına tabi tutulmayan kontrol grubuna ait gDNA'ların çoğaltılması ile elde edilen nukleotid dizilerinin hizalama analizi. * identik nukleotidler temsil etmektedir. Metillenmemiş sitozin nukleotidler kalın ve kırmızı karakter ile gösterildi. BS-: Bisülfid uygulanmamış. BS+: Bisülfid uygulanmış.	33
Şekil 4.12: $\beta 2$ - <i>tubulin</i> genine ait sodyum bisülfid dönüşümü yapılan MİK ₂₅ grubunun gDNA'larının (A) kodlanan ve (B) kalıp DNA ipliğine özgün primerler ile çoğaltımı sonrası elde edilen dizilim bilgileri ile sodyum bisülfid uygulamasına tabi tutulmayan MİK ₂₅ grubuna ait gDNA'ların çoğaltılması ile elde edilen nukleotid dizilerinin hizalama analizi. * identik nukleotidler temsil etmektedir. Metillenmemiş sitozin nukleotidler kalın ve kırmızı karakter ile gösterildi. BS-: Bisülfid uygulanmamış. BS+: Bisülfid uygulanmış.	34
Şekil 4.13: $\beta 2$ - <i>tubulin</i> genine ait sodyum bisülfid dönüşümü yapılan MİK ₅₀ grubunun gDNA'larının (A) kodlanan ve (B) kalıp DNA ipliğine özgün primerler ile çoğaltımı sonrası elde edilen dizilim bilgileri ile sodyum bisülfid uygulamasına tabi tutulmayan MİK ₅₀ grubuna ait gDNA'ların çoğaltılması ile elde edilen nukleotid dizilerinin hizalama analizi. * identik nukleotidler temsil etmektedir. Metillenmemiş sitozin nukleotidler kalın ve kırmızı karakter ile gösterildi. BS-: Bisülfid uygulanmamış. BS+: Bisülfid uygulanmış.	35

Şekil 4.14: Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış pozitif kontrolün 0.5-10 ng/µL konsantrasyonları ile oluşturulan standart eğri. 36

Şekil 4.15: Artan dozlarda karbendazim uygulaması ile FcUK99 suşunun % DNA metilasyon değerleri arasındaki ilişkinin grafikte gösterimi. ***: p<0.001, ****: p<0.0001..... 37



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: <i>F. culmorum</i> UK99 referans suşunun üretiminde kullanılan besi ortamları ve içerikleri, pH 5.6.	15
Tablo 3.2: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlara ait bileşenler ve derişimleri.	18
Tablo 3.3: Bisülfid dönüşümü sonrası kodlanan ve kalıp DNA ipliklerinin PZR ile çoğaltımında kullanılan primer çiftleri ve nukleotid dizileri. ssDNA: tek iplikli DNA (ing., single stranded), dsDNA: çift iplikli DNA (ing., double stranded), bs: bisülfid dönüşümü, i:İleri primer, g: Geri primer. Altı çizili nukleotidler uygun ΔG değerini sağlamak üzere değiştirilen nukleotidleri göstermektedir.	20
Tablo 3.4: MethylFlash™ Methylated 5mC DNA Quantification (P-1034-48, Epigentek)™ kit içeriği.	22
Tablo 3.5: Analizde kullanılmak üzere hazırlanan pozitif kontrollere ait son konsantrasyon değerleri.	23
Tablo 4.1: <i>F.culmorum</i> UK99 referans suşuna ait kontrol grubunun ve MİK ₂₅ ve MİK ₅₀ dozlarında karbendazim içeren deney gruplarının 7 günlük kültürlerinin ortalama doğrusal büyüme oranlarına (LGR) ve standart hatalarına (SH) ait değerler.	26
Tablo 4.2: Farklı karbendazim konsantrasyonlarının <i>F.culmorum</i> UK99 referans suşu üzerinde neden olduğu % DNA metilasyonu değişimi ve standart hata değerleri.	36

SİMGE VE KISALTIMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
±	: Standart Sapma
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
cm²	: Santimetre Kare
g	: Gram
kb	: Kilobaz
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat Derece
pH	: Hidrojen Potansiyeli
pmol	: Pikomol
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı (ing., Revolutions Per Minute)
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
α	: Alfa
β	: Beta
Δ	: Delta

Kısaltmalar	Açıklama
15- ADON	: 15-asetildeoksinivalenol
3-ADON	: 3-asetildeoksinivalenol
4-ANIV	: 4-asetilnivalenol
5mC	: 5-metilsitozin
At	: Akridin Turuncusu
bç	: Baz Çifti
bkz.	: Bakınız
BS-	: Bisültif Uygulanmamış
BS+	: Bisültif Uygulanmış
C	: Sitozin
ddH₂O	: İki Defa Destile Edilmiş Su
dH₂O	: Destile su
DIM-2	: Deficient in Methylation-2
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNMT	: DNA Metil Transferaz
DON	: Deoksinivalenol
dsDNA	: Çift İplikli DNA (ing., Double Stranded DNA)
ELISA	: Enzime Bağlı Immunosorbent Analiz (ing., Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EtBr	: Etidyum Bromür
G	: Guanin
gDNA	: Genomik DNA
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (ing., High Performance Liquid Chromatography)
ing.	: İngilizce
LGR	: Doğrusal Büyüme Oranı (ing., Linear Growth Rate)
MBC	: Metil Benzimidazol Karbamat
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MİK₂₅	: MİK dozunun % 25'i
MİK₅₀	: MİK dozunun % 50'si
MS	: Kütle Spektroskopisi (ing., Mass Spectroscopy)
MSP	: Metilasyon Özgün PZR (ing., Methylation-Specific PCR)

NIV	: Nivalenol
OD	: Optik Yoğunluk (ing., Optical Density)
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi (ing., Open Reading Frame)
p	: Fosfat
PBS	: Fosfat Tamponu Tuzu (ing., Phosphate Buffered Saline)
PDA	: Patates Dekstroz Agar
PZR/PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (ing., Polymerase Chain Reaction)
RID	: ing., Repeat-İnduced Point (RIP) Deficient
RNA	: Ribonükleik Asit
RNAi	: RNA İnterferans
s	: Saniye
SNA	: Sentetik Nutrient Agar
sncRNA	: Küçük Kodlanmayan RNA (ing., Small non-coding RNA)
ssDNA	: Tek İplikli DNA (ing., Single Stranded DNA)
T	: Timin
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
U	: Urasil

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KARBENDAZİMİN DNA METİLASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN *Fusarium* 'da ARAŞTIRILMASI

Şule İNAN KENAR

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK

Yüksek lisans tezi kapsamında, fungusit aktif bileşeni karbendazimin bitki patojeni *Fusarium culmorum*'un DNA metilasyonuna etkisi bisülfid dizileme ve enzime bağlı immunosorbent analiz (ELISA) yöntemi ile araştırıldı.

Karbendazimin bu türün referans suşunda (FcUK99) hücre canlılığına etkisi, fungal büyüme oranının belirlenmesi ve akridin turuncusu/etidyum bromür ikili boyama yaklaşımının kullanıldığı floresan mikroskopu görüntülemesi ile ortaya kondu. İlk olarak, aktif ajanın FcUK99'un büyümesini tamamen durduran minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) 2.8 µg/mL olarak belirlendi. Karbendazimin MİK₂₅ (0.7 µg/mL) ve MİK₅₀ (1.4 µg/mL) değerleri fungal üremeyi sırasıyla % 38.4 ve % 71.1 inhibe etti. Doz artışına bağlı olarak doğrusal büyüme oranlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı (p<0.0001) bulundu. Karbendazim ile muamele edilmiş örneklerde hücrelerin yeşilden sarıya ve sarıdan turuncuya lüminesansının floresans mikroskopu altında gözlemlenmesi, bileşiğin artan dozlarının hücre canlılığını azalttığını gösterdi. Karbendazimin apoptotik sürece benzer ölüm mekanizmasını tetikleyebildiği hücresel düzeyde gösterildi.

Karbendazim uygulanmış (MİK₂₅ ve MİK₅₀) ve uygulanmamış örneklerin gDNA'ları izole edildikten sonra hepsi sodyum bisülfid ile muamele edildi. Elde edilen tek iplikli kodlanan ve kalıp DNA'lardan β 2-tubulin geninin 311 ve 307 bp uzunluğundaki bölgelerinin çoğaltımı, sırasıyla Tub2-bs-1 ve Tub2-bs-2 primer çiftleri kullanılarak PZR ile gerçekleştirildi. Sodyum

bisülfid uygulanmamış gDNA'ların çoğaltımı Tub2 ileri ve geri primerleri ile gerçekleştirildi ve 1312 bç'lik DNA fragmentleri elde edildi. Kodlanan ve kalıp DNA ipliklerden elde edilen PZR ürünleri Sanger yöntemiyle çift yönlü olarak dizilenirken, bisülfid uygulanmamış örneklerin DNA'larından çoğaltılan ürünler tek yönlü olarak dizildi. Bisülfid uygulanmış ve uygulanmamış deney gruplarına ait ampikonların NCBI veri tabanındaki *β2-tubulin* gen dizisi ile hizalama analizleri karbendazimin *β2-tubulin*'de yer alan CpG adacıklarında metilasyona neden olmadığını gösterdi.

FcUK99 suşunun tüm genom 5-metilsitozin içeriği ELISA yöntemi kullanılarak % 0.49 olarak belirlendi. MİK₂₅ ve MİK₅₀ karbendazim maruziyeti kontrole kıyasla tüm genom metilasyonunu sırasıyla %79.6 ve %232.7 oranında artırdı. Aktif bileşiğin artan konsantrasyonlarının neden olduğu hipermetilasyon istatistiksel olarak anlamlı bulundu (kontrol *vice versa* MİK₂₅, p<0.001; kontrol *vice versa* MİK₅₀, p<0.0001).

Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen bulgular, karbendazimin *F. culmorum*'un *β2-tubulin* hedef geninin CpG adacıklarında DNA metilasyonuna neden olmadığını, ancak bu türde tüm genom düzeyinde DNA metilasyonunu aşırı düzeyde artırdığını ortaya koydu. Karbendazimin epigenomik etkilerine ilişkin bulgular, bu antifungal aktif bileşiğin DNA metilasyonu ile fungusit direncine katkıda bulunabilme potansiyelinin olduğunu, bu durumda da genomik damgalama yoluyla gelecek nesillere lateral olarak aktarılabilceğini düşündürdü. Yüksek lisans tezinin çıktıkları, *Fusarium* kontrolünde en sık karşılaşılan sorunlardan biri olan fungusit direncinin önlenmesinde epigenetik mekanizmaların önemini ortaya koymuştur.

Haziran 2024, 74 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Fusarium culmorum*, karbendazim, DNA metilasyonu, bisülfid dizileme, ELISA

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION of the EFFECT of CARBENDAZIM on DNA METHYLATION in *Fusarium*

Şule İNAN KENAR

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK

Within the scope of the master's thesis, the effect of carbendazim fungicide active compound on DNA methylation of the plant pathogen *Fusarium culmorum* was investigated by bisulfite sequencing and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method.

The effect of carbendazim on cell viability in the reference strain (FcUK99) of this species was revealed by the determination of fungal growth rate and fluorescence microscopy imaging using the acridine orange/ethidium bromide dual staining approach. At first, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the active agent, that completely suppresses the growth of FcUK99, was determined as 2.8 µg/mL. MIC₂₅ (0.7 µg/mL) and MIC₅₀ (1.4 µg/mL) values of carbendazim inhibited fungal growth by 38.4% and 71.1%, respectively. The decrease in linear growth rates due to dose increase was statistically significant ($p < 0.0001$). The observation of the luminescence of cells from green to yellow and from yellow to orange in carbendazim-treated samples under the fluorescence microscope indicated that increasing doses of the compound reduced cell viability. It was displayed that carbendazim could trigger a death mechanism similar to the apoptotic process at the cellular level.

After genomic DNA isolation of carbendazim-treated (MIC₂₅ and MIC₅₀) and non-treated samples, all gDNAs were exposed to sodium bisulfite. Amplification of 311 and 307 bp length regions of the $\beta 2$ -*tubulin* gene from generated single-stranded coding DNA and template DNA

was performed by PCR using Tub2-bs-1 and Tub2-bs-2 primer pairs, respectively. The amplification of non-sodium bisulfite treated gDNAs was carried out using Tub2 forward and reverse primers and produced the 1312 bp length DNA fragment. PCR products obtained from coding and template DNA strands were sequenced bi-directionally while products amplified from non-bisulfite-treated samples were unidirectional by the Sanger method. Alignment analyses of amplicons belonging to bisulfite treated and non-treated experimental groups with the *β2-tubulin* gene sequence in the NCBI database demonstrated that carbendazim did not cause the methylation on CpG islands located in *β2-tubulin*.

Whole genome 5-methylcytosine content was determined as 0.49 % by using ELISA method. MIC₂₅ and MIC₅₀ carbendazim exposure increased whole genome methylation at 79.6% and 232.7%, respectively, compared to the control. Hypermethylation caused by increasing concentrations of the active compound was found statistically significant (control *vice versa* MIC₂₅, p<0.001; control *vice versa* MIC₅₀, p<0.0001).

In conclusion, findings obtained from this study revealed that carbendazim did not cause DNA methylation in the CpG islands of the *β2-tubulin* target gene, but excessively increased DNA methylation at the whole genome level in *F. culmorum*. Findings related to the epigenomic effects of carbendazim made us think that this antifungal active compound has the potential to contribute to fungicide resistance through DNA methylation, in which case it can be laterally transmitted to future generations through genomic imprinting. The outputs of the master thesis showed the importance of epigenetic mechanisms in preventing fungicide resistance, one of the most common problems in the control of *Fusarium*.

June 2024, 74 pages.

Keywords: *Fusarium culmorum*, carbendazim, DNA methylation, bisulfite sequencing, ELISA

1. GİRİŞ

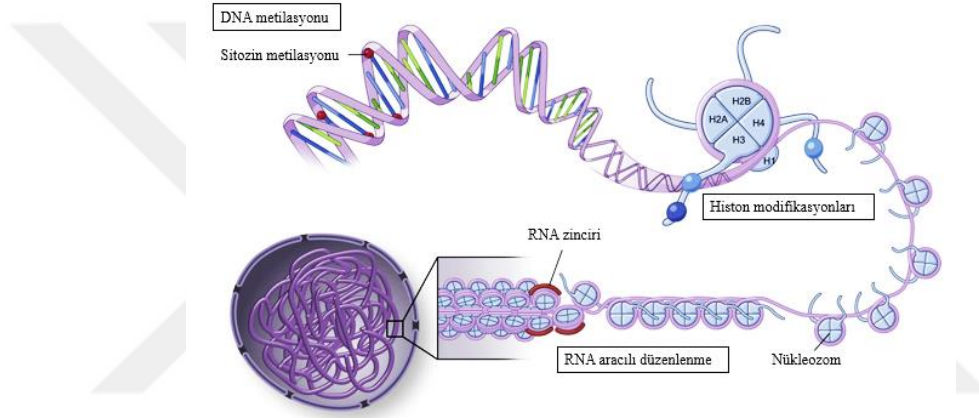
Fusarium türleri, dünya genelinde ekonomik öneme sahip küçük taneli tahıl bitkilerinde hastalık oluşturarak kalite ve verim kayıplarına neden olmaktadır (Matny, 2015; Shude ve diğ., 2020). Tarımsal alandaki kayıpların yanı sıra bu türler ürettikleri mikotoksinleri ile insan ve hayvanların sağlığını da olumsuz yönde etkilemektedir (Summerell, 2019). Bu nedenlerden dolayı tarımsal alanlarda *Fusarium* türleri ile mücadele büyük önem taşımaktadır. Bitki patojeni bu türler ile mücadelede kullanılan en etkili ve en yaygın yöntem fungusit uygulamasıdır (Lucas ve diğ., 2015). Fungusitler, mantarların temel yaşamsal faaliyetlerinde rol oynayan farklı hücresel mekanizmalar üzerinde antifungal etki göstermektedir (Pierre ve diğ., 2002; Russell ve diğ., 2005). Fitopatojenik mantarlarda fungusit aktif bileşen kullanımı ile ilişkili epigenetik mekanizmaların rolleri hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır (Yin ve diğ., 2023). TÜBİTAK KBAG tarafından desteklenen 119Z366 numaralı “Zirai İlaçların Aktif Bileşiklerinin *Fusarium* Türlerindeki Antifungal Etkilerinin Hücresel Gösterimi ve Direnç Seviyelerinin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması” başlıklı araştırma projesinde, karbendazim aktif bileşeninin etkileri *Fusarium*'un referans suşları ve tarla izolatlarında genomik, transkriptomik ve epigenomik düzeyde araştırılmıştır. Epigenomik etkiler, yalnızca metilasyon desenindeki değişiklikleri inceleyen CRED-RA (ing., coupled restriction enzyme digestion-random amplification) yöntemi ile taranarak epigenetik mekanizmanın etkinliği hakkında sınırlı veri elde edilmiştir.

Yüksek lisans tez çalışmasında, karbendazimin *F. culmorum*'da DNA metilasyonuna etkisi bisülfid dizileme ve enzime bağlı immunosorbent analiz (ELISA) yöntemleri ile incelenmiştir. Bu kapsamda, aktif ajan uygulaması sonrası türün referans suşunun (FcUK99) $\beta 2$ -tubulin geninin DNA metilasyon profili ve tüm genom düzeyinde DNA metilasyon seviyesi belirlenmiştir. Karbendazimin DNA metilasyonu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, antifungal ajanlar ile *Fusarium* türlerine karşı mücadelede epigenetik hedefli yeni araştırma projelerine veri sağlaması açısından önemlidir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. EPİGENETİK

Epigenetik, DNA’da nukleotid dizi değişimleri olmaksızın modifikasyonlar aracılığıyla gen anlatımını değişimlerine yol açan kalıtsal değişiklikleri inceleyen bilim dalıdır. Epigenetik düzenlemeler, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve küçük kodlanmayan RNA’ların (ing., small non-coding RNA; sncRNA) yer aldığı üç temel mekanizma aracılığıyla gerçekleşmektedir (Şekil 2.1) (Dubey ve Jeon, 2016; Wei ve diğ., 2016).

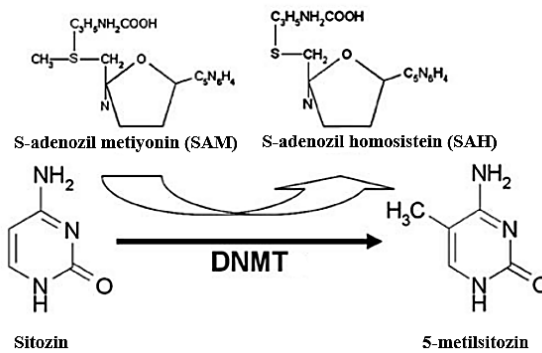


Şekil 2.1: Epigenetik düzenlemelerin üç temel mekanizmasının gösterimi (Yan ve diğ., (2010)’dan alıntılanarak düzenlenmiştir).

Histonların translasyon sonrası modifikasyonları gen anlatımının düzenlenmesinde önemli rol oynayan epigenetik mekanizmalardan biridir (Elías-Villalobos ve diğ., 2019). DNA molekülü, histon proteinlerinin bir araya gelerek oluşturduğu, iki H2A-H2B dimeri ve bir H3-H4 tetramerinden oluşan histon oktomerinin etrafına sarılarak paketlenmektedir (Dubey ve Jeon, 2016). Histon proteinleri N-terminal kuyruklarındaki genellikle lizin, arjinin ve serin amino asitlerinde yer alan kimyasal grupların uzaklaştırılması veya metil ve asetil gibi kimyasal gruplar ile değiştirilmesini içeren asetilasyon, fosforilasyon, metilasyon, ubikitinasyon, ribosilasyon ve sumolasyon mekanizmaları ile modifiye edilmektedirler (Brosch ve diğ., 2008). Farklı histon modifikasyonları, genlerin aktivasyonuna ya da inaktivasyonuna yol açarak gen anlatımını farklı seviyelerde etkilemektedir. Asetilasyon, ubikitinasyon ve fosforilasyon genellikle transkripsiyonun artmasına neden olurken, sumolasyon genellikle transkripsiyonun azalmasına neden olmaktadır (Brosch ve diğ., 2008; Chinnusamy ve Zhu, 2009; Chen ve diğ.,

2017). Metilasyon ise hedef aminoasit dizisine ve bağlanan metil grubu sayısına göre transkripsiyonun artmasına ya da azalmasına yol açmaktadır (Biancotto ve diğ., 2010). snRNA'lar histon modifikasyon süreçlerinde yer alan histonları modifiye eden enzimlerle etkileşerek bu enzimleri hedef gen bölgelerinde toplayarak gen anlatımının baskılanmasına neden olmaktadır (Simon ve Meyers, 2011; Szczepanek ve Tretyn, 2023).

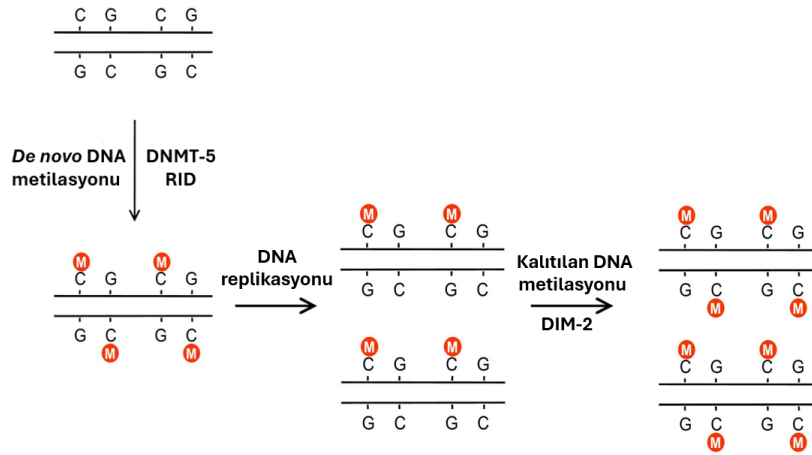
DNA metilasyonu, DNA molekülünde bulunan sitozinin (ing., cytosine; C) kimyasal modifikasyonu yoluyla genomu düzenleyen en yaygın epigenetik mekanizmalardan biridir. DNA'daki C bazının 5. pozisyonunda yer alan karbona DNA metil transferaz (DNMT) enzimleri tarafından metil grubunun transfer edilmesi 5-metilsitozin (5mC) oluşumu (Şekil 2.2) ile sonuçlanan metilasyon biçimidir (Martienssen ve Colot, 2001; Nai ve diğ., 2021). DNA metilasyonu, genellikle genin promotör bölgesinde, tekrarlı elementler ve CpG (ing., sitozin; C phosphate; p, guanin; G) adacıklarının yoğun olduğu bölgelerde meydana gelerek gen anlatımının baskılanmasına yol açabilmektedir. Ökaryotlarda DNA metilasyonu X kromozomunun inaktivasyonu, genomik imprinting ve hücre farklılaşması gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynamaktadır (Golbabapour ve diğ., 2011).



Şekil 2.2: DNMT tarafından C'ye metil grubunun transfer edilmesi ile 5mC oluşum mekanizmasının gösterimi (Luczak ve diğ., (2006)'dan alıntılanarak düzenlenmiştir).

Mantarlarda bulunan DNMT'ler ilk olarak *Neurospora crassa*'da tanımlanmıştır. Bu enzimler DIM-2 (ing., deficient in methylation-2) ve RID (ing., repeat-induced point (RIP) deficient) olarak kısaltılmaktadır. Yapılan filogenetik analizler, her iki DNMT enziminin DNMT-1 ailesi üyesi olduğu ve RID'in DIM-2'den önce evrimleştiğini ortaya koymuştur. DIM-2, replikasyon sonrası yeni sentezlenen DNA zincirine metil grubunun eklenmesinden sorumlu olup kalıtılan DNA metilasyonunda görev alırken RID ise *de novo* metilasyon oluşumundan sorumludur. Bazı mantar türlerinde bulunan DNMT-5 de *de novo* metilasyonu ile 5mC oluşumunu kataliz

etmektedir (Şekil 2.3). Mantar DNMT'lerinin fungal gelişim, patojenite ve sekonder metabolizma süreçlerinin düzenlenmesinde rol oynadıkları bilinmektedir (Bonner ve diğ., 2021; Nai ve diğ., 2021).

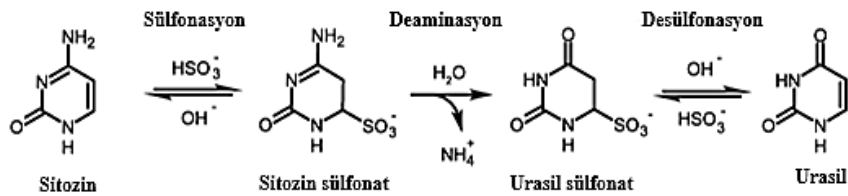


Şekil 2.3: Mantarlarda kalıtılan ve *de novo* DNA metilasyon oluşumunu gösteren şema (Yu ve diğ., (2011)'den alıntılanarak düzenlenmiştir).

2.1.1. DNA metilasyonunu belirleme yöntemleri

DNA metilasyonu, kullanılan yöntemeye dayalı olarak bir gene ya da lokusa özgün tespit edilebildiği gibi tüm genom düzeyinde de belirlenebilmektedir.

Gene veya lokusa özgün metilasyonu belirlemek amacıyla geliştirilen DNA metilasyonu yöntemlerinin temelinde genellikle sodyum bisülfid uygulaması yer almaktadır (Golbabapour ve diğ., 2011). Sodyum bisülfid muamelesi ile DNA'da yer alan metillenmiş C'ler değişime uğramazken metile olmamış C'ler U'ya dönüşmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Sodyum bisülfid uygulaması ile C'nin U'ya dönüşümünün gösterimi (von Meyenn, (2022)'den alıntılanarak düzenlenmiştir).

Dönüşüm sonrası metilasyon, meydana gelen bu nükleotid farklılığının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli yöntemler kullanılarak tespit edilmektedir (Sasaki ve diğ., 2003).

Lokus özgün metilasyonun belirlenmesinde kullanılan metilasyon özgün PZR (ing., methylation-specific PCR; MSP) yönteminde; metillenmiş ve metillenmemiş DNA bölgeleri özgün primer çiftleri kullanılarak çoğaltılmakta ve agaroz jel elektroforezi ile görüntülenebilmektedir. Ancak bu yaklaşım sadece metilasyonun varlığını ve yokluğunu belirlemeye olanak tanımaktadır (Chen ve diğ., 2017; Pajares ve diğ., 2021).

Sodyum bisülfid dönüşümü sonrası gerçekleştirilen PZR temelli bisülfid dizileme yönteminde ise DNA'da yer alan her bir CpG adacığındaki C'lerin metilasyon durumu ayrıntılı olarak belirlenebilmekte ve metilasyon yoğunluğunun kantitasyonu gerçekleştirilmektedir (Darst ve diğ., 2010; Dai ve diğ., 2024).

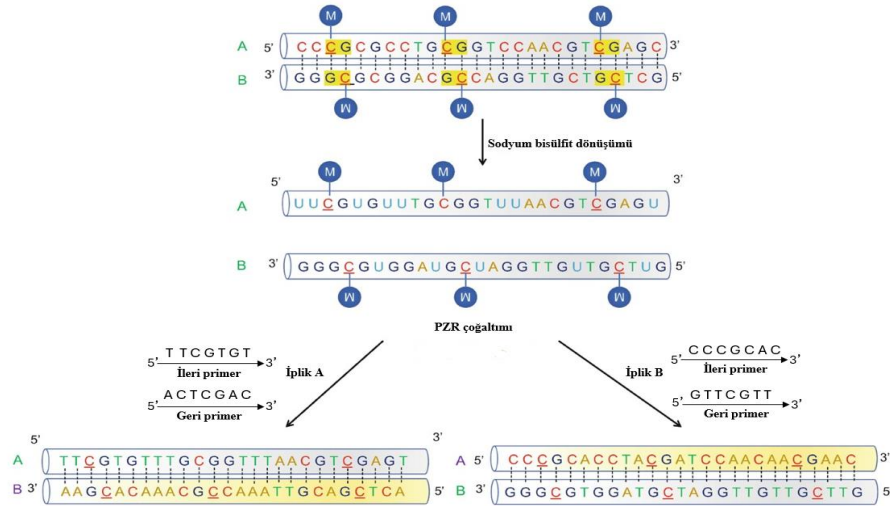
Endonukleaz enzim kesimine dayalı yöntemler ile de lokusa özgün DNA metilasyonu tespit edilebilmektedir. Bu yöntemde DNA üzerinde özgün dizileri tanıyarak kesim yapan restriksiyon endonukleazları kullanılmaktadır. Bu endonukleazların kesim etkinliği CpG adacıklarında 5mC'nin bulunduğu konuma göre değişeceğinden enzim muamelesi sonrası farklı boyutlarda fragmentler elde edilmektedir. Farklı DNA metilasyon tipleri, gDNA'ların endonukleazlar ile kesiminin ardından gerçekleştirilen PZR analizi ile rastgele bölgelerinin çoğaltılması sonucu elde edilen bant profilleri değerlendirilerek belirlenmektedir (Li ve Tollefsbol, 2011; Fu ve diğ., 2012). Bu yöntem sadece enzimin tanıma noktasında meydana gelen değişim hakkında bilgi verici olmaktadır.

Genom düzeyinde 5mC'lerin belirlenmesinde HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi), MS (Kütle Spektrometrisi) ve immün çöktürme gibi yöntemler de kullanılmaktadır. HPLC ve MS gibi kromatografik yöntemler uzun süre, yüksek maliyet ve özel ekipman ihtiyacı gerektirmektedir (de Oliveira ve diğ., 2020; Gupta ve diğ., 2022). İmmün çöktürme yönteminde ise oluşturulan antijen-antikör komplekslerinin çöktürülmesi sonucu görünür hale getirilmesi ile DNA metilasyonu sadece kalitatif olarak belirlenebilmektedir (Mohn ve diğ., 2009). Duyarlılığı düşük olan bu yöntem yüksek miktarda DNA kullanımını gerektirmektedir (Karpova ve Umemori, 2016). Bu yöntemlere alternatif olarak kullanılan ELISA yöntemi ile metile DNA'nın varlığı özgün antikör kullanımı ile tüm genom düzeyinde hem kalitatif ve hem de kantitatif olarak hızlı ve yüksek duyarlılıkta belirlenebilmektedir. Bu yaklaşım az miktarda DNA'yla çalışma olanağı sağlaması ve DNA'daki metilasyonu belirleme hassasiyetinden dolayı kullanımda tercih edilmektedir (de Oliveira ve diğ., 2020).

2.1.1.1. Bisülfid Dizileme Yöntemi

Bisülfid dizileme ilk olarak Frommer ve ark. (1992) tarafından tanımlanan DNA metilasyonu belirleme tekniğidir. Bu yöntemde DNA molekülünde yer alan 5mC'lerin metile olmamış C'lerden ayırt edilmesi ile DNA metilasyonu tespit edilmektedir. Bisülfid dizileme yöntemi sırasıyla sodyum bisülfid uygulaması, PZR çoğaltımı ve dizileme olmak üzere üç temel aşamayı içermektedir. Bisülfid dizileme işlemi için çift iplikli DNA (ing., double stranded DNA; dsDNA) örnekleri ilk olarak sodyum bisülfid ile muamele edilerek metillenmemiş C'ler deaminasyon yoluyla U'ya dönüştürülür (Li ve Tollefsbol, 2011; Toparslan ve diğ., 2015).

Bisülfid dönüşümü sonrası PZR için tek iplikli DNA'ya (ing., single stranded DNA; ssDNA) özgün primerler tasarlanır. CpG dizilerinin metillenmemesi durumunda, bisülfid uygulaması sonrası C bazı U bazına dönüştürüleceği ve PZR sırasında C'ler yerine T'ler çoğaltılacağından, primer tasarımı sırasında oligonukleotidler içerisindeki C'ler T nukleotidleri ile değiştirildikten sonra primer sentezi gerçekleştirilir. Bisülfid dönüşümü işlemi sonrası DNA iplikleri artık birbirine tamamlayıcı olmadıklarından bir primer çifti ile sadece bir DNA ipliğinin çoğaltımı gerçekleştirilmektedir. Geri primer, dönüştürülmüş DNA'ya bağlanırken, ileri primer geri primer tarafından oluşturulan yeni ipliğe bağlanarak çoğaltım sağlanmaktadır (Şekil 2.5) (Li ve Dahiya, 2002; Tusnady ve diğ., 2005).



Şekil 2.5: Sodyum bisülfid dönüşümü sonrası ileri ve geri primer çiftleri kullanılarak PZR ile kodlanan (İplik A) ve kalıp (İplik B) DNA ipliklerinin çoğaltımı (Gahlaut ve diğ., (2002)'den alıntılanarak düzenlenmiştir).

Bisülfid dönüşümü sonrası, hedef dizilerdeki T nukleotidi bolluğundan dolayı PZR'de oda sıcaklığında inaktif haldeyken yüksek sıcaklıklarda aktive olan bir enzim kullanılmaktadır.

Enzimin bu özelliği sayesinde primer dimer oluşumlarının önlenmesi ve T'ce zengin bölgeden yüksek özgüllükte ürün çoğaltımı sağlanmaktadır (Farrell, 2009).

PZR ile elde edilen çoğaltım ürünlerinin dizilemesi Sanger yöntemi ile yapılmaktadır (Kurdyukov ve Bullock, 2016). Sanger yönteminde, deoksinukleotidler ile birlikte reaksiyon ortamına eklenen nukleotidlerin tek tipteki dideoksi formları *in vitro* DNA replikasyonu sırasında DNA polimeraz tarafından seçici olarak eklendiğinde zincir uzaması o noktada sonlandırmaktadır (Alex ve diğ., 2020). Dizileme sırasında DNA'daki 5mC'ler C olarak okunurken, metilasyona uğramamış C'ler T olarak okunacağından bisülfid uygulaması yapılmayan DNA örneğiyle, bisülfid dönüşümü tamamlanmış DNA örnekleri karşılaştırılarak metilasyon saptanmaktadır. Bisülfid dizileme yöntemi ile gen düzeyinde ya da tüm genomdaki metilasyon profilleri belirlenebilmektedir (Hebestreit ve diğ., 2013).

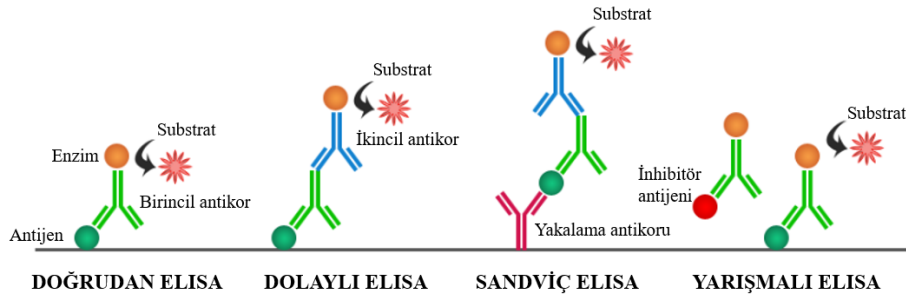
2.1.1.2. ELISA Yöntemi

ELISA yöntemi, 1971 yılında iki farklı araştırma ekibi Engvall ve Perlmann ile Van Weemen ve Schuurs tarafından eş zamanlı olarak geliştirilmiştir. ELISA, biyolojik sıvılardaki antijenin ya da antikorun varlığını ve konsantrasyonunu tespit etmek için antikorları ve enzim aracılı renk değişimini kullanan immunokimyasal bir ölçüm yöntemidir (Walker, 1987).

ELISA yöntemi ile tayin edilecek maddeler yapı ve özellik açısından farklılık gösterebildiğinden, kolorimetrik ölçümlerden alınan sinyalin daha hassas biçimde saptanmasını sağlayan farklı ELISA yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler doğrudan, dolaylı, sandviç ve yarışmalı olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.6). Doğrudan ELISA, düşük duyarlılığa sahip olduğundan yüksek molekül ağırlığına sahip antijenlerin miktarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu yöntemde enzim ile etiketli bir antikor ya da antijen kullanılarak örnekteki antijen veya antikorun miktarı belirlenmektedir. Dolaylı ELISA'nın doğrudan ELISA yönteminden farkı, ölçüm yapılacak antijeni belirleyecek antikorun birincil antikora bağlanan ikincil antikor olmasıdır. Doğrudan ELISA'ya göre bu yöntem yüksek duyarlılığa sahiptir. Sandviç ELISA yöntemi diğer yöntemlere göre daha yüksek duyarlılığa sahip olmasına rağmen yüksek maliyet gerektirir ve zaman alıcıdır. Bu yöntemin sandviç olarak adlandırılmasının nedeni ilgili antijenin iki antikorun arasında yer almasıdır. Yarışmalı ELISA'da, örnek antijeni ve enzim ile etiketli antijen veya antikor molekülleri, kuyucuklardaki antijen ya da antikorlara bağlanmak için birbirleriyle rekabet halindedir. Örnekteki antijen miktarı ile renklenme

arasında ters orantı olduğundan antijen miktarı yüksek olduğunda düşük absorpsiyon, düşük olduğunda yüksek absorpsiyon elde edilmektedir (Gan ve diğ., 2013; Aydın, 2015).

Bu çalışmada, tüm genom düzeyinde 5mC'lerin miktar tayini için uygun maliyetli ve yüksek duyarlılığa sahip dolaylı ELISA yöntemi temelli ticari bir kit (MethylFlash™ Methylated 5mC DNA Quantification) kullanılmıştır. Bu yöntemin çalışma prensibine göre, DNA'lar yüksek DNA afinitesine sahip olacak şekilde hazırlanmış kuyucuklara bağlama çözeltisi ile eklenmekte, ardından plakalar inkübasyona bırakılarak gDNA'ların kuyucuklara bağlanması sağlanmaktadır. Birincil antikorun ortama eklenmesiyle meydana gelen antijen-antikor kompleksi, enzim ile etiketli ikincil bir antikor eklenerek görünür hale getirilmektedir. Daha sonra ortama enzimin substratı ilave edilerek renk oluşturulmakta ve ardından mikropłaka okuyuculu spektrofotometrede absorpsiyon okunarak kolorimetrik olarak OD ölçümü yapılmaktadır. Elde edilen OD değerlerinin kit yönergesinde yer alan formüllere yerleştirilmesi ile 5mC'lerin içeriği belirlenmektedir. 5mC'lerin miktarı ölçülen OD yoğunluğu ile doğru orantılıdır.



Şekil 2.6: ELISA yönteminin çeşitlerinin gösterimi (Boster Bio, (2024)'ten alıntılanarak düzenlenmiştir).

2.2. BİTKİ PATOJENİ MANTARLAR

Mantarlar, çok hücreli ya da mayalar gibi tek hücreli formda olabilen çok çeşitli türleri kapsayan ökaryotik organizma grubudur (Naranjo-Ortiz ve diğ., 2020). Dünya çapında çeşitli bitkilerde enfeksiyona yol açan yaklaşık 8000 mantar türü bitki patojeni olarak bilinmektedir (Xu, 2022). Genellikle sıcak ve nemli iklimlerde görülseler de tüm iklim tiplerinde bitkilerdeki çeşitli hastalıklardan sorumlu olmaktadır (Prapagdee ve diğ., 2008; Nikitin ve diğ., 2023). Dünyadaki temel bitkisel besin kaynaklarından arpa, buğday ve mısır gibi tahıllarda meydana gelen hastalıkların %70-80'i bu patojenik mantarlardan kaynaklanmaktadır (Peng ve diğ.,

2021). Bu türler ürün kalitesi ve verimini önemli ölçüde azalttığı için yıllık yaklaşık %14 ürün verimi kaybına neden olarak küresel ekonomiyi olumsuz yönde etkilemektedir (Anand ve Rajeshkumar, 2022).

Fitopatojenik mantarlar, konak organizmadaki beslenme biçimlerine ve patojenik yaşam tarzlarına göre sınıflandırılmaktadır. Biyotrofik patojenler (biyotroflar) enfekte ettikleri bitkilerden kendisi için gerekli besin maddelerini organizmanın ölümüne yol açmadan sağlamaktadır. Biyotrofların yaşamını sürdürmesi konak bitkinin canlı kalmasına bağlıdır. Nekrotrofik mantarlar, biyotrofların aksine enfekte ettikleri bitkiye zarar vererek bitki hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır. Bu iki yaşam biçimine ek olarak, hemibiyotrofik yaşam biçiminde olanlar enfeksiyonun erken aşamalarında biyotrofik, enfeksiyonun ilerleyen aşamalarında da nekrotrofik özelliklerinden dolayı bitki dokularının ölümüne neden olmaktadır (Horbach ve diğ., 2011; Doehlemann ve diğ., 2017; Abacı-Günyar, 2017).

Bitki patojeni mantarlar, bitkide hastalığın ilerlemesine katkı sağlayan mikotoksin olarak adlandırılan sekonder metabolitleri üretmektedir (Horbach ve diğ., 2011). Bu toksinler, bitkide çoğunlukla solgunluk, nekroz, yaprakta leke gibi semptomlara yol açmakta, bitkinin sağlıklı gelişim göstermesi ve büyümesini sınırlamaktadır (Peng ve diğ., 2021). Mikotoksinler sadece bitkileri değil, bulaştığı yiyecekleri tüketen insan ve hayvanlar üzerinde de toksik etkilere neden olmaktadır (Ji ve diğ., 2019). Günümüzde 400'den fazla mikotoksin olduğu bilinmektedir. Bunlar mantarın kökeni, yapısı, işlevi ve biyolojik etkileri açısından çeşitlilik göstermektedir (Daou ve diğ., 2021; Pavlenko ve diğ., 2024). Tahıl kontaminasyonuna neden olan mikotoksinler arasında trikotosenler, zearalenon, okratoksin A, fumonisinler ve aflatoksinler, patulin, sitrinin, ergot, fusarik asit ve fusarinler yer almaktadır (Adeyeye, 2016).

2.2.1. *Fusarium* cinsi

Fusarium, filogenetik analizlerle tanımlanmış en az 300 farklı türü içeren en büyük filamentli bitki patojeni mantar cinsidir (O'Donnell ve diğ., 2015; Ölmez ve Tunalı, 2019). Bu grubun bitkilerde hastalıklara neden olan üyeleri, bitki kökleriyle parazitik ya da saprofitik yaşam süren toprak kaynaklı fitopatojenik mantarlar olarak bilinmektedir (Nelson ve diğ., 1994).

Fusarium türleri, çeşitli tahıl bitkilerinin yanında birçok süs, tarla, bahçe ve orman bitki türlerinde de farklı hastalıklara neden olmaktadır (Sharma ve diğ., 2018). Özellikle arpa, buğday ve mısır gibi küçük taneli tahıllarda hastalık oluşturarak ürün kalitesini ve verimini

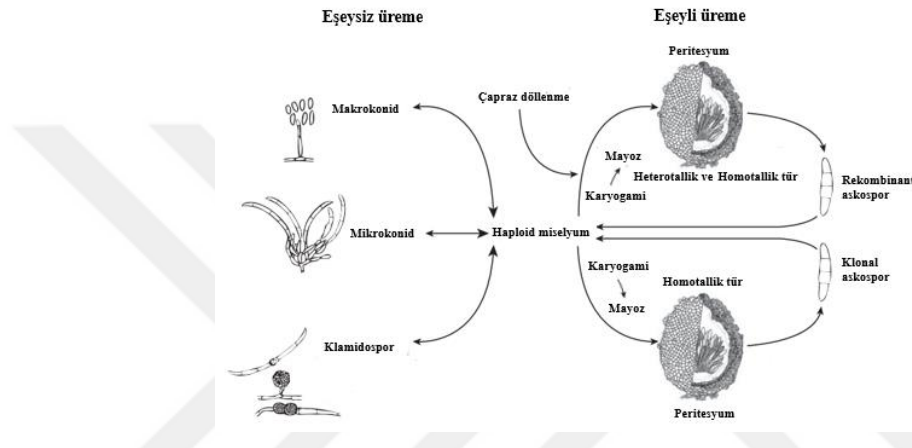
büyük ölçüde azaltmaktadır. Bitkilerde *Fusarium* başak yanıklığı, kök ve kök boğazı çürüklüğü tarımsal alanda verimi düşürerek yüksek ekonomik kayıplara yol açan en önemli hastalıklardır (Abdallah-Nekache ve diğ., 2019). Bu nedenlerden dolayı, *Fusarium* fitopatojenik mantarlar arasında en çok ekonomik kayba yol açan 10 cins arasında yer almaktadır (Timmusk ve diğ., 2020).

Günümüzde *Fusarium* türleri dünyanın tüm coğrafi bölgelerinde- genellikle toprakta ve bitki artıkları üzerinde, havada, suda ve canlı bitkiler üzerinde yaygın olarak bulunmakta, iklim değişimi etkisiyle de hastalıklara yol açmaktadır (Nikitin ve diğ., 2023). *Fusarium* türlerinden bazıları konak bitkiye doğrudan bulaşırken bazı türler yaralanan bitkiye bulaşabilmektedir. Yaralanma, bitkiyi *Fusarium* enfeksiyonuna karşı hassas hale getirmektedir (Zakaria, 2023).

Fusarium türleri mikotoksinleri en çok üreten fitopatojenler arasında yer almaktadır (Ekwomadu ve diğ., 2021). *Fusarium*'un 50'den fazla türünün çeşitli mikotoksinleri ürettikleri bildirilmektedir (Adeyeye, 2016). En çok çalışılan *Fusarium* mikotoksinleri trikotesenler, fumonisin B1, zearalenon, fusarinler ve fusarik asittir. Trikotosenler, bitkilere ve hayvanlara karşı yüksek toksisiteleri nedeniyle en iyi şekilde tanımlanmış mikotoksin sınıfıdır. T-2 toksini ve HT-2 toksini A tipi trikotesenler grubunda yer alırken, deoksinivalenol (DON), nivalenol (NIV), 4-asetilnivalenol (4-ANIV), 3-asetildeoksinivalenol (3-ADON) ve 15-asetildeoksinivalenol (15-ADON) B tipi trikotesenler grubuna dahildir. Dünya genelinde, küçük taneli tahıl bitkilerindeki DON'un başlıca nedeninin *Fusarium* türleri olduğu bildirilmiştir (Ji ve diğ., 2019; Perincherry ve diğ., 2019).

Fusarium türleri hem eşeyli ve hem de eşeysiz olarak üreyebilmektedir (Şekil 2.7). Eşeysiz üreme üç tür mitotik spor (makrokonid, mikrokonid, klamidospor) aracılığıyla gerçekleşmektedir. Makrokonidler, sporodokya olarak adlandırılan yapılarda üretilirken mikrokonidler ise hava hifleri tarafından üretilmektedir. Mikrokonidlerin varlığı tür tanısında kullanılan önemli bir ölçüttür. *Fusarium* türleri ortamda uygun bir konak bulunmadığında uzun süre hayatta kalmalarını sağlayan kalın duvarlı klamidosporları üretmektedir. Klamidosporlar tekli, ikili, zincir veya kümeler halinde taşınabilmektedir (Nelson ve diğ., 1994; Ma ve diğ., 2013). Eşeyli üreme, *Mat 1-1* ve *Mat 1-2* eşem allellerinin her ikisini de taşıyan homotallik olarak adlandırılan türler tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu türler kendi ürettiği sporlar aracılığı ile zigot oluşturup eşeyli olarak üreyebilmektedir. Heterotallik türler ise eşem allellerinden sadece birini bulundurduklarından eşeyli üremek için farklı eşem allelini taşıyan

türlere ihtiyaç duymaktadır (Yun ve diğ., 2000). *Fusarium* türlerinde eşeyli üreme, iki haploid hücrenin birleşmesiyle gerçekleşmektedir. Haploid miselyumların sitoplazmalarının kaynaşması (plazmogami) ile dikaryotik (iki haploid çekirdek) hücre meydana gelmektedir. Haploid çekirdekler birleşerek (karyogami) diploid yapıda zigot çekirdeğini oluşturmaktadır. Daha sonra diploid zigot mayoz bölünme geçirerek haploid yapıda askosporları meydana getirmektedir. Askosporlar peritesyum adı verilen yapı içerisinde askus kesesinde sekizli gruplar halinde üretilmektedir (Ma ve diğ., 2013; Samanta, 2015).



Şekil 2.7: *Fusarium* türlerinde eşeyli ve eşeysiz üreme (Ma ve diğ., (2013)'ten alıntılanarak düzenlenmiştir).

2.2.2. *F. culmorum*

F. culmorum özellikle tahıl bitkilerinden buğday ve arpada oluşan *Fusarium* başak yanıklığı (FBY) ve kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalıklarının başlıca etmenidir (Scherm ve diğ., 2013; Çepni ve diğ., 2013). Genellikle ılıman, sıcak ve nemli iklime sahip bölgelerde yaygın olarak bulunan bu tür, yurdumuzda Akdeniz, Marmara, Ege, Karadeniz ve İç Anadolu Bölgelerinde yayılım göstermektedir (Schilling ve diğ., 1996; Backhouse ve Burgess, 2002; Yörük ve diğ., 2016; Tok ve Arslan, 2016). Bu patojen, bitki dokularında başlangıçta kısa bir biyotrofik yaşam döngüsündeyken, bitki hücre duvarını bozan enzimleri üreterek nekrotrofik yaşam döngüsüne geçmektedir (Scherm ve diğ., 2013).

FBY, genellikle yağışlı döneme denk gelen çiçeklenme zamanında ortaya çıkmaktadır. Bu hastalık başak içerisindeki taneleri enfekte ederek buğdayın dane kalitesi ve verimini azaltmaktadır (Mert-türk ve diğ., 2013). FBY Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Çin ve Kanada gibi birçok ülkede ve yurdumuzda buğdaydaki verim kayıplarının en önemli nedeni

olarak bildirilmiştir (Tunalı ve diğ., 2006; Köycü, 2021). Kök ve kök boğazı çürüklüğü kökte lezyonlar, yapraklarda sararma ve solma semptomlarına yol açmaktadır. Semptomların toprak üstü organlara ulaşması genellikle bitki ölümü ile sonuçlanmaktadır (Williamson Benavides ve Dhingra, 2021).

F. culmorum ile enfekte bitkilerde hastalığın ilerlemesi ile birlikte patojen tarafından farklı çeşitteki mikotoksinler de bol miktarda üretilerek bitki dokularında birikmektedir. DON ile asetlenmiş türevleri, T-2 toksini, NIV ve 4ANIV, zearalenon ve fusarinler *F. culmorum* tarafından en çok üretilen mikotoksinlerdir (Wagacha ve Muthomi, 2007; Scherm ve diğ., 2013).

F. culmorum kısa, küt uçlu, kavisli, nispeten kalın duvarlı ve genellikle 3-5 bölmeli olan makrokonidler üretmektedir. Genellikle bol miktarda ve hızlı şekilde üretilen klamidosporeleri hifler arasında oval ya da küresel şekillidir. Klamidosporeler tekli, zincirler veya kümeler halinde de gözlenebilmektedir. Bu türde eşeysiz üreme makrokonidler ve hiflerden ya da makrokonidyumdan farklılaşan klamidosporeler aracılığıyla sağlanmaktadır. Mikrokonidler ise belirli kültürel koşullar dışında oluşmamaktadır. *F. culmorum*, patates dekstroz agar (PDA) besi ortamında optimum 25 °C sıcaklık koşulunda hava miselyumu ile hızlı bir şekilde üremektedir. Miselyumlar genellikle açık sarı, kırmızı ya da beyaz olarak gözlenmektedir. Yaşlanmış olan kültürlerde ise turuncu ya da kırmızı-kahverengi renkte sporodokya yapısı ortaya çıkmaktadır. Tek eşem alleli taşıdığı için *F. culmorum*'da eşeyli çoğalma gerçekleşmez (Nelson ve diğ., 1994; Wagacha ve Muthomi, 2007; Scherm ve diğ., 2013).

2.3. *Fusarium* ile MÜCADELEDE FUNGUSİT KULLANIMI

Fusarium türleri ekonomik açıdan önemli bitkilerin neredeyse tamamında çeşitli hastalıklara neden olarak ürün kayıplarına yol açtığından üzerinde en çok çalışılan bitki patojeni mantarlar arasındadır (Glenn ve diğ., 2007). Dünya çapında geniş alanlarda etkili olması, küresel ekonomik kayıpların ciddi boyutlara ulaşmasına neden olmaktadır (Leslie ve Summerell, 2013; Nikitin ve diğ., 2023). Bu nedenlerden dolayı tarımsal alanda *Fusarium* ile mücadele büyük önem taşımaktadır. *Fusarium* türleri ile etkin mücadelede dünya çapında kullanımı sıklıkla ve yaygın olarak tercih edilen yaklaşım fungusit uygulamasıdır (Yörük, 2018; Köycü, 2018; McLaughlin ve diğ., 2023). Fungusitler, hastalık etmeni olan mantar türlerini öldüren veya büyüme ve üremesini baskılayan kimyasal ajanlardır (Yoon ve diğ., 2013; Thind, 2021).

Fungusit aktif bileşenleri, fungal büyüme ve gelişimde rol oynayan önemli hücrel mekanizmalar üzerine etki ederek antifungal aktivite göstermektedir (Pierre ve diğ., 2002; Russell, 2005). Biyokimyasal etki biçimlerine göre fungusitler, mantarda hücrel solunumu, mikrotübül işlevini, ozmoregülasyonu, metiyonin biyosentezini ve sterol biyosentezini etkileyenler olmak üzere beş farklı kategoride sınıflandırılmaktadır (Pierre ve diğ., 2002). Fungusitler uygulama kolaylıkları, uygun maliyetli olmaları ve mantar üzerindeki yüksek etkinlikleri nedeniyle tarım alanlarında *Fusarium* türlerine karşı yaygın olarak kullanılmaktadır (Gondal ve diğ., 2012; Lucas ve diğ., 2015).

Fungusitlerin fazla miktarda ve tekrarlı kullanımları, mantarın doğal biyolojik sistemlerinde değişime yol açarak fungal direncin gelişimine neden olabilmektedir (Schmitt ve Seddon, 2005; Yoon ve diğ., 2013). Patojen mantarlardaki fungusit direnci gelişiminin önlenmesi ve fungusitin etkinliği ve sürekliliğinin sağlanması açısından uygun aktif bileşen dozlarının belirlenmesi önemlidir (Köycü, 2018).

2.3.1. Karbendazim

Metil benzimidazol karbamat (MBC) grubu fungusitler piyasaya sunulduğu 1970'lerin başından günümüze tarım alanlarında patojenlerin gelişimini durdurarak mantar hastalıklarının kontrol edilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Russell, 2005; Vela-Corcía ve diğ., 2018). Karbendazim [1H-1,3-benzimidazol-2-yl karbamat] FBY'nin kontrolü için çoğunlukla buğday ekimi sırasında uygulanan MBC sınıfına ait fungusitlerden biridir (Bi ve diğ., 2009; Machado ve diğ., 2017). Yurdumuzda da çok uzun yıllar bu amaçla tarım arazilerine uygulanan karbendazim Tarım ve Orman Bakanlığı'nın Yasaklanan Bitki Koruma Ürünleri Aktif Madde Listesi'nde¹ yer almıştır. Ülkemizde ithalat ve imalatı 23.06.2017 tarihinde, kullanımı ise 01.01.2018 tarihinde sonlandırılmıştır.² Ancak Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından 25.07.2019 tarihli, 21817801-305.04.02.02-E.2265284 sayılı ve "Görüş-RF/İhracatta Yasaklı İlaç" konulu yazısında yurdumuzda yetiştirilen ve ihraç edilen tarım ürünlerinde karbendazimin tespit edildiği rapor edilmiştir.³ Bununla birlikte 31 Ocak 2018 tarihli ve 30318 sayılı Resmî Gazete yazısında⁴ karbendazimin aktif bileşen olarak içinde bulunduğu antifungal ilacın açık ihale usulü alımı ile ilgili bildirimle ulaşılmıştır. Tüm bu belgeler karbendazimin ülkemizde

¹ <https://www.tarimorman.gov.tr/Konular/Bitki-Sagligi-Hizmetleri/Bitki-Koruma-Urunleri-Ve-Makinalari/Bitki-Koruma-Urunleri> [Ziyaret tarihi: 23.04.2024]

² <https://aydin.tarimorman.gov.tr/Duyuru/205/Carbendazim-Aktif-Madde-Kullaniminin-Sonlandirilmesi> [Ziyaret tarihi: 23.04.2024]

³ <https://bianet.org/yazi/rusya-sayesinde-fark-ettigimiz-carbendazim-sorunu-211406> [Ziyaret tarihi: 23.04.2024]

⁴ <https://www.resmigazete.gov.tr/ilanlar/eskiilanlar/2018/01/20180131-3.htm#A01> [Ziyaret tarihi: 23.04.2024]

Fusarium türlerinin de aralarında yer aldığı patojenler ile mücadelede hala kullanıldığını göstermektedir.

Mikrotübüller hücre bölünmesi sırasında kromozomların ayrılmasından ve hücre morfolojisinin korunmasından sorumlu olan hücre iskeleti proteinleridir. Karbendazimin mikrotübüllerin ana bileşeni olan β -tubulin'e bağlanarak polimerizasyonunu inhibe ettiği, *β 2-tubulin* geni ile etkileşime girerek mikrotübül dinamiklerinin (mikrotübülün birleşme ve ayrılması) bozulmasına yol açarak hücre bölünmesinin durmasına neden olduğu bildirilmektedir (Singh ve diğ., 2016; Zhou ve diğ., 2016).

Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından Ekonomi Bakanlığı'na gönderilmiş olan 13 Ağustos 2017 tarihli ve 19793230-320.99-1981 sayılı resmi yazısında karbendazim kullanımının insan ve çevre sağlığı üzerinde birçok soruna yol açabileceği bildirilmiştir. Karbendazimin kullanım miktarı aşıldığında kadın ve erkeklerde kısırlığa yol açtığı, hormonal dengesizliklere neden olduğu, sinir sistemini olumsuz etkilediği ve genler üzerinde toksik etkili olduğu tespit edilmiştir. Bunlarla birlikte piyasada ticari olarak ulaşılan ürünün karbendazim ile birlikte toksik etkili 1,2-fenildiamini (AE F037197) içermesi de hem insanlar hem de çevre üzerindeki etkileri hakkında endişe verici olmaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı karbendazimin ülkemizde kullanımının yasaklanmasına rağmen yurdumuzda yetişen tarım ürünlerinde bu aktif bileşiğin tespit edilmesi sağlık ve çevre üzerinde ciddi sorun teşkil etmektedir.

Karbendazimin *β 2-tubulin*'in üzerinde neden olduğu etkilerinin araştırılması, bu gende meydana gelebilecek farklı epigenetik varyasyonların belirlenmesi ve bu değişikliklerin ileriki nesillere aktarılmasıyla olası bir fungusit direncine yol açma potansiyeli bakımından önemlidir. Bu kapsamda yüksek lisans tez çalışmasında fungusit aktif bileşiklerinden karbendazimin bitki patojeni *F. culmorum*'da temel epigenetik mekanizmalardan DNA metilasyonu üzerindeki etkisinin hem *β 2-tubulin* geninde hem de aktif ajanın farklı mekanizmalar üzerinde etkili olabileceği düşünülerek tüm genom düzeyinde sırasıyla bisülfid dizileme ve ELISA yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. *F. culmorum* REFERANS SUŞUNUN *in vitro* ÜRETİMİ

Yüksek lisans tezi kapsamında karbendazimin etkisi, Dr. Pierre Hellin'in (Louvain Katolik Üniversitesi) İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonuna kazandırdığı *F. culmorum* UK99 (FcUK99) referans suşu üzerinde araştırıldı. Derin dondurucuda (-80 °C) muhafaza edilen referans suşun gliserol stoğu sentetik nutrient agar (SNA) besi ortamına (Tablo 3.1) ekilerek 25°C sıcaklık ve %50 nem koşullarını sağlayan gündüz/gece (16/8 saat) periyotlu iklimlendirme kabininde 7 gün süre ile canlandırıldı. Süre sonunda canlandırılan kültürden steril kürdan yardımı ile toplanan miselyum örneği patates dekstroz agar (PDA) besi ortamına (Tablo 3.1) ekilerek aynı koşullarda 7 gün boyunca üretildi.

Tablo 3.1: *F. culmorum* UK99 referans suşunun üretiminde kullanılan besi ortamları ve içerikleri, pH 5.6.

Besi ortamı	Bileşenler	Derişim (g/L)
Sentetik Nutrient Agar (SNA)	KH ₂ PO ₄	1
	KCl	0.5
	KNO ₃	1
	Glukoz	0.2
	Sukroz	0.2
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
	Agar	20
Patates Dekstroz Agar (PDA)	Patates dekstroz özütü	15
	Agar	20

3.2. FcUK99 ÜREMESİNİ İNHİBE EDEN MİNİMUM KARBENDAZİM KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

Karbendazim (Sigma 378674) aktif bileşeni ticari yolla elde edildi ve 300 µg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde saf aseton içerisinde süspanse edilerek çözüldü. Canlandırıldıktan sonra 7 gün süre ile üretilen fungal kültürden 0.25 cm² miselyum plakları alınarak karbendazimin 0.7, 1.4 ve 2.8 µg/mL konsantrasyonlarını içeren PDA'ya ekildi. Aktif bileşen içermeyen besi ortamında üretilen çalışma materyali ile kontrol grubu oluşturuldu. Deney ve kontrol gruplarına ait kültürlerde üreme 7 gün boyunca Bölüm 3.1'de verilen koşullarla sağlandı.

Karbendazimin *F. culmorum* referans suşunda üremeyi durduran en düşük konsantrasyon değeri (minimum inhibitör konsantrasyonu; MİK) belirlendi. MİK dozunun % 25'i (MİK₂₅) ve % 50'si (MİK₅₀) hesaplandı ve bu konsantrasyonlarda karbendazim içeren PDA besi ortamları ile deney grupları oluşturuldu. Kontrol ve deney gruplarını içeren kültürlerde inkübasyonun 4. ve 7. günlerinde radyal üreme çap değerleri ölçülerek doğrusal büyüme oranları (ing., linear growth rate; LGR) mm/gün olacak şekilde hesaplandı. Karbendazim uygulamasının yol açtığı inhibisyon, MİK₂₅ ve MİK₅₀ LGR değerlerinin kontrol grubunun LGR değerine oranlanması ile belirlendi ve % cinsinden verildi. Deneyler üç biyolojik tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Belirlenen LGR değerlerinin ortalamaları alındı ve veriler tek yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak değerlendirilerek karbendazimin FcUK99'un üremesini etkileyen dozları ortaya kondu.

3.3. KARBENDAZİM ETKİSİNİN FLORESAN MİKROSKOBU ile HÜCRESEL GÖSTERİMİ

F. culmorum referans suşuna ait kontrol ve deney gruplarının PDA kültürlerinden alınan örnekler 500 µL 1× PBS (ing., phosphate buffered saline; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄) tamponu içeren 1.5 mL'lik mikrotüplere aktarıldı. Hücre fiksasyonu için tüplere % 4 paraformaldehit ve % 0.1 Triton X-100 eklendi. Hücreler 60 dk boyunca oda sıcaklığında karanlıkta bırakılarak fikse edildi. İnkübasyonun ardından hücreler 13000 rpm hızda 5 dk boyunca yapılan santrifüj ile çöktürüldü. Hücreler 1.5 mL 1× PBS ile iki kez yıkandıktan sonra 100 µL 1× PBS içerisinde süspanse edildi. Ardından tüplere 5 µL akrinin turuncusu/etidyum bromür (at/etbr; 60 µg.mL⁻¹/100 µg.mL⁻¹) floresan boyası eklendi ve oda sıcaklığında karanlıkta 5 dk inkübe edildi. Süre sonunda hücreler 1.5 mL 1× PBS ile iki kez yıkılarak fazla boya uzaklaştırıldı. Hücreler 100 µL 1× PBS ile süspanse edildi. Karbendazimin hücre düzeyinde neden olduğu apoptotik etki floresan mikroskopunda GFP (At 502/526 nm, Etbr 510/595 nm) ve Texas Red (595/613 nm) filtreleri kullanılarak görüntülendi.

3.4. GENOMİK DNA İZOLASYONU ve ANALİZİ

Kontrol ve deney gruplarının yedi günlük kültürlerinin genomik DNA'ları (gDNA), TNES tamponunun kullanıldığı Doyle ve Doyle (1987) yöntemi modifiye edilerek izole edildi. Bu kapsamda kültürlerden toplanan 50 mg yaş miselyum örneği porselen havan içerisinde 750 µL TNES (pH 7.5; Tris 50 mM, NaCl 0.4 M, EDTA 100 mM (pH 8), SDS 0.5%) tamponu ile

parçalanarak homojen hale getirildi. Homojenat steril mikrotüplere aktarıldı ve üzerine 750 µL kloroform:izoamil alkol (24:1) eklendikten sonra birkaç kez ters düz edilerek karıştırıldı. 13000 rpm'de 2 dk santrifüj yapıldıktan sonra üst sıvı yeni bir mikrotüpe aktarıldı. Tüplere üst sıvının 2 katı hacimde saf etanol (-20°C) eklenerek -80°C'de 20 dk beklendi. 13000 rpm'de 1 dk santrifüj gerçekleştirildikten sonra üst sıvı uzaklaştırılarak pellet kurumaya bırakıldı. Kurutma işleminin ardından pellet 200 µL destile su (dH₂O) içerisinde çözdürüldü. Üzerine 10 µL RNazA (Macherey-Nagel, 10 mg/mL) eklendi ve 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı (her 5 dk'da bir tüpler ters düz edilerek karıştırıldı). Tüplere 200 µL kloroform:izoamil (24:1) eklendi, birkaç kez ters düz edilerek karıştırıldı ve 13000 rpm'de 1.5 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı yeni bir mikrotüpe aktarıldı. Üzerine 1/10 hacim 3M NaOAc ve 2:1 hacim saf etanol (-20°C) eklenerek -80°C'de 20 dk inkübe edildi. 13000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldıktan sonra üst sıvı uzaklaştırılarak pellet kurumaya bırakıldı. Kurutma işlemi sonrası gDNA'yı içeren pellet 50 µL dH₂O ile su içerisinde çözdürüldü.

İzole edilen gDNA'lar spektral ve elektroforetik yöntemler kullanılarak nitel ve nicel olarak analiz edildi. Spektrofotometre cihazı ile gDNA'ların UV ışığının 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçüldü. Çift iplikli DNA molekülü için 1 optik densite (OD) değeri 50 µg/mL'ye karşılık geldiğinden, gDNA miktarı formül 3.1'e göre hesaplandı (Maniatis ve diğ., 1982).

$$\text{gDNA Konsantrasyonu } (\mu\text{g/mL}): A_{260} \times \text{Sulandırım Oranı} \times 50 \quad (3.1)$$

gDNA'ların saflığı ise UV ışığının 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerlerinin oranı (A_{260}/A_{280}) ile belirlendi. Bu oranı 1.8-2.0 değer aralığında bulunan gDNA'lar saf olarak kabul edildi (Maniatis ve diğ., 1982).

Spektral yönteme ek olarak gDNA'ların miktarı ve bütünlüğü agaroz jel elektroforezi kullanılarak da kontrol edildi. Bu amaçla 40 mL %1'lik agaroz jel hazırlandı. Jelin derişimine göre agaroz tartılarak tris-asetat-EDTA (TAE) tamponunda (Tablo 3.2) çözdürüldü ve 2 µL etidyum bromür (10 mg/mL) eklendikten sonra jel kasetine döküldü. Jelin polimerize olmasının ardından izole edilen gDNA'lar ve molekül ağırlıkları bilinen fragmentleri içeren DNA standardı (λ HindIII, Thermo Scientific, SM0101, ABD) eş zamanlı olarak yükleme tamponuyla (Tablo 3.2) agaroz jele yüklendi. Elektroforez 70 volt ve 110 amper sabit güçte gerçekleştirildi. Elektroforez sonrası gDNA'lar jel görüntüleme cihazı kullanılarak UV ışık altında

fotoğraflandı. gDNA'ların miktarı ve bütünlüğü jelde ayrılmış DNA standardının fragmentleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

Tablo 3.2: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlara ait bileşenler ve derişimleri.

Tampon	Bileşenler	Derişim
Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu	Tris bazı	2
	Glasiyal asetik asit	% 0.571
	EDTA(pH 8.0)	0.05 M
Yükleme Tamponu (6×)	Tris-HCl (pH 7.6)	10 mM
	Bromofenol Mavisi	% 0.03
	Ksilen Siyanol FF	% 0.03
	Gliserol	% 60
	EDTA	60 mM

3.5. SODYUM BİSÜLFİT DÖNÜŞÜMÜ

Karbendazimin 7 günlük fungal kültürlerde neden olduğu epigenetik modifikasyonlardan DNA metilasyonuna etkisi izole edilen gDNA'ların sodyum bisülfid ile muamele edilmesi yoluyla araştırıldı. Sodyum bisülfid dönüşümü ticari kit (EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit, D5030, Zymo Research) kullanılarak gerçekleştirildi. Dönüşüm aşamalarında üretici firmanın önerdiği protokol takip edildi. Her bir gDNA örneğinden 2000 ng'a karşılık gelecek hacimde örnek alınarak 0.2 mL'lik mikrotüplere yerleştirildi. Tüplerdeki hacim iki defa destile edilmiş su (ddH₂O) ile 20 µL'ye tamamlandı. Örneklerin üzerine 130 µL dönüşüm reaktifi eklenerek pipet yardımıyla karıştırıldı. Tüpün kapağında ve kenarlarında damlacıkların kalmaması için kısa süreli santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Mikrotüpler termal döngü cihazına (Swift™ MiniPro® Thermal Cycler) yerleştirildikten sonra 98°C'de 8 dk'lık denatürasyon işlemi sonrası örnekler 54°C'de 60 dk bekletildi. Kolonlara 600 µL bağlama tamponu eklendikten sonra toplama tüplerine yerleştirildi. Mikrotüp içerisindeki örnekler bağlama tamponu içeren kolonlara aktararak kapakları kapatıldı ve birkaç kez ters düz edilerek karıştırıldı. 12000 rpm'de 30 s süre ile gerçekleştirilen santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı. Ardından kolonlara 100 µL yıkama tamponu eklenerek 12000 rpm'de 30 s boyunca santrifüjlendi. Daha sonra kolonlara 200 µL desülfonasyon tamponu eklenerek 15-20 dk boyunca oda sıcaklığında (20-30°C) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 12000 rpm'de 30 s santrifüj edildi. Kolonlara 200 µL yıkama tamponu eklenerek 12000 rpm'de 30 s santrifüj gerçekleştirildi. Yıkama adımı bir kez daha tekrarlandı. Kolonlar 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine

yerleştirildi ve 10 µL elüsyon tamponu eklendikten sonra 12000 rpm'de 30 s santrifüj edilerek sodyum bisülfid dönüşümü işlemi tamamlandı.

Bisülfid uygulaması sonrası geri kazanılan metillenmemiş sitozinleri timine dönüşen tek iplikli DNA'ların spektrofotometrik analiz ile miktar tayini RNA molekülü için 1 OD değeri 40 µg/mL'ye karşılık geldiğinden formül 3.2'ye göre gerçekleştirildi (Maniatis ve diğ., 1982).

$$\text{ssDNA Konsantrasyonu } (\mu\text{g/mL}): A_{260} \times \text{Sulandırım Oranı} \times 40 \quad (3.2)$$

Dönüşüm sonrası DNA'ların saflığı ise UV ışığının 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorpsiyon değerleri oranlanarak (A_{260}/A_{280}) belirlendi (Maniatis ve diğ., 1982).

3.6. HEDEF GEN SEÇİMİ ve PRİMER TASARIMI

Literatürde karbendazim aktif bileşenin mikrotübüllerin ana bileşeni olan tubulin dimerinin β -tubulin alt birimine bağlanarak hücre bölünmesi sürecinde mikrotübül oluşumunu inhibe ettiği bildirildiğinden karbendazimin DNA metilasyonu yoluyla neden olabileceği epigenetik modifikasyonun ortaya konması amacıyla gerçekleştirilecek bisülfid dizileme yöntemi için β -*tubulin* genleri hedef gen olarak seçildi (Kara ve diğ., 2019; Tarafder ve Datta, 2022). Hem $\beta 1$ -*tubulin* hem de $\beta 2$ -*tubulin* geninin kodlanan ve kalıp ipliklerine göre primer çiftlerinin tasarımı yapıldı. Ardından oligonukleotidlerin ΔG değerleri karşılaştırıldı. Primer çiftlerinin kullanılacağı PZR'ler ile çoğaltılacak ürün boyutları karşılaştırıldı. Son olarak çoğaltılacak hedef bölgede yer alan CpG adacık sayıları kontrol edildi. Bu 3 ölçüt bakımından analizler tamamlandığında, 4.3 başlığı altında gerekçelendirildiği gibi, tez çalışması kapsamında gen içi metillenmiş C'lerin belirlenmesi için $\beta 2$ -*tubulin* geni hedef gen olarak seçildi.

Sodyum bisülfid dönüşümü sonrası gerçekleştirilecek PZR için primer tasarımı bisülfid dönüşüm kiti üreticisinin önerdiği çevrimiçi araç olan "Free Bisulfite Primer Design Tool"⁵ programı kullanılarak yapıldı. Bu kapsamda öncelikle NCBI veri tabanından⁶ (ing., National Center of Biotechnology Information) *F. culmorum* suşuna ait CP064749.1 aksesyon numaralı $\beta 2$ -*tubulin* geninin nukleotid dizilim bilgisine erişildi. Elde edilen nukleotid dizilimi FASTA formatına çevrildikten sonra hem kodlanan hem de kalıp DNA ipliklerine ait dizi bilgisi bu

⁵ <https://zymoresearch.eu/pages/bisulfite-primer-seeker> [Ziyaret tarihi: 01.04.2023]

⁶ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [Ziyaret tarihi: 01.04.2023]

ipliklerin ayrı ayrı çoğaltılması için programda yer alan veri giriş penceresine yapıştırıldı. “GET PRIMERS” komutu ile genin CpG adacıklarını içermeyen bölgelerine özgün primer çiftleri tasarlandı.

Sodyum bisülfid uygulaması yapılmayan gDNA’ların PZR ile çoğaltımında kullanılacak oligonukleotid primerler çevrimiçi primer tasarlama aracı olan “Primer 3”⁷ ile tasarlandı. Bu kapsamda NCBI veri tabanından elde edilen *F. culmorum* suşuna ait CP064749.1 aksesyon numaralı *β2-tubulin* geninin nukleotid dizilim bilgisi FASTA formatında kopyalanarak programa girildi. GC oranı %50 olarak seçildikten sonra “Pick Primers” komutu ile açık okuma çerçevesini (ORF) içine alacak şekilde özgün primer çiftinin tasarımı gerçekleştirildi. Primerlerin erime sıcaklıklarının birbirleriyle uyumuna ve yaklaşık 20 nükleotit uzunluğunda olmalarına dikkat edildi.

Farklı yaklaşımlarla tasarımı yapılan her bir primer çifti için self-dimer, hetero-dimer ve hairpin yapılarını oluşturma olasılıkları “OligoAnalyzer”⁸ programı ile kontrol edildi. Oligonukleotidler için ΔG değerleri kontrol edildi. ΔG değerlerinin -6 kcal/mol ile +2 kcal/mol aralığında olması çoğaltımda uygun kriter olarak kabul edilmektedir. Bisülfid dönüşümü sonrası kodlanan iplik için tasarlanan ileri primerin 15. pozisyonundaki T→A’ya, kalıp iplik için tasarlanan ileri primerin 11. ve geri primerin 22. pozisyonundaki A→T’ye dönüştürüldükten sonra primer çiftleri hizmet alımı ile Triogen Biyoteknoloji firması tarafından sentezlendi (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: Bisülfid dönüşümü sonrası kodlanan ve kalıp DNA ipliklerinin PZR ile çoğaltımında kullanılan primer çiftleri ve nukleotid dizileri. ssDNA: tek iplikli DNA (ing., single stranded), dsDNA: çift iplikli DNA (ing., double stranded), bs: bisülfid dönüşümü, i:İleri primer, g: Geri primer. Altı çizili nukleotidler uygun ΔG değerini sağlamak üzere değiştirilen nukleotidler göstermektedir.

Hedef DNA	Primer	Nukleotid Dizisi (5'→3')	Ürün Boyutu (bp)
Kodlanan ssDNA	Tub2-bs-1	i: GAGGTGAGTATTA <u>AT</u> GTATTGTAATTG g: CAACTAAAAACCC <u>T</u> AAAAATAATCACAA	311
Kalıp ssDNA	Tub2-bs-2	i: TTAGTTGGA <u>AT</u> TTTTGAAGGTGGTTATAG g: AAATACCTATTACATTACAATTACAAATA	307
ds gDNA	Tub2	i: ACAAACGCACACACACACACA g: AAGATGGCGGAACAAGCGA	1312

⁷ <https://primer3.ut.ee/> [Ziyaret tarihi: 01.04.2023]

⁸ <https://eu.idtdna.com/calc/analyser> [Ziyaret tarihi: 01.04.2023]

3.7. *B2-tubulin* GENİNİN PZR ile ÇOĞALTILMASI

β2-tubulin geninde meydana gelebilecek DNA metilasyonunu belirleyebilmek için; sodyum bisülfid ile dönüşümü tamamlanan deney grubu ve sodyum bisülfid uygulaması yapılmayan kontrol grubu gDNA'larından *β2-tubulin* geni ayrı reaksiyonlar kurularak PZR ile çoğaltıldı. Her iki yaklaşım için kalıp DNA yerine ddH₂O içeren tüpler negatif kontrol grubu olarak çalışmaya eklendi.

Sodyum bisülfid dönüşümü gerçekleştirilen 25 ng DNA örneği PZR uygulaması için; 1× PZR tamponu (MyTaq), 10'ar pmol ileri ve geri primer (Tub2-bs-1 veya Tub2-bs-2), 1 U enzim (MyTaq Hot-Start DNA Polimeraz) ile toplam 25 µL hacimde bir araya getirildi. 94°C'de 3 dk ön denatürasyon sonrası gen çoğaltımı 94°C'de 10 s, 52°C'de 25 s ve 72°C'de 20 s koşullarının toplam 35 döngü uygulaması ile gerçekleştirildi. 72°C'de 5 dk son uzama aşaması ile son uzama reaksiyonları tamamlanarak *β2-tubulin* genindeki hedef bölge çoğaltıldı. Sodyum bisülfid dönüşüm uygulaması yapılmayan gDNA'ların *β2-tubulin* geninin çoğaltımı için; reaksiyon bileşenleri, 25 ng gDNA, 1× PZR tamponu, 1.6 mM MgSO₄, 200 µM dNTP karışımı, 5'er pmol ileri ve geri primer (Tub2), 1U enzim (Pfu DNA polimeraz) olacak şekilde 0.2 mL'lik mikrotüpler içerisinde birleştirildi. PZR, 95°C'de 5 dk ön denatürasyonun ardından 35 döngü olacak şekilde 94°C'de 40 s, 64°C'de 40 s, 72°C'de 1.5 dk koşulları altında gerçekleştirildi. Son uzama aşaması 72°C'de 5 dk süre ile tamamlandı.

PZR uygulamaları sonucu elde edilen tüm çoğaltım ürünleri jel elektroforezi ile Bölüm 3.4'te verildiği şekilde analiz edildi. PZR ürünlerinin miktar ve boyutlarının değerlendirilmesi için molekül ağırlıkları bilinen DNA standartları (GeneRuler 100 bp DNA ladder, SM0241, Thermo Scientific ve GeneRuler 1kb DNA Ladder, SM0311, Thermo Scientific) jelle yüklendi. Elektroforez sonrası çoğaltılan ürün boyutları jelde ayrılan standart DNA fragmentleri ile karşılaştırılarak kontrol edildi.

3.8. BİSÜLFİT DİZİLEME ANALİZİ

PZR ürünleri MedSanTek firması tarafından hizmet alınımıyla saflaştırıldıktan sonra Sanger yöntemine göre dizilendi. Dizileme sonuçları "Chromas Lite" yazılım programı ile görüntülenerek analiz edildi. Bisülfid dönüşüm uygulaması yapılmayan gDNA'ların PZR ürünlerine ait nukleotid dizi sırası, ileri primer kullanılarak tek yönlü okuma ile belirlendi. Tek

yönlü okumalardan elde edilen dizilim bilgileri FASTA formatına çevrildikten sonra NCBI veri tabanından elde edilen CP064749.1 aksesyon numaralı *β 2-tubulin* referans gen dizisi ile “CLUSTALW”⁹ programında hizalanarak aralarındaki nukleotid farklılığı değerlendirildi. Bisülfıt ile dönüştürülen örneklerin PZR ürünlerinin nukleotid dizi bilgisi ise çift yönlü okuma yapılarak elde edildi. Öncelikle çift yönlü okumaların doğruluğu kontrol edildi. Bu kapsamda çift yönlü okumalar sonucu ileri primerlerden elde edilen nukleotid dizilimleri doğrudan FASTA formatına çevrildi. Geri primerlerden elde edilen dizilim bilgilerinin ters komplementeri alındıktan sonra FASTA formatına çevrildi ve ardından kodlanan ve kalıba ait nukleotid dizilimleri kendi grubu içerisinde CLUSTALW aracılığıyla hizalandı. Tek bir ipliğe ait iki yönlü okumadan elde edilen nukleotid dizi bilgisi bu şekilde birleştirilerek yöntem aracılı hata olasılığı kaynaklı nukleotid varyasyonu tarandı. Sonrasında bisülfıt uygulanmamış ve bisülfıt uygulanmış örneklerle ait dizilim bilgileri aynı program aracılığı ile hizalama analizine tabi tutuldu. Hizalama sonucu nukleotid dizileri karşılaştırılarak karbendazimin *β 2-tubulin* gen bölgesinde yol açabileceği DNA metilasyon profilleri belirlendi.

3.9. DNA METİLASYONUNUN TÜM GENOM DÜZEYİNDE BELİRLENMESİ

Kontrol ve deney gruplarının tüm genom düzeyindeki DNA metilasyon içeriği, 5mC'lere özgü antikor temelli yaklaşım olan dolaylı ELISA yöntemi ile ticari kit (MethylFlash™ Methylated 5mC DNA Quantification Kit, P-1034-48, Epigentek) kullanılarak belirlendi. Kiti oluşturan antikorlar, tampon ve çözeltiler Tablo 3.4'te verildi ve protokol üretici firmanın önerdiği basamaklar takip edilerek gerçekleştirildi. Deneyler 2 biyolojik ve 2 teknik tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

Tablo 3.4: MethylFlash™ Methylated 5mC DNA Quantification (P-1034-48, Epigentek)™ kit içeriği.

İçerik	İşlev	Saklama koşulları (°C)
ME1	10× Yıkama tamponu	4°C
ME2	Bağlama çözeltisi	20-22°C
ME3	Negatif kontrol (20 µg/mL)	-20°C
ME4	Pozitif kontrol (20 µg/mL)	-20°C
ME5	Yakalama antikor (1000 µg/mL)	4°C
ME6	Saptama antikor (400 µg/mL)	-20°C
ME7	Güçlendirici çözelti	-20°C
ME8	Geliştirici çözelti	4°C
ME9	Durdurucu çözelti	20-22°C

⁹ <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw> [Ziyaret tarihi: 12.03.2024]

Kit içeriğinde yer alan yıkama tamponu, 13 mL 10× yıkama tamponuna 117 mL distile su (pH 7.2-7.5) eklenerek hazırlandı. Pozitif kontrol standartları hazırlığı için pozitif kontrol ilk olarak 10 ng/μL'ye (5 μL pozitif kontrol + 5 μL 1× TE) seyreltilti. Daha sonra, aşağıdaki seyreltme tablosuna (Tablo 3.5) göre 10 ng/μl seyreltik pozitif kontrol ve 1× TE ile 0,5, 1, 2, 5 ve 10 ng/μl olacak şekilde beş farklı konsantrasyonda pozitif kontrol standardı hazırlandı.

Tablo 3.5: Analizde kullanılmak üzere hazırlanan pozitif kontrollere ait son konsantrasyon değerleri.

Tüp	ME4 (10 ng/μL)	1× TE	ME4 Konsantrasyonu
1	1.0 μL	19.0 μL	0.5 ng/μL
2	1.0 μL	9.0 μL	1.0 ng/μL
3	1.0 μL	4.0 μL	2.0 ng/μL
4	2.5 μL	2.5 μL	5.0 ng/μL
5	4.0 μL	0.0 μL	10.0 ng/μL

gDNA bağlama aşaması için; deneyde kullanılacak sayıda kuyucuk belirlendi ve her kuyucuğa 80 μL bağlama çözeltisi eklendi. 1 μl negatif kontrol, 1 μl seyreltik pozitif kontrol standartları ve 100 ng örnek DNA yüksek bir DNA afinitesine sahip olan kuyucuklara iki tekrarlı olacak şekilde eklendi. Plaka hafifçe birkaç kez sallanarak solüsyonun kuyunun tabanını eşit şekilde kaplaması sağlandı. Ardından plakanın üzeri parafilm ile kapatıldı ve 37°C'de 90 dk inkübasyona bırakılarak bağlama çözeltisi yardımıyla gDNA'ların kuyucuklara bağlanması sağlandı. Süre sonunda kuyucuklardan bağlama çözeltisi uzaklaştırıldı ve her kuyucuk 150 μL 1× yıkama tamponu ile üç kez yıkandı.

Metile DNA'yı yakalama aşaması için; yakalama antikoru 1× yıkama tamponu ile 1: 1000 oranında seyreltilti. Her kuyucuğa 50 μl seyreltik yakalama antikoru eklenerek üzeri kaplandı ve oda sıcaklığında 60 dk inkübe edilerek antijen antikor kompleksinin oluşumu sağlandı. Süre sonunda yakalama antikoru kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve her kuyucuk 150 μL 1× yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Saptama antikoru 1× yıkama tamponu ile 1: 2000 oranında seyreltilti. Antijen antikor kompleksini görünür hale getirmek için yakalama antikorusunu tanıyan enzim etiketli seyreltik saptama antikoru her kuyucuğa 50 μl olacak şekilde eklenerek üzeri kaplandı ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Ardından seyreltik saptama antikoru kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve her kuyucuk 150 μL seyreltik 1× yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı. Güçlendirici çözelti, 1× yıkama tamponu ile 1: 5000 oranında seyreltilti. Her kuyucuğa 50 μl seyreltik güçlendirici çözelti eklenerek üzeri kaplandı ve oda sıcaklığında 30

dk inkübe edildi. Sonrasında seyreltik güçlendirici çözelti kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve her kuyucuk 150 µL 1× yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.

Sinyal tespiti aşaması için; her kuyucuğa 100 µL geliştirici çözelti eklendi ve karanlıkta oda sıcaklığında yaklaşık 15 dk inkübasyona bırakıldı. Bu aşamada renk değişimi reaksiyonu temelli olarak örnek ve kontrol kuyucuklarında metile DNA'nın mavi renge dönmesi izlendi. Pozitif kontrollerin bulunduğu kuyucuklardaki renk donuk maviye döndüğünde enzim reaksiyonunu durdurmak için her kuyucuğa 100 µL durdurucu çözelti eklendi. Kuyucukları içeren çerçeve hafifçe sallanarak çözelti karıştırıldı ve enzimatik reaksiyonun tamamen durması için 1-2 dk beklendi. Durdurucu çözeltinin eklenmesi sonrası kuyucuklardaki renk sarıya döndü ve 450 nm dalga boyunda görünür ışıpta mikrolaka okuyuculu spektrofotometre cihazında ("BioTek™ Eon Microplate Spectrophotometer") kolorimetrik olarak OD ölçümü yapıldı.

Bu aşamada tüm genom 5mC içeriğinin tayini için, kit içeriğinde belirtildiği şekilde farklı konsantrasyonlardaki pozitif kontrollerin aynı dalga boyundaki absorpslarından elde edilen OD değerleri kullanılarak standart bir eğri grafiği oluşturuldu. Daha sonra standart eğrinin eğimi (OD/ng) belirlendi ve formül 3.3 ve 3.4 kullanılarak sırasıyla DNA örneklerindeki 5mC miktarı ve % metilasyon değerleri hesaplandı.

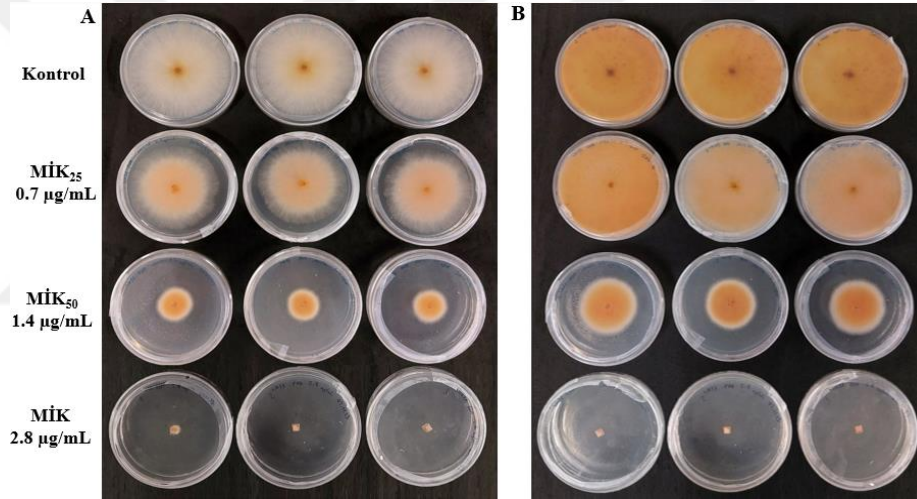
$$5mC (ng) = (\text{Örnek OD} - \text{Negatif Kontrol OD}) / (\text{Eğim} \times 2) \quad (3.3)$$

$$5mC (\%) = 5mC \text{ Miktarı (ng)} / \text{Örnek Miktarı (ng)} \quad (3.4)$$

4. BULGULAR

4.1. KARBENDAZİMİN FUNGAL ÜREME ÜZERİNDEKİ ETKİSİNE İLİŞKİN BULGULAR

Karbendazimin uygulanan dozları arasından 2.8 µg/mL konsantrasyonun FcUK99'un üremesini tamamen inhibe ettiği ortaya kondu. Bu doz MİK değeri olarak belirlendi. Aktif bileşiğin MİK₂₅ ve MİK₅₀ değerleri ise sırasıyla 0.7 µg/mL ve 1.4 µg/mL olarak hesaplandı. Karbendazimin FcUK99 referans suşunda belirlenen MİK₂₅, MİK₅₀ ve MİK dozlarını içeren deney gruplarının ve aktif bileşiği içermeyen kontrol grubunun 4. ve 7. günlerdeki üreme profilleri sırasıyla Şekil 4.1 A ve B'de verildi.



Şekil 4.1: *F. culmorum* UK99 referans suşunun kontrol grubu ve 0.7 µg/mL (MİK₂₅) ve 1.4 µg/mL (MİK₅₀) konsantrasyonunda karbendazim uygulanan deney gruplarına ait (A) 4 ve (B) 7 günlük kültürlerdeki üreme profilleri.

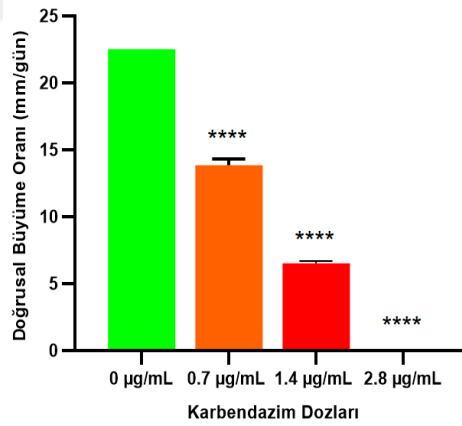
Referans suşuna ait karbendazim uygulanmayan kontrol grubunun 4 günlük kültürlerinde ortalama radyal üreme çapının 90±0.00 mm'ye ulaştığı, MİK₂₅ dozu uygulanan deney grubunda ise çap değerlerinin ortalamasının 59.3±0.07 mm olduğu belirlendi. Her iki deneme setinin 7 günlük kültürlerinde ortalama çap değerleri 90±0.00 mm'ye ulaştı. MİK₅₀ dozunda ise radyal üreme çap değer ortalamaları 4. gün için 25.3±0.12 mm, 7. gün için ise 46.7±0.13 mm olarak saptandı. Kontrol grubu ve deney gruplarının 7 günlük kültürlerinin radyal üreme çapları temel alınarak hesaplanan LGR değerleri kontrol grubunda 22.5±0.00 mm/gün, MİK₂₅ grubunda 13.85±0.45 mm/gün ve MİK₅₀ grubunda 6.50±0.18 mm/gün olarak belirlendi. MİK₂₅

uygulaması fungal büyümeyi % 38.4, MİK₅₀ ise % 71.1 azalttı. Deneme desenlerini oluşturan gruplar için hesaplanan ortalama LGR değerleri ile standart hataları (SH) Tablo 4.1’de verildi.

Tablo 4.1: *F.culmorum* UK99 referans suşuna ait kontrol grubunun ve MİK₂₅ ve MİK₅₀ dozlarında karbendazim içeren deney gruplarının 7 günlük kültürlerinin ortalama doğrusal büyüme oranlarına (LGR) ve standart hatalarına (SH) ait değerler.

Grup	Konsantrasyon (µg/mL)	\bar{x} Doğrusal büyüme oranı \pm SH (mm/gün)	% İnhibisyon
Kontrol	-	22.5 \pm 0.00	-
MİK ₂₅	0.7	13.85 \pm 0.45	38.4
MİK ₅₀	1.4	6.50 \pm 0.18	71.1

Elde edilen veriler tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirildiğinde, kontrol grubunun LGR değeri ile karbendazim içeren deney gruplarının LGR değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.0001$) bulundu. Ayrıca MİK₂₅ ve MİK₅₀ dozlarının kendi aralarında neden olduğu LGR değerleri arasındaki farkın da anlamlı ($p < 0.0001$) olduğu gösterildi (Şekil 4.2). Sonuç olarak, karbendazimin artan dozlarının fungal üremeyi inhibe ederek LGR değerinde azalmaya yol açtığı ortaya kondu.



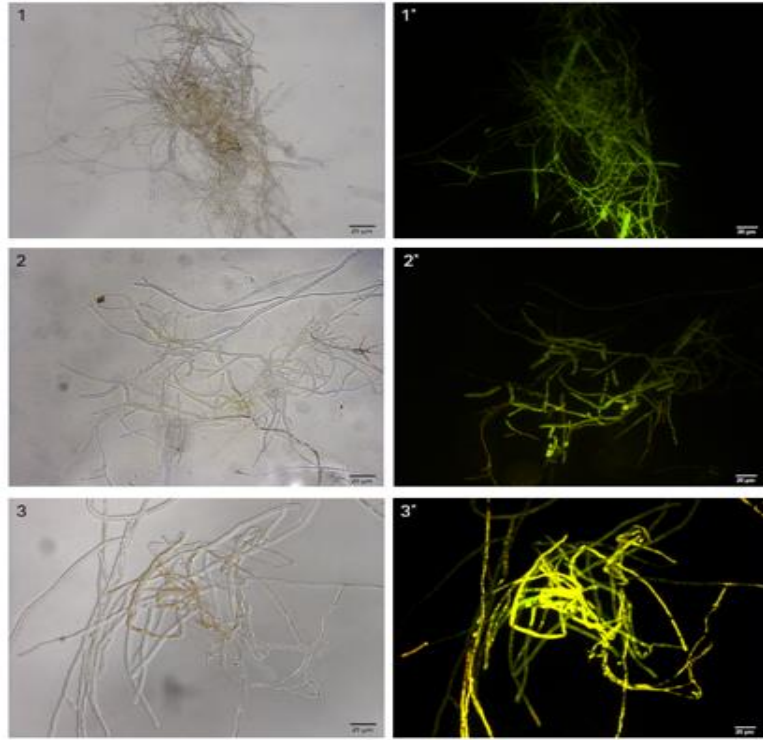
Şekil 4.2: Artan dozlarda karbendazim uygulanmış *F. culmorum* UK99 referans suşunun 7 günlük kültürlerinin doğrusal büyüme oranlarındaki azalmanın grafikte gösterimi. ****: $p < 0.0001$.

4.2. KARBENDAZİMİN FcUK99 ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN HÜCRESEL GÖSTERİMİ

Karbendazimin hücre canlılığına etkisi at/etbr ikili boyaması ile araştırıldığında kontrol grubuna göre MİK₂₅ ve MİK₅₀ dozlarında karbendazim uygulamasının hücrelerde apoptoz benzeri ölüm yolağını teşvik ettiği gözlemlendi. Uygulanan at boyası canlı ve apoptoza uğramış

hücrelerin her ikisine bağlanırken etbr boyası sadece canlı olmayan hücreler içerisine girdiğinden deney grubundaki hücre canlılığı kontrol grubuna göre değerlendirildi. Kontrol grubundaki örnekte saptanan yeşil floresan ışımaya kültürün 6. gününde hücrelerin metabolik olarak etkin olduğunu gösterdi (Şekil 4.3 1). Karbendazimin MİK₂₅ ve MİK₅₀ dozları uygulanmış örneklerin floresan mikroskobu gözlemlerinde yeşil ışımalar ile birlikte sarıdan turuncuya geçen ışımalar da gözlemlendi (Şekil 4.3 2 ve 3). Bu gözlemler karbendazimin uygulanan dozlarının FcUK99 suşunda apoptoz benzeri hücre ölümü mekanizmasının gerçekleştiğini ortaya koydu.

Sonuç olarak, karbendazim uygulamasının *F. culmorum*'da büyüme inhibisyonuna neden olduğu, LGR değerlerindeki azalmanın belirlenmesi ve floresan mikroskop analizlerinde apoptotik sürece benzer ölüm mekanizmasının tetiklendiğinin hücresel düzeyde gösterimi ile kanıtlandı.

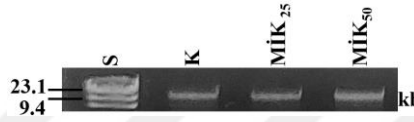


Şekil 4.3: *F. culmorum* UK99 suşunun (1) kontrol grubu ile (2) MİK₂₅ ve (3) MİK₅₀ dozlarında karbendazim uygulanan deney gruplarının at/etbr ikili boyaması sonucu ışık mikroskobunda 20× büyütmeleli objektif ile inceleme sonrası alınan görüntüleri ve floresan mikroskobunda* GFP (At 502/526 nm, EtBr 510/595 nm) ve Texas RED (595/613 nm) filtreleri ile elde edilen görüntüleri.

4.3. *B2-tubulin* GENİNİN ÇOĞALTIMINA AİT BULGULAR

Kontrol ve deney gruplarından izole edilen gDNA'ların miktarlarının 120-230 ng/ μ L değer aralığında olduğu hesaplandı. gDNA'ların saflık değerlerinin ise 1.75-1.85 değer aralığında olduğu bulundu.

İzole edilen gDNA'ların bütünlüklerini korudukları agaroz jel elektroforezi sonrası her bir örnekte görüntülenen tek bant ile ortaya kondu (Şekil 4.4). Gerçekleştirilen kalitatif ve kantitatif analizler gDNA'ların tez çalışması kapsamında gerçekleştirilecek ileriki analizlerde kullanılmak üzere uygun kalitede olduklarını gösterdi.

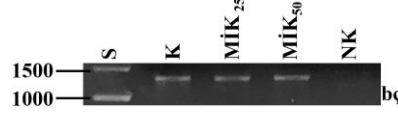


Şekil 4.4: Kontrol ve deney gruplarından izole edilen gDNA'ların agaroz jel elektroforezi sonrası UV ışık altındaki görüntüleri. S: λ HindIII Standart DNA (Thermo Scientific, SM0101, ABD), K: Kontrol.

İzole edilen gDNA'ların sodyum bisülfid dönüşümüne maruz bırakıldıktan sonra gerçekleştirilen kantitatif analizleri ile geri kazanılan gDNA'ların miktarlarının 18-35 ng/ μ L aralığında, saflık değerlerinin ise (A_{260}/A_{280}) 1.6-2.0 arasında olduğu bulundu.

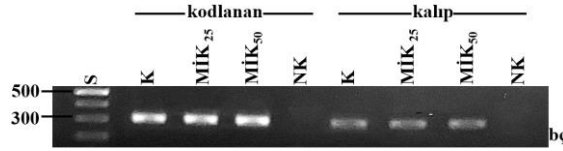
Bisülfid dönüşümü sonrası PZR'de kullanılmak üzere tasarlanan, hem *$\beta 1$ -tubulin* hem de *$\beta 2$ -tubulin* genlerinin kodlanan ve kalıp DNA ipliklerine tamamlayıcı oligonukleotidler; ΔG değerleri, çoğaltılacak ürün boyutları ve çoğaltılacak hedef bölgede yer alan CpG adacık sayıları olmak üzere 3 ölçüt bakımından değerlendirildiklerinde tez çalışmasında *$\beta 2$ -tubulin* gen bölgesindeki metilasyon profilinin araştırılmasına karar verildi. *$\beta 2$ -tubulin* geni için tasarlanan primer çiftlerinin daha yüksek ΔG değerlerine sahip oldukları belirlendi. *$\beta 2$ -tubulin*'e ait kodlanan iplikten 311 bç kalıp iplikten de 307 bç, *$\beta 1$ -tubulin*'in kodlanan ipliğinden 180 bç kalıp ipliğinden 457 bç boyutlu fragmentlerin çoğaltılacağı belirlendi. Ancak, *$\beta 1$ -tubulin* kalıp ipliğinden elde edilecek olan bölge boyutunun (457 bç) bisülfid özgün PZR için önerilen çoğaltım bölge boyut koşulunun (150-300 bç) hayli dışında kaldığı saptandı. *$\beta 2$ -tubulin*'in her iki ipliğinden elde edilecek çoğaltım bölgeleri içerisinde *$\beta 1$ -tubulin*'e göre çok sayıda CpG adacığının yer aldığının da belirlenmesi gen seçiminde en önemli ölçüt oldu.

$\beta 2$ -*tubulin* geninin ORF'sini içine alan bölgesi, kontrol grubunun ve karbendazim uygulanan deney gruplarının gDNA'larından Tub2 primer çiftinin kullanıldığı PZR ile çoğaltıldığında tüm örneklerden 1312 bç boyutundaki fragmentler elde edildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Sodyum bisülfid uygulaması yapılmayan gDNA'ların Tub2 primer çiftinin kullanıldığı PZR analizi ile çoğaltımı sonucu elde edilen $\beta 2$ -*tubulin* genine ait 1312 bç boyutundaki DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. S: 1 kb Standart DNA (SM0311, Thermo Scientific, ABD), K: Kontrol, NK: Negatif Kontrol.

Kontrol ve deney gruplarının çift iplikli gDNA'larından sodyum bisülfid dönüşümü sonrası elde edilen kodlanan ve kalıp DNA'nın tek iplikli formları sırasıyla Tub2-bs-1 ve Tub2-bs-2 primer çiftlerinin kullanıldığı PZR (Tablo 3.3) ile çoğaltıldığında agaroz jel elektroforezi sonrası jelde sırasıyla $\beta 2$ -*tubulin* genine ait 311 ve 307 bç boyutundaki DNA fragmentleri görüntülendi (Şekil 4.6).

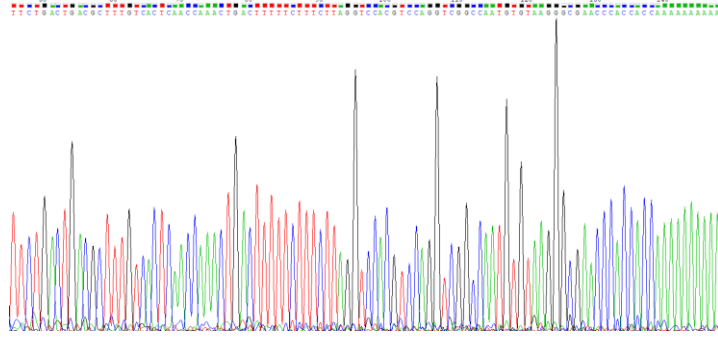


Şekil 4.6: Tub2-bs-1 ve Tub2-bs-2 primer çiftlerinin kullanıldığı bisülfid özgün PZR ile $\beta 2$ -*tubulin* geninden çoğaltılan sırasıyla 311 bç ve 307 bç boyutundaki DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. S: 100 bç'lik Standart DNA (SM0241, Thermo Scientific, ABD), K: Kontrol, NK: Negatif Kontrol.

4.4. BİSÜLFİT DİZİLEME BULGULARI

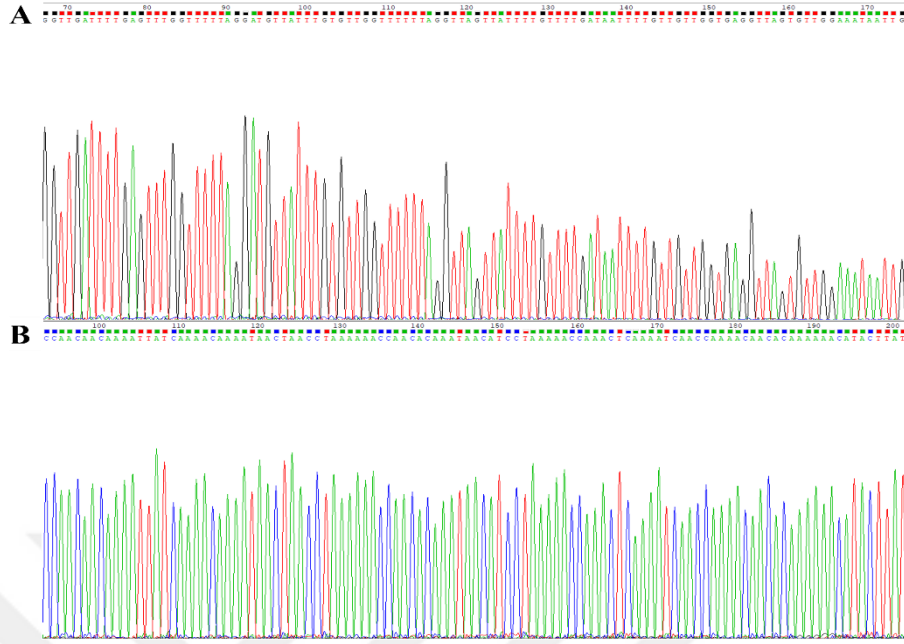
FcUK99 suşunun sodyum bisülfid uygulanmamış gDNA'larından Tub2 primer çifti ile çoğaltılan $\beta 2$ -*tubulin* genine ait ileri primerler kullanılarak yapılan dizileme analizi sonucu elde edilen dizilim bilgilerinin Chromas Lite programı aracılığıyla görüntülenen kromatogramları yüksek kalitede sinyal pikleri içerdi. Pikler üzerinde yer alan nukleotidleri temsil eden kutuların dolu olması nukleotid sırasının yüksek doğrulukta okunduğunu gösterdi (Şekil 4.7). Genin

ORF'yi içeren ham okumalarında; 953 bç'lik bölge kontrol grubundan, 945 bç'lik bölge MİK₂₅ uygulanmış ve 940 bç'lik bölge de MİK₅₀ örneğinden kayıt altına alındı.



Şekil 4.7: FcUK99 suşunun $\beta 2$ -*tubulin* geninin kısmi bölgesinin Tub2 ileri primerinin kullanıldığı Sanger dizileme yönteminden elde edilen nukleotid dizi bilgisine ait kromatogram.

Sodyum bisülfid dönüşümü sonrası $\beta 2$ -*tubulin* geninin kodlanan ve kalıp ipliklerinden hem ileri hem de geri primerler kullanılarak ayrı ayrı gerçekleştirilen PZR uygulaması ile çoğaltılan $\beta 2$ -*tubulin* geninin dizileme analizi sonucu elde edilen dizilim bilgilerinin Chromas Lite programı aracılığıyla görüntülenen kromatogramları yüksek kalitede sinyal piklerini ve nukleotidleri temsil eden dolu kutucukları içerdi. Kodlanan ssDNA'dan çoğaltılan $\beta 2$ -*tubulin* geninin Tub2-bs-1 ileri ve geri primerleri ile dizilenmesi sonucu elde edilen nukleotid dizilerinin kromatogram görüntüleri sırasıyla Şekil 4.8 A ve B'de verildi.



Şekil 4.8: FcUK99 suşunun sodyum bisüfit uygulanan gDNA'larının kodlanan DNA ipliğinden çoğaltılan $\beta 2$ -tubulin geninin Tub2-bs-1 (A) ileri ve (B) geri primerleri ile Sanger dizileme yönteminden elde edilen nukleotid dizi bilgilerine ait kromatogram.

Deneme setlerinin her birine ait ileri ve geri primerlerin kullanımı ile elde edilen $\beta 2$ -tubulin geninin sadece kalıp ve sadece kodlama ipliklerine ait dizilim bilgileri CLUSTAL W programı ile karşılaştırılarak her primerden 274-287 bç aralığında çift iplikli nukleotid dizilimi oluşturuldu. Hizalama analizleri yapılarak iki yönlü okumalarla elde edilen verilerde yöntem temelli varyasyonun olmadığı kontrol edildi. Her primer için gerçekleştirilen okumanın hassasiyetinin çok yüksek olduğu ortaya kondu. Bölüm 3.8'de verildiği şekilde hizalandığında genin bu kısmı bölgesine ait dsDNA dizilimi Şekil 4.9' da verildi.

BS+_i	TTTAGGGTGGTAATGATAAGTATGTTTTTGTGTGTTTTGGTTGATTTTGTAGTTTGGTT
BS+_g	TTTAGGGTGGTAATGATAAGTATGTTTTTGTGTGTTTTGGTTGATTTTGTAGTTTGGTT

BS+_i	TTTAGGATGTTATTTGTGTGGTTTTTTAGGTTAGTTATTTTGTTTTGATAATTTTGTTC
BS+_g	TTTAGGATGTTATTTGTGTGGTTTTTTAGGTTAGTTATTTTGTTTTGATAATTTTGTTC

BS+_i	TTGGTGAGGTTAGTGTGGAAATAATGGGTGAAGGTTATTATATTGAAGGTGTTGAGT
BS+_g	TTGGTGAGGTTAGTGTGGAAATAATGGGTGAAGGTTATTATATTGAAGGTGTTGAGT

Şekil 4.9: Kodlanan ipliğin kalıp olarak kullanıldığı PZR'de Tub2-bs-1 ileri ve geri primerlerinin çoğalttığı $\beta 2$ -tubulin geninin kısmi dizilimlerinin hizalama analizi. * identik nukleotidleri temsil etmektedir. BS+: Bisüfit uygulanmış. i: İleri primer. g: Geri primer.

Bisüfit uygulaması yapılmayan kontrol ve deney gruplarına ait $\beta 2$ -tubulin geninin ileri primer kullanılarak tek yönlü dizilmesi ile elde edilen nukleotid dizileri NCBI veri tabanında yer alan

CP064749.1 aksesyon numaralı referans *$\beta 2$ -tubulin* gen dizisi ile CLUSTALW programında karşılaştırılarak aralarındaki nukleotid farklılıkları değerlendirildiğinde varyasyon olmadığı saptandı. *$\beta 2$ -tubulin* genine ait referans ile kontrol grubundan elde edilen tek yönlü dizilim bilgilerinin karşılaştırıldığı karşılaştırma analizi sonucu kısmi olarak Şekil 4.10'da sunuldu.

BS- CP064749.1	GAGGTGAGTACCAATTGCATTGCAATTGCAAATGCAAATTTCAACGTGATTCCCTAACTTT GAGGTGAGTACCAATTGCATTGCAATTGCAAATGCAAATTTCAACGTGATTCCCTAACTTT *****
BS- CP064749.1	CTCAGGGCGGCAACGACAAGTACGTCCCCCGTGTGTTCTGGTCGATCTTGAGTCCGGCC CTCAGGGCGGCAACGACAAGTACGTCCCCCGTGTGTTCTGGTCGATCTTGAGTCCGGCC *****
BS- CP064749.1	CCCAGGATGCCATCCGCGCCGCCCTCTAGGCCAGCTATTCGCCCCGACAACCTTCGTGCG CCCAGGATGCCATCCGCGCCGCCCTCTAGGCCAGCTATTCGCCCCGACAACCTTCGTGCG *****
BS- CP064749.1	CCGGTGAGGCCAGTGCCGAAACAACCTGGGCGAAGGGTCATTACACCGAAGGTGCCGAGC CCGGTGAGGCCAGTGCCGAAACAACCTGGGCGAAGGGTCATTACACCGAAGGTGCCGAGC *****
BS- CP064749.1	TCGTTGAGGAGGCCATCGACGTTGTTTCGTCGCGAGGTCGAGAACGTGACCACCTTCAGG TCGTTGAGGAGGCCATCGACGTTGTTTCGTCGCGAGGTCGAGAACGTGACCACCTTCAGG *****

Şekil 4.10: Bisülfıt uygulanmayan kontrol grubundan izole edilen DNA örneğine ait *$\beta 2$ -tubulin* geninin ileri primer ile elde edilen dizi bilgisinin referans gen dizisi ile karşılaştırılma analizi. BS-: Bisülfıt uygulanmamış.

Kontrol grubuna ait çift yönlü okumalardan elde edilen hem kodlanan hem de kalıp diziler birleştirildikten sonra sodyum bisülfıt uygulanmamış *$\beta 2$ -tubulin* geninin çift iplikli dizilim bilgileri ile karşılaştırıldığında çalışılan kısmi bölgede yer alan C nukleotidlerinin tümünün bisülfıt uygulaması ile T nukleotidlerine dönüştüğü saptandı. Bu veri kısmi gen bölgesindeki kodlanan (Şekil 4.11 A) ve kalıp (Şekil 4.11 B) ipliğinde bulunan CpG adacıklarında metilasyon profilinin bulunmadığını belirlemeyi sağladı.

A	
K_BS-	CAAAATGCAAATTTCAACGTGATTCCTAACCTTCAGGGCGGCACGCAAGTACGTTCC
K_BS+_KODLANAN	TAAATGTAAATTTAAATGTGATTTTAAATTTTTTAGGGTGGTAATGATAAGTATGTTTT ***** ** ** *
K_BS-	CCGTGCTGTTCTGGTCGATCTTGAGTCCGGCCCCAGGATGCCATCCGCGCCGCTCT
K_BS+_KODLANAN	TTGTGTTGTTTGGTTGATTTTGAAGTTGGTTTTTAGGATGTTATTTGTGTTGGTTTTTT ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
K_BS-	AGGCCAGCTATTCGCCCCGACAACTTCGTCCCGGTTGAGGCCAGTGCCGGAAACAACTG
K_BS+_KODLANAN	AGGTAGTTATTTTGTGATAATTTGTGTTGGTTAGGTATGTTGGAAATAATTG ** * ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
K_BS-	GGCGAAGGGTCAATCACCGAAGGTCCGAGCTCGTTGAGGAGGCCATCGACGTTGTTCC
K_BS+_KODLANAN	GTTGAAGGGTATTATATTGAAGGTGTTGAGTTTGGTTGAGGAGGTATTGATGTTGTTG * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
K_BS-	TCCGAGGTCGAGAA
K_BS+_KODLANAN	TTGTGAGGTTGAGAA * * ** * ** * ** *
B	
K_BS-	TTCTCGACCTCGGCACGAACAACGTGATGGCTCCTCAACGAGCTCGGCACCTTCGGTG
K_BS+_KALIP	TTTTTGATTTTGTGATGAATAATGTTGATGTTTTTTTAAATGATTTGGTATTTTTGGTG * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
K_BS-	TAATGACCCCTCGCCAGTTGTTTCCGGCCTGCGCTCACCGGCGACGAAGTTGTCCGGG
K_BS+_KALIP	TAATGATTTTGTGTTAGTTGTTTGGGATGGTTTTTATGGTGATGAAGTTGTGGGG ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
K_BS-	CAGGAATAGCTGGCCTAGAGGGCCGGCGCGGATGGCATCCTGGGGCCGACTCAAGATCG
K_BS+_KALIP	TGGAATAGTTGGTTAGAGGGTTGGTGTGGATGTTATTTGGGGTTGGATTTAAGATTTG ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
K_BS-	ACCAGAACAGCACGGGGGACGTACTGTGCTTGCGCCCTGAGAAAGTTAGGAATCACGT
K_BS+_KALIP	ATTAGAATAGTATGGGGATGTATTGTGTTGTTGTTTTGAGAAAGTTAGGAATTAATGTT * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
K_BS-	TGAAATT
K_BS+_KALIP	TGAAATT *****

Şekil 4.11: $\beta 2$ -tubulin genine ait sodyum bisülfid dönüşümü yapılan kontrol grubunun gDNA'larının (A) kodlanan ve (B) kalıp DNA ipliğine özgün primerler ile çoğaltımı sonrası elde edilen dizilim bilgileri ile sodyum bisülfid uygulamasına tabi tutulmayan kontrol grubuna ait gDNA'ların çoğaltılması ile elde edilen nukleotid dizilerinin hizalama analizi. * identik nukleotidleri temsil etmektedir. Metillenmemiş sitozin nukleotidleri kalın ve kırmızı karakter ile gösterildi. BS-: Bisülfid uygulanmamış. BS+: Bisülfid uygulanmış.

Karbendazimin $MİK_{25}$ dozuna maruz bırakılan deney grubunun çift yönlü okumalardan elde edilen her iki nukleotid dizisi birleştirildikten sonra aynı şekilde gerçekleştirilen karşılaştırmada da kısmi bölgedeki tüm C nukleotidlerinin bisülfid uygulaması ile T nukleotidlerine dönüştüğü belirlendi. Bu veri karbendazimin $MİK_{25}$ dozunun genin kısmi bölgesindeki kodlanan (Şekil 4.12 A) ve kalıp (Şekil 4.12 B) ipliğinde bulunan CpG adacıklarında metilasyona yol açmadığını ortaya koydu.

A	
MIK25_BS-	C AAATG C AAATTT C AAC G TGATT C CTAAC T TT C TCAGGG C GG C AAC G CAAGT C GT C CC
MIK25_BS+_KODLANAN	TAAATGTAAATTTAAATGTGATTTTAATTTT T AGGGTGGTAATGATAAGTATGTTTT *****
MIK25_BS-	C CGT G CTGTT C TGGT C GAT C TTGAGT C GG C CCCCAGGAT G CCAT C CG G CGGG C CC T CT
MIK25_BS+_KODLANAN	TTGTGTTGTTTTGGTTGATTTT G AGTTGGTTTTTAGGATGTTATTTGTTGGTTTTTTT ***
MIK25_BS-	AGG C CGAG T ATT C CG C CC C G A CA A CT T CG T CG C GGT G AG G CC A GT G CG G AA C CA A CT G
MIK25_BS+_KODLANAN	AGGTTAGTTATTTTGGTTT G ATAATTTTGGTTGGTTGGTTAGTTAGTTGGAAATAATTG ***
MIK25_BS-	GG C GAAGGGT C ATT A CA C CGAAGGT G CG G AG C T C GTTGAGGAG G CC A T C GA C GT T GTT C G
MIK25_BS+_KODLANAN	GGTGAAGGGTTATATATTGAAGGTGTTGAGTTGGTTGAGGAGGTTATGATGTTGTTG **
MIK25_BS-	T CGCGAGGT C GAGAA
MIK25_BS+_KODLANAN	TTGTGAGGTTGAGAA * * *
B	
MIK25_BS-	T T C T C G A CC T CG G AC G AA C AA C GT C GAT G CC T CC T CA A C G AG C T C GG C AC C TT C GGT G
MIK25_BS+_KALIP	TTTTTGATTTTGTGATGAATAATGTTGATGGTTTTTTTAATGAGTTGGTATTTTGGT G * * * * *
MIK25_BS-	TAATGA C CC T CG C CC A GT T GTT C CG G CA C T G CC T CA C CG G CG A C G AG T T G T C GG G
MIK25_BS+_KALIP	TAATGATTTTGTGTTAGTTGTTTGGTATGGTTTTATGGTGAAGTTGTGGGG *****
MIK25_BS-	C GGAA T AG C TGG C CTAGAGGG C CG G CG G GAT G GC A T C CTGGGG C CG G ACT C AAG A T C G
MIK25_BS+_KALIP	TGGAATAGTTGGTTTAGAGGGTTGGTGTGGATGATTTTGGGGTTGGATTTAAGATTG *****
MIK25_BS-	A CCAGAA C AG C ACGGGG A CG T ACT T GT C GT T G C CG C CTGAGAAAGTTAGGAAT C AG T
MIK25_BS+_KALIP	ATTAGAATAGTATGGGGATGTATTGTTGTTGTTTGGAGAAAGTTAGGAATTATGT * * * * *
MIK25_BS-	TGAAATT
MIK25_BS+_KALIP	TGAAATT *****

Şekil 4.12: β 2-tubulin genine ait sodyum bisülfid dönüşümü yapılan MİK₂₅ grubunun gDNA'larının (A) kodlanan ve (B) kalıp DNA ipliğine özgün primerler ile çoğaltımı sonrası elde edilen dizilim bilgileri ile sodyum bisülfid uygulamasına tabi tutulmayan MİK₂₅ grubuna ait gDNA'ların çoğaltılması ile elde edilen nukleotid dizilerinin hizalama analizi. * identik nukleotidleri temsil etmektedir. Metillenmemiş sitozin nukleotidleri kalın ve kırmızı karakter ile gösterildi. BS-: Bisülfid uygulanmamış. BS+: Bisülfid uygulanmış.

MİK₅₀ dozunda karbendazim uygulanmış deney grubundan elde edilen nukleotid dizileri birleştirilerek bisülfid uygulanmamış gen bölgesi ile karşılaştırıldığında ise bisülfid uygulamasının bu bölgedeki tüm C'leri T'ye dönüştürdüğü, bu dozun da ilgili bölgedeki kodlanan (Şekil 4.13 A) ve kalıp (Şekil 4.13 B) ipliklerde yer alan CpG adacıklarında metilasyona neden olmadığı gösterildi.

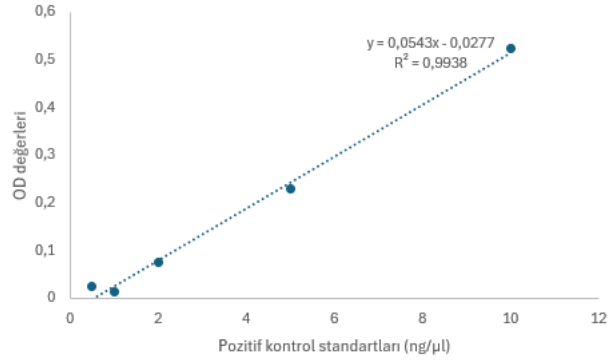
A	
MIK50_BS-	CAAATGCAAATTTCAACGTGATTCTTAACCTTCTCAGGGCGGCAACGACAAGTACGTTCCC
MIK50_BS+_KODLANAN	TAAATGTAAATTTAAATGTGATTTTAAATTTTTTAGGGTGGTAATGATAAGTATGTTTT ***** **
MIK50_BS-	CCGTGCTGTTCTGGTCTGATCTTGAGTCCGGCCCCAGGATGCCATCCGGCCGGCCCCCT
MIK50_BS+_KODLANAN	TTGTGTTGTTTTGGTTGATTTTGAGTTGGTTTTTAGGATTTATTTGTTGGTTTTTTTT *** **
MIK50_BS-	AGGCCAGCTATTCCGCCCCGACAACTTCGTCCCGGTGAGGCCAGTGCCGGAAACAAGT
MIK50_BS+_KODLANAN	AGGTTAGTTATTTTGTGATAATTTGTTGTTGGTGAGGTTAGTGTGGAAATAATTG ** * **
MIK50_BS-	GGCGAAGGGTCATTACCCGAAGGTGCCGAGCTCGTTGAGGAGGCCATCGACGTTGTTCCG
MIK50_BS+_KODLANAN	GGTGAAGGGTTATATATTTGAAGGTGTGAGTTGTTGAGGAGGTTATTTGATGTTGTTG ** * **
MIK50_BS-	TCCGCGAGGTCTGAGAA
MIK50_BS+_KODLANAN	TTGTGAGGTTGAGAA * * **
B	
MIK50_BS-	TTCTCGACCTCGCGACGAACAACCTCGATGGCTCCTCAACGAGCTCGGCACCTTCGGTG
MIK50_BS+_KALIP	TTTTTGATTTTGTGATGAATAATGTTGATGGTTTTTTTAAATGAGTTTGGTATTTTGTGTTG ** * **
MIK50_BS-	TAATGACCCCTCGCCAGTTGTTCCGGCACTGGCTCACCGGCGACGAAGTTGTGGGG
MIK25_BS+_KALIP	TAATGATTTTGTGTTAGTTGTTTTGGTATGGTTTTTATGGTGAAGTTGTGGGG ***** **
MIK50_BS-	CGGAATAGCTGGCCTAGAGGGCCGGCGCGGATGGCATCCTGGGGGCCGACTCAAGATCG
MIK50_BS+_KALIP	TGGAATAGTTGGTTAGAGGGTTGGTGTGGATGTTTGGGGTGGATTTAAGATTG ***** **
MIK50_BS-	ACCAGAACAGCACGGGGGACGTACTGTCTGTCCGCCCTGAGAAAGTTAGGAATCACGT
MIK50_BS+_KALIP	ATTAGAATAGTATGGGGATGTATTTGTTGTTGTTGTTTTGAGAAAGTTAGGAATTATGT * **
MIK50_BS-	TGAAATT
MIK50_BS+_KALIP	TGAAATT *****

Şekil 4.13: $\beta 2$ -tubulin genine ait sodyum bisülfid dönüşümü yapılan MİK₅₀ grubunun gDNA'larının (A) kodlanan ve (B) kalıp DNA ipliğine özgün primerler ile çoğaltımı sonrası elde edilen dizilim bilgileri ile sodyum bisülfid uygulamasına tabi tutulmayan MİK₅₀ grubuna ait gDNA'ların çoğaltılması ile elde edilen nükleotid dizilerinin hizalama analizi. * identik nükleotidleri temsil etmektedir. Metillenmemiş sitozin nükleotidleri kalın ve kırmızı karakter ile gösterildi. BS-: Bisülfid uygulanmamış. BS+: Bisülfid uygulanmış.

Sonuç olarak, karbendazimin $\beta 2$ -tubulin'in ORF'yi içine alan kısmi gen bölgesinde DNA metilasyonuna neden olmadığı bisülfid dizileme yöntemi ile ortaya kondu.

4.5. TÜM GENOM DÜZEYİNDEKİ DNA METİLASYONUNA İLİŞKİN BULGULAR

Tüm genom düzeyinde DNA metilasyonunun ELISA yöntemi aracılı kantitatif analizinde 5mC'lerin miktar tayini için, pozitif kontrolün (ME4) 0.5-10 ng/ μ L konsantrasyonları (bkz. 3.9) kullanılarak bir standart eğri oluşturuldu ve Şekil 4.14'te verildi.



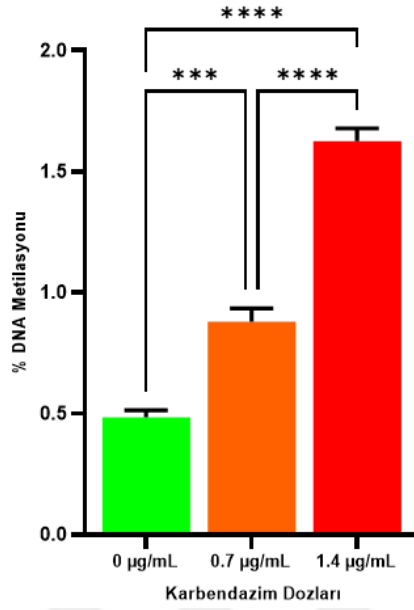
Şekil 4.14: Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış pozitif kontrolün 0.5-10 ng/μL konsantrasyonları ile oluşturulan standart eğri.

Standart eğri üzerinden Bölüm 3.9’da verilen formüller kullanılarak ilk olarak FcUK99 suşunun tüm genom düzeyinde 5mC içeriği % 0.49 olarak belirlendi. MİK₂₅ ve MİK₅₀ dozlarında karbendazim uygulanan gDNA örneklerinin %5 mC içerikleri sırasıyla % 0.88 ve % 1.63 olarak hesaplandı. Karbendazimin MİK₂₅ ve MİK₅₀ dozlarının tüm genom düzeyinde metilasyonu kontrole göre sırasıyla % 79.6 ve % 232.7 oranında artırarak hipermetilasyona neden olduğu belirlendi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Farklı karbendazim konsantrasyonlarının *F.culmorum* UK99 referans suşu üzerinde neden olduğu % DNA metilasyonu değişimi ve standart hata değerleri.

Grup	Konsantrasyon (μg/mL)	% 5mC ± SH	% Metilasyon artışı
Kontrol	-	0.49±0.03	-
MİK₂₅	0.7	0.88± 0.06	% 79.6
MİK₅₀	1.4	1.63±0.05	% 232.7

MİK₂₅ ve MİK₅₀ dozları uygulanan örneklerin % DNA metilasyon değerleri arasındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.0001$) olduğu ortaya kondu. Hem 0.7 μg/mL hem de 1.4 μg/mL karbendazim dozlarına maruz kalan FcUK99 suşunda meydana gelen % DNA metilasyon artışı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise her iki grup için de fark anlamlı (kontrol *vice versa* MİK₂₅, $p < 0.001$; kontrol *vice versa* MİK₅₀, $p < 0.0001$) bulundu (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: Artan dozlarda karbendazim uygulaması ile FcUK99 suşunun % DNA metilasyon değerleri arasındaki ilişkinin grafikte gösterimi. ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$.

Sonuç olarak, karbendazimin *F. culmorum*'un epigenetik modifikasyonu üzerindeki etkisinin araştırıldığı bu tez çalışmasında antifungal bileşiğin hücre inhibisyonuna yol açan dozlarının, aktif ajanın gen hedefi olduğu bildirilen $\beta 2$ -*tubulin*'deki CpG adacıklarında metilasyona neden olmadığı ancak, tüm genom düzeyindeki metilasyon düzeyini artırdığı ortaya kondu. Ek olarak, dizi analiz bulguları bu aktif maddenin $\beta 2$ -*tubulin* geninin kodlama bölgesi içerisinde tek nükleotid polimorfizmlerine yol açmadığı da genetik varyasyonların taranmadığı bu çalışma ile gösterilmiş oldu.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünyada ve yurdumuzda ekonomik öneme sahip küçük taneli tahıl bitkilerinde ortaya çıkan çok çeşitli hastalıklardan sorumlu olan fitopatojenik *Fusarium* türleri ürün verimini ve kalitesini azaltmanın yanı sıra insan ve hayvanların sağlığını da olumsuz yönde etkilemektedir (Abdallah-Nekache ve diğ., 2019; Ekwomadu ve diğ., 2021). Tarımsal alanlarda bu fitopatojenler ile etkin mücadelede kullanılan en yaygın yöntem yüksek düzeyde etkinliği, düşük maliyeti ve kolay uygulanabilirliğinden dolayı fungusit uygulamasıdır (Gondal ve diğ., 2012; Lucas ve diğ., 2015; McLaughlin ve diğ., 2023). Etki mekanizmalarına göre fungusitleri sınıflandıran FRAC (ing; Fungicide Resistance Action Committee) 2024 verilerine¹⁰ göre günümüzde 70'ten fazla farklı etki grubundan 200'ün üzerinde fungusit bulunmaktadır. MBC grubu fungusitler tarımsal alanda fungal hastalıklar ile mücadelede 1970'li yılların başında piyasaya sürüldüklerinden günümüze yaygın olarak kullanılmaktadır (Russell, 2005; Vela-Corcía ve diğ., 2018). MBC sınıfına ait karbendazim *Fusarium* türlerinin neden olduğu hastalıkların kontrolü için kullanımı en çok tercih edilen fungusit aktif bileşiklerinden biri olmuştur (Tarafder ve Datta, 2022; Zhang ve diğ., 2023). Karbendazimin kullanımı ülkemizde 01.01.2018 tarihinden itibaren sonlandırılmış¹¹ olmasına rağmen Tarım ve Orman Bakanlığının 25.07.2019 tarihli ve "Görüş-RF/İhracatta Yasaklı İlaç" konulu yazısında Rusya Federasyonu'na Türkiye'den gönderilen meyve ve sebze ürünlerinde yapılan analizler sonucu karbendazimin tespit edildiği belirtilmiştir. Rapor yasaklı olan bu bileşiğin hala kullanımına devam edildiğini göstermektedir.

Aralarında karbendazimin de bulunduğu zirai ilaç aktif bileşiklerinin *Fusarium* türleri üzerindeki antifungal etkileri ile tarla izolatlarının bu ajanlara direnç seviyelerinin araştırıldığı TÜBİTAK projesinde; karbendazimin fitopatojenlerden *F. graminearum* ve *F. culmorum*'un üremesini oksidatif stres ve apoptoz benzeri hücre ölümü aracılığıyla inhibe ettiği, buğday yetiştiriciliği yapılan Tekirdağ, Çanakkale ve Balıkesir civarında FBY ve kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalıklarından sorumlu tarla izolatlarının bu aktif bileşiğe karşı direnç geliştirdiği ortaya konmuştur (Teker ve diğ., 2023). Bu proje kapsamında tamamlanan bir yüksek lisans tezinde (Yüksektepe, 2023) de, karbendazimin her iki türde genomik kararsızlığa yol açtığı tip I ve tip IV metilasyonuna neden olduğu CRED-RA analizi ile gösterilmiştir. CRED-RA yalnızca karbendazimin metilasyon deseninde neden olduğu farklılıkların tespitine olanak

¹⁰ <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2024.pdf> [Ziyaret tarihi: 23.04.2024]

¹¹ <https://aydin.tarimorman.gov.tr/Duyuru/205/Carbendazim-Aktif-Madde-Kullaniminin-Sonlandirilmasi> [Ziyaret tarihi: 23.04.2024]

sağladığından bu yüksek lisans tezi kapsamında gerçekleştirilen çalışmada, karbendazimin *F. culmorum*'da epigenetik modifikasyonlardan DNA metilasyonu üzerindeki etkisi *β -tubulin* geni özelinde ve tüm genom düzeyinde sırasıyla bisülfid dizileme ve ELISA yöntemleri ile araştırılmıştır.

Bir aktif bileşiğin bir organizma üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmalarda kurulan her deney seti kendi içerisinde kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmektedir. Yine de tez çalışması sırasında TÜBİTAK projesinde karbendazimin FcUK99 referans suşu üzerinde belirlenen MİK (1.4 µg/ml), MİK₂₅ (0.35 µg/ml) ve MİK₅₀ (0.7 µg/ml) dozları uygulanarak deneme setleri başlatılmış, bir önceki çalışmadan belirlenen radyal üreme çap değerleri (MİK₂₅ ve MİK₅₀ dozları için sırasıyla 4. gün, 22.2±0.05 mm ve 36.0±0.20 mm; 7.gün, 19.0±0.08 mm ve 28.2±0.11 mm) elde edilememiş, beklendiği şekilde kültürlerin üreme profillerinde farklılık olduğu gözlenmiştir. Aktif bileşiğin farklı konsantrasyonları ile gerçekleştirilen tarama sonrası karbendazimin 2.8 µg/mL konsantrasyonunun FcUK99'un üremesini tamamen inhibe ettiği (MİK) belirlenerek hesaplanan MİK₂₅ (0.7 µg/mL) ve MİK₅₀ (1.4 µg/mL) dozları ile yeni deneme setleri kurulmuştur. Bu dozların fungal üremeyi sırasıyla % 38.4 ve % 71.1 oranında inhibe ettiği, proje verileri ile uyumlu olan karbendazimin artan dozlarının doğrusal büyüme oranlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.0001$) azalmaya neden olduğu gösterilerek analizlere geçilmiştir. Tamamlanan TÜBİTAK projesi kapsamında karbendazimin çözücüsü olan asetonun bu aktif ajan için denenen % 0.47 (v/v) konsantrasyonunun fungal üremeyi olumsuz etkilemediği gösterilmiştir. Ayrıca, projede yer alan diğer aktif bileşikler için de çözücü olarak kullanılan asetonun denenen en yüksek konsantrasyonu olan % 1.65 (v/v)'in de fungal üreme üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir. Tez çalışması kapsamında karbendazimin MİK₂₅ dozunun içerdiği % 0.23 (v/v) ve MİK₅₀'nin içerdiği % 0.46 (v/v) oranındaki aseton hücre canlılığı üzerinde etkili olmayan doz aralığında kalmıştır. Karbendazimin inhibitör konsantrasyonlarının farklı *Fusarium* türlerinde değişiklik gösterebileceği farklı araştırma grupları tarafından rapor edilmiştir (Zhang ve diğ., 2016; Xiaoru ve diğ., 2022). Ayrıca ortam koşullarının *Fusarium* türlerinin mevcut üreme profillerini değiştirebildiği, dolayısıyla küresel ısınmanın yol açtığı iklim değişikliklerinin fitopatojenler için önemli olduğu da vurgulanmıştır (Vaughan ve diğ., 2016; Ejaz ve diğ., 2023). Aynı referans suşun kullanıldığı bu iki çalışmada fitopatojenin üreme profilinde belirlenen farklılık, beklendiği gibi deneylerin farklı zaman aralıkları ve ortam koşullarında gerçekleştirilmesinden kaynaklanmıştır. Elde edilen bu çıktı aktif bileşiklerin hücre canlılığına olan etkisini belirlemek üzere gerçekleştirilecek her bağımsız

çalışma için büyümeyi inhibe eden konsantrasyonların mutlaka test edilmesi gerektiğini, belirlenen yeni dozlarla deneme setlerinin kurulmasının gereklilik olduğunu göstermesi bakımından önemlidir.

Fungusit aktif bileşiklerinin apoptozu tetikleyerek hücre canlılığını azalttığı sıçan ve insan hücre kültürlerinde gösterilmiştir (Calviello ve diğ., 2006; Xu ve diğ., 2020). Antifungal ajan olarak kullanılan farklı aktif bileşiklerin *Fusarium*'da apoptoz benzeri mekanizmayı teşvik ettiği de bildirilmiştir (Semighini ve diğ., 2008; Yörük, 2018; Teker ve diğ., 2021; Albayrak ve diğ., 2023). Kültür ortamındaki apoptotik hücreleri canlı hücrelerden ayırt etmede kullanılan at/etbr ikili boyaması hızlı, uygun maliyetli, güvenilir ve özgün bir yöntemdir. Bu yöntemde at boyası canlı ve apoptoza uğrayan hücrelerin her ikisi tarafından da alınırken etbr boyası yalnızca canlı olmayan hücrelere girmektedir. Bunun sonucunda canlı hücreler floresan mikroskobu gözlemlerinde yeşil, hücre ölüm sürecindeki hücreler ise turuncu ışığa yaymaktadır (Ciniglia ve diğ., 2010; Liu ve diğ., 2015). Yörük (2018) *F. graminearum*'da tetrakonazolün etkisini araştırdığı çalışmasında apoptoz benzeri hücre ölüm yolağının varlığını bu boyama yaklaşımını kullanarak göstermiştir. Altı (6) günlük kontrol grubunda saptanan yeşil floresan ışığa hücrelerin canlı ve metabolik olarak etkin olduğunu göstermiş, deney gruplarında yeşilden sarıya, sarıdan turuncuya geçen ışımalarla karbendazimin MİK₂₅ ve MİK₅₀ dozlarının *F. culmorum*'un FcUK99 suşunda apoptoz benzeri ölüm mekanizmasını tetiklendiğini at/etbr ikili boyaması sonrası floresan mikroskobu incelemesi ile hücresel düzeyde ortaya koymuştur. Teker ve diğ. (2021) bitkisel esansiyel yağlardan biri olan α -thujonun, Albayrak ve diğ. (2023) de bir diğer esansiyel yağ olan mirsenin benzer şekilde *Fusarium*'da hücre ölüm yolağı olarak apoptoz benzeri süreci tetiklediğini bu boyama yaklaşımı ile göstermişlerdir. Bu çalışmada karbendazimin *Fusarium*'da hücre canlılığını apoptoz benzeri hücre ölüm yolağı yoluyla azaltarak fungal üreme oranlarını etkilediği boyama yaklaşımını kullanılarak desteklenmiştir.

Antifungal ajanların uzun süreli kullanımı sonucu bu bileşiklere karşı direnç kazanımı hem laboratuvar suşları hem de tarla izolatlarıyla yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Oshima ve diğ., 2006; Sevastos ve diğ., 2016; Hagiwara ve diğ., 2016). Brent ve Hollomon, (2007) mantar türleri tarafından fungusitlere karşı geliştirilen direnç mekanizmasının antifungal ajanın etki gösterdiği hedef bölgedeki modifikasyona bağlı olduğunu bildirilmişlerdir. Ülkemizde ve dünyada *Fusarium* türlerinin dahil olduğu birçok fitopatojenik türün karbendazime karşı direnç

geliştirdiği çeşitli araştırma grupları tarafından rapor edilmiştir (Brent ve Hollomon 2007; Zhang ve diğ., 2016; Liu ve diğ., 2019; Song ve diğ., 2022). Literatürde *β2-tubulin* geninde taşınan mutasyonların karbendazim direncinden sorumlu olabileceğini vurgulayan bildirimlerin aksine bu aktif ajana dirençli çeşitli suşların *β2-tubulin* gen dizilerinde mutasyonların tespit edilemediği raporları da bulunmaktadır. Bu sonuçlar, karbendazim direncinde farklı moleküler mekanizmaların rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Kawchuk ve diğ., 2002; Ma ve diğ., 2003; Suga ve diğ., 2011; Chen ve diğ., 2014; Xu ve diğ., 2019; Song ve diğ., 2022). Antifungal bileşiklerin epigenetik değişimlere yol açarak fitopatojenik mantar türlerinin virulansını etkileyebilecekleri bilinmektedir. He ve diğ. (2020) en yaygın epigenetik modifikasyonlardan biri olan DNA metilasyonunun fitopatojenlerin gelişimindeki, patojenitesindeki ve sekonder metabolizma biyosentezinin düzenlenmesindeki rolüne dikkatleri çekmiştir. Yörük (2018) de tetrakonazol fungusit aktif bileşiğinin *F. graminearum*'un gelişimi üzerindeki etkisinin DNA metilasyon değişimi aracılığı ile olabileceğini göstermesi bu bakımdan önemli bulunmuştur. Fang ve diğ. (2024) gerçekleştirdikleri çalışmalarında piraklostrobin aktif bileşiğinin bitki patojeni *Magnaporthe oryzae*'deki DNA metilasyon desenlerini değiştirerek gen anlatımını etkilediğini ortaya koymuştur. Piroklostrobinin gen içindeki yüksek 5mC seviyesiyle ilişkili olarak ubukitin aracılı proteolizi ve glutatyon metabolizmasını artırdığı; DNA replikasyonu, DNA hasarı onarımı ve lipid metabolizmasını ise inhibe ettiği rapor edilmiştir. Yapılan çok çeşitteki çalışmalara rağmen günümüzde fungusit aktif bileşiklerinin epigenetik mekanizmalar yoluyla fitopatojenik mantarlar üzerindeki etkileri ve/veya rolleri hakkında hala sınırlı bilgi bulunmaktadır (Yin ve diğ., 2023).

Tez çalışması kapsamında karbendazimin FcUK99 suşunda DNA metilasyonuna etkisi özgün bir gen üzerinden bisülfid dizileme yöntemi ile araştırılmıştır. Darst ve diğ. (2010) bisülfid dizileme yaklaşımının aynı amaçla kullanılan diğer yöntemlere göre en önemli avantajını, DNA'da yer alan her bir C'nin metilasyon durumunun ayrıntılı olarak belirlenmesini sağlaması olarak belirtmektedir. Dizileme sırasında DNA'daki 5mC'ler C olarak, metillenmemiş C'ler ise T olarak okunduğundan genin ORF'sinde yer alan 5mC'lerin pozisyonları kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Bu nedenle MİK₂₅ ve MİK₅₀ dozlarında karbendazime maruz bırakılan örnekler ile kontrol grubundan Maniatis ve diğ. (1982) tarafından bildirilen ölçütlere uygun saflıkta (1.75-1.85) ve miktarda (120-230 ng/μL) gDNA izolasyonu gerçekleştirildi. Ardından gDNA'lar sodyum bisülfid ile muamele edilip metillenmemiş C'lerin U'ya dönüşümü teşvik edilerek sadece metillenmiş C'lerin tespit edilebilmesi sağlanmıştır. Sodyum bisülfid dönüşümü

için birçok çalışmada kullanılan yüksek verimli ve hızlı sonuç veren ticari bir kit (EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit (D5030, Zymo Research) kullanılmıştır (Holmes ve diğ., 2014; Izzi ve diğ., 2014; Signoretti ve Gupte, 2023). Literatürde karbendazimin mikrotubul temel bileşenlerinden tubulin dimerinin alt birimi olan β -tubulin'e bağlanarak α -tubulin alt birimiyle birleşmesini engellediği ve bu şekilde hücre bölünmesini durdurduğu bildirilmektedir (Kara ve diğ., 2019; Tarafder ve Datta, 2022). Bu nedenle bisülfid uygulanmayan ve bisülfid dönüşümü yapılan gDNA'larda PZR ile çoğaltılacak özgün gen bölgesi *β -tubulin* olarak seçilmiş, bu iki gruba ait deney setlerinden çoğaltılan kısmi bölgelerin nukleotid dizileri karşılaştırılarak gen içinde yer alan 5mC'lerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Fusarium türlerinde eşeyli ve eşeysiz üreme sırasında farklı işlevlere sahip *β 1-tubulin* ve *β 2-tubulin* olarak adlandırılan iki *β -tubulin* geni bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda *β 1-tubulin* geninin mayoz bölünme evresinde askospor oluşumunda görev aldığı, eşeyli üreme için bu genin önemli olduğu, *β 2-tubulin* geninin ise hif büyümesinde ve DON mikotoksinin üretiminde baskın rol oynadığı ortaya konmuştur (Qiu ve diğ., 2012; Zhao ve diğ., 2014; Wang ve diğ., 2019). Çalışmada kullanılacak olan *F. culmorum* eşeysiz üreme gösteren bir türdür ve DON üreticisidir. Bu nedenlerden dolayı karbendazimin CpG adalarındaki metilasyon etkisinin belirlenmesi için *β 1-tubulin* ve *β 2-tubulin* hedef genler olarak seçilmiştir. Bisülfid özgün PZR'de kullanılmak üzere hem *β 1-tubulin* hem de *β 2-tubulin* geninin kodlanan ve kalıp ipliklerine özgün primer çiftlerinin tasarımı yapıldıktan sonra oligonukleotidler Δ G değerleri, çoğaltacakları ürün boyutları ve hedef bölgede yer alan CpG adacık sayıları bakımından kontrol edilmişlerdir. *β 2-tubulin* geninin çoğaltımı için tasarlanan primer çiftlerinin Δ G değerlerinin *β 1-tubulin* genininkinden daha yüksek oldukları belirlenmiş, çoğaltımı hedeflenen bölgenin çok sayıda CpG adacığını içerdiği saptanmış ve çoğaltılacak ürün boyutunun bisülfid özgün PZR için önerilen çoğaltım bölge boyut sınırına (150-300 bç) çok yakın olduğu bulunmuştur. Yukarıdaki nedenlerle tez çalışmasında karbendazimin epigenomik etki potansiyeli sadece *β 2-tubulin* geni üzerinden araştırılmıştır. Literatürde karbendazimin genellikle *β 2-tubulin* genindeki modifikasyonlar ile ilişkilendirilmiş olması da bu genin hedef gen olarak seçiminde etkili olmuştur (Qui ve diğ., 2011; Chen ve diğ., 2014; Yang ve diğ., 2018).

PZR ile çoğaltım sonrası, bisülfid uygulanmayan kontrol ve deney grubu örneklerinden 1312 bç boyutunda ve bisülfid dönüşümü yapılan kontrol ve deney grubu örneklerinin kodlanan ve kalıp ipliklerinden ise sırasıyla 311 ve 307 bç boyutunda *β 2-tubulin* genine ait DNA fragmentleri

elde edilmiştir. Bisülfid uygulanmamış ve bisülfid uygulanan tüm PZR ürünleri sırasıyla tek yönlü ve çift yönlü olarak Sanger yöntemi ile dizilenmiştir. Dizileme sonrası bisülfid uygulanmayan örneklerin nukleotid dizileri NCBI veri tabanında yer alan referans *β2-tubulin* gen dizisi ile hizalandığında dizilerin identik oldukları, aralarında varyasyon olmadığı tespit edilmiştir. Çift yönlü okumalar hizalandıklarında dizilemenin yüksek hassasiyette yapıldığı belirlendikten sonra tek bir ipliğe ait bu okumalardan elde edilen dizilim bilgileri birleştirilerek bisülfid uygulanmamış örneklere ait nukleotid dizileriyle hizalanmıştır. Nukleotid dizilimleri karşılaştırıldığında kontrol ve deney gruplarının hem kodlanan hem de kalıp dizilerinde *β2-tubulin* geninin çalışılan kısmi bölgesindeki tüm C'lerin T'ye dönüştüğü saptanmış, karbendazimin MİK₂₅ ve MİK₅₀ dozlarının *β2-tubulin* geninin kısmi bölgesindeki kodlanan ve kalıp ipliklerinde yer alan CpG adacıklarında metilasyona neden olmadığı ortaya konmuştur. Chen ve diğ. (2014) yaptıkları çalışmalarında *Fusarium fujikuroi*'in MBC grubu fungusitlerine karşı geliştirdiği direncin *β2-tubulin* genindeki nokta mutasyonlarından kaynaklandığını bildirmişlerdir. Buna karşın Kawchuk ve diğ. (2002) MBC grubu fungusitlerinden tiyabendazol dirençli ve hassas *Fusarium sambucinum* izolatlarının bağlantı analizinde *β2-tubulin* geninde belirledikleri nukleotid ve amino asit farklılıklarının tiyabendazol direnciyle bağlantılı olmadığını bulmuşlardır. Song ve diğ. (2022) de benzer şekilde bitki patojeni *Ustilaginoidea virens*'in karbendazime hem dirençli hem de hassas izolatlarının *β2-tubulin* geninde mutasyona yol açmadığını göstermişlerdir. Bu tez çalışmasında da karbendazimin artan doz uygulamasının *F. culmorum*'un *β2-tubulin* geni içinde nukleotid farklılığına ve DNA metilasyonuna yol açmadığı bulunarak aktif ajanın sadece *β2-tubulin* genindeki modifikasyonlar yolu ile değil farklı moleküler mekanizmalar aracılığıyla da etkili olabileceğini ortaya konmuştur.

Tez çalışması kapsamında karbendazimin DNA metilasyonuna etkisi tüm genom düzeyinde dolaylı ELISA yöntemi temelli olan bir ticari kit (MethylFlash™ Methylated DNA Quantification, P-1034-48, Epigentek) kullanılarak araştırılmıştır. Bu kitin tüm genom düzeyindeki metilasyonu belirlemedeki etkinliği farklı araştırma grupları tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda bildirilmiştir (Varga ve Soulsbury, 2019; Armando ve diğ., 2022; Liu ve diğ., 2023). Tüm genomda yer alan 5mC'ler metillenmemiş C'lerden yüksek doğrulukta ayırt edilerek kısa sürede ve düşük DNA miktarı ile kantitatif olarak bu kit aracılığıyla belirlenebildiğinden bu çalışmada Epigentek markasına ait ticari kitin kullanımına karar verilmiştir (Kurdyukov ve Bullock, 2016; de Oliveira ve diğ., 2020). Metilasyon analizi renk değişimi reaksiyonu temelli olarak ortamdaki renk yoğunluğunun ölçülerek 5mC'lerin

içeriğinin belirlenmesi ile gerçekleştirilmektedir. Çalışmada kontrol ve deney gruplarına ait örneklerin yer aldığı kuyucuklarda metile DNA'nın varlığını gösteren mavi renk gözlemlendi. Kolorimetrik olarak 450 nm dalga boyunda görünür ışıkta yapılan OD ölçümleri sonucunda tüm genom düzeyinde FcUK99 suşunun 5mC içeriği % 0.49 olarak belirlendi. Karbendazimin MİK₂₅ ve MİK₅₀ dozlarına maruz bırakılan gDNA örneklerinde ise tüm genomdaki 5mC içerikleri sırasıyla % 0.88 ve % 1.63 olarak bulundu. Karbendazim aktif ajanının MİK₂₅ ve MİK₅₀ dozları DNA metilasyonunu tüm genom seviyesinde kontrole göre sırasıyla % 79.6 ve % 232.7 artırdı. Artan dozlarda karbendazim uygulamasının yol açtığı hipermetilasyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu ortaya kondu (kontrol *vice versa* MİK₂₅, p<0.001; kontrol *vice versa* MİK₅₀, p<0.0001).

Sonuç olarak, karbendazimin büyüme inhibisyonuna neden olan dozlarının *F.culmorum*'da epigenetik değişimlerden DNA metilasyonuna etkisinin araştırıldığı bu çalışmada *β2-tubulin* geninin metilasyon profili incelendiğinde bu gen bölgesinde yer alan CpG adacıklarında metilasyon meydana gelmediği ancak aktif ajanın tüm genom düzeyinde DNA metilasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Yüksektepe'nin (2023) yüksek lisans tezi kapsamında karbendazimin uygulanan tüm dozlarının DNA metilasyon seviyesini FcUK99 suşunda artırdığı ve tip I ve tip IV metilasyonuna neden olduğu bulguları tez çalışma bulguları ile uyumludur. Dizi analizinden elde edilen veriler aynı zamanda karbendazimin *β2-tubulin* geninin ORF'sini içine alan kısmi bölgesinde nokta mutasyonlarına neden olmadığını da ortaya koymuştur.

Yüksek lisans tez çalışması bulguları, karbendazimin artan dozlarının aktif ajanın etki ettiği bildirilen hedef geninde (*β2-tubulin*) metilasyona neden olmadığını ancak, tüm genom düzeyinde DNA metilasyonunu artırdığını göstererek fungusit aktif bileşiklerinin fitopatojenik mantarlarda epigenetik mekanizmalar üzerinden etkili olduğunu göstermesi bakımından önemli bulunmuştur. Bu çalışma karbendazimin antifungal etkisinin literatürde bildirildiği şekilde her zaman *β2-tubulin* genindeki modifikasyona bağlı olmadığını farklı moleküler mekanizmaların aktif ajanın patojenitesi ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Karbendazimin bitkilerde yüksek patojeniteye sahip olan *Fusarium*'da tüm genom düzeyinde hipermetilasyona yol açığının belirlenmesi temel bilimlere ve literatüre katkı sağlayacak olması bakımından büyük önem taşımaktadır.

Yüksek lisans tez çalışmasından elde edilen çıktılar, fungusit aktif bileşiklerinin epigenetik etkilerinin araştırılacağı yeni araştırmalara temel oluşturacaktır. Ayrıca bu proje çıktıları tarım

alanlarında *Fusarium* ile mücadelede yaygın olarak kullanılan antifungal ajanların DNA metilasyonunu tüm genom düzeyinde artırabileceğini, metilasyonun germ hücrelerinde meydana gelmesi durumunda genomik damgalama yoluyla gelecek nesillere aktarılmasıyla fungusit direncine yol açabileceğini ortaya koymaktadır. Bu veriler yüksek düzeyde epigenetik değişimin fungusit direncinde etkili olabileceğini ve patojenler ile mücadelede bu epigenetik modifikasyonların da hedeflenmesinin önemini göstermesi bakımından da büyük önem arz etmektedir.



KAYNAKLAR

- Abacı-Günyar, O., 2017, Bitki patojeni funguslarda virulans faktörleri, *Mantar*, 8(2), 143-151.
- Abdallah-Nekache, N., Laraba, I., Ducos, C., Barreau, C., Bouznad, Z. & Boureghda, H., 2019, Occurrence of *Fusarium* head blight and *Fusarium* crown rot in Algerian wheat: identification of associated species and assessment of aggressiveness, *European journal of plant pathology*, 154, 499-512.
- Adeyeye, S.A.O., 2016, Fungal mycotoxins in foods: A review, *Cogent food & agriculture*, 2(1), 1213127.
- Albayrak, G., Yörük, E., Teker, T. & Sefer, Ö., 2023, Investigation of antifungal activities of myrcene on *Fusarium* reference strain, *Archives of microbiology*, 205(3), 82.
- Alex, A., Brundha, M.P. & Prathap, L., 2020, Sanger sequencing and its recent advances-a review, *PalArch's journal of archaeology of egypt/egyptology*, 17(7), 698-705.
- Anand, G. & Rajeshkumar, K.C., 2022, *Challenges and threats posed by plant pathogenic fungi on agricultural productivity and economy*, Fungal diversity, ecology and control management, In: Vijay Rani Rajpal, V.R., Singh I. Navi, S.S. (ed.), Bölüm 25, Springer, Singapore, 483-493.
- Armando, I., Cuevas, S., Fan, C., Kumar, M., Izzi, Z., Jose, P.A. & Konkalmatt, P.R., 2022, G Protein-Coupled Receptor 37L1 Modulates Epigenetic Changes in Human Renal Proximal Tubule Cells, *International journal of molecular sciences*, 23(22), 14456.
- Aydın, S., 2015, A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA, *Peptides*, 72, 4-15.
- Backhouse, D. & Burgess, L.W., 2002, Climatic analysis of the distribution of *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum* on cereals in Australia, *Australasian plant pathology*, 31, 321-327.
- Bi, C. W., Qiu, J.B., Zhou, M.G., Chen, C.J. & Wang, J.X., 2009, Effects of carbendazim on conidial germination and mitosis in germlings of *Fusarium graminearum* and *Botrytis cinerea*, *International journal of pest management*, 55(2), 157-163.
- Biancotto, C., Frigè, G., & Minucci, S., 2010, *Histone modification therapy of cancer*, In: Herceg Z, Ushijima T. (ed.), *Advances in genetics*, Bölüm 70, Academic Press, 341-386.
- 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.
- BosterBio, 2024, *Types of ELISA*, <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle>, [Ziyaret tarihi: 10.04.2024].

- Brent, K.J. & Hollomon, D.W., 2007, Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? FRAC, Monograph No. 1. Brussels: Fungicide Resistance Action Committee.
- Brosch, G., Loidl, P. & Graessle, S., 2008, Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi, *FEMS microbiology reviews*, 32(3), 409–439.
- Calviello, G., Piccioni, E., Boninsegna, A., Tedesco, B., Maggiano, N., Serini, S., Wolf F.I. & Palozza, P., 2006, DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism, *Toxicology and applied pharmacology*, 211(2), 87-96.
- Chen Z., Li S., Shankar S., Shyy Y.J. & Chien S., 2017, Epigenetic Regulation: A New Frontier for Biomedical Engineers, *The annual review of biomedical engineering*, 19, 195–219.
- Chen, Z., Gao, T., Liang, S., Liu, K., Zhou, M. & Chen, C., 2014, Molecular mechanism of resistance of *Fusarium fujikuroi* to benzimidazole fungicides, *Fems microbiology letters*, 357(1), 77-84.
- Chinnusamy V. & Zhu J.K., 2009, Epigenetic regulation of stress responses in plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 12(2), 133–139.
- Ciniglia, C., Pinto, G., Sansone, C. & Pollio, A., 2010, Acridine orange/Ethidium bromide double staining test: A simple In-vitro assay to detect apoptosis induced by phenolic compounds in plant cells, *Allelopathy journal*, 26(2), 301-308.
- Çepni, E., Tunalı, B. & Gürel, F., 2013, Genetic diversity and mating types of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* originating from different agro-ecological regions in Turkey, *Journal of basic microbiology*, 53(8), 686-694.
- Dai, Q., Ye, C., Irkliyenko, I., Wang, Y., Sun, H.L., Gao, Y., Liu, Y., Beadell, A., Perea, J., Goel A. & He, C., 2024, Ultrafast bisulfite sequencing detection of 5-methylcytosine in DNA and RNA, *Nature biotechnology*, 1-12.
- Daou, R., Joubrane, K., Maroun, R.G., Khabbaz, L.R., Ismail, A. & El Khoury, A., 2021, Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies, *AIMS agriculture and food*, 6(1), 416-447.
- Darst., R.P., Pardo, C.E., Ai, L., Brown, K.D. & Klädde, M.P., 2010, Bisulfite sequencing of DNA, *Current protocols in molecular biology*, 91(1), 7-9.
- de Oliveira, N.F.P., de Castro Coêlho, M. & Viana Filho, J.M.C., 2020, *ELISA analysis of global methylation levels*, In: Epigenetics methods, In: Tollefsbol, T. (ed.), Bölüm 5, Academic Press, 83-92.
- Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W. & Sharon, A., 2017, *Plant pathogenic fungi*, The fungal kingdom, In: Heitman J., Howlett B.J., Crous P.W., Stukenbrock E.H., James T.Y. & Gow N.A.R. (ed.), Bölüm 34, ASM Press, ISBN:9781555819576, 701-726.
- Dubey, A. & Jeon, J., 2016, Epigenetic regulation of development and pathogenesis in fungal plant pathogens, *Molecular plant pathology*, 18(6), 887–898.

- Ejaz, M.R., Jaoua, S., Ahmadi, M. & Shabani, F., 2023, An examination of how climate change could affect the future spread of *Fusarium* spp. around the world, using correlative models to model the changes, *Environmental technology & innovation*, 31, 103177.
- Ekwomadu, T.I., Akinola, S.A. & Mwanza, M., 2021, *Fusarium* mycotoxins, their metabolites (free, emerging, and masked), food safety concerns, and health impacts, *International journal of environmental research and public health*, 18(22), 11741.
- Elías-Villalobos, A., Barrales, R.R., & Ibeas, J.I., 2019, Chromatin modification factors in plant pathogenic fungi: insights from *Ustilago maydis*, *Fungal genetics and biology*, 129, 52-64.
- Fang, S., Wang, H., Qiu, K., Pang, Y., Li, C. & Liang, X., 2024, The fungicide pyraclostrobin affects gene expression by altering the DNA methylation pattern in *Magnaporthe oryzae*, *Frontiers in plant science*, 15, 1391900.
- Farrell, Jr. R.E., 2009, *RNA Methodologies: laboratory guide for isolation and characterization*, 4th ed., Academic Press, New York.
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molly, P.L. & Paul, C.L., 1992, A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands, *Proceedings of the national academy of sciences*, 89(5), 1827-1831.
- Fu, C., Li, L., Wu, W., Li, M., Yu, X. & Yu, L., 2012, Assessment of genetic and epigenetic variation during long-term *Taxus* cell culture, *Plant cell reports*, 31, 1321-1331.
- Gahlaut, V., Jaiswal, V. & Kumar, S., 2022, *Whole-genome bisulfite sequencing for detection of DNA methylation in crops*, In Genomics of cereal crops, In: Wani, S.H., & Kumar A., Bölüm 17., Humana Press, NY: Springer US, New York, 325-334.
- Gan, S.D. & Patel, K.R., 2013, Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay, *Journal of investigative dermatology*, 133(9), 1-3.
- Glenn, A.E., 2007, Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed, *Animal feed science and technology*, 137(3-4), 213-240.
- Golbabapour, S., Abdulla, M.A. & Hajrezaei, M.A., 2011, Concise Review on Epigenetic Regulation: Insight into Molecular Mechanisms, *International journal of molecular sciences*, 12(12), 8661-8694.
- Gondal, A.S., Ijaz, M., Riaz, K. & Khan, A.R., 2012, Effect of different doses of fungicide (Mancozeb) against alternaria leaf blight of tomato in tunnel, *Journal plant pathology microbiology*, 3(125), 2.
- Gupta, M.K., Ghuge, A., Parab, M., Al-Refaei, Y., Khandare, A., Dand, N. & Waghmare, N., 2022, A comparative review on high-performance liquid chromatography (HPLC), ultra performance liquid chromatography (UPLC) & high-performance thin layer chromatography (HPTLC) with current updates, *Current issues in pharmacy and medical sciences*, 35(4), 224-228.

- Hagiwara, D., Watanabe, A., Kamei, K. & Goldman, G.H., 2016, Epidemiological and genomic landscape of azole resistance mechanisms in *Aspergillus* fungi, *Frontiers in microbiology*, 7, 214993.
- He, C., Zhang, Z., Li, B. & Tian, S., 2020, The pattern and function of DNA methylation in fungal plant pathogens, *Microorganisms*, 8(2), 227.
- Hebestreit, K., Dugas, M. & Klein, H.U., 2013, Detection of significantly differentially methylated regions in targeted bisulfite sequencing data, *Bioinformatics*, 29(13), 1647-1653.
- Holmes, E.E., Jung, M., Meller, S., Leisse, A., Sailer, V., Zech, J., Mengdehl M., Garbe L.A., Uhl B., Kristian S. & Dietrich, D., 2014, Performance evaluation of kits for bisulfite-conversion of DNA from tissues, cell lines, FFPE tissues, aspirates, lavages, effusions, plasma, serum, and urine, *PloS one*, 9(4), 93933.
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A.R., Knogge, W. & Deising, H.B., 2011, When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi, *Journal of plant physiology*, 168(1), 51-62.
- Izzi, B., Binder, A. M., & Michels, K.B., 2014, Pyrosequencing evaluation of widely available bisulfite conversion methods: considerations for application, *Medical epigenetics*, 2(1), 28-36.
- Ji, F., He, D., Olaniran, A.O., Mokoena, M.P., Xu, J. & Shi, J., 2019, Occurrence, toxicity, production and detection of *Fusarium* mycotoxin: A review, *Food production, processing and nutrition*, 1(1), 1-14.
- Kara, M., Jannuzzi, A.T. & Yön, S., 2019, In-vitro investigation of the cytotoxic and genotoxic effects of benzimidazole group pesticides benomyl and carbendazim, *Journal of toxicology current research*, 3(007).
- Karpova, N.N. & Umemori, J., 2016, *Protocol for methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) analysis*, Epigenetic methods in neuroscience research, In: Karpova, N. (ed.), Bölüm 4, Humana Press, 97-114.
- Kawchuk, L.M., Hutchison, L.J., Verhaeghe, C.A., Lynch, D.R., Bains, P.S. & Holley, J.D., 2002, Isolation of the β -tubulin gene and characterization of thiabendazole resistance in *Gibberella pulicaris*, *Canadian journal of plant pathology*, 24(2), 233-238.
- Köycü, N. D., 2021, *Fusarium* Başak Yanıklığının Buğday Kalite Parametreleri Üzerine Etkisi: Enfekteli Başaklara Fungisit Uygulamaları Sonrasındaki Değişim, *Journal of the institute of science and technology*, 11, 3455-3464.
- Köycü, N.D., 2018, Effect on *Fusarium culmorum* of fungicides used in wheat seed, *Proceedings of the International Congress on Engineering and Life Science*, 26-29 Nisan 2018 Kastamonu, Turkey, 26-29.
- Kurdyukov., S. & Bullock M., 2016, DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method, *Biology*, 5(1), 3.

- Leslie, J.F. & Summerell, B.A., 2013, *An overview of Fusarium, Fusarium*, In: Brown D.W., Proctor R.H. (ed.), Bölüm 1, Caister Academic Press, USA, 1-11.
- Li, L.C. & Dahiya, R., 2002, MethPrimer: designing primers for methylation PCRs, *Bioinformatics*, 18(11), 1427-1431.
- Li, Y. & Tollefsbol, T.O., 2011, *DNA methylation detection: bisulfite genomic sequencing analysis*, Epigenetics protocols, In: Tollefsbol, T. O. (ed.), Bölüm 2, Humana Press, 11-21.
- Liu, K., Liu, P.C., Liu, R. & Wu, X., 2015, Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry, *Medical science monitor basic research*, 21, 15.
- Liu, S., Fu, L., Wang, S., Chen, J., Jiang, J., Che, Z., Tian Y. & Chen, G., 2019, Carbendazim resistance of *Fusarium graminearum* from Henan wheat, *Plant disease*, 103(10), 2536-2540.
- Liu, Z., Li, Y. & Zhang, X., 2023, DNA methylation on C5-Cytosine and N6-Adenine in the *Bursaphelenchus xylophilus* genome, *BMC genomics*, 24(1), 671.
- Lucas, J.A., Hawkins, N.J. & Fraaije, B.A., 2015, The evolution of fungicide resistance, *Advances in applied microbiology*, 90, 29-92.
- Luczak, M.W. & Jagodziński, P.P., 2006, The role of DNA methylation in cancer development, *Folia histochemica et cytobiologica*, 44(3), 143-154.
- 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.
- Ma, Z., Yoshimura, M.A. & Michailides, T.J., 2003, Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California, *Applied and environmental microbiology*, 69(12), 7145-7152.
- Machado, F.J., Santana, F.M., Lau, D. & Del Ponte, E.M., 2017, Quantitative review of the effects of triazole and benzimidazole fungicides on *Fusarium* head blight and wheat yield in Brazil, *Plant disease*, 101(9):1633-1641.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J., 1982, *Molecular cloning: a laboratory manual*, New York.
- Martienssen, R.A. & Colot, V., 2001, DNA Methylation and Epigenetic Inheritance in Plants and Filamentous Fungi, *Science*, 293(5532), 1070–1074.
- Matny, O.N., 2015, *Fusarium* head blight and crown rot on wheat & barley: losses and health risks, *Advances in plants agriculture research*, 2, 2-7.

- McLaughlin, M.S., Roy, M., Abbasi, P.A., Carisse, O., Yurgel, S.N. & Ali, S., 2023, Why Do We Need Alternative Methods for Fungal Disease Management in Plants?, *Plants*, 12(22), 3822.
- Mert-türk, F., Kahriman, F., Gencer, R. & Egesel, C.O., 2013, *Fusarium* Başak Yanıklığının Buğdayda Toplam Protein ve Karbonhidrat İçeriğine Etkisi, *Yüzüncü yıl university journal of agricultural sciences*, 23(2), 149-153.
- Mohn, F., Weber, M., Schübeler, D. & Roloff, T.C., 2009, *Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)*, DNA methylation: methods and protocols, In: Tost J. (ed.), Bölüm 5, Humana Press, 55-64.
- Nai, Y.S., Huang, Y.C., Yen, M.R. & Chen P.Y., 2021, Diversity of Fungal DNA Methyltransferases and Their Association With DNA Methylation Patterns, *Frontiers in microbiology*, 11(616922).
- Naranjo-Ortiz, M.A. & Gabaldón, T., 2020, Fungal evolution: cellular, genomic and metabolic complexity, *Biological reviews*, 95(5), 1198-1232.
- Nelson, P.E., Dignani M.C. & Anaisse E.J., 1994, Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species, *Clinical microbiology reviews*, 7(4), 479-504.
- Nikitin, D.A., Ivanova, E.A., Semenov, M.V., Zhelezova, A.D., Ksenofontova, N.A., Tkhakakhova, A.K. & Kholodov, V.A., 2023, Diversity, ecological characteristics and identification of some problematic phytopathogenic *Fusarium* in soil: a review, *Diversity*, 15(1), 49.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Robert, V.A., Crous, P.W., Geiser, D.M. & Kang, S., 2015, DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions, *Phytoparasitica*, 43(5), 583-595.
- Oshima, M., Banno, S., Okada, K., Takeuchi, T., Kimura, M., Ichiishi, A., Yamaguchi I. & Fujimura, M., 2006, Survey of mutations of a histidine kinase gene BcOS1 in dicarboximide-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*, *Journal of general plant pathology*, 72, 65-73.
- Ölmez, F. & Tunali, B., 2019, *Fusarium* species isolated from wheat samples showing root and crown rot symptoms in Southeast Anatolia, *Plant protection bulletin*, 59 (3), 31-37.
- Pajares, M.J., Palanca-Ballester, C., Urtasun, R., Alemany-Cosme, E., Lahoz, A. & Sandoval, J., 2021, Methods for analysis of specific DNA methylation status, *Methods*, 187, 3-12.
- Pavlenko, R., Berzina, Z., Reinholds, I., Bartkiene, E., & Bartkevics, V., 2024, An Occurrence Study of Mycotoxins in Plant-Based Beverages Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry, *Toxins*, 16(1), 53.
- Peng, Y, Li S.J., Yan J., Tang Y., Cheng J.P., Gao A.J., Yao, X., Ruan J.J. & Xu B.L., 2021, Research Progress on Phytopathogenic Fungi and Their Role as Biocontrol Agents, *Frontiers in microbiology*, 12, 670135.

- Perincherry, L., Lalak-Kańczugowska, J. & Stępień, Ł., 2019, *Fusarium*-produced mycotoxins in plant-pathogen interactions, *Toxins*, 11: 664.
- Pierre L., René F., Danièle D., Catherine A., Catherine L., Jocelyne B., Michel G. & Florence C., 2002, Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*, *Pest management science*, 58(9), 876–888.
- Prapagdee, B., Kuekulvong, C. & Mongkolsuk, S., 2008, Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi, *International journal of biological sciences*, 4(5), 330.
- Qiu, J., Huang, T., Xu, J., Bi, C., Chen, C. & Zhou, M., 2012, β -Tubulins in *Gibberella zeae*: their characterization and contribution to carbendazim resistance, *Pest management science*, 68(8), 1191-1198.
- Qiu, J., Xu, J., Yu, J., Bi, C., Chen, C. & Zhou, M., 2011, Localisation of the benzimidazole fungicide binding site of *Gibberella zeae* β 2-tubulin studied by site-directed mutagenesis, *Pest management science*, 67(2), 191-198.
- Russell, P.E., 2005, A century of fungicide evolution, *The journal of agricultural science*, 143(1), 11–25.
- Samanta, I., 2015, *General Characteristics of Fungi*, Veterinary Mycology, Bölüm 2, Springer, 3-8.
- Sasaki, M., Anast, J., Bassett, W., Kawakami, T., Sakuragi, N. & Dahiya, R., 2003, Bisulfite conversion-specific and methylation-specific PCR: a sensitive technique for accurate evaluation of CpG methylation, *Biochemical and biophysical research communications*, 309(2), 305-309.
- 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.
- Schilling, A.G., Moller, E.M. & Geiger, H.H., 1996, Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*, *Phytopathology*, 86(5), 515-522.
- Schmitt, A. & Seddon, B., 2005, Biocontrol of plant pathogens with microbial BCAs and plant extracts—advantages and disadvantages of single and combined use, *Proceedings of the 14th International Reinhardbrunn Symposium: Modern Fungicides and Antifungal Compounds IV*, BCPC, Alton, UK, 205-225.
- Semighini, C.P., Murray, N. & Harris, S.D., 2008, Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and development by farnesol, *FEMS microbiology letters*, 279(2), 259-264.
- Sevastos, A., Markoglou, A., Labrou, N.E., Flouri, F. & Malandrakis, A., 2016, Molecular characterization, fitness and mycotoxin production of *Fusarium graminearum* laboratory strains resistant to benzimidazoles, *Pesticide biochemistry and physiology*, 128, 1-9.

- Sharma, M., Guleria, S., Singh, K., Chauhan, A. & Kulshrestha, S., 2018, Mycovirus associated hypovirulence, a potential method for biological control of *Fusarium* species, *Virus disease*, 29(2), 134–140.
- Shude, S., Yobo, K.S. & Mbili, N.C., 2020, Progress in the management of *Fusarium* head blight of wheat: An overview, *South african journal of science*, 116(11-12), 1-7.
- Signoretti, C. & Gupte, S. A., 2023, Studies in CRISPR-generated Mediterranean G6PD variant rats reveal G6PD orchestrates genome-wide DNA methylation and gene expression in vascular wall, *bioRxiv*.
- Simon, S.A. & Meyers, B.C., 2011, *Small RNA-mediated epigenetic modifications in plants*, Current opinion in plant biology, In: Köhler C., Wagner D. (ed.), Bölüm 14, Elsevier, 148-155.
- Singh, S., Singh, N., Kumar, V., Datta, S., Wani, A.B., Singh, D., Singh, K. & Singh J., 2016, Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim, *Springer*, 14:317–329.
- Song, J., Wang, Z., Wang, Y., Zhang, S., Lei, T., Liang, Y., Dai Q., Huo Z. Xu K. & Chen, S., 2022, Prevalence of carbendazim resistance in field populations of the rice false smut pathogen *Ustilaginoidea virens* from Jiangsu, China, molecular mechanisms, and fitness stability, *Journal of fungi*, 8(12), 1311.
- Song, J.H., Zhang, S.J., Wang, Y., Chen, Y.T., Luo, J.F., Huo, Z.Y., Dai Q.G. & Xu, K., 2022, First Report of Carbendazim-Resistant Field Isolates of *Ustilaginoidea virens* on Rice in East China, *Plant health progress*, 23(3), 334-335.
- Suga, H., Nakajima, T., Kageyama, K. & Hyakumachi, M., 2011, The genetic profile and molecular diagnosis of thiophanate-methyl resistant strains of *Fusarium asiaticum* in Japan, *Fungal biology*, 115(12), 1244-1250.
- Summerell, B.A., 2019, Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus, *Annual review of phytopathology*, 57, 323-339.
- Szczepanek, J. & Tretyn, A., 2023, MicroRNA-Mediated Regulation of Histone-Modifying Enzymes in Cancer: Mechanisms and Therapeutic Implications, *Biomolecules*, 13(11), 1590.
- Tarafder, M. & Datta, B., 2022, Deciphering β -*tubulin* gene of carbendazim resistant *Fusarium solani* isolate and its comparison with other *Fusarium* species, *Current genetics*, 68(3-4), 429-447.
- Teker, T., Arslan, M., Akpınar R., Mert F., Yörük E. & Albayrak G., 2023, Screening of tebuconazole, carbendazim, and fludioxonil resistance in *Fusarium* spp., the causal agent of cereal diseases in Türkiye, *2nd International Molecular Plant Protection Congress*, 15-18 Mayıs 2023 Bursa Türkiye, ISBN:978-625-8451-80-179.
- 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.

- Thind, T.S., 2021, Changing trends in discovery of new fungicides: a perspective, *Indian phytopathology*, 74, 875–883.
- Timmusk, S., Nevo, E., Ayele, F., Noe, S. & Niinemets, Ü., 2020, Fighting *Fusarium* pathogens in the era of climate change: A conceptual approach, *Pathogens*, 9(6), 419.
- Tok, F.M. & Arslan, M., 2016, Distribution and genetic chemotyping of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* populations in wheat fields in the eastern Mediterranean region of Turkey, *Biotechnology & biotechnological equipment*, 30(2), 254-260.
- Toparslan, E., Mercan, L. & Kuran, M., 2015, Kalıtımın Epigenetik Boyutunda DNA Metilasyon Desenleri, *Hayvansal üretim*, 56(2), 38-42.
- Tunali, B., Ozseven, I., Büyük, O., Erdurmus, D. & Demirci, A., 2006, *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation of wheat in Marmara region and reactions of wheat cultivars and lines to *F. graminearum* and *F. culmorum*, *Plant pathology journal*, 5(2).
- Tusnady, G. E., Simon, I., Varadi, A. & Aranyi, T., 2005, BiSearch: primer-design and search tool for PCR on bisulfite-treated genomes, *Nucleic acids research*, 33(1), 9.
- Varga, S. & Soulsbury, C.D., 2019, Arbuscular mycorrhizal fungi change host plant DNA methylation systemically, *Plant biology*, 21(2), 278-283.
- Vaughan, M., Backhouse, D. & Ponte, E.D., 2016, Climate change impacts on the ecology of *Fusarium graminearum* species complex and susceptibility of wheat to *Fusarium* head blight: A review, *World mycotoxin journal*, 9(5), 685-700.
- Vela-Corcía, D., Romero, D., de Vicente, A. & Pérez-García, A., 2018, Analysis of β -tubulin-carbendazim interaction reveals that binding site for MBC fungicides does not include residues involved in fungicide resistance, *Scientific reports*, 8(1), 7161.
- von Meyenn, F., 2022, *Profiling DNA Methylation in Human Naïve Pluripotent Stem Cells*, Human Naïve Pluripotent Stem Cells, In: Rugg-Gunn, P. (ed.), Bölüm 11, Humana Press, New York, NY, 157-180.
- 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.
- Walker, J.M., 1987, *The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)*, In Techniques in Molecular Biology, In: Walker, J. M. & Gaastra W. (ed.), Bölüm 2, MA: Springer US, Boston, 82-97.
- Wang, H., Chen, D., Li, C., Tian, N., Zhang, J., Xu, J. R. & Wang, C., 2019, Stage-specific functional relationships between Tub1 and Tub2 beta-tubulins in the wheat scab fungus *Fusarium graminearum*, *Fungal genetics and biology*, 132, 103251.

- Wei, J.W., Huang, K., Yang, C. & Kang, C.S., 2016, Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review), *Oncology reports*, 37, 3-9.
- Williamson Benavides, B.A. & Dhingra, A., 2021, Understanding Root Rot Disease in Agricultural Crops, *Horticulturae*, 7(2), 33.
- Xiaoru, Y., Jianqiang, X., Ying, S., Kai, Z., Xia, Y., Zi, X., Wei, Z. & Ying, H., 2022, Sensitivity of the isolates of *Fusarium pseudograminearum* to carbendazim in Henan Province, *Chinese journal of pesticide science*, 24(1), 81-87.
- Xu, J., 2022, Assessing global fungal threats to humans, *MLife*, 1(3), 223-240.
- Xu, J., Xiong, H., Zhang, X., Muhayimana, S., Liu, X., Xue, Y. & Huang, Q., 2020, Comparative cytotoxic effects of five commonly used triazole alcohol fungicides on human cells of different tissue types, *Journal of environmental science and health, Part B*, 55(5), 438-446.
- Xu, S., Wang, J., Wang, H., Bao, Y., Li, Y., Govindaraju, M., Yao W., Chen B. & Zhang, M., 2019, Molecular characterization of carbendazim resistance of *Fusarium* species complex that causes sugarcane pokkah boeng disease, *Bmc genomics*, 20, 1-14.
- Yan, M.S.C., Matouk, C.C. & Marsden, P.A., 2010, Epigenetics of the vascular endothelium, *Journal of applied physiology*, 109(3), 916-926.
- Yang, Y., Li, M. X., Duan, Y. B., Li, T., Shi, Y.Y., Zhao, D.L., Zhou Z.H., Xin W.J., Wu J., Pan X.Y., Li Y.J., Zhu Y.Y. & Zhou, M. G., 2018, A new point mutation in $\beta 2$ -tubulin confers resistance to carbendazim in *Fusarium asiaticum*, *Pesticide biochemistry and physiology*, 145, 15-21.
- Yin, Y., Miao, J., Shao, W., Liu, X., Zhao, Y. & Ma, Z., 2023, Fungicide resistance: Progress in understanding mechanism, monitoring, and management, *Phytopathology*, 113(4), 707-718.
- Yoon, M.Y., Cha, B. & Kim, J.C., 2013, Recent trends in studies on botanical fungicides in agriculture, *The plant pathology journal*, 29(1), 1-9.
- Yörük, E., 2018, Tetraconazole leads to alterations in *Fusarium graminearum* at different molecular levels, *Applied ecology & environmental research*, 16(5).
- Yörük, E., Tunali, B., Kansu, B., Ölmez, F., Uz, G., Zümrüt, I.M., Sarıkaya, A. & Meyva, G., 2016, Characterization of high-level deoxynivalenol producer *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates caused head blight and crown rot diseases in Turkey, *Journal of plant diseases and protection*, 123, 177-186.
- Yu, N.K., Baek, S.H. & Kaang, B.K., 2011, DNA methylation-mediated control of learning and memory, *Molecular brain*, 4, 1-9.
- 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., 2023, *Yaygın olarak kullanılan antifungal ajanların Fusarium türlerinin genomik kararsızlığı üzerindeki etkilerinin araştırılması*, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi.
- Zakaria, L., 2023, *Fusarium* species associated with diseases of major tropical fruit crops, *Horticulturae*, 9(3), 322.
- Zhang, H., Brankovics, B., van der Lee, T.A., Waalwijk, C., van Diepeningen, A.A., Xu, J., Xu J., Chen W. & Feng, J., 2016, A single-nucleotide-polymorphism-based genotyping assay for simultaneous detection of different carbendazim-resistant genotypes in the *Fusarium graminearum* species complex, *PeerJ*, 4, 2609.
- Zhang, Y., He, K., Guo, X., Jiang, J., Qian, L., Xu, J., Che Z., Huang X. & Liu, S., 2023, Transcriptomic profiling of *Fusarium pseudograminearum* in response to carbendazim, pyraclostrobin, tebuconazole, and phenamacril, *Journal of fungi*, 9(3), 334.
- Zhao, Z., Liu, H., Luo, Y., Zhou, S., An, L., Wang, C., Jin Q., Zhou M. & Xu, J.R., 2014, Molecular evolution and functional divergence of tubulin superfamily in the fungal tree of life, *Scientific reports*, 4(1), 6746.
- 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.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Şule İNAN KENAR
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	24.06.2021

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

Makale ve Bildiriler	
Danışman, Z., İnan, Ş., Özsoy, E., Yörük, E. & Yli-Mattila, T., 2022, Terpinolene is an effective essential oil compound to protect <i>Hordeum vulgare</i> L. from <i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc, <i>Trakya University Journal of Natural Sciences</i> , 23(1), 71-79.	