

**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

***Bacillus megaterium*'un *Fusarium* TÜRLERİNDE
ANTAGONİSTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Esra Nur KELEŞ**

**Danışman
Dr. Öğretim Üyesi Ayşe Feyza TUFAN DÜLGER**

**II. Danışman
Doç. Dr. Emre YÖRÜK**

İstanbul 2021

TEZ ONAY TUTANAĞI

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim/Anasanat Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Esra Nur Keleş tarafından hazırlanan “***Bacillus megaterium***’un ***Fusarium*** Türlerinde Antagonistik Etkisinin İncelenmesi” konulu çalışması jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:
15/02/2021

(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu):

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Feyza TUFAN DÜLGER
: Danışman, Haliç Üniversitesi

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Emre YÖRÜK
II. Danışman, İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Emel BOZKAYA
: Asıl Üye, Haliç Üniversitesi

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Özlem SAĞLAM UÇAR
: Asıl Üye, Haliç Üniversitesi

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Fatih SEYHAN
: Asıl Üye, İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hatice YORULMAZ
Vekil Müdür

İNTİHAL RAPORU

Bacillus megaterium'ün *Fusarium* Türlerinde Antagonistik Etkisinin İncelenmesi

ORJİNALLIK RAPORU

%**2**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**2**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**0**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

www.mikrobiyoloji.org

İnternet Kaynağı

%**1**

2

SEFER, Özlem, YÖRÜK, Emre, DEVELİ, Elif Sedef, ZÜMRÜT, Işıl Melis, SEZER, Ayşe Server and KONUKÇU, Zeynep. "Kaempferol'ün Başak Yanıklığı Etmeni *Fusarium culmorum*'un Üremesi ve Toksin Üretimi Üzerine Olan Etkileri", Süleyman Demirel Üniversitesi, 2017.

Yayın

%**1**

3

SEFER, Özlem, YÖRÜK, Emre, DEVELİ, Elif Sedef, SEZER, Ayşe Server and KONUKCU, Zeynep. "2,4-Dimetilpirol'ün Başak Yanıklığı Hastalığı Etmeni *Fusarium* ", İzzet KARA, Ramazan MAMMADOV, 2017.

Yayın

%**1**

TEZ ETİK BEYANI

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Bacillus megaterium*’un *Fusarium* Türlerinde Antagonistik Etkisinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanlarım Dr. Öğretim Üyesi Ayşe Feyza TUFAN DÜLGER ve Doç. Dr. Emre YÖRÜK ’ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri ve analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Esra Nur KELEŞ

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmam süresince bana her türlü destek ve yardımda bulunan, değerli danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Ayşe Feyza TUFAN DÜLGER ve Lisans öğrenimimde olduğu gibi Yüksek lisans öğrenimimde de her türlü destek ve yardımda bulunan ikinci danışman hocam Doç. Dr. Emre YÖRÜK'e en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullandığım *Bacillus megaterium* suşlarının temini için destek olan Prof. Dr. Hasan Murat AKSOY ve Dr. Öğretim Üyesi Yılmaz KAYA hocalarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitim süresince derslerinde bulunduğum ve harici tüm destekleri ile yanımda olan saygı değer öğretim üyelerine; hoş sohbetleri ile eğitim dönemimi güzel geçirmeme vesile olan dönem arkadaşlarım Elest İrem CANSIZ, Eysan AKDAĞ ile Esmer TAGHIYEVA'ya teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında bana gösterdikleri anlayış, maddi ve manevi destekleri için sevgili annem Havva KELEŞ ,sevgili babam Orhan KELEŞ ve sevgili erkek kardeşim Kürşat Berk KELEŞ'e, son olarakta tez yazım aşamasında bana her türlü manevi destekte bulunan sevgili kız kardeşim Ülkü ÇİÇEK'e ve de sevgili nişanlım Fatih KEYFOĞLU'na teşekkür ederim.

Şubat, 2021

Esra Nur KELEŞ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ ONAY TUTANAĞI.....	ii
İNTİHAL RAPORU	iii
TEZ ETİK BEYANI	iv
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR	viii
SEMBOLLER.....	ix
ŞEKİLLER.....	x
ÇİZELGELER.....	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Fusarium</i> Genel Özellikleri	4
2.1.1. <i>Fusarium</i> Hastalıkları.....	5
2.1.2. <i>Fusarium</i> Hastalıkları ile Mücadele	8
2.2. Biyokontrol ve Biyokontrol Ajanları	11
2.2.1. <i>Bacillus</i> spp. Genel Özellikleri ve İlgili Çalışmalar.....	13
2.2.2. <i>Bacillus megaterium</i>	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Araştırmanın Amacı	17
3.2. Araştırma Sürecinin Belirlenmesi	17
3.3. Araştırma Yöntemi.....	17
3.3.1. <i>Fusarium</i> Materyali ve <i>in vitro</i> Üretimi	17
3.3.2. <i>Bacillus megaterium</i> Materyali ve <i>in vitro</i> Üretimi	18
3.3.3. İkili Kültür Deneyi	18
3.3.4. Uçucu Organik Bileşikler Deneyi (VOC)	19
3.3.5. Genomik DNA İzolasyonu	20

3.3.6.	Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	21
3.3.7.	Nükleik Asit Moleküllerinin Kalitatif ve Kantitatif Analizleri	22
3.3.8.	Biyoinformatik Çalışmalar	23
3.3.9.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	24
3.3.10.	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR).....	24
3.3.11.	Hücre Proliferasyonunun Oransal Olarak Belirlenmesi	25
4.	BULGULAR	27
4.1.	İkili Kültür Analizi.....	27
4.2.	Uçucu Organik Bileşikler (VOC) Analizi	30
4.3.	Nükleik Asit Moleküllerinin Kalitatif ve Kantitatif Analizleri Sonucu	34
4.4.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizi	35
4.5.	Gen Ekspresyon Analizleri (qPCR)	36
4.6.	Hücre Proliferasyonu Analizi	39
5.	SONUÇ	41
6.	TARTIŞMA	43
7.	ÖNERİLER	48
8.	KAYNAKLAR.....	49
9.	ÖZGEÇMİŞ.....	56

KISALTMALAR

15- ADON	: 15-asetildekoksivivalenol
3-ADON	: 3-asetildekoksivivalenol
BLAST Arama Aracı	: Basic Local Alignment Search Tool; Temel Yerel Hizalama
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
CMC	: Karboksimetilselüloz
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DON	: Deoksinivalenol
FBY	: <i>Fusarium</i> Başak Yanıklığı
KBÇ	: Kök Boğazı Çürüklüğü
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
LB	: Lysogeny broth
Mb	: Megabaz
NCBI	: National Center for Biotechnology Information; Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
OD	: Optik Dansite
PDA	: Patates Dekstroz Agar
PIDG	: Radyal Çap Büyümesinin Yüzde İnhibisyonu
PIRG	: Radyal Büyümenin İnhibisyon Yüzdesi
RNA	: Ribonükleik asit
sn	: Saniye
TAE	: Tris-asetat EDTA Tamponu
UV	: Ultraviyole ışık
VOC	: Volatile Organic Compounds; Uçucu Organik Bileşikler

SEMBOLLER

<	: Küçüktür
%	: Yüzde
~	: Yaklaşık
≥	: Büyük Eşittir
° C	: Derece Santigrat
µg/mL	: Mikrogram/Mililitre
µL	: Mikrolitre
bç	: Baz çifti
A260/A280	: 260 ve 280 nm'deki absorbans
cm	: Santimetre
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
V	: Voltaj
xg	: Rölatif santrifüj kuvveti (RCF, g kuvveti)
rpm	: Revolutions Per Minute, Dakikadaki Devir Sayısı
µg	: Mikrogram

ŞEKİLLER

Sayfa No

- Şekil 4.1.** İkili kültür analizinde CTBmeg1 bakterisinin *F. graminearum* PH-1 hattının antifungal aktivitesi (hif büyümesi üzerindeki etkisi); kontrol grup (A^1 ve A^2) ve deney grup (B^1 ve B^2) arka ve ön görüntüsü.....27
- Şekil 4.2.** İkili kültür analizinde HMA5 bakterisinin *F. graminearum* PH-1 hattının antifungal aktivitesi (hif büyümesi üzerindeki etkisi); kontrol grup (C^1 ve C^2) ve deney grup (D^1 ve D^2) arka ve ön görüntüsü28
- Şekil 4.3.** İkili kültür analizinde CTBmeg1 bakterisinin *F. culmorum* UK99 hattının antifungal aktivitesi (hif büyümesi üzerindeki etkisi); kontrol grup (E^1 ve E^2) ve deney grup (F^1 ve F^2) arka ve ön görüntüsü28
- Şekil 4.4.** İkili kültür analizinde HMA5 bakterisinin *F. culmorum* UK99 hattının antifungal aktivitesi (hif büyümesi üzerindeki etkisi); kontrol grup (G^1 ve G^2) ve deney grup (H^1 ve H^2) arka ve ön görüntüsü29
- Şekil 4.5.** Bakterilerle enfekte edilen her iki izolatin birbiri ile PIRG sonuçlarının karşılaştırılması.....30
- Şekil 4.6.** CTBmeg1 *Bacillus* suşu tarafından üretilen VOC'un *Fusarium* PH-1 izolatının misel büyümesi ve gelişimi üzerinde sinerjistik aktivitesi; kontrol grup (I^1 ve I^2) ve deney grup (J^1 ve J^2) ön ve arka görüntüsü.....31
- Şekil 4.7.** HMA5 *Bacillus* suşu tarafından üretilen VOC'un *Fusarium* PH-1 izolatının misel büyümesi ve gelişimi üzerinde sinerjistik aktivitesi; kontrol grup (K^1 ve K^2) ve deney grup (L^1 ve L^2) ön ve arka görüntüsü.....31
- Şekil 4.8.** CTBmeg1 *Bacillus* suşu tarafından üretilen VOC'un *Fusarium* UK99 izolatının misel büyümesi ve gelişimi üzerinde sinerjistik aktivitesi; kontrol grup (M^1 ve M^2) ve deney grup (N^1 ve N^2) ön ve arka görüntüsü32
- Şekil 4.9.** HMA5 *Bacillus* suşu tarafından üretilen VOC'un *Fusarium* UK99 izolatının misel büyümesi ve gelişimi üzerinde sinerjistik aktivitesi; kontrol grup (O^1 ve O^2) ve deney grup (P^1 ve P^2) ön ve arka görüntüsü32
- Şekil 4.10.** CTBmeg1 ve HMA5 ile VOC analizine tabi tutulan *Fusarium* izolatlarının Radyal Büyüme İnhibisyonu (PIDG) sonucu analizi.....33
- Şekil 4.11.** 1: CTBmeg1, 2: HMA5 suşlarına ait gDNA'ların jel görüntüsü34
- Şekil 4.12.** 1: PH-1 Kontrol, 2: PH1+ CTBmeg1, 3: PH-1+ HMA5, 4: UK99 Kontrol, 5: UK99+CTBmeg1, 6: UK99+HMA5, örneklerine ait RNA'ların jel görüntüsü35
- Şekil 4.13.** CTBmeg1 suşu için PCR sonucu; M: 50 bp DNA Markırı (Thermo, ABD) 1: FenB, 2: FenD, 3: ITUC, 4: ItuD, 5: Prpo1, 6: SRFA, 7: Sur3'e ait jel görüntüsü.....36
- Şekil 4.14.** HMA5 suşu için PCR sonucu; M: 50 bp DNA Markırı (Thermo, ABD) 1: FenB, 2: FenD, 3: ITUC, 4: ItuD, 5: Prpo1, 6: SRFA, 7: Sur3'e ait jel görüntüsü.....36

- Şekil 4.15.** PH-1+ CTBmeg1 İkili Kültür analizine ait gen anlatımındaki oransal değişimleri gösteren grafik. Çubukların üzerindeki farklı harfler, önemli farklılıklar anlamına gelir.37
- Şekil 4.16.** PH-1+HMA5 İkili Kültür analizine ait gen anlatımındaki oransal değişimleri gösteren grafik. Çubukların üzerindeki farklı harfler, önemli farklılıklar anlamına gelir.38
- Şekil 4.17.** UK99+CTBmeg1 İkili Kültür analizine ait gen anlatımındaki oransal değişimleri gösteren grafik. Çubukların üzerindeki farklı harfler, önemli farklılıklar anlamına gelir.38
- Şekil 4.18.** UK99+HMA5 İkili Kültür analizine ait gen anlatımındaki oransal değişimleri gösteren grafik. Çubukların üzerindeki farklı harfler, önemli farklılıklar anlamına gelir.39
- Şekil 4.19.** PH-1 izolatlarının hücre proliferasyon analizinin karşılaştırılması. Çubukların üzerindeki “*” önemli farklılıklar anlamına gelir ($P < 0.05$ * ; $P < 0.01$ **; $P < 0.001$ ***).....40
- Şekil 4.20.** UK99 izolatlarının hücre proliferasyon analizinin karşılaştırılması. Çubukların üzerindeki “*” önemli farklılıklar anlamına gelir ($P < 0.05$ * ; $P < 0.01$ **; $P < 0.001$ ***).....40



ÇİZELGELER

Sayfa No

Çizelge 3.1. Radyal büyüme inhibisyon aralığı.....	19
Çizelge 3.2. <i>Fusarium</i> çap büyümesinin yüzde inhibisyonu	20
Çizelge 3.3. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponların bileşenleri ve konsantrasyonu	23
Çizelge 3.4. <i>Fusarium spp.</i> 'de meydana gelen antagonistik değişiklikler için kullanılan primerler	23
Çizelge 3.5. Bakteri antifungal biyosentez genleri için kullanılan primerler	24
Çizelge 3.6. PCR sırasında kullanılan genlere ait bağlanma sıcaklıkları	24
Çizelge 4.1. İkili kültür analizi ile PH-1 İzolatının radyal büyümesindeki yüzde inhibisyonuna (PIRG) dayalı olarak CTBmeg1 ve HMA5 bakteri suşunun antagonistik aktivitesinin belirlenmesi	29
Çizelge 4.2. İkili kültür analizi ile UK99 İzolatının radyal büyümesindeki yüzde inhibisyonuna (PIRG) dayalı olarak CTBmeg1 ve HMA5 bakteri suşunun antagonistik aktivitesinin belirlenmesi	29
Çizelge 4.3. PH-1 İzolatının CTBmeg1 ve HMA5 VOC analizi ile hesaplanan PIDG sonucu	33
Çizelge 4.4. UK99 İzolatının CTBmeg1 ve HMA5 VOC analizi ile hesaplanan PIDG sonucu	33
Çizelge 4.5. CTBmeg1 ve HMA5 suşlarından elde edilen gDNA'ların konsantrasyonları ...	34
Çizelge 4.6. <i>Fusarium</i> izolatlarının CTBmeg1 ve HMA5 ile yapılan ikili kültür deneylerindeki enfekte durumu ile elde edilen RNA konsantrasyonları.....	35
Çizelge 4.7. Hedef genlerin $2^{-\Delta\Delta CT}$ değişim sonuçları	37
Çizelge 4.8. PH-1 ve UK99 izolatlarının WST-1 hücre proliferasyonu analizinde 450 nm ve 620 nm dalga boylarındaki belirlenen canlılık oranı	39
Çizelge 4.9. <i>F. graminearum</i> PH-1 ve <i>F.culmorum</i> UK99 izolatlarının CTBmeg1 ve HMA5 suşları ile yapılan VOC deneyi sonucu hücre canlılığının %'lik oranındaki değişimi	40

ÖZET

***Bacillus megaterium*'un *Fusarium* TÜRLERİNDE ANTAGONİSTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Tarımsal kayıplar genel olarak hasat öncesi veya sonrası meydana gelen küf kontaminasyonlarıyla gerçekleşmektedir. Bu sebeple çeşitli stratejiler oluşturulmuştur. En yaygın ve etkili strateji pestisit gibi gözükse de aşırı kullanımı ile birlikte toksik birikimi oluşmakta, canlı ve çevre sağlığına ciddi zararlar vermektedir. Biyokontrol ajanlarının son derece etkili, türe özgü ve doğası gereği çevre dostu olduğu kanıtlanmış ve dünya çapında pest yönetimi stratejilerinde benimsenmesine yol açmıştır. *Bacillus spp.* biyokontrol ajanı olarak kullanımı artan suştur. Bu çalışmada *Bacillus megaterium*'un CTBmeg1 ve HMA5 suşlarının *Fusarium culmorum* referans ırkı UK99 ile *Fusarium graminearum* referans ırkı PH-1 izolatları üzerindeki antagonistlik etkisi ikili kültür deneyi ve uçucu organik bileşikler (VOC) deneyleri ile incelendi. Her iki deney içinde mantar ve bakteri suşları 25° C'de 7 gün inkübe edildi. İnkübasyona bırakılan 7. gün sonunda radyal büyümenin inhibisyon yüzdesi (percentage inhibition of radial growth; PIRG)'ne bakıldığında UK99'un antagonist direncinin PH-1 izolatına göre daha düşük olduğu, CTBmeg1'in ise antagonistlik etkisinin HMA5 suşuna oranla yüksek olduğu bulundu (76,22- 73,77; 77,28- 73,53). VOC deneyinde çap büyümesinin yüzde inhibisyonu (percentage inhibition of diameter growth; PIDG) değerine göre UK99 izolatı antagonistlik olarak daha hassas, CTBmeg1 ise antagonistlik etkisi yüksek suş olarak belirlendi (59,75- 54,87; 63,53- 49,41). Bakterinin antagonist aktivite gösteren metabolit üretme yetenekleri, *surfaktin*, *iturin*, *fengisin* antifungal biyosentez genlerine ait *Prpo*, *ITUC*, *SRFA*, *ItuD*, *Sur3f*, *FenD*, *FENB* genlerine ait primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile analiz edildi. Belirlenen genlerin bakteri suşlarında olduğu bulundu. Antagonistik etkinin *Fusarium* izolatları üzerinde meydana getirdiği değişiklikler transkripsiyon seviyesinde incelendi. İkili kültür deneyinde kullanılan kontrol ve deney gruplarına ait örneklerden RNA izolasyonu yapıp, ardından *Mgv1*, *stuA*, *CAT*, *POD*, *hog1*, *mst20* ve *tri5* genlerinin transkript miktarının belirlenmesi için qPCR yapıldı. Toksinin etkisi ile inaktif olan *tri5* geninin azaldığı, apoptozla ilişkili olan genler olan *hog1* ve *mst20*'nin arttığı bulundu. VOC ile yapılan çalışmada hücre canlılığı WST-1 ile proliferasyon analizi ile belirlendi. Proliferasyon oranı sonucunda UK99 suşunun ikili kültür ve VOC çalışmalarında olduğu gibi daha hassas, CTBmeg1'in ise antagonistlik etkisinin HMA5 suşuna oranla yüksek olduğu bulundu. Bu çalışma ilk kez *B. megaterium*'un *F. culmorum* ve *F. graminearum* üzerindeki antagonistlik etkisi incelenmesi bakımından özgün olması, biyolojik ve zirai araştırmalara katkı sağlaması açısından önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Biyokontrol, Uçucu Organik Bileşikler, İkili Kültür

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *Bacillus megaterium*'s ANTAGONISTIC EFFECT ON *Fusarium spp*

Agricultural losses are generally caused by pre- or post-harvest mold contamination. For this reason, various strategies have been created. Although the most common and effective strategy seems to be pesticide, toxic accumulation occurs with its excessive use, causing serious damage to living and environmental health. Biocontrol agents have proven to be highly effective, species-specific and environmentally friendly in nature, leading to the adoption of pest management strategies worldwide. *Bacillus spp.* are strains of bacteria which are increasingly used as biocontrol agents. In this study, the antagonistic effects of *Bacillus megaterium* CTBmeg1 and HMA5 strains on *Fusarium culmorum* reference strain UK99 and *Fusarium graminearum* reference strain PH-1 isolates were examined. Morphologically, dual culture experiments and volatile organic compounds (VOC) experiments were performed. In both experiments, fungal and bacterial strains were incubated for 7 days at 25°C. The radial growth diameters of the fungal isolates left to incubation were measured on the 7th day and when the Inhibition Percentage of Radial Growth (PIRG) is examined; It was found that the antagonist resistance of UK99 was lower than the PH-1 isolate, and the antagonism effect of CTBmeg1 was higher than the HMA5 strain. In the volatile organic compounds (VOC) experiment, radial growth of fungal isolates were measured and percent inhibition of diameter growth (PIDG) values were found. According to the PIDG value, UK99 isolate was more sensitive as antagonist, and CTBmeg1 was determined as a strain with high antagonism effect. The ability of the bacteria to produce metabolites with antagonist activity was analyzed by polymerase chain reaction (PCR) using *Prpo*, *ITUC*, *SRFA*, *ItuD*, *Sur3f*, *FenD*, *FENB* gene primers of surfactin, iturin, phengisin antifungal biosynthesis genes. It was found that the identified genes are in bacterial strains. The changes caused by the antagonistic effect on *Fusarium* isolates were examined at the transcription level. RNA was isolated from samples belonging to the control and experimental groups used in the dual culture experiment, and then qPCR was performed with the *b-tubulin* endogenous gene to determine the amount of transcript of the *Mgv1*, *stuA*, *CAT*, *POD*, *hog1*, *mst20* and *tri5* genes. It was found that *tri5* gene, which is inactive with toxin effect, decreased and genes associated with apoptosis increased *hog1* and *mst20*. WST-1 for proliferation rate and cell viability were determined in the study of VOC. As a result of the proliferation rate, it was found that the UK99 strain was more sensitive as in other studies, and the antagonistic effect of CTBmeg1 was higher than the HMA5 strain. This study is unique in terms of investigating the antagonistic effect of *B. megaterium* on *F. culmorum* and *F. graminearum* for the first time. For this reason, it is very important in terms of contributing to biological and agricultural research.

Keywords: Biocontrol, Volatile Organic Compounds, Dual Assay

1. GİRİŞ

Fusarium türleri tarımsal bitkiler, hayvancılık ve insanlar için önemli patojenlerdir. *Fusarium* cinsi mantarlar nekrozu indüklemeleri ve mikotoksin üretmeleri nedeniyle birçok tahıl ürününde büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Büyümenin her aşamasında tahılları enfekte edebilmektedirler (Parry et al., 1995; Miedaner et al., 2008). Bitkiler gelişim süreçlerinde, mantarlar ile enfeksiyonlarında antimikrobiyal proteinlerin sentezlenmesiyle hastalıklarda çeşitli savunma sistemleri oluştururlar (Tufan, 2016). Ancak bu savunma sistemi tek başına yeterli olmamaktadır. Bu sebeple bitkiler kendi savunma sistemlerinin haricinde dış faktörlerinde etkisine ihtiyaç duyarlar. Bu mantarların oluşturdukları hastalıklar ile mücadelede kısa süreli strateji olarak fungusitlerin kullanımı, patojenik fungusların bu fungusitlere karşı kolayca bağışıklık kazanabilmesi ve çevre kirliliğine sebep olması nedeniyle etkili bir strateji değildir. Biyokontrol ajanlarının kullanımı ise ekonomik olmasının yanı sıra çevreye olan kimyasal girdiyi azaltması ile çevre dostu bir stratejidir. Çeşitli bakteri cinsleri arasında, *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Streptomyces* türleri yaygın olarak biyokontrol ajanı olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, *Bacillus* cinsinin bitki büyümesini destekleyen üyeleri, endospor oluşturma kabiliyetleri, değişken pH, sıcaklık ve ozmotik koşullara toleransları ve yanı sıra patojenik olmamaları nedeniyle diğer mikroorganizmalara göre avantajlara sahiptir. *Bacillus spp.* biyofilmler oluşturarak kolonileşir ve bitki kökleriyle sağlam etkileşimler kurar. P-çözünürleştirmede rol oynayan sideroforlar ve organik asitler yoluyla besin alımını artırır, fitohormonlar üretir, bakteriyel antagonistler olarak etki eder veya patojenlere karşı bitki direncini indüklemenin yanı sıra, hidrolitik enzim sentezi ve salgılanması yoluyla mantar misellerini parçalayarak bitki büyümesini teşvik ederler (Khan et al., 2017).

Bu çalışmada, *Bacillus megaterium*'un *Fusarium* türleri üzerinde antagonistik etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, öncelikle bakterinin *Fusarium* türleri üzerine antagonistik etkileri *in vitro* koşullarda (ikili kültür ve uçucu organik bileşikler (VOC)) test edildi. Daha sonra, bu bakterinin antagonist aktivite gösteren metabolit üretme

yetenekleri, antifungal biyosentez genlerine ait (*surfaktin*, *iturin*, *fengisin*) primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile analiz edilmiştir. Ayrıca antagonistik etkinin *Fusarium spp.*'de meydana getireceği değişiklikler transkripsiyon seviyesinde (trikotesen üretimi, oksidatif stres ilişkili genler) incelenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

Yaşamın temel unsurlarından birisi gıda tüketimidir. Artan nüfus, tarım arazilerinin azalması, mevsim değişikliklerinin beraberinde getirdiği kuraklık, su kaynakları ile çevre kirliliği tarım ürünlerinde ciddi kayıplara sebep olmaktadır. 2013 Gıda ve Tarım Örgütü (İng; Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) raporuna göre sebze ve meyve üretimi sırasıyla yaklaşık 995 milyon ile 841 milyon tondur. Ancak hasat sonrası taze meyve ve sebzelerde meydana gelen hastalıklardan dolayı ancak %50'si tüketilebilmektedir (Ağırman ve ark., 2019).

Tarım ürünlerindeki kayıplar genel olarak hasat öncesi veya sonrası meydana gelen küf kontaminasyonları ile gerçekleşmektedir. Kontaminasyona sebep olan bazı mantar türleri örneğin; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Fusarium*, insanlar ve hayvanlar üzerinde toksik etkisi olan ve mikotoksinler olarak adlandırılan, çeşitli gıda işleme adımlarına dayanabilen ve bu nedenle gıda güvenliği endişelerine yol açan ikincil metabolitler üretirler (Sanzani et al., 2016).

Hastalık ile mücadelede pestisit kullanılmaya çalışılmıştır. Bunun yanında daha az hassas çeşitlerin ekimi dâhil olmak üzere farklı stratejiler denenmiştir. Yağışlı bölgelerde, yağıştan dolayı *Fusariumlar spp.*'lerin de beslemesi göz önüne alındığında pestisitler ekonomik bir çözüm olmamaktadır. Tohumlar üzerinde çeşitli biyoteknoloji çalışmaları yapılmış ve dayanıklı tohumlar elde edilmeye başlanmıştır. Ancak hala tohumlarda beklenen verim elde edilememiştir. Kimyasallar üzerinde yapılan çalışmalarda ise thiabendazole ve carbendazim uygulanan tohumlardan oluşan bitkilerde hastalığın daha az etkili olduğu ve propiconazole ve prochloraz'ın tanelerle birlikte uygulanması durumunda çok daha etkin sonuçlar alındığı gözlemlenmiştir (Netto and Giordani, 1989; Felix D'Mello et al., 1998; Doohan et al., 1999).

Kimyasal ilaç kullanımı çevre ve sağlık açısından önemli problemler meydana getirmektedir. Çevre de oluşan kirlilik ise sağlık açısından ölümcül toksik etkiler oluşturmaktadır. Bunun neticesinde kimyasal bileşiklerin kullanımının sınırlandırılması ve gıdaların korunması için doğal yöntemler geliştirilmesi çeşitli kamu kuruluşları tarafından teşvik edilmiştir.

Son zamanlarda araştırmacılar hastalıklarla mücadelede biyokontrol adı altında çeşitli mantar veya bakterileri antagonistik ajan olarak kullanmaktadır. Böylece çevreci ve sağlığa zararı olmayan mücadele yöntemleri geliştirmektedir.

2.1. *Fusarium* Genel Özellikleri

Mantarlar tatlı su ve denizlerde yaşayabilen, genellikle karasal ortamda bulunan heterotrof organizmalardır (Prescott et al., 1990). Hücre duvarına sahip bu ökaryotik organizmalar, eşeyli ve eşeysiz olarak çoğalmakta, sporları ise doğada rüzgâr, su veya hayvanlar aracılığıyla taşınmaktadır (Prescott et al., 1990; Tutel ve Çırpıcı, 1999). Mantarların tanımlanmış olan türleri genellikle ölü veya çürümekte olan organik materyallerin üzerinde saprofitik olarak yaşayan türleri temsil etmektedir. Ayrıca, simbiyotik ve parazit olarak yaşayan türleri de yayılmıştır (Prescott et al., 1990; Dickenson, 2003). Mantarlar seksüel yapı olarak ve sporulasyon organlarına göre dört temel sınıfa ayrılmaktadır: *Chytridiomycetes*, *Zygomycetes*, *Ascomycetes* ve *Basidiomycetes*. 550 milyon yıl önce üç ana fungal filum olan *Zygomycota*, *Ascomycota* ve *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*'dan türemiştir (Guarro et al., 1999).

Fusarium türleri ılıman iklimde yaşayan bitki patojenleridir. İnsanlarda ve hayvanlarda nadir enfeksiyon etkenidirler. Dünya üzerinde güncel 61 farklı *Fusarium* türünün olduğu tespit edilmiştir; *Fusarium avenaceum*, *Fusarium bubigeum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium langsethiae*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium poae*, *Fusarium solani*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium virguliforme* bunlardan bazılarıdır. *F. graminearum* taksonomik olarak *Ascomycota* bölümü, *Hypocreales* takımına ait *Nectriaceae* ailesinin bir üyesidir. *F. culmorum* taksonomik olarak *Mitosporik Hypocreales* ailesine ait bir mantar türüdür.

F. graminearum izolatları dünya genelinde toplanmış ve orijinal türlerin DNA dizilimleri filogenetik analizlere tabi tutulmuştur. Yapılan analizler soncunda 11 farklı türe ayrılmıştır (O'Donnell et al., 2004; Starkey et al., 2007). Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde baskın olan *Fusarium* türüne *F. graminearum* ismi verilmiş ve bu öneri tüm *Fusarium* araştırmacıları tarafından kabul edilmiştir (O'Donnell et al., 2004; Starkey et al., 2007).

F. graminearum'un 36.1 Mb olan genom dizisi, 2003 yılında Broad Institute tarafından yayımlanmıştır. Haploid kromozom sayısı $n=4$ 'tür (Cuomo et al., 2007).

2010 yılında Broad'a karşılaştırma avantajı olarak MIPS *F. graminearum* Genom Veritabanı (FGDB) *Fusarium* genomlarını karşılaştırmıştır. Karşılaştırmaya göre daha önce açıklanan yaklaşık 13,718 genin 2461'si farklı bir yapısı vardır. Karşılaştırma sonucu ekzon / intron yapısı açısından 11,257 genin (%82) tam olarak aynı olduğunu göstermektedir. Genel olarak, FGDB v3.1, Broad setinden 383 daha fazla intron içerdiği ortaya çıkmıştır.

F. culmorum'un ise genom projesi günümüzde resmi olarak tamamlanmamıştır. GenBank üzerinde haploid kromozom sayısı $n=4$ olan bu organizma, UK99 ırkının genomu olarak kayıtlıdır. *F. culmorum* suşu UK99'un genomik DNA'sı, Liverpool Üniversitesi'nde 454 GS FLX + (Roche Diagnostics Corporation) üzerinde sekanslandı. Genom boyutu *F. graminearum*'un genomundan daha büyük olarak yaklaşık 39 Mb'dir. UK99 taslak düzeneği, 41.928.875 bp uzunluğunda ve 1.062.015 boşlukludur, *F. graminearum* genomunun dizilim bilgisinin veri tabanlarında kayıtlı olması *F. culmorum* ve dizilimleri mevcut olmayan *Fusarium* türleriyle yapılacak genomik çalışmaları için önemli kaynak sağlamış olsa bile, özellikle konak-patojen ilişkisi ve patojenitesine ilişkin bilgiler yeterli değildir ve türe özgün genler ile yapılacak çalışmalara katkısı sınırlıdır (Scherm et al., 2013).

2.1.1. *Fusarium* Hastalıkları

Bitkilerde meydana gelen hastalıkların %75'i mantarlardan meydana gelmekle beraber, tahıllarda, meyve ve sebzelerde ve de süs bitkilerinde mantar hastalıkları görülmektedir (Agrios, 1997; Özer ve Soran, 1991). *Fusarium* türleri buğday, arpa, mısır ve de pirinçte kök ve kök boğazı çürüklüğü (KBÇ) ile *Fusarium* başak yanıklığı (FBY) hastalıklarına sebep olmakta ve bitkiyi büyük ölçüde ürün kaybına uğratmaktadır (Parry et al., 1995; Pereyra and Dill-Macky, 2008; Trail et al., 2003).

Mantarlar konakladıkları bitkilerde mikotoksin üretirler. Mikotoksinlerde insan ve hayvanlar için toksik olan sekonder metabolizma ürünleridir. Toksik maddelerde enfekte olmuş gıdaların alınımı insan ve hayvanlarda, kusma, oral lezyonlar, deri hastalıkları, kanser gibi birçok sağlık açısından zararlı etkiler ortaya çıkarır. Mikotoksin üreten yaklaşık 400 tür bilinmektedir ve bunların içerisinde; *Fusarium* hasat öncesi ve sonrasında, *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri ise kurutma esnasında ve sonrasında besin ürünlerine bulaşıp toksin üretirler (Erzurum, 2001). Ülkemizde tahılda *Fusarium* türlerinin neden olduğu en yaygın hastalıklar FBY ile KBÇ. Her ikisi de aynı *Fusarium* patojeni tarafından gerçekleştirilebilmekte

(Akınsanmi et al., 2004) ve dayanıklı kaynaklar farklı *Fusarium* patojenlerine karşı aynı derecede etkinlik gösterebilmektedir (Mesterhazy, 1995).

Fusarium'un ürettiği mikotoksinlerden birisi trikotesenlerdir. Bilinen en az 24 *Fusarium* türü biyosentetik enzimlerine göre veya trikotosen kümelerinin farklılıklarından dolayı farklı trikotesen üretirler (Alexander et al., 2011; Öksüztepe ve Erkan, 2016). ABD' de yaygın olan B tipi trikotesenler; deoksinivalenol (DON), nivalenol (NIV) ve bunların asetillenmiş türevleri 3-asetildekoksivivalenol (3-ADON), 15-asetildekoksivivalenol (15-ADON) ve 4-asetilnivalenol gıda güvenliği üzerinde önemli etkileri vardır (Desjardins et al., 2007; Liang et al., 2014). Bunların arasında, vomitoksin olarak da bilinen ve küresel bir sorun olan DON, tahıl tanelerinde en sık tespit edilen ve ekonomik açıdan önemli olan mikotoksindir. DON, ağırlıklı olarak *F. graminearum* ve *F. culmorum* tarafından üretilmektedir. Bu fitopatojenler tarladaki bitkileri enfekte edebilir ve FBY'ne neden olabilir (McMullen et al., 2012). Bu fitopatojenlerin virülans faktörü olarak, mikotoksin DON, *Fusarium* suşlarının enfekte olmuş doku içinde yayılmasını kolaylaştırır ve FBY hastalığının semptomlarına katkıda bulunur (Bai et al., 2002).

Fusarium türünün sebep olduğu başak yanıklığının esas etmeni Türkiye'de de sık görülen *F. graminearum* ve *F. culmorum*'dur. Bu iki tür toksik etki bakımından diğerlerinden daha güçlü ve üreme oranı diğerlerine göre daha verimlidir (Stack et al., 1985; Jorgensen, 2000). Buğday da *Fusarium* hastalığına neden olan türler arasında, *F. graminearum* dünyanın birçok bölgesinde baskındır (Parry et al., 1995; Bottalico, 1998; Bottalico and Perrone, 2002).

F. graminearum'un oluşturduğu toksinler misel veya eşeyli sporlar halinde mevsime uygun olarak rüzgâr veya yağışlar ile tahılların başaklarına ulaşırlar. Enerji için bir karbon kaynağı olarak glikoz kullanır ve aerobik solunum yaparlar. Genotipik ve fenotipik çeşitlilik göstermesi, genom projesinin tamamlanması, enfeksiyon sırasında anlatım yapması araştırmalar sırasında ilgi odağı olmasını sağlamıştır (Miedaner et al., 2001; Toth et al., 2004; Cuomo et al., 2007; Miedaner et al., 2008; Trail et al., 2009). Hücre duvarının heterojen bileşimi özellikle *F. graminearum*'un patojenitesi açısından önemlidir, çünkü kitin degradasyonu için kitinazın yanı sıra elektron transportu için çoklu yardımcı proteinler içerir (Shi et al., 2008). *F. graminearum*'un konak aralığı çok geniştir. Hastalık yaptığı konaklar sadece tahıllar değil, salatalık, domates, pırasa, kavun, karpuz ve süs bitkilerine kadar uzanan geniş bir aralıktadır.

Kök ve kök boğazı hastalığına sebep olan *F. culmorum* ülkemizde ilk defa Bremer tarafından 1948 yıllarında yapmış olduğu araştırma sonucunda keşfedilmiştir. Bu yıldan sonra farklı tarım alanlarında yapılan çalışmalarda ülkemizde ve dünyada KBC’i oldukça yaygın bir hastalık olduğu bildirilmiştir (Chakraborty et al., 2006). KBC’i hastalığının dünya genelinde %50-70 oranları arasında ürün kayıplarına neden olduğu, bu da beraberinde ciddi ekonomik kayıplar getirdiği bilinmektedir (Smiley et al., 1996; Hekimhan et al., 2005).

Fusarium Başak Yanıklığı hastalığı ilk defa 1884 yılında İngiltere’de tanımlanmıştır. Daha sonra 1891 yılında ABD’de ortaya çıkmış, 1902 yılında ise Japonya’da da görülmüştür (Ireta, 1994). 1993 yılında ABD genelinde 1 milyon dolarlık zarara sebep olmuştur. 2004 yılında bu miktar 8 milyon doları bulmuştur (Nganje et al., 2004). FBY hastalığı ile Türkiye ilk defa 1993 yılında karşılaşmış, 2004 yılı içerisinde ülkemizde Orta Anadolu Bölgesinde yetişen 12 buğday çeşidinde FBY sebebiyle %24 oranında ürün kaybı olduğu rapor edilmiştir (Aktaş ve Tunalı, 1993; Hekimhan ve ark., 2004). Dünyada FBY hastalığı *F. graminearum*’un tarafından yayılırken, Avrupa da hastalığın etmeni *F. culmorum* olarak belirlenmiştir. Ilıman iklim koşullarında *F. graminearum* yaygın olarak bulunurken, *F. culmorum* daha çok serin bölgelerde görülmektedir (Snijders, 1989).

Başak yanıklığına sebep olan miseller veya eşeyli sporlar, iklim koşullarına uygun olarak; su (yağış), rüzgâr ve çeşitli böceklerin yardımı ile konak bitkiye bulaşması sağlanmaktadır. 48 ile 72 saat arasında uygun sıcaklık ve pH değerinde enfeksiyon oluştururlar. *Fusarium* bitkide hastalığı, çiçekler üzerinde veya çiçek içinde spor birikmesiyle başlatır (Bushnell et al., 2003).

Hastalığın belirtileri çiçeklenme evresinden sonra ortaya çıkmaktadır. Başakçık erken olgunlaşır veya birkaç başakçık beyazlaşır. Başakların süt dolum evresinde, sağlıklı başaklar yeşil gözüktürken hastalıklı başaklar açık sarı halinde gözüktürler. Hastalık neticesinde ortaya çıkan renk farklılıkları hasta ile sağlıklı başakların ayırt edilmesini sağlar (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, TAGEM, 2008).

Enfekte eden *Fusarium* türü oksijene gereksinim duymaz ve toprakta 40 cm derinlikte hayatına devam edebilir. Türün üremesi için en uygun sıcaklık 24-32°C iken, uygun pH değer aralığı ise 5-7’dir (Özer ve Soran, 1991; Waller et al., 2005; Hornok et al., 2007).

Hastalık başağı sarmasından itibaren başakta açık pembe veya pembemsi bir renk görünmektedir. Rengin yoğunluğu fungus sporlarının yoğunluğu ile doğru orantılıdır (TAGEM, 2008). Enfekte olan taneler küçük ve buruşuk olmakta, bu taneler enfeksiyon nedeniyle çimlenme güçlerini kaybetmektedirler (Arıcı, 2006). Hasat zamanına kadar başak renklerindeki enfekte bölgeler mavi-siyah renge döner. Bu değişim ise artık sporların taşındığını belirtir.

Depolama alanına enfeksiyonlu ürünün girmesi veya hastalık taşıyan buğday, arpa gibi ürünlerin hasatından sonra toprağa mısır ekilmesi hastalığın bulaşmasına ve giderek yoğunlaşmasına sebebiyet vermektedir. Bu da hastalık ile mücadeleyi zorlaştırmaktadır.

2.1.2. *Fusarium* Hastalıkları ile Mücadele

Tarım ürünlerindeki kayıplar genel olarak hasat öncesi veya sonrası meydana gelen küf kontaminasyonları ile gerçekleşmektedir. Kontaminasyona sebep olan bazı mantar türleri örneğin; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Fusarium*, insanlar ve hayvanlar üzerinde toksik etkisi olan ve mikotoksinler olarak adlandırılan, çeşitli gıda işleme adımlarına dayanabilen ve bu nedenle gıda güvenliği endişelerine yol açan ikincil metabolitler üretirler (Sanzani et al., 2016). Bu metabolitler ciddi sağlık sorunlarına sebep olmaktadır. Gelişen teknoloji ve ilerleyen endüstri hasat öncesi ve sonrası ürünlerde kayıpları önlemeye çalışan birçok strateji geliştirmiştir.

Hastalıkların (FBY ve KBC) üstesinden gelinmesi için kullanılan stratejiler; kısa süreli ve uzun süreli olarak ikiye ayrılabilir. Kısa süreli yönetim; pestisit kullanımı ve biyokontrol gibi uygulamalardır. Endüstriyel tarımın başlıca koruma uygulamaları pestisit kullanımıdır. Pestisitler, gıda üretimi verimliliğini artıran, gıda kaynaklı ve vektör kaynaklı hastalıkları azaltan geniş bir heterojen kimyasal grubudur.

1940 yılından itibaren kullanılan pestisitler; tarım arazilerini yabancı otların zararından ve tarımsal ürün hastalıklarından korurken, üretimin kalitesini de güvence altına almaktadır (Tiryaki ve ark., 2010). Tarım arazilerinde pestisit kullanılmadığı vakit, ürünlerin %60'ı kaybolurken, tüm dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de zararlı organizmaları kontrol etmek amacıyla bitki koruma ürünlerinin kullanılması kaçınılmazdır (Turabi ve ark., 2007). Kısa sürede etki göstermesi ve kullanımının kolay olması pestisitleri diğer zirai ilaçlardan daha öncül kılmıştır.

Yaklaşık olarak pestisitlerin satış tutarı dünya da 30 milyon dolar ve üretim miktarı ise 3 milyon tondur. Bu üretim miktarının %47'lik bölümünü herbisitler

alırken, %29'luk payı insektisitler ve %19'luk payı ise fungusitler almaktadır. Ziraî ilaç kullanımının %70'ini herbisitler ve insektisitler alırken, parasal olarak tüketim ise en çok %31 ile insektisitler, %20 ile de fungusitler üçüncü sıradadır (Oskam et al., 1997). Ülkemizde bu duruma bakacak olursak tarım ilacı tüketiminin %47'sini insektisitler birinci sırada, %16 ile fungusitler üçüncü sırada oluşturmaktadır. Tüketim tonajına bakıldığında Avrupa (AB) ülkeleri arasında en az pestisit kullanımı Türkiye'de 0,7 kg/hk, en yoğun ise 13,8 kg/hk ile Hollanda'da görülmektedir (Tiryaki ve ark., 2010). 2016'da AB'nin resmi istatistik kurumu (İng: European statistics, Eurostat) verilerine göre en çok pestisit satan ülkeler arasında 49 milyon kiloyu aşkın ürünle Türkiye yer almaktadır. En fazla ilaç satılan ülkeler ise AB'de tarım ürünlerinin yaklaşık yarısını karşılayan İspanya, Fransa ve İtalya olmuştur.

Dağ ve ark. raporunda (2000) tarım ilacı kullanıldığında buğdayda, yabancı ot, hastalıkların ve böceklerin meydana getirdiği kayıpların %27 oranında olduğunu ancak ilaç kullanılmadığı takdirde bu oranın %53'e çıkacağını belirtmişlerdir. Yine aynı raporda arpa için bu durumun %40, mısır için ise kayıplarının %52'ye ulaşması muhtemel olduğunu bildirmişlerdir. Her ne kadar pestisit kullanımı kolay ve etkili gözükse de kontrolsüz kullanımı yan etkiler meydana getirmiştir. Bilinçsiz ve aşırı kullanılması sonucunda flora ve fauna da ciddi zararlar görülmüş, bunun yanında yer altı ve yüzeysel sular ile deniz sularında kirlenmeler meydana gelmiştir. Bu da beraberinde hedef kitleler dışında kullanımındaki ortamların ve insanların sağlığını olumsuz etkilemiştir (Kahn, 1991).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (İng: World Health Organization, WHO)'nın 1997 yılında pestisitleri kullanımına uygun olarak sınıflandırmıştır. Açıklanan kılavuzda en yaygın olarak kullanılan 700 pestisit 33'ü insan sağlığı için çok zararlı, 48'i oldukça zararlı, 118'i orta ve 239'u daha az zararlı olarak belirtilmiştir. Pestisit ve parçalanma ürünleri toksik maddeler içerirken parçalanma ürünlerinin bazıları pestisit kendisinden daha toksik etki göstermektedir. Kullanılan pestisitlerin buharlaşması aşırıdır bu da solunan havayı kirletir ve kanser, doğum anormallikleri, istemsiz kasılmaların beraberinde getirdiği sinir sistemi rahatsızlıkları, ayrıca kusma, ishal, çarpıntı gibi sağlık problemleri meydana getirmektedir (Delen, 2008). 2002 yılında WHO'nun açıklamış olduğu raporda pestisit kullanımının 186 bin kişinin ölümüne, 4 milyon 420 bin kişinin de sakat kalmasına sebep olduğunu belirtmiştir.

Fungusit kullanımı akut ve sinerjik etkileri ile dirençli patojen cinslerinin çoğalmasından dolayı yasal kontroller altında yürütülme zorunluluğu getirmiştir (de

Paiva et al., 2017; Romanazzi et al., 2017; Terao et al., 2017). Buna rağmen 2014 yılında Avrupa Gıda Otoritesi (İng: European Food Safety Authority, EFSA)'nin yapmış olduğu bir çalışmada incelenen örneklerin %45'inde sentetik fungusite rastlanmaktadır. Yapılan çalışmada örneklerin ayrıntılı incelendiğinde ise %1,9'unda izin verilenden daha fazla ilaç kullanıldığı tespit edilmiştir. Gıda tüketimindeki bilinçlenme giderek artmaktadır. İnsanlar kimyasal ilaç kalıntısının daha az veya hiç kullanılmayan gıdaları tercih etmeye başlamıştır.

Ülkemizde tahılda *Fusarium* türlerinin neden olduğu en yaygın hastalıklar FBY ile kök KBC'dir. Her ikisi de aynı *Fusarium* patojeni tarafından gerçekleştirilebilmektedir (Akinsanmi et al., 2004). Bu sebeple fungusit kullanımı oldukça yaygındır.

Patojenik funguslar, büyük popülasyonlara sahiptirler ve de oldukça sık mutasyona uğrarlar. Bu sebepten, bu fungusitlere karşı kolayca bağışıklık kazanabilmesi nedeniyle fungusit kullanımı etkili bir strateji değildir. Aynı zamanda bu fungusit çevre kirliliği ve fitotoksisite gibi sorunlara yol açabilmektedir (Wang et al., 2012). En etkili gibi görünen strateji her ne kadar fungusit ile kontrol olsa da bazı mantar öldürücüler tahıllarda DON içeriğini arttırmıştır (Homdork et al., 2000; Ramirez et al., 2004; Mesterházy et al., 2011). Bu da beraberinde patojenlerde fungusit direnci oluşturabilir (Yuan ve Zhou, 2005). Tohumlar üzerinde çeşitli biyoteknoloji çalışmaları ile genetik direnç yapılmaya ve dayanıklı tohumlar elde edilmeye başlanmıştır. Ancak hala tohumlarda beklenen verim elde edilememiştir (Bai et al., 2000, 2001; Buerstmayr et al., 2009; Miedaner and Korzun, 2012; Talas et al., 2012). Kimyasallar üzerinde yapılan çalışmalarda ise thiabendazole ve carbendazim uygulanan tohumlardan oluşan bitkilerde hastalığın daha az etkili olduğu ve propiconazole ve prochloraz'ın tanelere birlikte uygulanması durumunda çok daha etkin sonuçlar alındığı gözlemlenmiştir (Netto ve Giordani, 1989, Felix D'Mello et al., 1998; Doohan et al., 1999).

Kimyasal bileşiklerin kullanımının sınırlandırılması ve gıdaların korunması için doğal yöntemler geliştirilmesi, çeşitli kamu kuruluşları tarafından teşvik edilmiştir. Tüketiciler daha doğal, daha az işlenmiş ve daha güvenli ürünler aradığından, "temiz etiket" gıda ürünlerine yönelik güçlü bir toplumsal talep oluşmuştur (Leyva Salas et al., 2017).

Hastalığın kontrol altına alınmasında diğer bir yaklaşım biyokontroldür. Biyokontrol; ekonomik olmasının yanı sıra çevreye olan kimyasal girdiyi azaltması ile

evre dostu (Deshmukh et al., 2006) bir stratejidir. Bu amaçla yapılan araştırmalarda, özellikle mikroorganizmalar kullanılmaktadır (Coloretti et al., 2007; Prema et al., 2008).

2.2. Biyokontrol ve Biyokontrol Ajanları

evre ve insan sağlığı pestisit kullanımı ile tehlike altında olması sebebiyle araştırmacılar daha doğal yollar bulmaya çalışmışlardır. Yapılan çalışmalarda biyokontrol ajanları geliştirmışler ve bu ajanların yayılmasını sağlamışlardır.

Mikroorganizmaların antagonistik büyümesi ile gıdaların korunması 1972’de Hurst tarafından gözden geçirilmiştir. Koruyucu, antagonistik büyüme örnekleri olarak süt, lahana turşusu ve vakumlu paketlenmiş etlerde bir fermantif laktik asit bakterileri (LAB) mikroflorasının büyümesini göstermiştir. LAB mikroflorası, putrefaktif Gram negatif çubuk şekilli bakterilerden fermantif laktik asit bakterilerine dönüşmesidir. LAB'nin büyümesini destekleyen gıdaların korunmasında nisin gibi antibiyotiklerin (bakteriyosinler) rolü de dikkate alınmıştır (Hurst, 1972). Yapılan çalışmanın sonucunda gıda ürünlerinin korunması için kimyasal yol haricinde biyolojik bir yol bulunmuş ve buna “biyokontrol” veya “biyolojik kontrol” veya “biyokoruma” denilmiştir (Leyva Salas et al., 2017).

Korumanın etkisinin yanı sıra, birçok mikroorganizma suşu da bitkiler üzerinde büyümeyi teşvik edici özelliklere sahiptir. Bakteriler arasında, *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Agrobacterium* cinslerinden türler biyolojik kontrolde toprak ve bitki ile ilişkili mikroorganizmalar olarak en önemli role sahiptir. Bitki patojenlerine karşı mücadelede kullanılan canlı mikroorganizmalardan oluşan ürünler olarak tanımlanırsa, son on yıla kadar biyokontrol ürünleri tüm tarımsal kimyasalların dünya pazarındaki satışlarının sadece %1’ini oluşurmaktadır (Fravel, 2005). Biyokontrol ajanlarının kullanımı ise ekonomik olmasının yanı sıra çevreye olan kimyasal girdiyi azaltması ile evre dostu bir stratejidir.

Biyolojik kontrol için *Bacillus* türü bakteriler bilimsel araştırmalarda dikkatleri üzerine çekmektedir. Bu türler, bitki ve fungal patojen etkileşimlerini, temel besin maddeleri için rekabet etme, fungitoksik metabolitler üreterek patojenleri antagonize etme veya bitkilerde sistemik direnci indükleme gibi bir dizi mekanizma ile etkiler (Khan et al., 2017). Ayrıca yaşam habitatlarından biri olan toprakta çokça bulunmaları, çeşitli biyolojik aktif metabolitlerin üretimi ve sabit sıcaklık dirençli spor formları

oluşturma yetenekleri, biyolojik savaş için ajan olmalarının sebebidir (Katı et al., 2016).

Uçucu organik bileşikler (VOC) olarak da bilinen uçucu metabolitler, düşük moleküler kütleye, yüksek buhar basıncına (> 0.01 kPa), düşük kaynama noktasına ve düşük polariteye sahiptir. Kimyasal olarak çeşitlidirler ve hidrokarbonlar, aromatikler, aminler, tiyoller ve terpenler içerirler. Bu bileşiklerin mantarlardaki metabolik kökeni hakkında nispeten az şey bilinir (Lee et al., 2016). Kai et al. (2008) bakteriyel uçucuların önemini belirtmiştir. Buna göre insan sağlığını iyileştirmek, tarım ürünlerinin verimliliğini artırmak, bitkileri hastalıktan korumak veya bitki büyümesini teşvik etmek için bazı bakterilerin VOC üreticisi olduğunu bulmuştur. Bu bakteriler ise; *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus* ve *Agrobacterium* cinsi türleri daha sık biyoaktif VOC üreticileri olarak bildirilmiştir. Özellikle *Bacillus* türleri tarafından yayılan VOC'lerin mantar büyümesini önleme potansiyeli olduğu gösterilmiştir; bu antagonistik eylem, doğal ortamlarda, mikrobiyotanın bir seçimine yol açan rekabetçi bir baskıyı yansıttığını ifade etmiştir. VOC'lerin toprak bakterilerinden fito-patojenik küf türlerine karşı, *Alternaria*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Sclerotinia*, *Trichoderma*, *Botrytis*, *Verticillium dahliae* ve *Colletotrichum*'a ait antagonizmaları hakkında bazı bilgiler mevcuttur (Chaurasia et al., 2005; Kai et al., 2007; Zheng et al., 2013).

Chaves-L'opez et al. (2015) yapmış olduğu çalışmada 75 *Bacillus* suşu kullanılmış ve bu suşların *Aspergillus niger* MG43, *Aspergillus flavus* MG09, *Aspergillus parasiticus* MG51, *Fusarium oxysporum f.sp. lactucae* MA28, *Aspergillus clavatus* MG103 ve *Moniliophthora perniciosa* DM4B türlerine olan muhtemel antagonistlik seviyeleri ölçölmüştür. Çalışmanın sonucunda *Bacillus* suşlarının, mantar inhibisyonunu, farklı inhibisyon derecelerine rağmen, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus cereus* suşları ile en iyi antifungal VOC üreticileri olarak mantarı inhibe ettiğini bulmuştur. Tenorio-Salgado et al., 2013 yılında *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum* ve *Sclerotium rolfsii* mantar çeşitleri ile *Burkholderia tropica* bakterisi üzerinde VOC alışmaları yapmış ve büyümelerinde ciddi anlamda gerileme olduğunu kaydetmiştir. Meena et al. (2017) *Trichoderma spp.* ile yapmış olduğu VOC testinde *Alternaria alternata* 'nın *T. harzianum* ve *T. viride* tarafından sırasıyla %40 ve %35 maksimum büyümesini inhibe ettiğini bulmuştur. Başka bir çalışmada, *Fusarium oxysporum f. sp.*

üç farklı (*Trichoderma harzianum*, *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Pseudomonas aeruginosa*) bakteri türü VOC deneylerine tabi tutulmuş ve salgıladıkları uçucu metabolitler ile mantarın spor gelişimi üzerinde güçlü bir baskılama göstermiştir (Palyzová1 et al., 2019). Bakteriler ile yapılan çalışmalarda görüldüğü gibi ortaya çıkardığı uçucu metabolitler de biyokontrol ajanı olarak kullanılmasında büyük etkiye sahiptir.

2.2.1. *Bacillus* spp. Genel Özellikleri ve İlgili Çalışmalar

Bacillus cinsinin bitki büyümesini destekleyen üyeleri, endospor oluşturma kabiliyetleri, değişken pH, sıcaklık ve ozmotik koşullara toleransları ve yanı sıra bazı türlerin patojen olmamaları nedeniyle diğer mikroorganizmalara göre avantajlara sahiptir. *Bacillus* spp. biyofilmler oluşturarak kolonileşir ve bitki kökleriyle sağlam etkileşimler kurar. P-çözünürleştirmede rol oynayan sideroforlar ve organik asitler yoluyla besin alımını artırarak, fitohormonlar üreterek, bakteriyel antagonistler olarak etki ederek veya patojenlere karşı bitki direncini indükler. Bunun yanı sıra hidrolitik enzim sentezi ve salgılanması yoluyla mantar misellerini parçalayarak bitki büyümesini teşvik ederler (Khan et al., 2017).

Bacillus lipopeptitlerin bitki patojenleri üzerindeki önemli etkisinin aydınlatılmasına yönelik birçok çalışma ve eleştirel inceleme yapılmıştır (Stein, 2005; Romero et al., 2007; Ongena and Jacques, 2008; Raaijmakers et al., 2010; Roongsawang et al., 2010; Romano et al., 2011; Béchet et al., 2012; Dimkić et al., 2013, 2015, 2017). *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus pasteurii* ve *Bacillus pumilus* gibi *Bacillus* türleri çok etkili antibiyotik molekülleri üreticileri ve bunların antibiyotiklerle bitki patojenlerine karşı inhibe edici aktiviteleri en iyi bilinen mekanizmadır (Cawoy et al., 2011; Bacon et al., 2015). *B. amyloliquefaciens* FZB42 bitki büyümesini teşvik edici özellikler göstermiştir (Idriss et al., 2004; Chowdhury et al., 2013).

Genel olarak, mantar ve virüslere karşı geniş bir antagonistik aktivite spektrumuna sahiptirler ve Gram-pozitif bakteri grubunu temsil eden *Bacillus*'ların genomlarının yaklaşık %4'ü farklı antimikrobiyal bileşik üretim kabiliyetine sahip ikincil metabolit sentezine adanmıştır. Bilinen 142 çeşide sahiptir ve gün geçtikçe sayıları artmaktadır (Logan and De Vos, 2009). En önemli molekülleri ribozomal olmayan bir şekilde sentezlenmiş peptitler ve lipopeptitlerdir. Çok güçlü

antimikrobiyal aktivitesi sayısız çalışma ile doğrulanmıştır. *Bacillus* lipopeptitleri, bitki patojenleri üzerine doğrudan antibiyozis yoluyla güçlü etkiye sahiptir. Antibiyozis, antagonistik suşların potansiyel patojenleri inhibe etmek veya öldürmek için antimikrobiyal maddeler üretebildiği biyolojik bir işlem olarak tanımlanmaktadır. Bu gruptan en önemli moleküller, *surfaktin*, *iturin* ve *fengisin* ailelerinin lipopeptitleri hedef hücreleri etkiler. *Bacillus* suşları, biyolojik kontrol kapasitelerini baskın olarak, bitki patojenlerinin büyümesi üzerine inhibe edici aktivitenin yanı sıra, bitkilerde sistemik direnci indükleyerek ve bitki patojenleriyle ekolojik nişler için rekabet ederek gösterir.

Son zamanlarda *Bacillus spp.* ile yapılan bazı karakterizasyon çalışmalarında, fitopatojenlere karşı çok güçlü antibakteriyel ve antifungal aktivite gösterilmiş, PCR analizleri ile test edilen suşlarda *iturin*, *bacillomisin*, *fengisin* ve *surfaktin* için biyosentetik operonların varlığı gösterilmiştir (Fira et al., 2018). Çalışmaların çoğu, *fengisin* üretimi nedeniyle *B. subtilis* tarafından, özellikle *Fusarium* cinsinden patojenik mantarlar üzerinde doğrudan antifungal etkiyi ortaya koymuştur (Fira et al., 2018). Cao et al. (2012), *F. oxysporum*'un *B. subtilis* SQR 9 tarafından enfekte bir salatalık alanının, sağlıklı bir şekilde izole edilmiş *in vitro* inhibisyonunu göstermiştir (Falardeau et al., 2013). *F. graminearum*'un neden olduğu buğday ve arpa FBY'nın ve mısır kulak çürüklüğü *B. subtilis* JA ve D1 / 2 suşları tarafından başarıyla bastırılmıştır. *Fusarium* türleri ile ilgili diğer çalışmalarda, tuzlu ve enfekte olmuş topraktan izole edilen *B. subtilis* SR146 ve B-FS01'in *fengisin* üreten suşları, sırasıyla *F. culmorum* ve *F. moniliforme*'yi başarıyla inhibe etmiştir (Hu et al., 2007). Zalila-Kolsi et al. 2016 yılında yapmış olduğu çalışmada; *B. amiloliquefaciens* suşu BLB369, *B. subtilis* suşu BLB277 ve *Paenibacillus polymyxa* suşu BLB267'lerinin sırasıyla, *iturin* ve *surfaktin*, *surfaktin* ve *fengisin*, *fusarisidin* ve *polimiksin* üreterek çeşitli fitopatojenik mantarlara karşı geniş spektrum sergiledikleri görülmüş, aynı zamanda buğday tohumu çimlenmesi, bitki boyu, fenolik bileşikler, klorofil ve karotenoid içeriklerinin *in vivo* incelenmesinde, bakteri hücrelerinin verimliliği arttırdığı ile *Triticum turgidum L. sub sp. durum* çeşidinin *Om Rabiia against F. graminearum*'a karşı korumada etkinliğini kanıtlamıştır. Başka bir çalışmada ise Zhao et al. (2014) kendi izole ettikleri *B. subtilis* SG6 suşunun, %87,9, %95,6 ve %100 inhibisyon oranı ile *F. graminearum* 'un miselyum büyümesi, sporülasyonu ve DON üretimi üzerinde yüksek bir antifungal etki sergilemiş olduğunu bulmuştur. Çalışma *Fusarium*'un kendi yetiştirme bölgesinde de denenmiş ve henüz yeni oluşumu sırasında bakteri ile enfekte

edilmiş, *B. subtilis* SG6'nın hastalık insidansını, FBY indeksini ve DON'u önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir ($P < 0.05$). Ayrıca, ultrastrüktürel inceleme de ise, *B. subtilis* SG6 suşunun, hücresel yapıyı tahrip edip *F. graminearum* hiphal yüzeyinin bozulmasına neden olduğu gözlenmiştir. Bu da beraberinde hücre içindeki organellerin ve sitoplazmanın sızmasıyla hücre ölümünü meydana getirmektedir. SG6'nın antifungal aktivitesi, *kitinaz*, *fengisin* ve *surfaktin* çoğalması ile ilişkili olabileceğine değinilmiştir. Dört farklı *Bacillus* suşları ile yapılan bir çalışmada (*Bacillus simplex* 30N-5, *B. simplex* 11, *B. simplex* 237 ve *B. subtilis* 30VD-1) *in vitro* koşullarda *Fusarium* türlerinin radyal büyümesinde yaklaşık %40 inhibisyona neden olduğu bulunmuştur (Khan et al., 2018).

2.2.2. *Bacillus megaterium*

Biyolojik kontrol için kullanılan *Bacillus megaterium*, Gram pozitif, endospor oluşturan, çubuk şekilli, hareketli, endofit bir bakteridir. 1884 yılında *Bacillus megaterium* keşfeden Bary, *Escherichia coli*'nin yaklaşık 100 katı büyüklüğünden dolayı *Bacillus megaterium*'u “büyük canavar” olarak adlandırmıştır (Vary et al., 2007). Genom boyutu 5,6 Mb'tır.

B. megaterium, *B. Subtilis*'in geliştirilmesinden önce 1960'lara kadar ana model organizma olmasına rağmen son zamanlar da popülerliği tekrardan artmıştır (Bunk et al., 2010). Rekombinant teknoloji ile popülerliği artan *B. megaterium* önemli bir endüstriyel organizmadır. Ayrıca harici alkalın proteazlara sahip olmadığı ve çeşitli plazmid vektörlerini stabil olarak koruyabildiği için bozulmamış proteinlerin üretimi için arzu edilen bir klonlama konakçısıdır. Fırıncılık endüstrisinde çeşitli amilaz grubu, glikoz kan testlerinde glikoz dehidrojenaz, sentetik penisilin endüstrisinde penisilin amidaz olarak kullanılmıştır. Son zamanlarda ise mantar öldürücü ve antiviral özelliklere sahip ilaçlar üretiminde de kullanılan aerobik bir saprofittir (Vary et al., 2007). *B. megaterium*, biyokimya, sporülasyon ve bakteriyofajlar üzerine yoğun çalışmalar için de kullanılmıştır.

Genelde toprak organizması olarak görülse de pirinç tarlalarından kurutulmuş gıdalara, deniz suyuna, tortulara, balıklara, normal floraya ve hatta bala kadar çeşitli ortamlarda bulunur. Suşlar, sıklıkla, psödomonadlar ve diğer yabancı maddeler (herbisitler gibi) üzerinden izole edilir. Optimum 30°C, ancak 3°C ile 45°C arasındaki sıcaklıklarda da büyür. Antartika Jeotermal gölden bazı izolatların 63°C'ye kadar sıcaklıklarda büyüdüğü bulunmuştur (De Vos et al., 2009). 2008 yılında yapılan bir

Çalışmada, *A. thaliana* ve *P. vulgaris* fidelerinin büyümesini destekleyen bir *B. megaterium* keşfedilmiştir. Sitokinin reseptörü CRE1-12 / AHK2-2 / AHK3-3 nakavt edilmiş fidelerin, sitokinin reseptörlerinin *B. megaterium* tarafından bitki büyümesinin desteklenmesinde tamamlayıcı bir rol oynadığı gösterilmiştir (Ortíz-Castro et al., 2008). Buna karşı *B. megaterium* için biyokontrol çalışmaları henüz yeterli bir sayıya ulaşmamıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada *Bacillus* sp'nin mantar izolatlarına karşı antagonist aktivitelerle metabolit üretme yeteneklerinin test edilmesi ve antifungal bileşiklerin karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

3.2. Araştırma Sürecinin Belirlenmesi

B. megaterium'un *Fusarium* türleri üzerine antagonistik etkileri *in vitro* koşullarda (ikili kültür deneyi ve uçucu organik bileşikler (VOC) deneyi) test edildi. Daha sonra, bu bakterinin antagonist aktivite gösteren metabolit üretme yetenekleri, antifungal biyosentez genlerine ait (*surfaktin*, *iturin*, *fengisin*) primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile analiz edildi. Yanı sıra antagonistik etkinin *Fusarium spp.*'de meydana getireceği değişiklikler transkripsiyon seviyesinde (*trikotesen* üretimi, oksidatif stres ilişkili genler) incelendi. Ön görülen süre 2019/2020 Eğitim Öğretim Yılıdır.

Araştırma deneysel hücreler üzerinde yapılacağı için etik kurul onayına gerek yoktur.

3.3. Araştırma Yöntemi

3.3.1. *Fusarium* Materyali ve *in vitro* Üretimi

Hastalıklı tahıllardan elde edilmiş ve genom boyutları çıkarılıp referans ırk olarak belirlenmiş PH-1 (*F. graminearum*) ve UK99 (*F. culmorum*) izolatları İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. *Fusarium* izolatları patates dekstroza agar (PDA, patates 4 g/L, dekstroza: 20 g/L, agar: 15 g/L; SigmaAldrich, Almanya) besiy ortamında oda sıcaklığında 7 gün inkübe edilmek suretiyle üretildi ve hem morfolojik testlerde hem de nükleik asit izolasyonunda kullanıldı.

İkili kültür ve VOC deneyleri için aynı alt kültür kullanılması için Nalam et al. (2016)'ın karboksimetilselüloz stok hazırlama protokollü optimize edildi. PDA ile üretilen *Fusarium* izolatları karboksimetilselüloz (CMC, %1,0 karboksimetilselüloz, %0,3 NaCl, %0,1 KH₂PO₄, %2,0 agar) besiyeri kullanılarak stok olarak hazırlandı ve -86°C' de muhafaza edildi. Bu amaçla, 25°C'de 4 gün boyunca ½ PDA besiyerli petriler üzerinde *F. graminearum* ve *F. culmorum* yetiştirildi. Sporülasyonu desteklemek için ¼'lük alanı kaplayacak şekilde mantar büyümesi gözlemlenen yerlerden mantar diskleri alındı ve 250 mL steril CMC içerisine bırakıldı. Bol miktarda makrokonidiasyon gözlemlenene kadar 4-5 gün boyunca çalkalayıcıda 28°C'de 100 rpm'de çalkalandı. Mantar süspansiyonu, döküntüleri ve misel kütlesini gidermek için dört gazlı bez içinden süzüldü. Süzüntü 10 dk boyunca 3,000 x g'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 10 mL steril ddH₂O içinde tekrar süspanse edilerek yıkandı, ardından daha önce tarif edildiği gibi oda sıcaklığında 10 dk boyunca 3,000 x g'de santrifüj edildi. Pelletlenen makrokonidi steril ddH₂O su içinde 1 x 10⁵ makrokonidi / mL konsantrasyonuna ayarlandı.

3.3.2. *Bacillus megaterium* Materyali ve *in vitro* Üretimi

Bacillus megaterium'a ait CTBmeg1 ve HMA5 suşları Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü ve Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünden sağlandı. Stok olarak alınan bakteriler Luria Bertani (LB, 10 g/L pepton, 5 g / L maya ekstraktı, 10 g/L NaCl; Lab M®, İngiltere) besiyerinde üretildi. 5 mL besiyerine 200 µL stok bakteri ekimi yapıldı ve çalkalayıcıda 30°C 200 rpm'de bir gece inkübe edildi. Elde edilen bakteriler spektrofotometre (Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, ABD) yardımı ile ölçülüp optik dansite (OD₆₀₀) 0,4 olacak şekilde seyreltilti. Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere gliserol ile stok yapıldı (1 mL saf gliserol, 1 mL süspanse bakteri) ve -86°C'de muhafaza edildi.

3.3.3. İkili Kültür Deneyi

CMC stok olarak hazırlanan *Fusarium* izolatları steril PDA besiyerinin merkezine 20 µL olacak şekilde ekildi. 7 gün boyunca 25°C'de inkübasyona bırakıldı. Her deney için aynı CMC stok *Fusarium* izolatları kullanıldı. Deneyin 6. gününde LB besiyeri içerisinde bakteriler üretildi. Deneyin 7. gününde *Fusarium*'lardan pipet uçlarının arka kısımları ile ~3mm çapında diskler alındı. Diskler yeni PDA

besiyerlerinin merkezine yerleştirilerek alt kültürleme yapıldı. Merkezdeki *Fusarium* disklerinin ~2,5 cm uzağına, petri kabının ise ~1 cm uzağına üretilmiş bakteri izolatları swab yardımı ile sürüntü şeklinde ekildi. Sadece *Fusarium* içeren petri negatif kontrol olarak kullanıldı. 7 gün boyunca *Fusarium* disk merkezinden mantarın bakteriye doğru radyal büyüme çapı ölçüldü. Aynı sürede *Fusarium* ve bakteri arasındaki mesafede ölçülüp kaydedildi. Bakterilerin radyal büyümesi Toh et al. (2016)'un protokolüne göre optimize edilmiştir. Buna göre ölçümler aşağıdaki formüllere göre yapıldı (R1: Kontrol petrisindeki *Fusarium*'un radyal üremesi, R2: *Fusarium*'un antagonist bakterilere doğru radyal üremesi) (3.1). Bakterilerin antagonistik etkileri radyal büyümenin inhibisyon aralıklarına göre sonuçlandırıldı. Radyal büyümenin inhibisyon yüzdeleri, düşük ile çok yüksek antifungal aktivite olarak kategorize edildi (Çizelge 3.1). İkili kültür deneyi çalışmasında 2 mantar izolatı ile 2 bakteri suşu kullanıldı. %30'dan fazla inhibisyon olan bakteri izolatları, bu ikili kültür testinden seçildi ve daha ileri moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere saklandı. Deney, 5 teknik ve 2 biyolojik tekrarlar gerçekleştirildi. Çalışmanın anlamlı olup olmadığı Tukey'in Post testi kullanılarak İki Yönlü ANOVA analizi Graphpad Prism 5.0 programı ile yapıldı.

$$PIRG (\%) = [(R1 - R2) / R1] \times 100\% \quad (3.1)$$

Çizelge 3.1. Radyal büyüme inhibisyon aralığı

Radyal Büyüme Sonucu (PIRG)	Antifungal Aktivite
<30%	Düşük antifungal aktivite
30- <50%	Orta derecede antifungal aktivite
50- <70%	Yüksek antifungal aktivite
≥70%	Çok yüksek antifungal aktivite

3.3.4. Uçucu Organik Bileşikler Deneyi (VOC)

Uçucu organik bileşikler deneyi Toh et al. (2016)'nın çalışmasından optimize edilmiştir. *Fusarium* izolatları PDA besiyerinin merkezine ekilerek 25°C'da 7 gün boyunca inkübe edildi. Deneyin 6. gününde *B. megaterium* suşları LB içerisinde bir gece 30°C'de 200 rpm de üretildi ve OD₆₀₀ 0,4 olacak şekilde seyreltilti. Çalışmada 2 mantar izolatı ve 2 bakteri suşu kullanıldı. Deneyin 7. gününde *Fusarium*'lardan pipet uçlarının arka kısımları ile ~3mm çapında diskler alındı. Diskler yeni PDA besiyerlerinin merkezine yerleştirilerek alt kültürleme yapıldı. Başka bir taze PDA

besiyerine bir gece inkübe edilen bakteri izolatları genel yayım yöntemi ile swab yardımı ile ekimi gerçekleştirildi. *Fusarium* disklerinin üzerine iki petri arasında sadece ortak hava akışı olacak şekilde bakteri ekimi yapılmış PDA yerleştirildi. Dışarıdan hava akışı olmaması için üst üste bırakılan petriler 2 kat parafilm ile sarıldı ve 7 gün boyunca 25°C’de inkübe edildi. Deney 5 teknik ve 2 biyolojik tekrarlar gerçekleştirildi. Büyüme inhibisyonu, iki tabakanın bir araya getirilmesinden önce ve sonra mantar kültürünün çapındaki fark hesaplanarak denklemde gösterilen PIDG değerlerine dayanılarak değerlendirildi (D1: Kontrol petrisindeki *Fusarium*’un çapı. D2: Antagonistik bakteriler ile muamele edilen *Fusarium*’un çapı) (3.2). Radyal büyümenin inhibisyon yüzdeleri, düşük ile çok yüksek antifungal aktivite olarak kategorize edildi (Çizelge 3.2). %30’dan fazla inhibisyon olan bakteri izolatları seçildi ve daha ileri çalışmalar için saklandı. Çalışmanın anlamlı olup olmadığı Tukey’in post testi kullanılarak İki Yönlü ANOVA analizi Graphpad Prism 5.0 programı ile yapıldı.

$$PIDG (\%) = [(D1 - D2) / D1] \times 100\% \quad (3.2)$$

Çizelge 3.2. *Fusarium* çap büyümesinin yüzde inhibisyonu

Radyal Büyüme Sonucu (PIDG)	Antifungal Aktivite
<30%	Düşük antifungal aktivite
30- <50%	Orta derecede antifungal aktivite
50- <70%	Yüksek antifungal aktivite
≥70%	Çok yüksek antifungal aktivite

3.3.5. Genomik DNA İzolasyonu

Bakterilerden genomik DNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi için 5mL LB besiyerine 200 µL stok bakteri ekimi yapıldı ve çalkalayıcıda 30°C 200 rpm’de bir gece inkübe edildi. Elde edilen bakteriler spektrofotometre yardımı ile ölçülüp OD₆₀₀ 0,4 olacak şekilde seyreltilti. Genomik DNA için NucleoSpin Tissue ticari kiti (Macherey nagel, ABD) kullanıldı. İzolasyonun tüm aşamaları ticari kitin belirtildiği şekilde uygulandı. 1mL bakteri kültürü 1,5 mL’lik eppendorf’a alındı ve 5 dakika (dk) boyunca 8000 x g’de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 180 µL Buffer T1 ve 25 µL Proteinaz K ilave edilip 56°C’de 3 saat inkübe edildi (her yarım

saatte bir 2 dk vortekslendi). 3 saat sonunda 200 µL Buffer B3 eklenip vortekslendi ve 70°C’de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası süspansiyonun üzerine 210 µL etanol (96–100 %) eklendi ve vortekslendi. Süspansiyon NucleoSpin® Tissue Column tüpüne alınıp 10000 x g’de 1 dk santrifüj edildi. Kolon altında kalan süspansiyon atıldı ve kolona 500 µL Buffer BW eklenip 10000 x g’de 1 dk santrifüj edildi. Süspansiyon atıldı ve kolona 600 µL Buffer B5 eklenip 10000 x g’de 1 dk santrifüj edildi. Süspansiyon atıldı ve boş kolon 10000 x g’de 1dk santrifüj edildi. Kolon steril bir 1,5 mL’lik eppendorf tüpe alındı ve üzerine 70°C’de inkübe edilen 100 µL Buffer BE eklendi ve 10000 x g’de 1dk santrifüj edildi. DNA solüsyonu -20°C’de saklandı.

Elde edilen genomik DNA bakterinin antifungal etkisinin araştırılması için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) çalışmalarında kullanıldı.

3.3.6. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

İkili kültür deneyi ile elde edilen bir haftalık *Fusarium* izolatları kullanılarak Total RNA izolasyonunun gerçekleştirildi. RNA izolasyonu için NucleoSpin RNA mini ticari kiti (Macherey nagel, ABD) kullanıldı. İzolasyonun tüm aşamaları ticari kitin belirtildiği şekilde optimize edilerek uygulandı.

30 mg mantar hifleri alındı. Steril bir 1,5 mL’lik eppendorf tüpe konuldu. Steril metal boncuklar içerisine yerleştirildi. 350 µL Buffer RA1 ve 3,5 µL β-merkaptoetanol eklendi. Homojenizatörde $\frac{1}{5}$ ’de 30 Hz vibrasyon frekansında 1dk boyunca homojenize edildi (RETSCH MM 400, Almanya).

Süspansiyonun içerisine %70’lik 350 µL etanol eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra süspansiyon NucleoSpin® RNA kolonuna alındı ve 11000 x g’de 30 sn santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Kolonun üzerine 350 µL MDB eklendi ve 11000 x g’de 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Kolon üzerine 95 µL DNaz reeaksiyon karışımı ilave edildi ve oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Kolon üzerine 200 µL Buffer RAW2 eklendi ve 11000 x g’de 30 sn santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Kolon üzerine 600 µL Buffer RA3 eklendi ve 11000 x g’de 30 sn santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Kolon üzerine 250 µL Buffer RA3 eklendi ve 11000 x g’de 2 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kolon boş halde 11000 X g’de 1dk santrifüj edildi. Kolon steril bir 1,5 mL’lik eppendorf tüpe alındı ve üzerine 50 µL RNaz içermeyen su eklendi. 11000 X g’de 1dk santrifüj edildi ve RNA solüsyonu -86°C’de muhafaza edildi.

Total RNA molekülleri cDNA sentezinde kullanıldı. cDNA molekülleri ticari kiti ile elde edildi (ProtoScript® First Strand cDNA SynthesisBioLABs, İngiltere) ve

daha sonra kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) analizlerinde kullanıldı. Üreticinin sağladığı protokol izlendi. Senteze başlamadan önce birbirinden farklı RNA konsantrasyonuna sahip örneklerin her biri, hedef gen ekspresyon değişikliklerinin tespiti için başlangıçtaki transkript sayısının eşit olması sebebiyle başlangıç RNA miktarı 1 µg olacak şekilde ayarlandı (son hacim 20 µl). cDNA sentezinde 0,2 ml'lik eppendorf tüpe ilk önce RNA ve 2 µL oligo(dt) (50 µM) eklendi ve 8 µL'ye tamamlanacak şekilde ddH₂O ilave edildi. Ardından RNA 5 dk 70°C'de denatüre edildi. Daha sonra üzerine 10 µL M-MuLV Reaksiyon Karışımı ve 2 µL M-MuLV enzim karışımı ilave edildikten sonra bir saat 42°C'de inkübe edildi, ardından enzim 5 dk boyunca 80°C'de inaktive edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA'lar qPCR'da kullanılmak için 2 kat seyreltildi ve final konsantrasyonu 25 ng/µl olarak süreç tamamlandı. qPCR yapıma aşamasından cDNA moleküllerinden, gen ekspresyon analizinde kullanmak için 1 µg RNA'ya denk gelen miktarda cDNA kullanıldı.

3.3.7. Nükleik Asit Moleküllerinin Kalitatif ve Kantitatif Analizleri

Bakteri hücrelerinden total DNA ve Total RNA'ların sağlamlığının belirlenmesi için 40 mL %0,8'lik agaroz jel elektroforezi gerçekleştirildi. 1X Trisasetat EDTA (TAE) agaroz çözeltisi, final konsantrasyonu 0,5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür (10 mg/ml) ile muamele edilip elektroforez kasetinde hazırlandı (Çizelge 3.3). DNA ve RNA örnekleri agaroz jele yüklenip 70 V sabit güç altında 45 dk boyunca yürütüldükten sonra UV ışın altında (Gen-Box imagER-CFx, Türkiye) incelendi.

İzole edilen genomik DNA'lar ve total RNA'ların miktarları ve saflık kontrolleri kantitatif olarak spektrofotometrik yöntem ile belirlendi (Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, ABD). DNA'nın 260, 280 ve 230 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçüldü. Çift iplikli DNA molekülü için 1 OD değeri 50 µg/mL'ye karşılık geldiği için DNA miktarları; "DNA (µg/ml) = A₂₆₀ x sulandırım katsayısı x 50" formülüne göre hesaplandı. İzole edilen total RNA'lar için ise tek zincirli RNA molekülü için 1 OD değeri 40 µg/mL'ye karşılık geldiği için RNA'ların miktarı; "RNA (µg/ml) = A₂₆₀ x sulandırım katsayısı x 40" formülüne göre hesaplandı. Saflık kontrolünde 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerlerinin oranı (A₂₆₀/A₂₈₀, A₂₆₀/A₂₃₀) kullanıldı (Maniatis et al., 1982).

Bu oran 1,8-2,0 değer aralığında hesaplandığında RNA molekülleri saf olarak kabul edildi.

Özelge 3.3. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponların bileşenleri ve konsantrasyonu

Elektroforez çözeltileri	��erik	Konsantrasyon
Tris-asetat EDTA (TAE) tamponu	Tris Baz Glasiyal Asetik Asit EDTA (pH 8.0)	242 gr 57.1ml 0.5 M (100ml)
Elektroforez yükleme tamponu (6x)	Bromofenol mavisi	%0.25
Etidyum Bromür	Etidyum Bromür	(10 mg/ml)

3.3.8. Biyoinformatik   alı  malar

Antagonistik etkinin *Fusarium spp.*'de meydana getireceği değişiklikleri transkripsiyon seviyesinde incelemek için qPCR yapıldı. Gazdağlı ve ark. (2018)'in belirlediği mantar yaşam döngüsünde temel hücre süreçleriyle yakından ilişkili olan genler; *Mgv1*, *stuA*, *CAT*, *POD*, *hog1*, *mst20* ve *tri5* kullanıldı. Endojen gen olarak *  -tubulin* kullanıldı (  zelge 3.4).

Özelge 3.4. *Fusarium spp.*'de meydana gelen antagonistik değişiklikler için kullanılan primerler

Primer	İleri Primer Dizi (5'-3')	Geri Primer Dizi (5'-3')	��zellik
betaF/betaR	agggtcattacaccgaggt	gtaccaccaagagagtg	Endojen gen
MgvRTF/MgvRTR	aggtcaacgattccgacag	gaccattaccctgagcgaga	Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz geni (hücre canlılığı ve hayatta kalması için gerekli olan temel gen)
StuARTF/StuARTR	gcccctactggatacgatca	ttgccttctaggacattgg	Transkripsiyonel faktör geni (hücre canlılığı ve hayatta kalması için gerekli olan temel gen)
Hog1F/Hog1R	cctggcaaaaatacgacgtt	tgatggagaattggtgacg	MAP kinaz (apoptoz benzeri süreçlerle ilişkilidir)
PodrtF/PodrtR	tggatcaaggacattggtga	gttgtagcatcctgctggt	Peroksidaz (ekspresyonu, oksidatif strese bir tepki olarak düzenlenir.)
tri5fullF/tri5fullR	atggagaacttcccaccgagtatt	agtccatagtctacggataaggtcaa	Trikodiyen sentaz geni (toksin sentezinde i�� görmektedir)
CatrF/CatrR	aattccacgttcgttcgtc	ccatactaggctcgtttgc	Katalaz (ekspresyonu, oksidatif strese bir tepki olarak düzenlenir.)
Mst20rtF/Mst20rtR	cctgaaaaggaacgacgaga	gccagcatgatggaattct	Serin / treonin-protein kinaz (apoptoz benzeri süreçlerle ilişkilidir)

B. megaterium'un *Fusarium spp.*'ye kar  şı antagonist aktivite gösteren metabolit üretme yetenekleri antifungal biyosentez genleri olan *rpoB*, *surfaktin*, *iturin* ve *fengisin*'in bakteri su  larında var olup olmadıkları PCR ile test edildi. PCR' da kullanılan primerler Gond et al. (2014) ile Zalila-Kolsi et al. (2016)'un yapmış olduğu çalışmalardan *B. megaterium* ile NCBI veri tabanında verilmiş olan referans ırk (MSP20.1) genomuna BLAST analizi ile en yakın olanlar seçildi (  zelge 3.5).

Çizelge 3.5. Bakteri antifungal biyosentez genleri için kullanılan primerler

Primer	İleri Primer Dizi (5'-3')	Geri Primer Dizi (5'-3')	Özellik (Antifungal karakterizasyon)
Prpo	atttcgtagccgaagaacgt	atgtgtcctattgagacacca	<i>rpoB</i> Sentezi
ITUC	ccccctcggtaagtgaata	ttggtaagccctgatgctc	<i>iturin</i> sentezi
SRFA	agagcacattgagcgttataaa	cagcatctcgttcaactttcac	<i>surfaktin</i> sentezi
ItuD1	gatgcgatctccttgatgt	atcgatcatgtgctgcttgag	<i>iturin</i> sentezi
Sur3	acagtatggaggcatggtc	ttccgccacttttcagttt	<i>surfaktin</i> sentezi
FenD1	tttggcagcaggagaagttt	gctgtccgttctgcttttc	<i>fengisin</i> sentezi
FENB	cctggagaaagaataaccgtaccy	gctgggttcagttkgatcacat	<i>fengisin</i> sentezi

3.3.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bacillus megaterium suşları olan CTBmeg1 ve HMA5'den elde edilen genomik DNA'lar kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yapıldı. PCR oligonükleotid primerler ile gerçekleştirildi. 25 µL hacimde PCR bileşen karışımı hazırlamak için; izole edilen genomik DNA'dan 50 ng, 1 X PCR tamponu, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP karışımı, 10 pmol primer, 0,02 U/µL Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. Primerlerin farklı bağlanma sıcaklıkları sebebiyle Gradient PCR gerçekleştirildi (Çizelge 3.6). PCR koşulu; tüm genler için 94°C'de 2 dk başlangıç denarütasyonu, 94°C'de 30 sn denatürasyon, Çizelge 3.5'te belirtilen sıcaklıklarda 30 sn bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama (28 döngü) ve 72°C'de 10 dk son uzama olarak optimize edildi (BİO-RAD, T100 Thermal Cyclers, ABD). PCR sonucu analizi için %1'lik agaroz jel elektroforezi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.6. PCR sırasında kullanılan genlere ait bağlanma sıcaklıkları

Primer	Bağlanma Sıcaklığı
Prpo	53 °C
ITUC	50 °C
SRFA	53 °C
ItuD1	55 °C
Sur3	52 °C
FenD1	50 °C
FENB	55 °C

3.3.10. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

İkili kültür deneyinde kullanılan *Fusarium* izolatlarından elde edilen Total RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar kullanılarak qPCR gerçekleştirildi. *Mgv1*, *stuA*, *CAT*, *POD*, *hog1*, *mst20* ve *tri5* genlerinin anlatımlarının belirlenmesinde “Sybr-Green I” boyası kullanılarak üretici firmanın protokolü uygulandı (BİO-RAD; iQ™ SYBR® Green Supermix, 100 x 50 µl rxns, 2,5 ml (2 x 1,25 ml), #1708880). qPCR

bileşenleri 1X Sybr Green I karışımı, 5 pmoL ileri primer, 5 pmol geri primer ve 25 ng/µl cDNA olacak şekilde toplam 10 µL hacimde 96 kuyulu qPCR beyaz plakasında bir araya getirildi. PCR koşulları 95°C’ de 2 dk ile gerçekleştirilen başlangıç denatürasyonu takiben, 95°C’de 5 sn denatürasyon, 58°C’de 10 sn bağlanma ve 72°C’ de 10 sn uzama aşaması 40 döngü gerçekleştirildikten sonra 40°C’de 30 saniyelik soğutma aşamasından oluşmaktadır (BIO-RAD, CFX Connect Realtime System, ABD). En son aşamada istenen hedef bölgenin çoğalıp çoğalmadığını anlayabilmek için her örnek için “melting curve” (erime eğrisi) analizi yapıldı. Erime eğrisi analizi için örnekler 65°C-95°C arası 2-5 sn/aşama’da 0,5°C arttırıldı. Endojen gen anlatımı hem kontrol grubu hem de deney setlerinde belirlendi ve bu analiz sonucu ile qPCR’ın etkin bir şekilde gerçekleştirildiği bulundu. Gen anlatım profilleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalizasyon değerlerine göre yorumlandı (Livak and Schmittgen, 2001). Deneyler, 3 teknik ve 2 biyolojik tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. Çalışmanın anlamlı olup olmadığı Tukey’in Post testi kullanılarak Tek Yönlü ANOVA analizi Graphpad Prism 5.0 programı ile yapıldı. Genlerin kendi içinde anlamlı fark olup olmadığı ise R Statistics R Studio ile LSD test ile belirlendi.

3.3.11. Hücre Proliferasyonunun Oransal Olarak Belirlenmesi

VOC deneyi yapıp PIDG değeri hesaplanmış *Fusarium* kültürlerinden yapıldı. Çalışmada WST-1 kiti ticari olarak temin edildi ve kitin belirlediği protokol optimize edilerek uygulandı (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche, Almanya). Mantar alt kültürü yapılmış PDA besiyerinden 1cm²’lik miselyum agar plağı alındı. Alınan agardan misel olmayan alt PDA besiyeri kısmı bistüri yardımıyla atıldı ve miselyum kısmı 1X PBS (1X PBS: 1 L DMSO, 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄, 0,24g KH₂PO₄) ile çözdürüldü. Çözdürme işlemi metal boncuk yardımı ile homejenizatörde 1/s’de 30 Hz vibrasyon frekansında 40 sn’de gerçekleştirildi (RETSCH MM 400, Almanya). 100 µL’lik hücre süspansiyonuna 1:10 (v/v) WST-1 ((‘2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu) eklendi. Bu çalışma WST-1’in tetrazolyum tuzunun hücresel mitokondriyal dehidrojenaz tarafından formazana bölünmesine dayanır. Dehidrojenaz aktivitesi ile üretilen boya miktarı, canlı hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır. Kör örnek olarak 100 µL 1X PBS içine 10 µL WST-1 eklendi. Karanlık odada 28°C’de 100 rpm’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası spektrofotometre ile 450 nm ve 620 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçüm yapıldı (Multiskan SkyHigh

Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, ABD). 450 nm dalga boyundaki ölçüm 620 nm dalga boyundaki ölçümden çıkarıldı. İşleme arka plan ışması dahil edilmemiştir. Kontrol grupları ile deney grupları arasındaki oransal değişim hesaplandı. Hücre canlılığının %'lik oranındaki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı Graphpad Prism 5.0 programı Tek Yönlü ANOVA ile belirlendi. Çalışma 2 teknik 2 biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir.

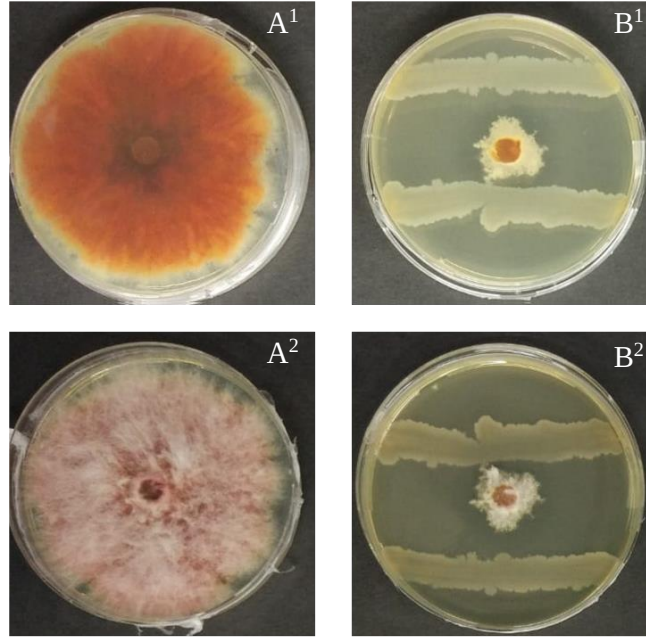


4. BULGULAR

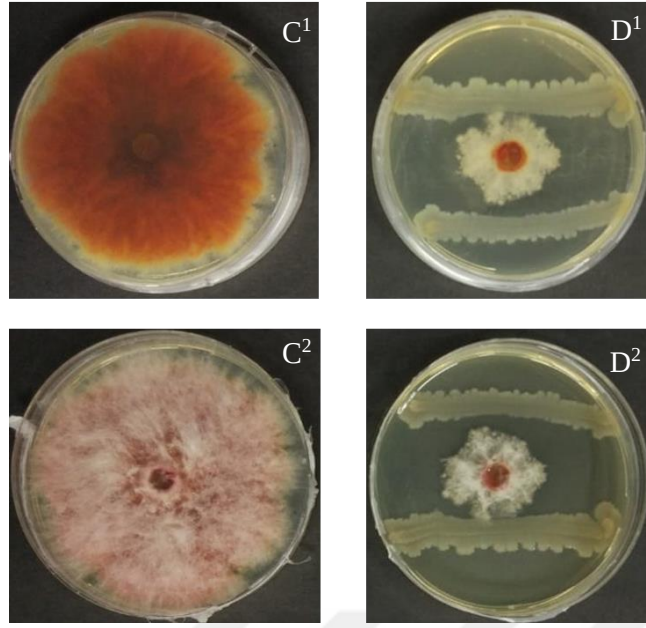
4.1. İkili Kültür Analizi

CTBmeg1 ve HMA5 bakterilerinin patojenik *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* UK99 izolatlarına karşı antifungal aktivitesi *in vitro* İkili kültür analiziyle değerlendirildi. Analiz sonucunda PH-1 ve UK99'un hif rengi ve yapısı bakımından kontrol gruplarına göre deney gruplarında morfolojik olarak belirgin farklar gözlemlendi.

PH-1 kontrol grubunda hif yapısı daha gevşek ve pamuksu yapıda, hif rengi daha koyu pembe aralığındayken, CTBmeg1 ve HMA5 suşlarının antagonisik etkileriyle hif yapısının kontrol grubu gibi gevşek olmasına karşın beyaza dönüştüğü saptandı. Ayrıca kontrol grubu 7 gün sonunda tüm petriyi kaplayacak şekilde üreme gerçekleştirirken, deney grubunda bakteri şeritleri arasında *Fusarium* izolatının radyal olarak gelişemediği gözlemlendi (Şekil 4.1, 4.2).

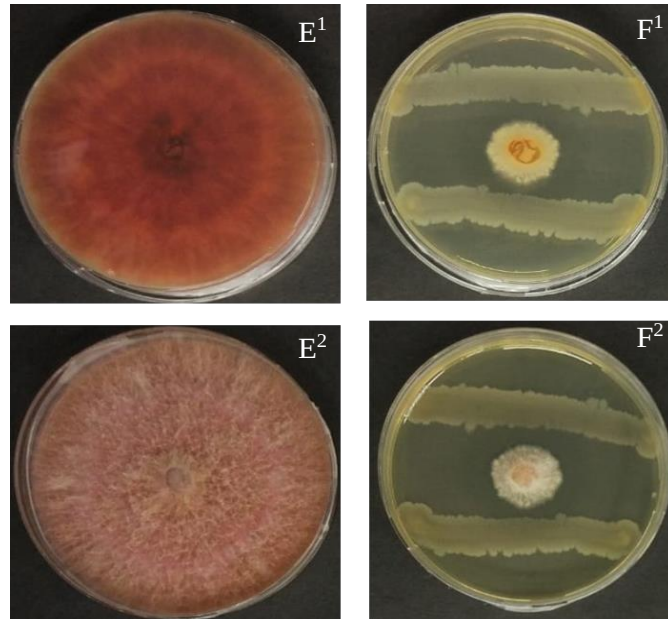


Şekil 4.1. İkili kültür analizinde CTBmeg1 bakterisinin *F. graminearum* PH-1 hattının antifungal aktivitesi (hif büyümesi üzerindeki etkisi); kontrol grup (A¹ ve A²) ve deney grup (B¹ ve B²) arka ve ön görüntüsü

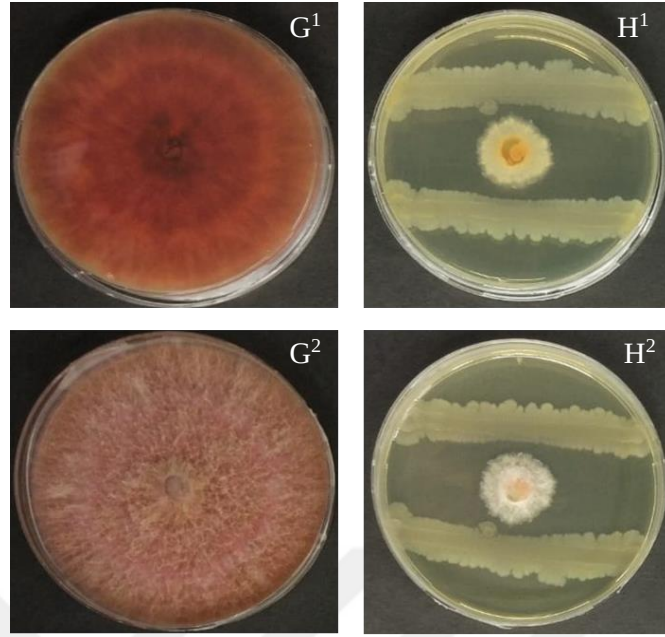


Şekil 4.2. İkili kültür analizinde HMA5 bakterisinin *F. graminearum* PH-1 hattının antifungal aktivitesi (hif büyümesi üzerindeki etkisi); kontrol grup (C¹ ve C²) ve deney grup (D¹ ve D²) arka ve ön görüntüsü

UK99 kontrol grubunda ise hif daha gevşek ve pamuksu yapıda, hif rengi ise koyu pembe-bordo aralığındayken CTBmeg1 ve HMA5 suşlarının antagonisik etkileriyle daha sık, keçe yapıda hif üremesi ve beyaz hif rengi gözlemlendi. Ayrıca kontrol grubu 7 gün sonunda tüm petriyi kaplayacak şekilde üreme gerçekleştirirken, deney grubunda bakteri şeritleri arasında *Fusarium* izolatının radyal olarak gelişemediği gözlemlendi (Şekil 4.3, 4.4).



Şekil 4.3. İkili kültür analizinde CTBmeg1 bakterisinin *F. culmorum* UK99 hattının antifungal aktivitesi (hif büyümesi üzerindeki etkisi); kontrol grup (E¹ ve E²) ve deney grup (F¹ ve F²) arka ve ön görüntüsü



Şekil 4.4. İkili kültür analizinde HMA5 bakterisinin *F. culmorum* UK99 hattının antifungal aktivitesi (hif büyümesi üzerindeki etkisi); kontrol grup (G^1 ve G^2) ve deney grup (H^1 ve H^2) arka ve ön görüntüsü

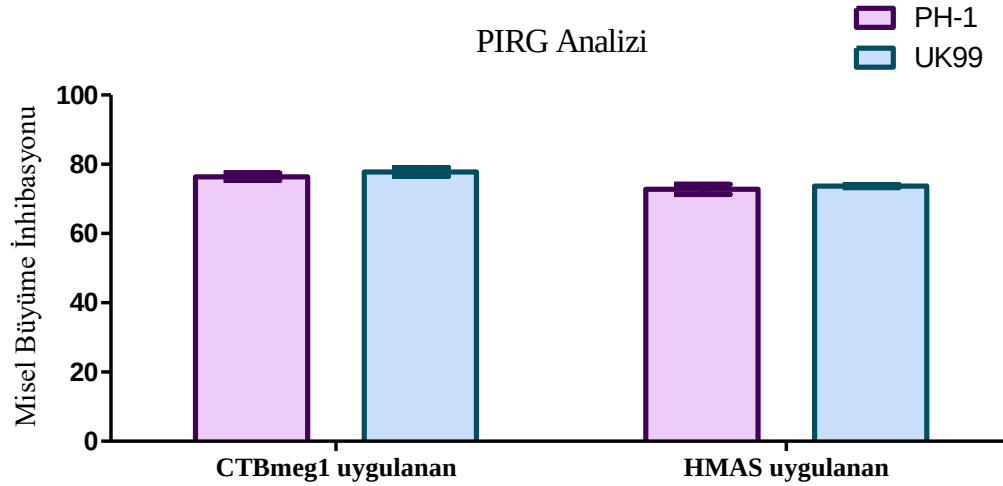
B. megaterium ile enfekte edilen *Fusarium* izolatları 7 gün sonunda çap ölçümleri (radyal büyüme) yapıldı. Bakteriler *F. culmorum* ($75,40 \pm 1,875$) ve *F. graminearum*'a ($75,00 \pm 1,220$) karşı yüksek *in vitro* antifungal aktivite gösterdi. Deney grupları arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı İki Yönlü ANOVA Tukey Post Testi ile yapıldı. Analiz sonucunda *Fusarium* gelişimi açısından tüm deney gruplarında kontrol gruplarına göre anlamlı fark ($p < 0.05$) bulundu (Çizelge 4.1, 4.2; Şekil 4.5).

Çizelge 4.1. İkili kültür analizi ile PH-1 İzolatının radyal büyümesindeki yüzde inhibisyonuna (PIRG) dayalı olarak CTBmeg1 ve HMA5 bakteri suşunun antagonistik aktivitesinin belirlenmesi

Deney Grupları	PIRG
PH-1 + CTBmeg1	$76,215 \pm 1,825$
PH-1 + HMA5	$73,770 \pm 1,825$

Çizelge 4.2. İkili kültür analizi ile UK99 İzolatının radyal büyümesindeki yüzde inhibisyonuna (PIRG) dayalı olarak CTBmeg1 ve HMA5 bakteri suşunun antagonistik aktivitesinin belirlenmesi

Deney Grupları	PIRG
UK99 + CTBmeg1	$77,27 \pm 1,985$
UK99 + HMA5	$73,52 \pm 0,584$

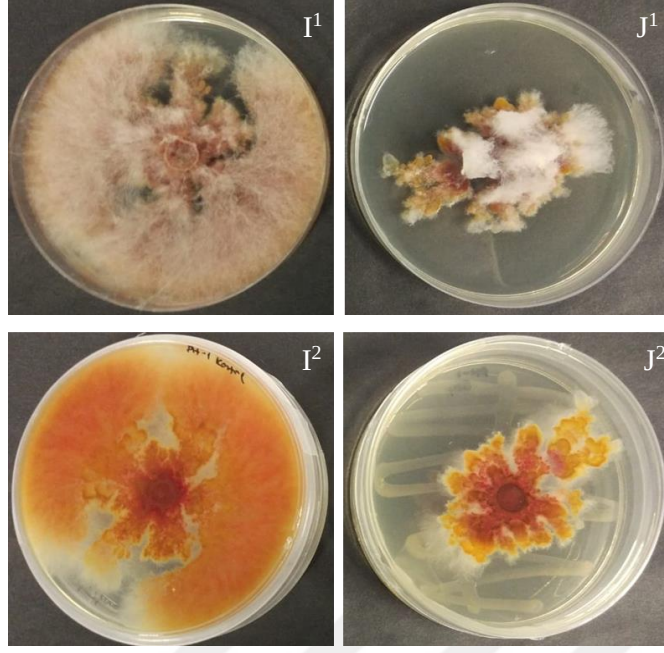


Şekil 4.5. CTBmeg1 ve HMA5 suşları ile ikili kültür deneyine tabi tutulan her iki izolatın birbiri ile PIRG sonuçlarının karşılaştırılması

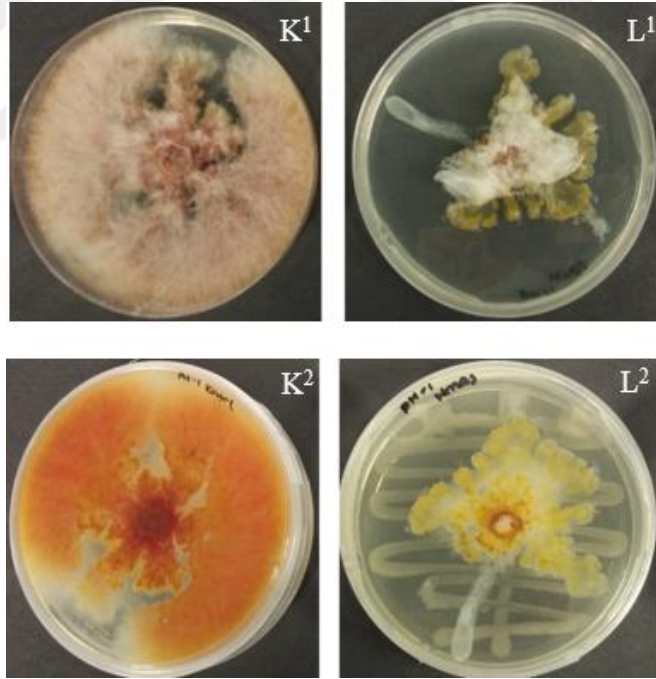
4.2. Uçucu Organik Bileşikler (VOC) Analizi

CTBmeg1 ve HMA5 bakterilerinin patojenik *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* UK99 izolatlarına karşı antifungal aktivitesi *in vitro* VOC analiziyle değerlendirildi. Analiz sonucunda her iki *Fusarium* izolatının hif rengi ve yapısı bakımından kontrol gruplarına göre deney gruplarında morfolojik olarak belirgin farklar gözlemlendi.

PH-1 kontrol grubu hif yapısı daha gevşek ve pamuksu yapıda, hif rengi daha koyu pembe aralığındadır, VOC'a maruz kalmış olan grup ise hif yapısı kontrol grubu gibi gevşek, ancak daha parçalı yapıdadır. Kontrol grubunda daha kısa hif üremesi görünürken, deney gruplarında hif gelişimi daha uzun olmuştur. Renk değişikliği fazla görülmemektedir. Ayrıca kontrol grubu 7 gün sonunda tüm petriyi kaplayacak şekilde üreme gerçekleştirirken, bakteri suşuna maruz kalmış olan grup radyal olarak çok fazla ilerleyememiştir (Şekil 4.6, 4.7).



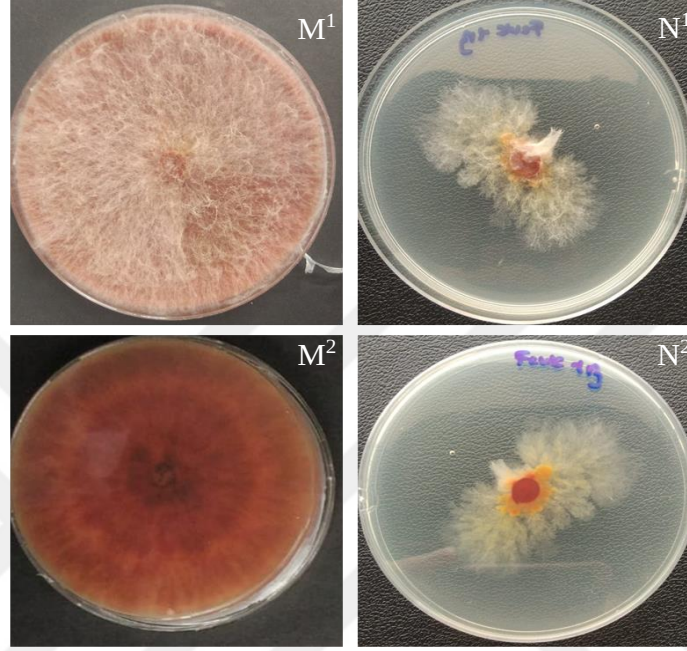
Şekil 4.6. CTBmeg1 *Bacillus* suşu tarafından üretilen VOC'un *Fusarium* PH-1 izolatının misel büyümesi ve gelişimi üzerinde sinerjistik aktivitesi; kontrol grup (I¹ ve I²) ve deney grup (J¹ ve J²) ön ve arka görüntüsü



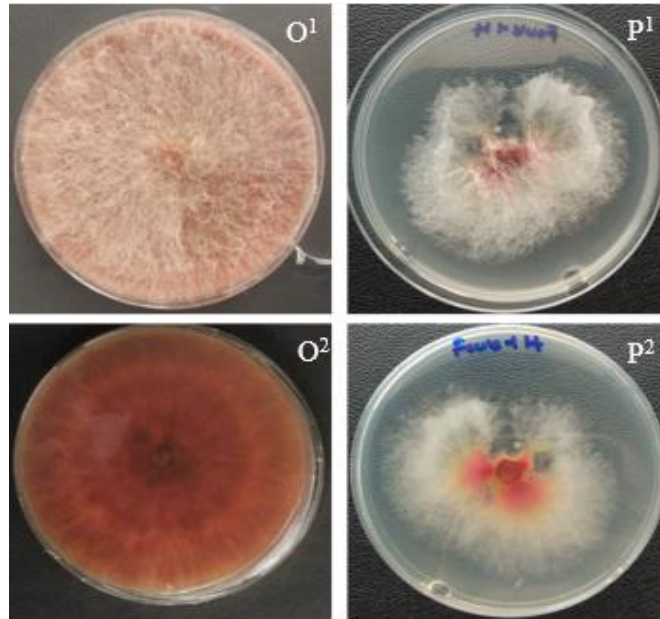
Şekil 4.7. HMA5 *Bacillus* suşu tarafından üretilen VOC'un *Fusarium* PH-1 izolatının misel büyümesi ve gelişimi üzerinde sinerjistik aktivitesi; kontrol grup (K¹ ve K²) ve deney grup (L¹ ve L²) ön ve arka görüntüsü

CTBmeg1 ve HMA5 bakterileri ile VOC'a maruz kalan *F. culmorum* UK99 izolatında da kontrol grubuna göre hif yapısında ve radyal büyüme de morfolojik olarak bazı belirgin farklar mevcuttur. Buna göre; kontrol grubu hif yapısı gevşek ve

pamuksu yapıda, hif rengi ise koyu pembe-bordo aralığındadır, VOC' a maruz kalmış olan grup ise İkili kültür deneyinin aksine kontrol grubundan daha gevşek hif yapısına sahip ve hif rengi merkezde bordo, çevre misel gelişimi beyazdır. Ayrıca kontrol grubu 7 gün sonunda tüm petriyi kaplayacak şekilde üreme gerçekleştirirken, bakteri suşuna maruz kalmış olan grup radyal olarak çok fazla ilerleyememiştir (Şekil 4.8, 4.9).



Şekil 4.8. CTBmeg1 *Bacillus* suşu tarafından üretilen VOC'un *Fusarium* UK99 izolatının misel büyümesi ve gelişimi üzerinde sinerjistik aktivitesi; kontrol grup (M¹ ve M²) ve deney grup (N¹ ve N²) ön ve arka görüntüsü



Şekil 4.9. HMA5 *Bacillus* suşu tarafından üretilen VOC'un *Fusarium* UK99 izolatının misel büyümesi ve gelişimi üzerinde sinerjistik aktivitesi; kontrol grup (O¹ ve O²) ve deney grup (P¹ ve P²) ön ve arka görüntüsü

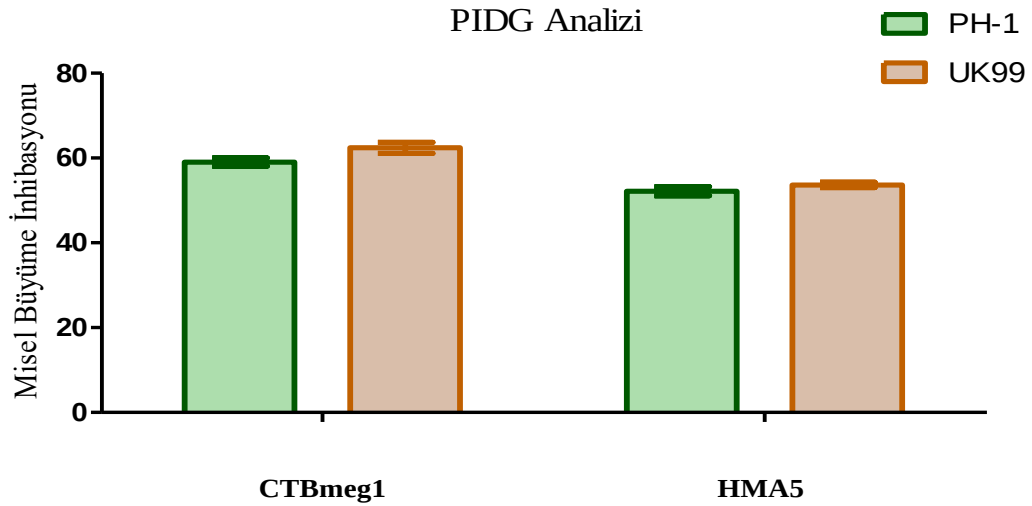
B. megaterium ile hava akışını ortak kullanacak şekilde hazırlanan VOC düzeneğinde *Fusarium* izolatlarının 7 gün sonunda PIDG aktiviteler belirlendi (Çizelge 4.3, 4.4). PIDG hesapları deney grupları arasındaki farklılığın anlamlı olup olmadığı Tukey Post testi kullanılarak İki Yönlü ANOVA analizi Graphpad Prism 5.0 programı ile yapıldı. Bakteriler *F. culmorum* ($56,47 \pm 7,057$) ve *F. graminearum*'a ($57,31 \pm 2,440$) karşı yüksek *in vitro* antifungal aktivite gösterdi. Analiz sonucunda antifungal aktivite kontrol grupları ve deney grupları arasındaki anlamlı farkı; önemli olarak kaydedilmiştir ($p < 0.001$) (Şekil 4.10).

Çizelge 4.3. PH-1 İzolatının CTBmeg1 ve HMA5 VOC analizi ile hesaplanan PIDG sonucu

Deney Grubu	PIDG
PH-1+CTBmeg1	59,06 $\pm$ 1,220
PH-1+HMA5	52,16 $\pm$ 1,219

Çizelge 4.4. FcUK99 İzolatının CTBmeg1 ve HMA5 VOC analizi ile hesaplanan PIDG sonucu

Deney Grubu	PIDG
UK99+CTBmeg1	62,42 $\pm$ 1,174
UK99+HMA5	53,66 $\pm$ 3,529



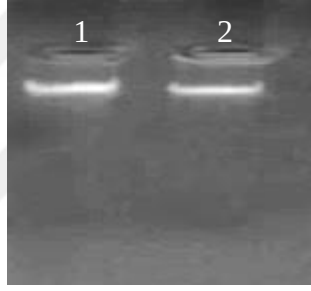
Şekil 4.10. CTBmeg1 ve HMA5 ile VOC analizine tabi tutulan *Fusarium* izolatlarının Radyal Büyüme İnhibisyonu (PIDG) sonucu analizi

4.3. Nükleik Asit Moleküllerinin Kalitatif ve Kantitatif Analizleri Sonucu

CTBmeg1 ve HMA5 suşlarının *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* UK99 izolatlarına karşı antagonist aktivite gösteren metabolit üretme yetenekleri antifungal biyosentez genlerinin PCR ile belirlenebilmesi için DNA izolasyonu yapıldı. Spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre kontrol ve deney gruplarında 72,62 ng/μl ile 53,31 ng/μl gDNA elde edildi. İzole edilen gDNA'ların A_{260}/A_{280} oranları 2,01 ile 2,1 ve A_{260}/A_{230} oranları 2,23 ile 2,28 arasındaydı. Bu değerler gDNA'ların saf bir şekilde elde edildiğini göstermektedir (Çizelge 4,5; Şekil 4.11).

Çizelge 4.5. CTBmeg1 ve HMA5 suşlarından elde edilen gDNA'ların konsantrasyonları

Bakteri Suşu	Konsantrasyon (ng/μl)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
CTBmeg1	72,62	2,107	2,232
HMA5	53,31	2,015	2,280

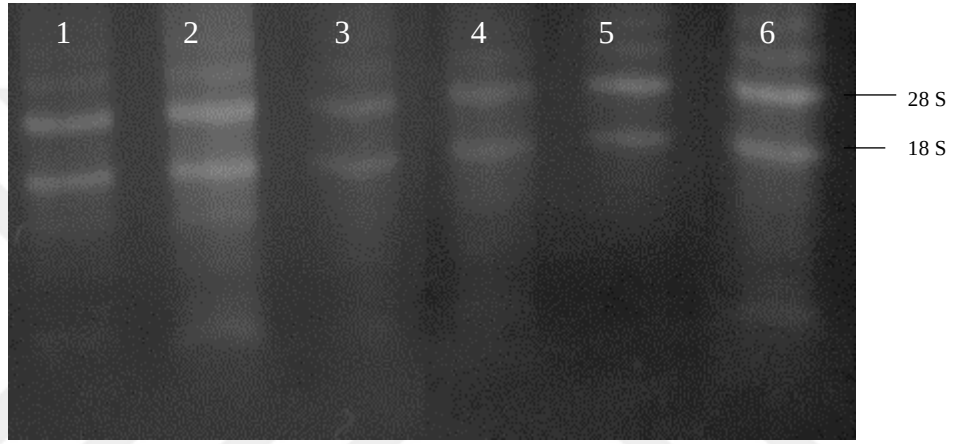


Şekil 4.11. 1: CTBmeg1, 2: HMA5 suşlarına ait gDNA'ların jel görüntüsü

İkili kültür analizi sonrasında kontrol ile CTBmeg1 ve HMA5 deney gruplarında üreyen *Fusarium* izolatlarından Total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre kontrol ve deney gruplarında 88,77 ng/μl ile 372,2 ng/μl arasında total RNA elde edildi. İzole edilen Total RNA'ların A_{260}/A_{280} oranları 2,1 ile 2,2 ve A_{260}/A_{230} oranları 1,6 ile 2,4 arasındaydı (Çizelge 4,6; Şekil 4.12). Bu değerler total RNA'ların saf bir şekilde elde edildiğini göstermektedir. İzole edilen RNA'lar gen anlatımı için 1 μg total RNA olacak şekilde cDNA'ya çevrildi.

Çizelge 4.6. *Fusarium* izolatlarının CTBmeg1 ve HMA5 ile yapılan ikili kültür deneylerindeki enfekte durumu ile elde edilen RNA konsantrasyonları

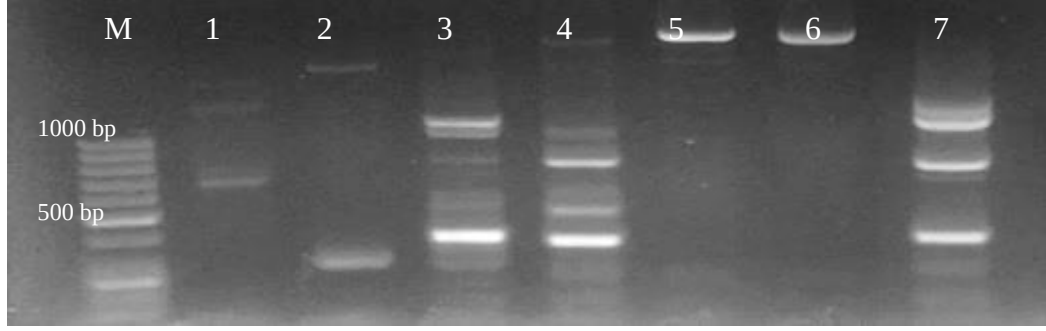
<i>Fusarium</i> İzolatı	Konsantrasyon (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
PH-1 Kontrol	116,2	2,171	1,996
PH1+CTBmeg1	372,2	2,165	2,287
PH-1+HMA5	88,77	2,121	1,653
UK99 Kontrol	180,2	2,212	2,420
UK99+CTBmeg1	202,2	2,243	1,915
UK99+HMA5	307,6	2,167	2,094



Şekil 4.12. 1: PH-1 Kontrol, 2: PH1+CTBmeg1, 3: PH-1+HMA5, 4: UK99 Kontrol, 5: UK99+CTBmeg1, 6: UK99+HMA5, örneklerine ait RNA'ların jel görüntüsü

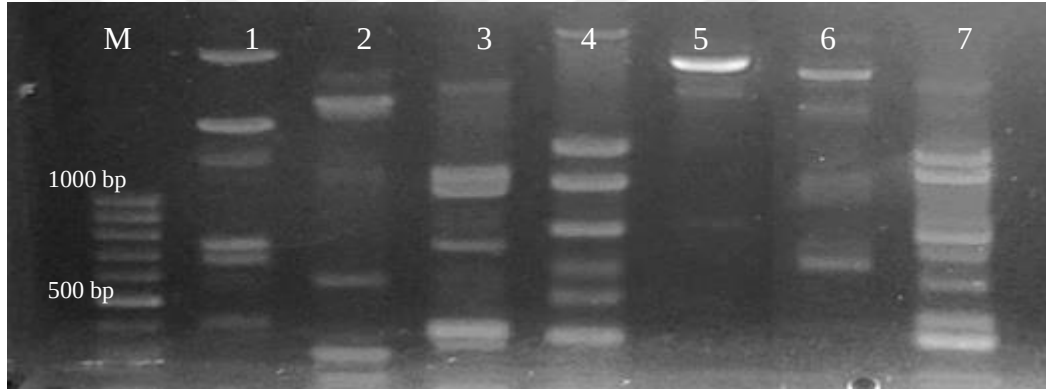
4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizi

CTBmeg1 ve HMA5 suşlarının *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* UK99 izolatlarına karşı antagonist aktivite gösteren metabolit üretme yetenekleri antifungal biyosentez genleri (*surfaktin*, *iturin* ve *fengisin*) PCR ile test edildi. PCR sonucu elektroforez jel görüntüleme sistemi ile analizlendi. Çalışmada kullanılan gen primerlerinin; Prpo 535 bç, ITUC 560 bç, SRFA 520 bç, ItuD1 647 bç, Sur3 441 bç, FenD1 964 bç, FENB 538 bç aralıkta bant vermesi beklenmektedir. PCR sonucunda genlerin genelinde çoklu bağlanma bölgeleri ile birden fazla bölgede çoğaldığı gözlemlendi. CTBmeg1 ile yapılan PCR sonucunda FENB 700 bç tek bant, FenD 1500 ile 300 bç arasında 2 bant, ITUC 1200 ile 400 bç arası 5 bant, ItuD 1100 ile 400 bç arası 7 bant, Prpo1 2000 bç, SRFA 2000 bç, Sur3 1300 ile 400 bç arası 2 bant çoğaldığı gözlemlendi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. CTBmeg1 suşu için PCR sonucu; M: 50 bç DNA Markırı (Thermo, ABD) 1: FenB, 2: FenD, 3: ITUC, 4: ItuD, 5: Prpo1, 6: SRFA, 7: Sur3'e ait jel görüntüsü

HMA5 ile yapılan PCR sonucunda; FENB 2000 ile 400 bç 6 bant, FenD 1700 ile 250 bç arasında 6 bant, ITUC 1600 ile 400 bç arası 6 bant, ItuD 2500 ile 400 bç arası 7 bant, Prpo1 2000 bç tek bant, SRFA 1800 ile 700 bç arası 2 bant, Sur3 1500 ile 300 bç arası 5 bant çoğaldığı gözlemlendi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. HMA5 suşu için PCR sonucu; M: 50 bç DNA Markırı (Thermo, ABD) 1: FenB, 2: FenD, 3: ITUC, 4: ItuD, 5: Prpo1, 6: SRFA, 7: Sur3'e ait jel görüntüsü

4.5. Gen Ekspresyon Analizleri (qPCR)

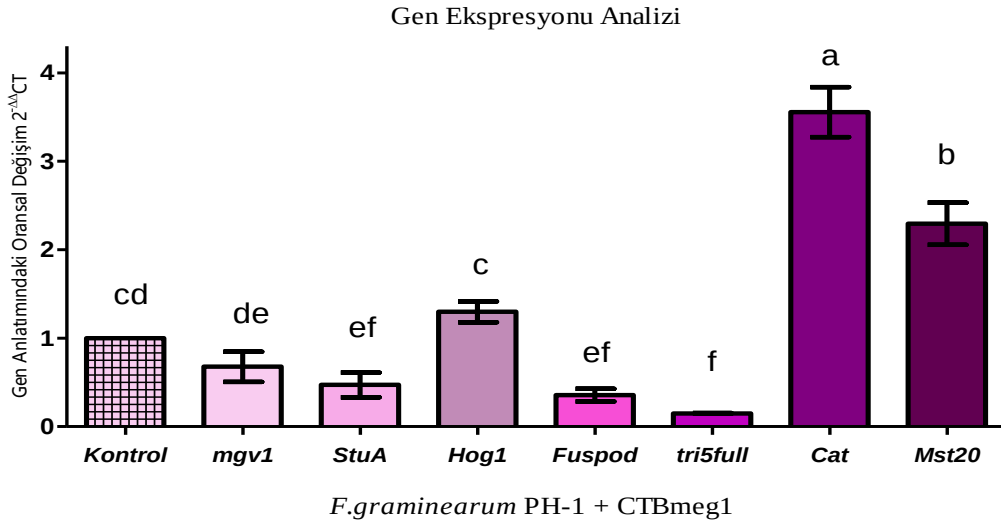
PH-1 ve UK99 izolatlarının İkili kültür deneyi sonucunda kontrol ve deney gruplarından birbirinden farklı konsantrasyona sahip Total RNA'lar sentezlendi. Hedef gen ekspresyon değişikliklerinin tespiti için başlangıçtaki transkript sayısının eşit olması sebebiyle başlangıç Total RNA miktarı 1 µg olacak şekilde ayarlandı. Gen ekspresyon analizinde 1 µg RNA'ya denk gelen miktarda cDNA sentezlendi (25 ng/µl). Gen anlatımı hem kontrol grubu hem de CTBmeg1 ve HMA5 suşları ile oluşturulan deney gruplarında; *hog1*, *mst20*, *CAT*, *POD*, *mgv1*, *stuA* ve *tri5* gen ekspresyon seviyeleri belirlendi. Hedef genlerin deneysel setleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalizasyon değerlerine göre yorumlanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001). Buna göre her deney grubunda mikotoksinde sorumlu olan *tri5* geninin ($0,15 \pm 0,003$ ile $3,838 \pm 0,11$ ve

0,149±0,006 ile 0,360±0,143), hücrenin hayatta kalması ve canlılığından sorumlu olan *mgv1* ve *StuA* genlerinin azaldığı (0,676±0,17 ile 0,910±0,380 ve 0,906±0,143 ile 0,901±0,005; 0,471±0,14 ile 0,673±0,118 ve 1,111±0,1036 ile 0,47±0,053), apoptoz ile ilişkile olan *hog1* ve *mst20* genlerinin (1,3±0,1166 ile 0,9±0,212 ve 1,3±0,1166 ile 0,9±0,212; 0,9±0,212 ile 1,468±0,571 ve 3,732±0,437 ile 1,625±0,418) ise değişerek arttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Hedef genlerin $2^{-\Delta\Delta CT}$ değişim sonuçları

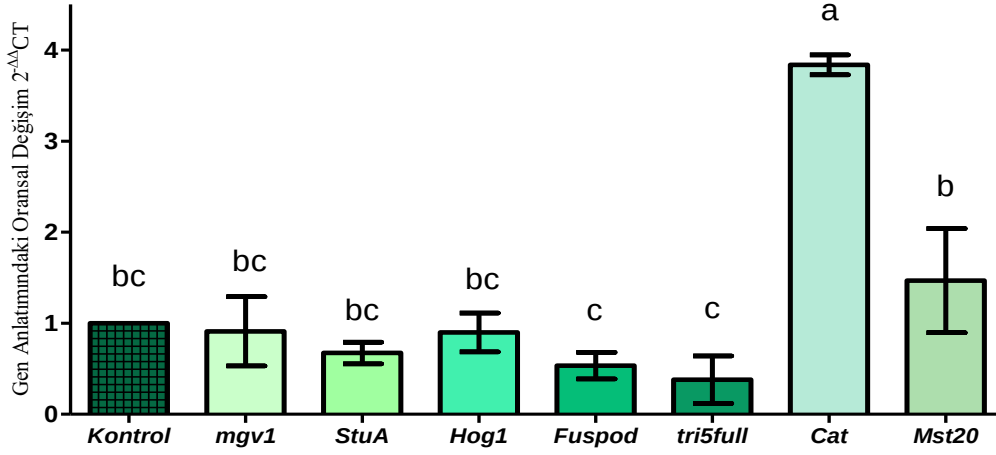
$2^{-\Delta\Delta CT}$	<i>Mgv1</i>	<i>StuA</i>	<i>Hog1</i>	<i>Fuspod</i>	<i>tri5full</i>	<i>Cat</i>	<i>Mst20</i>
PH-1+CTBmeg1	0,676±0,17	0,471±0,14	1,3±0,1166	0,356±0,073	0,15±0,003	3,554±0,282	0,9±0,212
PH-1+HMA5	0,910±0,380	0,673±0,118	0,9±0,212	0,534±0,147	0,381±0,260	3,838±0,11	1,468±0,571
UK99+CTBmeg1	0,906±0,143	1,111±0,1036	1,93±0,26	0,308±0,038	0,149±0,006	4,687±0,34	3,732±0,437
UK99+HMA5	0,901±0,005	0,47±0,053	0,87±0,378	0,534±0,0732	0,360±0,143	3,77±0,575	1,625±0,418

Bulunan sonuçlar Tek Yönlü ANOVA testine tabi tutulduktan sonra deney gruplarının kendi aralarında hangi genin birbirinden farklı olduğunu belirlemek için çoklu karşılaştırma testi (LSD) yapıldı. Test R 3.1.3 istatistik programı (RStudio; Sürüm 0.98.1103) agricolae paketi ile Tek Yönlü ANOVA ile gerçekleştirildi (Şekil 4.15, 4.16, 4.17, 4.18).



Şekil 4.15. PH-1+CTBmeg1 İkili Kültür analizine ait gen anlatımındaki oransal değişimleri gösteren grafik. Çubukların üzerindeki farklı harfler, önemli farklılıklar anlamına gelir.

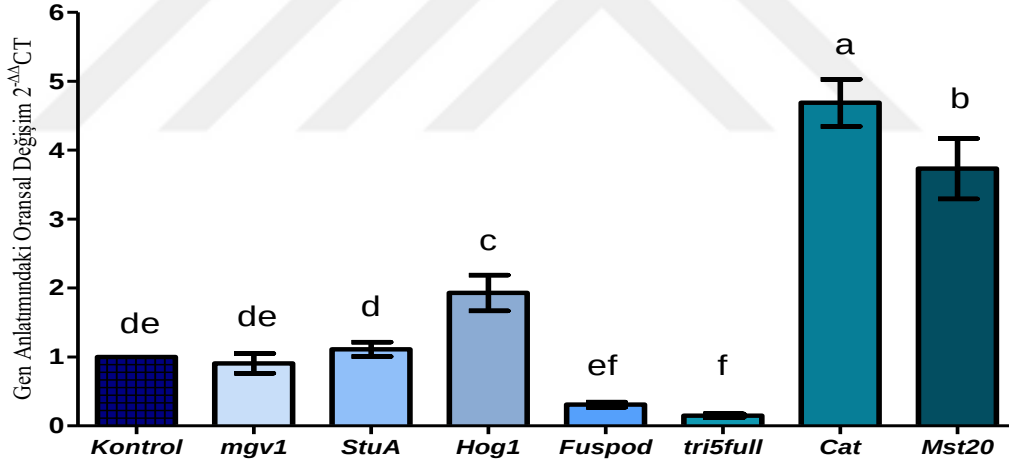
Gen Ekspresyonu Analizi



F.graminearum PH-1 + HMA5

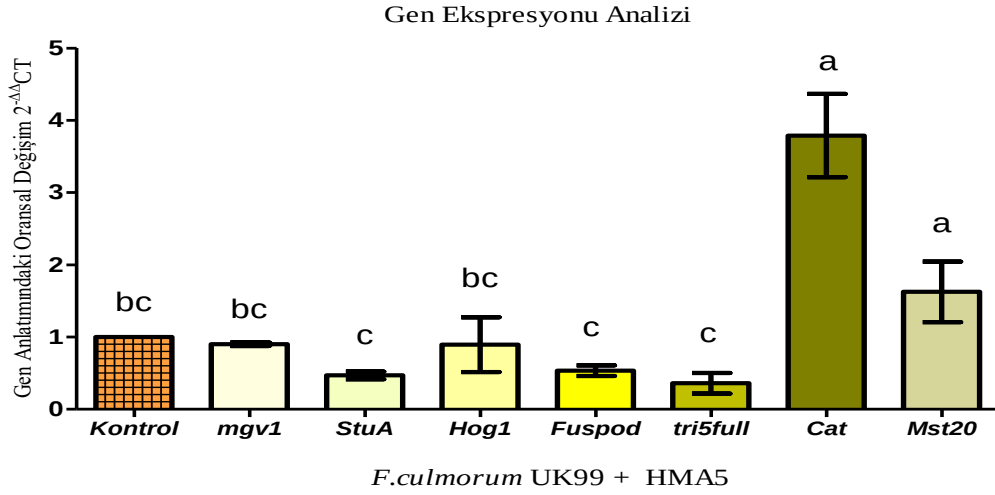
Şekil 4.16. PH-1+HMA5 İkili Kültür analizine ait gen anlatımındaki oransal değişimleri gösteren grafik. Çubukların üzerindeki farklı harfler, önemli farklılıklar anlamına gelir.

Gen Ekspresyonu Analizi



F.culmorum UK99 + CTBmeg1

Şekil 4.17. UK99+CTBmeg1 İkili Kültür analizine ait gen anlatımındaki oransal değişimleri gösteren grafik. Çubukların üzerindeki farklı harfler, önemli farklılıklar anlamına gelir.



Şekil 4.18. UK99+HMA5 İkili Kültür analizine ait gen anlatımındaki oransal değişimleri gösteren grafik. Çubukların üzerindeki farklı harfler, önemli farklılıklar anlamına gelir.

4.6. Hücre Proliferasyonu Analizi

Hücre proliferasyon analizi için 4 günlük *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* UK99 izolatlarının kontrol ile CTBmeg1 ve HMA5 suşlarıyla yapılan VOC deney grupları misel plakları kullanıldı. Analiz WST-1 ajanı ile gerçekleştirildi. Kontrol grubu ile deney grubu arasındaki hücre proliferasyon oransal değişim hesaplandı (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. PH-1 ve UK99 izolatlarının WST-1 hücre proliferasyonu analizinde 450 nm ve 620 nm dalga boylarındaki belirlenen canlılık oranı

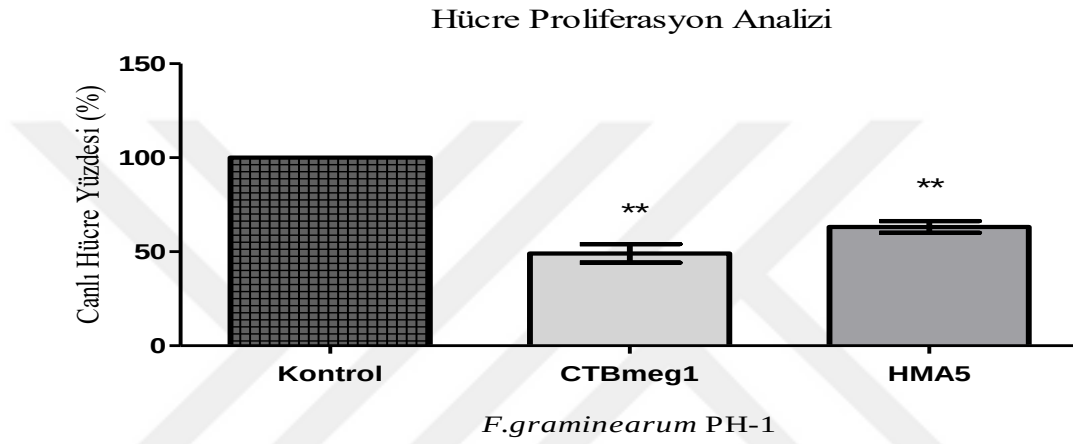
Örnek Adı	Canlılık Oranı
PH-1 Kontrol	0,328
PH-1+CTBmeg1	0,161
PH-1+HMA5	0,208
UK99 Kontrol	0,448
UK99+CTBmeg1	0,17
UK99+HMA5	0,258

F. graminearum PH-1 ve *F. culmorum* UK99 izolatlarının 4.saat sonunda alınan spektrofotometrik ölçüm sonucu %100 olarak oranlandı ve proliferasyon normalizasyonu oluşturuldu. Daha sonra bu normalizasyona göre deney gruplarının spektrofotometrik ölçüm sonuçları % değer olarak oranlandı. Hücre canlılığının %'lik oranındaki değişimi bilimsel açıdan anlamlı olup olmadığı Graphpad Prism 5.0 programı Tek Yönlü ANOVA analizi ile belirlendi. Buna göre *F. graminearum* PH-1 izolatının CTBmeg1 ve HMA5 suşları ile yapılan VOC deneyi hücre proliferasyon oranı sırasıyla $49,1 \pm 4,9$ ile $63,15 \pm 3,15$, *F. culmorum* UK99 izolatının CTBmeg1

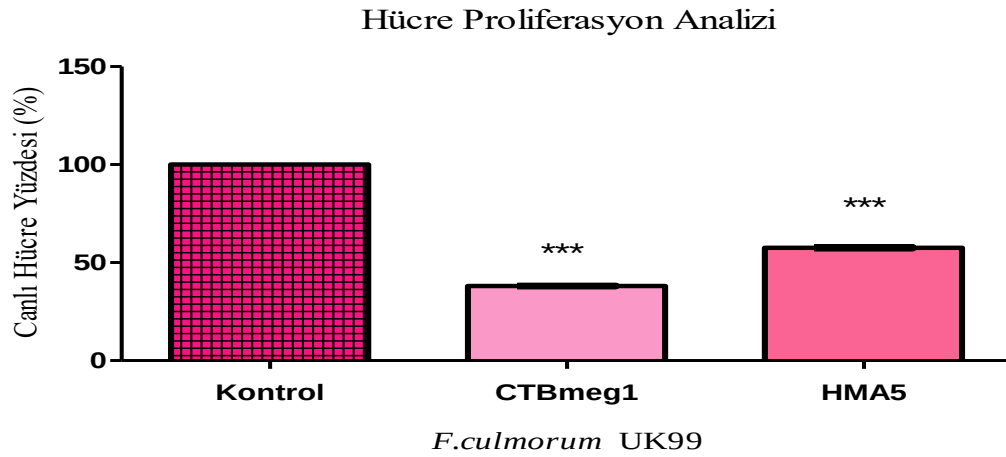
ve HMA5 suşları ile yapılan VOC deneyi hücre proliferasyon oranı sırasıyla $38 \pm 0,5$ ile $57,56 \pm 0,59$ olarak bulunmuştur (Çizelge 4.9; Şekil 4.19, 4.20).

Çizelge 4.9. *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* UK99 izolatlarının CTBmeg1 ve HMA5 suşları ile yapılan VOC deneyi sonucu hücre canlılığının %'lik oranındaki değişimi

Örnek Adı	Canlılık %
PH-1+CTBmeg1	49,10%
PH-1+HMA5	63,15%
UK99+CTBmeg1	38,00%
UK99+HMA5	57,57%



Şekil 4.19. PH-1 izolatlarının hücre proliferasyon analizinin karşılaştırılması. Çubukların üzerindeki “**” önemli farklılıklar anlamına gelir (P <0.05 *; P<0.01 **; P<0.001 ***)



Şekil 4.20. UK99 izolatlarının hücre proliferasyon analizinin karşılaştırılması. Çubukların üzerindeki “***” önemli farklılıklar anlamına gelir (P <0.05 *; P<0.01 **; P<0.001 ***)

5. SONUÇ

İkili kültür deneyinde kullanılan *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* UK99 izolatlarında antagonistik en çok etkilenen izolat UK99 olarak belirlenmiş, her iki *Fusarium* izolatında kontrole göre hif yapısında ve renginde morfolojik değişimler gözlemlenmiştir. Çalışmada kullanılan CTBmeg1 ve HMA5 suşlarından en fazla antagonistik etki gösteren bakteri ise CTBmeg1 olarak bulunmuştur.

VOC deneyinde kullanılan *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* UK99 izolatlarında antagonistik en çok etkilenen izolat UK99 olarak belirlenmiş, her iki *Fusarium* izolatında kontrole göre hif yapısında ve renginde morfolojik değişimler gözlemlenmiştir. Çalışmada kullanılan CTBmeg1 ve HMA5 suşlarından en fazla antagonistik etki gösteren bakteri ise CTBmeg1 olarak bulunmuştur.

CTBmeg1 ve HMA5 suşlarının *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* UK99 izolatlarına karşı antagonist aktivite gösteren metabolit üretme yetenekleri antifungal biyosentez genleri (*surfaktin*, *iturin* ve *fengisin*) PCR ile incelenmesi sonucunda; CTBmeg1 ve HMA5 suşlarında çoklu bağlanma bölgeleri ile birden fazla bölgenin çoğaldığı gözlemlendi. Referans alınan yayınlara bakıldığında aynı işlemin onlarda da görüldüğü, bu sebeple sadece genin var olup olmadığının belirlenmesi yönünde sonuç çıkarıldığı göz önüne alındı. Sonuç olarak ilgili genin bakteri suşlarında var olduğu jel görüntüsü ile desteklenmiştir.

İkili kültür deneyinde kullanılan *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* UK99 izolatlarından elde edilen RNA' lardan sentezlenen cDNA' lar ile gerçekleştirilen qPCR analizinde; mikotoksinde sorumlu olan *tri5* geninin, hücrenin hayatta kalması ve canlılığından sorumlu olan *mgv1* ve *StuA* genlerinin azaldığı; apoptoz ile ilişkile olan *hog1* ve *mst20* genlerinin arttığı belirlenmiştir. İkili kültür deneyi sonucunda UK99 izolatının daha hassas ve CTBmeg1 suşunun daha antagonistik olduğu morfolojik testi ile ortaya çıkmış, qPCR testi sonucu ile de desteklenmiştir.

Hücre proliferasyonu sonucunda; VOC'a maruz kalıp ortak gaz kullanan *F. graminearum* PH-1 ve *F. culmorum* UK99 izolatlarından CTBmeg1 ile muamele gören UK99'un canlılığının HMA5 ile muamele gördüğünden daha az olduğu, buna karşı *F. graminearum* PH-1 izolatının ise yine aynı şekilde CTBmeg1 ile muamele gören PH-1'in canlılığının HMA5 ile muamele gördüğünden daha az olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak VOC deneyinde ortak gaz kullanımından en çok etkilenen izolatın *F. culmorum* UK99 olduğu, en çok antagonistik etkinin ise CTBmeg1 suşunda olduğu bulunmuştur.



6. TARTIŞMA

Gıda tüketimi canlılığın devam etmesi için zorunlu bir unsurdur. Nüfusun artması her geçen gün gıda ihtiyacını da beraberinde arttırmaktadır. Nüfusun artması, tarım arazilerinin azalması, mevsimlerde meydana gelen değişiklikler sonucu veya kontrolsüz zirai ilaç kullanımı tarım arazilerini kirletmekte ve azaltmaktadır. 2019 yılı istatistik sonuçlarına göre yaklaşık 7,5 milyar olan insan nüfusunun 820 milyona aşkını yeterli besin bulamadığı için açlıkla mücadele etmektedir.

Hasat öncesi ve sonrası meydana gelen kontaminasyonlar, tarım ürünlerindeki kayıpların en büyük etkenidir. Hasat sonrası taze meyve ve sebzelerdeki hastalıklar sebebiyle ürünlerin sadece %50'si tüketilebilmektedir (Ağırman ve ark., 2019). *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Fusarium*, bu kontaminasyona sebep olan bazı mantar örnekleridir. Bitki hastalıklarının %75'ini oluşturan mantarlardan *Fusarium* kök ve kök boğazı çürüklüğü ile *Fusarium* başak yanıklığı hastalıklarına sebep olur (Parry et al., 1995; Trail et al., 2003; Pereyra and Dill-Macky, 2008).

Mantarlar hastalık oluşturmak için ikincil metabolitler üretirler. Ürettikleri bu metabolitler toksik etkilidir (Sanzani et al., 2016). Toksik maddelerde enfekte olmuş gıdaların alınımı insan ve hayvanlarda, kusma, oral lezyonlar, deri hastalıkları, kanser gibi birçok sağlık açısından zararlı etkiler ortaya çıkarır. Bu sebeple mücadelesi çok önemlidir.

Başak yanıklığı ve kök çürüklüğü hastalıkları ile mücadele iki tür strateji yaygın olarak kullanılmaktadır; kısa süreli ve uzun süreli mücadele stratejisi. Kısa süreli yönetim; pestisit kullanımı ve biyokontrol gibi yöntemlerin uygulanmasıdır. Endüstriyel tarımın başlıca koruma uygulamaları pestisit kullanımıdır. Pestisitler, gıda üretimi verimliliğini artıran, gıda kaynaklı ve vektör kaynaklı hastalıkları azaltan geniş bir heterojen kimyasal grubudur. 1940 yılı itibari ile pestisit kullanımı başlamıştır (Tiryaki ve ark., 2010). Pestisitlerden fungusit kullanılan buğdayda, yabancı ot, hastalıkların ve böceklerin meydana getirdiği kayıpların %27 oranında olduğunu ancak ilaç kullanılmadığı takdirde bu oranın %53'e çıkacağını belirtilmiştir (Dağ ve ark., 2000). Öte yandan aşırı pestisit kullanımının toprak ve su kaynaklarını kirletmekte,

biyolojik çeşitlilik kaybına neden olmakta, zararlıların doğal düşmanlarını yok etmekte ve gıdanın besin değerini düşürmektedir. Su yolu ile pestisit kalıntıları toprak altına inip doğal sulara karışmaktadır. Böylece toprak, alınan ürün ve sular kimyasala maruz kalmaktadır. Bu kimyasala aşırı maruz kalan canlılarda kanser, böbrek fonksiyonlarını tüketme, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları, hormon bozulması, gelişimsel bozukluklar, kısırlıkla, hatta ölümle sonuçlanan unsurlar görülmektedir. Ayrıca, fungusların büyük popülasyonlara sahip olmaları ve yüksek sıklıkta mutasyona uğramalarından dolayı bu fungusitlere karşı kolayca bağışıklık kazanabilmesi nedeniyle etkili bir mücadele olmadığını göstermektedir.

Birleşmiş Milletler İnsan Hakları Konseyi (İng: United Nations Human Rights Council, OHCHR) 2017 yılında yayınladıkları bildiride her yıl yaklaşık 200 bin insanın pestisit maruz kalması sonucu akut ölümlerin ortaya çıktığını belirtmiştir. Aynı bildiride son 40 yıl boyunca kullanılan pestisit, ürünlerde ki kaybına etkisi tahmin edilenden daha az olduğu rapor edilmiştir.

TUİK verilerine göre 2014 yılı ile 2018 yılı arasında pestisit kullanımının %50 arttığı görülmektedir. Ülkemizde, Dünyada olduğu gibi pestisitlerden en çok fungusit kullanılmaktadır. Bu oran %44 iken, %22,8 insektisitler pestisit kullanımının büyük kısmını oluşturmaktadır. 2017 yılı itibariyle Akdeniz bölgesinde pestisit kullanımın ülke genelinden daha fazla olduğu, bölgede ise en çok tarım ilacı kullanan ilin %10 ile Antalya, bu ilimizi %9 ile Manisa takip etti bilinmektedir (Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, 2020). Artan pestisit kullanımı ve beraberinde getirdiği çevre sorunları için dünya çapında mücadele başlamıştır. Ülkemizde de Tarım ve Orman Bakanlığı “Entegre Mücadele” prensibini oluşturmuş, böylece 2017 yılı itibariyle pestisit kullanan arazilerden %44’ nın azaldığını bildirmiştir. Ancak pestisit kullanan arazilerde son 2 yılda düşüş meydana gelmiş, pestisit kullanımı arttığı tekrardan gözlemlenmiştir.

Yasal yaptırımların yanında biyoteknolojik çalışmalarda günden güne artmıştır. Hurst 1972’de keşfettiği LAB ile mikroorganizmaların antagonistik büyümesi ile gıdaların korunmasını bulmuştur. Bu sonuç tarım arazilerine de yansımış biyokontrol ajanlarının tarım ürünlerini çeşitli hastalık unsuru mantarlardan koruduğu ortaya çıkmıştır. Korumanın etkisinin yanı sıra, birçok mikroorganizma suşu da bitkiler üzerinde büyümeyi teşvik edici özelliklere sahiptir. Bakteriler arasında, *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Agrobacterium* cinslerinden türler biyolojik kontrolde toprak ve bitki ile ilişkili mikroorganizmalar olarak en önemli role sahiptir.

Bacillus türü bakteriler biyolojik kontrol için son yıllarda yapılan çalışmalarda dikkatleri üzerine çekmektedir. Bu türler, bitki ve fungal patojen etkileşimlerini, temel besin maddeleri için rekabet etme, fungitoksik metabolitler üreterek patojenleri antagonize etme veya bitkilerde sistemik direnci indüklemeye gibi bir dizi mekanizma ile etkiler (Khan et al., 2017). Dahası, yaşam habitatlarından biri olan toprakta çokça bulunmaları, çeşitli biyolojik aktif metabolitlerin üretimi ve sabit sıcaklık dirençli spor formları oluşturma yetenekleri biyolojik savaş için ajan olmalarının sebebidir (Katı et al., 2016).

Bacillus cinsinin bitki büyümesini destekleyen üyeleri, endospor oluşturma kabiliyetleri, değişken pH, sıcaklık ve ozmotik koşullara toleransları ve yanı sıra patojenik olmamaları nedeniyle diğer mikroorganizmalara göre avantajlara sahiptir. Genel olarak, mantar ve virüslere karşı geniş bir antagonistik aktivite spektrumuna sahiptirler.

B. amiloliquefaciens suşu BLB369, *B. subtilis* suşu BLB277 ve *Paenibacillus polimiksa* suşu BLB267 ile yapılan çalışmanın sonucunda fitopatogenik mantarlara karşı *iturin*, *surfaktin*, *fengisin*, *fusarisidin* ve *polimiksin* ürettikleri bunun yanı sıra geniş spektrum sergiledikleri görülmüş, aynı zamanda buğday tohumu çimlenmesi, bitki boyu, fenolik bileşikler, klorofil ve karotenoid içeriklerinin arttığı bulunmuştur (Zalila-Kolsi et al., 2016). Böylelikle hem çevre dostu olması hem de bitki büyümeyi teşvik etmesi yani bitki oluşumu kalitesini arttırması biyolojik ajan çalışmalarını arttırmıştır. Ancak hala tarım pazarında biyolojik ajan tüketimi sadece %1’lik payı oluşturmaktadır (Fravel, 2005).

Uçucu organik bileşikler (VOC) olarak da bilinen uçucu metabolitler, düşük moleküler kütleye, yüksek buhar basıncına (>0.01 kPa), düşük kaynama noktasına ve düşük polariteye sahiptir. Mantarlardaki metabolik kökeni hakkında az şeyler bilinse bile bakteri üzerinde yeteri kadar bilgi edinilmiştir (Lee et al., 2016; Kai et al., 2008). Buna göre insan sağlığını iyileştirmek, tarım ürünlerinin verimliliğini arttırmak, bitkileri hastalıktan korumak veya bitki büyümesini teşvik etmek için bazı bakterilerin VOC üreticisi olduğunu bulmuştur. Bu bakteriler ise; *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus* ve *Agrobacterium* cinsi türleri daha sık biyoaktif VOC üreticileri olarak bildirilmiştir. Özellikle *Bacillus* türleri tarafından yayılan VOC’lerin mantar büyümesini önleme potansiyeli olduğu gösterilmiştir; bu antagonistik eylem, doğal ortamlarda, mikrobiyotanın bir seçimine yol açan rekabetçi bir baskıyı yansıttığını ifade etmiştir.

Tüm yukarıda bahsedilenler bir araya geldiğinde ortaya çıkan sonuç Funguslarla mücadele gıda tüketimi, insan ve çevre sağlığı açısından çok önemlidir. Bakteriler bu konudaki çevre dostu alternatiflerdir. Hem ekonomik hem de kolayca üretilmektedirler. Bu da yapılan VOC çalışmalarının sonucunda ortaya saldıkları uçucu organik bileşikler ile anlaşılmıştır. Oluşturdukları bilinen *iturin*, *surfaktin*, *fengisin*, *fusarisidin* ve *polimiksin* genleri bakteriler ile biyoteknolojik çalışmalara zemin hazırlamıştır. Buradan yola çıkılarak bu tez çalışması yapılmıştır.

Fusarium türünün sebep olduğu başak yanıklığının esas etmeni Türkiye'de de sık görülen *F. graminearum* ve *F. culmorum* olduğu bilinmekte ve bazı çalışmalarda *F. culmorum* 'un arpada enfeksiyon gücünün yüksek olduğu bulunmuştur (Uluhan ve ark., 2019). Tufan ve ark. (2016)'nın yapmış olduğu bir çalışmada 6 arpa hattı üzerinde *F. culmorum* (F16) kök çürüklüğü hastalığı etmeninin yüksek olduğu bulunmuş ve arpada stresle ilişkili genler (*HvBAS1*, *HvLOX1*, *HvMT2*, *HvPR1*, *HvPR3*, *HvPR4*, *HvPR5*, *HvPR10* ve *HvWRKY12*) ile antioksidan sistemle ilişkili genler (*HvAPX*, *HvCu/ZnSOD*, *HvGST6* ve *HvBAS1*) ile yapılan moleküler çalışmalarda ise *F. culmorum* 'un bu genlere olumsuz etkisi olduğu bulunmuştur (Tufan ve ark.; 2016).

Bu tez çalışmasında hem *F. graminearum* hem de *F. culmorum* 'a ait referans suşların (PH-1, UK99) *Bacillus megaterium* 'un (CTBmeg1, HMA5) antagonistik etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, öncelikle bakterinin *Fusarium* türleri üzerine antagonistik etkileri *in vitro* koşullarda (İkili kültür ve uçucu organik bileşikler) test edilmiştir. Bu testlerde aynı besiyeri üzerinde, yani ikili kültür deneyi ile üretilen mantarlardan UK99'un antagonistlik olarak daha çok etkilendiği belirlenmiştir. Antagonistlik etkiyi ise en çok CTBmeg1 suşu göstermiştir. Bunun yanı sıra uçucu bileşikler, yani VOC deneyi ile farklı besi yeri ancak ortak hava kullanımı sağlayan mantar izolatlarından yine UK99'un antagonistlik olarak daha fazla etkilendiği gösterilmiştir. Her iki deneyde de hif yapılarında morfolojik değişiklik gözlenmiştir. Bu da direkt maruz kalma ve sadece ortak gaz kullanımının mantar izolatları üzerinde benzer etkinlik oluşturduğunu göstermektedir.

Her iki çalışma moleküler olarak desteklenmiştir. İkili kültür ile yapılan çalışmalar mantar izolatlarının antagonistlik açıdan nasıl tepki verdiğini gen bazından incelemeye vesile olmuştur. Bunun için hücre canlılığı ve hayatta kalması, apoptoz ile ilişkili, oksidatif strese tepki oluşturan temel genler qPCR ile incelenmiştir. qPCR için *Mgv1*, *stuA*, *CAT*, *POD*, *hog1*, *mst20* ve *tri5* genleri kullanılmıştır (Gazdağlı ve ark., 2018). Sonuç olarak toksin etki ile inaktif olan *tri5* geninin azaldığı, apoptozla

ilişkili olan genlerin *hog1* ve *mst20* arttığı bulunmuştur. VOC ile yapılan çalışmada hücre canlılığı için WST-1 ile proliferasyon oranı belirlenmiştir. WST-1'in çalışma prensibi tetrazolyum tuzunun hücresel mitokondriyal dehidrojenaz tarafından formazana bölünmesine dayanır. Dehidrojenaz aktivitesi ile üretilen boya miktarı, canlı hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır. Böylece her iki suşun bakteri izolatlarının uçucu bileşkilerine maruz kalmasıyla ne kadar canlı kaldığı belirlenmiş oldu. Sonuçta ikili kültür deneyine benzer etkinin görüldüğü ve hassas izolatın olduğu bulunmuştur. Ancak her iki çalışmada da CTBmeg1 suşunun güçlü bir antagonistlik etkisi olduğu ortaya çıkmıştır.

Daha sonra, bu bakterinin antagonist aktivite gösteren metabolit üretme yetenekleri, antifungal biyosentez genlerine ait (*surfaktin*, *iturin*, *fengisin*) primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile analiz edilmiştir. Bu analiz için FENB, FenD, İTUC, İTUD, PRO1, SRFA, Sur3 primerleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda *surfaktin*, *iturin*, *fengisin* ile ilgili genlerin, kullanılan bakteri türlerinde var olduğu bulunmuştur.

7. ÖNERİLER

Yapılan çalışmalarda *Bacillus megaterium*'un (CTBmeg1, HMA5) antagonistik etkileri incelenmiş ve *F. graminearum* ile *F. culmorum*'a ait referans suşlar (PH-1, UK99) üzerinde etkin olduğu bulunmuştur. *in vitro* ortamda gerçekleştirilen bu çalışmalar buğday, arpa gibi bitkiler üzerinde *in vivo* çalışmalar ile geliştirilmelidir. Oda sıcaklığı ile çok kısa sürede üreyebilen *B. megaterium*, hem ekonomik açıdan ülkelere katkı sağlarken hem de çevre dostu olması ekosistem açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Bu sebeple geliştirilecek sistem sayesinde pestisit kullanımı azalacak ve tarım ürününde verim artacaktır.

8. KAYNAKLAR

- Agrios, G.N. (1997) Plant pathology (No. BOOK). Academic press.
- Ağırman, B, Akalın, MN., & Erten, H. (2019) Meyve Ve Sebzipelerde Hasat Sonrası Fungal Hastalıkların Antagonistik Mayalar İle Biyokontrolü. Gıda, 44(1): 31-49.
- Akinsanmi, O.A., Mitter, V., Simpfendorfer, S., Backhouse, D., Chakraborty, S. (2004) Identity and pathogenicity of *Fusarium* spp. from wheat fields in Queensland and northern New South Wales. Australian Journal of Agricultural Research, 55: 97-107.
- Aktaş, H., Tunalı, B. (1993) Konya ilinde buğdayın bazı hastalık sorunları ve çözüm yolları, 1. Konya'da Hububat Tarımının Sorunları ve Çözüm Yolları Kongresi, Konya, pp. 247- 255.
- Anonymus, (2001) Tarım Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü.
- Arıcı Ş. E. (2006) Somaklonal varyasyondan yararlanarak in vitro seleksiyonla buğday (*Triticum aestivum*)’ da başak yanıklığına dayanıklı bitki elde edilmesi, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Birleşmiş Milletler İnsan Hakları Konseyi, 2017 Raporu, OHCHR (İnternet adresi: <https://www.ohchr.org/EN>; Son Erişim: 04.12.2020)
- Bottalico A. (1998) *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles, Journal of Plant Pathology 80 (2): 85-103.
- Bottalico A., Giancarlo P. (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe, European Journal of Plant Pathology, 108: 611–624.
- Bunk, B. et al. A short story about a big magic bug. Bioengineered Bugs 1: 85–91 (2010)
- Bushnell, W. R., Hazen, B. E., Pritsch, C. (2003) Head blight, in *Fusarium* head blight of wheat and barley, Histology and physiology of *Fusarium* 44–83.
- Chakraborty, S., Liu, C. J., Mitter, V., Scott, J. B., Akinsanmi, O. A., Ali, S., Dill- Macky, R., Nicol, J., Backhouse, D., Simpfendorfer, S. (2006) Pathogen population structure and epidemiology are keys to wheat crown rot and *Fusarium* head blight management, Australasian Plant Pathology 35:643-655.
- Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L.M.S., Trivedi, P., Kumar, B. and Colvin, N. (2005) Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. Microbiol Res 160: 75–81.
- Chaves-López, C., Serio, A., Gianotti, A., Sacchetti, G., Ndagijimana, M., Ciccarone, C., ... and Paparella, A. (2015) Diversity of food-borne *Bacillus* volatile

compounds and influence on fungal growth. Journal of applied microbiology, 119(2): 487-499.

Coloretti, F., Carri, S., Armaforte, E., Chiavari, C., Grazia, L. (2007) Antifungal activity of lactobacilli isolated from salami. Fems Microbiology Letters, 271: 245-250.

Cuomo C. A. (2007) The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization, Science, 317: 1400-1402

Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, Tarım İlacı (Pestisit) Kullanımı. (İnternet Adresi: <https://cevreselgostergeler.csb.gov.tr/tarim-ilaci-pestisit-kullanimi-i-85834>; Son Erişim: 06.11.2020)

Dağ, S. S., Aykaç, V. T., Gündüz, A., Kantarcı, M. Ve Şişman, N. (2000) Türkiye’de tarım ilaçları endüstrisi ve geleceği. Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi, Ankara, 2: 933-958.

De Bary A., Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bakterien. Wilhelm Engelmann, Leipzig, 1884.

De Paiva, E., Serradilla, M. J., Ruiz-Moyano, S., Cordoba, M. G., Villalobos, M. C., Casquete, R., Hernandez, A. (2017) Combined effect of antagonistic yeast and modified atmosphere to control *Penicillium expansum* infection in sweet cherries cv. Ambrunes. Int J Food Microbiol, 241: 276-282. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.033.

De Vos, P. et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. Springer, (2009)

Delen, N. Fungisitler. Nobel Yayın Dağıtım. Nobel Yayın No: 1360, Ankara Kasım, 2008.

Deshmukh, S., Huckelhoven, R., Schafer, P., Imani, J., Sharma, M., Weiss, M., Waller, F.,

Kogel, K.H. (2006) The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103,49:18450-18457.

Doohan, F. M., Parry, D.W., Nicholson, P. (1999) *Fusarium* ear blight of wheat, the use of quantitative PCR and visual disease assessment in studies of disease control, Plant Pathology, 48: 209-217.

Efsa, 2014. The 2011 European Union report on pesticide residues in food. Efsa J. 12(5): 3694, Parma, Italy

Felix D'Mello, J. P., Macdonald, A. M. C., Postel, D., Dijkma, W.T.P., Dujardin A., Placint, C. M. (1998) Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens, European Journal of Plant Pathology, 104 (8): 741-751

Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J. and Stankovic, S. (2018) Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. J. Biotech., 285: 44-55.

Gazdağlı, A., Sefer, Ö., Yörük, E., Varol, G. İ., Teker, T., and Albayrak, G. (2018) Investigation of Camphor Effects on *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* at Different Molecular Levels. Pathogens, 7(4): 90.

- Guarro J., Gene J., Stchigel A. M. (1999) Developments in fungal taxonomy, Clin Microbiol Rev, 12: 454.
- Gond, S. K., Bergen, M. S., Torres, M. S., and White Jr, J. F. (2015) Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. Microbiological research, 172: 79-87.
- Hekimhan, H., Bagci, A., Nicol, J., Arisoy, Z., Taner, S., and Sahin, S. (2004, September). Dryland root rot: A major threat to winter cereal production under sub-optimal growing conditions. In Proceedings of the 4th International Crop Science Congress (Vol. 26, p. 283).
- Hurst, A. (1973) Microbial antagonism in foods. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 6:80-90
- Ireta, M. J., Gilchrist, L. (1994) *Fusarium* head scab of wheat (*Fusarium graminearum* schwabe), Mexico, pp.25.
- Jenkinson, N. P., and Parry, D. W. (1994) Isolation of *Fusarium* species from common broad-leaved weeds and their pathogenicity to winter wheat. Mycological Research, 98(7): 776-780.
- Jorgensen L. N. (2000) Control of *Fusarium* ear blight in winter wheat, Proceedings of the 17th Danish plant protection conference.
- Kahn, J.R. (1991) Atrazine pollution and chesapeake fisheries, farming and countryside an economic analysis of external costs and benefits, Wallingford, CAB International
- Kai, M., Effmert, U., Berg, G. and Piechulla, B. (2007) Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. Arch Microbiol 187: 351–360.
- Kai, M., Hausteine, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B. and Piechulla, B. (2008) Bacterial volatiles and their action potential. Appl Microbiol Biotechnol 81: 1001–1012.
- Khan, N., Maymon, M. and Hirsch, A. (2017) Combating *Fusarium* infection using *Bacillus*-based antimicrobials. Microorganisms, 5(4): 75.
- Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R. and Bennett, J. W. (2016) Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. Fungal biology and biotechnology, 3(1): 7.
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., and Coton, E. (2017) Antifungal microbial agents for food biopreservation—a review. Microorganisms, 5(3): 37.
- Liu, Y., Ma, J., Yan, W. (2012) Different Tolerance in Bread Wheat, Durum Wheat and Barley to *Fusarium* Crown Rot Disease Caused by *Fusarium pseudograminearum*. Journal of Phytopathology, 1-6.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. methods, 25(4): 402-408.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982) Molecular cloning: a laboratory manual (Vol. 545), Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring harbor laboratory.

- Meena, M., Swapnil, P., Zehra, A., Dubey, M. K. and Upadhyay, R. S. (2017) Antagonistic assessment of *Trichoderma* spp. by producing volatile and non-volatile compounds against different fungal pathogens. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 50(13-14): 629-648.
- Mesterhazy, A. (1995) Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breeding*, 114: 377-386.
- Miedaner, T., Cumagun, C. J. R., and Chakraborty, S. (2008) Population genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*. *Journal of Phytopathology*, 156(3): 129-139
- Miedaner, T., Schilling, A. G., Geiger, H. H. (2001) Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries, *Journal of Phytopathology*, 149: 641-648.
- Mitter, V., Zhang, M. C., Liu, C. J., Ghosh, R., Ghosh, M., and Chakraborty, S. (2006) A high-throughput glasshouse bioassay to detect crown rot resistance in wheat germplasm. *Plant Pathology*, 55(3): 433-441.
- Nalam, V. J., Sarowar, S., and Shah, J. (2016) Establishment of a *Fusarium graminearum* infection model in *Arabidopsis thaliana* leaves and floral tissues. *Bio Protoc*, 6, e1877
- Netto, N., Giordani, N. A. (1989) Control químico de La Fusariosis del trigo, Mexico.
- Nganje, W. E. Bangsund, D. A., Leistritz, F. L., Wilson, W. W., Tiapo, N. M. (2004) Economic Impacts of *Fusarium* Head Blight in Wheat and Barley: 1993–2001, North Dakota State University, ND, USA. Report No. 538.
- O'Donnell, K., Ward, T. J., et al. (2004) Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade, *Fungal Genet. Biol.* 41: 600-623
- Ortíz-Castro, R., Valencia-Cantero, E., and López-Bucio, J. (2008) Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant signaling & behavior*, 3(4): 263-265.
- Oskam, A.J., Vijftines, R.N.A., and Graveland, C. Additional E. U. policy instrumans for plant protection. Wageningen Agricultural University, the Netherlands, 1997.
- Özer, N., ve Soran, H. (1991) *Fusarium* species of Turkey. *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 6(6): 259-271
- Palyzová, A., Svobodová, K., Sokolová, L., Novák, J., and Novotný, Č. (2019) Metabolic profiling of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 2 in dual cultures with biocontrol agents *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Trichoderma harzianum*. *Folia microbiologica*, 64(6): 779-787.
- Parry, D. W., Jenkinson, P., Mcleod, L. (1995) *Fusarium* ear blight (Scab) in small grain cereals, *Plant Pathology*, 44: 207-238

- Pereyra S. A., Dill-Macky R. (2008) Colonization of the residues of diverse plant species by *Gibberella zeae* and their contribution to *Fusarium* head blight inoculum, *Plant Dis* 92(5): 800–807
- Prema, P., Smila, D., Palavesam, A., Immanuel, G. (2008) Production and characterization of an antifungal compound (3-Phenyllactic Acid) produced by *Lactobacillus plantarum* Strain. *Food Bioprocess Tech.*, 3:379-386.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, D. A. (1990) *Microbiology*. Wm C Brown Publishers.
- Romanazzi, G., Feliziani, E., Baños, S. B., Sivakumar, D. (2017) Shelf life extension of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 57(3): 579-601. doi: 10.1080/10408398.2014.900474.
- Sanzani, S. M., Reverberi, M., Geisen, R. (2016) Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination. *Postharvest Biol. Technol*, 122: 95–105. [CrossRef]
- Scherm, B., Orrù, M., Balmas, V., Spanu, F., Azara, E., Delogu, G., Migheli, Q. (2011) Altered trichothecene biosynthesis in TRI6-silenced transformants of *Fusarium culmorum* influences the severity of crown and foot rot on durum wheat seedlings, *Molecular plant pathology*, 12(8): 759-771.
- Shi, Z., Shouguo S., et al. (2008) *Fusarium graminearum* growth inhibition due to glucose starvation caused by osthol, *International Journal of Molecular Sciences*, 9: 371-381.
- Smiley, R. W., Collins, H. P., Rasmussen, P. E. (1996) Diseases of wheat in long-term agronomic experiments at Pendleton, Oregon, *Plant Disease*, 80(7): 813-820.
- Snijders, C. H. A., Perkowski, J. (1990) Effects of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels, *Phytopathology*, 80: 566–570
- Stack, R. W., McMullen, P. (1985) Head blighting potential of *Fusarium* species associated with spring wheat heads, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 7: 79-82
- Starkey, D. E., Ward, T. J., Aoki, T., Gale, L. R. Et al. (2007) Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity, *Fungal Genet. Biol.* 44:1191-1204
- Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, (2008) *Zirai Mücadele Teknik Talimatları*, 1: 24-25-26
- Tenorio-Salgado, S., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., Caballero-Mellado, J., and Perez-Rueda, E. (2013) Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered*, 4(4): 236-243.
- Terao, D., Nechet, K., Ponte, S. M., Maia, N. A., Anjos, D. A. V., Halfed- Viera A. B. (2017) Physical postharvest treatments combined with antagonistic yeast on the control of orange green mold. *Sci Hortic*, 224: 317-323. doi: 10.1016/j.scienta.2017.06.038

Tiryaki, O., Canhilal, R., and Horuz, S. (2010) Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi, 26(2): 154-169.

Toth, B., Mesterhazy, A., et al. (2004) Mycotoxin production and molecular variability of European and American isolates of *Fusarium culmorum*. European Journal of Plant Pathology, 110: 587-599

Toh, S. C., Samuel, L., and Awang, A. S. A. H. (2016) Screening for antifungal-producing bacteria from *Piper nigrum* plant against *Phytophthora capsici*. International Food Research Journal, 23(6).

Trail, F. (2009) For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era, Plant Physiology, 149: 103-110.

Trail, F., Xu, J. R., et al. (2003) Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*), Fungal Genet Biol 38(2):187–197

Tufan, A.F. (2016) Arpada *Fusarium culmorum* enfeksiyonuna dayanıklılığın gen anlatımı düzeyinde analizi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, (Danışman: Prof. Dr. Filiz GÜREL).

Tufan, F., Uçarlı, C., Tunalı, B., and Gürel, F. (2017). Analysis of early events in barley (*Hordeum vulgare* L.) roots in response to *Fusarium culmorum* infection. European Journal of Plant Pathology, 148(2): 343-355.

Tunalı, B., Ozseven, I., Buyuk, O., Erdurmus, D., and Demirci, A. (2006a) *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.

Tunalı, B., Nicol, J., Erol, F. Y., and Altıparmak, G. (2006b) Pathogenicity of Turkish crown and head scab isolates on stem bases on winter wheat under greenhouse conditions. Plant Pathology Journal, 5(2): 143-149.

Türkiye İstatistik Kurumu, TÜİK. (İnternet adresi: <https://www.tuik.gov.tr> , Son Erişim; 25.12.2020)

Turabi, M.S., Bitki Koruma Ürünlerinin Ruhsatlandırılması. Tarım İlaçları Kongre 168 Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 26(2): 154-169 (2010) ve Sergisi,

TMMOB Zir. Müh Odası ve TMMOB Kimya Müh Odası, Bildiriler Kitabı, s:50-61: 25-26 Ekim 2007. 2

Uluhan, E., Keleş, E. N. and Tufan, F. (2019) Analysis of WRKY transcription factors in barley cultivars infected with *Fusarium culmorum*. Int. J. Life Sci. Biotechnol, 2: 165-174.

Vary, P.S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W.D. and Jahn, D. (2007) *Bacillus megaterium* from simple soil bacterium to industrial protein production host. Applied microbiology and biotechnology, 76:5, 957-967.

Wallwork, H. (2000) Cereal Root and Crown Diseases, Grains Research and Development Corporation, Kingston, Australia

Walter, S., Nicholson, P., and Doohan, F. M. (2010) Action and reaction of host and pathogen during Fusarium head blight disease. *New Phytologist*, 185(1): 54-66.

Wang, H., Yan, Y., Wang, J., Zhang, H., Qi, W. (2012) Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *Plos One*, 7,1: 1-7.

Zalila-Kolsi, I., Mahmoud, A. B., Ali, H., Sellami, S., Nasfi, Z., Tounsi, S., and Jamoussi, K. (2016) Antagonist effects of *Bacillus* spp. strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum). *Microbiological research*, 192: 148-158.

Zhao, Y., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., ... and Liu, Y. (2014) Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PloS one*, 9(3).

Zheng, M., Shi, J., Shi, J., Wang, Q. and Li, Y. (2013) Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangoses. *Biol Control* 65: 200–206

9. ÖZGEÇMİŞ

İhlas İlköğretim Okulu'nu Yüksek Başarı ile bitirdi. İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü Onur Derecesi ile tamamladı. Lisans eğitimi süresince İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Bitki Patolojisi Laboratuvarında Doç. Dr. Emre Yörük ile çeşitli çalışmalarda aktif olarak rol aldı. Bu çalışmalar neticesinde uluslararası hakemli yayın, sözlü sunum ve poster sunumu bulunmaktadır. Lisans eğitim döneminde birçok sosyal aktivitelere katıldı, Biyoteknoloji Kulübü başkanlığı ve aynı zamanda okul konseyinde Kulüpler Birliği Yönetim Kurulu üyeliği yaptı. Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Tezli Yüksek Lisans Programına başladı. Haliç Üniversitesi Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarında Dr. Öğretim Üyesi Ayşe Feyza Tufan Dülger'in içerisinde bir adet TÜBİTAK desteğinde bulunan çeşitli projelerine katıldı. Yüksek lisans eğitim süresince uluslararası ve ulusal hakemli yayınları bulunmaktadır. Bitki doku kültürü, bitki patolojisi, bitki gen aktarımı, bitki abiyotik stresi, mikrobiyoloji, hayvan hücre kültürü alanlarında eğitim aldı, bir kısmı ile laboratuvarında aktif çalıştı. Moleküler alanda birçok biyoistatistik programı kullanmayı öğrenmiştir; GraphPad5, Chromas2, GelQuant, Mega6, MVSP, DNA Dragon, Gelanalyzer2010 programlarını çok iyi kullanmaktadır.

YAYINLAR

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

- Ebru Uluhan, **Esra Nur Keleş**, Feyza Tufan, "Analysis of WRKY Transcription Factors in Barley Cultivars Infected with *Fusarium culmorum*", August,2019, International Journal of Life Sciences and Biotechnology.
- Emre Yörük, **Esra Nur Keleş**, Özlem Sefer, Mehmet Eraslan, "Salinity and Drought Stress on Barley and Wheat Cultivars Planted in Turkey", October 2018, Journal of Environmental Biology.

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

- Feyza Tufan, **Esra Nur Keleş**, "Genom Düzenleme Teknolojileri ve Bitkilerdeki Uygulamaları", Mart,2019, Haliç Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi
- Feyza Tufan, **Esra Nur Keleş**, Özlem Sefer, Mehmet Eraslan, Sena Sefalı, Özge. 2020. "Determining WRKY transcription factors related to salinity stress response in wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.)" Şubat, 2020, Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi, 35(1), 1-7.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceeding) Basılan Bildiriler

- Özlem Sefer, Mehmet Eraslan, Sena Sefalı, **Esra Nur Keleş**, Özge Güngör, Feyza Tufan, Emre Yörük, “Determining WRKY Transcription Factors Related to Salinity Stress Response in Wheat (*Triticum aestivum* L.)”, European Conference on Science, Art & Culture, April 2018, Antalya, S:12
- Emre Yörük, **Esra Nur Keleş**, Özlem Sefer, Mehmet Eraslan, “Salinity and Drought Stress Investigations on Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars Planted in Turkey”, International Natural and Health Science Conference (INHSC2017), October 2017, Antalya, S:218-220

Devam Eden Çalışmalar

- Buğday (*Triticum aestivum* L.) ve Arpa (*Hordeum vulgare* L.)’da Tuz ve Kuraklık Stres Tepkisi ile ilgili Mikrosatalit Transkripsiyon Faktörlerinin Belirlenmesi (İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi- Haliç Üniversitesi)
- *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis* ve *Pseudomonas putida* Bakterilerinde Tür Tanısı (Haliç Üniversitesi)
- *Bacillus thuringiensis* ve *Pseudomonas putida*’ nın *Fusarium* Türlerinde Antagonistik Etkisinin İncelenmesi (Haliç Üniversitesi)
- *Pseudomonadales* TaeBurcu001 *Fusarium* Türlerinde Antagonistik Etkisinin İncelenmesi ve *Fusarium* Türleri ile Enfekte Olmuş Buğday (*Triticum aestivum* L.) ile Arpa (*Hordeum vulgare* L.) da Bitki Büyüme Desteğinin İncelenmesi (Haliç Üniversitesi)
- Antifungal Etkisi Olan Camphor Kimyasalının Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Bitkisinin Gelişimi Üzerindeki Etkisi (Haliç Üniversitesi)
- Morfolojik Karakterizasyonu Yapılmış Trabzon Hurması (*Diospyros kaki* L.) Çeşit/Genotiplerinin SSR Markörleri ile Moleküler Karakterizasyonu (Haliç Üniversitesi- Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü)