



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



ENDOFİT *FUSARIUM* TÜRLERİNDEN SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ

Yüksek Lisans Tezi

Gözde DURMUŞ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

ENDOFİT *FUSARIUM* TÜRLERİNDEN SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ

Gözde DURMUŞ

Danışman : Prof. Dr. Rengin ELTEM

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

İzmir
2022

Gözde Durmuş tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Endofit *Fusarium* türlerinden sekonder metabolit üretimi**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 19/09/2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Rengin Eltem	
Raportör Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Havva Dinler	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi İsmail Hakkı Akgün	

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Endofit *Fusarium* türlerinden sekonder metabolit üretimi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

19/09/2022

Gözde DURMUŞ



ÖZET**ENDOFİT *FUSARIUM* TÜRLERİNDEN SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ**

DURMUŞ, Gözde

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Rengin ELTEM

Eylül 2022, 112 sayfa

Yaşamlarının bir kısmını veya tamamını bitki dokularında sürdüren fakat herhangi bir hastalığa neden olmayan endofit *Fusarium* türleri, pek çok sekonder metabolitin üretiminde yer almaktadır. *Fusarium*’ların keşfinden günümüze kadar yaklaşık 700 adet sekonder metabolit ürettikleri bildirilmiştir. *Fusarium* türleri tarafından üretilen toksinlerden biri olan fusarik asit anti-hipertansif, anti-viral, insektisidal ve herbisidal aktivite göstermesi sebebiyle ilgi çekmektedir. Bu tez çalışmasında patojen olmayan endofit *Fusarium* türlerinde fusarik asit üretimi incelenmiştir. Fusarik asitin gösterdiği herbisidal aktivite sayesinde, bu çalışmanın biyoherbisitlerin geliştirilebilmesi için literatüre katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

Çalışmada, farklı lokasyonlardan toplanan ayrık otundan (*Agropyron repens*) ve canavar otundan (*Orobancha spp.*) yapılan izolasyonla *Fusarium* izolatları elde edilmiştir. Patojen özelliklerinin belirlenmesi için endofit *Fusarium* izolatlarına PDA plağında, nohut bitkisi (*Cicer arietinum*) üzerinde patojenite testi yapılmıştır. Patojen olmayan izolat/suşların eldesinin ardından fusarik asit üreticisi olanların seçilmesi için sıvı kültürde Czapek Dox ve M1-D besin ortamlarında biyokütle üretimi yapılmıştır. Katı kültür ortamında üretim ise pirinç kültür ortamında üretim yapılmıştır. Tamamlanan üretimlerin ardından elde edilen kültür ortamları filtre edildikten sonra

kloroform ve etil asetat ile ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Ekstraktlarda fusarik asit varlığının incelenmesi için iki farklı sistem kullanılarak TLC (İnce Tabaka Kromatografisi) ve RP (ters faz) TLC plakada analizler yapılmıştır. Son olarak fusarik asit üreticisi olduğu belirlenen suş/izolatların ekstraktlarında HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) analiziyle en yüksek fusarik asit üreticisi olan suş/izolat belirlenmiştir.



Anahtar Kelimeler: *Fusarium* spp., fusarik asit, sekonder metabolit, fitotoksin, endofit, endofit fungus

ABSTRACT**PRODUCTION OF SECONDER METABOLITE FROM ENDOPHYTE
FUSARIUM SPECIES**

DURMUŞ, Gözde

M.S. in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Rengin ELTEM

September 2022, 112 page

Endophyte *Fusarium* species, which live some or all of their lives in plant tissues but do not cause any disease, are involved in the production of many secondary metabolites. *Fusarium* species have been reported to produce approximately 700 secondary metabolites since their discovery. Fusaric acid, one of the toxins produced by *Fusarium* species, attracts attention due to its anti-hypertensive, anti-viral, insecticidal and herbicidal activity. In this thesis, the production of fusaric acid in non-pathogenic endophyte *Fusarium* species was investigated. Thanks to the herbicidal activity of fusaric acid, it is aimed that this study will be a step in the studies to be used in weed control.

In the study, *Fusarium* isolates were obtained by isolation from couch grass (*Agropyron repens*) and broomrape (*Orobanche* spp.) collected from different locations. To determine the pathogenic characteristics, pathogenicity test was performed on the endophyte *Fusarium* isolates on the PDA plate and on the chickpea plant (*Cicer arietinum*). After obtaining non-pathogenic isolates/strains, biomass production was carried out in liquid culture in Czapek Dox and M1-D nutrient media to select those producing fusaric acid. Production in solid culture medium, on the other hand, was produced in rice culture medium. After the completed productions, the culture media obtained were filtered and extracted with

chloroform and ethyl acetate. In order to examine the presence of fusaric acid in the extracts, analyzes were performed on TLC (Thin Layer Chromatography) and RP (reverse phase) TLC plates using two different systems. Finally, the strain/isolate that was the highest producer of fusaric acid was determined by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) analysis in the extracts of the strains/isolates determined to be fusaric acid producers.



Key words: *Fusarium* spp., fusaric acid, seconder metabolite, phytotoxin, endophyte fungus

ÖNSÖZ

Sekonder metabolit üretiminde önemli bir yere sahip olan endofit *Fusarium* türleri bu alanda bir biyosentetik makine olarak görülebilmektedir. *Fusarium* türlerinin ürettiği toksinlerden biri olan fusarik asit güçlü farmakolojik aktiviteleri ve gösterdiği herbisidal aktivite ile dikkat çekmektedir. Bu tez çalışmasının temel amacı patojen olmayan endofit *Fusarium* suş/izolatlarında fusarik asit üretiminin belirlenmesidir.

Tez süresince saygıdeğer hocalarımla yardım ve destekleriyle deney tasarımları gerçekleştirilmiş, tasarlanan deneyler uygulanmış ve elde edilen verilerin analizi tamamlanmıştır.

Tez çalışmamı “TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlar Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı” kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İZMİR
19.09.2022

Adı-Soyadı
Gözde DURMUŞ

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	vii
ABSTRACT	viii
ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
TABLolar DİZİNİ	xxii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 <i>Fusarium</i> spp.....	4
2.2 Endofitler	7
2.3 Sekonder Metabolitler	9
2.3.1 Terpenler	11
2.3.2 Alkoloidler	11

2.3.2 Fenolik Bileşikler	11
2.4 <i>Fusarium</i> Türlerinin Ürettiği Sekonder Metabolitler.....	12
2.4.1 Deoksinivalenol	15
2.4.2 Zearalenon	16
2.4.3 T-2 ve HT-2 Toksin.....	17
2.4.4 Fumonisinler	18
2.4.5 Fusarik Asit.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1 Gereç	22
3.1.1 Mikroorganizmalar	22
3.1.2 Kullanılan Besiyerleri.....	25
3.1.2.1 Rose Bengal-Gliserin-Üre Besiyeri (RbGU)	25
3.1.2.2 Pepton PCNB (Pentokloronitrobenzen) Besiyeri.....	25
3.1.2.3 Patates Dekstroz Agar (PDA)	26
3.1.2.4 Czapek Dox Besiyeri.....	26

3.1.2.5 M-1 D Besiyeri.....	27
3.1.2.6 Piriç Ortamı	28
3.1.3 Kullanılan Çözeltiler.....	29
3.1.3.1 PCNB Çözeltisi	29
3.1.3.2 %5'lik Kloramfenikol Çözeltisi	29
3.1.3.3 0,2 M'lık Hidroklorik Asit (HCl) Çözeltisi	29
3.1.3.4 %1'lik HgCl ₂ (Cıva (II) Klorür) Çözeltisi.....	29
3.1.3.5 %5'lik Sülfürik Asit Çözeltisi	29
3.1.3.6 1000 ppm'lik Fusarik Asit Çözeltisi.....	30
3.1.3.7 500 ppm'lik Fusarik Asit Çözeltisi.....	30
3.1.3.8 250 ppm'lik Fusarik Asit Çözeltisi.....	30
3.1.3.9 100 ppm'lik Fusarik Asit Çözeltisi.....	30
3.1.3.10 50 ppm'lik Fusarik Asit Çözeltisi.....	30
3.1.3.11 25 ppm'lik Fusarik Asit Çözeltisi.....	31
3.1.3.12 10 ppm'lik Fusarik Asit Çözeltisi.....	31

3.1.3.13 %1'lik Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4) Çözeltisi	31
3.1.4 Kullanılan Cihazlar	31
3.1.4.1 Hassas terazi.....	31
3.1.4.2 Isıtıcılı manyetik karıştırıcı.....	31
3.1.4.3 Otoklav	31
3.1.4.4 Pastör fırını	32
3.1.4.5 Vorteks	32
3.1.4.6 İnkübatör.....	32
3.1.4.7 Buzdolabı.....	32
3.1.4.8 Işıklı mikroskobu	32
3.1.4.9 pH metre	32
3.1.4.10 Evaporatör.....	33
3.1.4.11 Ultrasonik Banyo	33
3.1.4.12 254/366 nm UV Işık Kabini.....	33
3.1.4.13 Blender.....	33

3.1.4.14 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	33
3.2 Yöntem	34
3.2.1 Endofit <i>Fusarium</i> İzolasyonu Amacıyla Örneklerin Alınması ve Laboratuvara Getirilmesi.....	34
3.2.2 Örneklerden <i>Fusarium spp.</i> İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	34
3.2.3 <i>Fusarium</i> İzolatlarının Mikroskopik Olarak İncelenmesi	35
3.2.4 <i>Fusarium</i> İzolatlarının Saklanması	35
3.2.4.1 <i>Fusarium</i> İzolatlarının Yatık Agarlı Tüplerde Saklanması	35
3.2.4.2 <i>Fusarium</i> İzolatlarının Toprakta Saklama Yöntemi ile Saklanması.....	35
3.2.5 <i>Fusarium</i> İzolatlarının Patojenite Testi Yapılması.....	37
3.2.5.1 Patojenite Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	37
3.2.6 Patojen Olmayan Endofit <i>Fusarium</i> İzolatlarında Fusarik Asit Üretiminin İncelenmesi.....	39
3.2.6.1 Patojen Olmayan Endofit <i>Fusarium</i> İzolatlarından Sıvı Kültürde Fusarik Asit Üretimi	39
3.2.6.2 Patojen Olmayan Endofit <i>Fusarium</i> İzolatlarının Kültür Sıvılarında İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması	40
3.2.6.2.1 Biyokütle Miktarının Belirlenmesi.....	40
3.2.6.2.2 Kültür Filtratlarından Fusarik Asit Ekstraksiyonu	42

3.2.6.2.3 İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması	43
3.2.6.2.4 Ters Faz (RP) İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması	44
3.2.6.3 Patojen Olmayan Endofit <i>Fusarium</i> İzolatlarından Katı Kültürde Fusarik Asit Üretimi	45
3.2.6.4 Patojen Olmayan Endofit <i>Fusarium</i> İzolatlarının Katı Kültür Ortamında İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması	45
3.2.6.4.1 Kültür Filtratlarından Fusarik Asit Ekstraksiyonu	45
3.2.6.4.2 İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması	46
3.2.6.5 Patojen Olmayan Endofit <i>Fusarium</i> İzolatlarında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Fusarik Asit Üretiminin Belirlenmesi	47
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	49
4.1 Örneklerden <i>Fusarium spp.</i> İzolasyonu ve Saflaştırılması	49
4.2 <i>Fusarium</i> İzolatlarının Mikroskopik Olarak İncelenmesi	50
4.3 <i>Fusarium</i> İzolatlarının Saklanması	51
4.3.1 <i>Fusarium</i> Suş/İzolatlarının Yatık Agarlı Tüplerde Saklanması	51
4.3.2 <i>Fusarium</i> Suş/İzolatlarının Toprakta Saklama Yöntemi ile Saklanması	51
4.4 <i>Fusarium</i> İzolatlarına Patojenite Testi Yapılması	52
4.5 Patojenite Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	52

4.6 Patojen Olmayan Endofit <i>Fusarium</i> İzolatlarında Fusarik Asit Üretiminin İncelenmesi.....	56
4.6.1 Patojen Olmayan Endofit <i>Fusarium</i> İzolatlarından Sıvı Kültürde Fusarik Asit Üretimi	56
4.6.2 Patojen Olmayan Endofit <i>Fusarium</i> İzolatlarının Kültür Sıvılarında İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması	57
4.6.2.1 Biyokütle Miktarının Belirlenmesi.....	57
4.6.2.2 Kültür Filtratlarından Fusarik Asit Ekstraksiyonu	60
4.6.2.3 İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması.....	60
4.6.2.4 Ters Faz (RP) İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması	63
4.6.3 Patojen Olmayan Endofit <i>Fusarium</i> İzolatlarından Katı Kültürde Fusarik Asit Üretimi	67
4.6.4 Patojen Olmayan Endofit <i>Fusarium</i> İzolatlarından Katı Kültürde İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması	67
4.6.4.1 Kültür Filtratlarından Fusarik Asit Ekstraksiyonu	67
4.6.4.2 İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması	68
4.6.5 Patojen Olmayan Endofit <i>Fusarium</i> İzolatlarının Kültür Ortamında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Fusarik Asit Üretiminin Belirlenmesi.....	68

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	72
KAYNAKLAR DİZİNİ	74
TEŞEKKÜR	89
ÖZGEÇMİŞ.....	90
EKLER.....	91



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Fusarium oxysporum</i> makrokonidi (a), makrokonidi ve mikrokonidi (b) mikrokonidi (c) klamidospor (d) görüntüsü.....	13
Şekil 2.2 Deoksinivalenolün kimyasal yapısı	18
Şekil 2.3 ZEA'nın kimyasal yapısı	19
Şekil 2.4 ZEA'nın türevlerinin kimyasal yapısı	19
Şekil 2.5 Fumonisinlerin A, B ve C gruplarının kimyasal yapısı	21
Şekil 2.6 Fusarik asitin kimyasal yapısı.....	22
Şekil 2.7 Fusarik asit uygulaması yapılan ve yapılmayan <i>O. ramosa</i> tohumlarının çimlenme yüzdesi.....	23
Şekil 3.1 Spor süspansiyonu hazırlamak için erlenlerde yatık şekilde katılaştırılmış PDA besiyeri.....	36
Şekil 3.2 Toprakta saklama yöntemi ile liyofilizasyon şişesinde saklanan <i>Fusarium</i> sp. Sus6T-4 numaralı izolat	36
Şekil 3.3 Patojenite testi sonucu nohut tohumlarında oluşan lezyonlar ve skala değerleri.....	38
Şekil 3.4 M-1 D ve Czapek Dox besiyerlerinde üretimleri tamamlanmış olan <i>Fusarium</i> sp. Ş7T-18 ve <i>Fusarium</i> sp. Ş3T-5 numaralı izolatlar	40
Şekil 3.5 <i>Fusarium</i> sp. Y1T-17 numaralı izolatın misel kütlelerinin filtre kağıdı ile süzülerek uzaklaştırılması	41

Şekil 3.6 <i>Fusarium</i> sp. Sus3T-3 numaralı izolatın misel kütlesinin kuru ağırlığının ölçülmesi	42
Şekil 3.7 Örnekleri yüklenmiş ve çözgen takında yürütülmüş TLC plaka	47
Şekil 4.1 <i>Fusarium</i> sp. Suş1T-1 kodlu izolatın (a) <i>Fusarium</i> sp. Y6T-8 kodlu izolatın (b) <i>Fusarium</i> sp. Ş6T-19 kodlu izolatın (c) <i>Fusarium</i> sp. Ş3T-5 kodlu izolatın (d) PDA plağındaki görüntüsü	49
Şekil 4.2 <i>Fusarium</i> sp. 163-A.4 kodlu izolatın mikrokonidi yapısı (a), <i>Fusarium</i> sp. 175-A.5 kodlu izolatın makrokonidi yapısı (b), <i>Fusarium</i> sp. 79-A.2 kodlu izolatın klamidospor yapısı (c), <i>Fusarium</i> sp. 46-O.1 kodlu izolatın mikrokonidi yapısı (d).....	50
Şekil 4.3 Patojenite testinde herhangi bir izolata maruz bırakılmamış pozitif kontrol grubu	53
Şekil 4.4 <i>Fusarium</i> sp. 129-A.3 kodlu izolatın patojenite testi sonuçları	53
Şekil 4.5 Altı adet <i>Fusarium</i> suşu ile Czapek Dox ve M1-D besiyerlerinde yapılan üretimler sonrası TLC plakadaki fusarik asit analizi.....	61
Şekil 4.6 FA standartı ile birlikte TLC plakalara yüklenmiş ve yürütülmüş örneklerin UV kabininde 254 nm’de görüntüsü	62
Şekil 4.7 FA standartı ile birlikte TLC plakalara yüklenmiş ve yürütülmüş örneklerin UV kabininde 254 nm’de görüntüsü	63
Şekil 4.8 FA standartı ile birlikte TLC plakalara yüklenmiş ve yürütülmüş örneklerin UV kabininde 254 nm’de görüntüsü	63

Şekil 4.9 RP TLC plakalara yüklenmiş ve yürütülmüş FA standardının UV kabininde 254 nm’de görüntüsü..... 65

Şekil 4.10. FA standardı (en solda) ile birlikte RP TLC plakalara yüklenmiş ve yürütülmüş ekstraktların UV kabininde 254 nm’de görüntüsü..... 66

Şekil 4.11. FA standardı ile birlikte RP TLC plakalara yüklenmiş ve yürütülmüş ekstraktların UV kabininde 254 nm’de görüntüsü 66

Şekil 4.12. FA standardı (en solda) ile birlikte TLC plakalara yüklenmiş ve yürütülmüş *Fusarium* sp. 32, *Fusarium* sp. 39, *Fusarium* sp. 60, *Fusarium* sp. 168, *Fusarium* sp. 176 ve *Fusarium* sp. 76-b kodlu ekstraktların UV kabininde 254 nm’de görüntüsü 68

Şekil 4.13 FA standardı (50 ppm) ile birlikte *Fusarium* sp. Ş2T-1 kodlu izolatin (50 mg/ml) fusarik asit analizi..... 71

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. <i>Fusarium</i> türleri tarafından üretilen bileşikler ve biyoaktiviteleri	12
Tablo 3.1 Patojen olmayan <i>Fusarium</i> 'ların izolasyonunda kullanılan numunelerin özellikleri	22
Tablo 3.2. Fusarik asit üretiminde kullanılan <i>Fusarium</i> suşlarının özellikleri ...	23
Tablo 3.3. Fusarik asit üretiminde kullanılan patojen olmayan <i>Fusarium</i> izolatları	24
Tablo 3.4. RbGU besiyeri içerikleri.....	25
Tablo 3.5 Pepton PCNB besiyeri içerikleri.....	26
Tablo 3.6 Czapek Dox besiyeri içerikleri	27
Tablo 3.7 M-1 D besiyeri içerikleri.....	28
Tablo 3.8 Hastalık şiddetinin değerlendirilmesinde kullanılan tanımsal skala	38
Tablo 4.1 <i>Fusarium</i> izolatlarının, kökçüklerde meydana getirdiği lezyonların ortalama skala değerleri ve hastalık şiddeti (%).....	54
Tablo 4.2 <i>Fusarium</i> izolat/suşlarının Czapek Dox ve M1-D besiyerindeki üretim sonrası misel kütlesi kuru ağırlığının ortalaması.....	57

Tablo 4.3 t-Test iki örnekle yapılan istatistiksel analiz sonuçları.....	58
--	----

Tablo 4.4 Patojen olmayan endofit <i>Fusarium</i> izolatlarının Czapek Dox besiyerindeki üretim sonrası misel kütlesi kuru ağırlıklarının ortalaması	59
--	----

Tablo 4.5. TLC plaka analizi ile fusarik asit üreticisi olduğu belirlenen izolat/suşların yeniden yapılan üretimlerinde balonda kalan örnek miktarı (mg) ve örneklerle eklenen metanol hacmi (ml)	64
---	----

Tablo 4.6. Fusarik asit ürettiği belirlenen izolat/suşların üç kez tekrarlanan analiz sonuçları, analizlerin ortalaması, standart sapma değeri, toplam ekstre edilmiş fusarik asit kütlesi (µg) ve ekstrakttaki fusarik asit yüzdesi (%)	70
--	----

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar	Açıklama
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
cm ³	Santimetre Küp
μ	Mikro
G	Gram
μg	Mikrogram
ml	Mikrolitre
Mm	Milimetre
L	Litre
mL	Mililitre
Dk	Dakika
pH	Hidrojen Gücü
Ppm	Milyonda Bir
W	Ağırlık (Weight)
V	Hacim (Volume)
UV	Ultraviyole
RbGU	Rose Bengal-Gliserin-Üre

PDA	Patates Dekstroz Agar (Potato Dextrose Agar)
TWA	Tap Water Agar
PCNB	Pentokloronitrobenzen
HCL	Hidroklorik Asit
FA	Fusarik Asit
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromatography)
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
ZEA	Zearalenon
DON	Deoksinivalenol
NIV	Nivalenol
FUS	Fusarenon
α	Alfa
B	Beta
Yy	Yüzyıl



1. GİRİŞ

Dünya nüfusu günümüzde hızla artmakta ve bu artış besin yetersizliği sorununu beraberinde getirmektedir. Artan Dünya nüfusu karşısında yeni tarım alanları açılmamakla birlikte erozyon, yeni sanayi bölgeleri ve yerleşim yerlerinin açılması gibi nedenlerle tarım arazileri giderek azalmaktadır. Günümüzde devletleri uğraştıran en önemli sorunlardan biri hızla artan dünya nüfusu karşısında ortaya çıkan besin yetersizliği problemidir. Bu probleminin etkilerinin azaltılması için kültür bitkilerinin yetiştiriciliğinde mevcut tarım arazilerinden maksimum düzeyde verim alınabilmesi gerekmektedir. Tarım arazilerinde maksimum düzeyde verim alınabilmesi için kültür bitkilerinde önemli verim kayıplarına sebep olan hastalık, zararlı ve yabancı otların mücadelesinde her geçen gün önemli adımlar atılmakta ve yeni teknikler geliştirilmektedir (Mengüç vd., 2014).

Kültür bitkilerinde önemli verim kayıplarına sebep olan yabancı otların kontrolü, tarım arazilerinden maksimum verimin alınmasında karşılaşılan sorunların başında gelmektedir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre, yabancı otların kültür bitkilerinde sebep olduğu verim kayıplarının yıllık oranı %10-15 arasında değişmektedir (Huang et al., 2020). Yabancı otların mücadelesinde, uygulamasının kolay olması ve diğer yöntemlere göre ucuz olması nedeniyle daha çok kimyasal mücadele metotları tercih edilmektedir. Fakat kimyasal herbisitlerin (tarımsal üretimde verim ve kaliteyi artırmak amacıyla yabancı ot kontrolünde kullanılan kimyasallar) kullanım sıklığına bağlı olarak toprakta, suda ve gıda maddelerinde kalıntı sorunu oluşmakta, hedef dışı organizmalar olumsuz yönde etkilenmekte ve çevre kirliliği sorunları artmaktadır. Kültür bitkilerinde kalıntı sorunu yaşanması insan sağlığı açısından çeşitli sorunları beraberinde getirmektedir. Bu sorunlara ek olarak yabancı otların herbisitlere karşı dayanıklılık oluşturmaları da son yıllarda karşılaşılan önemli sorunlardan biridir (Uysal, 2011). Günümüzde kimyasal mücadele yöntemleri yerini biyoherbisitlere (yabancı otların kontrolü için kullanılan doğa orijinli ürünler) bırakmıştır. Biyolojik mücadele yöntemleri diğer yöntemler ile

karşılaştırıldığında; doğal dengeyi korunması, etki oranının yüksek olması, kaliteli ve ilaç kalıntısı olmayan ürün elde edilmesi gibi avantajlara sahiptir.

Sekonder metabolit (metabolizma faaliyetlerinde primer metabolitlerin dönüştürülmesi ile oluşan, eksponansiyel fazın sonunda üretilen metabolitler) üretiminde oldukça önemli bir yeri olan funguslar, zengin bir doğal ürün üretme potansiyeline sahiptir (Zhang et al., 2019; Carroll et al., 2020; Blunt et al., 2018; Lam et al., 2007; Zhang et al., 2018). Bu funguslardan biri olan ve doğada yaygın olarak bulunan *Fusarium* cinsi dikkate değer kimyasal çeşitlilikte, önemli biyoaktiviteler gösteren pek çok metabolit üretme potansiyeline sahiptir (Wei et al., 2020). *Fusarium* spp. enniatin, fumonisins, beauvericin, moniliformin, fusarik asit gibi pek çok sekonder metabolit üretmektedir (Bohni et al., 2016; Lopez-Diaz et al., 2018). Metabolit üretiminde, *Fusarium oxysporium* bu cinsin en çok karşılaşılan ve ekonomik açıdan en değerli olan türlerindendir (Wei et al., 2020).

Yatuba tarafından 1934 yılında keşfi gerçekleşen fusarik asit (5-bütülpikolinik asit) bir fitotoksindir ve *F. moniliforme*, *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. temperatum*, *F. thapsinum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum* ve *F. solani* tarafından üretilmektedir. Yapılan pek çok araştırma fusarik asidin; geniş spektrumlu doğal bir antibiyotik olduğunu, belirgin herbisidal aktivite sergilediğini (Capasso et al., 1996; Stipanovic et al., 2011), anti-hipertansif aktivite gibi önemli farmakolojik aktivitelere sahip olduğunu (Herskovits et al., 1973; Chase, 1974) ve daha pek çok alanda önemli etkiler sağlayabileceğini gözler önüne sermiştir.

Bu tez çalışmasında farklı lokasyonlardan toplanan ayrık otunun ve canavar otunun kökünden endofit *Fusarium* spp. izolasyonu yapılması ve ardından çalışmada kullanılan *Fusarium* izolat/suşlarının içerisinde patojen olmayanların belirlenmesi için patojenite testi yapılması amaçlanmıştır. Patojen olmayan izolat/suşlar arasından en yüksek fusarik asit üreticisi olan suş/izolatın belirlenmesi için, TLC plaka ile fusarik asit üreticisi olanların seçilmesi ve daha sonra HPLC metodu ile kantitatif fusarik asit analizi yapılması hedeflenmiştir. Bu tez çalışmasının nihai amacı patojen olmayan

endofit *Fusarium* suş/izolatlarında fusarik asit üretiminin belirlenmesidir. Ayrıca bu çalışmanın yabancı ot kontrolünde kullanılacak çalışmalara basamak olması hedeflenmektedir.



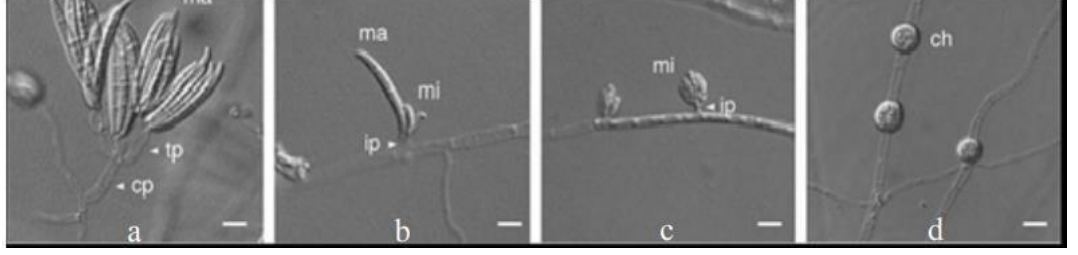
2. GENEL BİLGİLER

2.1 *Fusarium* spp.

Fusarium cinsi 1821 yılında Link ex Gray tarafından, Malamaceae bitkisinden *Fusarium roseum*'un tanımlanması ile keşfedilmiştir. 1821 yılından günümüze kadar 1000'den fazla *Fusarium* türü keşfedilmiştir (Wei et al., 2020). Bu cinsin taksonomisi uzun yıllar boyunca tartışma konusu olmuştur. 1935 yılında Wollenweber ve Reinking tarafından yayınlanan 'Die Fusarien' çeşitli araştırmacılar tarafından da temel alınan ilk eserdir. Bu eserde o tarihe kadar tanımlanan yaklaşık 1000 tür gruplandırılarak 65 tür, 55 varyete ve 22 form olarak 16 bölümde toplanmıştır. Bu bölümlerin ayırt edici kriterleri; i) mikrokonidinin mevcut olup olmaması, ii) makrokonidi şekli, iii) mikrokonidi şekli, iv) makrokonidinin bazal ve apeks hücrelerinin şekli, v) klamidosporun mevcut olup olmaması ve vi) klamidosporun terminal ve interkalarolarak oluşması olarak belirlenmiştir. Bölüm içerisindeki türlerin ayırt edilmesinde ise i) stroma rengi, ii) sklerotiumun mevcut olup olmaması, iii) makrokonidideki septa sayısı ve iv) makrokonidinin uzunluk ve genişliği temel alınmıştır.

Eşeysiz dönemine göre *Fusarium* olarak isimlendirilen bu cins Eumycota bölümü, Dutemycotina alt bölümü, Hyphomycetes sınıfı, Tuberculariales takımında yer almaktadır (Ainsworth et al., 1971). *Fusarium* türleri eşeyli dönemlerine göre ise; Eumycota bölümü, Ascomycotina alt bölümü, Pyrenomyetes sınıfı, Hypocreales takımında bulunmaktadır (Nelson et al., 1983).

Fusarium türleri makrokonidi, mikrokonidi ve klamidospor olmak üzere 3 çeşit spor üretebilmektedir (Şekil 2.1). Ancak 2 çeşit spor (mikrokonidi ve klamidospor) yapısıyla daha çok yayılmaktadır. Bunlardan mikrokonidi formu nekrotik dokularda bulunmakta ve hava akımıyla taşınabilmektedir. Klamidospor formu ise; uzun süre toprakta canlı kalabilmektedir (Ozbay and Steven, 2004).



Şekil 2.1. *Fusarium oxysporum* makrokonidi (a), makrokonidi ve mikrokonidi (b), mikrokonidi (c), klamidospor (d) görüntüsü (Tsuge ve Ohara, 2004; Ergün, 2014)

Genellikle bir veya iki bölmeli mikrokonidiler oval şekilde oluşurlar. Makrokonidiler üç veya beş hücreli olup kıvrık, eğik ve uca doğru sivrilen bir yapıdadır. Klamidosporlar ise bir ya da iki bölmeli olup yuvarlak kalın duvarlardan oluşan bir yapıya sahiptir. Klamidospor oluşumu incelendiğinde iki tip oluşum görülmektedir. Bunlardan birincisi, makrokonididen meydana gelen klamidosporlar, ikincisi ise miselin üstünde gelişen klamidosporlardır. Miselin üstünde gelişen klamidosporlar, miselin orta kısmında veya uçlarında yer alabilmektedir (Egel and Martyn, 2007). Bölmeli misellerin oluşturduğu kümelerin birleşmesi ile meydana gelen yapıya miselyum adı verilmektedir (Grün, 2003).

Fusarium türlerinde eşeysiz üreme konidiosporların aracılığıyla gerçekleşirken, eşeyli üreme ise gametangioğami ile gerçekleşir (Tutel ve Çırpıcı, 1999; Trail, 2009). Eşeyli üreme sürecinde erkek ve dişi misellerin kaynaşmasıyla oluşan askogen miselin olgunlaşmasının ardından çift çekirdekli askus oluşur. Askus hücresinde erkek ve dişi nükleuslar birleşerek zigotu oluştururlar. Zigotun mayoz bölünme geçirmesiyle haploid sayıda kromozom taşıyan dört nükleus oluşur ve bu nükleuslar mitoz bölünme ile sayılarını ikiye katlar. Ardından birbirinden ayrılan nükleuslar (askospor) olgunlaşır ve haploid döngüyü başlatırlar (Prescott et al., 1990; Tutel ve Çırpıcı, 1999).

Doğada yaygın olarak bulunan funguslardan biri olan *Fusarium* türleri dünyanın pek çok yerinde toprakta, suda ve çeşitli organik maddelerin üzerinde farklı formlarda yaşarlar (İbrahim et al., 2021). *Fusarium* cinsinin pek çok türünün habitatı topraktır ve saprofit özellikleri göstermektedir

(Larkin and Fravel, 1998; Patil et al., 2011). *Fusarium* türleri doğal yaşam alanları olan toprakta 40 cm'ye kadar derinlikte yaşayabilmektedir (Özer ve Soran, 1991; Strausbaugh et al., 2005). Çoğalması için ideal sıcaklık 24-32 °C ve pH değer aralığı 5-7'dir. *Fusarium* türleri temel besin maddelerini karbon kaynaklarından ve mineral tuzlarından sağlamaktadır. *Fusarium* cinsi genellikle nemli ve yarı nemli bölgelerde, düşük toprak nemine sahip, potasyumca zengin, azot ve fosforca fakir topraklarda gelişim göstermektedir (Bai and Shaner, 2004; Miedaner et al., 2008; Miedaner et al., 2013). Ayrıca 8 °C'de bile toksin üretebildikleri belirlenmiştir (Yörük ve Albayrak, 2014).

Fusarium türleri kültür bitkilerinde patojen olabildiği gibi, bitkilerin fillofer ve rizosfer bölgelerinde saprofit olarak yaşamını sürdürebilmektedir. Toprakta, saprofit olarak yaşayan çok sayıda *Fusarium* türü bulunmaktadır (Gordon and Martyn, 1997). Patojenite gösteren *Fusarium* türleri bitkide su ve mineral alımını engelleyerek bitki dokularında sararmaya ve solmaya sebep olmaktadır (Dilmaç vd., 2020).

İran'da 1999-2000 yıllarında *Fusarium* türlerinin şeker pancarında kök çürüklüğü ve solgunluk üzerine etkisini ortaya çıkarmak amacıyla yapılan çalışmada 168 *Fusarium* izolatı elde edilmiştir. Bu izolatların 42 adedi *F. solani*, 31 adedi *F. oxysporum*, 27 adedi *F. acuminatum*, 23 adedi *F. avenaceum*, 19 adedi *F. moniliforme*, 16 adedi *F. equiseti* ve 10 adedi ise *F. culmorum* olarak belirlenmiştir. *F. oxysporum* izolatlarının tamamı patojenite çalışmalarında kullanılmış ve sonuçta kullanılan *F.oxysporum* izolatlarının %38.7'sinin patojen olmadığı tespit edilmiştir (Dastjerdi et al., 2003).

Patojen olmayan *Fusarium* türleri patojenlerin aksine vasküler dokulara zarar vermemekte ve hastalık oluşturmamaktadır (Dilmaç vd., 2020). Patojen olmayan türlerin, *Fusarium* solgunluğuna karşı mücadelede en çok kullanılan etmenlerden olduğu bilinmektedir (Mandeel and Baker, 1991; Ogawa and Komada, 1985; Paulitz et al., 1987). Patojen olmayan *Fusarium* türlerinin muz, fesleğen, karanfil, hıyar, keten, kavun, domates, ıspanak, çilek ve karpuz dahil olmak üzere birçok kültür bitkisinde *Fusarium* solgunluğuna karşı mücadelede kullanıldığı görülmektedir (Dilmaç vd.,

2020). Yapılan çalışmada patojen olmayan *Fusarium* türleri domatestede patojen olan *Fusarium oxysporum*'a karşı sera koşullarında uyarıcı olarak denenmiştir. Patojen olmayan türün, patojen olan *Fusarium oxysporum*'a karşı biyolojik kontrolü (%10,7-69,6) önemli oranlarda sağladığı saptanmıştır (Yiğit vd., 2007).

2.2 Endofitler

Endofitler yaşamının bir parçasında bitki dokularında yerleşmiş olan fakat herhangi bir hastalığa neden olmayan mikroorganizma grubu olarak tanımlanmaktadır (Bacon and White, 2000). Endofit mikroorganizmalar bitkiye kök ve kotiledon bölgelerinden giriş yaparak buradan diğer dokulara yayılım göstermektedir (Kobayashi and Palumbo, 2000). Bu mikroorganizmalar yaşam süreleri boyunca zorunlu veya fakültatif endofit olabilirler. Bu durum endofitlerin tanımının net bir şekilde yapılmasına engel olmaktadır. Obligat yani zorunlu endofit olanlar konukçusuna bağımlıdır fakat fakültatif olanların böyle bir zorunluluğu yoktur (Beram vd., 2016).

Endofit funguslar, ilk olarak 19. yy'ın sonlarında Avrupalı araştırmacılar tarafından keşfedilmiştir. Bu keşiflerin ardından Bacon (1977), *Clavicipitaceae* familyasında bulunan endofitlerin, sığırlarda toksik madde oluşumuna neden olabileceğini bildirmiştir. Bundan sonraki çalışmalar endofitlere bağlı toksisite sendromlarının yaygınlaşarak, hayvancılık sektöründe önemli ekonomik zarara neden olabileceğini göstermiştir (Hoveland, 1993). Bu familyaya ait endofitler bitki fungus ilişkilerinin ilginç ve ekonomik olarak kayda değer örneklerinden olup, sebep olduğu zarar bakımından birçok endofit üzerinde araştırma yapılmasının da ilham kaynağı olmuştur. Diğer endofit grupları ile karşılaştırıldığında genellikle yanılığa sebep olan bu funguslar; mutualist yaşam şeklinin yanında birlikte evrim ihtimalini güçlendirmiş ve çoğu çalışmaya öncülük etmiştir (Bacon and White, 2000; Faeth and Fagan, 2002).

Dothideomycetes, *Sordariomycetes*, *Leotiomyces*, *Eurotiomycetes* ve *Pezizomycetes* gibi sınıflara ait üyeler çoğu bitkide baskın olarak bulunan

fungus endofit kolonilerini oluşturmaktadır (Jumpponen and Jones, 2009). Bu sınıfların yanında *Zygomycota* ve *Basidiomycota* üyeleri ve otlarda yaygın olarak görülen *Agaricales* takımının üyeleri de endofit olarak tanımlanmaktadır (Herrera et al., 2010; Khidir et al., 2010). Her bitki türü kendine özgü endofit kolonisine sahip olmakla birlikte, tek bir tropikal ağaç yaprağında bile 90'a yakın endofit tür bulunmaktadır (Bayman, 2006). Boreal ve arktik ekosistemlerde yetişen en baskın üç türün, 2 mm²'lik bir yaprak parçasında endofitik koloni oranı %1 ile %41 arasında değişim gösterdiği bilinmektedir. Tropikal ormanlarda bulunan yapraklı türlerde ise bu oran %90'a kadar ulaşmaktadır (Lodge et al., 1996).

Endofitlerin bir kısmı farklı dokular ile etkileşim içinde olmayıp, yaprakta sadece tek bir hücre ve doku içinde sınırlı kalabilmektedir (Stone, 1987). Bazıları ise konukçularına özelleşmiştir. Konukçuya özelleşmiş türlerin sayısının sabit olduğunu varsayarsak endofit türlerin sayısı bitki tür sayısı aracılığıyla tahmin edilebilmektedir (Bills, 1996; Hawksworth and Rossman, 1997). Bitki çeşitliliğinin tropik bölgelerde fazla olduğu düşünülünce endofit tür çeşitliliğinin belki de en fazla tropik bölgelerde olduğu varsayılabilir. Yapılan bir meta-analiz ile yaprak endofit çeşitliliğinin ılıman bölgelere oranla tropik bölgelerde daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır (Arnold, 2007). Bununla birlikte yapılan diğer bir çalışma, kök endofit çeşitliliğinin enlem ile beraber artış gösterdiğini bildirmektedir (Herrera, 2010). Bütün bunlar geniş coğrafik alanlarda endofitik fungus çeşitliliğinin değerlendirilebilmesi için daha kapsamlı araştırmalar yapılması gereğini ortaya koymuştur. Biyoçeşitliliğinin ve konukçu spesifikliğinin tanımlanmaya devam etmesi, endofitlerin önemini ve endofitlerle ilgili beklentileri gün geçtikçe arttırmaktadır.

Endofit fungus kolonileri aynı konukçu tür üzerinde farklı iklim, mevsim ve ortam şartlarında değişiklik göstermektedir (Gamboa et al., 2002). Mikrobiom kompozisyonu; konukçu, bitki sıklığı, besin durumu, çevre koşulları ve dış mikrobiomlar (toprak fungusları ve bakteriler) ile etkileşim gibi çok sayıda faktöre bağlı olup değişim her düzeyde görülebilmektedir. Aynı konukçu türde bulunan endofit fungus çeşitliliği, farklı ortam şartlarında

artabilir veya farklılık göstermeyebilir (Arnold and Herre, 2003; Herrera et al., 2010). Çeşitli çalışmalar bitkilerin endofit kolonizasyonlarının sıcaklık artışı, karbondioksit artışı, azot birikimi, uzun süreli kuraklık gibi iklim değişikliğinin çeşitli açılarından etkilendiğini göstermiştir (Kannadan and Rudgers, 2008). Aynı bitkide bulunan yapraklar, kökler ve odunsu dokular endofitik fungus çeşitliliği açısından büyük farklılıklar gösterebilmekte ve her biri diğerinden farklı işlevlere sahip olabilmektedir (Chaverri and Gazis, 2010; Gazis and Chaverri, 2010). Weber ve Anke'nin (2006) yapmış oldukları bir çalışmada yoncaların yaprak, kök ve gövdelerinde farklı sekonder metabolitler üreten birbirinden farklı endofit funguslar izole etmişlerdir. Bitki organlarındaki bu endofit çeşitliliği, dokular ve organlar arasındaki biyolojik farklılıkları da yansıtmaktadır (Porras-Alfaro and Bayman, 2011). Bu değişimlerin sebeplerinin ve işlevsel önemlerinin belirlenebilmesi için çok sayıda araştırmaya ihtiyaç vardır.

Bazı endofitler doğrudan ya da dolaylı olarak hastalıklara karşı kullanılan çeşitli bioaktif metabolitlerin sentezlenmesinde kullanılmaktadır (Kusari and Spiteller, 2012). Yapılan çalışmalar, endofitlerin ilaçların keşfinde önemli bir zemin oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır (Staniek et al., 2008). Sekonder metabolit üretmek için endofitlerin kullanıldığı patentlerin sayısı gözle görülür şekilde artmaktadır (Priti et al., 2009).

Yeni bileşiklerin keşfi için bol kaynak sunan endofit funguslar tıp, tarım, endüstri gibi önemli alanlarda geniş kullanım potansiyeli barındırmaktadır. Dünyadaki bitki çeşitliliği göz önüne alındığında yeni biyoaktif ürünler için endofit fungusların büyük bir kaynak oluşturabileceği açıkça görülmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar endofitlerin sahip olduğu potansiyelin oldukça umut verici olduğunu gözler önüne sermiştir.

2.3 Sekonder Metabolitler

Metabolizma faaliyetlerinin ara basamaklarında veya sonucunda oluşan metabolitler, kullanım önceliklerine göre primer ve sekonder metabolitler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Amino asitler, vitaminler,

şekerler, pürin ve pürimidin gibi primer metabolitler logaritmik fazda üretilen metabolik faaliyetlerde doğrudan yer alan bileşiklerdir. Sekonder metabolitler ise primer metabolizmada kullanılan bileşiklerin dönüştürülmesi ile ekspanansiyel fazın sonunda üretilen ürünleri kapsamaktadır (Calvo et al., 2002; Pelaez, 2005; Fox and Howlett, 2008; Brakhage and Schroeckh, 2011; Brakhage, 2013; Boruta, 2018). Canlıların büyümesinde ve gelişmesinde primer metabolitler gibi aktif yer almayan sekonder metabolitler her ne kadar geçmişte atık olarak değerlendirilselerde günümüzde pek çok sektörde değer arz eden küçük moleküler yapıları bileşiklerdir (Cantürk, 2015). Sekonder metabolitlere antibiyotikler, pigmentler, antitümör ajanlar, toksinler ve çeşitli ilaçlar örnek olarak gösterilmektedir (Demain, 1998).

Sekonder metabolitlerin keşfedilmesinden günümüze kadar en yaygın kullanım alanı antibiyotik üretimi ve keşifleri olmuştur (Spellberg, 2014). Bu alanda yeni keşifler günümüzde de devam etmektedir. Kimyasal yapıları ve etki mekanizmaları birbirinden çok farklı olan pek çok antibiyotik bilinmesine rağmen pek azı tıp alanında kullanılabilecek kadar düşük toksisite göstermektedir (Ruiz, 2010). Belirlenmiş yüzlerce antibiyotik arasında günümüzde antibiyotiklerin birçoğu *Penicillium*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Micromonospora* ve *Cephalosporium* cinslerine ait türlerden elde edilmektedir (Demain, 1998).

Özellikle son dönemlerde COVID-19 pandemisine sebebiyet veren, SARS-CoV-2 virüsünün proteaz enzimini inhibe etmek amacıyla enzim flebindeki önemli amino asitlerle etkileşime girebilmek için sekonder metabolitlerin kullanılabilmesi bu bileşiklerin önemini arttırmıştır (Mohammadi and Shaghghi, 2020).

Pek çok endüstriyel alanda ekonomik değer arz eden sekonder metabolitler biyosentetik kökenlerine göre terpenler, alkaloidler ve fenolik bileşikler olmak üzere üç temel gruba ayrılmaktadır.

2.3.1 Terpenler

Terpenler, sekonder metabolitlerin en büyük sınıfını oluşturmaktadır ve temel olarak beş karbonlu izoprenlerin birbirine çeşitli yollarla bağlanmasıyla meydana gelmektedir. Terpenler basit hidrokarbonlardır ve hidrokarbonlara ek olarak oksijen içeren terpenler de mevcuttur. Oksijen içeren bu gruba ‘terpenoidler’ adı verilmektedir. Terpenler kokuları sebebiyle kozmetik sektörü açısından değerli bileşikler içermektedir (Özkaya vd., 2018).

2.3.2 Alkaloidler

Alkaloidler (kokain, nikotin vb.) aktif azot içeren bazik bileşiklerdir ve ilk kez 1819 yılında farmakolog Carl Meissner tarafından keşfedilmiştir. Alkaloidlerin sık sık böceklerin savunma mekanizmasında yer aldığı görülmektedir. Alkaloidlerin savunma amacıyla kullanılmasına kanarya otu (*Senecio jacobaea*), ateş karıncaları (*Solenopsis invicta*), Amerikan lale ağacı (*Liriodendron tulipifera*) gösterilebilir. Bu mekanizmalarda kullanılan pirolizidin, aporfin ve kinolizidin alkaloidleri acı tat vermeleri, zehir etkisi göstermeleri gibi yollarla koruma sağlamaktadırlar (Tiring vd., 2020). Ayrıca alkaloidler insektisit olarak da kullanılmaktadır. Tütünde bulunan nikotin, günümüzde hala kullanılmaya devam edilen en etkili insektisitlerdendir.

2.3.3 Fenolik Bileşikler

Benzen halkasında bir veya birden fazla hidroksil grubu mevcut olan bileşik grubuna fenolik bileşikler denmektedir. Fenolik bileşiklerin üretiminde akla ilk gelen canlılar bitkilerdir. Bitkilerin genellikle yaralandıkları bölgelerde üretilip salgıladığı fenolik bileşikler havaya temas ettiğinde oksidasyona uğramakta ve mevcut bölgeyi kahverengiye boyamaktadır (Tiring vd., 2020). Bitkilerdeki görevleri bununla sınırlı olmayan fenolik bileşikler büyüme, gelişme ve döllenmede de rol almaktadır. Fenolik birleşikler hayvan hücrelerinde meydana gelen mutasyonların azaltılmasında kullanılmaktadır (Karakaya, 2004) ve iki temel yolla

sentezlenmektedir. Bunlardan ilki olan şikimik asit yolu genellikle bitki fenoliklerinin sentezinde görülmektedir. Malonik asit yolu ise fungusların ve bakterilerin fenoliklerinin sentezinde kullanılmaktadır (Özeker, 1999).

2.4 *Fusarium* Türlerinin Ürettiği Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında *Fusarium* türlerinin; alkaloidler, seskiterpenler, poliketidler, karotenoidler, antraknon, siklopentanon, naftokinon türevleri gibi antifungal, antibakteriyal ve sitotoksik bileşikler üreten bir biyosentetik makine olarak görülebileceğini ortaya koymuştur (Li et al., 2020). Doğal Ürünler Sözlüğü veri tabanında 2019 yılı aralık ayında yayınlanan verilere göre *Fusarium* türleri tarafından üretilen (bazıları farklı organizmalar tarafından da üretilebilen) 678 adet sekonder metabolitin varlığı listelenmiştir. Kapsamlı bir literatür taraması yapıldığında toplam 272 adet metabolitin *Fusarium* cinsine özgü olduğu söylenilebilmektedir (Li et al., 2020). Tablo 2.1’de *Fusarium* türleri tarafından üretilen bazı bileşikler ve bu bileşiklerin biyoaktiviteleri verilmiştir.

Tablo 2.1. *Fusarium* türleri tarafından üretilen bileşikler ve biyoaktiviteleri (Wei et al., 2020)

Bileşik	Biyoaktivitesi	Bileşik	Biyoaktivitesi
beauvericin K	<i>C. albicans</i> ’a karşı aktivite	indole derivative	<i>E. crusgalli</i> ’e karşı fitotoksik aktivite
enniatin S	K562 hücre hattına karşı güçlü antiproliferatif etki	amoenamide C	<i>P. aeruginosa</i> ’ e karşı aktivite, <i>F. oxysporum</i> ve <i>T. basicola</i> ’a karşı spesifik aktivite
fusarithioamide B	<i>C. albicans</i> ’e karşı seçici antifungal aktivite, <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> ve <i>S. aureus</i> ’e karşı antibakteriyel etki potansiyeli	sclerotiamide B	<i>H. armigera</i> ’ye karşı insektisidal aktivite, zebra balığı embriyolarının kuluçka süresini önemli ölçüde azaltma

Tablo 2.1 (devam)

fusolanone B	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 'de aktivite	nor-sesquiterpenoid	MV4-11'e karşı sitotoksik aktiviteyi azaltmak
fusarester B	Tirozin fosfataz enzimine karşı zayıf inhibisyon	fusaricates A-G, 10-hidroksi-11-klorofusarik asit	Arpa yapraklarında fitotoksik etki
Oxysporizoline	Metisilin ve çoklu ilaca karşı dirençli <i>S. aureus</i> 'a karşı zayıf antibakteriyel aktivite, radikal temizleyici aktivitesi	[-(α-oksisohegzanoi-N-metil-leucil)2-]	NO üretiminin inhibisyonu
fusarithioamide A	<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> ve <i>E. coli</i> 'e karşı antibakteriyel aktivite	fusaribenzamide A	<i>C. albicans</i> 'a karşı önemli antifungal aktivite
enamide biosurfactant	Temizleyici aktivitesi (askorbik asite kıyasla)	karimunone B	Çoğu ilaca dirençli <i>Salmonella enterica</i> 'ya karşı antibakteriyel aktivite
α-pyrone derivative	Mutant mayalarda hiperaktif edilmiş Ca^{2+} sinyalinin neden olduğu büyüme inhibisyonunun restorasyonu	fusariumin A,B,C ve D	<i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> 'ya karşı aktivite, ılımlı anti-inflamatuar aktivite, <i>S. aureus</i> 'a karşı aktivite
Coculnol	MDCK'e hücrelerine karşı zayıf sitotoksik etki, A/PR/8/34 (H1N1)'e karşı inhibisyon etkisi	integracide H,J	BT-549, SKOV-3 ve KB hücrelerine karşı sitotoksik aktivite
fusopoltide A	Siklooksijenaz-2'ye karşı inhibisyon etkisi	sambacide	<i>S. aureus</i> 'e karşı önemli antibakteriyel aktivite

Tablo 2.1 (devam)

fusaspirol A	RAW264.7 hücrelerinin osteoklastik farklılaşmasında sinyal yolağının aktivasyonu	hikiamides A,C	PPAR-y'ye bağlı gen ekspresyonunun indüklenmesi
naphthalenone derivative	Asetilkolinesteraza karşı inhibisyon etkisi	integracide F,G	BT-549 ve SKOV-3'e karşı sitotoksik aktivite
6-hidroksi-astropaquinone B, astropaquinone D	<i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> 'e karşı ılımlı antibakteriyel aktivite, marul ekiminde sitotoksik etki	Fusartricin	<i>E. aerogenes</i> , <i>M. tetragenus</i> ve <i>C. albicans</i> 'a karşı önemli antimikrobiyal aktivite
Solaninaphthoquinone	Meme kanseri (MCF-7) hücrelerine karşı sitotoksik etki, oral insan karsinomuna (KB) karşı sitotoksik aktivite	fusaripeptide A	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> ve <i>A. fumigates</i> 'a karşı antifungal aktivite
β-resorsiklik makrolit	<i>C. neoformans</i> 'e karşı zayıf antifungal aktivite	fusarihekzin A,B	<i>C. gloeosporioides</i> , <i>C. musae</i> ve <i>F. oxysporum</i> 'a karşı inhibisyon etkisi
etil-3,5-dihidroksi-7-(6,8-dihidroksinonil) benzoate	Mutant mayaya karşı büyüme restorasyon aktivitesi	helvolik asit metil ester	Antifungal ve antibakteriyel aktiviteler
fusarielin J	İnsan yumurtalık kanseri A2780 hücre hattına karşı sitotoksik etki	fusaristerol A,B,C	<i>C. albicans</i> 'a karşı önemli antifungal aktivite, 5-lipoksijenaz (5-LOX) inhibitör potansiyeli

Tablo 2.1 (devam)

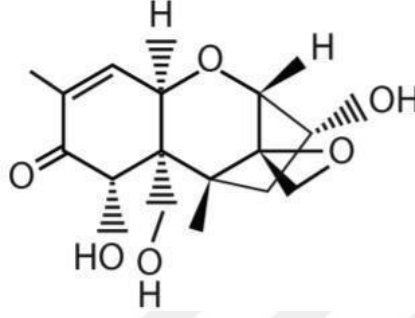
3-epi-fusarielin H, 3-O-methyl-fusarielin H, 3-O-methyl-epi-fusarielin H	<i>S. aureus</i> NBRC 13276'ya karşı antibakteriyel aktivite	7-desmethyiscorpino ne, 7-desmethyl-6-methylbostrycoidin	HeLa servikal karsinom, MDA MB 231 meme kanseri, MIA PaCa2 pankreas kanseri ve NCI H1975 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hatlarına karşı sitotoksik etki
fusarisolin A,B	3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A sentaz gen ekspresyonu inhibisyon etkisi	fusariumester B	<i>P. theae</i> ' a karşı ılımlı inhibisyon aktivitesi
2β,6β-dihydroxy-5α-methoxyergosta-7, 22-diene/2β,9α-dihydroxy-5α-methoxyergosta-7, 22-diene	Zayıf antagonistik etki		

2.4.1 Deoksinivalenol

Deoksinivalenol (DON), genellikle *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*), *Fusarium crookwellense* ve *Fusarium culmorum* türleri tarafından üretilen bir sekonder metabolittir. DON çoğunlukla buğday, arpa, çavdar, yulaf ve mısır gibi bitkilerde bulunmaktadır. Pirinç, tritikale ve sorgum gibi bitkilerde ise bulunma sıklığı daha azdır.

Deoksinivalenol, trikotesenlerin siklik seskiterpenoid ailesindendir ve yapısı Şekil 2.2.'de görülmektedir. Fonksiyonel gruplarına göre A, B, C ve D olmak üzere dört ana gruba ayrılmaktadır. A grubu trikotesenler arasında T-2 ve HT-2 toksinleri yer almaktadır. DON, 3-asetil-DON, 15-asetil-DON, nivalenol ve fusarenon-X gibi metabolitlerin bulunduğu B grubu trikotesenler diğer gruplara oranla doğada daha az bulunmaktadır. B grubunda hidroksil

gruplarının A grubuna göre fazla olması bu gruptaki metabolitlerin daha polar yapıda olmalarına sebep olmaktadır. Bu sebeple DON su, etanol, metanol, etil asetat ve asetonyitril gibi polar çözügenlerde çözünebilmektedir. A grubunda yer alan T-2 ve HT-2 toksinleri daha polardır ve bu toksinlere doğada az rastlanmaktadır (Krska et al., 2007).



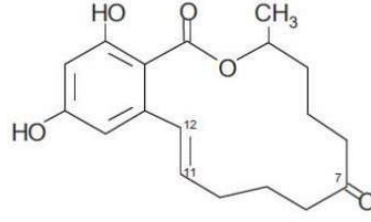
Şekil 2.2. Deoksinivalenolün kimyasal yapısı (Sobrova et al., 2010)

2.4.2 Zearalenon

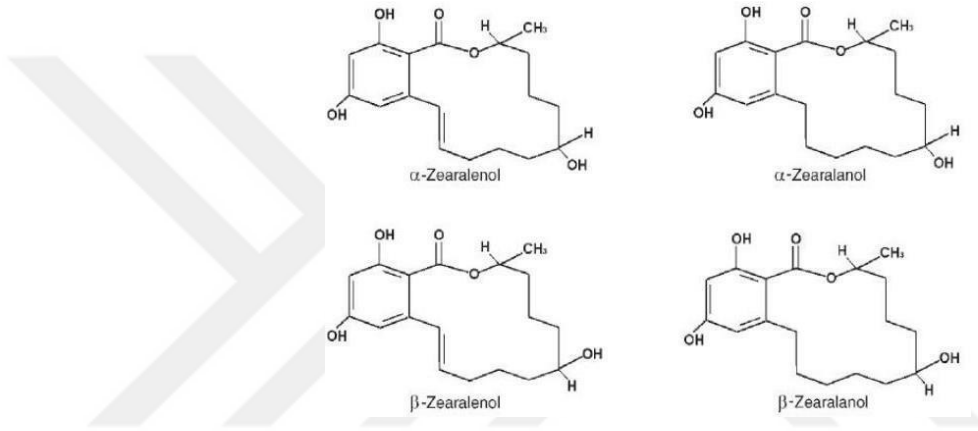
Zearalenon (ZEA) *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium cerealis* ve *Fusarium equiseti* gibi *Fusarium* türleri tarafından üretilebilen bir toksindir. Şekil 2.3'te yapısı görülen ZEA'nın kimyasal adı 6-(10-hidroksi-6-okzo-trans-1-undesenil)- β -resorsiklik asit lakton'dur (Alldrick and Hajselova, 2004). Mısır, arpa, çavdar, buğday, pirinç gibi çeşitli tahıllar üzerinde üretilebilen ve östrojenik yapıya sahip bir toksin olan ZEA'nın üretimi 25-30 °C'de gerçekleştirilmektedir (Sanchis and Magan, 2004; Krska et al., 2007; Doll and Danicke, 2011). ZEA'nın türevleri (Şekil 2.4) olan α -zearalenol (α -ZEA), β -zearalenol (β -ZEA), α -zearalanol (α -ZAL), β - zearalanol (β -ZAL) ve zearalanona en yüksek konsantrasyonda *Fusarium* türleri ile kontamine olmuş mısırdaki üretilmektedir (Minervini et al., 2005).

Zearalenon ve deoksinivalenol çoğunlukla aynı fungus türleri tarafından bir arada üretilmektedir. ZEA'nın tahıllarda üretiminde deoksinivalenolün yanı sıra eş zamanlı olarak pembe renkli bir pigmentin de

üretildiği görülmüştür. Bu sebeple tahıllarda pembe rengin görülmesi ZEA varlığı ile ilişkilendirilmektedir (Richard, 2007).



Şekil 2.3. Zearalenonun kimyasal yapısı (Doll and Danicke, 2011)



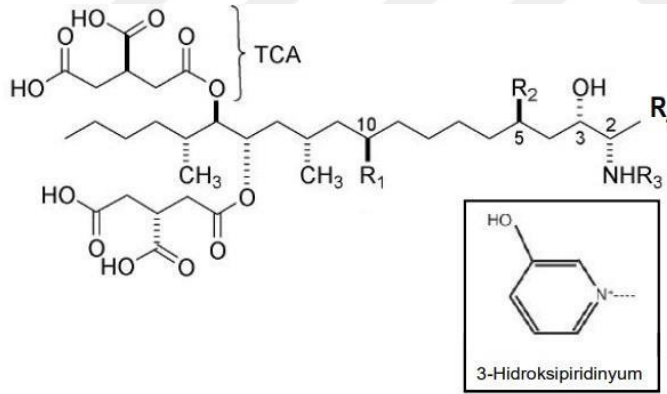
Şekil 2.4. Zearalenonun türevlerinin kimyasal yapısı (Alldrick and Hajselova, 2004)

2.4.3 T-2 ve HT-2 Toksin

T-2 ve HT-2 toksinler Bölüm 2.2.1.2.1’de belirtilen A grubu trikotesenlerdendir. *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium poae* ve *Fusarium acuminatum* tarafından üretilmektedir. Bu *Fusarium* türlerinin en belirgin özelliği soğuk iklim alanlarında toksin üretebilme becerileridir. *Fusarium* türlerinin 2 °C’de toksin üretebildikleri bilinmektedir. T-2 toksin, doğada daha az bulunan bir toksin olmasına rağmen, diğer A grubu toksinler ile karşılaştırıldığında toksisite oranının yüksekliği sebebiyle oldukça dikkat çekmektedir (Li et al., 2011). Molekül formülü $C_{24}H_{34}O_9$ olan T-2 toksin beyaz kristal yapıda bulunur. Isı ve ışığa dayanıklıdır ancak kuvvetli asidik koşullarda parçalanabilmektedir (Yagen and Bialer, 1993; Li et al., 2011).

2.4.4 Fumonisinler

İlk olarak Güney Afrika’da 1988 yılında bulunan fumonisinler (Şekil 2.5), *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium nygamai*, *Fusarium anthophilum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium diamini* ve *Fusarium globosum* gibi türler tarafından üretilmektedir. (Magnoli et al., 1999; Arıcı et al., 2002). Fumonisin üretiminde öncü olan türlerden *Fusarium proliferatum* ve *Fusarium verticillioides*’in en ideal büyüme sıcaklık aralığı 22.5-27.5°C’dir. Bu aralık 2 °C ile başlayıp 37 °C’ye kadar çıkmaktadır. Bu kadar geniş bir sıcaklık aralığında üretim yapılabilir olması bu toksinlerin üretiminin rahatlıkla yapılabileceğini gözler önüne sermektedir. Nemli ortamlardan hoşlanan *Fusarium* türlerinin toksin üretimi ortamda artan nem değeri ile birlikte yükselmektedir. Ayrıca diğer toksinlerin aksine fumonisin üretiminde anaerobik ortam koşulları toksin üretimini arttırdığı görülmektedir (Sweeney and Dobson, 1998).



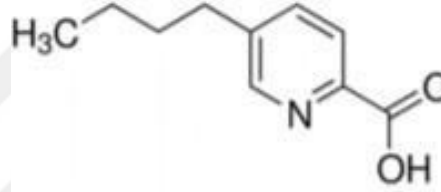
Toksin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Grup A				
FA ₁	OH	OH	COCH ₃	CH ₃
FA ₂	H	H	COCH ₃	CH ₃
FA ₃	OH	OH	COCH ₃	CH ₃
Grup B				
FB ₁	OH	OH	H	CH ₃
FB ₂	H	OH	H	CH ₃
FB ₃	OH	H	H	CH ₃
FB ₄	H	H	H	CH ₃
Grup C				
FC ₁	OH	OH	H	H
FC ₃	OH	H	H	H
FC ₄	H	H	H	H

Şekil 2.5. Fumonisinlerin A, B ve C gruplarının kimyasal yapısı (Humpf and Voss, 2004; Krska et al., 2007)

2.4.5 Fusarik Asit

Kimyasal olarak 5-butilpikolinik asit olarak bilinen fusarik asit (Şekil 2.6) ilk olarak 1934 yılında Yabuta T. ve arkadaşları tarafından pirince parazit yapan *Fusarium heterosporium*'un metabolitlerinden izole edilmiştir. Fusarik asit düşük veya orta derecede toksisiteye sahip bir doğal alkaloid ürünüdür (Huang et al., 2020).

Fusarium türleri tarafından üretilen fitotoksinlerden biri olan fusarik asit *F. andiyazi*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. temperatum*, *F. thapsinum*, *F. verticillioides* (Leslie and Summerell, 2006; Munkvold et al., 2019; Scaufaire et al., 2011) ve özellikle *F. oxysporum*, *F. solani* (Bohni et al., 2016; Lopez-Diaz et al., 2018) tarafından üretilmektedir.



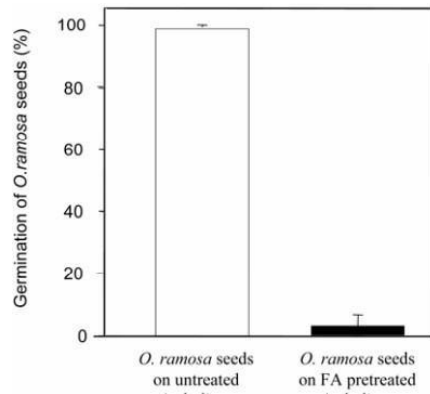
Şekil 2.6. Fusarik asidin kimyasal yapısı (Dor et al., 2007)

Fusarik asit (FA) ile ilgili 2000'li yıllara kadar yapılan çalışmalar bu toksinin konukçuya spesifik olduğunu, hedef olarak aldığı bitkilerde mitokondri aktivitesini ve ATP sentezini azalttığını ifade etmişlerdir. Ayrıca hücre zarının seçici geçirgenliğini ve kök gelişimini negatif yönde etkilediği bildirilmiştir. (Bouizgarne et al., 2004; Bouizgarne et al., 2005; Bouizgarne et al., 2006; Wu et al., 2008).

Fusarik asit (5-butilpikolinik asit) bir dizi bakteri, fungus ve yosun oluşumunu baskılayan geniş spektrumlu doğal bir antibiyotiktir. Yapılan pek çok araştırma fusarik asitin anti-hipertansif ve anti-viral (Fernandez-Pol et al., 2001; Li et al., 2014) aktivitelerden, anti-kanser etkilerine ve Parkinson tedavisine kadar çeşitli önemli farmakolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir (Huang et al., 2020). Farmakolojik aktivitelerinden en çok dikkat çeken anti-hipertansif etkisidir.

Bu alanda yapılan çalışmada dopamine beta-hidroksilaz'ı inhibe eden fungus ürünlerinin sistematik taranmasıyla, zayıf antimikrobiyal özellik gösteren bir antibiyotik olarak bilinen fusarik asit aktif bileşik olarak tanımlanmıştır. Kalpteki ve adrenalindeki norepinefrin'nin azalmasının fusarik asit tarafından inhibe edilen dopamin-beta-hidroksilaz sayesinde olduğu ve agniyovasküler sistemdeki hipotansif etkinin nedenin norepinefrin'nin azalması olduğu düşünülmektedir (Hidaka et al., 1969).

Fusarik ait önemli bir böcek fenoloksidaz inhibitörü olarak belirli insektisidal aktiviteye sahiptir (Dowd et al., 1999; Kwon et al., 2007). Ayrıca bir tür fitotoksin olarak bilinen fusarik asit ve türevleri belirgin herbisidal aktivite de sergilemektedir (Capasso et al., 1996; Stipanovic et al., 2011). Şeytan elması, boru çiçeği gibi pek çok yabancı ota karşı fitotoksin olarak etki eden fusarik asit (Abbas et al., 1991; Abbas et al., 1995) özellikle canavar otuna (*Orobanch* spp.) karşı biyokontrol ajanı olarak kullanılmaktadır. Fitotoksik aktiviteleri sayesinde çimlenmenin ve büyümenin inhibisyonu, solma, nekroza sebep olma gibi pek çok metabolik etkiye sebep olmaktadır (Wakulinski, 1989; Van Asch et al., 1992). Yapılan çalışmada, biyokontrol ajanı olarak kullanımı amacıyla fusarik asitin canavar otuna karşı etkisi incelenmiştir (Bouizgarne et al., 2006). Şekil 2.7'de görüldüğü üzere fusarik asit uygulamasının canavar otuna karşı etkisi ortaya konmuştur.



Şekil 2.7 Fusarik asit uygulaması yapılan ve yapılmayan *O. ramosa* tohumlarının çimlenme yüzdesi (Bouizgarne et al., 2006)

Fusarik asit hem tıbbi hem de tarımsal alanlarda güçlü antifungal aktivite göstermektedir (Zheng et al., 2011; Son et al., 2008). Fusarik asidin in vitro antifungal aktivitelerinden elde edilen sonuçlar, fusarik asidin tarımsal bir fungusit olarak daha fazla araştırılması ve geliştirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Mikroorganizmalar

Bu çalışmada endofit *Fusarium* türlerinin eldesi için farklı lokasyonlardan toplanan ayırık otunun (*Agropyron repens*) ve canavar otunun (*Orobanch* spp.) kökünden (rizosfer bölgesindeki toprakla birlikte) 9 adet numune alınmış ve izolasyonlar yapılmıştır. Bu numunelerin özellikleri Tablo 3.1’ de verilmiştir.

Tablo 3.1. Patojen olmayan *Fusarium*’ların izolasyonunda kullanılan numunelerin özellikleri

No	Numune Kodu	İzolasyon Kaynağı	İzole Edildiği Yer	Tarih
1	O. 1	Canavar otu (<i>Orobanch</i>) kökü (rizosfer bölgesindeki toprakla birlikte)	İzmir	20.10.2018
2	O.2	Canavar otu (<i>Orobanch</i>) kökü (rizosfer bölgesindeki toprakla birlikte)	İzmir	20.10.2018
3	O.3	Canavar otu (<i>Orobanch</i>) kökü (rizosfer bölgesindeki toprakla birlikte)	İzmir	20.10.2018
4	O.4	Canavar otu (<i>Orobanch</i>) kökü (rizosfer bölgesindeki toprakla birlikte)	İzmir	20.10.2018
5	A.1	Ayrık otu (<i>Agropyron repens</i>) kökü (rizosfer bölgesindeki toprakla birlikte)	İzmir	08.11.2018

Tablo 3.1. (devam)

6	A.2	Ayrık otu (<i>Agropyron repens</i>) kökü (rizosfer bölgesindeki toprakla birlikte)	Ankara	14.11.2018
7	A.3	Ayrık otu (<i>Agropyron repens</i>) kökü (rizosfer bölgesindeki toprakla birlikte)	İzmir	18.11.2018
8	A.4	Ayrık otu (<i>Agropyron repens</i>) kökü (rizosfer bölgesindeki toprakla birlikte)	İzmir	28.11.2018
9	A.5	Ayrık otu (<i>Agropyron repens</i>) kökü (rizosfer bölgesindeki toprakla birlikte)	İzmir	09.12.2018

Ek olarak Biyomühendislik Bölümü, Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda yer alan 6 adet *Fusarium* suşu da çalışmada yerini almıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Fusarik asit üretiminde kullanılan *Fusarium* suşlarının özellikleri

No	Tür Adı	İzolat Kodu	Genbank Erişim Numarası
1	<i>Fusarium solani</i>	32	MW165531
2	<i>Fusarium solani</i>	39	MW165532
3	<i>Fusarium solani</i>	60	MW165529
4	<i>Fusarium solani</i>	76-b	MW165530
5	<i>Fusarium solani</i>	168	MW165528
6	<i>Fusarium redolens</i>	176	MW165533

Ayrıca Uşak Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünden Dr. Öğretim Üyesi Havva DİNLER'in laboratuvarında nohut (*Cicer arietinum*) bitkisinden izole edilmiş ve patojenite testleri yapılmış olan, 22 adet patojen olmayan endofit *Fusarium* izolatı (Tablo 3.3) çalışmada kullanılmıştır (Dilmaç vd., 2020).

Tablo 3.3. Fusarik asit üretiminde kullanılan patojen olmayan *Fusarium* izolatları

No	İzolat Kodu	No	İzolat Kodu
1	<i>Fusarium</i> sp. Sus1T-1	12	<i>Fusarium</i> sp. Ş6T-19
2	<i>Fusarium</i> sp. Sus1T-2	13	<i>Fusarium</i> sp. Ş6T-21
3	<i>Fusarium</i> sp. Sus3T-3	14	<i>Fusarium</i> sp. Ş7T-2
4	<i>Fusarium</i> sp. Sus6T-4	15	<i>Fusarium</i> sp. Ş7T-16
5	<i>Fusarium</i> sp. Ş2T-1	16	<i>Fusarium</i> sp. Ş7T-18
6	<i>Fusarium</i> sp. Ş3T-5	17	<i>Fusarium</i> sp. Ş8T-7
7	<i>Fusarium</i> sp. Ş3T-11	18	<i>Fusarium</i> sp. Y1T-9
8	<i>Fusarium</i> sp. Ş3T-17	19	<i>Fusarium</i> sp. Y1T-17
9	<i>Fusarium</i> sp. Ş6T-3	20	<i>Fusarium</i> sp. Y5T-6
10	<i>Fusarium</i> sp. Ş6T-12	21	<i>Fusarium</i> sp. Y5T-11
11	<i>Fusarium</i> sp. Ş6T-14	22	<i>Fusarium</i> sp. Y6T-8

Patojenite testinde negatif kontrol olarak kullanılmak üzere bir adet patojen *Fusarium* izolatı aynı şekilde Uşak Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünden alınmıştır.

3.1.2 Kullanılan Besiyerleri

3.1.2.1 Rose Bengal-Gliserin-Üre Besiyeri (RbGU)

Fusarium türlerinin izolasyonunda ve saflaştırılmasında kullanılmıştır (Nelson et al., 1983; Van Wyk, 1969). Tablo 3.4'te verilen ortam içerikleri karıştırılarak iyice çözündükten sonra otoklavda steril edilmiştir (121 C, 15 dk). Sterilizasyonun ardından, besiyeri katılaşmadan önce 50 mg/L antibiyotik (kloramfenikol) aseptik koşullarda eklenmiştir.

Tablo 3.4. RbGU besiyeri içerikleri

Bileşenin Adı	Bileşenin miktarı
Gliserin	10 g
Üre	1 g
Pentokloronitrobenzen (PCNB)	10 ml
L-alanin	0,5 g
Rose Bengal	0,5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

3.1.2.2 Pepton Pentokloronitrobenzen (PCNB) Besiyeri

Fusarium türlerinin izolasyonunda ve saflaştırılmasında kullanılmıştır (Nelson et al.,1983). Tablo 3.5'te verilen besiyeri içerikleri karıştırılarak çözündükten sonra otoklavda (121°C, 15 dk) steril edilmiştir. Ardından besiyeri steril petri kaplarına dökülmeden önce %5'lik konsantrasyonda stoğu hazırlanmış olan 20 ml/L kloramfenikol aseptik koşullarda besiyerine eklenmiştir.

Tablo 3.5. Pepton PCNB besiyeri içerikleri

Bileşenin Adı	Bileşenin miktarı
Difco pepton	15 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
PCNB (pentokloronitrobenzen)	10 ml
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

3.1.2.3 Patates Dekstroz Agar (PDA)

PDA izole edilen *Fusarium* 'ların büyütülmesinde, aktifleştirilmesinde ve stoklanmasında kullanılmıştır. *Fusarium* izolatlarının çalışma boyunca canlılığını korumak amacıyla, yatık olarak hazırlanmış PDA ile saklama (Dikilitaş, 2011) metodu uygulanarak depolanmaları sağlanmıştır.

Laboratuvarda PDA besiyerinin hazırlığı için 200 g patates 1000 ml distile suda 30 dakika kaynatılmıştır. Elde edilen nişastalı su (200 g patatesin kaynatılması ile elde edilen patates nişastasının miktarı ortalama 4 g olarak kabul edilmiştir) tülbent yardımıyla filtre edilmiş ve hacmi tekrar distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra içerisinde 20 g glukoz çözündürülerek, 0,2 M HCl asit çözeltisi ile pH 5,6 ±2'ye ayarlanmıştır. Ardından 15 g agar eklenmiş ve otoklavda steril edilerek (121°C, 15 dk) besiyeri hazırlığı tamamlanmıştır (Macfaddin, 1985).

3.1.2.4 Czapek Dox Besiyeri

Patojen olmayan endofit *Fusarium* izolatlarının fusarik asit üretimi tayininde sıvı besin ortamı olarak kullanılmıştır (Hamid and Strange, 2000).

Besiyeri içerikleri (Tablo 3.6) çözündürüldükten sonra otoklavda (121 °C, 15 dk) steril edilmiştir.

Tablo 3.6. Czapek Dox besiyeri içerikleri

Bileşenin Adı	Bileşenin miktarı
Sükroz	30 g
NaNO ₃	3 g
MgSO ₄	0,5 g
KCl	0,5 g
Fe ₃ (SO ₄)	0,01 g
KH ₂ PO ₄	1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1 g
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.02 g
Distile su	1000 ml

3.1.2.5 M-1 D Besiyeri

Patojen olmayan endofit *Fusarium* izolatlarının fusarik asit üretimi tayininde sıvı besin ortamı olarak kullanılmıştır. Tablo 3.7’de verilen besiyeri içerikleri önce iyice karıştırılarak çözündürülmüş ve ardından otoklavda (121 °C, 15 dk) steril edilmiştir (Pinkerton and Strobel, 1976).

Tablo 3.7. M-1 D besiyeri içerikleri

Bileşenin Adı	Bileşenin miktarı
Sükroz	18 g
$C_4H_{12}N_2O_6$	3 g
NaH_2PO_4	0,01 g
KCl	0,04 g
KNO_3	0,05 g
$Ca(NO_3)_2$	0,12 g
KI	0,0005 g
H_3BO_3	0,0008 g
$ZnSO_4$	0,0008 g
$MnSO_4$	0,002 g
$FeCl_3$	0,0007 g
Distile su	1000 ml

3.1.2.6 Pirinç Kültür Ortamı

İzolatların fusarik asit üretimi tayini için, yapılan üretiminde katı kültür üretim ortamı olarak pirinç kullanılmıştır. Pirinç ile hazırlanacak ortam için; 250 ml'lik erlende 50 g'lık pirincin üzerine 25 ml distile su eklenmiş ve 2 saat boyunca sık sık karıştırılarak bekletilmiştir. Ardından 121 °C, 15 dk otoklavda yapılan sterilizasyon işlemi sonrası katı kültür üretim ortamı hazırlanmıştır (Shotwell, 1966).

3.1.3 Kullanılan Çözeltiler

3.1.3.1 PCNB Çözeltisi

Fusarium türlerinin izolasyonunda ve saflaştırılmasında kullanılan RbGU (rose bengal-gliserin-üre) ve Pepton PCNB (pentokloronitrobenzen) besiyerlerinde kullanılmıştır (Nelson ve ark., 1983; Van Wyk, 1969). Çözeltinin hazırlanması için 100 ml metanolde 0,75 g PCNB çözündürülmüştür. Ardından besiyerlerine 10 ml/L hacminde eklenmiştir.

3.1.3.2 %5'lik Kloramfenikol Çözeltisi

Fusarium türlerinin izolasyonunda ve saflaştırılmasında kullanılan RbGU besiyerlerinde kullanılmıştır (Nelson et al., 1983; Van Wyk, 1969). Çözeltinin hazırlanması için 100 ml distile suda 5 g chloramphenicol çözündürülmüştür. RbGU besiyerlerinin hazırlanması ve otoklavda (121°C, 15 dk) steril edilmesinin ardından aseptik koşullarda %5'lik çözeltiden 10 ml/L hacminde (Basbagci vd., 2019) besiyerine eklenmiştir.

3.1.3.3 0.2 M'lık Hidroklorik Asit (HCl) Çözeltisi

Besiyerlerinin ve kültür ortamlarının pH'ının ayarlanmasında kullanılmıştır. Ticari olarak satılan %37'lik HCl' den 1,67 ml alınmış 100 ml distile su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

3.1.3.4 %0.1'lik HgCl₂ (Cıva (II) Klorür) Çözeltisi

Patojenite testinde nohut tohumlarına yüzey sterilizasyonu yapılması için %0,1'lik HgCl₂ kullanılmıştır. Çözeltinin hazırlanması için 0,1 g HgCl₂ 100 ml distile suda çözündürülmüştür.

3.1.3.5 %5'lik Sülfürik Asit (H₂SO₄) Çözeltisi

UV (CAMAG) ışık altında fusarik asidin varlığının daha iyi gözlemlenebilmesi için Thin Layer Chromatography (TLC) plakasına (Merck

No. 5553, Darmstad, Germany) %5'lik H_2SO_4 püskürtülmüştür. Çözeltilinin hazırlanması için 95 ml metanolde 5 ml H_2SO_4 çözündürülmüştür.

3.1.3.6 1000 ppm'lik Fusarik Asit Çözeltisi

TLC plakada ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizinde standart olarak kullanılmak için 1000 ppm'lik fusarik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 1 mg fusarik asit (Sigma Alrich, Germany) 1 ml metanolde çözündürülmüştür.

3.1.3.7 500 ppm'lik Fusarik Asit Çözeltisi

HPLC analizinde kalibrasyon grafiği çıkarılabilmesi için 500 ppm'lik fusarik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 0,5 mg fusarik asit (Sigma Alrich, Germany) 1 ml metanolde çözündürülmüştür.

3.1.3.8 250 ppm'lik Fusarik Asit Çözeltisi

HPLC analizinde kalibrasyon grafiği çıkarılabilmesi için 250 ppm'lik fusarik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 0,25 mg fusarik asit (Sigma Alrich, Germany) 1 ml metanolde çözündürülmüştür.

3.1.3.9 100 ppm'lik Fusarik Asit Çözeltisi

TLC plakada ve HPLC analizinde standart olarak kullanılmak için 100 ppm'lik fusarik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 0,1 mg fusarik asit (Sigma Alrich, Germany) 1 ml metanolde çözündürülmüştür.

3.1.3.10 50 ppm'lik Fusarik Asit Çözeltisi

HPLC analizinde kalibrasyon grafiği çıkarılabilmesi için 50 ppm'lik fusarik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 0,05 mg fusarik asit (Sigma Alrich, Germany) 1 ml metanolde çözündürülmüştür.

3.1.3.11 25 ppm’lik Fusarik Asit Cözeltisi

HPLC analizinde kalibrasyon grafiği çıkarılabilmesi için 25 ppm’lik fusarik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 0,025 mg fusarik asit (Sigma Alrich, Germany) 1 ml metanolde çözündürülmüştür.

3.1.3.12 10 ppm’lik Fusarik Asit Cözeltisi

HPLC analizinde kalibrasyon grafiği çıkarılabilmesi için 10 ppm’lik fusarik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 0,01 mg fusarik asit (Sigma Alrich, Germany) 1 ml metanolde çözündürülmüştür.

3.1.3.13 %1’lik Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH₂PO₄) Cözeltisi

HPLC analizinde mobil faz olarak kullanılması için %1’lik KH₂PO₄ çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 10 mg KH₂PO₄ 1000 ml ultra saf suda çözündürülmüştür.

3.1.4 Kullanılan Cihazlar

3.1.4.1 Hassas terazi

Mettler toledo (ABD) marka (AL204 model) hassas terazi çalışmada kullanılan besiyeri içeriklerinin ve kimyasalların tartımının yapılmasında kullanılmıştır.

3.1.4.2 Isıticılı manyetik karıştırıcı

Heidolph marka ve MR 3001 model ısıticılı manyetik karıştırıcı (Almanya), ısıticılı manyetik karıştırıcı kullanılan besiyerlerinin ve çözeltilerin hazırlanmasında karıştırma işlemi için kullanılmıştır.

3.1.4.3 Otoklav

Hirayama marka Hiclave HVE-50 (Japonya) model otoklav besiyerleri ve çözeltilerin sterilizasyonunun yapılmasında kullanılmıştır.

3.1.4.4 Pastör fırını

Binder marka (Almanya), pastör fırını cam malzemelerin sterilizasyonu için kullanılmıştır. Ayrıca TLC plakaların aktifleştirilmesi için 110 °C’de yakılmasında kullanılmıştır.

3.1.4.5 Vorteks

Yellowline (Türkiye) marka ve TTS2 model vorteks, hücre süspansiyonlarının homojenize edilmesi için kullanılmıştır.

3.1.4.6 İnkübatör

Nüve EN 120 (Türkiye) marka inkübatör kültürlerin 25°C ve 27°C’de inkübasyonları için kullanılmıştır.

3.1.4.7 Buzdolabı

Kültürlerin +4 °C’ de depolanması için kullanılmıştır.

3.1.4.8 Işık mikroskobu

Olympus CX31RTSF (Türkiye) marka mikroskop kültürlerin spor yapılarının incelenmesinde ve Thoma lamında spor sayımı yapılmasında kullanılmıştır.

3.1.4.9 pH metre

Sartorius Basic Meter PB-11 (Fransa) marka pH-metre besin ortamı ve diğer çözeltilerin pH değerlerinin belirlenmesi ve gerekli ayarlamaların yapılması amacı ile kullanılmıştır.

3.1.4.10 Evaporatör

HEIDOLPH marka Heizbad Hei-VAP (ABD) model evaporatör, katı-sıvı ve sıvı-sıvı ekstraksiyonlar sonrası organik çözenlerin uçurulması için kullanılmıştır.

3.1.4.11 Ultrasonik Banyo

ÇALIŞKAN marka LAB.ULT.4022 (Türkiye) model ultrasonik banyo katı kültür üretimlerinde katı-sıvı ekstraksiyonun yapılmasında kullanılmıştır. Evaporatörde çözenlerin uçurulması sonrası TLC plakaya (Merck No. 5553, Darmstad, Germany) yükleme yapılması için ekstraktları metanolde daha iyi çözündürebilmek için kullanılmıştır.

3.1.4.12 254/365 nm UV Işık Kabini

TLC plakaların CAMAG marka (Almanya) UV ışık kabiniinde fusarik asit varlığının tespiti için gözlemlenmesinde kullanılmıştır.

3.1.4.13 Blender

Waring marka (ABD) blender katı kültür üretimlerinden sonra ekstraktların parçalanması için kullanılmıştır.

3.1.4.14 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Thermo Scientific marka (ABD) HPLC cihazı TLC plakalarda yapılan gözlemler sonrası fusarik asit varlığı tespit edilmiş ekstraktlarda kantitatif miktar tayini yapmak için kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1 Endofit *Fusarium* İzolasyonu Amacıyla Örneklerin Alınması ve Laboratuvara Getirilmesi

Patojen olmayan *Fusarium* türlerinin izolasyonu için Ankara ve İzmir illerinden farklı lokasyonlardan toplanan ayrık otunun (*Agropyron repens*) ve canavar otunun (*Orobanch* spp.) kökünden (rizosfer bölgesindeki toprakla birlikte) alınmış örnekler izolasyon yapılması için etiketli torbalar ile ağızları kapalı bir şekilde laboratuvara getirilmiştir.

Uşak Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünden Dr. Öğretim Üyesi Havva DİNLER'in nohut (*Cicer arietinum*) bitkisinden izole edilen ve patojenite testleri yapılmış olan, 22 adet patojen olmayan endofit *Fusarium* izolatu petri kaplarında PDA besiyerine ekilmiş bir şekilde laboratuvara getirilmiş ve 4 °C'ye kaldırılmıştır.

3.2.2 Örneklerden *Fusarium* spp. İzolasyonu ve Saflaştırılması

Toprak örneklerinden fungus izolasyonu için, Waksman (1922) tarafından geliştirilen "Toprağı Sulandırma Yöntemi" uygulanmıştır. Değişik lokasyonlardan toplanan ayrık otunun (*Agropyron repens*) ve canavar otunun (*Orobanch* spp.) kökünden (rizosfer bölgesindeki toprakla birlikte) alınan parçalar steril bir makasla kesilerek 10 g olarak tartılmış ve 100 ml'lik steril suya konarak 10 dakika boyunca çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Seri seyreltme yönteminin uygulanması için, tüplere konulan 9 ml'lik distile suların ağızları pamukla kapatılıp otoklavda (121 °C, 15 dk) steril edilmiştir. İlk etapta hazırlanmış olan 10^{-1} seyreltmeden steril pipet ile 1 ml alınarak 9 ml steril saf su bulunan tüpe eklenerek 10^{-2} seyreltme elde edilmiştir. Ardından vorteks ile yapılan çalkalama işleminden hemen sonra 1 ml örnek alıp 9 ml steril saf su bulunan tüpe eklenerek 10^{-3} seyreltme elde edilmiştir. 10^{-3} karışımından 1 ml alınıp içerisinde 9 ml steril saf su bulunan tüpe eklenerek 10^{-4} seyreltme elde edilmiştir. 10^{-5} seyreltme için de aynı işlemler tekrarlanmıştır (Oskay, 2007).

Bu işlemin ardından her bir seyreltmede tek tek düşen kolonilerin elde edilebilmesi için dökme plaka yöntemi uygulanmıştır (Halkman ve Ayhan, 2000). İzolasyon çalışmalarında *Fusarium* türleri için seçici ortamlar olan; Pepton PCNB ve RbGU besiyerleri kullanılmıştır. Hazırlanan 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} oranındaki seyreltmelerden 1 ml alınarak steril petrilere aktarılmış ve yaklaşık 45 °C' ye kadar soğutulmuş olan seçici besiyerlerinin her birinden 15 – 20 ml dökülerek karıştırılmıştır. Agar katılaşınca petrilere 27 °C' de beş gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petrilere incelenmiş ve *Fusarium* olduğu tahmin edilen kolonilerden aseptik koşullarda iğne/öze ile alınarak içerisinde PDA bulunan steril petrilere aktarılmıştır. Petrilere 27 °C' de beş gün boyunca inkübe edilmiştir. Bu işlem saf ve tek koloniler elde edilene kadar tekrarlanmıştır.

3.2.3 *Fusarium* İzolatlarının Mikroskopik Olarak İncelenmesi

Elde edilen izolatlardan *Fusarium* olanların tespit edilebilmesi için inkübasyon sonunda gelişen kültürlerden hazırlanan preparatlara ticari olarak hazır halde satılan laktofenol pamuk mavisi damlatılmış ve ışık mikroskopunda izolatların spor yapıları incelenmiştir (Shamly, 2014).

3.2.4 *Fusarium* İzolatlarının Saklanması

3.2.4.1 *Fusarium* İzolatlarının Yatık Agarlı Tüplerde Saklanması

Saf ve tek kolonilerin eldesinden sonra izolatların saklanabilmesi için içerisinde PDA bulunan yatık agarlı tüplere ekim yapılmış ve 27 °C' de beş gün boyunca inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda üreme gözlenen yatık agarlı tüpler +4 °C' de buzdolabında saklanmıştır (Dikilitaş, 2011).

3.2.4.2 *Fusarium* İzolatlarının Toprakta Saklama Yöntemi ile Saklanması

Bu metot bir gün aralya iki kez otoklavda steril edilen (121 °C, 15 dk) 3 cm³ toprakta *Fusarium* kültürlerinin her birinden hazırlanan 1 ml'lik spor süspansiyonunun 27 °C' de yedi gün boyunca inkübe edilmesi ile

gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle 100 ml'lik erlenlerde 80 ml PDA besiyeri konmuş ve otoklavda (121 °C, 15 dk) steril edilmiştir. Ardından 250 ml'lik erlenlerin içindeki PDA besiyerinin donması için, erlenler yatık şekilde konumlandırılmıştır (Şekil 3.1). *Fusarium* izolatlarının her birinden ayrı ayrı yatık erlenlere ekilerek 27 °C' de yedi gün boyunca inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda, erlenlere 10 ml steril su eklenmiş ve steril pipet ucuyla hafifçe kazınarak 10^7 spor/ml'lik spor süspansiyonları (Spor yoğunluğu Thoma lamı ile mikroskop altında sayım yapılarak 10^7 spor/ml'ye ayarlanmıştır) oluşturulmuştur. Hazırlanan spor süspansiyonundan 1 ml alınarak içerisinde yaklaşık 3 cm³ steril toprak bulunan küçük liyofilizasyon şişelerine konulmuştur. Son olarak ise liyofilizasyon şişeleri 27 °C'de kapakları sıkıca kapatılmadan sekiz gün boyunca inkübe edilmişler ve ardından kapakları kapatılarak 17 °C'de soğuk odada depolanmışlardır (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Spor süspansiyonu hazırlamak için erlenlerde yatık şekilde katılaştırılmış PDA besiyeri



Şekil 3.2. Toprakta saklama yöntemi ile liyofilizasyon şişesinde saklanan *Fusarium* sp. Sus6T-4 numaralı izolat

3.2.5 *Fusarium* İzolatlarının Patojenite Testinin Yapılması

Tablo 3.1’de gösterilen örneklerden elde edilen potansiyel *Fusarium* izolatlarına patojenite testi yapabilmek için öncelikle aktifleştirme yapılmıştır. Bunun için 15-20 ml PDA dökülmüş ve katılaşmış olan petrilere izolatlar ekilerek, 27 °C’ de beş gün boyunca inkübe edilmişlerdir. Nohut tohumları yüzey sterilizasyonu için %0,1’lik HgCl₂’de yedi dakika boyunca çalkalanmış ardından HgCl₂’ün uzaklaştırılması için iki kere steril distile sudan geçirilmişlerdir. Yüzey sterilizasyonu tamamlanmış nohut tohumları, içerisinde nemli pamuk bulunan ve otoklavda (121 °C’de 15 dk) steril edilmiş kaplara alınarak 25 °C’de üç gün boyunca çimlenmeye bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda büyümüş olan *Fusarium* izolatlarının büyüyen kolonilerinden steril içi boş cam çubuklar yardımıyla 0,8 cm çapında diskler alınmıştır. İzolatların her birinin büyüyen kolonisinden alınan çapı 0,8 cm agar diskleri %5’lik kloramfenikol çözeltisi ilave edilerek hazırlanmış PDA plağının merkezine yerleştirilmiş ve 27 °C’ de bir gün inkübe edilmiştir. Bir günlük inkübasyon sonunda nemli pamuk üzerinde çimlenmiş olan nohut tohumlarından, beş adet alınarak (her bir petri için) aseptik koşullarda merkezinde 0,8 cm çapında agar diski bulunan petrilere yerleştirilmiştir. İşlemleri tamamlanan petrilere patojenite testi için 25 °C’de 12 saat fotoperiyotta, yedi gün boyunca inkübe edilmiştir (Basbagci vd., 2019). Tüm işlemler her bir izolat için tekrar edilmiştir. Denemeler her bir izolat için üç tekrarlı yapılmıştır.

3.2.5.1 Patojenite Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Denemeler her bir izolat için 15 adet nohut tohumuyla yürütülmüştür. Kontrol grubu olarak, hem patojen olduğu bilinen *Fusarium* sp. izolatu ile yapılan petri denemeleri hem de herhangi bir izolata maruz bırakılmayan petri denemeleri kullanılmıştır. Gerekli patojen *Fusarium* izolatu Uşak Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünden alınmıştır. Denemelerin tamamlanmasının ardından petrilere nohut tohumlarının

gelişen kökçükleri gözlemlenmiştir ve izolatların hastalık şiddeti (%) bu şekilde belirlenmiştir. (Basbagci vd., 2019).

Kökçüklerde gelişen lezyonlar Tablo 3.8’de belirtilen hastalık şiddetinin değerlendirilmesinde kullanılan tanımsal skalaya göre değerlendirilmiştir (Trapero Casas and Jimenez-Diaz 1985; Peters and Grau, 2002; Leisso et al., 2011).

Tablo 3.8. Hastalık şiddetinin değerlendirilmesinde kullanılan tanımsal skala

Skala Değeri	Hastalık Tanımı
1	Çimlenmiş tohumların köklerinde hastalık göstergesi mevcut değil
2	Çimlenmiş tohumların köklerinin <%25 hastalıklı
3	Çimlenmiş tohumların köklerinin %25-50'si hastalıklı
4	Çimlenmiş tohumların köklerinin %50-75'i hastalıklı
5	Tohumda çimlenme yok (hastalık sebebiyle) veya çimlenmiş tohumların köklerinin %75-100 'ü hastalıklı

Kökçükler üzerinde gelişen lezyonlara skala değeri verilirken aşağıda verilen Şekil 3.3’teki görselden de yararlanılmıştır.



Şekil 3.3. Patojenite testi sonucu nohut tohumlarında oluşan lezyonlar ve skala değerleri (Basbagci vd., 2019)

Hastalık şiddeti ilgili yapılan hesaplamada aşağıda verilen Tawsend-Heuberger formülü uygulanmıştır (Karman, 1971).

$$\text{Hastalık Şiddeti \%} = \frac{\sum (\text{Skala Değeri} \times \text{Skala Değerine Dahil olan Bitki Sayısı}) \times 100}{\text{Toplam Bitki Sayısı} \times \text{En Yüksek Skala Değeri}}$$

3.2.6 Patojen Olmayan Endofit *Fusarium* İzolatlarında Fusarik Asit Üretiminin İncelenmesi

3.2.6.1 Patojen Olmayan Endofit *Fusarium* İzolatlarından Sıvı Kültürde Fusarik Asit Üretimi

Patojen olmayan *Fusarium* izolatlarından fusarik asit üretimi için literatürde verilen M-1D (Pinkerton and Strobel, 1976) ve Czapek Dox (Hamid and Strange, 2000) sıvı ortamları kullanılmıştır. En uygun besi ortamının belirlenmesi için yapılan denemelerde Biyomühendislik Bölümü, Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda yer alan 6 adet *Fusarium* suşu ile Uşak Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünden temin edilen patojen olmayan; *Fusarium* sp. Sus1T-1, *Fusarium* sp. Sus1T-2, *Fusarium* sp. Sus2T-1, *Fusarium* sp. Ş2T-1, *Fusarium* sp. Y1T-17, *Fusarium* sp. Y6T-8, *Fusarium* sp. Ş6T-12, *Fusarium* sp. Ş6T-14, *Fusarium* sp. Ş7T-18, *Fusarium* sp. Ş6T-19, *Fusarium* sp. Ş3T-5, *Fusarium* sp. Y5T-11 numaralı 12 izolat kullanılmıştır.

Fusarik asit üretiminin incelenebilmesi için öncelikle izolat/suşların spor süspansiyonları hazırlanmıştır. Bunun için 100 ml'lik erlenlerde 80 ml PDA besiyeri konmuş ve otoklavda (121 °C, 15 dk) steril edilmiştir. Ardından 250 ml'lik erlenlerin içindeki PDA besiyerinin donması için, erlenler yatık şekilde konumlandırılmıştır. *Fusarium* izolat/suşları yatık erlenlere ekilerek 27 °C' de yedi gün boyunca inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda, erlenlere 10 ml steril su eklenmiş ve steril pipet ucuyla hafifçe kazınarak 10⁷ spor/ml'lik spor süspansiyonları (Spor yoğunluğu Thoma lamı ile mikroskop altında sayım yapılarak 10⁷ spor/ml'ye ayarlanmıştır) oluşturulmuştur.

M-1 D ve Czapek Dox besiyerleri hazırlanmış ve 121 °C, 15 dk otoklavda steril edilmişlerdir. Ardından her izolat için, hazırlanan spor süspansiyonlarından başlangıç inokülasyon hacmi olarak 0,5 ml alınmış ve

içerisinde 50 ml besiyeri bulunan 250 ml'lik erlenlere konulmuştur. Erlenler iyice çalkalanmış ve 25 °C'de üç hafta statik kültür şeklinde inkübasyona bırakılmıştır (Gopalakrishnan et al., 2005). İki tekrarlı yapılan üretimlere, kontrol grubu olarak başlangıç inokülasyonu yapılmamış besiyerleri eşlik etmiştir. İnkübasyon sonucunda M-1 D ve Czapek Dox ortamlarının kültür sıvılarında biyokütle miktarı ile kültür filtratlarında fusarik asit oluşumu incelenerek en uygun üretim ortamı belirlenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. M-1 D ve Czapek Dox besiyerlerinde üretimleri tamamlanmış olan *Fusarium* sp. Ş7T-18 ve *Fusarium* sp. Ş3T-5 numaralı izolatlar

En uygun üretim ortamı belirlendikten sonra çalışmada kullanılan tüm izolatlarla bu üretim ortamı kullanılarak sıvı kültürde fusarik asit üretimi yapılmıştır.

3.2.6.2 Patojen Olmayan Endofit *Fusarium* İzolatlarının Kültür Sıvılarında İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması

3.2.6.2.1 Biyokütle Miktarının Belirlenmesi

Fusarium izolatların M-1 D ve Czapek Dox kültür sıvılarında, fusarik asit taranması için literatürde verilen iki farklı çözücü olarak kloroform (Dor et al., 2007) ve etil asetat (Abouzeid et al., 2004) ile ayrı ayrı ekstraksiyon denemesi yapılmış ve en uygun çözücü belirlenmiştir. En uygun çözücünün

belirlenmesi için yapılan denemelerde Biyomühendislik Bölümü, Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda yer alan 6 adet *Fusarium* suşu ve Uşak Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünden sağlanmış 12 adet patojen olmayan endofit *Fusarium* izolatu kullanılmıştır. Fusarik asit ekstraksiyonu yapılabilmesi için aşağıdaki işlemler sırası ile takip edilmiştir.

İzolatların kuru misel ağırlıklarının ölçülebilmesi için inkübasyon süresinin sonunda sıvı kültürler Şekil 3.5'te görüldüğü üzere önce filtre kağıdı yardımıyla süzülerek misel kütlesi uzaklaştırılmıştır. Uzaklaştırılan misel kütlelerinin kuru ağırlıklarının tayini için 70 °C sıcaklıkta etüvde ağırlığı sabitleninceye kadar kurutulmuştur (Gopalakrishnan et al., 2005). Bunun için Şekil 3.6'da görüldüğü gibi üç gün boyunca belirli aralıklarla hassas terazide ağırlık ölçümleri yapılmıştır (Misel kütlelerinin kuru ağırlık ölçümü için; petri+filtre kağıdının darası alınmıştır). Ağırlığı sabitlendiğinde misel kütlesinin kuru ağırlığı not edilmiştir. Darasından çıkarılarak misel kütlesinin net ağırlığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.5. *Fusarium* sp. Y1T-17 numaralı izolatu misel kütlesinin filtre kağıdı ile süzülerek uzaklaştırılması



Şekil 3.6. *Fusarium* sp. Sus3T-3 numaralı izolatın misel kütlesinin kuru ağırlığının ölçülmesi

Misel kütlesi filtre kağıdı ile süzülerek uzaklaştırıldıktan sonra kalan filtratın pH'ı, 0,2 M HCl çözeltisi kullanılarak pH metre ile 2'ye ayarlanmıştır.

3.2.6.2.2 Kültür Filtratlarından Fusarik Asit Ekstraksiyonu

Filtre edilmiş kültür ortamlarından ekstraksiyon için, kloroform ve etil asetat olmak üzere iki farklı çözügen ayrı ayrı denenmiştir. Bunun için ayırma hunisinde 50 ml filtrat ile aynı hacimde çözügen bir dakika boyunca çalkalanmıştır. Ekstraksiyon işlemi arka arkaya üç kez tekrarlanmıştır. Ekstraksiyon işlemi tekrarlanırken her seferinde çözügenin bulunduğu faz temiz bir erlene alınarak ağız sıkıca kapatılmıştır. Aynı işlemler her bir *Fusarium* suşu için tekrarlanmıştır (Dor et al., 2007).

Ekstraksiyon sonrası alınan çözügen, kalan suyu uzaklaştırmak için 10 gr (50 ml hacim için) Na_2SO_4 ile çalkalanmıştır. Ardından yine filtre kağıdı ile süzülerek kalan suyu toplayan Na_2SO_4 uzaklaştırılmıştır.

Tüm bu işlemler sonrası TLC (Merck No. 5553, Darmstad, Germany) yapılabilmesi için evaporatörde kloroform 35 °C, etil asetat 40 °C' de uçurulmuştur. Tekrar 2 ml metanolün içinde ultrasonik banyoda

(ÇALIŞKAN, Türkiye) ekstraksiyon yapılmış ve ekstraktlar TLC (Merck No. 5553, Darmstad, Germany) plaka için hazır hale getirilmiştir

3.2.6.2.3 İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması

(Merck No. 5553, Darmstad, Germany) plaka 110 °C’ de 10-15 dakika tutularak aktive edilmiştir. Ardından FA standartı (Sigma Alrich, Germany) TLC plakalara yüklenmesi için 50 ppm ve 100 ppm konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Öncelikle her iki konsantrasyondaki standarttan 50 µl, 100 µl, 150 µl ve 200 µl alınmış ve pipet yardımı ile plakalar üzerine uygulanmıştır. Ardından plakalar önceden hazırlanmış geliştirme solventinin bulunduğu tanka yerleştirilerek gelişmeleri sağlanmış ve bu işlemi takiben plakalar tanktan çıkarılıp havada kurutulmuştur. Geliştirme solventinin hazırlanması için; asetonitril:su (1:1, v/v), etil asetat:metanol:su (8,5:2:1, v/v/v) (Idris et al., 2003), toluen:etil asetat:formik asit (5:4:2, v/v/v) (Paterson and Rutherford, 1991) ve toluen:etil asetat:formik asit (6:3:2, v/v/v) olmak üzere farklı çözgen karışımları hazırlanmıştır. Her iki konsantrasyondan farklı miktardaki standartların yüklendiği plakalar, belirtilen çözgen karışımlarında teker teker yürütülmüştür. Uygun standart konsantrasyonu, yükleme miktarı ve geliştirme solventi belirlenmiştir. Yapılan optimizasyonun ardından ekstraktlar (50 µl) ve 100 ppm’lik FA standartı (200 µl) TLC plakaya yüklenerek (toluen:etil asetat:formik asit, 6:3:2, v/v/v) geliştirme solventinde yürütülmüştür. Tanktan çıkarılarak kurutulan TLC plakaya çeker ocakta %5’lik H₂SO₄ püskürtülmüş ve plaka etüvde 110 °C’de 10 dakika yakılmıştır (Abouzeid et al.,2004).

Yakılan TLC plaka 254 nm UV ışık (CAMAG) altında incelenmiştir (Srobarova et al., 2004; Eged, 2005). Ekstraktlardaki fusarik asit varlığı ve yokluğu, fusarik asit standardı ile kıyaslanmış ardından Paterson and Rutherford (1991)’ un metodu modifiye edilerek sonuç gözlemsel olarak belirlenmiştir.

TLC sisteminden alınan sonuçlar neticesinde ekstraksiyon için en uygun çözügen belirlendikten sonra çalışmada kullanılan tüm izolatların kültür filtratlarının ekstraksiyonu yapılmıştır.

3.2.6.2.4 Ters Faz (RP) İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması

Fusarik asit ürettiği bir önceki plaka sisteminde belirlenen izolat/suşlar ile Bölüm 3.2.6 belirtildiği gibi üretim ve ekstraksiyon işlemleri yeniden yapılmıştır. Yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyon işleminin ardından ekstraktların konsantrasyonunun belirlenmesi için evaporatörde kullanılacak balonların her birinin darası alınmış ve kodlama yapılmıştır. Organik çözügenin (etil asetat, 40 °C) evaporatörde uçurulması sonrası balonlar tekrar hassas terazide tartılmıştır. Elde edilen sonuçtan balonun darasının çıkarılması sonrası balonda bulunan metabolit miktarı tespit edilmiştir. Ardından ekstraktlar farklı miktarda metanol ile çözündürülmüş ve ekstraktların konsantrasyonu 50 mg/ml olarak ayarlanmıştır. Daha sonra FA standardının (Sigma Alrich, Germany) 100 ppm ve 1000 ppm'lik konsantrasyonları hazırlanmıştır. Her iki konsantrasyondaki standarttan 25 µl ve 50 µl alınmış ve pipet yardımı ile plakalar üzerine uygulanmıştır. Plakalar önceden hazırlanmış olan asetonitril:su (5:5, v/v), aseton:su (5:5, v/v), asetonitril:su (6:4, v/v) ve asetonitril:su (7:3, v/v) geliştirme solventinin bulunduğu tanka ayrı ayrı yerleştirilerek yürütülmüş ve bu işlemi takiben plakalar tanktan çıkarılıp havada kurutulmuştur. Uygun FA standart konsantrasyonu ve çözügen karışımı belirlendikten sonra hazırlanmış olan standart (100 ppm) ve ekstraktlardan (50 mg/ml) 25 µl alınmış ve RP (reverse phase-ters faz) TLC plakaya yüklenmiştir. Plaka asetonitril:su (7:3, v/v) solventinin bulunduğu tanka yerleştirilerek yürütülmüş ve ardından havada kurutulmuştur.

RP TLC plaka 254 nm UV ışık (CAMAG) altında incelenmiştir (Srobarova et al., 2004; Eged, 2005). Ekstraktlardaki fusarik asit varlığı ve yokluğu, fusarik asit standardı ile kıyaslanmış sonuç gözlemsel olarak belirlenmiştir.

3.2.6.3 Patojen Olmayan Endofit *Fusarium* İzolatlarından Katı Kültürde Fusarik Asit Üretimi

Fusarik asit üretiminin başlatılabilmesi için öncelikle izolatların spor süspansiyonları ve 250 ml'lik erlende 50 g'lık pirinç ile besiyeri hazırlanmıştır. Bunun için 100 ml'lik erlenlerde 80 ml PDA besiyeri konmuş ve otoklavda (121 °C, 15 dk) steril edilmiştir. Ardından 250 ml'lik erlenlerin içindeki PDA besiyerinin donması için, erlenler yatık şekilde konumlandırılmıştır. *Fusarium* izolatları yatık erlenlere ekilerek 27 °C' de yedi gün boyunca inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda, erlenlere 10 ml steril su eklenmiş ve steril pipet ucuyla hafifçe kazınarak 10^7 spor/ml'lik spor süspansiyonları (Spor yoğunluğu Thoma lamı ile mikroskop altında sayım yapılarak 10^7 spor/ml'ye ayarlanmıştır) oluşturulmuştur.

Pirinç ile hazırlanan besiyeri 121 °C, 15 dk otoklavda steriledildikten sonra pirinç tanelerini birbirinden ayırmak için steril cam çubukla karıştırılmıştır. Ardından her izolat için, hazırlanan spor süspansiyonlarından başlangıç inokülasyon hacmi olarak 0,5 ml alınmış ve içerisinde 50 g pirinç ile hazırlanan besiyeri bulunan erlenlere konulmuştur (Park et al., 1983; Shotwell et al., 1966). Erlenler tekrar karıştırılmış ve 25 °C'de dört hafta statik şekilde inkübasyona bırakılmıştır. Denemelerde Biyomühendislik Bölümü, Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda yer alan 6 adet *Fusarium* suşu kullanılmıştır.

3.2.6.4 Patojen Olmayan Endofit *Fusarium* İzolatlarının Katı Kültür Ortamında İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması

3.2.6.4.1 Kültür Filtratlarından Fusarik Asit Ekstraksiyonu

İnkübasyon süresinin bitmesinin ardından kültür ortamındaki sporların öldürülmesi için erlenler 110 °C'de 1⁰ dakika otoklavlanmıştır.

Ardından nemini kaybetmesi için etüvde 40 °C'de iki gün boyunca bekletilerek kurutulmuştur. Nemini kaybeden kültür ortamları ekstraksiyonun

daha verimli hale gelebilmesi için blenderdan (Waring) geçirilmiş ve daha küçük parçalara ayrılmıştır.

Blenderdan geçirilen kültür ortamları 25 g tartılmış ve 100 ml metanol-su (55:45 v/v; %1 NaCl) karışımında iki saat sık sık çalkalanarak bekletilmiştir. Ardından 30 dakika ultrasonik banyoda ekstraksiyonun gerçekleşmesi için bekletilmiştir. Ekstraksiyon sonrası pirinç tortusunun uzaklaştırılması için filtre kağıdından geçirilmiştir.

Elde edilen filtrata (50 ml) içerisindeki yağın uzaklaştırılması için n-hekzan (50 ml) ile ayırma hunisinde üç kere ekstraksiyon yapılmıştır. Yağın uzaklaştırılmasının ardından 50 ml filtrata, 60 ml etil asetat ile (metanol ve su karışımının yoğunluğu ile etil asetatın yoğunluk farkının az olmasından dolayı fazlarına rahatlıkla ayrılabilmesi için organik çözümden 60 ml kullanılmıştır) üç kere sıvı sıvı ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstraksiyonun gerçekleşmesi için ayırma hunisinde bir dakika boyunca çalkalanmış ve ardından fazlar birbirinden ayrılmıştır.

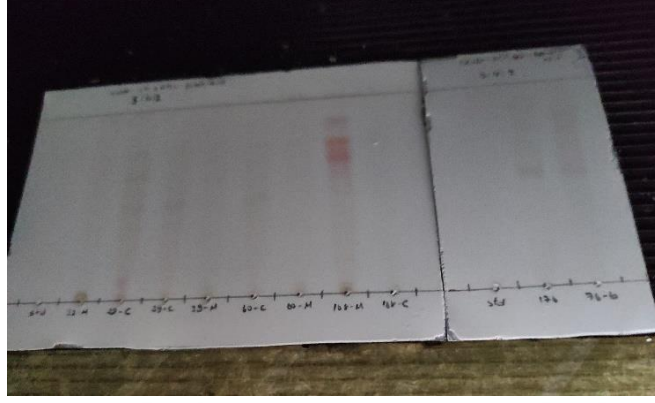
Ekstraksiyon sonrası elde edilen ekstre, kalan suyu uzaklaştırmak için 10 gr (50 ml hacim için) Na_2SO_4 ile çalkalanmıştır. Ardından yine filtre kağıdı ile süzülerek kalan suyu toplayan Na_2SO_4 uzaklaştırılmıştır (İdris et al., 2003).

Tüm bu işlemler sonrası TLC (Merck No. 5553, Darmstad, Germany) yapılabilmesi için evaporatörde (40 °C’de) çözgen uçurulmuştur. Tekrar 2 ml metanolün içinde ultrasonik banyoda (ÇALIŞKAN, Türkiye) ekstraksiyon yapılmış ve ekstraktlar TLC (Merck No. 5553, Darmstad, Germany) plaka için hazır hale getirilmiştir.

3.2.6.4.2 İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması

TLC (Merck No. 5553, Darmstad, Germany) plaka 110 °C’ de 10-15 dakika aktive edildikten sonra işlemlerin tamamlanması için Bölüm 3.2.6.2.1’de yer verilen basamaklar aynı şekilde tekrarlanmıştır.

Ekstraktlardaki fusarik asit varlığı veya yokluğu, fusarik asit standardı ile kıyaslanarak Paterson and Rutherford (1991)' un yöntemi modifiye edilerek gözlemsel olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Standart ve ekstraktları yüklenmiş ve çözgen takında yürütülmüş TLC plakası

3.2.6.5 Patojen Olmayan Endofit *Fusarium* İzolatlarında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Fusarik Asit Üretiminin Belirlenmesi

Uygun üretim ortamında, TLC plakada fusarik asit ürettiği belirlenen izolatların üretimleri Bölüm 3.2.6.1 belirtildiği gibi yeniden yapılmıştır. Ardından Bölüm 3.2.6.2'de belirtildiği gibi ekstraktlarda TLC plaka ile fusarik asit taranması yapılmıştır. Fusarik asit varlığı belirlenen izolatların HPLC metodu ile kantitatif fusarik asit analizi yapılmıştır.

HPLC metodunda kalibrasyon grafiği oluşturulması için 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm ve 10 ppm'lik konsantrasyonda FA (Sigma Aldrich, German) standardı hazırlanmıştır. Kalibrasyon grafiği çıkarılması için Amalfitano ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılan çalışma modifiye edilerek HPLC analiz metodu belirlenmiştir (Tablo 3.9).

Tablo 3.9. HPLC analiz metodunun koşulları (Amalfitano et al., 2002)

HPLC Kolonu	Shodex Asahipak NH2P-50 4E
Mobil Faz	Asetonitril, %1'lik KH_2PO_4
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Akış Hızı	1 ml/dk
Enjeksiyon Hacmi	10 μl
Enjeksiyon Modu	Partial Loop
UV Deteksiyon	254 nm, 210 nm, 270 nm

HPLC metodunda mobil faz olarak %1'lik KH_2PO_4 (A) ve asetonitril (B) kullanılmıştır. Analiz 0,01. dakikada 95A/5B ile başlayıp kompozisyon 20,01. dakikada 20A/80B'ye yükseltilmiştir. 25. dakikaya kadar 20A/80B ile devam eden analizde kompozisyon 25,01. dakikada 95A/5B'ye getirilmiştir. Toplam analiz süresi 35 dakikadır. Her analiz başlangıcından önce, kolon başlangıç koşullarıyla 10 dakika dengelenmiştir.

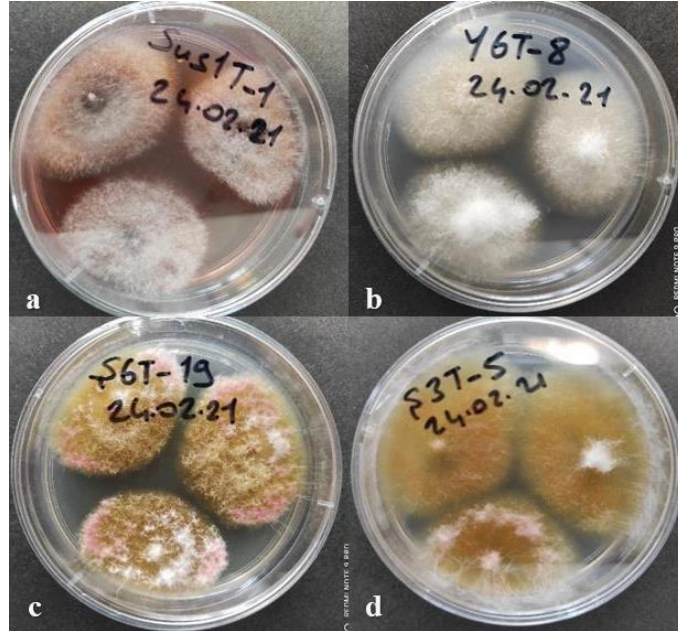
Kalibrasyon grafiğinin çıkarılmasının ardından TLC plakada analizi yapılarak fusarik asit ürettiği belirlenen ekstraktlar ile HPLC analizi yapılmıştır. Ekstraktların konsantrasyonu öncelikle 50 mg/ml ardından 5mg/ml olarak ayarlanmış ve her bir konsantrasyon için Tablo 3.9'da verilen koşullarda analiz gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Örneklerden *Fusarium* spp. İzolasyonu ve Saflaştırılması

Ankara ve İzmir illerindeki farklı lokasyonlardan toplanan ayırık otu (*Agropyron repens*) ve canavar otunun (*Orobanch* spp.) köklerinden (rizosfer bölgesindeki toprakla birlikte) alınan örneklerden izolasyonlar yapılmıştır. Bu aşamada, dört farklı canavar otundan (*Orobanch* spp.) ve beş farklı ayırık otundan (*Agropyron repens*) dökme plaka yöntemiyle 183 adet fungus izolatı elde edilmiştir.

Elde edilen 183 adet izolat arasından potansiyel *Fusarium*'ların belirlenebilmesi için, *Fusarium* türlerinin tanıları kültürel ve morfolojik özellikleri dikkate alınarak, Gerlach ve Nirenberg'in 1982 yılında belirlediği taksonomik sisteme göre incelenmiştir. Bunun için PDA besiyerinde büyütülen kolonilerin rengi, büyüme hızı ve misel yapıları incelenmiştir. Gerlach ve Nirenberg (1982)'e göre yapılan gözlemler sonucu *Fusarium* olduğu düşünülen izolatlar belirlenmiştir (Şekil 4.1).

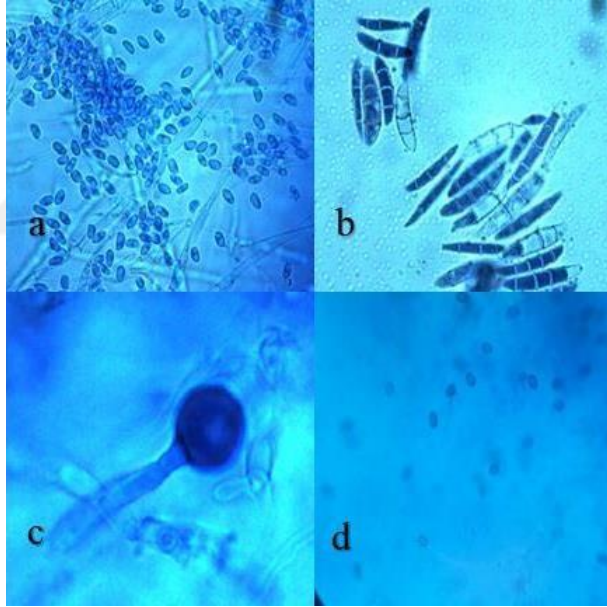


Şekil 4.1. *Fusarium* sp. Suş1T-1 kodlu izolatın (a) *Fusarium* sp. Y6T-8 kodlu izolatın (b) *Fusarium* sp. Ş6T-19 kodlu izolatın (c) *Fusarium* sp. Ş3T-5 kodlu izolatın (d) PDA plağındaki görüntüsü

4.2 *Fusarium* İzolatlarının Mikroskopik Olarak İncelenmesi

Yapılan kültürel ve morfolojik gözlemlere ilave olarak tüm izolatların spor yapıları laktofenol pamuk mavisi ile boyanarak incelenmiştir (Şekil 4.2). Olympus CX31RTSF (Türkiye) model mikroskop ile izolatların spor yapıları gözlenmiştir. Gerlach ve Nirenberg (1982)'e göre kültürel ve morfolojik özellikleri ile spor yapıları herhangi bir *Fusarium* türü ile örtüşmeyen izolatlar elenmiştir.

Tüm bu işlemlerin sonucunda 183 adet izolat arasından, 82 adet izolatın *Fusarium* olmadığı belirlenmiş ve *Fusarium* olmayanlar elenmiştir. Kalan 101 izolattan 2 adedinin kaybı ile nihai olarak 99 adet potansiyel *Fusarium* izolatu elde edilmiştir.



Şekil 4.2. *Fusarium* sp. 163-A.4 kodlu izolatın mikrokonidi yapısı (a), *Fusarium* sp. 175-A.5 kodlu izolatın makrokonidi yapısı (b), *Fusarium* sp. 79-A.2 kodlu izolatın klamidospor yapısı (c), *Fusarium* sp. 46-O.1 kodlu izolatın mikrokonidi yapısı (d)

Laboratuvarımızda elde edilen *Fusarium* izolatlarına ek olarak Uşak Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünden sağlanan, nohut köklerinden izole edilmiş 22 adet patojen olmayan endofit *Fusarium* izolatu alınmıştır (Dilmaç vd., 2020).

4.3 *Fusarium* İzolatlarının Saklanması

4.3.1 *Fusarium* Suş/İzolatlarının Yatık Agarlı Tüplerde Saklanması

Çalışmada kullanılan 121 adet potansiyel *Fusarium* izolatı ile 6 adet *Fusarium* suşu öncelikle yatık agarlı tüplere alınarak inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra +4 °C’ de buzdolabına kaldırılarak depolanmışlardır (Dikilitaş, 2011).

4.3.2 *Fusarium* Suş/İzolatlarının Toprakta Saklama Yöntemi ile Saklanması

Toprakta saklama yönteminde kültürler çoğunlukla bozulmadan stabil kalabilirler, canlılıklarını koruma ihtimalleri yüksektir, akar oluşumu neredeyse imkansızdır, defalarca kullanılabilirler (birden fazla stok bulundurmak kontaminasyon riski için faydalıdır), ucuz ve kolaydır. Dezavantajı ise toprakta saklama yönteminin varyasyon oluşmasına neden olabilmesidir. Ayrıca kuraklığa dayanamayan funguslar için uygun bir yöntem değildir ve fungusların geri kazanımında kontaminasyon riski de mevcuttur. Fakat bu yöntem özellikle *Fusarium* türlerinin saklanması oldukça kullanışlı bir yöntemdir. Bu metotta, inkübasyon süresi fungusların büyüme hızına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Fungus bu süreçte önce ortamda mevcut olan nemi kullanmaktadır ve ardından dormant hale geçmektedir. Bu yöntem düşük maliyeti, yüksek stabilite oranı ve 5-20 yıl arasında değişebilen saklama ömrü açısından gayet elverişlidir. Kontaminasyon ve varyasyon riski bu yöntemin dezavantajlarıdır (Dikilitaş, 2011).

Çalışmada kullanılan *Fusarium* suş/izolatları bu yöntemle doğal habitatları olan toprakta saklanmıştır. Toprakta saklama yöntemi ile 121 adet *Fusarium* izolatı ve 6 adet *Fusarium* suşundan oluşan bir *Fusarium* spp. koleksiyonu oluşturulmuş bu sayede kültürlerin daha güvenli bir şekilde saklanması sağlanmıştır.

Fungal kültürler genellikle yatık agar içeren tüplerde yıllarca saklanabilirler. Bu metotta fungusun iyi gelişen kısmı yatık agara alınmalı, kontaminasyon ve genetik varyantların transferinden kaçınmak için özen gösterilmelidir. Yatık agarda saklama metodu düşük maliyeti ve 2-4 yıl arasında değişen saklama süresi sebebiyle sıkça başvurulan bir yöntemdir (Dikilitaş, 2011). Çalışmamızda *Fusarium* kültürleri iki farklı yöntemle saklanarak koleksiyonun devamlılığı sağlanmaya çalışılmıştır.

4.4 *Fusarium* İzolatlarına Patojenite Testi Yapılması

Patojenite testi için, (PDA besiyerinde) merkezinde 0,8 cm agar disk ve etrafında çimlenmiş nohut tohumları bulunan petriler 25 °C’de 12 saat fotoperiyotta, yedi gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodu sonrasında, nohut tohumlarının gelişen kökçükleri üzerindeki lezyonlar incelenmiştir. Literatürde yapılan taramalarda patojenite testlerinde ağırlıklı olarak TWA (Tap Water Agar) kullanıldığı görülmüştür fakat TWA besiyerinde (Sneh, 1998) *Fusarium* izolatlarının gelişimi yeterince gözlemlenemediği için besiyeri olarak PDA (Basbagci vd., 2019) kullanılmıştır.

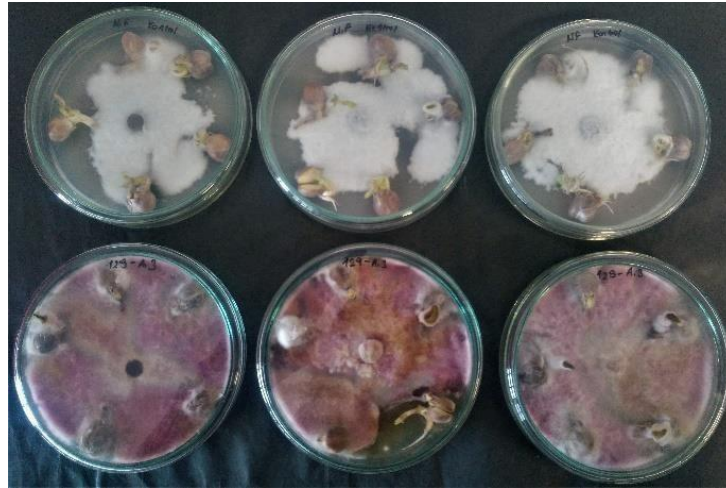
4.5 Patojenite Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Patojenite denemeleri her bir izolat için 15 adet nohut tohumuyla yürütülmüştür. Kontrol grubu olarak, hem patojen *Fusarium* izolatına maruz bırakılan petri denemeleri hem de herhangi bir izolata maruz bırakılmayan petri denemeleri (Şekil 4.3) kullanılmıştır.



Şekil 4.3. Patojenite testinde herhangi bir izolata maruz bırakılmamış pozitif kontrol grubu

Tamamlanmış olan patojenite testi sonuçlarına göre izole edilmiş olan 96 adet *Fusarium* izolatının ‘patojen’ olduğu görülmüştür (Tablo 4.1). Negatif kontrol grubu olarak kullanılan Uşak Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünden alınan patojen *Fusarium* izolatının hastalık şiddeti yüzdesi %74,67 olarak belirlenmiştir. Tablo 4.1’de görüleceği üzere özellikle 129-A.3 (%86) ve 175-A.5 (%92) numaralı izolatların hastalık şiddeti değeri kontrol grubunun (%74,67) hastalık şiddeti değerinden daha yüksektir. Şekil 4.4’te *Fusarium* sp. 129-A.3 kodlu izolatın patojenite testi sonuçları görülmektedir.



Şekil 4.4. *Fusarium* sp. 129-A.3 kodlu izolatın patojenite testi sonuçları (Negatif kontrol grubu olarak patojen *Fusarium* izolatı ile kullanılmıştır).

Tablo 4.1. *Fusarium* izolatlarının, kökçüklerde meydana getirdiği lezyonların ortalama skala değeri ve hastalık şiddeti (%)

İzolat Kodu	Ortalama skala değeri	Hastalık şiddeti (%)	İzolat Kodu	Ortalama skala değeri	Hastalık şiddeti (%)	İzolat Kodu	Ortalama skala değeri	Hastalık şiddeti (%)
<i>Fusarium</i> sp. 2-O.3	1,73	%34,67	<i>Fusarium</i> sp. 80-A.2	1,8	%36	<i>Fusarium</i> sp. 142-A.4	2,07	%41,4
<i>Fusarium</i> sp. 5-O.1	1,93	%38,6	<i>Fusarium</i> sp. 81-A.2	2,7	%54	<i>Fusarium</i> sp. 143-A.4	1,43	%28,6
<i>Fusarium</i> sp. 10-O.4	2,3	%46	<i>Fusarium</i> sp. 83-O.1	2,87	%57,4	<i>Fusarium</i> sp. 146-A.4	2,7	%54
<i>Fusarium</i> sp. 12-O.4	2,07	%41,4	<i>Fusarium</i> sp. 89-A.3	1,73	%34,6	<i>Fusarium</i> sp. 147-A.4	2,13	%42,6
<i>Fusarium</i> sp. 14-O.4	1,43	%28,6	<i>Fusarium</i> sp. 90-A.3	2,3	%46	<i>Fusarium</i> sp. 148-A.4	2,13	%42,6
<i>Fusarium</i> sp. 15-O.4	2,87	%57,4	<i>Fusarium</i> sp. 91-A.3	1,73	%34,6	<i>Fusarium</i> sp. 149-A.4	2,07	%41,4
<i>Fusarium</i> sp. 17-A.2	1,13	%22,6	<i>Fusarium</i> sp. 97-A.2	2,93	%58,6	<i>Fusarium</i> sp. 152-A.3	1,93	%38,6
<i>Fusarium</i> sp. 33-A.2	2,27	%45,4	<i>Fusarium</i> sp. 98-A.2	2,07	%41,4	<i>Fusarium</i> sp. 154-A.4	2,47	%49,4
<i>Fusarium</i> sp. 34-A.2	1,87	%37,4	<i>Fusarium</i> sp. 99-A.2	3	%60	<i>Fusarium</i> sp. 155-A.4	2	%40
<i>Fusarium</i> sp. 35-A.2	1,4	%28	<i>Fusarium</i> sp. 105-A.3	1,93	%38,6	<i>Fusarium</i> sp. 157-A.3	3	%60
<i>Fusarium</i> sp. 39-A.2	1,67	%33,4	<i>Fusarium</i> sp. 111-O.1	1,93	%38,6	<i>Fusarium</i> sp. 158-A.3	1,87	%37,4
<i>Fusarium</i> sp. 43-O.4	2,2	%44	<i>Fusarium</i> sp. 115-O.1	2,27	%45,5	<i>Fusarium</i> sp. 159-A.3	1,53	%30,6
<i>Fusarium</i> sp. 44-O.4	2,47	%49,4	<i>Fusarium</i> sp. 116-O.1	2,67	%53,4	<i>Fusarium</i> sp. 160-A.3	1,8	%36

Tablo 4.1 (devam)

<i>Fusarium</i> sp. 46-O.1	1,53	%30,6	<i>Fusarium</i> sp. 117-A.3	2,47	%49,4	<i>Fusarium</i> sp. 161-A.4	2,4	%48
<i>Fusarium</i> sp. 48-O.1	2	%40	<i>Fusarium</i> sp. 118-A.3	3	%60	<i>Fusarium</i> sp. 162-A.4	2,27	%45,4
<i>Fusarium</i> sp. 50-O.1	2,4	%48	<i>Fusarium</i> sp. 119-A.3	1,2	%24	<i>Fusarium</i> sp. 163-A.4	2	%40
<i>Fusarium</i> sp. 51-O.1	3,07	%61,4	<i>Fusarium</i> sp. 120-A.3	3	%60	<i>Fusarium</i> sp. 164-A.5	2,2	%44
<i>Fusarium</i> sp. 52-O.1	2,13	%42,6	<i>Fusarium</i> sp. 121-A.3	2,53	%50,6	<i>Fusarium</i> sp. 165-A.5	2,47	%49,4
<i>Fusarium</i> sp. 53-O.4	2,07	%41,4	<i>Fusarium</i> sp. 122-A.3	3,4	%68	<i>Fusarium</i> sp. 166-A.5	2,67	%53,4
<i>Fusarium</i> sp. 56-O.4	2	%40	<i>Fusarium</i> sp. 123-A.3	2	%40	<i>Fusarium</i> sp. 167-A.5	1,4	%28
<i>Fusarium</i> sp. 58-O.4	2,6	%52	<i>Fusarium</i> sp. 125-A.3	2,1	%42	<i>Fusarium</i> sp. 168-A.5	1,73	%34,6
<i>Fusarium</i> sp. 61-O.1	2,27	%45,4	<i>Fusarium</i> sp. 127-A.4	2,67	%53,4	<i>Fusarium</i> sp. 169-A.5	2,4	%48
<i>Fusarium</i> sp. 64-O.1	2,6	%52	<i>Fusarium</i> sp. 128-A.4	3,27	%65,4	<i>Fusarium</i> sp. 170-A.5	3,8	%76
<i>Fusarium</i> sp. 65-O.4	2,3	%46	<i>Fusarium</i> sp. 129-A.3	4,3	%86	<i>Fusarium</i> sp. 171-A.5	1,67	%33,4
<i>Fusarium</i> sp. 66-O.4	2,13	%42,6	<i>Fusarium</i> sp. 130-A.4	2,47	%49,4	<i>Fusarium</i> sp. 172-A.5	3,6	%72
<i>Fusarium</i> sp. 69-O.4	2,8	%56	<i>Fusarium</i> sp. 132-A.4	2,07	%41,4	<i>Fusarium</i> sp. 173-A.5	2,53	%50,6
<i>Fusarium</i> sp. 70-O.4	0,73	%14,6	<i>Fusarium</i> sp. 133-A.4	2,13	%42,6	<i>Fusarium</i> sp. 174-A.5	1,8	%36
<i>Fusarium</i> sp. 72-O.4	2	%40	<i>Fusarium</i> sp. 135-A.4	3,93	%78,6	<i>Fusarium</i> sp. 175-A.5	4,6	%92

Tablo 4.1 (devam)

<i>Fusarium sp.</i> 73-O.4	2,3	%46	<i>Fusarium sp.</i> 136-A.4	2,3	%46	<i>Fusarium sp.</i> 176-A.5	3	%60
<i>Fusarium sp.</i> 74-O.4	2,07	%41,4	<i>Fusarium sp.</i> 137-A.4	2,2	%44	<i>Fusarium sp.</i> 179-A.5	2,3	%46
<i>Fusarium sp.</i> 77-O.4	2,67	%53,4	<i>Fusarium sp.</i> 138-A.4	2,6	%52	<i>Fusarium sp.</i> 181-A.5	2	%40
<i>Fusarium sp.</i> 78-A.2	2,73	%54,6	<i>Fusarium sp.</i> 139-A.4	1,4	%28	<i>Fusarium sp.</i> 182-A.5	1,27	%25,4
<i>Fusarium sp.</i> 79-A.2	1,4	%28	<i>Fusarium sp.</i> 140-A.4	3,4	%68	<i>Fusarium sp.</i> 183-A.5	2,67	%53,4

Çalışmamızda elde edilen 99 adet potansiyel *Fusarium* izolatından 96 tanesinin patojen olduğu görülmesi sebebiyle Uşak Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünden 22 adet patojen olmayan endofit *Fusarium* izolatı temin edilmiştir (Dilmaç vd., 2020). Tez çalışmasına bu 22 adet patojen olmayan endofit *Fusarium* izolatı ile devam edilmiştir.

4.6. Patojen Olmayan Endofit *Fusarium* İzolatlarında Fusarik Asit Üretiminin İncelenmesi

4.6.1 Patojen Olmayan Endofit *Fusarium* İzolatlarından Sıvı Kültürde Fusarik Asit Üretimi

Sıvı kültür üretimlerinde M-1 D (Pinkerton and Strobel, 1976) ve Czapek Dox (Hamid and Strange, 2000) besiyeri olmak üzere iki farklı besiyeri kullanılmıştır. Yapılan literatür taramasının sonucunda fusarik asit üretiminde çoğunlukla kullanıldığı görülen iki besiyeri bu tez çalışmasında yerini almıştır.

4.6.2 Patojen Olmayan Endofit *Fusarium* İzolatlarının Kültür Sıvılarında İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması

4.6.2.1 Biyokütle Miktarının Belirlenmesi

Kullanılan M-1 D ve Czapek Dox besiyerlerinde, aynı suş/izolatla yapılan üretimlerde inkübasyon sonrası misel kitlesi kuru ağırlıkları karşılaştırıldıklarında Tablo 4.2’te görüldüğü üzere Czapek Dox besiyerinde yapılan üretimlerde misel kütlesi kuru ağırlığı ortalamasının M-1 D besiyerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Tablo 4.2. *Fusarium* suş/izolatlarının Czapek Dox ve M1-D besiyerindeki üretim sonrası misel kütlesi kuru ağırlığının ortalaması

İzolat No	Misel Kütlesi Kuru Ağırlığı Ortalaması (Czapek Dox Besiyerinde)	Misel Kütlesi Kuru Ağırlığı Ortalaması (M1-D Besiyerinde)
<i>Fusarium</i> sp. 39	0,4557 g	0,2671 g
<i>Fusarium</i> sp. 32	0,5126 g	0,3084 g
<i>Fusarium</i> sp. 168	0,4575 g	0,2354 g
<i>Fusarium</i> sp. 60	0,4972 g	0,2482 g
<i>Fusarium</i> sp. 176	0,4102 g	0,2118 g
<i>Fusarium</i> sp. 76-b	0,3898 g	0,2095 g
<i>Fusarium</i> sp. Sus1T-1	1,3048 g	0,1735 g
<i>Fusarium</i> sp. Sus1T-2	0,5043 g	0,1766 g
<i>Fusarium</i> sp. Sus3T-3	0,4404 g	0,1735 g
<i>Fusarium</i> sp. Ş2T-1	1,463 g	0,2008 g
<i>Fusarium</i> sp. Ş6T-14	0,4339 g	0,1758 g

Tablo 4.2 (devam)

<i>Fusarium</i> sp. Ş6T-12	0,2899 g	0,3028 g
<i>Fusarium</i> sp. Ş7T-18	0,3421 g	0,1182 g
<i>Fusarium</i> sp. Ş3T-5	0,3379 g	0,2697 g
<i>Fusarium</i> sp. Ş6T-19	0,3144 g	0,2091 g
<i>Fusarium</i> sp. Y5T-11	0,4832 g	0,1667 g
<i>Fusarium</i> sp. Y6T-8	1,0043 g	0,2451 g
<i>Fusarium</i> sp. Y1T-17	0,4553 g	0,2088 g

Tablo 4.3'te görüldüğü üzere yapılan istatistiksel analiz testinde (t-Test) $P(T \leq t)$ iki-uçlu değeri 0,00014 ($p < 0,05$) çıktığı için aralarındaki ilişki anlamlı bulunmuştur.

Tablo 4.3. t-Test iki örnek ile yapılan istatistiksel analiz sonuçları

t-Test: Eşit Varyanslar Varsayarak İki Örnek		
	Değişken 1 (Czapek Dox besiyeri)	Değişken 2 (M1-D besiyeri)
Ortalama	0,560916667	0,216722222
Varyans	0,113338659	0,002528478
Gözlem	18	18
Birikimli Varyans	0,057933569	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
Df	34	
t Stat	4,290026452	
P(T<=t) tek-uçlu	6,99887E-05	

Tablo 4.3 (devam)

t Kritik tek-uçlu	1,690924255	
P(T≤t) iki-uçlu	0,000139977	
t Kritik iki-uçlu	2,032244509	

Biyotransformasyon metotları, immobilizasyon, suş geliştirme, besiyeri optimizasyonu, geçirgenlik ve nutrient eklenmesi gibi yöntemlerle biyokütle birikimi ve sekonder metabolit üretimi için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir (Murthy et al., 2014). Biyokütle ve sekonder metabolit üretimi arasındaki doğrusal ilişki yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu durum biyokütle üretimi daha fazla olan Czapek Dox besin ortamının sekonder metabolit üretimi için de daha elverişli olduğunu göstermektedir.

En uygun üretim ortamı olarak belirlenen Czapek Dox besiyeri ile, tez çalışmasının devamında patojen olmayan tüm endofit *Fusarium* izolatlarının sıvı kültürde üretimleri yapılmıştır. *Fusarium* izolatlarının Czapek Dox besiyerindeki üretim sonrası misel kütlesi kuru ağırlıklarının ortalaması Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4. Patojen olmayan endofit *Fusarium* izolatlarının Czapek Dox besiyerindeki üretim sonrası misel kütlesi kuru ağırlıklarının ortalaması

İzolat No	Misel Kütlesi Kuru Ağırlığı Ortalaması
<i>Fusarium</i> sp. Sus 6T-4	0,2627 g
<i>Fusarium</i> sp. Ş8T-7	0,2424 g
<i>Fusarium</i> sp. Ş3T-11	0,2264 g
<i>Fusarium</i> sp. Ş6T-21	0,2912 g
<i>Fusarium</i> sp. Ş7T-2	0,3423 g

Tablo 4.4. (devam)

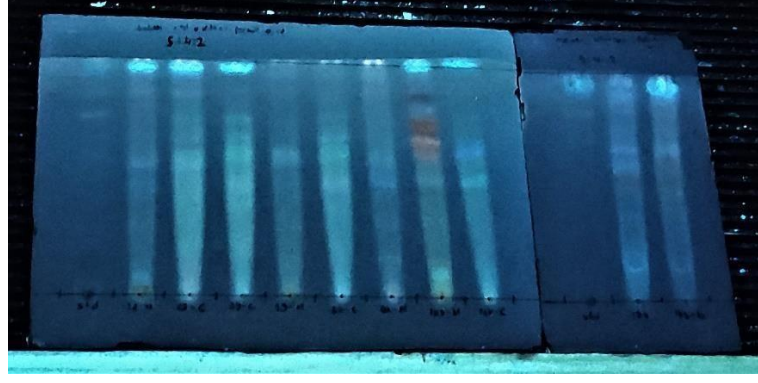
<i>Fusarium</i> sp. Ş3T-17	0,2983 g
<i>Fusarium</i> sp. Ş7T-16	0,478 g
<i>Fusarium</i> sp. Ş6T-3	0,4285 g
<i>Fusarium</i> sp. Y1T-9	0,2977 g
<i>Fusarium</i> sp. Y5T-6	0,6667 g

4.6.2.2 Kültür Filtratlarından Fusarik Asit Ekstraksiyonu

M1-D ve Czapek Dox besiyerlerinde yapılan üretimlerde, inkübasyon sonrası gerçekleştirilen fusarik asit taramasında; kloroform ile yapılan ekstraksiyonda fusarik aside rastlanmazken, etil asetat ile yapılan ekstraksiyonda fusarik asit varlığı tespit edilmiştir. Bu nedenle ekstraksiyon basamaklarında organik çözügen olarak etil asetat kullanılmasına karar verilmiştir.

4.6.2.3 İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması

Biyomühendislik Bölümü, Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda yer alan 6 adet *Fusarium* suşu ile hem sıvı kültür üretimleri hem de katı kültür üretimleri yapılmıştır. TLC (İnce Tabaka Kromatografisi) plakalarda yapılan fusarik asit taramasında sıvı kültür üretimlerinde Czapek Dox ve M1-D besin ortamları kullanılmıştır. Sıvı kültür üretimlerinin ekstreleri ile TLC plakalarda yapılan fusarik asit analizi Şekil 4.5'te görülmektedir. *Fusarium* sp. 32, *Fusarium* sp. 39 ve *Fusarium* sp. 60 kodlu suşların Czapek Dox besiyeri ile yapılan üretimlerinde fusarik asit varlığı tespit edilmiştir. Bu sebeple sıvı kültür üretimlerine Czapek Dox besiyeri ile devam edilmesi kararı alınmıştır.



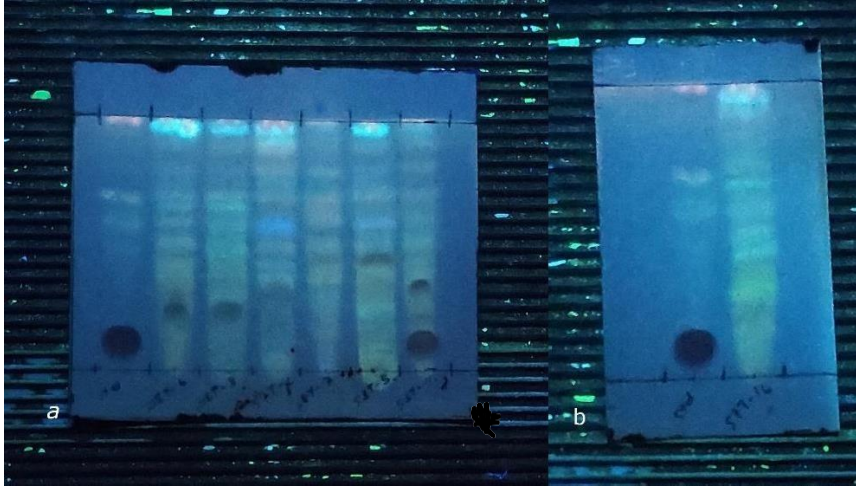
Şekil 4.5. Altı adet *Fusarium* suşu ile Czapek Dox ve M1-D besiyerlerinde yapılan üretimler sonrası TLC plakadaki fusarik asit analizi (Kontrol grubu olan standart en solda bulunmaktadır.)

En uygun üretim ortamı olarak belirlenen Czapek Dox besiyeriyle, tez çalışmasının devamında Uşak Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünden alınan 22 adet patojen olmayan *Fusarium* izolatı ile yapılan üretimlerde fusarik asit taraması yapılmıştır. Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de görüleceği üzere TLC plakalarda yapılan tarama sonucu; *Fusarium* sp. Ş2T-1, *Fusarium* sp. Ş3T-5, *Fusarium* sp. Ş3T-11, *Fusarium* sp. Ş3T-17, *Fusarium* sp. Ş6T-3, *Fusarium* sp. Ş6T-12, *Fusarium* sp. Ş6T-14, *Fusarium* sp. Ş6T-19, *Fusarium* sp. Ş8T-7, *Fusarium* sp. Y5T-6, *Fusarium* sp. Y5T-11 ve *Fusarium* sp. Y6T-8 kodlu izolatlarda fusarik asit varlığı tespit edilmiştir. Ekstraktlardaki fusarik asit varlığının tespiti Paterson and Rutherford’un 1991 yılında geliştirdiği yöntem modifiye edilerek gözlemsel olarak belirlenmiştir. 12 adet patojen olmayan *Fusarium* izolatının ve 3 adet *Fusarium* suşunun fusarik asit ürettiği bu yöntemle tespit edilmiştir.

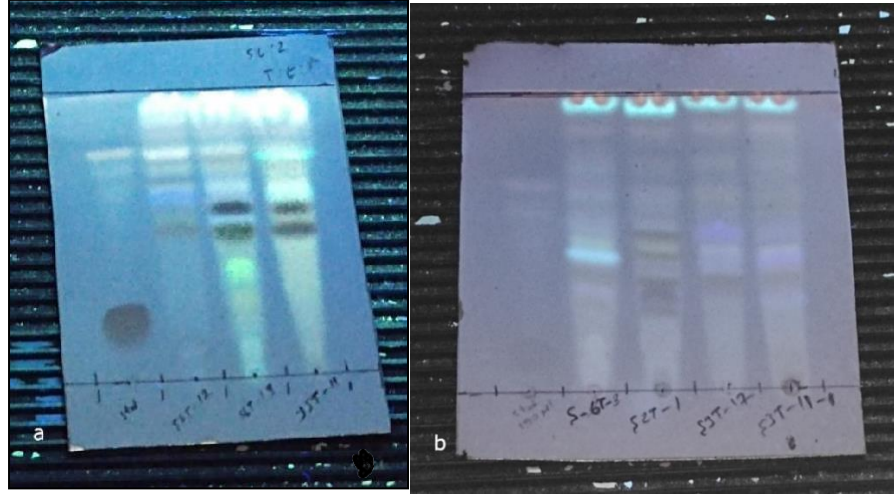
TLC plakalarda fusarik asit standardının görülebilmesi için uygun geliştirme solventinin tespiti yapılmıştır. Standartın TLC plakada gözlenebilmesi için 100 ppm’lik fusarik asit standardı (50 µl) TLC plakalara yüklendikten sonra asetonitril:su (1:1, v/v), etil asetat:metanol:su (8,5:2:1, v/v/v) ve toluen:etil asetat:formik asit (5:4:2, v/v/v) gibi farklı çözgen karışımlarında yürütülmüştür. UV ışık kabininde 254 nm’de yapılan gözlemler sonucu standartın görülebildiği toluen:etil asetat:formik asit (5:4:2, v/v/v) çözgen karışımı seçilmiştir. Ardından standartın daha net

görülebilmesi için TLC plakaya 50 µl, 100 µl, 150 µl ve 200 µl standart yüklemesi yapılmıştır. UV ışık kabininde yapılan gözlemler sonucunda 200 µl standart yüklemesi yapılmasına karar verilmiştir.

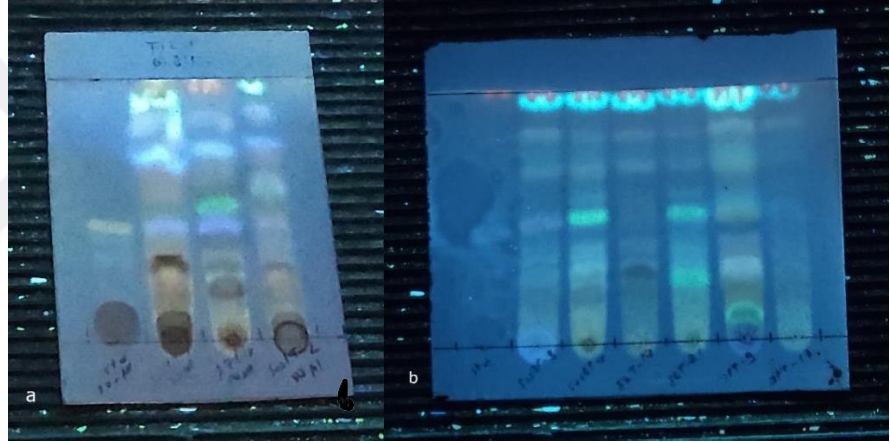
TLC plakalar toluen:etil asetat:formik asit, 5:4:2, v/v/v şeklinde formüle edilmiş olan geliştirme solventinin bulunduğu tanka yerleştirilmiş ve gelişmeleri sağlanmıştır. Şekil 4.6 ve 4.7’de görüldüğü üzere yürütülmüş olan TLC plakalarda fusarik asit standardının (100 ppm) tutunma faktörü (Retardation factor, R_f) 0,7 olarak ölçülmüştür. Denemelerde tutunma faktörünün küçültülmesi için (TLC plakalardaki sonuçların daha sağlıklı değerlendirilebilmesi için) geliştirme solventinin daha apolar hale getirilmesi gerekmiştir. Bu sebeple geliştirme solventi toluen:etil asetat:formik asit, 6:3:2, v/v/v şeklinde formüle edilmiştir. Değiştirilen geliştirme solventinde yürütülen plakalarda Şekil 4.8’de görüleceği üzere fusarik asit standardının R_f değeri 0,4 olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.6. FA standardı (en solda) ile birlikte TLC plakalara yüklenmiş ve yürütülmüş ekstraktların UV kabininde 254 nm’de görüntüsü



Şekil 4.7. FA standardı (en solda) ile birlikte TLC plakalara yüklenmiş ve yürütülmüş ekstraktların UV kabininde 254 nm’de görüntüsü



Şekil 4.8. FA standardı (en solda) ile birlikte TLC plakalara yüklenmiş ve yürütülmüş ekstraktların UV kabininde 254 nm’de görüntüsü

4.6.2.4 Ters Faz (RP) İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması

Fusarik asit ürettiği bir önceki plaka sisteminde belirlenen izolat/suşlar ile Bölüm 3.2.6.2.3’te belirtildiği gibi yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyon işleminin ardından ekstraktların konsantrasyonunun belirlenmesi için evaporatörde kullanılacak balonların her birinin darası alınmış ve kodlama yapılmıştır. Organik çözügenin (etil asetat, 40 °C) evaporatörde uçurulması sonrası balonlar tekrar hassas terazide tartılmıştır.

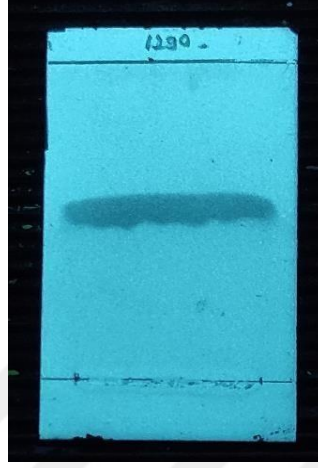
Elde edilen sonuçtan balonun darasının çıkarılması sonrası balonda bulunan örnek miktarı tespit edilmiştir. Ardından ekstraktlar farklı miktarda metanol ile çözündürülmüş ve ekstraktların konsantrasyonu 50 mg/ml olarak ayarlanmıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. TLC plaka analizi ile fusarik asit üreticisi olduğu belirlenen izolat/suşların yeniden yapılan üretimlerinde balonda kalan örnek miktarı (mg) ve örneklerle eklenen metanol hacmi (ml)

İzolat Kodu	Balonda Kalan Örnek Miktarı (mg)	Örneklere Eklenen Metanol Hacmi (ml)
<i>Fusarium</i> sp. Ş6T-3	180	3,6
<i>Fusarium</i> sp. Ş2T-1	230	4,5
<i>Fusarium</i> sp. Ş3T-11	430	8,6
<i>Fusarium</i> sp. Y5T-11	230	4,6
<i>Fusarium</i> sp. Ş6T-14	210	4,2
<i>Fusarium</i> sp. Y5T-6	120	2,4
<i>Fusarium</i> sp. Y6T-8	110	2,2
<i>Fusarium</i> sp. Ş8T-7	200	4
<i>Fusarium</i> sp. Ş6T-12	450	9
<i>Fusarium</i> sp. Ş6T-19	160	3,3
<i>Fusarium</i> sp. 60	460	9,2
<i>Fusarium</i> sp. 32	110	2,2
<i>Fusarium</i> sp. 70-O.4	450	9
<i>Fusarium</i> sp. 39	180	3,6

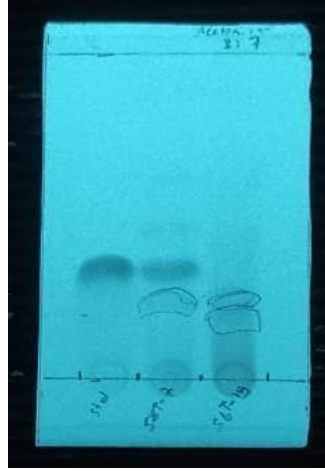
İkinci TLC sistemi için RP (reversed-phase, ters-faz) TLC plaka kullanılmıştır. Öncelikle standardın görüntüsünü elde etmek için uygun konsantrasyon oranı tespiti yapılmıştır. Bunun için 100 ppm'lik ve 1000 ppm'lik fusarik asit standardı RP TLC plakalara yüklenmiş ve asetonitril:su, (5:5, v/v) çözgen karışımında yürütülmüştür. Bu denemelerin sonucunda

1000 ppm'lik standartta (Şekil 4.9) madde yoğunluğunun fazla olması sebebiyle 100 ppm'lik konsantrasyon oranına karar verilmiştir. Standarttan 50 µl ve 25 µl'lik yüklemeler yapılarak, UV ışık kabiniinde gözlemler gerçekleştirilmiş ve 25 µl standart yüklemesi yapılmasına karar verilmiştir.



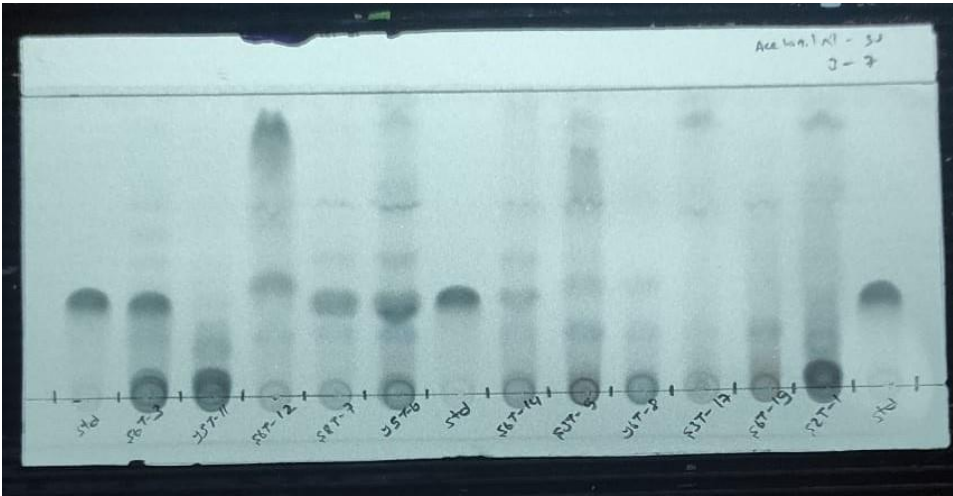
Şekil 4.9. RP TLC plakalara yüklenmiş ve yürütülmüş FA standardının UV kabiniinde 254 nm'de görüntüsü

Uygun standart konsantrasyonu ve yükleme miktarına karar verilmesinin ardından, uygun geliştirme solventinin belirlenmesi için 100 ppm'lik fusarik asit standardı ve iki adet ekstrakt plakalara 25 µl yüklenmiştir. Ardından plakalar asetonitril:su (5:5, v/v), aseton:su (5:5, v/v), asetonitril:su (6:4, v/v) ve asetonitril:su (7:3, v/v) çözgen karışımlarının bulunduğu tanklara ayrı ayrı yerleştirilmiş ve yürütülmüştür. Şekil 4.10'da 3. kolonda görüldüğü üzere üst üste gelen iki molekülü ayırmak için asetonitril:su (7:3, v/v) çözgen karışımı seçilmiştir.



Şekil 4.10. FA standardı (en solda) ile birlikte RP TLC plakalara yüklenmiş ve yürütülmüş ekstraktların UV kabininde 254 nm’de görüntüsü

Yapılan optimizasyon sonrası, uygun fusarik asit standardı konsantrasyon oranı, yükleme miktarı ve geliştirme solventinin belirlenmesinin ardından 25 µl fusarik asit standardı (100 ppm) ve ekstraktlar (50 mg/ml) RP TLC plakaya yüklenmiş ve asetonitril:su (7:3, v/v) geliştirme solventinde yürütülmüştür. RP TLC plaka 254 nm UV ışık (CAMAG) altında incelenmiştir (Srobarova et al., 2004; Eged, 2005). Yapılan inceleme sonrası fusarik asit varlığı *Fusarium* sp. Ş6T-3, *Fusarium* sp. Ş8T-7, *Fusarium* sp. Y5T-6, *Fusarium* sp. Ş6T-14 ve *Fusarium* sp. Ş3T-11 kodlu izolatlarda tespit edilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. FA standardı ile birlikte RP TLC plakalara yüklenmiş ve yürütülmüş ekstraktların UV kabininde 254 nm’de görüntüsü

4.6.3 Patojen Olmayan Endofit *Fusarium* İzolatlarından Katı Kültürde Fusarik Asit Üretimi

Patojen olmayan endofit *Fusarium* izolatlarının fusarik asit tayini için katı kültürde yapılan üretimlerinde besiyeri olarak pirinç kullanılmıştır. Denemelerde Biyomühendislik Bölümü, Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda yer alan 6 adet *Fusarium* suşu kullanılmıştır. Pirinç ile hazırlanan besiyerinde dört haftalık (25 °C’de) inkübasyon süresinde pirinç taneleri yavaş yavaş üretimi yapılan izolatın sporlarının rengini almaya başlamıştır.

Erlenlerde inkübasyon sonrası oluşan yoğun sporülasyon gerek sağlık açısından gerekse kontaminasyona sebep olması açısından önemlidir. Bu yüzden sporların ekstraksiyon öncesi ısı işlemi ile öldürülüp etkisiz hale getirilmesi gerekmektedir (Eltem, 1996). Bu sebeple inkübasyon sonrası erlenler 110 °C’de 10 dakika tutularak sporların ölmesi sağlanmıştır.

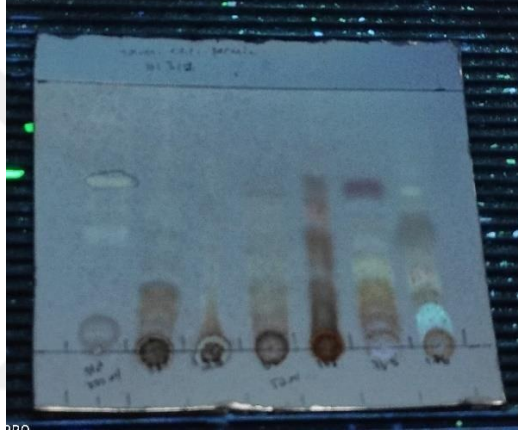
4.6.4 Patojen Olmayan Endofit *Fusarium* İzolatlarının Katı Kültür Ortamında İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması

4.6.4.1 Kültür Filtratlarından Fusarik Asit Ekstraksiyonu

Pirinç ile hazırlanan katı kültür ortamında yapılan bu üretim, Czapek Dox ve M-1 D besiyerinde yapılan sıvı kültür üretimleriyle karşılaştırıldığında ekstraksiyon sonrası fusarik asit varlığına sadece sıvı kültür ortamı olan Czapek Dox besiyerinde rastlanmıştır. Bu sebeple üretilere Czapek Dox besiyeri ile devam edilme kararı alınmıştır. Ayrıca katı kültür ortamında yapılan üretimler sonrası ekstraksiyon işlemleri, sıvı kültür ortamında yapılan üretimler sonrası gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerine göre daha fazla basamaktan oluşmaktadır ve daha fazla miktarda organik çözügen kullanımını gerektirmektedir. Bu sebeple yapılan denemeler sonucu, sıvı kültür üretimlerinin hem zaman açısından hem de ekonomik açıdan daha verimli olduğu kanaatine varılmıştır.

4.6.4.2 İnce Tabaka Kromatografisi ile Fusarik Asit Taranması

Biyomühendislik Bölümü, Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda yer alan 6 adet *Fusarium* suşu ile yapılan hem sıvı kültür ortamında hem de katı kültür üretimlerinin TLC plakalardaki analizine bakıldığında katı kültür üretimlerinde sayıca daha fazla metabolitin varlığı gözlemsel olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.12). Yapılan literatür taramasında pirincin yüksek konsantrasyonlarda metabolize edilebilir karbonhidratlar içermesi sebebiyle fungusların toksin üretiminde oldukça elverişli bir besin ortamı olduğu görülmüştür (Park and Bullerman, 1983).



Şekil 4.12. FA standardı (en solda) ile birlikte TLC plakalara yüklenmiş ve yürütülmüş *Fusarium* sp. 32, *Fusarium* sp. 39, *Fusarium* sp. 60, *Fusarium* sp. 168, *Fusarium* sp. 176 ve *Fusarium* sp. 76-b kodlu ekstraktların UV kabininde 254 nm’de görüntüsü

4.6.5 Patojen Olmayan Endofit *Fusarium* İzolatlarının Kültür Ortamında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Fusarik Asit Üretiminin Belirlenmesi

TLC plakalarda fusarik asit ürettiği gözlemlenen izolat/suşlar ile HPLC analizi yapılarak kantitatif miktar tayini yapılmıştır. HPLC analizi sonuçlarına göre *Fusarium* sp. Ş6T-3, *Fusarium* sp. Ş2T-1, *Fusarium* sp. Ş3T-11, *Fusarium* sp. Y5T-11, *Fusarium* sp. Ş6T-14 *Fusarium* sp. ve Y5T-6 kodlu 6 adet izolat/suşta fusarik asit varlığı belirlenmiştir. Her bir izolat/suş için HPLC analizi 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bölüm 3.2.6.5'te belirtilen HPLC analizi sonuçlarının incelenmesinin ardından metot, kromatogramlarda moleküllerin üst üste gelmesi ve analizlerde standart sapma değerinin yüksek olmasından dolayı (daha sağlıklı sonuç alınabilmesi için) optimize edilmiştir. Bunun için HPLC metodunda yine mobil faz olarak %1'lik KH_2PO_4 (A) ve asetonitril (B) kullanılmıştır. Analiz 0,01. dakikada 95A/5B ile başlayıp kompozisyon 50,00. dakikada 50A/50B'ye yükseltilmiştir. 50. dakikaya kadar 50A/50B ile devam eden analizde kompozisyon 50,01. dakikada 20A/80B'ye getirilmiştir. 55. dakikaya kadar aynı koşullar ile devam eden analizde 55,01. dakikada kompozisyon 95A/5B'ye ulaşmıştır. Toplam analiz süresi 60 dakikadır. Her analiz başlangıcından önce, kolon başlangıç koşullarıyla 10 dakika dengelenmiştir. Tablo 3.9'da verilen koşullarda analiz gerçekleştirilmiştir.

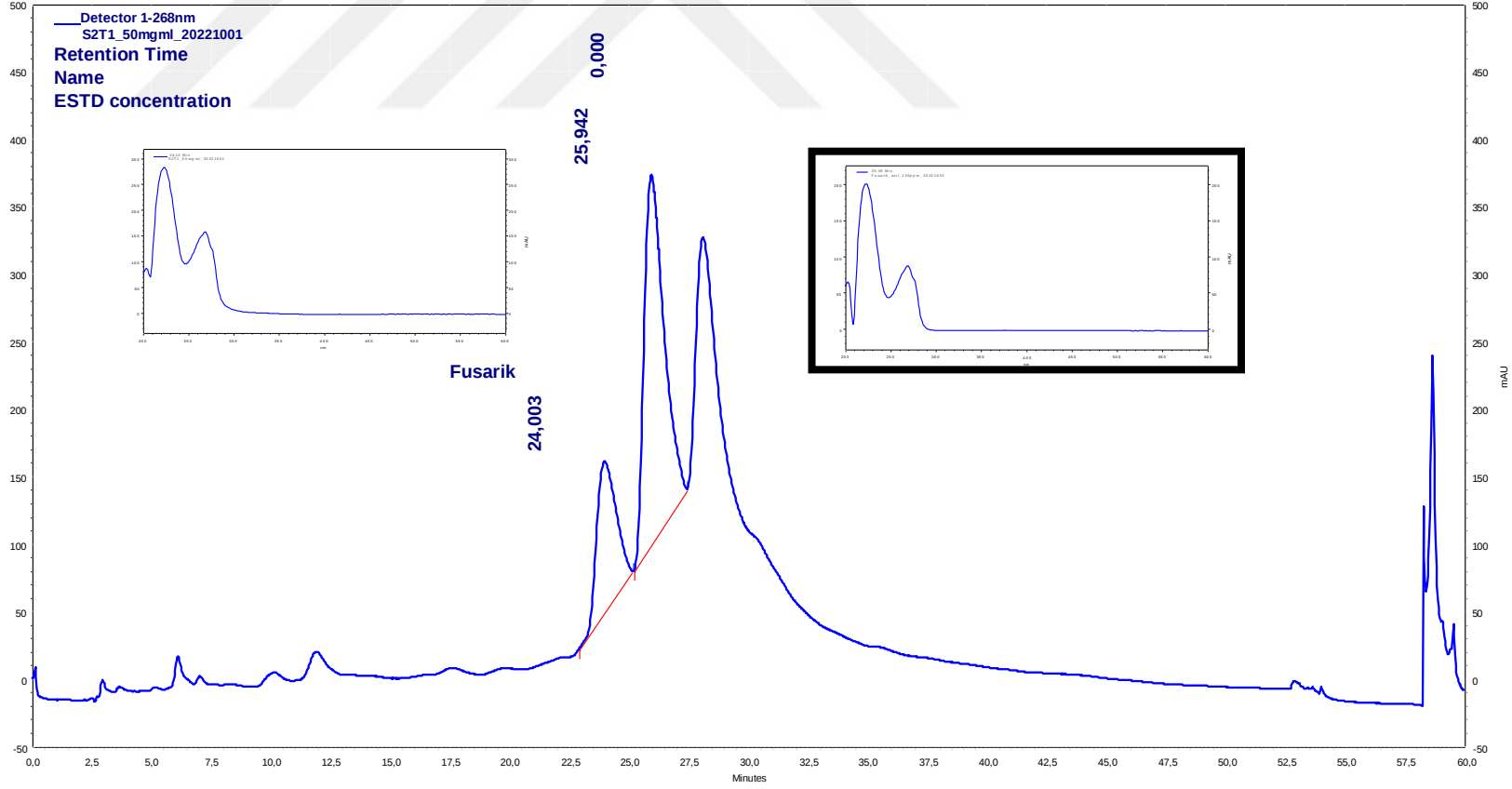
Optimize edilerek iyileştirilen metodun sonuçları Tablo 4.6'da verilmiştir. Analiz sonuçlarında birbirinden ayrılması hedeflenen moleküller ayrılmış ve yüksek standart sapma değerine sahip olan analizlerin sonuçları iyileştirilmiştir.

FA standardı (100 ppm) ile birlikte *Fusarium* sp. Ş2T-1 kodlu izolatın (50 mg/ml) kromatogramı Şekil 4.13'te verilmiştir. Fusarik asit varlığı HPLC analizi ile anlaşılmış olan diğer suş/izolatların kromatogramları ise Ek 2'de verilmiştir.

Tablo 4.6. Fusarik asit ürettiği belirlenen izolat/suşların üç kez tekrarlanan analiz sonuçları, analizlerin ortalaması, standart sapma değeri, toplam ekstre edilmiş fusarik asit kütlesi (µg) ve ekstrakttaki fusarik asit yüzdesi (%)

İzolat/suş Kodu	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama (µg/ml)	Standard Sapma	Toplam Ekstre Edilmiş Fusarik Asit Kütlesi (µg)	Ekstrakttaki Fusarik Asit Yüzdesi (%)
<i>Fusarium</i> sp. Ş6T-3	93,584	100,977	89,604	94,72	5,77	3410,00	1,894
<i>Fusarium</i> sp. Ş2T-1	111,200	108,263	104,797	108,9	3,2	486,39	0,211
<i>Fusarium</i> sp. Ş3T-11	104,721	112,856	116,621	111,40	6,08	958,03	0,223
<i>Fusarium</i> sp. Y5T-11	157,4	158,449	153,726	156,53	2,48	720,02	0,313
<i>Fusarium</i> sp. Ş6T-14	25,145	30,173	33,321	29,55	4,12	124,9	0,059
<i>Fusarium</i> sp. Y5T-6	17,504	17,403	16,686	17,20	0,45	41,27	0,034

Şekil 4.13 FA standardı (100 ppm) ile birlikte *Fusarium* sp. Ş2T-1 kodlu izolatın (50 mg/ml) fusarik asit analizi



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında Ankara, İzmir illerindeki farklı lokasyonlardan toplanan ayırık otunun (*Agropyron repens*) ve canavar otunun (*Orobancha* spp.) kökünden (rizosfer bölgesindeki toprakla birlikte) alınan örnekler ile izolasyonlar yapılmıştır. Bu aşamada, 183 adet fungus izolatu elde edilmiştir. *Fusarium* türüne ait olan izolatların tespiti için, *Fusarium* türlerinin tanıları kültürel ve morfolojik özellikleri dikkate alınmıştır. Gerlach ve Nirenberg'in 1982 yılında belirttiği taksonomik sistemden yararlanılarak eleme yapılmıştır. Bu eleme sonucunda 99 adet *Fusarium* izolatu elde edilmiştir.

Gerçekleştirilen tez çalışmasıyla literatüre katkı sağlanan özgün değerlerden ilki ülkemiz topraklarından *Fusarium* izolatları elde edilmiş olmasıdır. Ayrıca izole edilmiş olan 99 adet *Fusarium* izolatu ile yerli bir *Fusarium* spp. koleksiyonu oluşturulmuştur.

Fusarium spp. tarafından üretilen fusarik asidin tayini için, yapılan üretim çalışmalarında; Czapek Dox, M-1 D ve pirinç ile hazırlanan besiyeri kullanılmış ve bu ortamlar arasında fusarik asidin varlığına Czapek Dox besiyerinde rastlanmıştır. Yapılan katı kültür ve sıvı kültür üretimleri karşılaştırıldığında fusarik asit varlığına sıvı kültür üretimlerinde rastlanmış üretime sıvı kültür ortamında yapılan üretimlerle devam edilmiştir. Czapek Dox besiyeri, M-1 D besiyeri ile yürütülen sıvı kültürdeki üretimler sonucu izolatların misel kitlesinin kuru ağırlıkları hesaplanmış ve Czapek Dox besiyerinde yapılan üretimlerde misel kitlesi kuru ağırlığının M-1 D besiyerine oranla daha fazla olduğu yaygın olarak görülmüştür.

TLC plakalarda gerçekleştirilen fusarik asit taramalarında kloroform ile yapılmış olan ekstraksiyonlarda fusarik asite rastlanmazken, etil asetat ile yapılmış olan ekstraksiyonlarda fusarik asit varlığına rastlanmıştır. Aynı izolat ile aynı besin ortamında yapılan üretimlerde etil asetat ile yapılan ekstraksiyonda fusarik asit varlığının tespit edilmesi fusarik asitin etil asetatta daha iyi çözündüğünü düşündürmektedir.

Sekonder metabolit üretme potansiyelleri çok yüksek olan *Fusarium* türlerinin; alkaloid, seskiterpen, poliketid, karotenoid, antrakinin, siklopentanon ve naftokinon türevleri gibi antifungal ve antibakteriyel özelliklere sahip pek çok sekonder metabolit ürettikleri yapılan çalışmalarda görülmüştür. Gerçekleştirilen tez çalışmasında *Fusarium* türleri tarafından üretilen ve bir fitotoksin olan fusarik asit üzerine çalışılmıştır. Sekonder metabolit üretiminde ilgiyi üzerine toplayan *Fusarium* türleri, bu alanda gelecek vadetmektedir.

Bu çalışma neticesinde ortaya çıkan kültür sıvılarının (fusarik asit üretmiş olan) özellikle fusarik asitin çimlenmesini inhibe ettiği canavar otu tohumlarındaki etkisinin görülmesi için denemeler yapılmalıdır. Öncelikle in vitro denemeleri ardından ise in vivo tarla denemelerinde kullanılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abbas, H. K., Boyette, C. D., Hoagland, R. E. and Vesonder, R. F., 1991, Bioherbicidal potential of *Fusarium moniliforme* and its phytotoxin, fumonisin, *Weed Sci.*, 39:673-677pp.

Abbas, H. K., Tanaka, T. and Duke, S. O., 1995, Pathogenicity and/or phytotoxicity of *Alternaria alternata* and its AAL-toxin, and *Fusarium moniliforme* and its fumonisin B1 on tomato varieties, *J. Phytopathol.*, 143:329-334pp.

Abouzeid, M. A., Boari, A., Zonno, M. C., Vurro, M. and Evidente, A., 2004, Toxicity profiles of potential biocontrol agents of *Orobanche ramosa*. *Weed Science*, 52(3):326-332pp.

Ainsworth, G. C., 1971, Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi (including the lichens by PW James and DL Hawksworth), *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi (including the lichens by PW James and DL Hawksworth)*.

Aldrick, A. J. and Hajselova, M., 2004, Zearalenone. Mycotoxins in Food-Detection and Control. Magan, N. and Olsen, M. (eds.), *CRC Press, Woodhead Publishing Ltd.*, Cambridge., 353-362pp.

Arıcı, M., Gümüş, T. and Dağhoğlu, O., 2002, Mısır ve mısır kaynaklı ürünlerde fumonisinler. Hububat 2002- Hububat Ürünleri Teknolojisi Kongre ve Sergisi. Bayram, M. and Bozkurt, H. (eds.), Gaziantep Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Gaziantep, 129-137s.

Arnold, A. E., Herre, E. A., 2003, Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae), *Mycologia*, 95:388-98pp.

Arnold, A. E., 2007, Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21:51-56pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Bacon, C.W., Porter, J.K., Robbins, J.D., Luttrell, E.S., 1977, Epichloe typhina from toxic tall fescue grasses, *Applied and Environmental Microbiology*, 34:76-81pp.

Bacon, C.W., White, J.F., 2000, Microbial Endophytes, New York: Marcel Dekker.

Bai, G., Shaner, G., 2004, Management and Resistance in Wheat and Barley to FusariumHead Blight, *Annual Review of Phytopathology*, 42:135-161pp.

Basbagci, G., Unal, F., Uysal, A. ve Dolar, S., 2019, Identification and pathogenicity of Rhizoctonia solani AG-4 causing root rot on chickpea in Turkey, *Spanish Journal of Agricultural Research*, 17(2):1007-1019pp.

Bayman, P., 2006, Diversity, scale and variation of endophytic fungi in leaves of tropical plants, *In Microbial Ecology of Aerial Plant Surfaces*, 37–50pp.

Beram, R. C., Beram, A., Doğmuş Lehtijarvi, H., T., 2016, Fungal Endofitler ve Etkileşimler, 7(2):161-166pp.

Bills, G. F., 1996, Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants, 124:31-65pp.

Blunt, J.W., Carroll, A.R., Copp, B.R., Davis, R.A., Keyzers, R.A., Prinsep M.R., 2018, Marine natural products, *Nat. Prod. Rep.*, 35(1):8-53pp.

Bohni, N., Hofstetter, V., Gindro, K., Buyck, B., Schumpp, O., Bertrand, S., et al., 2016, Production of fusaric acid by *Fusarium* spp. in pure culture and in solid medium cocultures., *Molecules*, 21:370pp.

Booth, C., 1971, The Genus *Fusarium*, Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.

Boruta, T., 2018, Uncovering the repertoire of fungal secondary metabolites: From Fleming’s laboratory to the International Space Station. *Bioengineered*, 9(1):12-16pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Bouizgarne, B., Brault, M., Pennarun, A.M., Rona, J.P., Ouhdouch, Y., ElHadrami, I. and Bouteau, F., 2004. Electrophysiological responses to fusaric acid of root hairs from seedlings of date palm susceptible and resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*., *J. Phytopathol.*, 152:321-324pp.

Bouizgarne, B., El-Maarouf-Bouteau, H., Madiona, K., Biligui, B., Monestiez, M., Pennarun, A.M., Amiar, Z., Rona, J.P., Ouhdouch, Y., El Hadrami, I. and Bouteau, F., 2005, A Putative Role for Fusaric Acid in Biocontrol of the Parasitic Angiosperm *Orobanche ramosa*, *MPMI Vol.*, 19:550-556pp.

Bouizgarne, B., El-Maarouf-Bouteau, H., Frankart, C., Reboutier, D., Madiona, K., Pennarun, A.M., Monestiez, M., Trouverie, J., Amiar, Z., Briand, J., Brault, M., Rona, J.P., Ouhdouch, Y., El Hadrami, I. and Bouteau F., 2006, Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cells to fusaric acid: Toxic and signaling effects, *New Phytol.*, 169:209-218pp.

Brakhage, A.A., 2013, Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1):21-32pp.

Brakhage, A.A. and Schroeckh V., 2011, Fungal secondary metabolites - Strategies to activate silent gene clusters, *Fungal Genetics and Biology*, 48:15-22pp.

Cantürk, Z., 2015, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerine ait sekonder metabolitler ve sınıflandırılması, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 13(2):1-8s.

Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W. and Keller N.P., 2002, Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3):447-59pp.

Capasso, R., Evidente, A., Cutignano, A., Vurro, M., Zonno, M.-C. and Bottalico, A., 1996, Fusaric and 9, 10-dehydrofusaric acids and their methyl esters from *Fusarium nygamai*, *Phytochemistry*, 41:1035-1039pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Carroll, A.R., B.R. Copp, R.A. Davis, R.A. Keyzers and M.R. Prinsep, 2020, Marine natural products, *Nat. Prod. Rep.*, 37(2):175–223pp.

Chase, T.-N., 1974, Fusaric acid in Parkinson's disease. *Neurology*, 24:637-639pp.

Chaverri, P. and Gazis, R., 2010, Perisporiopsis lateritia, a new species on decaying leaves of Hevea spp. From the Amazon basin in Peru. *Mycotaxon*, 113:163-69pp.

Dastjerdi, R., Falahati R.M. and Jafarpour, B., 2003, Identification of Fusarium species associated with sugar beet root in Khorasan province and investigation of the pathogenicity of Fusarium oxysporum, *Journal of Sugar Beet*, 18(2):143-154pp.

Demain, AL., 1998, Induction of microbial secondary metabolism. *Int. Microbiol.*, 1(4):259-264pp.

Dikilitaş, M., Katircioğlu, Y. Z. ve Altınok, H. H., 2011, Fungus ve fungal materyallerin uzun dönem saklanması, korunması ve geri kazanımı üzerine varılan son gelişme ve yöntemler. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(1):55-69s.

Dilmaç, M., Dinler, H. ve Barış, K. A. K. İ., 2020, Nonpatojen Fusarium spp.'lerinin nohutta Fusarium solgunluğuna karşı in vitro koşullarda antagonist etkilerinin belirlenmesi, *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 7(3):775-792s.

Doll, S. and Danicke, S., 2011, The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding, *Prev Vet Med.*, 102(2):132-145pp.

Dor, E., Evidente, A., Amalfitano, C., Agrelli, D. and Hershenhorn, J., 2007, The influence of growth conditions on biomass, toxins and pathogenicity of Fusarium oxysporum f. sp. orthoceras, a potential agent for broomrape biocontrol, *Weed Research*, 47(4):345-352pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Dowd, P.-F., 1999, Relative inhibition of insect phenoloxidase by cyclic fungal metabolites from insect and plant pathogens, *Nat. Toxins.*, 7:337-341pp.

Eged, S., 2005, Thin-layer chromatography-an appropriate method for fusaric acid estimation, *Biologia*, 60:104p.

Egel, D. S. and Martyn, R. D., 2007, Fusarium wilt of watermelon and other cucurbits, The Plant Health Instructor.

Eltem, R.,1996, Growth and aflatoxin B1 production on olives and olive paste by moulds isolated from ‘Turkish-style’ natural black olives in brine. *International journal of food microbiology*, 32(1-2):217-223s.

Ergün, A., 2014, İthal Edilen Bazı Çiçek Soğanlarında Fusarium spp.’nin Moleküler Yöntemlerle Saptanması ve Kimyasal Mücadele Olanakları, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir, 100s.

Faeth, S. H., and Fagan, W. F., 2002, Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists, *Integrative and Comparative Biology*, 42:360-68pp.

Fernandez-Pol, J.-A., Klos, D.-J. and Hamilton, P.-D., 1993, Cytotoxic activity of fusaric acid on human adenocarcinoma cells in tissue culture, *Anticancer Res.*, 13:57-64pp.

Fernandez-Pol, J.-A., Klos, D.-J. and Hamilton, P.-D., 2001, Antiviral, cytotoxic and apoptotic activities of picolinic acid on human immunodeficiency virus-1 and human herpes simplex virus-2 infected cells. *Anticancer Res.*, 21:3773-3776pp.

Fox, E.M. and Howlett B.J., 2008, Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology, *Current Opinion in Microbiology*, 11:481-487pp.

Gamboa, M. A., Laureano, S. and Bayman, P., 2002, Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? *Mycopathologia*, 156:41-45pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Gazis, R. and Chaverri, P., 2010, Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru, *Fungal Ecology*, 3:240-50pp

Gerlach, W., Nirenberg, H., Eckart, I., Rummland, I., & Schwarz, R., 1982, *The genus Fusarium: a pictorial atlas*, 209:1-406pp.

Gimenez, C., Cabrera, R., Reina, M. and Gonzalez-Coloma, A., 2007, Fungal endophytes and their role in plant protection, *Current Organic Chemistry*, 11:707-20pp.

Gordon, T.R and Martyn, R.D., 1997, The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*, *Annual Review of Phytopathology*, 35:111-128pp.

Grün, C.H., 2003, Structure and biosynthesis of fungal α -glucans, Utrecht University, Netherlands.

Halkman, A.K. ve Ayhan, K., 2000, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını, Ankara, 522s.

Hamid, K. and Strange, R.N., 2000, Phytotoxicity of solanapyrones A and B produced by the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. and the apparent metabolism of solanapyrone A by chickpea tissues, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56:235-244pp.

Hawksworth, D. L. and Rossman, A. Y., 1997, Where are all the undescribed fungi *Phytopathology*, 87:888-91pp.

Herskovits, E. and Figueroa, G.-E., 1973, Effect of fusaric acid in Parkinson's disease. *Medicine*, 33-51pp.

Herrera, J., Khidir, H. H., Eudy, D.M., Porras-Alfaro, A., Natvig, D. O. and Sinsabaugh, R. L., 2010, Variation in root associated fungal endophytes: some taxonomic consistency at a transcontinental scale. *Mycologia*, 102:1012-26pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Hoveland, C. S., 1993, Importance and economic significance of the Acremonium endophytes to performance of animals and grass plant, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 44:3-12pp.

Huang, B. B., Liu, Y. Y., Zhu, P. F., Jiang, Y. C., and Ouyang, M., 2020, Concise Total Synthesis and Antifungal Activities of Fusaric Acid, a Natural Product, *Fujian Agriculture and Forestry University, China*.

Humpf, H. U. and Voss, K. A., 2004, Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins, *Mol. Nutr. Food Res.*, 48:255-269pp.

Jumpponen, A. and Jones, K. L., 2009, Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytologist*, 184:438-48pp.

Kannadan, S. and Rudgers, J. A., 2008, Endophyte symbiosis benefits a rare grass under low water availability. *Functional Ecology*, 22:706-713pp.

Karakaya, S., 2004, Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(6):453-464s.

Karman, M., 1971, Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler, Denemelerin Kuruluşu ve Değerlendirme Esasları, *T.C. Tarım Bak. Zir.Müc. Zir. Karantina Gn. Müd. Yayınları*, Mesleki Kitaplar serisi, 279s.

Khidir, H. K., Eudy, D. M., Porras-Alfaro, A., Herrera, J., Natvig, D. O. and Sinsabaugh, R. L., 2010, A general suite of fungal endophytes dominate the roots of two dominant grasses in a semiarid grassland, *Journal of Arid Environments*, 74:35-42pp.

Kobayashi, D. Y. and Palumbo, J. D., 2000, Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Bacon, C. W., White, J. F., (eds) *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, New York, 199-236pp.

Kusari, S. and Spiteller, M., 2012, Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. In *Metabolomics*, U. Roessner, ed, 241-266pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kwon, H.-R., Son, S.-W., Han, H.-R., Choi, G.-J., Jang, K.-S., Choi, Y.-H., Lee, S., Sung, N.-D. and Kim, J.-C., 2007, Nematicidal activity of bikaverin and fusaric acid isolated from *Fusarium oxysporum* against pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Plant Pathol. J.*, 23:318-321pp.

Lam, K.S., 2007, New aspects of natural products in drug discovery, *Trends Microbiol* 15(6):279-289.

Larkin, R.P. ve Fravel, D.R., 1998, Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organism for control of *Fusarium* wilt of tomato, *Plant Disease*, 82:1022-1028pp.

Leslie, J. F. and Summerell, B. A., 2006, The *Fusarium* laboratory manual. Ames, Iowa, USA: Blackwell Professional.

Li, Y., Wang, Z., Beier, R. C., Shen, J., De Smet, D., De Saeger, S. and Zhang, S., 2011, T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin: review of toxicity, metabolism, and analytical methods, *J Agric Food Chem.* 59:3441-3453pp.

Li, J.-F., Sun, W.-Y., Guo, Z.-X., Lu, C.-H., Shen, Y.-M., 2014, Fusaric acid modulates type three secretion system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 449:455-459pp.

Li, M., Yu, R., Bai, X., Wang, H., Zhang, H., 2020, *Fusarium*: a treasure trove of bioactive secondary metabolites, *Natural Product Reports*, 37(12):1551-1702pp.

Lodge, D. J., Fisher, P. J., Sutton, B. C., 1996, Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia*, 88:733-38pp.

Lopez-Diaz, C., Rahjoo, V., Sulyok, M., Ghionna, V., Martín-Vicente, A., Capilla, J., et al., 2018, Fusaric acid contributes to virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Molecular Plant Pathology*, 19:440-453pp.

MacFaddin, 1985, Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Magnoli, C. E., Saenz, M. A., Chiacchiera, S. M. and Dalcero, A. M., 1999, Natural occurrence of *Fusarium* species and fumonisin-production by toxigenic strains isolated from poultry feeds in Argentina, *Mycopathologia*. 145:35-41pp.

Mandeel, Q. ve Baker, R., 1991, Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*, *Phytopathology*, 81:462-469pp.

Mengüç, Ç., Elibüyük. Ö. İ., 2014, Yabancı Otlarda Herbisitlere Dayanıklılık ve Yönetimi, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 7(2):19-22s.

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*, 156:129-139pp.

Miedaner, T., Caixeta, F. and Talas, F., 2013, Head-Blighting Populations of *Fusarium Culmorum* from Germany, Russia and Syria Analyzed by Microsatellite Markers show a Recombining Structure, *European Journal of Plant Pathology*, 137:743-752pp.

Minervini, F., Giannoccaro, A., Cavallini, A. and Visconti, A., 2005, Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters, *Toxicol Lett*, 159(3):272-83pp.

Munkvold, G. P., Arias, S., Taschl, I. and Gruber-Dorninger, C., 2019, Mycotoxins in corn: Occurrence, impacts, and management. In S. O. Serna-Salvidar (Ed.). *Corn: Chemistry and technology*, USA, 235-287pp.

Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O., 1983, *Fusarium species: an illustrated manual for identification*.

Ogawa, K. and Komada, H., 1985, Biological control of *Fusarium* wilt of sweet potato with cross-protection by prior inoculation with nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 19(1):20-25pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Oskay, F., 2007, Çankırı İli Eldivan İlçesi Karaçam Ormanı Topraklarındaki Fungal Floranın ve İn-Vitro'da Antagonistik Etkileşimlerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 24-25s.

Ozbay, N. and Steven, E. N., 2004, Fusarium Crown and Root Rot of Tomato and Control Methods, *Plant Pathology Journal*, 3(1):9-18pp.

Özeker, E., 1999, Phenolic compounds and their importance, *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 9(2).

Özer, N., Soran, H., 1991, Fusarium Species of Turkey, *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 6:259-271s.

Özkaya, O., Şen, K., Aubert, C., Dündar, Ö. and Gunata, Z., 2018, Characterization of the free and glycosidically bound aroma potential of two important tomato cultivars grown in Turkey, *Journal of Food Science and Technology*, 55(11):4440-4449pp.

Park, K. Y., & Bullerman, L. B., 1983, Effect of cycling temperatures on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in rice and cheddar cheese, *Journal of Food Science*, 48(3):889-896pp.

Paulitz, T.C., Park, C. S. ve Baker, R., 1987, Biological control of Fusarium wilt of cucumber with non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*, *Canadian Journal of Microbiology*, 33(5):349-353pp.

Patil, U., Sriram, S. ve Savitha, M.J., 2011, Evaluation of non-pathogenic *Fusarium* for antagonistic activity against *Fusarium wilt* of tomatoes, *Journal of Biological Control*, 25(2):118-123pp.

Paterson, R. R. M., & Rutherford, M. A., 1991, A simplified rapid technique for fusaric acid detection in *Fusarium* strains. *Mycopathologia*, 113(3):171-173pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Pelaez, F., 2005, Biological activities of fungal metabolites.

Handbook of Industrial Mycology, New York, 49-92pp.

Pinkerton, F. and G.A. Strobel., 1976, Serinol as an activator of toxin production in attenuated cultures of *Helminthosporium sacchari*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 73: 4007-4011pp.

Porras-Alfaro, A., Bayman, P., 2011, Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes, *Phytopathology*, 49(1):291p.

Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A., 1993, Microbiology, 7th ed. C. Brown Communications Inc., New York.

Priti, V., Ramesha, B. T., Singh, S., Ravikanth, G., Ganeshaiah, K. N., 2009, How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites, *Current Science*, 97:477-78pp.

Richard, J. L., 2007, Some Major Mycotoxins and Their Mycotoxicoses- An Overview, *International Journal of Food Microbiology*, 119:3-10pp.

Ruiz, B., Chavez, A., Forero, A., Garcia-Huante, Y., Romero, A., Sanchez, M., Langley, E., 2010, Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Crit. Rev. Microbiol.*, 36(2):146-67pp.

Sanchis, V. and Magan, N., 2004, Environmental conditions affecting mycotoxins. *Mycotoxins in Food Detection and Control*. Magan, N. and Olsen, M. (eds.), Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, 174-186pp.

Scaufflaire, J., Gourgue, M., & Munaut, F., 2011, *Fusarium temperatum* sp. nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. *Mycologia*, 103:586-597pp.

Shamly, V., Kali, A., Srirangaraj, S., & Umadevi, S., 2014, Comparison of microscopic morphology of fungi using lactophenol cotton blue (LPCB), iodine glycerol and congo red formaldehyde staining. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 8(7):01p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W., Stubblefield, R. D., & Sorenson, W. G., 1966, Production of aflatoxin on rice, *Applied microbiology*, 14(3):425-428.

Smith, T.K., 1992, Recent advances in the understanding of Fusarium trichothecene mycotoxins, *Journal of Animal Science*, 70(12):3989-3993pp.

Sneh, B., Ichievlevich-Auster, M., 1998, Induced resistance of Cucumber Seedlings Caused by Some Non-Pathogenic Rhizoctonia (np-R) Isolates, *Phytoparasitica*, 26(1):27-38pp.

Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L. and Kizek, R., 2010, "Deoxynivalenol and Its Toxicity." *Interdisc Toxicol*, 3(3):94-99pp.

Son, S.-W., Kim, H.-Y., Choi, G.-J., Lim, H.-K., Jang, K.-S., Lee, S.-O., Lee, S., Sung, N.-D., Kim, J.-C., 2008, Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*, *J. Appl. Microbiol*, 104:692-698pp.

Spellberg, B., 2014, The future of antibiotics. *Critical care*, 18(3):228p

Srobarova, A., Nadubinska, M., Eged, S., Altomare, C., Kogan, G., 2004, Treatment with antagonist *Trichoderma* and cell-wall polysaccharide decreases maize root rot infestation by *F. verticillioides* and fusaric acid production. *Acta fytotechnica et zootechnica* 7:293-299pp.

Staniek, A., Woerdenbag, H. J., Kayser, O., 2008, Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery, *Journal of Plant Interaction*, 3:75-93pp.

Stankovic, S., Levic, J., Petrovic, T., Logrieco, A., Moretti, A., 2007, Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia, *European Journal of Plant Pathology*, 118(2):165-172pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Stipanovic, R.; Puckhaber, L.; Liu, J.; Bell, A., 2011, Phytotoxicity of fusaric acid and analogs to cotton. *Toxicon*, 57:176-178pp.

Stone, J. K., 1987, Initiation and development of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas fir., *Canadian Journal of Botany*, 65:2614-21pp.

Strausbaugh, C. A., Overturf, K., Koehn, A. C., 2005, Pathogenity and Real-Time PCR Detection of *Fusarium* spp. in Wheat and Barley Roots, *Canadian Journal of Plantpathology*, 27:430-438pp.

Sweeney, M. J. and Dobson, A. D. W., 1998, Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species, *Int J Food Microbiol*, 43:141-158pp.

Trail, F., 2009, For Blighted Waves of Grain: *Fusarium graminearum* in the Post Genomics Era, *Plant Physiology*, 149:103-110pp.

Tiring, G., Satar, S., Özkaya, O., 2020, Sekonder Metabolitler, *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(1):203-215s.

Tsuge, T., Ohara, T., 2004, Encoding a basic helix-loop-helix protein, differentially regulates development of three kinds of asexual spores, macroconidia, microconidia, and chlamydospores, in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*, *American Society for Microbiology*, 3(6):1412-1422pp.

Tutel, B., Çırpıcı, A., 1999, Sporlu Bitkiler Sistematığı Laboratuvar Kılavuzu, Çantay Kitabevi, İstanbul, 975-404s.

Uysal, B., 2011, Yabancı Otların Herbisitlere Dayanıklılığı, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Semineri, Tokat.

Van Asch, M.A.J., Rijkenberg, F.H.F., Coutinho, T.A., 1992, Phytotoxicity of fumonisin B1, moniliformin and T-2 toxin in corn callus cultures, *Phytopathology*, 82:1330-1332pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Van Wyk, P. S., 1969, Die inhibisie van *Verticillium dahliae*. M.Sc Thesis, University of the Orange Free State.

Voss, K.A., Porter, J. K., Bacon, C.W., Meredith, F. I., Norred, W.P., 1999, Fusaric acid and modification of the subchronic toxicity to rats of fumonisins in *F. moniliforme* culture material”, *Food and Chemical Toxicology*, 37:853-861pp.

Yabuta, T., Kobe, K., & Hayashi, T., 1934, Biochemical studies of the 'bakanae' fungus of rice. I. Fusarinic acid, a new product of the 'Bakanae' fungus, *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten (Pflanzenpathologie) und Pflanzenschutz*, 10:1059-1068pp.

Yagen, B. and Bialer, M., 1993, Metabolism and pharmacokinetics of T-2 toxin and related trichothecenes, *Drug Metabolism Reviews*. 25(3):281-323pp.

Yiğit, F., Arıkan, K. ve Balaban, Y.Y., 2007, Patojen olmayan *Fusarium* türleri ile domateste *Fusarium* kök çürüklüğü hastalığının biyolojik kontrolü üzerinde bir araştırma, *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21(42):59-63.

Yörük, E., Albayrak, G., 2014, Tri4 and Tri5 Gene Expression Analysis in *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* Isolates by qPCR, *Plant Pathology Journal*, 13(2):133-138.

Zhang, X., Li Z., Gao J., 2019, Chemistry and biology of secondary metabolites from *Aspergillus* Genus, *Nat. Prod. J.* 8(4):275-304pp.

Zhang, H., X. Bai, M. Zhang, J. Chen, H. Wang, 2018, Bioactive natural products from endophytic microbes, *Nat. Prod. J.* 8(2):86-108pp.

Zheng, Y.; Wu, B.; Chen, Y.-W., 2011, Active ingredients from metabolite of *Datura arborea* entophytic fungi and its anti-dermal pathogenic fungi activities. *J. Anhui Agric. Sci.* 39:1323-1329pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Waksman, S. A., 1922, A method for counting the number of fungi in the soil. *Journal of bacteriology*, 7(3), 339-341.

Wakulinski, W., 1989, Phytotoxicity of Fusarium metabolites in relation to pathogenicity. In: *Fusarium—Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity* (ed. J Chelkowski), 257–268.

Weber, R. W. S., Anke, H., 2006, Effects of endophytes on colonization by leaf surface microbiota. In *Microbial Ecology of Aerial Plant Surfaces*, 209–222.

Wei, J., Wu, B., 2020, Chemistry and bioactivities of secondary metabolites from the genus *Fusarium*, Ocean College, Zhejiang University, Zhoushan, China.

Wollenweber, H. W., & Reinking, O. A., 1935, *The Fusaria*. Paul Barey, Berlin, 335p.

Wu, H., Yin, X., Liu, D., Ling, N., Bao, W., Ying, R., Zhu, Y., Guo, S., Shen, Q., 2008, Effect of fungal fusaric acid on the root and leaf physiology of watermelon (*Citrullus lanatus*) seedlings. *Plant Soil* 308:255-266.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı titizlikle takip ederek beni yönlendiren, bilgi ve tecrübesi ile daima yanımda olan tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Rengin ELTEM' e teşekkür ederim.

Bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, bölümümüz laboratuvarlarının imkanlarından faydalanmama izin veren değerli hocam Sn. Dr. Öğr. Üyesi İsmail Hakkı AKGÜN'e, ve yine bölümümüz laboratuvarlarının imkanlarından faydalanmama izin veren değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Nuri AZBAR' a ve Sn. Prof. Dr. Murat ELİBOL'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda sağladığı çok kıymetli yardımlardan dolayı Sn. Dr. Öğr. Üyesi Havva DİNLER'e teşekkürler ederim.

TÜBİTAK "2210-C Öncelikli Alanlar Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı" ile yüksek lisans tez dönemim boyunca mali destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili endüstriyel mikrobiyoloji laboratuvarı ekibine teşekkür ederim.

Son olarak, maddi, manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen babam Erdal DURMUŞ, annem Ayfer DURMUŞ ve kardeşim Özgür Berke DURMUŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

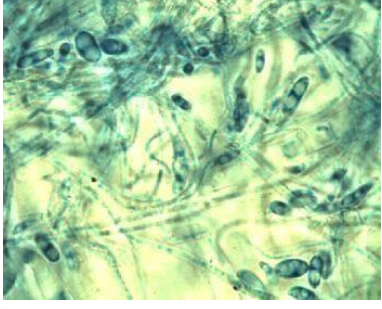
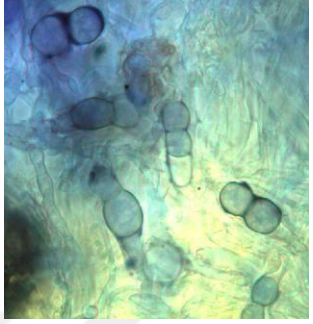
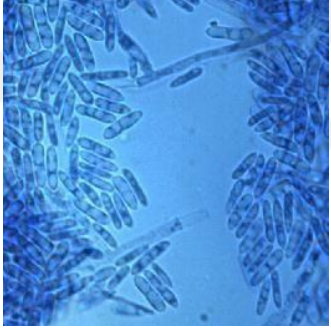
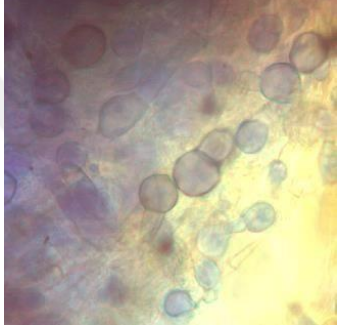
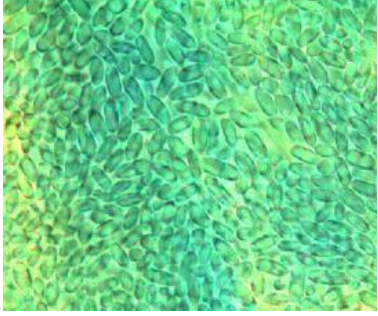
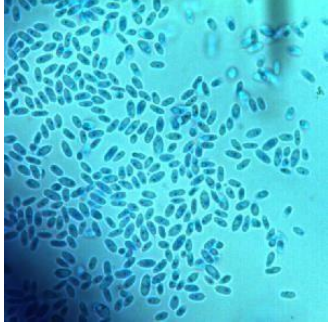
ÖZGEÇMİŞ

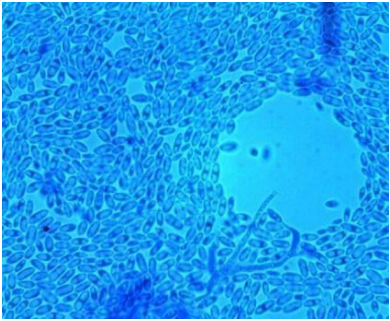
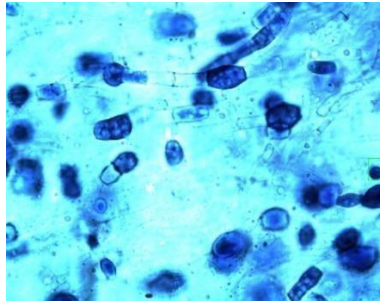
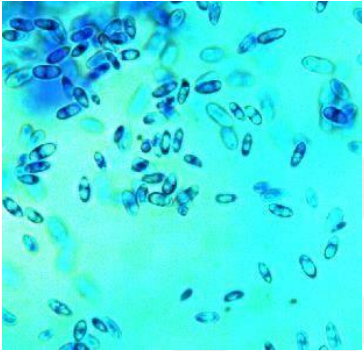
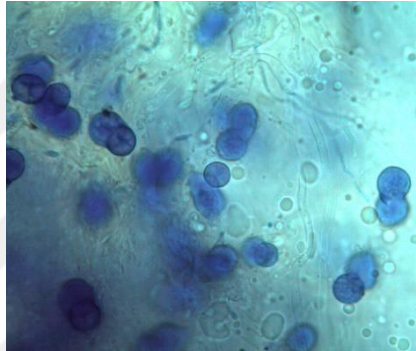
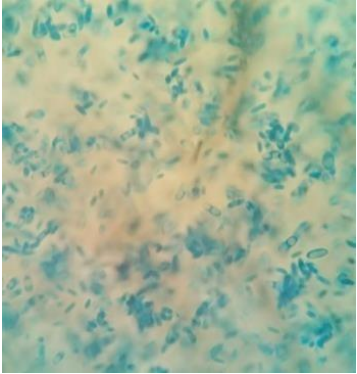
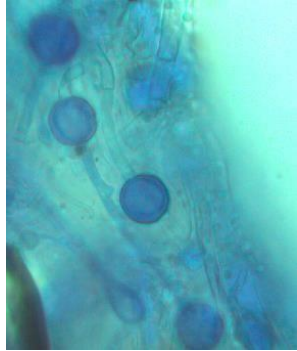
İlk, Orta, Lise öğrenimini İstanbul’da tamamladı. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümünden 2017 yılında mezun olup, 2018 yılı itibariyle Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarında yüksek lisans eğitimine başladı.

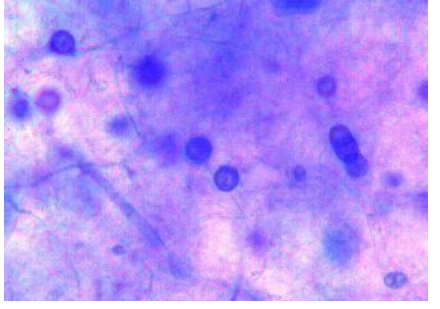
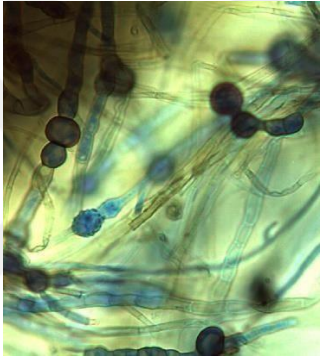
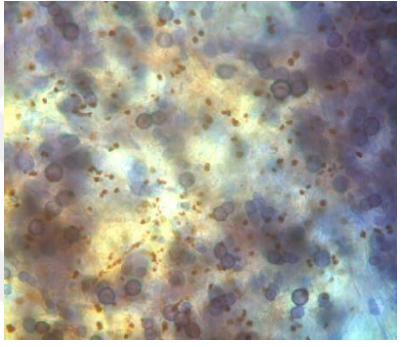
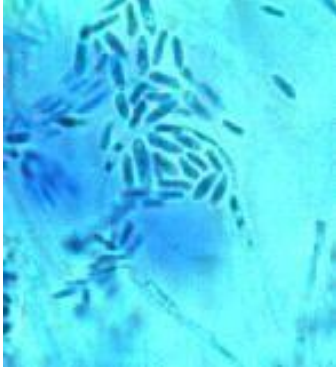
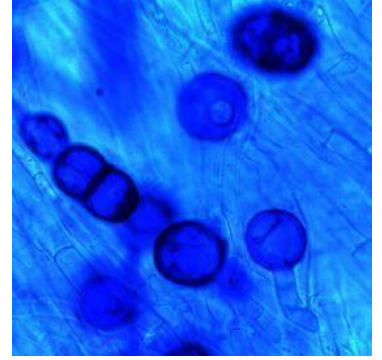


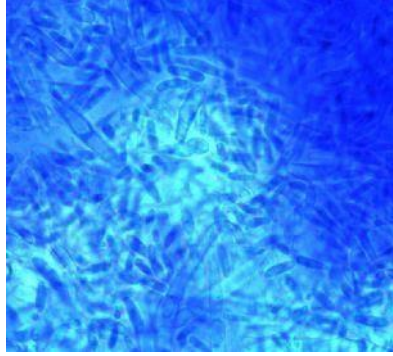
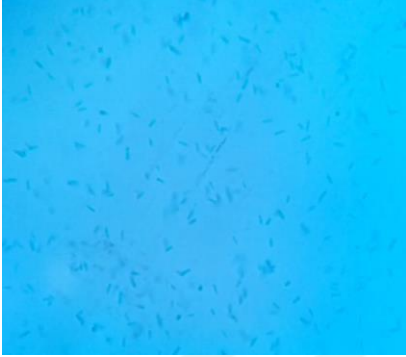
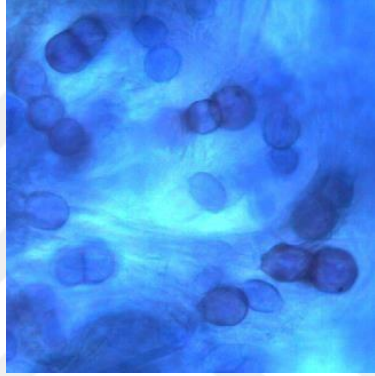
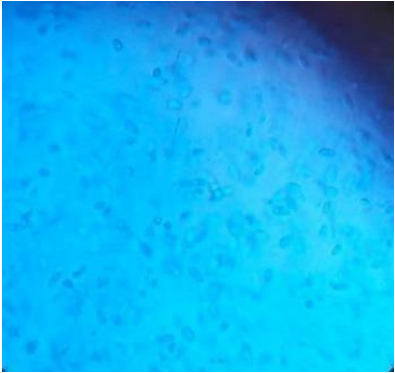
EKLER

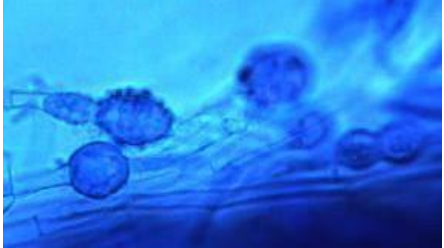
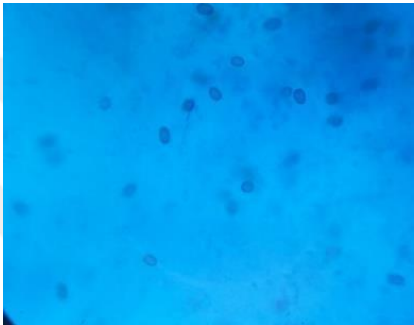
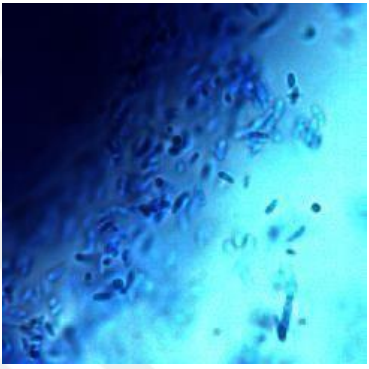
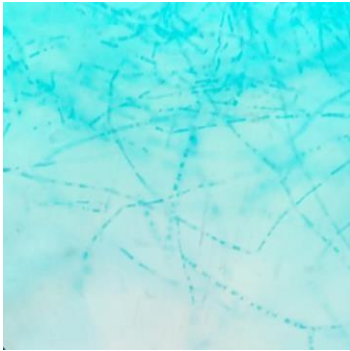
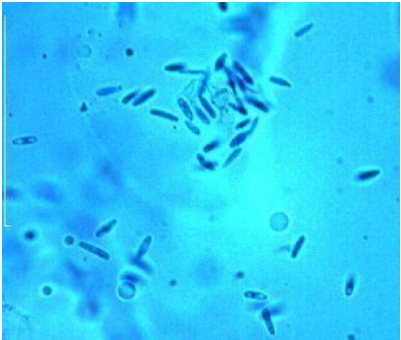
Ek 1. Potansiyel *Fusarium* izolatlarının spor yapısı ve PDA plağındaki görüntüsü hakkında bilgi

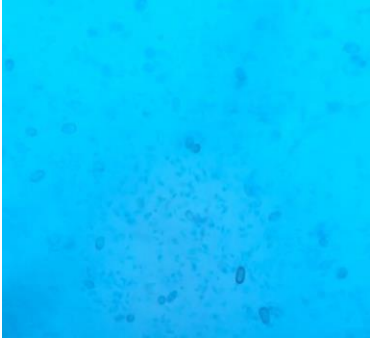
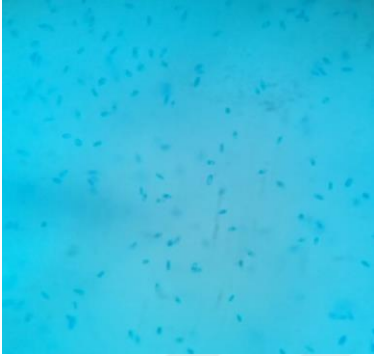
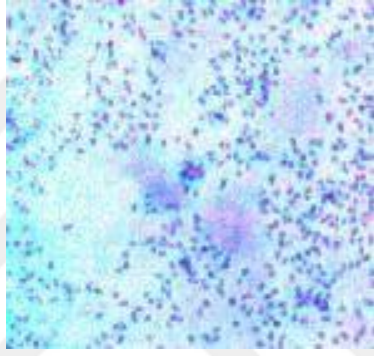
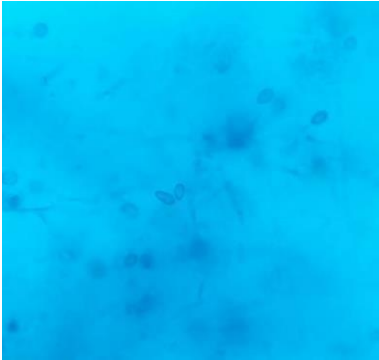
1		51	
	2-O.3 (PDA plağında yavru ağzı renk, sümüksü görüntü)		121-A.3 (PDA plağında pembe-fuşya renk, yoğun beyaz-sarımsı misel)
2		52	
	5-O.3 (PDA plağında krem renk, sümüksü görüntü)		122-A.3 (PDA plağında pembe-fuşya renk, yoğun sarımsı misel)
3		53	
	10-O.4 (PDA plağında yavru ağzı renk, sümüksü görüntü)		123-A.3 (PDA plağında kahverengi renk, beyaz misel)

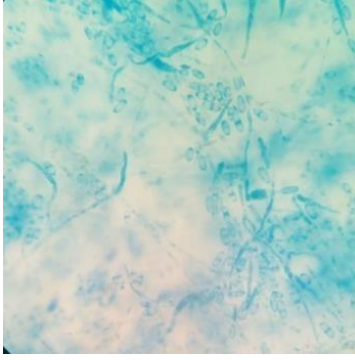
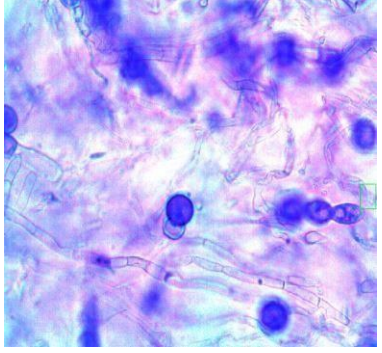
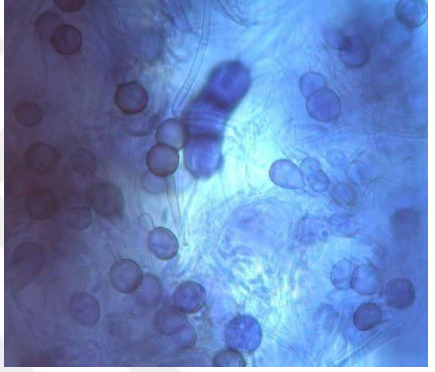
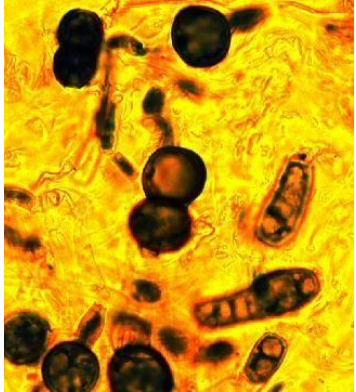
4	 12-O.4 (PDA plağında krem renk, sümüksü görüntü)	54	 125-A.3 (PDA plağında pembe renk, beyaz misel)
5	 14-O.4 (PDA plağında krem renk, sümüksü görüntü)	55	 127-A.4 (PDA plağında pembe – fuşya renk, beyaz misel)
6	 15-O.4 (PDA plağında krem renk, sümüksü görüntü)	56	 128-A.4 (PDA plağında pembe-sarı-kahverengi karışık renk)

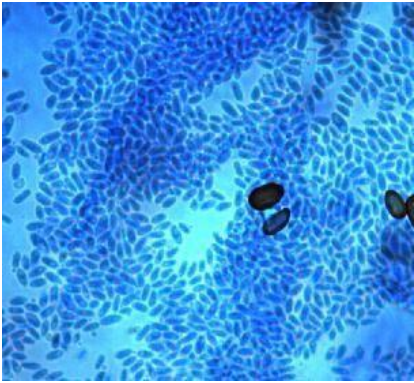
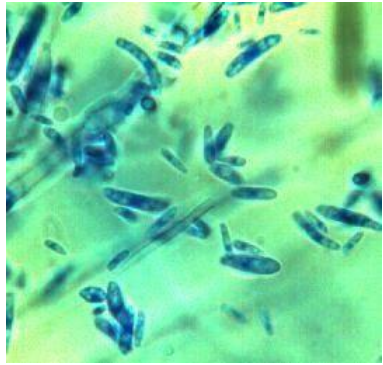
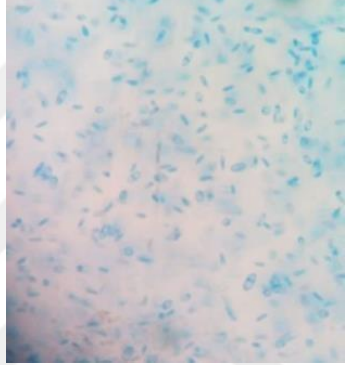
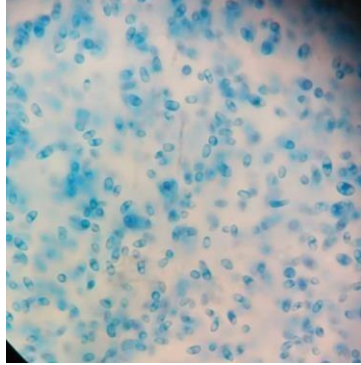
7	 17-A.2 (PDA plağında yavru ağız renk, sümüksü görüntü)	57	 129-A.4 (PDA plağında pembe-sarı- kahverengi karışık renk)
8	 33-A.2 (PDA plağında koyu kahve-koyu hardal renk, yoğun kahvem-sarımsı misel)	58	 130-A.4 (PDA plağında pembe-sarı-kahverengi karışık renk)
9	 34-A.2 (PDA plağında açık pembe renk, beyaz-pembemsi misel)	59	 132-A.4 (PDA plağında sarımsı ve pembe renk, yoğun beyaz ve hardal misel)

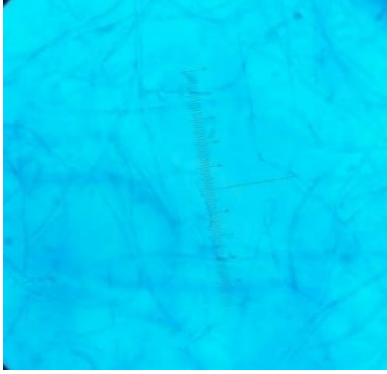
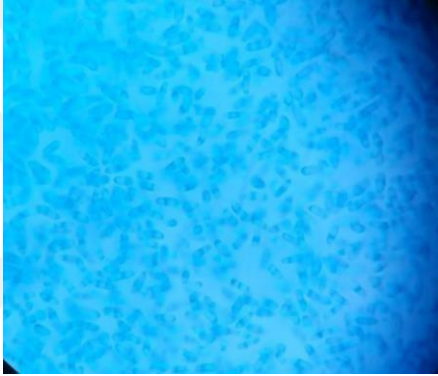
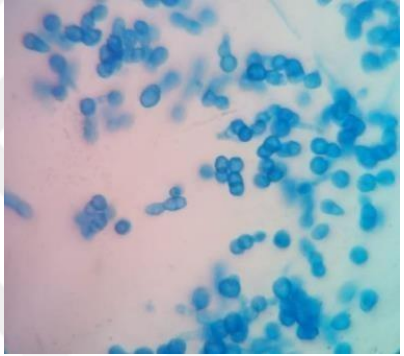
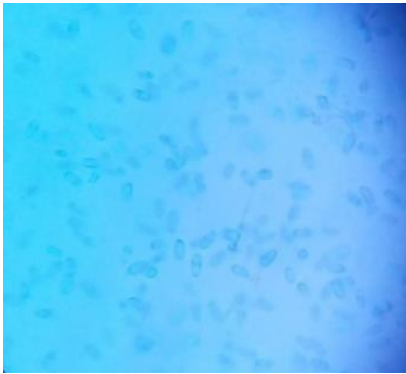
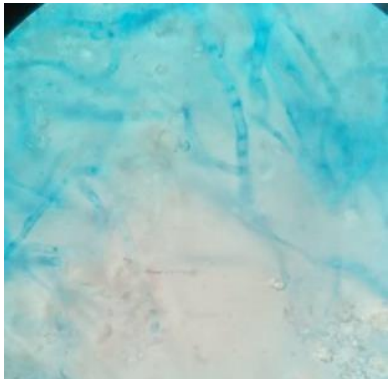
10		60	
	35-A.2 (PDA plağında açık pembe renk, beyaz- pembemsi misel)		133-A.4 (PDA plağında mürdüm renk, yoğun beyaz misel)
11		61	
	39-A.2 (PDA plağında açık pembe renk, beyaz-pembemsi misel)		135-A.4 (PDA plağında alttan bakıldığında pembe-fuşya renk, beyaz-sarımsı misel)
12		62	
	43-O.4 (PDA plağında krem-yavru ağzı renk, seyrek beyaz misel)		136-A.4 (PDA plağında mürdüm renk, yoğun beyaz misel)

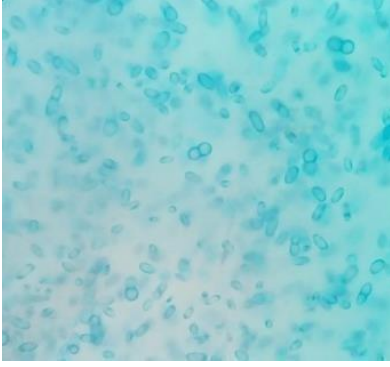
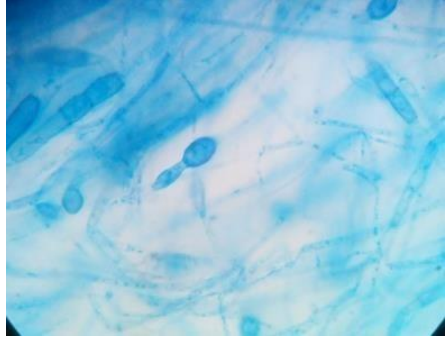
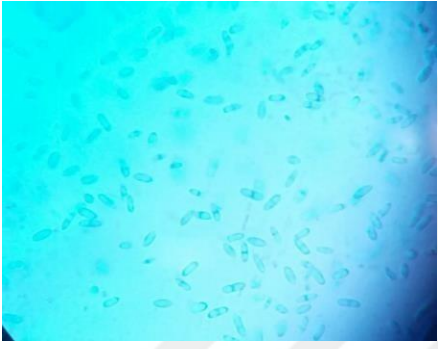
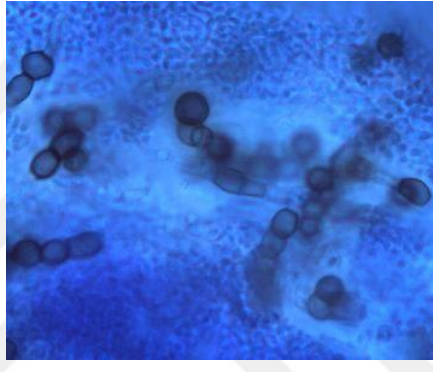
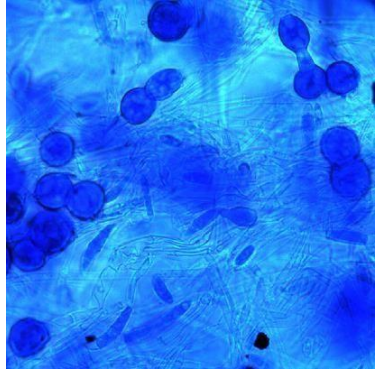
13	 44-O.4 (PDA plağında petride krem-yavru ağzı renk, seyrek beyaz misel)	63	 137-A.4 (PDA plağında pembe-sarımsı renk, yoğun beyaz-sarımsı misel)
14	 46-0.1 (PDA plağında koyu kahverengi-grimsi renk, beyaz misel)	64	 138-A.4 (PDA plağında krem renk, merkezde yoğun krem renk misel)
15	 48-O.1 (PDA plağında beyaz-sarımsı renk, yoğun beyaz ve bulutsu misel)	65	 139-A.4 (PDA plağında mürdüm renk, yoğun beyaz misel)

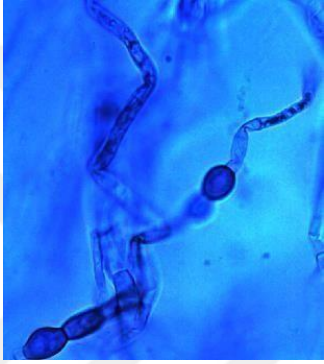
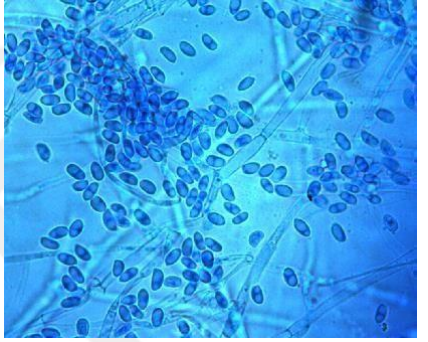
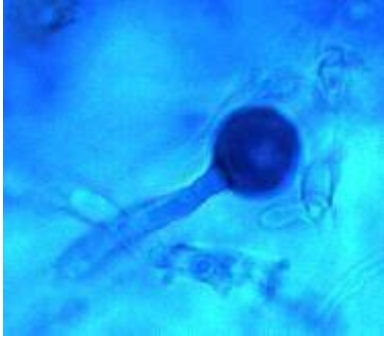
16		66	
	50-O.1 (PDA plağında koyu yeşil renk)		140-A.4 (PDA plağında krem-sarımsı renk, beyaz yoğun misel)
17		67	
	51-O.1 (PDA plağında koyu kahverengi-grimsi renk, merkezde seyrek misel)		142-A.4 (PDA plağında pembe-sarı-kahverengi renk)
18		68	
	52-O.1 (PDA plağında koyu yeşil renk)		143-A.5 (PDA plağında pembe-fuşya renk-beyaz misel)

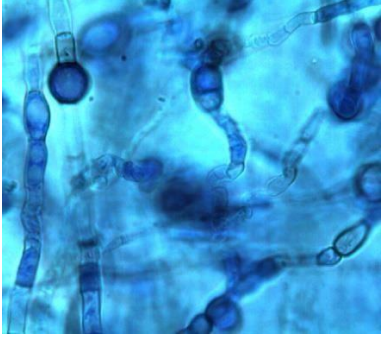
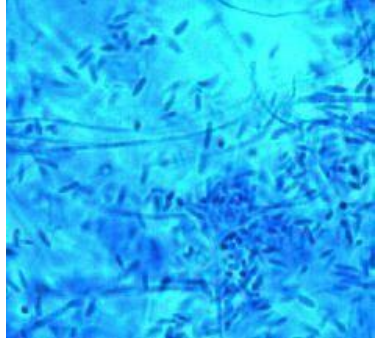
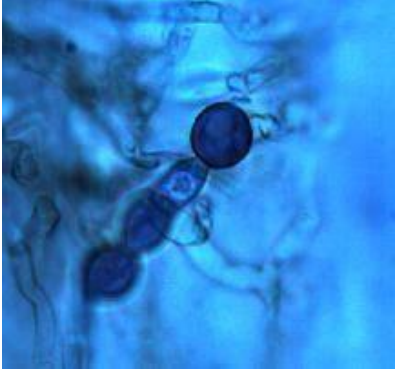
19	 53-O.4 (PDA plağında krem-yavruağzı renk, seyrek beyaz misel)	69	 146-A.4 (PDA plağında pembe-sarı-kahverengi renk)
20	 56-O.4 (PDA plağında krem-yavru ağzı renk, seyrek beyaz misel)	70	 147-A.4 (PDA plağında kahverengi-koyu hardal renk, yoğun renk misel)
21	 58-O.4 (PDA plağında krem-yavru ağzı renk, seyrek beyaz misel)	71	 148-A.4 (PDA plağında pembe ve sarımsı renk, beyaz-sarımsı yoğun misel)

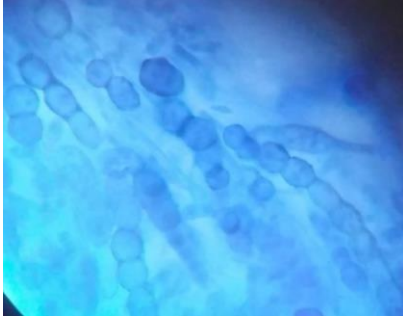
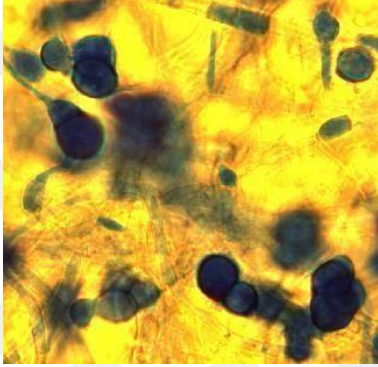
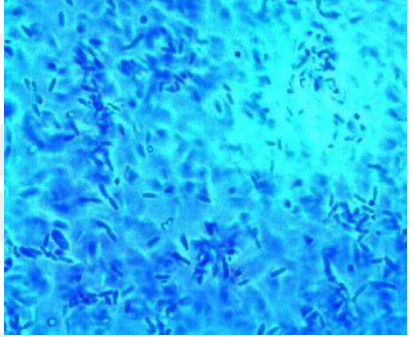
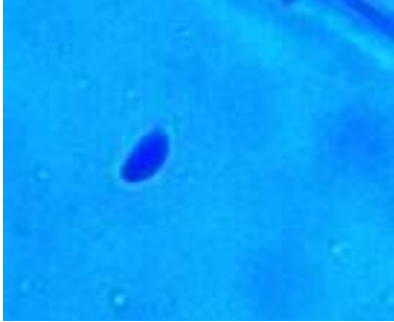
22	 61-O.1 (PDA plağında kahverengi-grimsi renk, merkezde beyaz misel)	72	 149-A.4 (PDA plağında mürdüm renk-yoğun beyaz misel)
23	 64-O.1 (PDA plağında beyazımsı-ekru renk, yoğun beyaz-grimsi misel)	73	 152-A.3 (PDA plağında petride koyu kahverengi-grimsi renk, beyaz misel)
24	 65-O.4 (PDA plağında beyazı-krem renk, yoğun bulutsu beyaz misel)	74	 154-A.4 (PDA plağında krem-turuncumsu renk, beyaz-sarımsı misel)

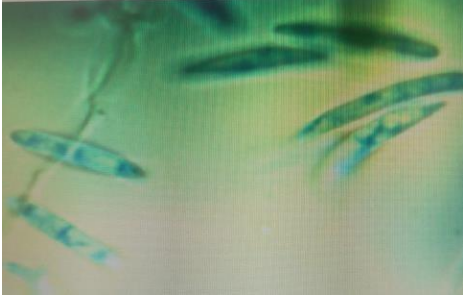
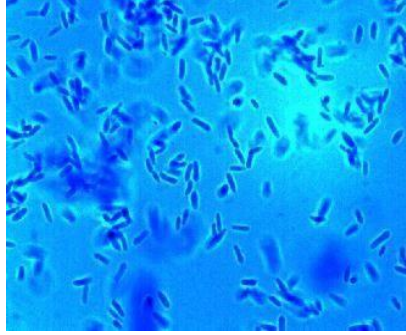
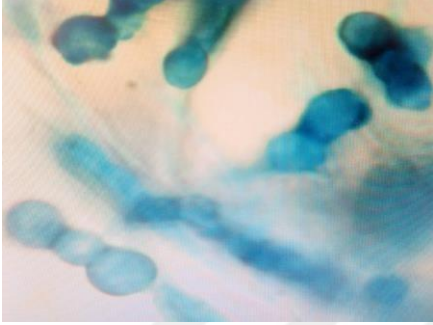
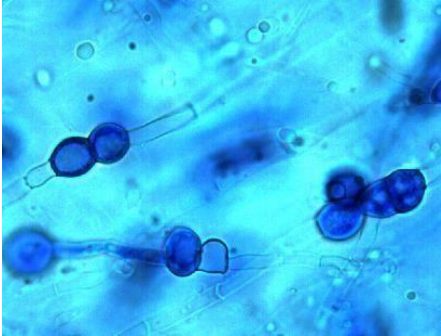
25	 66-O.4 (PDA plağında beyaz-krem renk, yoğun bulutsu beyaz misel)	75	 155-A.4 (PDA plağında koyu pembe- fuşya renk- yoğun beyaz misel)
26	 69-O.4 (PDA plağında beyaz-krem renk, beyaz misel)	76	 157-A.3 (PDA plağında pembe-sarımsı karışık renk, sarımsı misel)
27	 70-O.4 (PDA plağında yavru ağız-krem renk, beyaz misel)	77	 158-A.3 (PDA plağında merkez pembe-fuşya çevresi beyaz renk, yoğun beyaz misel)

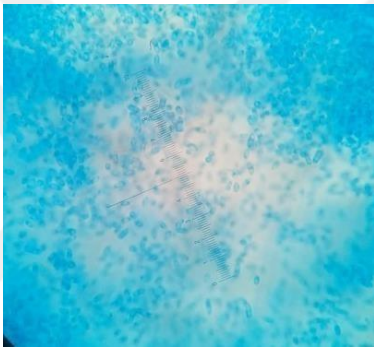
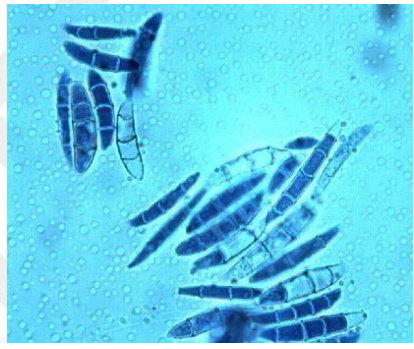
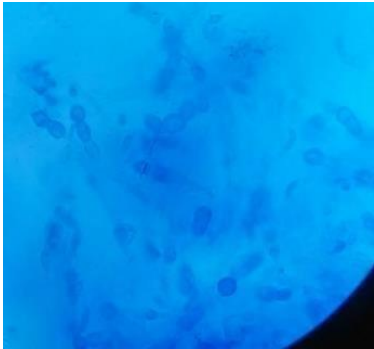
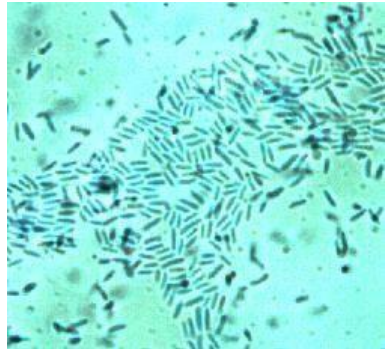
28	 72-O.4 (PDA plağında yavru ağzı renk, seyrek beyaz misel)	78	 159- A.3 (PDA plağında pembe renk, beyaz-sarımsı misel)
29	 73-O.4 (PDA plağında beyaz-krem renk, yoğun bulutsu beyaz misel)	79	 160-A.3 (PDA plağında kahverengi-grimsi renk, yoğun beyaz misel)
30	 74-O.4 (PDA plağında beyaz-krem renk, yoğun bulutsu beyaz misel)	80	 161-A.4 (PDA plağında sarı-pembe şeritler, yoğun beyaz misel)

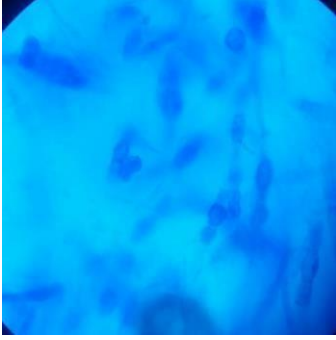
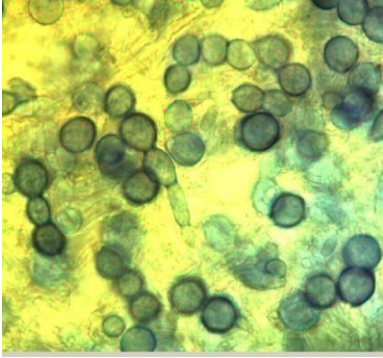
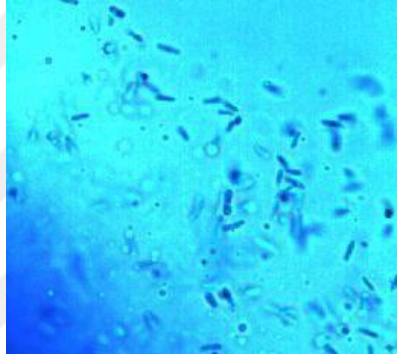
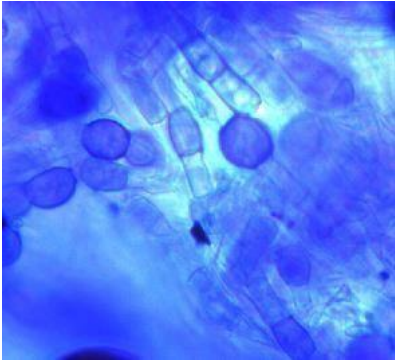
31		81	
	77-O.1 (PDA plağında koyu yeşil renk)		162-A.4 (PDA plağında pembe ve sarı renk, yoğun beyaz misel)
32		82	
	78-A.2 (PDA plağında koyu kahve-koyu hardal renk, yoğun hardal sarısı-kahverengi misel)		163-A.4 (PDA plağında krem renk, krem-beyaz kısa parçacıklı misel)
33		83	
	79-A.2 (PDA plağında koyu kahve-koyu hardal renk, yoğun hardal sarısı-beyaz-kahverengi misel)		164-A.5 (PDA plağında pembe renk, beyaz misel)

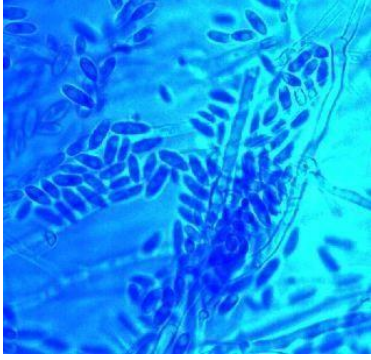
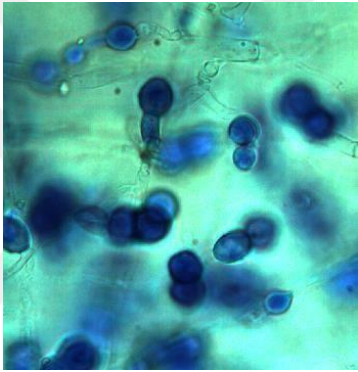
34	 80-A.2 (PDA plağında koyu kahve-koyu hardal rengi- yoğun hardal sarısı-beyaz-kahverengi misel)	84	 165-A.5 (PDA plağında krem-yavru ağzı renk, merkezde beyaz misel, sümsü görüntü)
35	 81-A.2 (PDA plağında kahverengi-koyu hardal renk, yoğun hardal sarısı-beyazımsı misel)	85	 166-A.5 (PDA plağında pembe renk, beyaz misel)
36	 83-0.1 (PDA plağında beyaz-ekru renk, yoğun beyaz-grimsi misel)	86	 167-A.5 (PDA plağında fuşya renk, beyaz misel)

37	 89-A.3 (PDA plağında koyu pembe-renk, beyaz-sarımsı misel)	87	 168-A.5 (PDA plağında fuşya renk- beyaz misel)
38	 90-A.3 (PDA plağında koyu pembe renk, yoğun beyaz misel)	88	 169-A.5 (PDA plağında yavru ağzın renk, beyaz misel)
39	 91-A.3 (PDA plağında pembe-fuşya-beyaz renk, yoğun beyaz misel)	89	 170-A.5 (PDA plağında fuşya renk, beyaz misel)

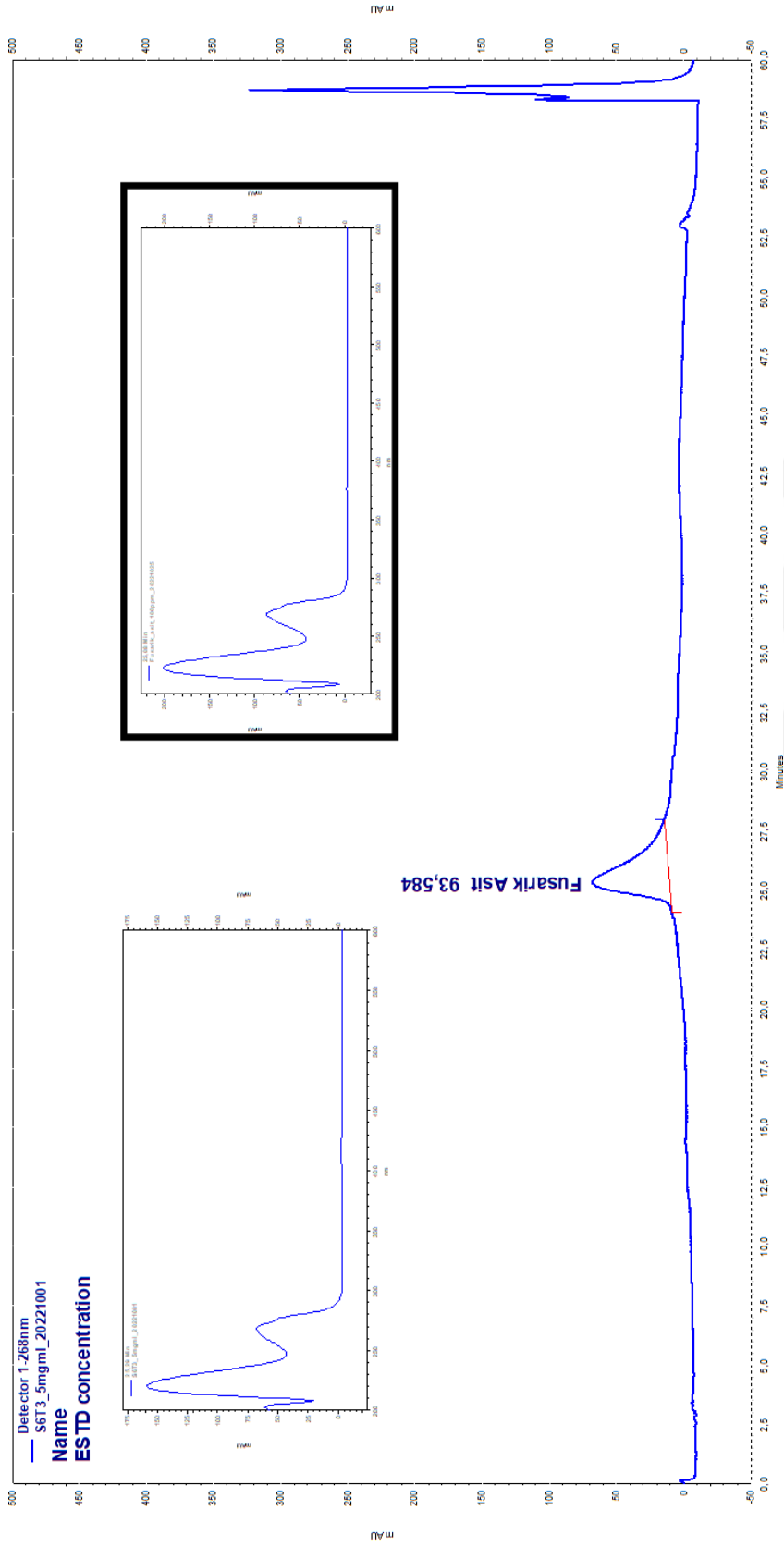
40	 97-A.2 (PDA plağında beyaz-ekru renk, yoğun beyaz-grimsi misel)	90	 171-A.5 (PDA plağında yavru ağzı renk, merkezde beyaz misel, sümüksü görüntü)
41	 98-A.2 (PDA plağında krem-hardal renk, kahverengi-beyaz yoğun misel)	91	 172-A.5 (PDA plağında fuşya renk-beyaz misel)
42	 99-A.2 (PDA plağında krem-hardal renk, kahve-beyaz yoğun misel)	92	 173- A.5 (PDA plağında krem-yavru ağzı renk, sümüksü görüntü)

43	 105-A.3 (PDA plağında koyu pembe renk, yoğun beyaz-pembe misel)	93	 174- A.5 (PDA plağında krem-yavru ağızı renk, sümüksü görüntü)
44	 111- O.1 (PDA plağında krem-yavru ağızı renk, beyaz misel)	94	 175-A.5 (PDA plağında pembe renk, beyaz-turuncumsu misel)
45	 115-O.1 (PDA plağında krem renk)	95	 176-A.5 (PDA plağında yavru ağızı renk, merkezde beyaz misel)

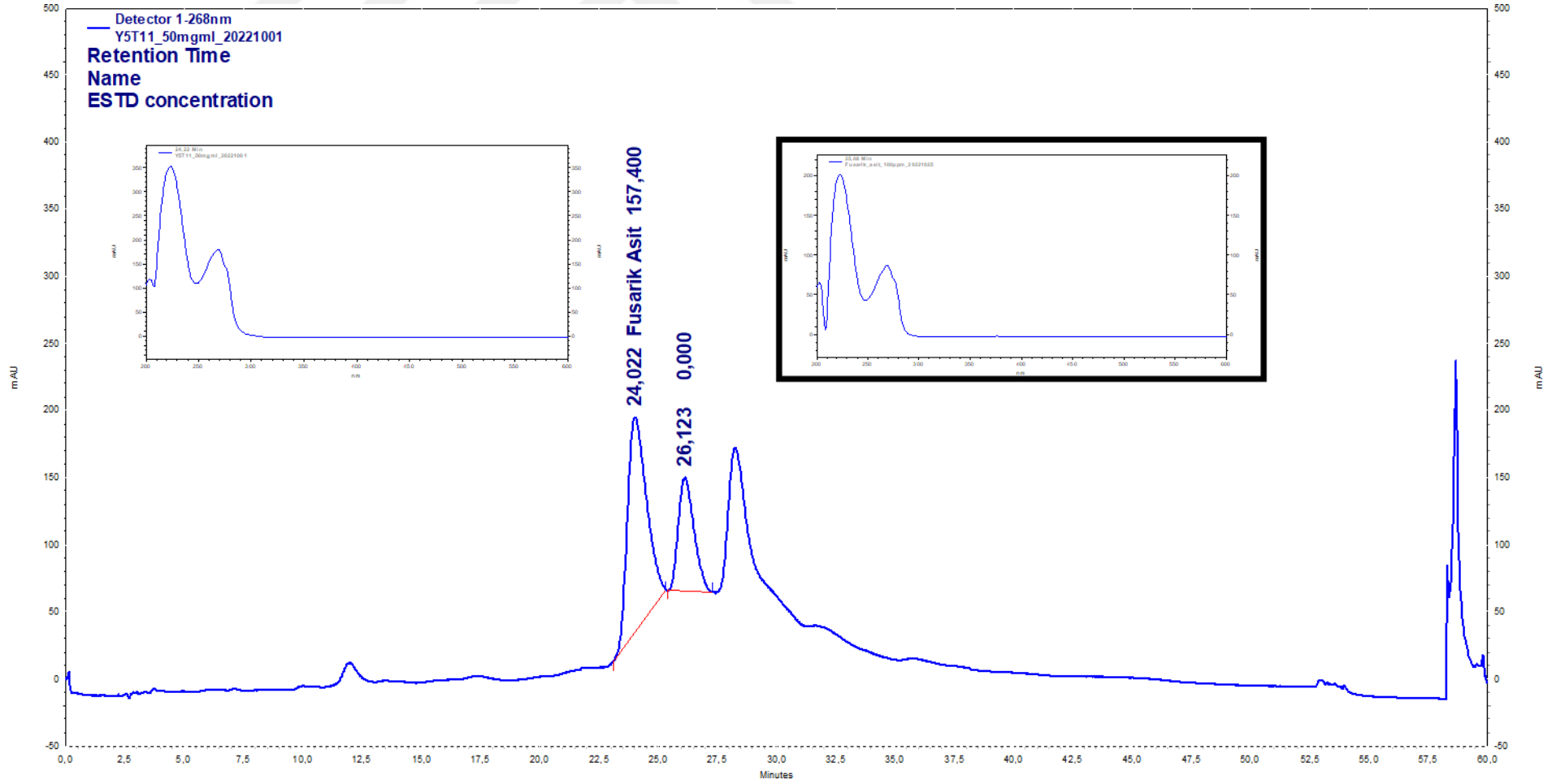
46		96	
	116-O.1 (PDA plağında pembe-beyazımsı renk, beyaz misel)		179-A.5 (PDA plağında yavru ağzı renk, merkezde seyrek beyaz misel)
47		97	
	117-A.3 (PDA plağında pembe-fuşya renk, beyaz-sarımsı misel)		181-A.5 (PDA plağında yavru ağzı renk, merkezde seyrek beyaz misel)
48		98	
	118-A.3 (PDA plağında turuncu renk, beyaz-sarımsı misel)		182-A.5 (PDA plağında yavru ağzı renk, merkezde seyrek beyaz misel)

49	 119-A.3 (PDA plağında yavru ağız-krem renk, merkezde yoğun beyaz misel)	99	 183-A.5 (PDA plağında pembe renk, beyaz-turuncumsu misel)
50	 120-A.3 (PDA plağında pembe-fuşya renk, beyaz-sarımsı misel)		

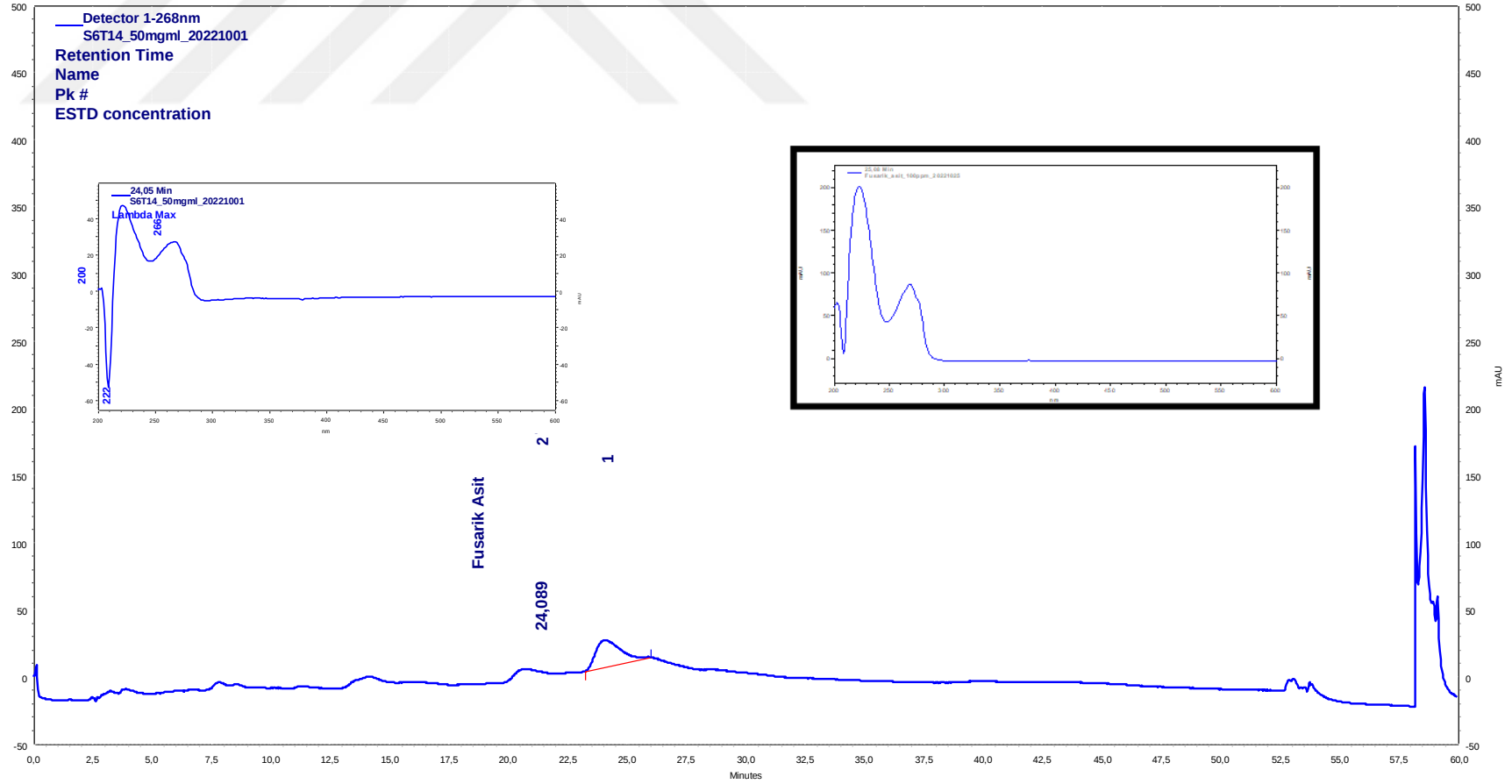
Ek 2. Fusarik asit üreticisi olan, endofit *Fusarium* suş/izolatlarının HPLC analizi kromatogramları



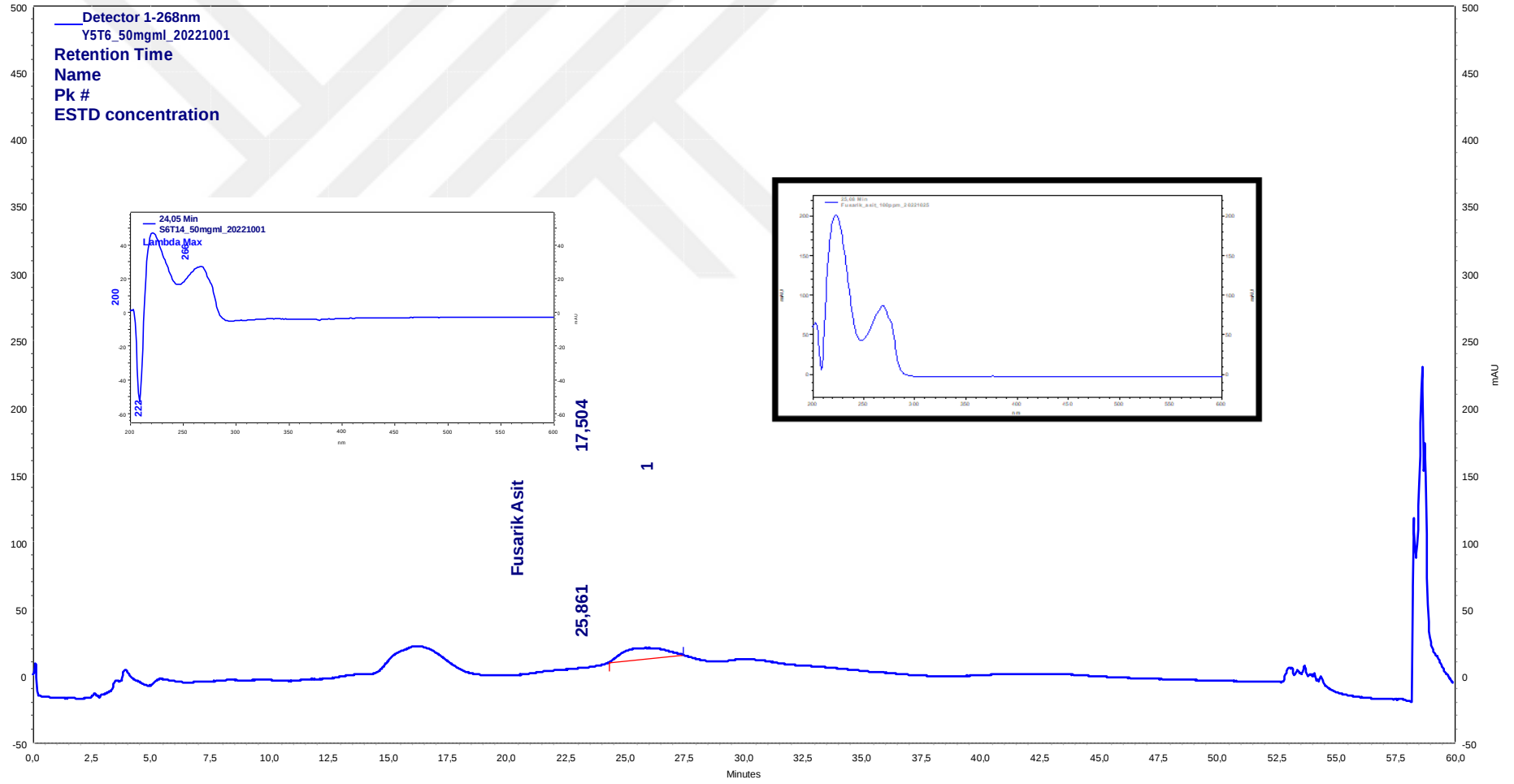
Ek 2 - Şekil 1. FA standardı (100 ppm) ile birlikte *Fusarium* sp. S6T-3 kodlu izolatın (5 mg/ml) fusarik asit analizi



Ek 2 - Şekil 2. FA standardı (100 ppm) ile birlikte *Fusarium* sp. Y5T-11 kodlu izolatın (50 mg/ml) fusarik asit analizi



Ek 2 - Şekil 4. FA standardı (100 ppm) ile birlikte *Fusarium* sp. S6T-14 kodlu izolataın (100 mg/ml) fusarik asit analizi



Ek 2 - Şekil 5. FA standardı (100 ppm) ile birlikte *Fusarium* sp. , Y5T-6 kodlu izolatin (100 mg/ml) fusarik asit analizi