

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***DİANTHUS ERİNACEUS* BOİSS. VAR. *ERİNACEUS*
BİTKİSİNDEN ENDOFİTİK
MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU,
TANIMLANMASI VE ANTİMİKROBİYAL
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Ezgi TAN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ataç UZEL

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 24.01.2018

Bornova-İZMİR

2018

Ezgi TAN tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak “*Dianthus erinaceus* Boiss. Var. *erinaceus* Bitkisinden Endofitik Mikroorganizmaların İzolasyonu, Tanımlanması ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 24.01.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Ali İZEL

.....

Raportör Üye : Doç. Dr. ZURİN KAYA

.....

Üye : Doç. Dr. İslam Akar Günyar

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Dianthus Erinaceus* Boiss. Var. *Erinaceus* Bitkisinden Endofitik Mikroorganizmaların İzolasyonu, Tanımlanması ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi” 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.

24 / 01 / 2018

Ezgi TAN



ÖZET***DIANTHUS ERINACEUS* BOİSS. VAR. *ERINACEUS* BİTKİSİNDEN
ENDOFİTİK MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU,
TANIMLANMASI VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

TAN, Ezgi

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ataç UZEL

Ocak 2018, 96 sayfa

Endofitlerin, bitki zararlılarına karşı savunması için sentezlediği biyoaktif bileşiklerin, yeni ilaçların keşfi için umut verici bir kaynak olduğu düşünülmektedir. Oldukça spesifik bitki-mikroorganizma etkileşimleri, özgül bileşenleri üretebilir. Endemik bitkiler ve endofitik mikroorganizmalar, yeni biyoaktif bileşikler için önemli kaynaklar sunmaktadır.

Bu çalışmada, endemik bir bitki olan *Dianthus erinaceus*'tan endofitik mikroorganizmaların izole edilmesi, tanımlanması ve bunların antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. *D. erinaceus* bitkisi Nif dağından toplanmış ve uygun koşullarda laboratuvara getirildikten sonra yaprak, gövde ve kökleri içeren farklı bitki parçalarından yüzey sterilizasyonundan sonra endofitik fungus ve bakteri izolasyonu yapılmıştır. *D. erinaceus* bitkisinin farklı dokularından 6 fungus ve 10 bakteri olmak üzere toplamda 16 izolat elde edilmiştir. Endofitik fungus ve bakteri izolatları polifazik yaklaşımlar kullanılarak tanımlanmıştır. Bakteriyal tanımlamalar *Bacillus*, *Kocuria*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* ve *Ralstonia* türlerini içeren 5 farklı genusu açığa çıkartmıştır. Fungal tanımlamada ise Eurotiomycetes grubuna ait 2 tür (*Aspergillus* spp. ve *Penicillium* spp.) ve Dothideomycetes grubuna ait 1 tür (*Alternaria* spp.) olmak üzere 3 farklı genus tanımlanmıştır. Aynı zamanda bitkiden izole edilen fungus ve bakterilerin antimikrobiyal bileşik üretme kapasiteleri araştırılmıştır. İzolatların fermentasyon sıvılarından elde edilen Etil asetat (EtOAc) ve bütanol ekstratlarının aktiviteleri disk difüzyon ve broth mikrodilüsyon yöntemleriyle belirlenmiştir.

Buna göre 8 bakteri ve 4 fungus türünün test organizmalarına karşı iyi bir antimikrobiyal etkisinin olduğu saptanmıştır. Özellikle fungal izolatlardan Dek20f gram negatiflere karşı yüksek aktivite gösterirken, bakteriyal izolatlardan Deg11b *C.albicans*'a karşı antifungal etki göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Dianthus erinaceus*, endofitik mikroorganizmalar, antimikrobiyal aktivite, endemik bitki



ABSTRACT**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC
MICROORGANISM FROM *DIANTHUS ERINACEUS* BOISS. VAR.
ERINACEUS AND DETERMINATION OF THEIR
ANTIMICROBIAL PROPERTIES**

TAN,Ezgi

MSc. in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ataç UZEL

January 2018, 96 pages

Bioactive compounds synthesized by endophytes to defence against plants enemies are thought to be promising source for the discovery of new drugs. Highly specific symbiotic plant-microorganism interactions can produce compounds that could not be found elsewhere. Endemic plants and their endophytic microorganisms present valuable sources for new bioactive compounds.

Therefore the aims of this study were to isolation and identification of the endophytic microorganisms from an endemic plant, *Dianthus erinaceus* and evaluate their antimicrobial activities. The whole plant samples of *D. erinaceus* were collected from Nif Mountain, İzmir in July 2016. Different plant parts including leaves, stems and roots were subjected to surface sterilization with bleach and ethanol to eliminate the surface microorganisms. Then the outer tissues are removed with a sterilized scalpel and inner tissues are sliced thinly than placed on isolation media. Plates were incubated at 27°C for 6 weeks. A total of 10 bacterial and 6 fungal endophytes were isolated from the different tissues of the *D. erinaceus*, the endemic plant species of the Nif Mountain in the Aegean Region. Endophytic fungi and bacteria isolates were identified using polyphasic taxonomy. Bacterial identifications revealed 5 different bacterial genera including *Bacillus*, *Kocuria*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* and *Ralstonia*. Identification of fungal strains revealed that 3 of the fungal isolates were belonging to the Eurotiomycetes classis (*Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp.) and 1 belong to the Dothideomycetes classis (*Alternaria* spp.). Furthermore all isolates were subjected fermentation in 250 ml erlenmeyer flasks in order to assess their antimicrobial activities. Cell free culture filtrates were extracted three times with an equal volume of ethylacetate and butanol (1:1, v/v) separately. Some gram negative, gram positive and yeast were used test organisms. Antimicrobial activities of the crude extracts were determined by disc diffusion and broth microdilution method.

Butanol extracts showed considerable activity against test microorganisms. A total of 8 bacteria and 4 fungi showed activity against test microorganisms. Fungal strain DEK20f was shown to be more effective against gram-negative bacteria than gram positive. On the other hand, bacterial isolate DEG11b showed a strong antifungal activity against *C. albicans*.

Keywords: *Dianthus erinaceus*, endophytic microorganisms, antimicrobial activity, endemic plants



TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca benden destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam sayın Prof. Dr. Ataç UZEL'e, çalışma bitkisinin arazide toplanıp laboratuvara getirilmesini sağlayan sayın Doç. Dr. Serdar Gökhan ŞENOL'a ve her konuda yardım ve desteğini gördüğüm sevgili hocam Araş. Gör. Sennur ÇALIŞKAN ÖZDEMİR'e, ayrıca çalışma arkadaşım Dilek EROĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve bugünlere gelmemde en büyük destekçim olan başta İzzet BİRKEN olmak üzere tüm aileme teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma, Ege Üniversitesi BAP (2017-FEN-023) tarafından desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. Endofit mikroorganizmalar.....	3
2.2. Endofitik mikroorganizmaların bitki içinde kolonizasyonu.....	5
2.3. Endofitik mikroorganizma ve bitki etkileşimleri	6
2.4. Endofitik mikroorganizmaların izolasyonu	11
2.5. Sekonder metabolitler	12
2.5.1. Sekonder metabolitlerin biyosentezi	14
2.6. Sekonder metabolit üreten endofitler	16
2.6.1. Antibiyotik üreten endofitler.....	16
2.6.2. Antiviral metabolit üreten endofitler.....	19
2.6.3. Antioksidan metabolit üreten endofitler.....	21
2.6.4. Antitüberkülotik metabolit üreten endofitler	22
2.6.5. İmmünoşüpresif metabolit üreten endofitler	23
2.6.6. Antikanser ajanlar üreten endofitler	24
2.6.7. İnsektisidal metabolit üreten endofitler	26
2.7. Endemik ve Etnobotanik	27
2.8. Bitki seçimi	29
2.8.1. Endemik bitki seçimi.....	30
3. MATERYAL VE METOT	33
3.1. Materyal.....	33

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.1. Bitki örnekleri.....	33
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri.....	33
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Tamponlar	37
3.1.4. Test Organizmaları	39
3.1.5. PZR reaksiyonunda kullanılan primerler	39
3.1.6. Denemelerde kullanılan cihazlar	40
3.2. Metot	40
3.2.1.Bitki örneği	40
3.2.2. Endofitik mikroorganizmaların izolasyonu.....	41
3.2.3. İzolatların saflaştırılması	42
3.2.4. İzolatların mikroskopik özelliklerinin belirlenmesi	43
3.2.5. İzolatların saklanması	44
3.2.6. İzolatların kültürel karakteristikleri.....	44
3.2.7. İzole edilen türlerin moleküler karakterizasyonu	45
3.2.8. Antibiyotik üretici suşların belirlenmesi	50
4. BULGULAR	53
4.1. Yüzey Sterilizasyonu	53
4.2. Endofit mikroorganizmaların izolasyonu	53
4.2.1. Endofitik fungusların izolasyonu	53
4.2.2. Endofitik Bakterilerin İzolasyonu	54
4.3.İzolatların mikroskopik özelliklerinin belirlenmesi.....	56
4.3.1. Bakterilerin mikroskopik özelliklerinin belirlenmesi.....	56
4.3.2. Fungusların mikroskopik özelliklerinin belirlenmesi.....	58
4.4. İzolatların saklanması	59
4.5. İzolatların kültürel karakteristikleri	60
4.6. İzolatların moleküler karakterizasyonu	60

İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa**

4.7. Antibiyotik üretici suşların belirlenmesi	63
4.7.1. İzolatlardan elde edilen ekstrelerin disk difüzyon sonuçları.....	63
4.7.2. Broth mikrodilüsyon yöntemi ile antibiyotik üretici suşların belirlenmesi	65
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	66
KAYNAKLAR DİZİNİ	78
ÖZGEÇMİŞ.....	96



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Endofitik mikroorganizmaların bitki içindeki yerleşimi	5
2.2 Maytansinoid'in kimyasal yapısı	7
2.3 Konak bitki ve endofiti tarafından üretilen bazı bileşikler	10
2.4 Endofitlerden biyoaktif doğal ürünlerin izolasyon akım şeması	12
2.5 NRPS (A) ve PKS (B) sistemleri.....	15
2.6 Kriptokandin'in kimyasal yapısı.....	18
2.7 Bazı antiviral bileşikler	20
2.8 Pestasin ve İzopestasin'in kimyasal yapısı	22
2.9 Phomoxanthone A ve B'nin kimyasal yapısı	23
2.10 İmmünoşüpresif bileşiğin kimyasal yapısı	24
2.11 Populasyonların Türkiye'deki dağılımı	30
2.12 Dianthus erineceus'un dış görünüşü	32
3.1 Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiş bitki kökleri	41
3.2 İzolasyon petrilerinde bakteriyel ve fungal oluşumlar	42
4.1 İzole edilen saf fungus kolonilerinin MEA ve PDA'daki görüntüleri A) DEK1F, B) DEY12F, C) DEK4F, D) DEY11F, E) DEK20F, F) DEK22F.	54
4.2 İzole edilen saf bakteri kolonileri A) DEK1b, B) DEK3b, C) DEK4b, D) DEK7b, E)DEK8b, F)DEG11b, G) DEK12b, H) DEG13b I)DEK14b, J) DEK15b.	56
4.3 Bakterilerin Gram boyama reaksiyonu sonrası 100X immersion objektifinde görüntüsü A) DEK1b, B) DEK3b, C) DEK4b, D) DEK7b, E)DEK8b, F)DEG11b, G) DEK12b, H) DEG13b I)DEK14b, J) DEK15b.	58
4.4 Endofitik fungusların mikroskopik görüntüsü A) DEK1F, B) DEY12F, C) DEK4F, D) DEY11F, E) DEK20F, F) DEK22F.	59
4.5 PZR amplifikasyonu sonucu elde edilen PZR ürünleri A) 27F-1492R Primerleri ile elde edilen PZR ürünleri, B) ITS1F-ITS4R Primerleri ile elde edilen PZR ürünleri	62

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**Şekil****Sayfa**

- 4.6** Tamura-Nei neighbor joining metodu ile oluşturulmuş A) Bakteri, B) Fungus suşları arasındaki yakınlıkları gösteren filogenetik ağaç. Ağaç, MEGA v7.0 yazılımı kullanılarak oluşturulmuş ve güvenilirliği 1000 tekrarlı bootstrap analizi ile gerçekleştirilmiştir.....62
- 4.7** DEG11b, DEK14b ve DEK 20f numaralı endofitik mikroorganizma izolatlarından elde edilen fermentasyon sıvılarının test organizmalarına karşı göstermiş oldukları antimikrobiyal aktivite sonuçları65

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
<u>2.1 Endofitik mikroorganizmalardan izole edilen biyoaktif metabolitler</u>	<u>27</u>
<u>3.1 PZR reaksiyonunda kullanılan primerler</u>	<u>39</u>
<u>4.1 Endofitik fungus suşlarının izolasyon bilgileri</u>	<u>53</u>
<u>4.2 Endofitik bakteri suşlarının izolasyon bilgileri</u>	<u>55</u>
<u>4.3 Bakteri izolatlarının fenotipik ve mikroskopik özellikleri</u>	<u>57</u>
<u>4.4 Fungus izolatlarının morfolojik özellikleri</u>	<u>59</u>
<u>4.5 16S rDNA ve ITS Bölgesi Dizi Analizi Sonuçları</u>	<u>61</u>
<u>4.6 Endofitik mikroorganizmalara ait bütanol ekstralarının antimikrobiyal</u> <u>aktiviteleri</u>	<u>64</u>
<u>4.7 Bütanol ekstralarının test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri. 66</u>	

1. GİRİŞ

Endofitler, yüksek bitkilerin intra/interselüler dokularında yaşayan ve konak bitkide herhangi bir belirtiye neden olmayan mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Bir çok endofit mikroorganizmanın antibiyotik, antikanser ajanı, insektisidal, antitümör, antioksidan gibi tıp, endüstri ve ziraatte kullanılan yararlı pek çok doğal biyoaktif metabolit üreticisi olduğu bilinmektedir (Kumar vd., 2014).

Bitkiler ve mikroorganizmalar, biyoaktif özellik gösteren doğal ürünlerin önemli bir kaynağıdır. Son yıllarda var olan antibiyotiklere karşı mikroorganizmalar tarafından geliştirilen direnç mekanizmaları ile yeni antibiyotiklere olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Yeni sekonder metabolit eldesi için yapılan araştırmalarda ise endofitik mikroorganizmalar ve ürettikleri biyoaktif metabolitler önemli bir kaynak oluşturmaktadır (Tan ve Zou, 2001).

Bugüne kadar endofitik bakteri ve fungus izolasyonuna yönelik pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar ile doğada 1 milyonun üzerinde fungal endofitin var olduğu bilinmektedir. Fungal endofitlerin ürettiği sekonder metabolitlerin, ışık, kuraklık gibi abiyotik streslere ve doku patojeni, böcek, herbivor gibi biyotik streslere karşı bitkiyi koruduğu kanıtlanmıştır (Firakova vd.,2007). Örneğin, *Hypericum* bitkisinin farklı dokularından 441 tane endofitik mikroorganizma izole edilmiş, bunların mikrobiyal patojenlere ve zararlı böceklerle karşı hiperisin adı verilen bir madde ürettiği saptanmıştır. Bunun yanında, Hiperisin çeşitli alanlarda, antimikrobiyal, antiviral, antidepresan olarakta kullanılmaktadır. Ayrıca fotodinamik özelliği kanıtlandığından beri kanser tedavisinde kullanımı ve güneş panellerinde boya duyarlı güneş hücreleri olarak kullanımı geliştirilmeye çalışılmıştır (Aktuna, 2014).

Askomisetik ve endofitik bir fungus olan *Xylaria*'nın *Candida albicans*'a karşı antifungal özellik gösteren sordarisin maddesinin üreticisi olduğu bulunmuştur (Grabley ve Sattler, 2003). Aynı endofitik fungusun mellisol ve 1,8 – dihidroksinaptol 1-O-a glukopiranosid üreticisi olduğu ve bu maddelerin *Candida albicans* ve Herpes virüs tip-1 'e karşı antiviral özellik gösterdiği belirlenmiştir (Stadler ve Keller, 2008). Bunların yanında funguslar tarafından üretilen ve günümüzde halen pek çok hastalığın tedavisinde aktif olarak kullanılan β -laktam antibiyotikler, griseofulvin, siklosporin A, taksol, ergotalkaloidleri ve lovastatin gibi ilaç grupları mevcuttur (Tan ve Zou, 2001).

Endofitik bakterilerde en az endofitik funguslar kadar önemlidir. Son yapılan moleküler çalışmalar, endofitik bakteri zenginliğini ortaya koymuştur. Endofitlerin varlığında eksprese edilen bitki genleri, bitki-endofit etkileşimleri ile ilgili ipuçları vermektedir (Rosenblueth ve Romero, 2006). Aynı zamanda insan sağlığını tehdit edecek organizmalara karşı önemli bileşikler üretirler. Örneğin, saprofit ve zayıf patojen olan *Pseudomonas viridiflava* bitki ile bağlantılı floresans özelliği olan bir bakteri türüdür. Genellikle çimen türü bitkilerin yapraklarında ya da dokularında bulunur. Bu organizmadan patojen fungus türleri olan *Cryptococcus neoformans* ve *Candida albicans* 'a karşı etkili hepaserin ve β -hidroksiaspartik asit içeren ekomisin adı verilen biyoaktif molekül elde edilmiştir (Strobel,2003). Buna benzer diğer bir örnek ise özellikle yeni doğan bebeklerde ölümlere sebep olan insan patojeni *Serratia marcescens* 'ten izole edilen Oosidin A metaboliti antifungal olarak etki göstermiştir (Ryan vd.,2007).

Türkiye'de, üç kıta arasında doğal bir köprü olması, çeşitli coğrafik özellikleri ve coğrafi farklılığın getirdiği iklim çeşitliliği nedeniyle dünyada benzerine az rastlanan bir bitki çeşitliliğine sahiptir. Türkiye' de 9582 tane bitki türü vardır bunlardan 3155 tanesinin endemik olduğu bildirilmiştir (Bulut ve Tuzlacı, 2013). Verilere bakıldığında endemizm oranının %34.4 olduğu görülür (Erik ve Tarıkahya,2004; Avcı,2005; Özhatay vd.,2005; Duran vd.,2010). Türkiye'nin zengin bitki örtüsü kaynağında dağlık alanlar, doğu, batı ve kıyı kesimler oluşturmaktadır. Bu zengin bitki örtüsünden faydalanarak geleneksel tıbbi ilaçlar yapılmıştır. Bu tıbbi bitkilerin %14.1'i solunum hastalıklarında ,%10'u gastro-intestinal hastalıklarda ,%7.3'ü böbrek sorunlarında ,%7.1'i diyabet tedavisinde %5'i de kolesterol problemlerinde kullanılmıştır (Sargın vd.,2013). Bizde geleneklerin ışığında yeni ilaçların keşfi için biyoaktif molekül üretmeyi amaçlamaktayız.

Bu noktadan hareketle, çalışmanın amacı ülkemizde endemik bitki türü olan *Dianthus erinaceus* bitkisinin farklı (kök, gövde, yaprak vb.) dokularından endofit mikroorganizmaların izole edilmesi, tanımlanması ve bu izolatlardan elde edilecek ekstratlar üzerinde biyoaktivite çalışmalarının gerçekleştirilmesidir. Ayrıca izole edilen mikroorganizmaların sekonder metabolit üretme yeteneklerini anlamak amacıyla küçük ölçekli fermentasyon yöntemiyle süpernatant kullanılarak etil asetat (EtOAc) ve bütanol ekstratlarından aktivite kontrolü yapılması amaçlanmıştır. Test edilen bu yöntemde, disk difüzyon yöntemi ve broth mikrodilüsyon yöntemi seçilmiştir. Bunun yanı sıra bitki dokusundan elde edilen mikroorganizmaların fenotipik, genotipik ve biyokimyasal testler ile tanımlanması hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Endofit Mikroorganizmalar

Endofitlerin keşfinden bu yana çeşitli araştırmacılar, genellikle endofitin izole edildiği ve hangi amaçla test edildiğine bağlı olarak farklı endofit tanımları yapmıştır. Gunatilaka(2006), Endofit terimini bitkilerin iç dokularını kolonize eden ancak konukçusuna patojenik bir etkisi bulunmayan bakteriyel veya fungal mikroorganizmalar olarak tanımlamıştır. Bu simbiyotik ilişkide konukçu bitki (makrofit) endofiti korur ve besler, endofit de karşılığında konukçunun büyümesini ve rekabet gücünü arttırmak, herbivorlara ve bitki patojenlerine karşı korumak için biyoaktif metabolitler üretir (Dreyfus vd., 1994). Endofitler, yüksek bitkilerin intra/interölüler dokularında yaşayan ve konak bitkide herhangi bir belirtiye neden olmayan mikroorganizmalardır (Kumar vd., 2014).

Endofitik mikroorganizmalar arasındaki en yaygın grup olan endofitik funguslar çoğunlukla Ascomycetes ve Fungi imperfecti'ne dahildir ve yaklaşık olarak $1,5 \times 10^6$ tür ile çok büyük, keşfedilmemiş bir doğal molekül kaynağı oluştururlar (Gunatilaka, 2006). Hawksworth ve Rossman (1987)'a göre 1,5 milyon farklı fungal türden şu ana kadar sadece 100 bin'i tanımlanabilmiştir. Yeni çalışmalar yapıldıkça tahmin edilen sayılar gittikçe artmaktadır ve yeni türlerin keşfine olanak sağlamaktadır. Kültür temelli çalışmalarda birçok çeşitteki bakterinin endofitik olarak izole edildikleri bildirilmiştir. Bunların arasında başta buğdaygillerdeki rhizobiumları da içeren Proteobacteria olmak üzere, Firmicutes, Actinobacteria ve Bacteroidetes bulunmaktadır (Rosenblueth vd., 2006). Archaea üyelerinin ise bitkilerle yakın bir endofitik ilişkide olmadığı bildirilmiştir.

İyi anlaşılmış olan endosimbiyotik veya patojenik sistemlerin aksine endofitik etkileşimlerin moleküler temeli hala net olarak anlaşılamamıştır. Hatta birçok endofitik mikroorganizmanın bitkiler için yararlı etkileri olduğuna dair çok sayıda kanıt olmasına rağmen, bu etkileşimlerin ortak bir temeli olup olmadığı bile açık değildir (Reinhold-Hurek vd., 2006).

Bitki dokularında endofitlerin bulunmasının herhangi bir yan etkisinin olmaması ve bitkilere yarar sağlaması gibi nedenlerden ötürü bitki ile fungus arasında simbiyotik ya da mutualistik bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Ayrıca endofitlerin biyoçeşitliliği ile ilgili gözlemler endofitlerin etkin saprofitler ya da

fırsatçı patojenler olabildiğini de göstermiştir. Endofitler bütün bitkilerde kolonize olurlar ve günümüze kadar araştırılan bütün bitkilerden izole edilmişlerdir. Bitkiler ile ilişkileri zorunlu veya fakültatif olabilir ve konukçu bitkiye zarar vermezler. Konukçuları ile mutualizm ve antagonizmi içeren kompleks etkileşimler gösterirler (Parker, 1995; Dudeja vd, 2012). Endofitler simbiyozis kurmak için bitkilerin büyümesini stimüle edici bileşikler üretirler ve bitkilerin çevrelerine daha iyi adapte olmasını sağlarlar (Das ve Varma, 2009; Lee vd, 2004). Endofitik mikroorganizmaların ürettiği bu biyoaktif metabolitler, bazı spesifik hastalık hedeflerine karşı kimyasal olarak kullanılmasını ve yeni farmasötiklerin keşfedilmesini sağlamaktadır.

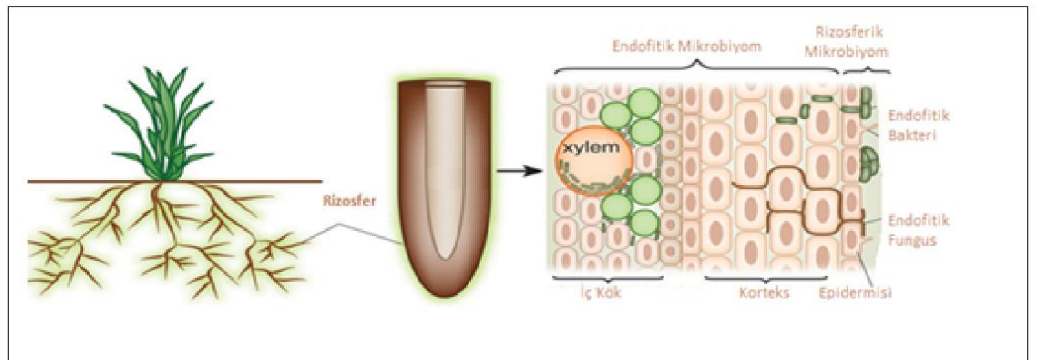
Endofitler, öncelikle tıp alanında kullanıldığı gibi, tarım ve endüstri alanındada geniş potansiyeli olan, biyoaktif ve kimyasal olarak yeni bileşikler için bol ve güvenilir bir kaynak sunan çok fazla araştırılmamış bir mikroorganizma grubudur. Bu sınırsız kaynak sunan az anlaşılmış mikroorganizmalarla ilgili çalışmalar yeni başlamış olmasına rağmen, bu alanda keşfedilecek organizma, ürün ve yararların büyük potansiyelinin umut verici olduğu düşünülmektedir (Tejesvi vd., 2007). Tarım alanında özellikle ziraatte hem büyüme destekleyici maddeler hem de hastalıkların oluşmasını önlemek için profilaktik katkılar olarak hayvan yemlerinde takviye şeklinde endofitlerin ürettiği metabolitler kullanılmaktadır.

Endofitlerin ilk keşfi 1904'e dayanmasına rağmen (Freeman, 1904), ekolojik önemlerinin ve çeşitli yapı ve biyolojik aktiviteye sahip metabolitleri üretme potansiyellerinin son yıllarda anlaşılmasına kadar bu grup mikroorganizmalara ilaç keşfi alanında gereken önem verilmemiştir. Dolayısıyla endofitler canlı bitkilerin dokularında bulunan, tıpta, ziraatte ve endüstride kullanılmak üzere araştırılan yeni doğal ürün kaynağı olarak yüksek potansiyele sahip, nispeten az çalışılmış mikroorganizmalardır. Bu organizmalar üzerinde yapılacak olan çalışmalar ile yeni türlerin keşfi ve onların ürettiği metabolitler ile birçok alanda gelişmeler yaşanmasını mümkün kılmaktadır. Dünyada yaklaşık olarak 300.000 yüksek bitki türü bulunmaktadır ve bunların hepsi bir veya daha fazla sayıda endofit mikroorganizmaya ev sahipliği yapmaktadır (Strobel vd., 2004). Bu sonsuz kaynak düşünüldüğünde bu alanda yapılabilecek potansiyel çalışmalar açıkça kendini belli etmektedir.

2.2. Endofitik mikroorganizmaların bitki içinde kolonizasyonu

Endofitik mikroorganizmaların gövde ve yapraklarda kolonize olması ve bitki içerisinde sistemik olarak yayılabilmesi araştırmacılar tarafından iyi bilinmektedir (Hardoim vd., 2008). Bakteriyel ve fungal endofitlerin konukçu bitkiye yerleşmeleri ve kararlı bir ilişki kurmaları için çeşitli ihtiyaçları bulunmaktadır. Endofitik bakteriler, köklerin aktif girişinde öne çıkan bölgeler, yan köklerin çıkış noktaları ve kök ucundaki farklılaşma ve uzama bölgelerinde kolonize olurlar. Bu bölgedeki tam olarak farklılaşmamış ve hafifçe bozulmuş olan dokular endofitik bakterilerin penetrasyonuna olanak sağlar. Epidermal ve kortikal bölgelerdeki hücrelerarası boşluklar ve lizise uğramış bitki hücreleri temel kolonizasyon bölgeleridir ve endofitik bakteri hücreleri buralarda bölgesel olarak 10^{10} hücre/cm³ kadar yüksek bir sayıya ulaşabilirler. Vasküler doku ve ksilem hücreleri de daha az yoğunlukta olsa da istila edilebilir; vasküler dokunun kolonizasyonu, sürgünlere de ulaşan sistemik bir yayılmaya neden olur (Compant vd., 2005).

En yüksek endofitik mikroorganizma yoğunluğu genellikle köklerde olup, gövdeden yapraklara doğru ilerledikçe bu yoğunluk azalmaktadır. Bu yüzden endofitler ekolojik olarak başarılı olabilmek için, kökleri kolonize eden diğer mikroorganizmalar ile rekabet etmek zorundadırlar. Organizmaların bitki içerisindeki devamlılığı sağlamak için diğer florayla rekabet etme zorunluluğu, endofitlerin metabolit üretmesine sebep olur (Sturz vd., 2000).



Şekil 2.1 Endofitik mikroorganizmaların bitki içindeki yerleşimi

Yapılan mutasyonel analiz çalışmalarıyla köklere tutunmada bakteriyal endofitlerin yüzey özelliklerinin özellikle önemli olduğu ortaya konulmuştur. Lipopolisakkarit kompozisyonunun *Herbaspirillum seropedicae*'nin mısır köklerine tutunmasında (Balsanelli vd., 2010) tip IV pilusların *Azoarcus* sp. BH72'nin çimen bitkisine tutunmasında ve yayılmasında önemli oldukları gösterilmiştir (Reinhold-Hurek vd., 2006).

Endofitik kolonizasyon için sadece tutunma değil aynı zamanda katı yüzeylerde hareket için kullanılan ve pilusun PilT-aracılı kasılmasıyla yapılan çekme hareketi de gereklidir (Böhm vd., 2007). Endofitlerin içsel kolonizasyonunda selüloz ve pektinaz gibi bitki-polimeri parçalayıcı enzimlerin rol oynadığı da düşünülmektedir. *Azoarcus* sp. BH72'nin endoglukanaz mutant bir suşu pirinç köklerinde yaban tipin yaptığı sistemik yayılmayı yapamamaktadır (Reinhold-Hurek vd., 2006). Bu nedenle başarılı endofitlerin hücre çeperi parçalayıcı enzimleri olması olasıdır.

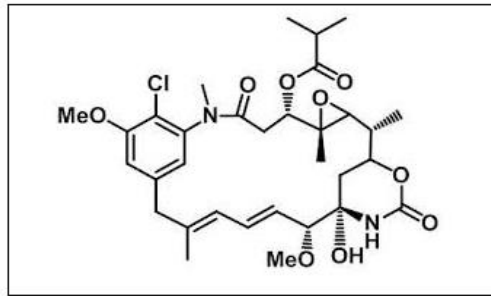
2.3. Endofitik mikroorganizma ve bitki etkileşimleri

Endofitik mikroorganizma ve bitkiler arasındaki ilişkinin anlaşılması için bu birliktelik yoğun bir inceleme altına alınmıştır. Bitki ve mikroorganizma ilişkisinin anlaşılması hem aralarındaki ilişkinin bulunmasında hemde yeni biyoaktif bileşik bulma çalışmalarında yardımcı olması beklenmektedir. Endofitlerin doğadaki rolleri ve değişik konak bitki türleri ile ilişkilerinin ne olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir. Bazı endofit funguslar (*Fusarium* spp., *Pestalotiopsis* spp. ve *Aspergillus* spp.) ve bakteriler (*Pseudomonas* sp. ve *Bacillus* sp.) birden çok bitkide bulunmaktadır. Zaten endofitlerin doğrudan bitkiye spesifik olması pek gözlenen bir durum değildir. Aynı zamanda bir endofit mikroorganizma şans eseri bitki içerisinde olmasından ziyade rizosfer içindeki biyotadan bitki sistemine dahil olması daha mümkündür (Strobel ve Daisy, 2003; Kharwar ve Strobel, 2011).

Endofitler ve bitkiler arasındaki birlikteliğin anlaşılması için moleküler, kültürel ve ekolojik pek çok çalışma yapılmıştır. Endofitlerin, metabolitleri doğal ortamda ve laboratuvar ortamında ne amaçla ürettikleri yönündeki belirsizlikte

ilgi konusu olmuştur. Endofit tarafından in situ olarak üretilen biyoaktif bileşikler endofitin bitki dokularındaki hâkimiyetini kolaylaştırdığı, bu sayede konukçu bitki (makrofit) endofit mikroorganizmayı koruyup beslediği ve karşılığında bitkinin büyümesini desteklediği, rekabet gücünü arttırarak, herbivorlara ve bitki patojenlerine aynı zamanda çevresel streslere karşı koruduğu muhtemel görünmektedir. Bitkilerin büyümelerinin desteklenmesi oksin, sitokinin ve giberellin gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin bakteriyel üretimi ile sağlanır ayrıca endofitik bakteriler, İndol asetik asit (Lee vd., 2004) gibi fitohormonları üreterek doğrudan ve bitkide fitohormon sentezini etkileyerek dolaylı olarak bitki gelişimini uyarabilir (Iospenko ve Ignatov, 1995),siderofor üretimi (Arora vd., 2001) ve fosfatın çözünübilirliği aktivitesi gibi mekanizmalar ile minerallerin bitkiye alınımını kolaylaştırabilir (Sarapatka ve Kraskova, 1997).

Eskiden sadece bitkilere özgü olduğu düşünülen doğal ürünlerin endofitler tarafından da üretilmesi, orijinal kaynak organizmalar hakkında ilgi çekici soruları da akla getirmektedir. Gerçekte çeşitli sözde “bitki metabolitlerinin” aslında onların endofitlerinin biyosentetik ürünleri olması daha gerçekçidir. Önemli bir örnek, orijinal olarak yüksek bitkilerden izole edilmiş olan çok etkili bir anti tümör maytansinoid (**Şekil 2.2**), bir Aktinobakteri olan *Actinosynnemাপretiosum auranticum* tarafından üretilmesidir (Yu vd., 2002). Bu çalışma maytansinoid iskeletinin gerçek biyosentetik kaynağının bakteriyel bir endofit olduğunu doğrulamıştır. Horizontal gen transferi bitkiler tarafından üretilmesini açıklayabilmesine rağmen daha olası senaryo maytansinoidlerin endofitler tarafından üretilmesidir (Cassady vd., 2004).



Şekil 2.2 Maytansinoid'in kimyasal yapısı

Endofit ile konak bitki arasındaki ilişkinin fizyolojisi ve biyokimyası hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Endofitlerin biyolojisini, iklim

koşulları, bitkinin yaşı, bulunduğu çevre ve lokasyon gibi bitkide değişimlere yol açan sebepler etkiler. Esasında moleküler düzeydeki ileri çalışmalar bitki ile endofit arasındaki ilişki ve ekolojiye odaklanmalıdır. Bütün bu etkileşimler muhtemelen doğada bir amaç için kimyasal olarak ortaya çıkmıştır. Bu organizmaların doğadaki rolü ile ilgili ekolojik farkındalık, en yüksek potansiyele sahip endofitik aktivitenin hedeflenmesine yardımcı olacaktır (Strobel ve Daisy, 2003; Kharwar ve Strobel, 2011).

Herhangi bir bitki-mikroorganizma etkileşiminde kararlı bir ilişki kurulması için öncelikle bitki ve mikroorganizma arasındaki fiziksel karşılaşmanın gerçekleşmesi ve bunu takiben diğer fiziksel ve kimyasal bariyerlerin aşılması gereklidir. Bir endofit konukçunun savunma mekanizmalarını aktive etmeyip, konukçunun toksik metabolitleri ile etkisizleştirilmeden önce öz-direnç sağlar ve konukçusunun içinde görünür bir enfeksiyon veya hastalık belirtisi olmadan büyümeyi gerçekleştirir. Bu teoriyi açıklamak için ilk önce “Dengeli antagonizma” hipotezi önerilmiştir (Schulz vd., 1999; Schulz ve Boyle, 2005). Bu hipoteze göre; asemptomatik kolonizasyon, konukçu ve endofit arasındaki antagonizmaların bir dengesidir. Endofitler ve patojenlerin her ikisi de bitki savunma mekanizmalarına karşı birçok virülens faktörü taşırlar. Eğer fungal virülens ve bitki savunması dengelenirse, ilişki açıkça asemptomatik ve avirulent olarak kalır. Bu faz, çevresel faktörlerin antagonizmalar arasındaki hassas dengeyi bozmada ana rolü oynadığı geçici bir süreçtir. Eğer bitki savunma mekanizmaları, fungal virülens faktörlerinin tamamen üstesinden gelirse fungus elimine edilir. Aksine eğer bitki fungusun virülens faktörlerine yenik düşerse, bitki-patojen ilişkisi bitki hastalığına dönüşecektir (Kusari vd., 2012).

Son zamanlarda bitki-endofit etkileşiminin sadece virülens ve savunma arasındaki bir denge olmadığı, çok daha kompleks ve düzenli bir şekilde kontrol edilen bir etkileşim olduğu ortaya çıkartılmıştır. Örneğin, *Camptotheca acuminata* bitkisi, topoizomeraz I-DNA kompleksine bağlanıp kompleksi stabilize ederek topoizomeraz I’i inhibe eden anti kanser bir bileşik olan kamptotesin üretir (Kusari ve Spiteller, 2012a). *C. acuminata*’nın iç kabuk dokularından izole edilen kamptotesin üreten bir endofitin (*Fusarium solani*), topoizomeraz I’inin kamptotesinle bağlanan ve katalitik olan domainlerinde spesifik aminoasit

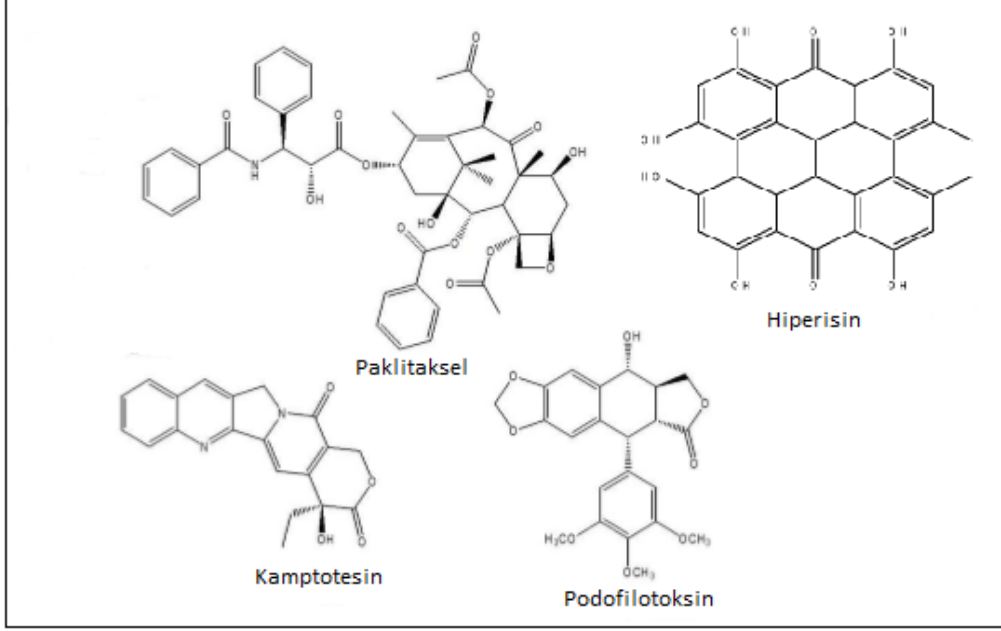
değişiklikleri yaparak kendisinin ve bitkinin kamptotesinine karşı koruma sağladığı bulunmuştur (Kusari vd., 2012b).

Bitkilerin endofit mikroorganizmalarla olan ilişkilerinin temellerine dair son hipotez ise “bitki-endofit koevolüsyon hipotezi”dir (Ji vd., 2009). Buna göre, endofitlerin biyoaktif sekonder metabolitler üreterek bitkiye kimyasal savunmasında yardımcı olmaları mümkündür. Bu hipoteze yönelik iki tane ilgi çekici önerme yapılmıştır. “Mozaik etki teorisi” ne göre endofitler konukçu bitkileri, normalde genetik olarak uniform olacak olan bitki organları içinde ve arasında heterojen bir kimyasal kompozisyon oluşturarak korurlar (Carroll, 1991). Sonuçta bu organlar tesadüfî şekilde lezzetlilik veya herbivorlar için değerleri bakımından ve patojenler için enfektivite anlamında farklılaşırlar. Diğer teori ise endofitlerin kendi konukçularına “kazanılmış immün sistemleri” olarak yardımcı olduklarını savunur (Arnold vd., 2003).

En son Howitz ve Sinclair (2008) tarafından öne sürülen “ksenohormesis” hipotezi bitkilerde sinyalleşme ve stresle indüklenen moleküllerin, evrimsel seçici baskılar altında böyle bir yetenek geliştiren heterotroflar (hayvanlar ve mikroorganizmalar) tarafından hissedilebildiğini ifade eder. Heterotroflar bu bileşikler sentezleme kapasitelerini yavaş yavaş kaybetmelerine rağmen, benzer sekonder metabolitleri tekrar üretmek için bitkilerdeki kimyasal ipuçlarını hissetme kapasitelerini korumuş olabilirler. Dolayısıyla, bazı gen kümeleri evrimsel süreç içinde bitkiler, mikroorganizmalar ve hayvanlar arasında muhtemelen homolog olarak kalmış olabilir ve bunlar uygun bitki-endofit ve/veya endofit-endofit birliktelikleriyle aktive edilebilirler. Örneğin son zamanlarda, orijinal olarak sadece *Papaver somniferum*’a (haşhaş) münhasır olduğu düşünülen morfini memelilerin de sentezleyebildikleri ortaya çıkartılmıştır (Grobe vd., 2010). Böylece, önceleri sadece bitkilerin sentezleyebildiğine inanılan bileşiklerin aynı zamanda endofitler tarafından da sentezlenebilecekleri kanıtlanmıştır.

Sonuç olarak endofitik mikroorganizmaların bitki tarafından patojenlere karşı savunma amacıyla kullanılan biyoaktif bileşikler sentezleme kapasitesinde oldukları ve bu bileşiklerin bazılarının yeni antibiyotik ve antitümör ilaçların keşfinde kullanıldığı ispatlanmıştır (Strobel vd., 2004; Staniek vd., 2008; Aly vd., 2010; Kharwar vd., 2011; Kusari ve Spiteller, 2012b). Sıklıkla terapötik değere veya potansiyele sahip bitki sekonder metabolitleri üreten endofitler de

keşfedilmektedir. Örneğin; paklitaksel (Taksol) (Stierle vd., 1993), podofilotoksin (Eyberger vd., 2006; Puri vd., 2006), deokspodofilotoksin (Kusari vd., 2009a), kamptotesin ve yapısal analogları (Puri vd., 2005; Shweta vd., 2010), hiperisin ve emodin (Kusari vd., 2008, 2009b).



Şekil 2.3 Konak bitki ve endofiti tarafından üretilen bazı bileşikler

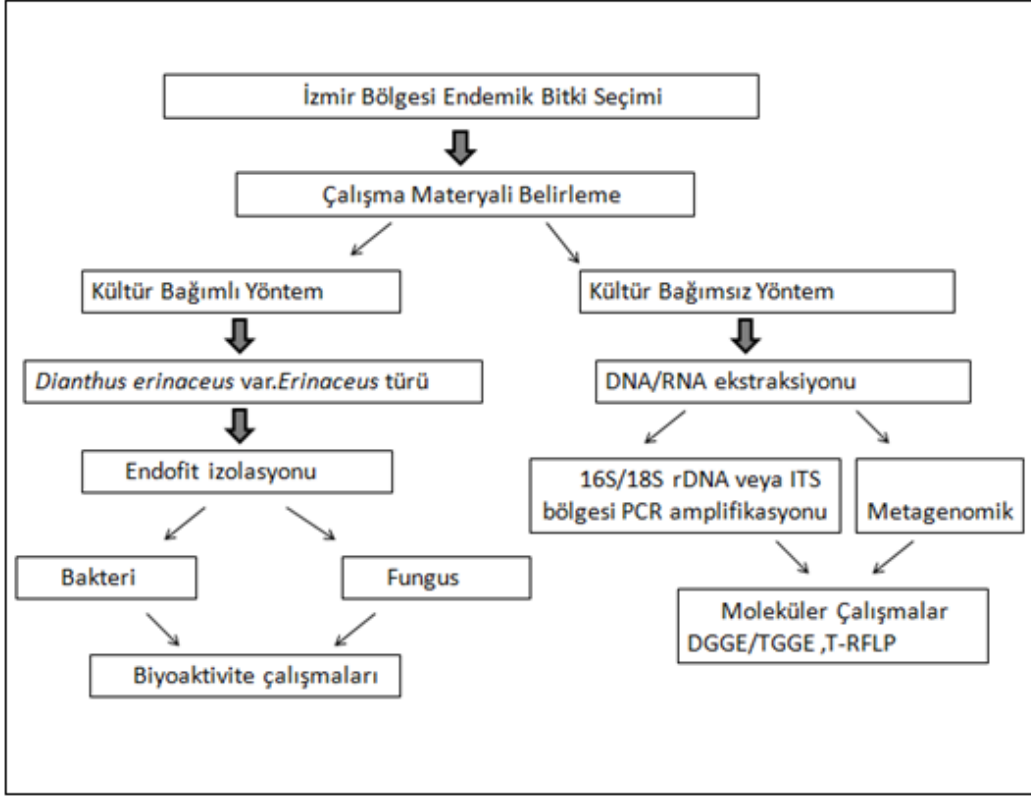
Endofitler tarafından bitki konukçularına ait biyoaktif bileşiklerin üretilmesi sadece ekolojik yönden değil, biyokimyasal ve moleküler bakımdan da önemlidir. Bu nedenle bakteriyel ve fungal endofitler yeni ve biyoaktif sekonder moleküllerin keşfedilmesi için büyük bir potansiyel sunmaktadır. Endofitlerden elde edilen biyoaktif metabolitlerin en önemlilerinden bir tanesi de paklitaksel'dir (Taksol) (Şekil 2.3). Paklitakzel ve bazı türevleri endofitler tarafından üretilen antikanser ajanlarının ilk grubudur. Son derece fonksiyonel diterpenoid paklitakzel, ilk olarak 1960'larda son on yılın en önemli ve en ilginç antikanser ajanı olarak keşfedilmiştir. Sitotoksik aktivitenin paklitakzelden kaynaklandığı 1962 yılında Washington eyaletinde *Taxus brevifolia* Nutt.'a ait ağaç kabuğu ve dalların toplanıp ekstre edilmesi ve biyoaktivite için analiz edilmesi sonucunda keşfedilmiştir. *Taxus brevifolia*'dan elde edilen ekstrenin bazı lösemiler, karsinosarkomaya karşı aktivite gösterdiği bulunmuştur (Strobel ve Daisy, 2003).

2.4. Endofitik mikroorganizmaların izolasyonu

Endofitler, canlı bitki dokuları ile yakın bir ilişki içinde yaşarlar. Bu yüzden, endofitik mikroorganizmaları yaygın olarak izole etmek için kullanılan yöntemleri ve seçimleri anlamak kritik önem taşır. Endofitleri elde edebilmek için öncelikle benzersiz biyoloji, yaş, endemizm, etnobotanik tarihçesi ve / veya çevresel uyumluluk sağlayabilecek bir bitki türü seçilmelidir. Aynı zamanda, dünyanın tropik ve yarı tropik bölgelerinde yetişen bitkilerin, daha az bitki çeşitliliğine sahip olan kurak veya daha soğuk bölgelerde yetişen bitkilerden daha geniş çeşitlilikte endofitlere sahip oldukları belirlenmiştir. Bitki seçiminde bu durumda göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışma için seçilen bitkinin rastgele olmasındansa belirli sebepleri olması gereklidir. Örneğin, sürekli suyun ve atığın geçtiği kayaların arasında bulunan bir bitki seçildiğinde, o bitkinin sürekli yara aldığı görülmüştür. Bitkinin, hasta olması beklenirken, yaygın oomisetik fungi (fitopatojenik su kalıpları) tarafından hala enfeksiyona karşı direnmektedir. Çünkü birçok giriş kapısı endofitler tarafından üretilen metabolitler sayesinde korunmaktadır. Bu durum, güneydoğu Venezuela'nın Auyan Tepui'sindeki nehir sistemlerinde yetişen bir su bitkisi, *Rhyncholacis penicillata* üzerinde *Serratia marcescens* türünün ürettiği ookindin A (yeni bir antifungal ajan) sayesinde kendini çevresel etmenlerden korumasıyla aynıdır (Strobel vd.,1999).

Çalışma için kullanılacak bitkiler arazide belirlenip, tanımlandıktan sonra coğrafik pozisyonları belirlemek amacıyla GPS yardımıyla tam olarak konumları bulunmalıdır. Endofit izolasyonunda ilk basamak küçük kök, gövde, yaprak, dal parçalarının bitkiden kesilmesi ve fazla nemi uzaklaştırıldıktan sonra plastik poşetlere yerleştirilmesidir. İzolasyon petrilere yerleştirilene kadar bitki parçaları +4°C'de muhafaza edilmelidir. Bitki materyalleri laboratuvarda yüzeydeki kontamine mikroorganizmaları elimine etmek için %70'lik etanol ile iyice yıkanmalıdır. Sterilizasyon işlemlerinden sonra örnekler steril lamin air kabinde yüzeyleri kuruyana kadar bekletilmelidir. Daha sonra steril bir bisturi yardımıyla dış dokular uzaklaştırılarak iç dokular dikkatlice kesilip uygun besiyerlerine ince parçalar halinde konulmalıdır. 4-5 gün sonra fungusların hifsi yapıları patatose dekstroz agar'a aktarılmalıdır. Bu işlem ile endofitik mikroorganizmaların spor oluşturması sağlar ve organizamanın tanımlanmasında yardımcı olur. Fenotipik

tanımlanmanın yanı sıra moleküler ve biyokimyasal olarak tanımlamak gereklidir (Strobel, 2003).



Şekil 2.4 Endofitlerden biyoaktif doğal ürünlerin izolasyon akım şeması

2.5. Sekonder metabolitler

Sekonder metabolitler organizma tarafından çevresine daha iyi adapte olabilmesi için üretilen fakat organizmanın büyümesi için gerekli olmayan düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Biyoaktif metabolitler mikroorganizmanın hayatta kalması için önemli rol oynamaktadır ve mikroorganizma ve konukçu bitki arasında sinyalleşme, savunma ve regülasyon gibi çeşitli metabolik etkileşimleri içermektedir (Schulz vd., 2005). Mikrobiyal metabolitler çevre koşullarına göre ve organizmadan organizmaya farklılık göstermektedir. Üretilen sekonder metabolit, mikroorganizmanın büyüdüğü ve adapte olduğu çevreye göre değişmektedir. Örneğin, mikroorganizmanın yaşadığı habitat değiştikçe ürettiği metabolitler siklosporin A, ekinokandin B, papulakandinler ve verrukinallerin olarak gözlenmiştir (Dreyfuss vd., 1994).

Strobel and Schulz (2002), 6500 adet endofitik fungus izole etmişlerdir. Bu mikroorganizmalardan sekonder metabolit elde etmişler ve bunları yapısal olarak gruplara ayırmışlardır. Bu gruplar, alkaloidler, steroidler, terpenoidler, peptitler, poliketonlar, flavonoidler, quinoller, fenoller, ksantonlar, kinonlar, izokumarinler, benzopiranonlar, tetralonlar, sitokalsinler, perilen türevleri, furandionlar, depsi-peptidler and enniatinler'i içermektedir. Daha sonra yapılan bir çalışmada palmarumisinler ve yeni benzopiranonlar bu yapısal gruplar içerisinde dahil olmuştur (Tan vd., 2001).

Etnobotanik bitkilerle ilişkili endofitlerin ürettiği sekonder metabolitler, hastalıkları iyileştirmek için kullanılabilir (Tejesvi vd., 2007). Endofitik fungusların, biyoaktif metabolit üretmesi için uygulanan fermentasyon prosesinin birçok avantajı vardır;

- Biyoaktif maddelerin sanayide üretilmesi (farmasötik ilaçlar) için tekrarlanabilir ve üretilebilir olması gerekir. Biyoaktif maddenin kaynağı mikroorganizma ise, tank fermantörlerinde gerektiği gibi yetiştirilebilir ve neredeyse tükenmez bir kaynak olabilmektedir.
- Mikroorganizmalarda oluşan metabolitin eskalasyonu kolaydır. Büyüme koşulları değiştirildiğinde o metabolitin daha etkili türevlerine ulaşılabilir.
- Bitkiden sekonder metabolit elde etmek endofitik mikroorganizmalardan elde etmekten daha zordur. Çünkü onların büyüme evreleri oldukça uzun olup hasat dönemlerini beklemek gerekir. Ancak endofitik mikroorganizmalarda kültür alınıp fermentasyon koşullarının optimize edilmesi sekonder metabolit üretmesi için yeterli olmaktadır.

Görüldüğü üzere, 1904'te Delice (*Lolium temulentum*) bitkisinden yapılan ilk endofitik fungus izolasyonundan itibaren çalışmalar ilerleme kaydetmiştir. Stierle ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda, endofitik funguslardan ekstrakte edilen önemli biyoaktif özellik gösteren metabolitler için patent alınmıştır (Priti vd., 2009). Endofitik funguslardan izole edilen metabolitler, antibiyotik, antiviral, antioksidant, antitüberkilotik, immüno-süpresif, antikanserojenik ve insektisidal ajan olarak kullanılmaktadır (Schulz vd., 2002, Strobel vd., 2003, Wiyakrutta vd., 2004).

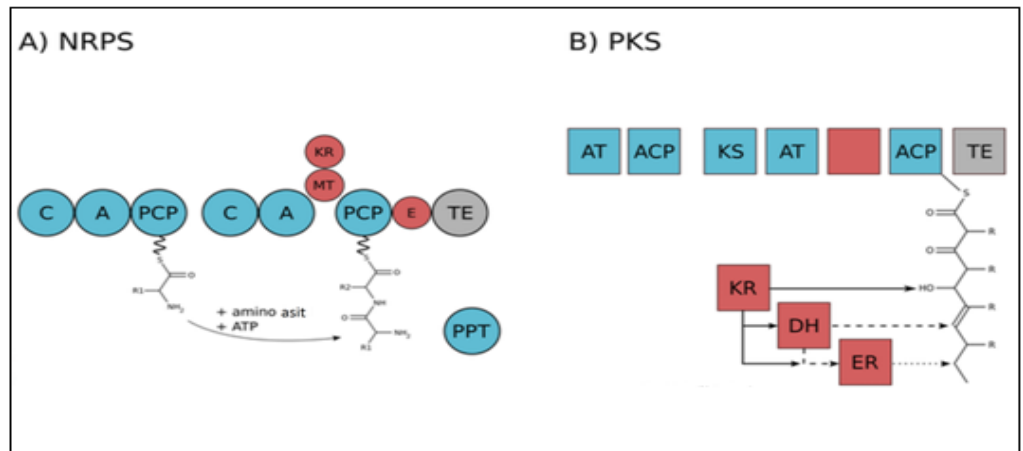
2.5.1. Sekonder metabolitlerin biyosentezi

Biyotik ve abiyotik uyarılar, karbon-beslenme dengesine, genotip ve ontogenez gibi faktörler bitkilerdeki sekonder metabolitlerin biyosentezini kontrol edip düzenlemektedir (Mary vd., 2006). Bitki ve endofitik mikroorganizma arasındaki etkileşim bazı kimyasal uyarılar salgılanması sonucu sağlanmaktadır. Sekonder metabolitlerin üretiminden sorumlu genler endofitik bakteri ya da fungus içerisinde kümelenmiş halde bulunmaktadır. Ayrıca genetik tarama yöntemleriyle incelenen bu genlerin oldukça duyarlı ve hızlı olduğu bulunmuştur (Keller, 2005).

Endofitler, yüksek organizmalara karşı düşük toksisiteye sahip biyoaktif maddeler üreten kimyasal sentezleyici olarak görülmektedir (Owen ve Hundley.,2004). Endofitler, bu kimyasalları çeşitli metabolik yollar vasıtasıyla sentezlemektedir. Bu yollar; poliketid, izoprenoid ve aminoasit türetme olarak sıralanabilir (Tan ve Zou., 2001). Bu sistemler detaylı olarak incelendiğinde poliketid sentaz (PKS) ve non-ribozomal peptid sentetaz (NRPS) sistemleri tarafından yönetildiği görülmüştür (Sauer, 2002; Rakshith ve Sreedharamurthy, 2010). PKS ve NRPS biyosentetik yollarının belirlenmesi, bir organizmanın biyoaktif bileşikler üretme potansiyelini değerlendirmek için kullanılabilir. Poliketidler, funguslarda fazla bulunan, oldukça oksijenlenmiş sekonder metabolitlerdir. Bu metabolitlerin sentezi Poliketid sentaz (PKS) adı verilen oldukça büyük bir enzim ailesi tarafından katalizlenmektedir. PKS enzimleri ketosentaz, açıl transferaz ve açıl taşıyıcı protein gibi tekrarlayan ünitelerden oluşmaktadır. Bu tekrarlayan üniteler, uzayan zincirler ve katlanmalar PKS enzim ailesinin çeşitliliğini oluşturmaktadır (Hill, 2006). Sentez AT domaininde bir açıl-CoA monomerinin (genellikle malonil- CoA veya metil malonil- CoA) seçimiyle başlar. Bir sonraki aşamada açıl-CoA ACP domainine transfer edilerek ACP domainindeki fosfopantetein grubuna bağlı sülfidril grubuna (SH) kovalent olarak bağlanır. Kondensasyon aşamasında KS domainine bağlı bulunan sisteyin sülfidril grubuna bağlı asetil veya propionil grubu fosfopanteteinin sülfidril grubuna transfer edilir. Bu durumda kondensasyon reaksiyonu meydana gelmekte ve malonil-CoA içindeki karboksil grubu CO₂ şeklinde ayrılmaktadır. Oluşan ürün daha sonraki aşamalarda oluşacak poliketid ürüne göre KR domainindeki

katalizle redüklenir, DH domaininde dehidratlanır, ER domaininde ise DH domainindeki dehidratasyon sonucunda oluşan çift bağ indirgenerek doymun hale getirilir. Kondensasyon döngüsü bu şekilde devam ederek zincir uzaması devam eder. Sentezin son aşamasında TE kataliziyle zincir uzaması tamamlanır (Hopwood ve Sherman 1990, Khosla, 1997, Schwarzer vd., 2003, Jimenez vd., 2010).

NRPS sistemleri ise; adenilasyon domaini (A), peptidil taşıyıcı protein ya da tiyolasyon domaini (PCP/T) ve kondensasyon domaini (C) olmak üzere en az üç domain içerir (Büber ve Açan 2004). Final modülü bir tiyoesteraz (TE) domaini ile sonlanır. Bu, zincir uzamasının bitişini katalizler. Peptid sentetazlar tarafından peptid bağı oluşumu mekanizmasını açıklamak üzere geliştirilen modele “multiple carrier model/ çoklu taşıyıcı model” adı verilmektedir (Büber ve Açan 2004). Bu mekanizmaya göre; adenilasyon domaininde substrat olan aminoasit, ATP hidrolizi yoluyla aktive edilir. Adenilasyon yoluyla aktive olmuş aminoasitler PCP domainindeki 4-fosfopantetein grubuna bağlı sülfidril grubuna (SH) kovalent olarak bağlanır (Marahiel vd., 1997; Mootz vd., 2002; Sieber ve Marahiel 2005; Grünewald ve Marahiel, 2006). Bu aşamadan sonra substrat, eğer varsa epimerizasyon veya N-metilasyon gibi değişiklikler geçirir (Döhren vd., 1999). Bu değişiklikleri geçirdikten sonra bir kondensasyon domainindeki alıcı (akseptör) konumuna taşınır. Bir önceki modülün fosfopantetein taşıyıcısı tarafından verici (donör) konumuna yerleştirilmiş olan aminoasitin peptidil grubu ile kondensasyon meydana gelerek peptid bağı oluşumu gerçekleşir (Sieber ve Marahiel, 2005).



Şekil 2.5 NRPS (A) ve PKS (B) sistemleri

2.6. Sekonder metabolit üreten endofitler

Endofitlerden elde edilen doğal ürünlerin büyük çoğunluğunu antibiyotikler oluşturmakta ve sonra da anti kanser ajanlar (Stierle vd., 1993), biyolojik kontrol ajanları (Strobel, 2004) ve diğer birçok biyoaktif bileşik gelmektedir (Golinska vd., 2015). Örneğin; *Artemisia annua* geleneksel Çin tıbbında kullanılan ve bir sıtma ilacı olan artemisini sentezlediği bilinen bir bitkidir. *A. annua*'dan izole edilen ve fungus olan *Colletotrichum* sp. kültüründen ekstrakte edilen ve spektroskopik yöntemlerle karakterize edilen 3 yeni metabolitin insan patojeni fungus ve bakterilere karşı da etkili oldukları bulunmuştur (Lu vd., 2000). Son yıllarda yüksek bitkilerde bulunan endofitik bakteri ve funguslardan fermentasyon, biyoaktivite rehberli izolasyon ve spektroskopik yöntemlerle yapı tayini kullanılarak keşfedilen çok sayıda antimikrobiyal bileşik vardır.

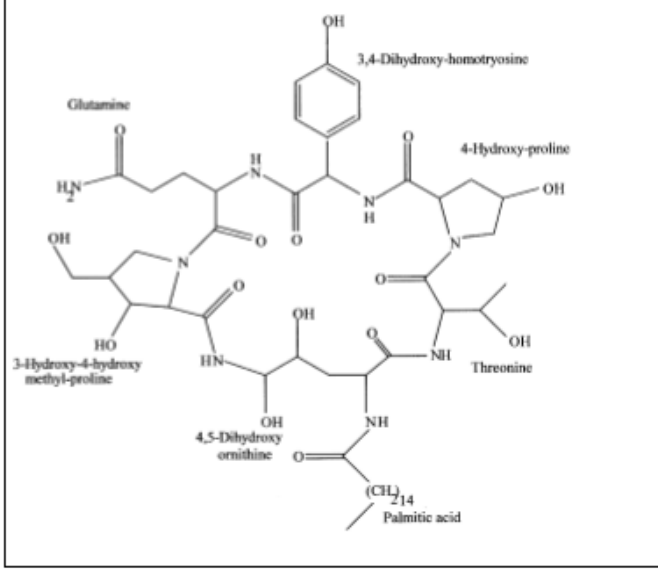
2.6.1. Antibiyotik üreten endofitler

Antibiyotikler, mikroorganizmalar tarafından üretilen ve diğer mikroorganizmalara karşı düşük/yüksek konsantrasyonlarda etkili olan organik ürünler olarak tanımlanmaktadır. Bu antibiyotiklerin genellikle kaynağı endofitlerdir. Endofit mikroorganizmalardan elde edilen doğal ürünlerin, bakteriler, funguslar, virüsler, fitopatojenler, parazitler gibi insan, bitki ve hayvanları etkileyen geniş aralıktaki hastalık yapıcı ajanlara karşı inhibe edici ya da öldürücü etkileri olduğu gözlenmiştir (Guo vd., 2007).

Antibiyotik üreten spesifik endofitler üzerinde yapılan araştırmaların kökeni, yerli halkın kullandığı yerel medikal ürünleri içeren etnobotaniğe dayanıyor olabilir. Örneğin, Avustralya'nın Kuzey Bölgesi'nde, çeşitli Aborjin grupları, ciltteki yaraları ve enfeksiyonları iyileştirmek için yılanbaşı (*Kennedy nigriscans*) adı verilen yerel bir bitkiyi kullanmaktadır. Dalabon ve Mayali'de "mangerrporlo" olarak bilinen bir bitkiden taze kök parçasını keserek çeşitli yöntemlerle yapışkan bir macun halinde yara veya enfeksiyon üzerine uygulandığını göstermiştir. Bu bitkinin doğal kullanımı nedeniyle, iyileştirici özelliklerinden bazılarının aslında bir veya daha fazla endofitin ürettiği metabolit olabileceği düşüncesiyle endofitik mikroorganizmalar kaynak olarak

seçilmektedir. Bu bitkiden aynı zamanda güçlü bir antibakteriyal ajan olarak keşfedilen *Streptomyces* sp. türünde izole edilmiştir. İlk kez dikotiledon bir bitkiden aktinobakteri izole edildiği için ilgi odağı olmuştur. Daha sonra *Lolium perene* adında çok yıllık bir bitkiden izole edildiği bildirilmiştir (Guerney vd., 1993). Bu endofit, lösin ve fenilalaninin kümeleşmiş formu olan metilalbonürin olarak adlandırılan zayıf bir antibiyotik üretmektedir. *Streptomyces*, dünya antibiyotiklerinin %70'inden fazlasının kaynağı olmakla beraber, çoğunlukla topraktan izole edilmektedir. Bu mikroorganizmayla ilgili en önemli keşif Reggie Munumbi Miller'ın bulduğu, A, B, C ve D munumbisinler olarak adlandırılan geniş spektrumlu (antibakteriyal, antifungal ve *Plasmodium* sp. üzerinde oldukça etkili) peptid antibiyotiklerdir (Miller vd., 1998).

Cryptosporiopsis quercina Avrupa'da ağaçlarda yaygın olarak bulunan *Pezicula cinnamomea*'nın düzensiz formudur. Avrasya'ya özgü tıbbi bitki *Tripterigeum wilfordii*'den izole edilmiştir (Strobel vd., 1999). *C. quercina*'nın petrilerde *Candida albicans* ve *Trichophyton* spp. gibi insanlar için önemli fungal patojenlere karşı aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ekinokandin ve pnömokandinlerle ilişkili benzersiz bir peptid antimikotik ajan olan kriptokandin (**Şekil 2.6**), *C. quercina*'dan izole edilmiştir. Bu bileşik sayısız kendine özgü hidroksillenmiş aminoasit ve yeni bir aminoasit olan 3-hidroksi-4-hidroksimetil prolin içermektedir. Genellikle endofitin, bir değil birkaç ilgili biyoaktif bileşik ürettiği kabul edilmektedir. Dolayısıyla *C. quercina*'nın kriptokandin ile ilişkili diğer antifungal ajanları da ürettiği söylenebilir (Walsh vd., 1992).



Şekil 2.6 Kriptokandin'in kimyasal yapısı

Ekomisinler, bitkiyle birlikte yaşayan floresan bir bakteri grubunun üyesi *Pseudomonas viridiflava* tarafından üretilir (Miller vd., 1998). Genellikle birçok çim türünün yapraklarının üstünde ve içinde barınırlar. Alanin, serin, treonin ve glisin gibi yaygın aminoasitlerin dışında homoserin ve β -hidroksiaspartik asit gibi alışılmamış aminoasitler de ekomisinlerin yapısında bulunmaktadır. Ekomisinler, *C. neoformans* ve *C.albicans* gibi insan patojeni funguslara karşı aktiftirler. Diğer bir bitki ile ortak yaşayan Pseudomonad'dan elde edilen antifungal bileşikler psödomisinlerdir. Psödomisinler, bitki ve insan patojeni olarak geniş bir aralıktaki funguslara karşı aktif bir lipopeptid grubudur. Bu önemli hedef organizmaların bazıları *C. albicans* ve *C. Neoformans* gibi güçlü funguslar, *Ceratocystis ulmi* (Hollanda karaağaç hastalığı) ve *Mycosphaerella fijiensis* (muzda siyah Sigatoka hastalığı) gibi türleri içeren bitki patojenleridir (Harrison vd.,1991; Ballio vd.,1994)

K, L ve M olmak üzere 3 grup melleolid, *Armillaria mellea*'dan izole edilen gram pozitif bakterilerden ekstrakte edilmiştir. Bu bileşik, maya ve funguslar'a karşı antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. Daha önce izole edilen melleolid B ve D yine *Armillaria mellea*'dan ekstrakte edilmiştir (Arnone vd., 1986). Bir başka bileşik olan Armillarik asit gram pozitif bakterilere ve mayaya karşı belirgin inhibisyon aktivitesi sergilediği rapor edilmiştir (Obuchi., 1990).

Ginkgo biloba L'den izole edilen endofitik fungus *Xylaria* sp.'den ekstrakte edilen biyoaktif bileşik 7-amino-4-metilkumarin YX-28, gıda bozulmasına neden olan çeşitli mikroorganizmalara karşı (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *A. hydrophila*, *Yersinia* sp., *V. anguillarum*, *Shigella* sp., *V. parahaemolyticus*, *C. albicans*, *P. expansum* ve *A. niger*, özellikle de *A. hydrophila*) etkili olarak bulunmuş, bu yüzden gıda koruyucusu olarak kullanılması önerilmiştir (Liu vd.,2008).

Bir hint tıbbi bitkisinden izole edilen endofitik fungus tarafından üretilen, naphthodianthron türevi olan Hiperisin ($C_{30}H_{16}O_8$) ve Emodin ($C_{15}H_{10}O_5$), çeşitli bakterilere (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* ve *Escherichia coli*) karşı antimikrobiyal ve hastalık etmeni bazı funguslara (*Aspergillus niger* ve *Candida albicans*) karşı antifungal etki göstermiştir (Kusari vd., 2011).

Fusarium semitectum'dan ekstrakte edilen, patojenik/mikotoksijenik (*Alternaria alternate*, *Aspergillus flayus*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Phoma tracheiphila* ve *Penicillium verrucosum*) etki gösteren fuzapiron ve deoksifuzapiron adı verilen iki alfa piron, antifungal bileşimleridir (Altomare vd.,2000). *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus fumigatus*, insanlarda hastalığa neden olan başlıca patojen funguslardır ve tedavileri için endofitik funguslardan izole edilen ekstraktlar kullanılmaktadır. Örneğin, amfoterisin B, nistatin ve natamisin gibi antimikotik ilaçlar koksidiyal menenjit, kutanöz dermatofitler ve histoplasmoz gibi mikotik hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan polienlerdir (Gupte vd., 2002; İznaga vd., 2004; Augustine vd., 2005; Gohel vd., 2006). Mikotik hastalıkların kontrolünde, ilaç direncinin gelişmesini engellemek için geniş spektrumlu antifungal bileşikler kullanılabilir.

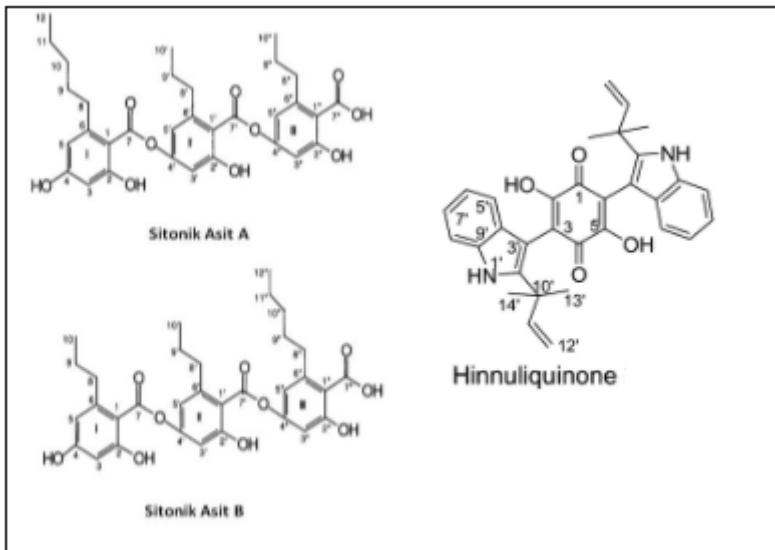
2.6.2. Antiviral metabolit üreten endofitler

Endofitik fungus metabolitlerinin diğer bir kullanım alanı virüslerin inhibisyonunu sağlayacak olan biyoaktif bileşikleri üretmesidir. İki yeni insan

sitomegalovirus (hCMV) proteaz inhibitörü, sitonik asit A ve B (Şekil 2.7), endofitik fungus *Cytonaema* sp.'ın katı kültüründen elde edilmiştir (Guo vd.,2007).

Diğer antiviral metabolit üreten bileşik, *Quercus coccifera*'nın yapraklarından izole edilen endofitik fungus, insan bağışıklık sistemi eksikliğinde ortaya çıkan virüsü tip 1 (HIV-1) proteazının güçlü bir inhibitörü olan hinnuliquinonu sentezleme yeteneği ortaya çıkarılmıştır. Hinnuliquinon, C2-simetrik bis-indolil kinonun doğal bir ürünü olmakla birlikte HIV-1 proteazının vahşi tipini ve klinik olarak dirençli (A44) bir suşunu inhibe eden metabolittir. İnhibitör bağlı HIV-1 proteazının kristalografik analizi, hinnuliquinonun C2 simetriğinin aktivite için önemini açıklamaya yardımcı olmuştur (Singh vd., 2004).

Endofitik mikroorganizmalardan antiviral aktivite gösteren bileşiklerin bulunması umut verici olmaya başlamıştır. Virüsün kararsız yapısı ona karşı uygulanacak tedavinin kısıtlı kalmasına sebep olurken, endofitlerin ürettiği metabolitler çözüm yollarına ışık tutmaktadır. Günümüze kadar bileşik keşiflerindeki esas kısıtlama muhtemelen tarama programlarında yaygın bir antiviral tarama sisteminin olmayışıdır. Virulent insan patojenlerine karşı test edilen endofitlerden izole edilmiş herhangi bir antiviral bileşik olmadığı için çeşitli insan patojen virüslerine karşı etkili olabilecek, potansiyel antiviral bileşiklerin tanımlanması için yoğun bir araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



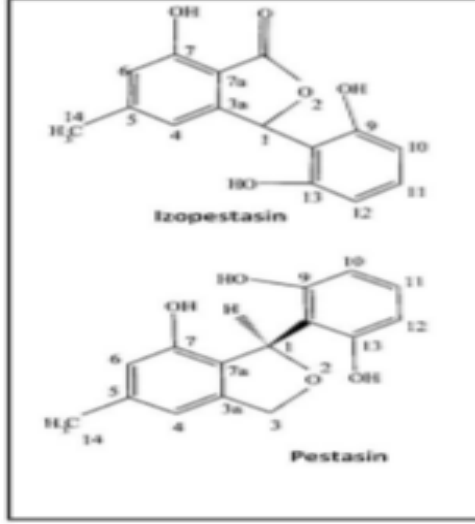
Şekil 2.7 Bazı antiviral bileşikler

2.6.3. Antioksidan metabolit üreten endofitler

Oksijen güçlü bir oksidan ve solunumda görev alan oldukça iyi bir elektron alıcısıdır. Ancak bazı durumlarda oksijen toksik formlara dönüşebilir. Bu toksik formlar hücre bileşenlerine zarar vererek DNA hasarı, karsinogenez ve hücresel dejenerasyon gibi durumlar oluşturmaktadırlar (Huang vd.,2007; Seifried vd.,2007). Oksijenin toksik formlarını (Süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali) zararsız formlara dönüştürmek için yeni metabolitler aranmaktadır. Bu arayış endofitik mikroorganizmaların doğasında üretilen metabolitlerin bu amaçla kullanılabileceği yönünde araştırmalara sebep olmuştur. Bu yüzden antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin önemi, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu zararlara karşı oldukça etkili oldukları gerçeğinden kaynaklanmaktadır.

Antioksidanlar, kanser, kardiyovasküler hastalık, ateroskleroz, hipertansiyon, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer ve Parkinson hastalıkları), romatizmal artrit ve yaşlanma gibi oksijenin toksik formlarının bağlantılı hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için umut verici bir tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir (Valko vd., 2007).

Doğal antioksidanlar yaygın olarak şifalı bitkiler, sebze ve meyvelerde bulunur. Bununla birlikte, yeni doğal antioksidanların potansiyel bir kaynağı olan endofitlerinde metabolik etkileri olduğu bildirilmiştir. Örneğin, Pestasin (1,3-dihidro izobenzofuran) ve izopestasin (izobenzofuran) (**Şekil 2.8**), Papua Yeni Gine de Sepik nehri sistemlerinde yaşayan çiçekli bitki (combretaceous) *Terminalia morobensis*'ten izole edilen *Pestalotiopsis microspora*'nın kültür sıvısından elde edilmiş iki bileşiktir. İki bileşik de antimikrobiyal ve antioksidan aktivite göstermektedir. Pestasin'in antioksidan aktivitesi, yapısındaki C-H bağlarının deaktivasyonundan sonra O-H grubunun ayrılmasıdır. Pestasinin antioksidan aktivitesi bir vitamin E türevi olan troloks'tan fazladır. İzopestasin ise flavonoid türevlerine benzer antioksidan aktivite göstermektedir. Elektron spin rezonans spektroskopisi ile yapılan ölçümler , bileşiğin süperoksit ve hidroksil radikallerini uzaklaştırdığını doğrulamıştır (Strobel vd., 2002; Harper vd., 2003).

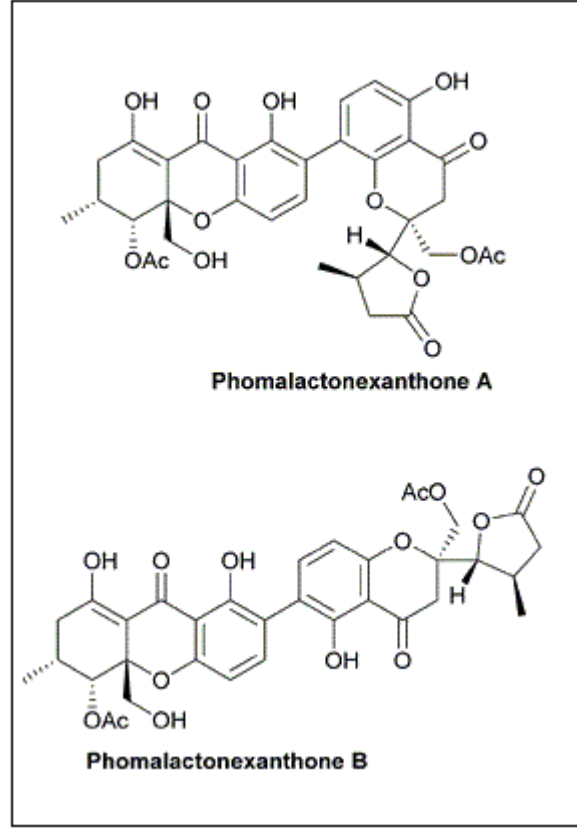


Şekil 2.8 Pestasin ve İzopestasin'in kimyasal yapısı

2.6.4. Antitüberkülotik metabolit üreten endofitler

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), her saat tüberkülozdan 1500 kişinin öldüğünü ve 50 milyon kişiye bulaştığını rapor etmiştir. *Mycobacterium tuberculosis*'in varolan ilaçlara karşı direnç geliştirmesi yeni antimikobakteriyal ilaçların bulunması gerektiğini göstermiştir (WHO, 2008). Dünya, yeni moleküler yapı ve çeşitli insan patojenlerine karşı biyolojik aktivite içeren modern tıpta yerini almış medikal bitkilerin olduğunu fark etmiştir.

Tayland'ta *Garcinia* sp. bitkisinden izole edilen endofitik fungus *Phomopsis* sp. metabolitinin *M.tuberculosis* üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (Wiyakrutta vd., 2004). Bir başka çalışmada yine aynı bitkiden izole edilen endofitik fungustan ekstrakte edilen metabolit Phomoxanthone A ve B (Şekil 2.9) spektroskopik yöntemlerle incelenmiş ve ikiside xanthone dimeri olarak tanımlanmıştır. Bu iki bileşiğin antitüberkülotik etkisinin yanında antimalaryal ve sitotoksik etkisinde olduğu bulunmuştur (Isaka vd., 2001).

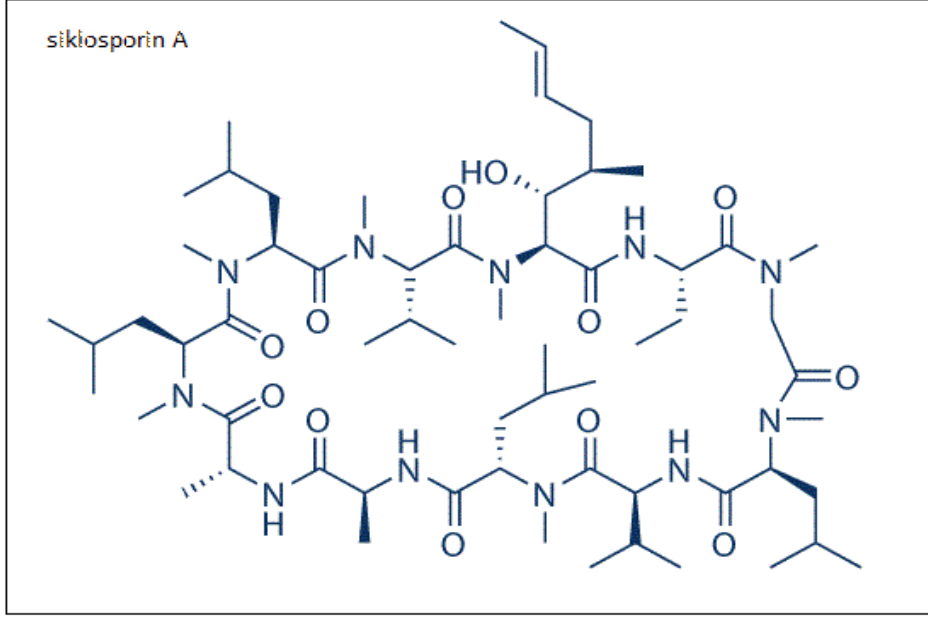


Şekil 2.9 Phomoxanthon A ve B'nin kimyasal yapısı

2.6.5. İmmünoşüpresif metabolit üreten endofitler

Birçok araştırmacının amacı immünoşüpresif bileşikler üreten endofitleri, daha önce çalışılmamış yaygın olmayan konak bitkileri ve çevreleri kullanarak yeni metabolitler keşfetmektir. İmmünoşüpresif ilaçlar, organ nakli yapan hastalarda nakledilen doku ya da organı kabul etmeme durumlarını önlemek için kullanılmakta ve gelecekte romatoid artrit ve insulin bağlı diyabet gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılacaktır (Tenguria vd., 2011).

Sandoz LTD. şirketi, fungusları biyoaktivite yönünden taramak ve değerlendirmek için bilgisayar destekli bir program geliştirmiştir. Bu program çalışmalarda yaygın olarak bilinen bileşikler üreten fungusları tarayıp elimine etmektedir. Böylece doğrudan yeni biyoaktivitelere sahip muhtemel metabolitler üretebilecek nadir türler üzerine yoğunlaşmaktadır. Bu yaklaşım son derece yararlı bir immünoşüpresan olan siklosporin A'nın *Tolypocladium inflatum*'dan elde edilmesini sağlamıştır (Borel vd.,1991).



Şekil 2.10 İmmünosüpresif bileşiğin kimyasal yapısı

Kosta Rika tropik ormanlarında yetişen *Pteromischum* sp. bitkisinden izole edilen *Colletotrichum dematium*'dan Ile, Ser, N-metil-Val benzeri yapıları içeren ve beta-amino bütirik asit oranı 3: 2: 1: 1: 1 arasında olan Kollutelin A ekstrakte edilmiştir. Bu bileşeni üreten fungus, yeni antimikotik bileşik üreten türler arasına girmiştir. Yine aynı çalışmada CD4 (+), T hücresi, Interleukin 2 üretiminin aktivasyonu gibi özellikler göstererek siklosporin A ile aynı derecede immünosüpresif aktivite göstermiştir (Ren vd., 2008).

2.6.6. Antikanser ajanlar üreten endofitler

Dönemin ciddi sayılabilecek düzeyde populasyon yoğunluğunun bozulmasına sebep olan ve henüz etkin bir tedavi yöntemi bulunmayan kanser, ölümlere sebep olmaya devam etmektedir. Bu yüzden üzerine en çok araştırmanın yapıldığı ve çözümlerin arandığı bir hastalıktır.

Bu konuda yapılan en önemli buluşlardan bir tanesi Paklitaksel'in keşfidir. Paklitaksel, diterpenik polioksijenli bir pseudoalkaloittir ve başta meme kanseri olmak üzere birçok kanser türünde başarıyla kullanılan bir antitümör ajandır. Kanser ilacı olarak çok büyük bir başarı gösteren bu bileşik orijinal olarak *Taxus brevifolia*'dan (Pasifik porsuk ağacı) izole edilmiştir ve şimdiye kadar Dünyadaki 11 farklı *Taxus* türünde mevcut olduğu saptanmıştır (Flores-Bustamante vd.,

2010). Paklitaksel başlangıçta erişkin porsuk ağaçlarının kabuklarından ekstraksiyonla üretilmiş ancak 1980'lerde ilaca artan ihtiyaç ve olgun ağaç kıtlığı nedeniyle diğer alternatif üretim metotları araştırılmaya başlanmıştır (Suffness vd., 1995). Bu çalışmalar sırasında *T. brevifolia*'dan izole edilen endofitik fungusların da paklitaksel ürettikleri saptanmış, daha sonra yapılan detaylı araştırmalarda ise paklitakselin aslında bir endofit metaboliti olduğu anlaşılmıştır. Başta *Taxus* olmak üzere bitkilerden izole edilen 57 fungus 13 bakteri suşunun yarısentetik sıvı besiyerlerindeki fermentasyon sıvılarında paklitaksel ürettikleri belirlenmiştir (Flores-Bustamante vd., 2010).

Diğer bir bileşik, Podofilotoksin, *Podophyllum* sp.'den ekstrakte edilen aril tetralin lignan grubunda antikanser özelliği gösteren bir bileşendir. Bu yüzden üzerine çalışılmış ve başka bir endofit olan *Trametes hirsute* organizmasından da ekstrakte edilmiştir (Puri vd.,2006). Podofilotoksin ve analogları klinik açıdan oldukça önemli bileşiklerdir (Kusari vd., 2009; Kour vd., 2008). Daha sonraları *Juniperus communis* L'den izole edilen *Aspergillus fumigatus* (Kusari vd., 2009), *Podophyllum peltatum*'dan izole edilen *Phialocephala fortinii* (Eyberger vd., 2006) ve *Juniperus recurva*'dan izole edilen *Fusarium oxysporum* (Kour vd., 2008) ile yapılan çalışmalarda podofilotoksin üretilmiş ve kanser çalışmalarında kullanılmıştır.

Kamptotesin, ilk önce Çinde *Decaisne* ağacı (Nyssaceae) olarak kabul edilen ve güçlü antineoplastik ajan olan *Camptotheca acuminata*'dan ekstrakte edilmiştir (Wall vd., 1966). Kamptotesin ve 10-hidroksikamptotesin, kanser tedavilerinde aktif olarak kullanılan topotekan ve irinotekan ilaçlarının prekürsörleridir (Uma vd., 2008). Ham kamptotesin, sulu ortamda düşük çözünürlükte ve yüksek toksitededir. Bununla birlikte, bazı kamptotesin türevleri tıbbi özellikler ve gösterilen faydalar bakımından korunmuştur (Li vd.,2006). Mikrobiyal antikanser özellik gösteren bileşen olan kamptotesin ve iki analogu (9-metoksikamptotesin ve 10-hidroksikamptotesin) *Camptotheca acuminata*'dan izole edilen *Fusarium solani*'den elde edilmiştir (Ciddi vd., 2000; Kusari vd., 2009).

2.6.7. İnsektisidal metabolit üreten endofitler

Dünya, haşareyle mücadelede sentetik böcek öldürücülerin çevreye verdiği zarardan dolayı; yeni seçici, güvenilir ve güçlü metabolitleri kullanarak tedbir almak istemektedir. Bu doğal ürünler, bu sayede hem verilen ekolojik zarardan kurtaracak hemde böceklere karşı koruma sağlamış olacaktır. Keklik üzümünden (*Gaultheria procumbens*) izole edilen endofitik fungusun ladin kurtçuk larvaları (*Choristoneura fumiferana*) üzerinde toksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Bu bileşiğin 5-hidroksi-2-(1'-hidroksi-5'-metil-4'-hekzenil) benzofuran ve 5-hidroksi-2-(1'-okso-5'-metil-4'-hekzenil) benzofuran olduğu tanımlanmıştır (Findlay vd., 1997 a ve b).

Murraya paniculata (Rutaceae) yapraklarından izole edilen diğer bir endofit *Eupenicillium* spp. majör bileşik olarak spirokuinazolin alkaloidlerin türevi olan; alanditripinon, alantrifenon, alantripinen ve alantriyonon üretmektedir. Bu bileşenler geniş bir şekilde insekt kovucu olarak kullanılmaktadır (Fabio vd.,2005).

Çizelge 2.1. Endofitik mikroorganizmalardan izole edilen biyoaktif metabolitler

Kaynak Bitki	Endofit	Molekül	Molekül Sınıfı	Aktivite Spektrumu	Referans
<i>Kennedia nigricans</i>	<i>Streptomyces NRRL 30562</i>	Munumbisin	Peptit	Gram pozitif Bakteriler, Antimalaryal	Strobel vd., 2004
<i>Tripterigeum wilfordii</i>	<i>Cryptosporopsis quercina</i>	Kriptokandin	Lipopeptit	Antimikotik(<i>C.albicans</i> ve <i>Trichophyton</i> spp)	Walsh vd.,1992
Çim türleri	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Ekomisin	Peptit	Antimikotik	Miller vd.,1998
<i>Ginkgo biloba</i>	<i>Xylaria</i> sp.	Armillarik asit	Fenol	Antibakteriyal	Obuchi vd.,1990
<i>Quercus coccifera</i>	<i>Cytospora</i> sp.	Sitonik asit A ve B	Tridepsid	Antivirütik	Guo vd.,2007
<i>Terminalia morobensis</i>	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	Pestasin, İzopestasin	Furan	Antimikrobiyal, Antioksidant	Strobel vd.,2002
<i>Garcinia</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	Phomoksanton A ve B	Alkoloid	Antitüberkülotik, antimalaryal, sitotoksik	İsaka vd.,2001
<i>Pteromischum</i> sp.	<i>Colletotrichum dematium</i>	Kollutelin A	Peptit	İmmünosupresif ve antimikotik	Ren vd.,2008
<i>Taxus brevifolia</i>	<i>Taxomyces andrea</i>	Taxol®	Diterpenoid	Antikanserojenik	Suffness vd.,1995
<i>Decasine</i>	<i>Camptotheca acuminata</i>	Kamptotesin	Alkoloid	Antikanserojenik	Li vd.,2006
<i>Murraya paniculata</i>	<i>Eupenicillium</i> sp.	Alanditripinon, Alantrifenon, Alantripinen ve Alantriyonon	Alkoloid	İnsektisidal	Fabio vd.,2005

2.7. Endemik ve Etnobotanik

Hastalıkları iyileştirmede bitkiler ve onların ürettiği metabolitlerin kullanımı, halkın ve geleneksel tıbbın bir parçası olarak kabul edilmektedir. Yüzyıllar boyunca, şifalı bitkilerle yapılan tedaviler günümüz için kaynak oluşturmuştur. Günümüzde bitkiler hala geleneksel tıpta birçok hastalığın tedavisinde, hafifletilmesinde veya önlenmesinde kullanılmaktadır (Gaspardo vd., 2011). Hastalıkları iyileştirmek ve fiziksel hasarlardan kurtulmak için

bitkilerin kullanılması insanlık tarihinin en erken zamanlarından itibaren başlamıştır (Hill., 1989).

Etnobotanik, insanlarla bitkiler arasındaki ilişkinin incelenmesi olarak tanımlanır ve bitkilerin yerli halk tarafından kullanımlarını inceler. Diğer bir deyişle, kültürel antropoloji ile botanik arasındaki ilaç, beslenme, doğal kaynaklar gibi kullanım alanlarını araştıran bir alandır (Diksha ve Amla, 2011). Genel olarak etnobotanik, yerli kültürün gıda, ilaç, ritüel, ev eşyaları, müzik aletleri, çayır ağaçları, zirai ilaçlar, giysiler, barınak ve diğer amaçlar için kullanılan bitkilerin bilimsel araştırması olarak kabul edilmektedir (Ugulu., 2011).

Endemik, alanları belirli bir ülke veya bölgeye ait, yerel, ender bulunan türler olarak tanımlanmaktadır. Latince endemos (indigenous) kelimesinden gelir ve “yerli” anlamında kullanılmaktadır. Sıcak iklim kuşağında yer alan Türkiye, bitki çeşitliliği ile birçok ülkeden ayrılmaktadır. Dolayısıyla Türkiye endemik bitkiler açısından dünyanın önemli ülkelerinden biridir. Yurdumuzun hudutları içinde doğal olarak yetiştiği halde başka hiçbir yerde yetişmeyen, diğer bir deyişle dünyada sadece ülkemizde yetişen bitkiler Türkiye endemikleri olarak adlandırılır. Ülkemizde endemizim oranı %34 civarındadır. Tüm Avrupa kıtasında 12500 açık ve kapalı tohumlu bitki türü varken, sadece Anadolu’da bu sayıya yakın (11.000’in üzerinde) tür olduğu bilinmektedir. Bunların yaklaşık üçte biri ise Türkiye’ye özgü endemik türlerdir (Erik ve Tarıkahya., 2004). Bu endemik bitkiler Ülkemiz biyoçeşitliliğinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Çalışılması planlanan İzmir bölgesi (Bozdağ, Nif dağı, Mahmut dağı, Gümüldür-Tahtalı) ise Dünya’daki koruma öncelikli biyoçeşitlilik sıcak noktaları içinde yer almaktadır (Myers vd., 2000). Botanikçiler tarafından yapılan taramalarda İzmir bölgesinde 21 Familyaya ait toplam 113 endemik bitki olduğu ve bunların 21 tanesinin ise alana özgü oldukları belirlenmiştir. Buradan hareketle, Ülkemizin biyoçeşitliliğinin değerlendirilmesi ve başka bir yerde bulunamayacak bitki-mikroorganizma etkileşimleri sonucunda üretilen yeni aktif bileşiklerin keşfi için bu bitkilerin endofitlerinin ürettiği biyoaktif metabolitlerinin keşfedilmesi hedeflenmiştir.

2.8. Bitki seçimi

Etnobotanik geçmişe sahip bitkiler, endofit izolasyonunda yeni metabolitlerin keşfi için çalışmalara ışık tutmaktadır. Bu bitkilerin ürettiği metabolitlerin hangi şartlar altında yaşayan bitkiler olduğunu gözlemlemek ve seçim yapabilmek oldukça önem arz etmektedir.

Endofit izolasyonu ve doğal ürün keşfi için toplanan her bir bitki için spesifik yöntemler kullanılır. Bitki seçim stratejilerini belirleyen birkaç teori vardır (Kharwar ve Strobel, 2011; Yu vd., 2010);

- Eşsiz çevresel ortamlarda bulunan, özellikle de sıra dışı biyolojiye ve hayatta kalmak için yeni stratejilere sahip olan bitkiler çalışma için seçilmelidir. Bu tarz çevrelerde bitkilerin yaşama gücünün, dokuları içinde barındırdığı endofitlerden kaynaklandığı düşünülebilmektedir.
- Spesifik bir kullanım alanı, uygulaması veya etnobotanik bir tarihçesi olan bitkiler tercih edilmelidir. Bu bitkiler çalışılan bölgedeki yerli insanlarla görüşerek ya da yerli kaynaklar incelenerek bulunabilir. Bu yaklaşım aynı zamanda ortak araştırma programı bünyesinde yardımları belgelemek suretiyle yerli ve kabilelerin de yararınadır. Bilimsel açıdan yerel halkı bilgilendirmenin yanı sıra, bilim adamları başvurdukları kaynaklara ve yerel halka gereken önemi vermelidirler. Eninde sonunda belki botanik kaynağın iyileştirme gücünün bitkinin doğal ürünlerinden değil de bitkide var olan endofitlerden olduğu ortaya çıkabilmektedir.
- Endemik bitkiler, alışılmadık yaşam süresine sahip olan, çok uzun süredir varlığını sürdüren relik endemik bitkiler seçilmelidir. Gondwanaland gibi antik olduğu kesin olan topraklarda yaşayan bitkilerin aktif doğal bileşik üreten endofit bulundurma ihtimali diğer bitkilere göre daha fazladır.
- Yüksek biyoçeşitliliğe sahip bölgelerde yetişen bitkilerin geniş biyoçeşitliliğe sahip endofitleri barındırması muhtemeldir. Dolayısıyla, dünyadaki en büyük çeşitliliğe sahip tropikal yağmur ormanları endofitler için ev sahipliği yapmaktadır.
- Belirti olmadan patojenler tarafından enfekte edilmiş endofit içeren bitkiler, diğer bitkilere göre antimikrobiyal aktivite taşıyan metabolitler bakımından daha büyük potansiyele sahip olabilmektedir.

Bu özellikler bakımından incelendiğinde doğru bölgede yaşayan konukçu bitkilerin seçimi, endofitlerin varlığı ve ürettikleri metabolitlerin oluşumu aynı

zamanda tıbbi, zirai ve endüstriyel açıdan sağladığı yararlar hakkında bilgi toplanmasına yardımcı olmaktadır.

2.8.1. Endemik bitki seçimi

Dianthus L., Akdeniz Bölgesi'nde ve Orta Doğu'da dağılım gösteren dünyadaki yaklaşık 300 türden oluşan *Caryophyllaceae* familyasına ait bir genustur (Davis.,1999). Genellikle bu genus yabani otlar gibi büyür ancak süs bitkisi gibi yetişen türleride vardır. Türkiye'de, özellikle Batı Anadolu'da 67 türü bulunmaktadır ve bunlardan 42 türü endemiktir. *Dianthus erinaceus* Boiss. var. *erinaceus*, yalnızca Türkiye'nin batısında; Manisa (spil) Dağı, Manisa - Kırkağaç - Bakır - Sarı kaya tepesi, İzmir/Kemalpaşa (Nif) ve Mahmut Dağlarında yetişen çok yıllık bir endemik bitkidir (Davis.,1967).



Şekil 2.11 Populasyonların Türkiye'deki dağılımı

Birçok *Dianthus* türü binlerce yıldır Çin, İran ve Moğolistan'da tıbbi olarak enfeksiyonlarla mücadele etmek için kullanılmıştır. Aynı zamanda bazı *Dianthus* türleri geleneksel tıp dışında tarımsal alanlarda da kullanılmaktadır (Davis., 1967; Bonjar., 2004; Mansouri., 1999). Önceki fitokimyasal ve çeşitli aktivite çalışmalarında, *Dianthus* türlerinden izole edilmiş doğal bileşiklerin ve ham bitkinin ürettiği metabolitlerin, antimikrobiyal (Bonjar., 2004), antifungal (Galeotti vd., 2008), antioksidan (Durucasu vd., 2009), antihepatotoksik, analjezik (Hikino vd., 1984), diüretik (Hsieh vd., 2004), proliferatif (hücrelerin çoğalmasını sitümüle eden) (Tong vd., 2012) ve dermatolojik (Mansouri., 1999) olarak etkilerinin olduğu görülmüştür. Antimikrobiyal etkisi yakından incelendiğinde *Dianthus caryophyllus*'un ürettiği metabolitlerin, *Micrococcus luteus* dışındaki *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aureginosa* gibi güçlü gram negatiflere, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae* gibi hastanelerde ciddi enfeksiyonlara

sebepe olan gram pozitif bakterilere karşı oldukça aktif olduğu gözlenmiştir (Bonjar.,2004).

Dianthus türlerinin fitokimyasal incelemeleri yapıldığında bu cinslere ait bitkilerin zengin triterpenoid saponin kaynağı olduğu görülmüştür. Bu bileşenin, membranolitik özelliğı nedeniyle *Dianthus* genusuna ait türlerin antibakteriyal özelliğı olduğu düşünülmektedir (Chen vd., 2010; Koike vd., 1994; Nakano vd., 2011; Oshima vd., 1984a,b,c). Mutlu ve arkadaşları'nın *Dianthus erinaceus* Boiss var. *erinaceus* üzerine yaptığı fitokimyasal analizde, K ve L (1, 2) olarak adlandırılan olean tipi iskelet içeren dienositler, iki yeni triterpenoid saponinin ve bunun yanında bilinen altı triterpenoid saponin bulunmuştur. Bu metabolitler, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* ve *Candida albicans* gibi birçok test mikroorganizmasına karşı denenmiş ve bazı gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca yapılan farklı izolasyon çalışmalarında *Dianthus* türünden, flavonidler (Obmann vd., 2012), piklen tipi glikozitler (Plouvier vd., 1986), makrosiklik antosiyaninler (Nakayama vd., 2000) ve siklopeptitler (Tong vd., 2012) bulunmuştur.

D. erinaceus var. *erinaceus* bitkisi yok olma tehlikesi taşıyan bir taksondur. Yayılış alanları parçalanmış ve dört ayrı popülasyon halinde bulundukları saptanmıştır. Popülasyonlar arasındaki kopukluk çeşitlilik açısından olumsuzluk teşkil etmektedir. Bundan dolayı konumlandığı alanlarda popülasyonunda devamlılığın sağlanması çok güç olmaktadır. Bitkinin dikenli yapısı onu dışarıdaki tüketici canlılara karşı korusada, fiziksel ve çevresel şartlara karşı bitkinin yaşam mücadelesine endofitik mikroorganizmalar ve onların ürettiğı metabolitler destek vermektedir.



Şekil 2.12 *Dianthus erinaceus* (Ersöz, 2006)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki örnekleri

D. erinaceus örnekleri Doç. Dr. Serdar Gökhan ŞENOL tarafından yapılan arazi çalışmasıyla tolanmıştır. Seçilen bitki arazide belirlendikten ve tanımlandıktan sonra pozisyonları GPS yardımıyla kaydedilerek 2 adet tam bitki örneği aynı gün içinde laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen örnekler en kısa sürede analize alınmıştır (Strobel vd., 1996; Stinson vd., 2003).

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri

Aktinomiset İzolasyon Agar (AIO),

	g/litre
Aktinomiset İzolasyon Agar (Difco)	22.0
Gliserol	5.0
pH 7.0	

Yukarıda belirtilen bileşenler, distile suda çözündükten sonra otoklavda 121°C' de 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra besiyeri, 50-55 °C'ye kadar soğutulmuş ve filtre ile steril edilmiş nistatin (100 IU/ml, antifungal) ve nalidiksik asit (20 µg/ml, antibakteriyel) olacak şekilde eklenerek aseptik koşullar altında steril petri kaplarına paylaştırılmıştır (Kaewkla ve Franco, 2013). Bu besiyeri endofitik aktinobakterilerin izolasyonu için kullanılmıştır.

Nişasta kazein nitrat agar (SCNA)

	g/litre
Çözünür nişasta	10.0
KNO ₃	2.0
K ₂ HPO ₄	2.0
NaCl	2.0
Kazein	0.3

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
CaCO ₃	0.02
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
Agar	18.0
pH 7.2	

Besiyeri bileşenleri, distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121°C’ de 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra besiyeri, 50-55 °C ‘ye kadar soğutulmuş ve filtre ile steril edilmiş nistatin (100 IU/ml, antifungal) ve nalidiksik asit (20 µg/ml, antibakteriyel) olacak şekilde eklenerek aseptik koşullar altında steril petri kaplarına paylaştırılmıştır (Kaewkla ve Franco, 2013). Bu besiyeri endofitik aktinobakterilerin izolasyonu için kullanılmıştır.

Patates Dekstroz Agar (PDA)

	g/litre
Patates Dekstroz Agar(Merck)	39.0
pH 7.2	

Besiyeri bileşenleri, distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121°C’ de 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra besiyeri ,50-55 °C ‘ye kadar soğutulmuş ve filtre ile steril edilmiş kloramfenikol (50 µg/ml ,antibakteriyel) eklenmiştir (Kusari vd., 2008). Bu besiyeri endofitik fungusların izolasyonu için kullanılmıştır.

Malt Ekstrakt Agar (MEA)

	g/litre
Malt Ekstrakt Agar (LabM)	50.0
pH 7.2	

Besiyeri bileşenleri, distile suda çözündükten sonra otoklavda 121°C' de 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra besiyeri, 50-55 °C 'ye kadar soğutulmuş ve filtre ile steril edilmiş kloramfenikol (50 µg/ml ,antibakteriyel) eklenmiştir (Kusari vd., 2008). Bu besiyerleri endofitik fungusların izolasyonu için kullanılmıştır.

Rose Bengal Kloramfenikol Agar (RBKA)

g/litre

Rose Bengal Agar(Merck) 32.2

pH 7.2

Besiyeri bileşenleri, distile suda çözündükten sonra otoklavda 121°C' de 15 dakika steril edilmiştir. Bu besiyerleri endofitik fungusların izolasyonu için kullanılmıştır.

Tryptic Soy Agar (TSA)

g/litre

Tryptic Soy Agar(LabM) 37.2

pH 7.2

Besiyeri bileşenleri, distile suda çözündükten sonra otoklavda 121°C' de 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra besiyeri, 50-55 °C 'ye kadar soğutulmuş ve filtre ile steril edilmiş nistatin (100 IU/ml, antifungal) eklenmiştir (Kaewkla ve Franco, 2013). Bu besiyeri endofitik bakterilerin izolasyonu için kullanılmıştır.

Tryptic Soy Broth (TSB)

g/litre

Tryptic Soy Broth(Merck) 30.0

pH 7.2

Besiyeri bileşenleri, distile suda çözündükten sonra otoklavda 121°C' de 15 dakika steril edilmiştir (Kaewkla ve Franco, 2013). Bu besiyeri ortam sterilizasyonunun kontrolü ve fermentasyon için kullanılmıştır.

Malt Ekstrakt Broth (MEB)

g/litre

Malt Ekstrakt Broth (Merck) 17.0

pH 7.2

Besiyeri bileşenleri, distile suda çözündükten sonra otoklavda 121°C' de 15 dakika steril edilmiştir. (Kaewkla ve Franco, 2013). Bu besiyeri ortam sterilizasyonunun kontrolü ve fermentasyon için kullanılmıştır.

Luria Broth (LB)

g/litre

Luria Broth (Difco) 25.0

pH 7.2

Besiyeri bileşenleri, distile suda çözündükten sonra otoklavda 121°C' de 15 dakika steril edilmiştir. Bu besiyeri DNA izolasyonu için (hangi) izolatların büyütülmesinde kullanılmıştır (Atlas, 2004).

Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

g/litre

Sabouraud Dextrose Agar (Merck) 30.0

pH 7.2

Besiyeri bileşenleriYukarıda, distile suda çözündükten sonra otoklavda 121°C' de 15 dakika steril edilmiştir. Bu besiyeri, antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde test fungusları için kullanılmıştır (Atlas, 2004).

Mueller Hinton Agar (MHA)

g/litre

Mueller hinton agar(Lab) 38.0

pH 7.2

Besiyeri bileşenleri Yukarıda, distile suda çözündükten sonra otoklavda 121°C' de 15 dakika steril edilmiştir. Bu besiyeri, antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde test bakterileri için kullanılmıştır (Atlas, 2004).

Mueller Hinton Broth (MHB)

g/litre

Mueller Hinton Broth (Merck) 21.0

pH 7.2

Besiyeri bileşenleri Yukarıda, distile suda çözündükten sonra otoklavda 121°C' de 15 dakika steril edilmiştir. Bu ortam denemelerdeki test organizmalarının aktifleştirilmesinde kullanılmıştır (Atlas, 2004).

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Tamponlar

Nalidiksik asit

0.4 mg nalidiksik asit (Sigma) 20 ml distile suda çözündürülüp 0.22 µm por çaplı şırınga filtreler ile steril edilerek - 20°C'de stoklanmıştır. İzolasyon petrilerinde, Gram negatif bakterileri baskılamak için 20 µg/ml final konsantrasyonunda olacak şekilde 100 ml ortama 1000 µl eklenerek kullanılmıştır (Kaewkla ve Franco, 2013).

Nistatin

0.4 mg nistatin (Sigma) 20 ml etanolle çözündürülerek 0.22 µm por çaplı şırınga filtreler ile steril edilerek -20°C'de stoklanmıştır. İzolasyon petrilerinde, fungal büyümeyi baskılamak için 100 IU/ml final konsantrasyonunda olacak şekilde 100 ml ortama 1000 µl eklenerek kullanılmıştır (Kaewkla ve Franco, 2013).

Kloramfenikol

1 mg kloramfenikol (Sigma) 20 ml distile suda çözündürülüp 0.22 µm por çaplı şırınga filtreler ile steril edilerek -20°C'de stoklanmıştır. İzolasyon petrilerinde, bakterileri baskılamak için 50 µg/ml final konsantrasyonunda olacak şekilde 100 ml ortama 1000 µl eklenerek kullanılmıştır (Kusari vd., 2008).

Fizyolojik Tuzlu Su

NaCl %0.85

Bu bileşen, test organizmalarının ayarlanmasında kullanılmıştır.

Lizis Tamponu

EDTA (Sigma) pH8.0 60 mM

NaCl (Sigma) 150 mM

SDS (Sigma) %1

Tris-HCl (Sigma) pH 8.0 400mM

Bu tampon, DNA izolasyonunda kullanılmıştır (Liu vd., 2000).

Potasyum Asetat Tamponu

5M potasyum asetat (Sigma) 60 mM

Glisial asetik asit (Sigma) 11.5 ml

Distile su 28.5 ml

Bu tampon, DNA izolasyonunda kullanılmıştır (Liu vd., 2000).

Tris-Borat-EDTA Tamponu (TBE) (5xL)

Trismabase (Sigma) 54.0 g

Borik asit (Sigma) 27.5 g

0.5M EDTA (Sigma) 20.0 ml

pH 8.0

Bu tampon , agaroz jel elektroforezinde DNA ve PZR ürünlerinin yürütülmesinde kullanılmıştır (Liu vd., 2000).

İzopropil alkol

%70'lik etanol (v/v)

Ultra saf su

Agaroz (Sigma)

dNTP (100mM, Fermentas)

GelRed (nükleik asit jel boyası, Biotium)

Marker DNA (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas,
GeneRuler 50 bp Plus DNA Ladder, Fermentas)

PZR reaksiyon tamponu (Fermantas)

Taq DNA Polimeraz (500U Fermantas)

3.1.4. Test Organizmaları

Escherichia coli O157H7

Staphylococcus aureus ATCC43300: metisilin dirençli

Enterococcus faecium DSMZ 13590: vankomisin dirençli

Pseudomonasaureginosa ATCC 27853

Bacillus cereus ATCC 10876

Candida albicans DSMZ 5817

3.1.5. PZR reaksiyonunda kullanılan primerler

PZR reaksiyonunda kullanılan primerler **çizelge 3.1**'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 PZR reaksiyonunda kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Dizisi	Beklenen Amplikon Uzunluğu (bp)	Kaynak
27F	5'-CCGCGGCTGCTGGCACGTA-3'	1400	Gontang vd., 2007
1492R	5'-GTGCGGGCCCCCGTCAATT-3'	1400	Gontang vd., 2007
ITS1F	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	600	White vd.,1990
ITS4R	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	600	White vd.,1990
Cmd5	5'-CCGAGTACAAGGAGGCCTTC-3'	580	Hong vd.,1996
Cmd6	5'-CCGATAGAGGTCATAACGTGG-3'	580	Hong vd.,1996

3.1.6. Denemelerde kullanılan cihazlar

Çalkalamalı İnkübatör (Zhicheng/ZHWY-2112B)

Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı (Consort/EV 243)

Etüv (Heraeus, Wisecube)

Hassas Terazı (OHAUS Adventurer/ AR 3130)

Mikroskop (Olympus)

Nanodrop Cihazı (Thermo/Nanodrop2000)

PZR Cihazı (Corbett Research PCR Thermal Cyclers)

Rotary Evaporatör (Heidolph Laborota/ 4001)

UV lamba (Spectroline ENF-260C/FE)

Vorteks (IKA Yellow/Line TTS-2)

3.2. Metot

3.2.1.Bitki örneği

Dianthus erinaceus bitkisi öncelikle steril bistturi yardımıyla kök, gövde, yaprak ve çiçek parçalarına ayrılmıştır. Bu parçalar bitki yüzeyindeki kontamine mikroorganizmaları elimine etmek için %70'lik etanol ile yıkanarak, %3'lük sodyum hipoklrit (NaOCl) içerisinde 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra örneklerin yüzeyleri 3'er kez aleve tutulmuştur (Strobel vd., 1996). Örnekler son olarak steril distile su ile iki kere çalkalanarak, bu son çalkalama suyu yüzey sterilitesinin kontrolü olarak kullanılmıştır. Yüzey sterilizasyon işlemlerinden sonra örnekler steril laminair kabinde yüzeyleri kuruyana kadar bekletilmiştir. Daha sonra steril bir bisturi yardımıyla dış dokular uzaklaştırılarak iç dokular ince kesitler alınacak şekilde kesilerek izolasyon besiyerlerine 1-2 cm küçüklüğünde ince parçalar halinde konulmuştur. Aynı zamanda izolasyon besiyerlerinden ikişer petriye ve sıvı ortamlara son çalkalama suyundan da 1'er ml ekim yapılarak inkübasyona kaldırılıp inkübasyon sonunda mikrobiyal gelişme gözlenmemesi ile örneklerin dış yüzeylerinin steril edilmiş olduğu doğrulanmıştır.

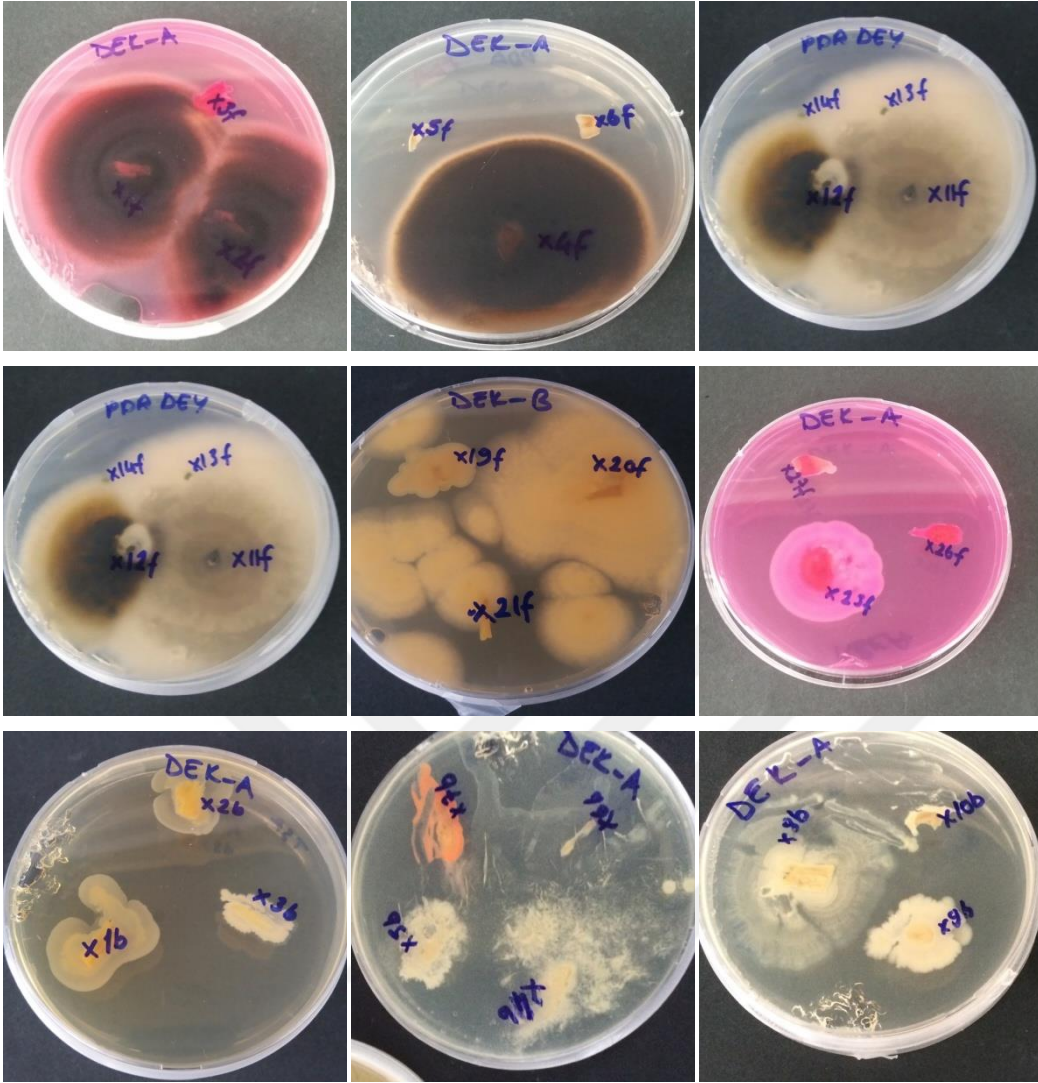


Şekil 3.1 Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiş bitki kökleri

3.2.2. Endofitik mikroorganizmaların izolasyonu

Laboratuvara getirilen bitki örneği 24 saat içerisinde analize alınmıştır. Bitkiye ait kök, gövde ve yaprak örneklerinin iç dokularından petri başına 5'er tane olmak üzere en az 15 parça inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerleri inkübasyon süresi boyunca nem seviyesini koruması için steril ıslak kağıt havlular içeren kapalı plastik kutularda 27°C'ta 8-10 hafta boyunca inkübasyona bırakılmıştır. *Streptomyces* dışındaki diğer aktinobakterileri de izole edebilmek için petriler koloni gelişimi bakımından her gün kontrol edilerek 8 hafta boyunca inkübasyonda tutulmuştur.

Endofitik fungusların izolasyonu için üç farklı besiyeri (PDA, MEA, RBKA), endofitik aktinobakterilerin izolasyonu için iki farklı besiyeri (AİA, SCNA), endofitik bakterilerin izolasyonu için TSA kullanılmıştır. Belirlenen inkübasyon sürelerinden sonra petrilerde gelişen bakteri, aktinobakteri ve fungus suşları saf halde %15 gliserol içeren uygun sıvı besiyerlerinde 2'şer kopya halinde kodlanarak stok kültür olarak saklanmıştır (Wardecki vd., 2015).



Şekil 3.2 İzolasyon petrilerinde bakteriyel ve fungal oluşumlar

3.2.3. İzolatların saflaştırılması

İzolasyon petrilerinde gözlenen fungus ve bakteri kolonileri, öze yardımıyla alınıp izole edildikleri besiyerlerinde çizgi ekim yöntemiyle saflaştırılmış ve bu işleme saf koloniler elde edilene kadar devam edilmiştir (Ensign,1992).

3.2.4. İzolatların mikroskopik özelliklerinin belirlenmesi

3.2.4.1. Bakterilerin mikroskopik özelliklerinin belirlenmesi

Bakteri izolatları TSA besiyerinde aktive edildikten sonra Gram boyama, endospor boyama ve morfoloji tespit işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Gram boyama yöntemi

Gram boyama yöntemi aşağıdaki prosedür ile gerçekleştirilmiştir;

- Temiz bir lama bir damla su ve steril bir öze ile bakteri kültüründen ilave edilmiş ve lam üzerine kültür yayılmıştır.
- Bakteriyel film öncelikle havada kurutulmuş, ardından bakteriyel film üstte kalacak şekilde 2-3 kere aleve tutularak fiksasyonu sağlanmıştır.
- Hazırlanan preparata sırasıyla kristal viole (1dk), iyodur çözeltisi (1dk), alkol (6sn) ve safranin (30sn) uygulanmıştır. Her bir boya muamelesinden sonra fazla boya su ile akıtılmış ve daha sonra kurutma kağıdı ile hafifçe kurulanmıştır.
- Boyama sonucu hücreler mikroskop altında incelenmiştir (Claus, 1992).

Endospor boyama yöntemi

- TSA besiyerinde 24 saat boyunca büyütülen bakteri izolatu öze yardımıyla temiz bir lam üzerine alınır.
- Lama bir damla su ve steril bir öze ile bakteri kültüründen ilave edilmiş ve lam üzerine kültür yayılmıştır.
- Bakteriyel film öncelikle havada kurutulmuş, ardından bakteriyel film üstte kalacak şekilde 2-3 kere aleve tutularak fiksasyonu sağlanmıştır.
- Malaşit yeşili (% 5) solusyonu ile, alttan ısıtılarak, 5 dakika boyanır. Su ile yıkanır. Safranin (%0,5) ile 30 saniye boyanır. Su ile yıkanır, kurutulur ve immersiyon objektifi ile muayene edilir
- Sporlar yeşil ve vejetatif hücre ise kırmızı renkte görülürler (Malathi and Suneetha ,2015).

3.2.4.2. Fungusların mikroskopik özelliklerinin belirlenmesi

Elde edilen fungusların fenotipik özelliklerinin belirlenmesi için Patatose Dekstroz Agar, Malt ekstrakt Agar (MEA) besiyerlerine üç nokta şeklinde ekim yapılmıştır ve 25°C’ de 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Mikroskopik özellikleri belirlemek için laktofenol cotton mavisi çözeltisi yardımıyla ışık mikroskopunda inceleme yapılmıştır

- Temiz bir lama bir damla su ve steril bir öze ile fungus kültüründen ilave edilmiş, laktofenol cotton mavisi çözeltisi ve kültür süspanse edilerek lam üzerine yayılmıştır.
- Daha sonra üzerine lamel kapatılarak mikroskop altında incelenmiştir. (Samson vd., 2007; Klich,2002).

3.2.5. İzolatların saklanması

Stok kültürlerin hazırlanması

Funguslar için PDA, bakteriler için TSA besiyerleri kullanılarak tüplerde hazırlanan yatık besiyerlerine inoküle edilen funguslar ve bakteriler inkübasyona (fungus için 27°C’ta 5-7 gün, bakteri için 27°C’ta 24 saat) bırakılmıştır. Yeterli büyüme gözlemlendikten sonra tüpler +4°C soğuk odada muhafaza edilmiştir.

3.2.6. İzolatların kültürel karakteristikleri

Elde edilen bakteriyal izolatların kültürel karakteristiklerini belirlemek için çeşitli biyokimyasal testler yapılmıştır.

3.2.6.1. Katalaz testi

TSA besiyerinde 24 saat boyunca geliştirilen endofit bakteri kültürlerinden öze ile örnek alınarak distile su ile temiz bir lam üzerinde süspanse edilmiştir. Bunun üzerine %30’luk H₂O₂ ilave edilerek karıştırılmıştır. Hava kabarcıkları testin pozitif olduğunu göstermiştir (Holding ve Collee, 1971).

3.2.6.2. Oksidaz testi

Bakteri kültürleri TSA besiyerinde 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, oluşan kolonilerin üzerine % 1’lik tetrametil-p-fenilendiamin okzalit ve % 1’lik etanol içinde hazırlanmış α-naftol çözeltilerinin

her birinden birkaç damla ilave edilmiştir. Mavi renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Holding ve Collee, 1971).

3.2.6.3. Hareketlilik testi

Dik TSA tübüne bakteri kültürleri uygun koşullarda öze 90°lik açı olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat sonunda ortam incelenmiştir. Öze çizgisinin kenarında yayılım olması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

3.2.7. Endofitik izolatların moleküler karakterizasyonu

3.2.7.1. DNA izolasyonu

İzole edilen bakteri ve aktinobakterilerden genomik DNA izolasyonu, Liu ve arkadaşları (2000) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir.

1. LB broth'da bakteri ve aktinobakteri hücreleri 27°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.
2. Sıvı besiyerinde bir gece büyütülen kültürler steril ependorf tüpüne aktarılmış, 7000g'de 5 dakika santrifüjlenerek hücreler çöktürülmüş ve daha sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır.
3. Pellet üzerine 500 µl lizis tamponu ilave edilmiş ve karışım homojen olana dek karıştırılmıştır.
4. 65°C'lik su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra 150µl potasyum asetat ilave edilmiş ve karışım homojen olana dek karıştırılmıştır.
5. Karışım 12000 g'de 4°C'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant yeni, steril bir ependorf tüpüne aktarılmıştır.
6. Yeni tüpe aktarılan sıvının üzerine eşit hacimde izopropil alkol ilave edilmiş ve homojen karışım sağlanana dek karıştırılmıştır.
7. Karışım 11000 g'de 4°C'de 2 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.
8. Örnekler üzerine 300 µl %70'lik soğuk etanol ilave edilmiş, 10000 g'de 4°C'de 1 dakika santrifüjlenmiş ve etanol uçana kadar beklenilmiştir.

9. Etanol uçtuktan sonra örnekler, 50 µl ultra saf suda süspanse edilmiş ve kullanılan kadar -20°C'de saklanmıştır.

Funguslardan DNA izolasyonu:

1. Malt Ekstrakt Broth'da 7 gün 45°C 150 rpm'de büyütülen funguslar santrifüjlenerek üst sıvısı uzaklaştırılmış ve pelletleri toplanmıştır. Pelletler dondurulmuş ve -30°C'da saklanmıştır.
2. Bir miktar pellet temiz ependorf tüplerine alınmış, 65°C ısı ile şok uygulaması yapılmıştır. Bu işlem iki kez tekrar etmiştir.
3. Örneklerin üzerine 500 µl lizis buffer eklenmiştir. Ardından 65°C'de su banyosunda 15 dakika inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon sonrası 150 µl Potasyum asetat ilave edilmiştir ve 12000 rpm de +4 °C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant kısmı yeni bir sterilependorfa aktarılmıştır.
5. Supernatant miktarı kadar eşit hacimde (500 µl + 500 µl) isopropil alkol ilave edilmiş ve vorteks ile homojenizasyonu sağlanmıştır. Ardından 11000rpm de 1dakika santrifüj edilmiştir.
6. Supernatant kısmı döküldükten sonra pellet üzerine 300 µl %70lik soğuk etanol ilave edilmiş ve 10000 rpm de 1dakika santrifüj edilmiştir.
7. Supernatant kısmı döküldükten sonra etanolün uçması için bir süre beklenmiştir. Hızlı sonuç almak için 37 °C'de 24saat bekletilmiştir.
8. İzolatların her birine 50 µl ultra saf su ilave edilmiş ve -20° C'ta saklanmıştır.

Elde edilen genomik DNA'ların bütünlüklerini kontrol etmek için agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezi, 1.5µl/100ml GelRed ve %1,2 agaroz içeren jelde gerçekleştirilmiştir. Jel hazırlanmasında ve elektroforezde TBE tamponu kullanılmış, 3µl DNA solüsyonu, 1 µl yükleme solüsyonu, 2 µl steril saf su ile karıştırılarak 90 volta 60 dakika süreyle yürütülmüştür. Elektroforezde marker olarak GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) kullanılmıştır. Elektroforez sonucunda başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA'ların bütünlüğünün tam olduğunu göstermiştir (Sambrook vd., 1989; Ausubel vd., 1997).

DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra miktar ve saflık ölçümleri Thermo Scientific Nanodrop 2000c'de gerçekleştirilmiştir. Ayrıca DNA örnekleri agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir.

3.2.7.2. 16S rDNA bölgesinin PZR ile çoğaltılması

Kültüre edilen bakteri ve aktinobakteri şubalarının filogenetik analizleri için korunmuş 16S ribozomal DNA bölgesi tercih edilmiştir. Bu amaçla, PZR amplifikasyonu için 27F ve 1492R primer çiftleri (**Çizelge 3.1**) kullanılmıştır. Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde, aşağıdaki bileşenler sırasıyla PZR tüpüne konulmuştur;

- Ultra saf su	12.875 µl
- Taqbuffer	2.5 µl
- dNTP karışımı (10pM)	1.0 µl
- 27F primeri (10 pmol)	1.0 µl
- 1492R primeri (10 pmol)	1.0 µl
- Taq DNA polimeraz	0.25 µl
- Tune up	2.0 µl
- Kalıp DNA (50 mg)	5.0 µl

Amplifikasyon programlanabilir bir ThermalCycler'da aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir;

Basamak	Döngü	Süre	Sıcaklık
İlk Denatürasyon	1	2 dk	95°C
Denatürasyon	35	20 sn	95°C
Annealing		40 sn	56°C
Uzama		90 sn	72°C
Son Uzama	1	5 dk	72 °C

Tüpler daha sonra +4°C'de saklanmıştır.

3.2.7.3. ITS bölgesinin PZR analizi

Kültüre edilen fungus suşlarının tanımlanmaları için korunmuş ITS bölgesi dizi analizi kullanılmıştır. Bu amaçla, PZR amplifikasyonu için ITS1F ve ITS4R primer çiftleri kullanılmıştır. Toplam reaksiyon hacmi 25µl olacak şekilde, aşağıdaki bileşenler sırasıyla PZR tüpüne konulmuştur.

- Ultra saf su	12.875 µl
- Taqbuffer	2.5 µl
- dNTP karışımı (10pM)	1.0 µl
- ITS1F primeri (10 pmol)	1.0 µl
- ITS4R primeri (10 pmol)	1.0 µl
- Taq DNA polimeraz	0.25 µl
- Tuneup	2.0 µl
- Kalıp DNA (50 mg)	5.0 µl

Amlifikasyon programlanabilir bir ThermalCycler'da aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir;

Basamak	Döngü	Süre	Sıcaklık
İlk Denatürasyon	1	2 dk	95°C
Denatürasyon	35	20 sn	95°C
Annealing		40 sn	58°C
Uzama		50 sn	72°C
Son Uzama	1	5 dk	72 °C

Tüpler daha sonra 4°C'de saklanmıştır.

3.2.7.4. Kalmodulin bölgesinin PZR analizi

Kültüre edilen fungus suşlarının tanımlanması için korunmuş ITS bölgesine ilave olarak kalmodulin bölgesinin analizi de yapılmıştır. Bu amaçla, PZR amplifikasyonu için cmd5 ve cmd6 primerleri kullanılmıştır. Toplam reaksiyon

hacmi 25µl olacak şekilde, aşağıdaki bileşenler sırasıyla PZR tüpüne konulmuştur;

- Ultra saf su	12.875 µl
- Taqbuffer	2.5 µl
- dNTP karışımı (10pM)	1.0 µl
- cmd5 primeri (10 pmol)	1.0 µl
- cmd6 primeri (10 pmol)	1.0 µl
- Taq DNA polimeraz	0.25 µl
- Tuneup	2.0 µl
- Kalıp DNA (50 mg)	5.0 µl

Amlifikasyon programlanabilir bir ThermalCycler'da aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir;

Basamak	Döngü	Süre	Sıcaklık
İlk Denatürasyon	1	2 dk	95°C
Denatürasyon	35	20 sn	94°C
Annealing		50 sn	56°C
Uzama		35 sn	72°C
Son Uzama		5 dk	72 °C

Tüpler daha sonra +4°C'de saklanmıştır.

3.2.7.5. PZR Ürünlerinin Elektroforezi

PZR ürünlerinin elektroforezinde Consort marka 13x15 cm boyutlarında bir yatay elektroforez cihazı kullanılmıştır. Farklı agaroz jellerdeki bant izlerinin karşılaştırılabilmesi için elektroforez koşulları standardize edilmiş ve bütün elektroforez işlemleri aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Elektroforez, 90 V'ta 1 saat boyunca sürdürülmüştür. Tampon olarak TBE kullanılmış ve elektroforez

%1'lik agaroz jelde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca jel hazırlanırken içerisine, 1,5 µl/100ml olacak şekilde 10000 X GelRed (Biotium) nükleik asit boyası katılmıştır (Ausubel, 1997). Elektroforez için 5µl PZR ürünü ve 1 µl yükleme boyası karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiş, her elektroforez işleminde örneklerle beraber DNA marköründe (O' Gene Ruler 100bp DNA ve O'Range Ruler 100bp DNA) jelde yürütülmüştür.

3.2.7.6. Dizi analizi ve değerlendirme

Bakteri, fungus ve aktinobakteri kültürleri 16S ribozomal DNA bölgesi, CMD bölgesi ve ITS bölgesi dizi analizleri hizmet alımıyla gerçekleştirilmiştir. 16S ribozomal DNA bölgesi için 27F ve 1492R primerleri çiftleri, ITS bölgesi için ITS1F ve ITS4R primerleri çiftleri, kalmodulin bölgesi için CMD5 ve CMD6 primerleri kullanılmıştır. Sekans karşılaştırmaları NCBI GenBank veri tabanında bulunan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı kullanılarak ve DNA Baser sekans programıyla eşleşme sağlayarak elde edilen yakın türlerin hizalaması yapılmıştır. Filogenetik ağaç, Mega v5.0 yazılımı ile Tamura-Nei neighbor joining metodu kullanılarak oluşturulmuştur (Tamura vd., 2011). Ağacın güvenilirliği, 1000 tekrarlı parametrik olmayan bootstrap örnekleme ile değerlendirilmiştir.

3.2.8. Antibiyotik üretici suşların belirlenmesi

Bitkiden izole edilen fungus ve bakterilerin antimikrobiyal bileşik üretme kapasiteleri, Bölüm 3.1.4.'de belirtilen test organizmalarına karşı denenmiştir (CLSI, 2007). Antimikrobiyal aktivite taramalarında, fermentasyon sıvıları kullanılarak gerçekleştirilen etil asetat (EtOAc) ve bütanol ekstraktlarından aktivite kontrolü yapılmıştır. Denemeler, disk difüzyon yöntemi ve broth mikrodilüsyon yöntemi göre gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.1. Fermentasyon

Tüm organizmalar aktifleştirilerek taze kültürler inokülasyonda kullanılmıştır. Öze yardımıyla koloniler 250ml'lik 50 ml TSB(bakteri için) ve MEB(fungus için) erlenlere aseptik koşullarda aktarılmış ve 150 rpm 28°C'de uygun süre (fungus için 8-10 gün, bakteri için 24 saat) boyunca çalkalamalı

inkübasyona bırakılmıştır. Belirtilen süre sonunda fermentasyon ortamından 50'şer ml plastik steril falkon tüplerine alınmış ve 4°C 5000 rpm'de uygun sürede (bakteri için 10 dakika, fungus için 30 dakika) santrifüj edilmiştir.

3.2.8.2. Ekstraksiyon ve evaporasyon

3.2.8.2.1. Etil asetat ile ekstraksiyon ve evaporasyon

Santrifüj sonrası hücrelerden arındırılan süpernatantlar, (1:1)'i kadar EtOAc (etil asetat) ile 2 kez partisyona tabi tutulmuştur. Birleştirilen EtOAc fazları evaporatörde 37°C'de vakum altında uçurulmuştur. Elde edilen EtOAc ekstresi 1 ml EtOAc'da çözündürülmüştür.

3.2.8.2.2. Bütanol ile ekstraksiyon ve evaporasyon

Santrifüj sonrası hücrelerden arındırılan süpernatantlar, (1:1)'i kadar bütanol ile 2 kez partisyona tabi tutulmuştur. Birleştirilen bütanol fazları evaporatörde 37°C'de vakum altında uçurulmuştur. Elde edilen bütanol ekstresi 1 ml bütanol'de çözündürülmüştür.

3.2.8.3. Etil asetat ve bütanol ekstresinde aktivite taraması

EtOAc'da ve Bütanol'de çözünen ekstreden alınan 50' şer µl örneğin antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir.

Disk difüzyon yöntemi

37°C'de 24 saat boyunca MHA ve SDA üzerinde büyütülmüş bakteri ve maya kültürlerinden alınan uygun miktarda hücre süspansiyonu, McFarland bulanıklık standardına göre 0.5'e hazırlanmış ve steril eküvyonlar yardımıyla petrilere (MHA ve SDA) inoküle edilmiştir. Etil asetat ve bütanol ekstrelerinden antimikrobiyal aktivite tayini gerçekleştirilirken, steril diskler, petrilere yerleştirilmeden alüminyum folyo üzerine dizilmiş, 50 µl etil asetat ve bütanol ekstresi disklerle emdirilmiş ve disklerdeki solvent tamamen uçuncaya kadar beklenilmiştir. Disklerin tamamen kuruduklarına emin olunduktan sonra steril pens yardımıyla aseptik koşullarda petrilere yerleştirilmiştir. İnkübasyon öncesi petrilere, 2 saat 4°C'de bekletilmiş ve daha sonra 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her denemede standart antibiyotik diskleri (örneğin, novabiyosin ve tetrasiklin) ve saf etil asetat ve bütanol emdirilmiş diskler kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyon sonucunda disklerin çevresinde oluşan zonlar mm cinsinden ölçülmüştür (CLSI, 2007).

Broth mikrodilüsyon yöntemi

Etil asetat ve bütanol ekstrlerinin minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK), “Clinical and Laboratory Standarts Institute” tarafından tanımlanan mikrodilüsyon yöntemine göre yapılmıştır (CLSI 2007). Ekstreler, MHB besiyerinde steril plastik mikrodilüsyon plakları içerisinde iki kat seyreltmelerle hazırlanmıştır. Mikrodilüsyon protokolü aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir;

- Test organizmaları MHB besiyerinde 1 gece 37°C’de inkübe edilip aktifleştirilmiştir.
- Aktif organizmalar fizyolojik tuzlu su (FTS) kullanılarak 0.5 MacFarland bulanıklığına ayarlanmıştır.
- 100 µl MHB tüm kuyucuklara eklenmiştir.
- Ekstrlerden de 100 µl alınıp kuyucuklara eklenmiş ve planlanan seyreltme oranına ulaşıncaya kadar kuyucuklarda seyreltmeye devam edilmiştir. Her seyreltmede kuyucuktaki madde miktarı yarıya inmiştir. Her test organizması için 1 kuyucuk negatif kontrol, 1 de test organizmasını içeren pozitif kontrol hazırlanmıştır. Seyreltme işlemi bittiğinde her kuyucukta 100 µl sıvı yer almıştır.
- Denenecek maddenin kuyucuklara dağıtımı bittiğinde her kuyucuğa 5 µl 0.5 MacFarland bulanıklığına göre seyreltilmiş organizmalar eklenmiştir.
- Plaka 1 gece 37°C’de inkübe edilmiş ve büyümenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Yüzey Sterilizasyonu

Bitki materyalleri laboratuvarında yüzeydeki kontamine mikroorganizmaları elimine etmek için %70'lik etanol ile iyice yıkanarak, %3'lük sodyum hipoklorit (NaOCl) içerisinde 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra örneklerin yüzeyleri 3'er kez aleve tutulmuştur. Örnekler son olarak steril distile su ile çalkalanarak, bu son çalkalama suyundan alınıp uygun besiyerlerine ekim yapılmıştır. Petrilerde ve brothlarda herhangi bir biyolojik üreme gözlenemediğinden, başarılı bir yüzey sterilizasyonu gerçekleştirdiği sonucuna varılmıştır.

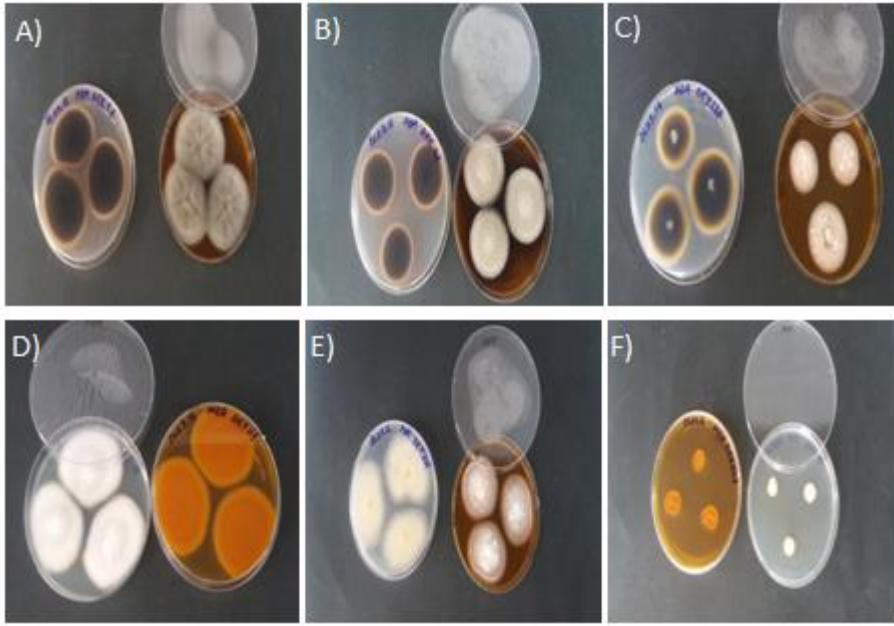
4.2. Endofit mikroorganizmaların izolasyonu

4.2.1. Endofitik fungusların izolasyonu

Ege bölgesi Kemalpaşa Nif dağı endemiği olan *Dianthus erinaceus* Boiss. var. *erinaceus* bitkisinden 6 adet fungus suşu saf olarak izole edilmiştir. 6 adet endofitik fungusun 4'ü kökten 2'si yapraktan izole edilmiştir. İzolatlarla ait bilgiler **çizelge 4.1**'de verilmiştir. Saflaştırılan bazı fungusların RBKA, PDA ve MEA besiyerindeki koloni görüntüleri **şekil 4.1**'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Endofitik fungus suşlarının izolasyon bilgileri

İzolat No	İzolat Kodu	Bitkiden İzole Edilen Kısım	Tarih	İzolasyon Besiyeri
1	DEK1f	Kök	15.07.2016	RBKA
2	DEK4f	Kök	15.07.2016	PDA
3	DEY11f	Yaprak	15.07.2016	PDA
4	DEY12f	Yaprak	15.07.2016	PDA
5	DEK20f	Kök	15.07.2016	MEA
6	DEK22f	Kök	15.07.2016	MEA



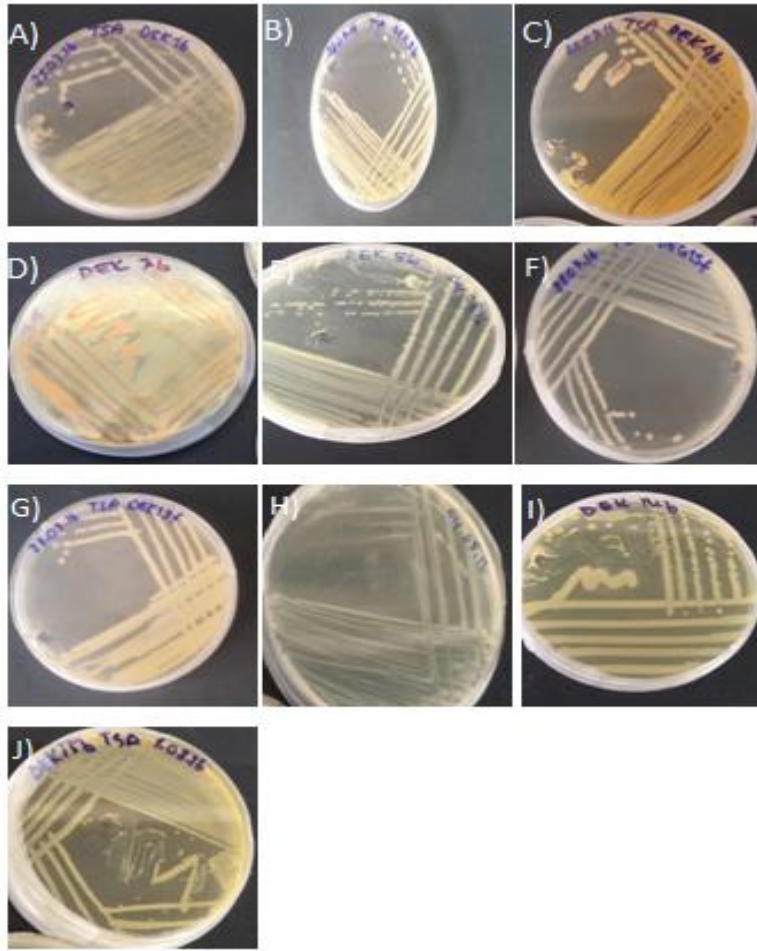
Şekil 4.1 İzole edilen saf fungus kolonilerinin MEA ve PDA'daki görüntüleri A) DEK1F, B) DEY12F, C) DEK4F, D) DEY11F, E) DEK20F, F) DEK22F.

4.2.2. Endofitik Bakterilerin İzolasyonu

Ege bölgesi Kemalpaşa Nif dağı endemiği olan *Dianthus erinaceus* Boiss. var. *erinaceus* bitkisinin kök ve gövdesinden 10 adet bakteri suşu saf olarak izole edilmiştir. İzolatlara ait bilgiler **çizelge 4.2**'de verilmiştir. Saflaştırılan bazı bakterilerin TSA ve AİA besiyerindeki koloni görüntüleri **şekil 4.2**'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Endofitik bakteri suşlarının izolasyon bilgileri

İzolat No	İzolat Kodu	Bitkiden İzole Edilen Kısım	Tarih	İzolasyon Besiyeri
1	DEK1b	Kök	15.07.2016	TSA
2	DEK3b	Kök	15.07.2016	TSA
3	DEK4b	Kök	15.07.2016	TSA
4	DEK7b	Kök	15.07.2016	TSA
5	DEK8b	Kök	15.07.2016	TSA
6	DEG11b	Gövde	15.07.2016	MEA
7	DEK12b	Kök	15.07.2016	MEA
8	DEG13b	Gövde	15.07.2016	MEA
9	DEK14b	Kök	15.07.2016	MEA
10	DEK15b	Kök	15.07.2016	AİA



Şekil 4.2 İzole edilen saf bakteri kolonileri A) DEK1b, B) DEK3b, C) DEK4b, D) DEK7b, E) DEK8b, F) DEG11b, G) DEK12b, H) DEG13b I) DEK14b, J) DEK15b.

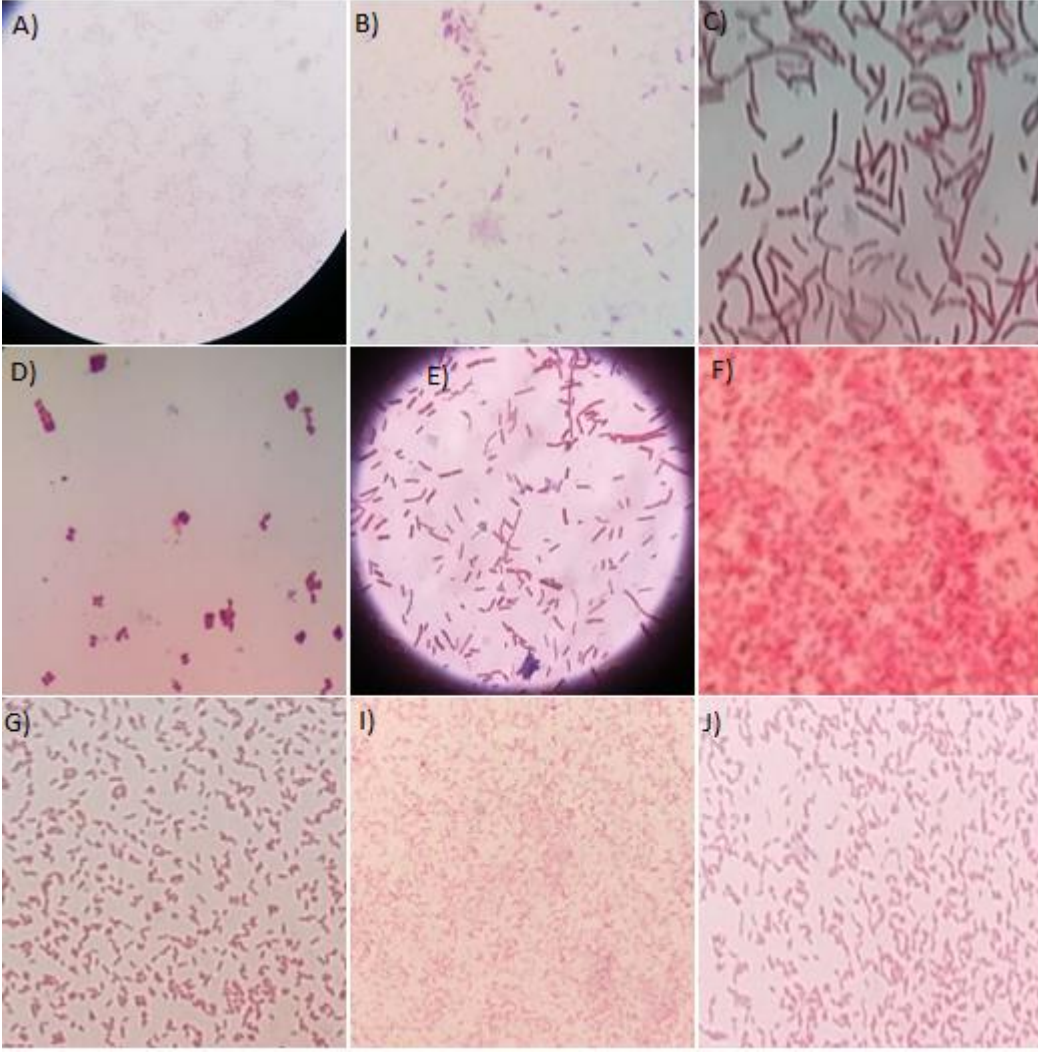
4.3. İzolatların mikroskopik özelliklerinin belirlenmesi

4.3.1. Bakterilerin mikroskopik özelliklerinin belirlenmesi

TSA'da 27 °C'de 24 saat büyütülen bakteri izolatların Gram boyama ve endospor boyama yöntemiyle boyanması ve mikroskopik olarak incelenmesi sonrasında edinilen bilgiler **çizelge 4.3**'de verilmiştir. Ayrıca gram reaksiyonu ve morfolojik özellikleri **şekil 4.3**'te görülmektedir.

Çizelge 4.3 Bakteri izolatlarının fenotipik ve mikroskopik özellikleri

İzolat No	İzolat Kodu	Morfoloji	Gram Boyama	Endospor boyama	Katalaz	Oksidaz	Hareketlilik
1	DEK1b	Basil	Gram negatif	Sporsuz	Negatif	Pozitif	Hareketli
2	DEK3b	Basil	Gram pozitif	Sporlu	Pozitif	Negatif	Hareketli
3	DEK4b	Basil	Gram pozitif	Sporlu	Pozitif	Pozitif	Hareketli
4	DEK7b	Kok	Gram pozitif	Sporsuz	Pozitif	Negatif	Hareketsiz
5	DEK8b	Basil	Gram negatif	Sporsuz	Negatif	Negatif	Hareketli
6	DEG11b	Basil	Gram negatif	Sporsuz	Pozitif	Pozitif	Hareketli
7	DEK12b	Basil	Gram negatif	Sporsuz	Pozitif	Pozitif	Hareketli
8	DEG13b	Kokobasil	Gram negatif	Sporsuz	Negatif	Pozitif	Hareketli
9	DEK14b	Basil	Gram negatif	Sporsuz	Pozitif	Pozitif	Hareketli
10	DEK15b	Basil	Gram negatif	Sporsuz	Negatif	Negatif	Hareketli



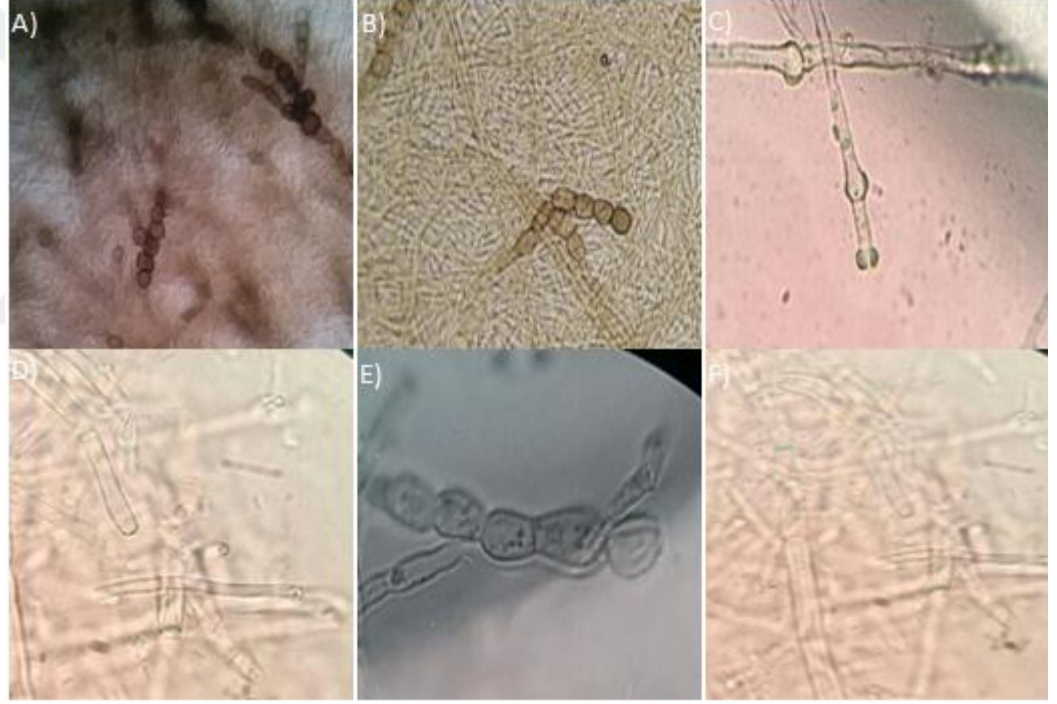
Şekil 4.3 Bakterilerin Gram boyama reaksiyonu sonrası 100X immersion objektifinde görüntüsü
 A) DEK1b, B) DEK3b, C) DEK4b, D) DEK7b, E)DEK8b, F)DEG11b, G) DEK12b, H) DEG13b
 I)DEK14b, J) DEK15b.

4.3.2. Fungusların mikroskopik özelliklerinin belirlenmesi

RBKA, PDA ve MEA'da 27 °C 'de 5-7 gün büyütülen fungus izolatlarının lama bir damla su alınarak aseptik koşullarda örneğin aktarılmasıyla mikroskopik olarak incelenmesi sonrasında edinilen bilgiler **çizelge 4.4**'de verilmiştir. Endofitik funguslar mikroskopik olarak değerlendirildiğinde çoğu genus steril misel oluşturmuş şekilde gözlenmiştir (**Şekil 4.4**).

Çizelge 4.4 Fungus izolatlarının fenotipleri ve morfolojileri

İzolat No	İzolat Kodu	Fenotipi	Morfoloji
1	DEK1f	Steril misel	Açık yeşil
2	DEK4f	Steril misel	Beyaz
3	DEY11f	Steril misel	Beyaz
4	DEY12f	Steril misel	Beyaz
5	DEK20f	Steril misel	Beyaz pamuksu
6	DEK22f	Steril misel	Beyaz



Şekil 4.4 Endofitik fungusların mikroskopik görüntüsü A) DEK1F, B) DEY12F, C) DEK4F, D) DEY11F, E) DEK20F, F) DEK22F.

4.4. İzolatların saklanması

Elde edilen izolatların saflıkları funguslar için MEA, bakteriler için TSA besiyerlerinde saflıkları kontrol edilmiştir. İzolatların stokları funguslar için yatkı MEA, bakteriler için yatkı TSA'ya ekim yapılarak gerçekleştirilmiştir.

4.5. İzolatların kültürel karakteristikleri

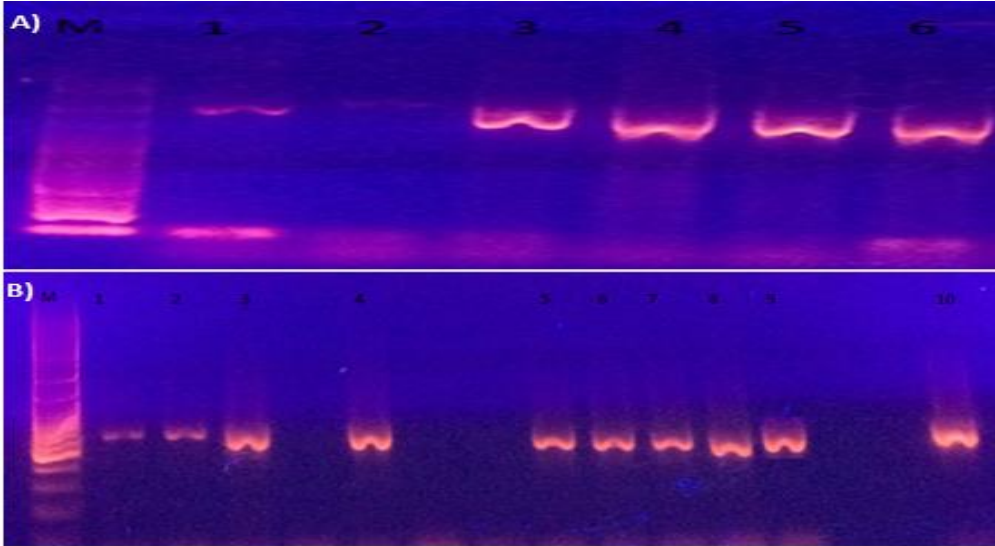
Bakteriyal izolatların 24 saatlik kültüründen örnek alınarak yapılan testlerde kültürel karakteristiklerini belirlemek için katalaz, oksidaz ve hareketlilik testleri yapılmıştır. Sonuçlar **çizelge 4.4**'te verilmiştir.

4.6. İzolatların moleküler karakterizasyonu

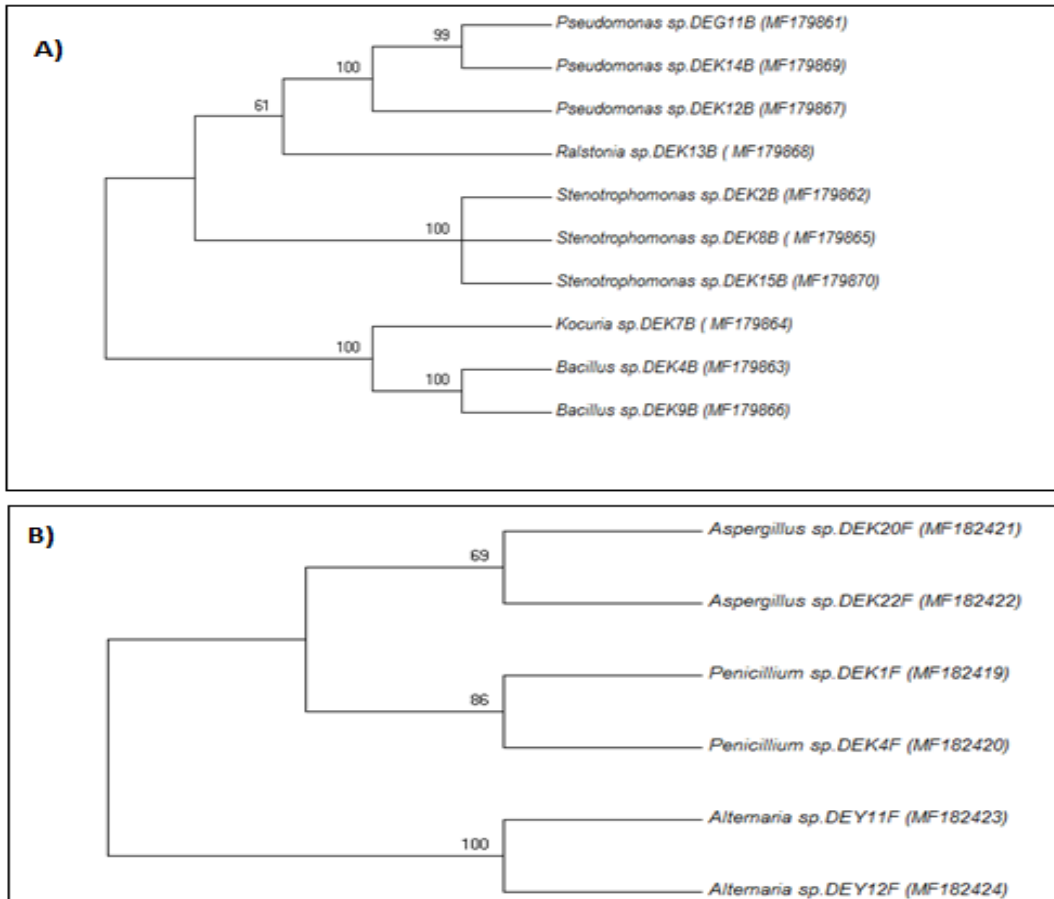
Elde ettiğimiz 6 fungus, 10 bakteri izolatının DNA izolasyonu, Bölüm 3.2.7.1'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildikten sonra sırasıyla endofitik funguslar için CMD5-CMD6 ve ITS1F-ITS4R primerleri ve endofitik bakteriler için 27F-1492R primer çifti kullanılarak kalmodulin gen bölgesi, 18S rRNA Internal Transcribed Spacer bölgesi ve 16S rDNA bölgesinin PZR amplifikasyonu, bölüm 3.2.7.4, 3.2.7.3 ve 3.2.7.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. PZR amplifikasyonu sonucu elde edilen amplikonlar (**Şekil 4.5**), dizi analizine tabi tutulmuş ve elde edilen diziler, NCBI veri tabanında “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) ile homoloji araştırmasına tabi tutulmuştur. İzolatların Blast analizi sonuçları **çizelge 4.7**'de verilmiştir. Kalmodulin bölgesinin PZR analizi sonuç vermediği için bulgu elde edilmemiştir. Onun yerine 18S rDNA sekans analizi ve filogenetik analizleri sonucunda izole edilen 6 adet fungustan Eurotiomycetes classisine ait 2 tür (*Penicillium spp.* ve *Aspergillus spp.*) ve Dothideomycetes clasisine ait *Alternaria sp.* olarak 3 farklı genus tespit edilmiştir. 16S rDNA sekans analizlerinde ise, *Bacillus sp.*, *Kocuria sp.*, *Stenotrophomonas sp.*, *Pseudomonas sp.* ve *Ralstonia sp.* türlerini içeren 5 farklı genus bulunmuştur. İzole edilen endofitik mikroorganizmaların filogenetik yakınlıklarını görebilmek için 18S rDNA ITS bölgesi ve 16S rDNA bölgesine ait diziler kullanılarak filogenetik ağaç çizilmiştir. Suşlara ait filogenetik ağaç, **Şekil 4.6**'da gösterilmektedir.

Çizelge 4.5. 16S rDNA ve ITS Bölgesi Dizi Analizi Sonuçları

16S rDNA Bölgesi Dizi Analizi				
İzolat No.	Ürün Boyutu (bp)	Homoloji (%)	Erişim no.	Genus
DEK1b	1376	99	MF179862	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
DEK3b	1406	100	MF179866	<i>Bacillus</i> sp.
DEK4b	1413	100	MF179863	<i>Bacillus</i> sp.
DEK7b	1380	99	MF179864	<i>Kocuria</i> sp.
DEK8b	1391	99	MF179865	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
DEG11b	1345	99	MF179861	<i>Pseudomonas</i> sp.
DEK12b	1401	99	MF179867	<i>Pseudomonas</i> sp.
DEG13b	1389	99	MF179868	<i>Ralstonia</i> sp.
DEK14b	1381	99	MF179869	<i>Pseudomonas</i> sp.
DEK15b	1398	100	MF179870	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
ITS Bölgesi Dizi Analizi				
İzolat No.	Ürün Boyutu (bp)	Homoloji (%)	Erişim No.	Genus
DEK1f	461	100	MF182419	<i>Penicillium</i> sp.
DEK4f	421	92	MF182420	<i>Penicillium</i> sp.
DEY11f	431	100	MF182423	<i>Alternaria</i> sp.
DEY12f	529	99	MF182424	<i>Alternaria</i> sp.
DEK20f	347	100	MF182421	<i>Aspergillus</i> sp.
DEK22f	501	100	MF182422	<i>Aspergillus</i> sp.



Şekil 4.5 PZR amplifikasyonu sonucu elde edilen PZR ürünleri A) 27F-1492R Primerleri ile elde edilen PZR ürünleri, B) ITS1F-ITS4R Primerleri ile elde edilen PZR ürünleri



Şekil 4.6 Tamura-Nei neighbor joining metodu ile oluşturulmuş A) Bakteri, B) Fungus suşları arasındaki yakınlıkları gösteren filogenetik ağaç. Ağaç, MEGA v7.0 yazılımı kullanılarak oluşturulmuş ve güvenilirliği 1000 tekrarlı bootstrap analizi ile gerçekleştirilmiştir.

4.7. Antibiyotik üretici suşların belirlenmesi

Antibiyotik üreten suşların belirlenmesi amacıyla saflaştırılan 6 fungus ve 10 bakteri türünün her birinden izolasyon besiyerinin sıvı formundan 50 ml fermentasyon ortamı hazırlanmıştır. Elde edilen fermentasyon sıvısından etil asetat ve bütanol ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Antimikrobiyal aktivite taraması fermentasyon sıvılarıyla partisyona tabi tutulmuş etil asetat ve bütanol ile yapılmış olup disk difüzyon yöntemi ve broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Yöntemlerin sonuçlarına göre funguslardan en aktif izolat **DEK20f** ve bakterilerden **DEG11b'nin** gram negatif, gram pozitif ve *C.albicans*'a karşı etkinliği olduğu bulunmuştur. Bakteri izolatlarından **DEK14b'nin** de gram negatif ve gram pozitiflere karşı etkin olduğu gözlemlenmiştir.

4.7.1. İzolatlardan elde edilen ekstrelerin disk difüzyon sonuçları

Antimikrobiyal aktivite taramalarında, fermentasyon sıvıları kullanılarak gerçekleştirilen etil asetat (EtOAc) ve bütanol ekstrelerinden aktivite kontrolü yapılmıştır. Ancak etil asetat denemelerinde sonuç alınamadığı için bütanol ekstrelerindeki antimikrobiyal aktivite taraması sonrasında elde edilen sonuçlar, **çizelge 4.6'da** verilmiştir. Yüksek aktivite gösteren türler **şekil 4.7'de** gösterilmektedir.

Çizelge 4.6. Endofitik mikroorganizmalara ait bütanol ekstrelerinin disk difüzyon sonuçları

İzolat No	İzolat Kodu	Antimikrobiyal aktivite (mm)					
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aureginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	MRSA	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida albicans</i>
1	DEK1f	0	0	0	0	0	0
2	DEK4f	0	0	0	0	0	0
3	DEY11f	0	0	0	0	0	0
4	DEY12f	0	0	0	0	0	0
5	DEK20f	0	10	8	10	0	8
6	DEK22f	0	0	0	0	0	0
7	DEK1b	9	0	0	0	0	0
8	DEK3b	0	0	0	0	0	0
9	DEK4b	0	0	0	0	0	0
10	DEK7b	0	0	0	0	0	0
11	DEK8b	0	0	0	0	0	0
12	DEG11b	12	12	0	12	0	7
13	DEK12b	0	0	0	0	0	0
14	DEG13b	0	0	0	0	0	0
15	DEK14b	8	11	0	8	0	0
16	DEK15b	0	0	0	0	0	0

50 ml fermentasyon sıvısından elde edilen ekstre, 1000 µl bütanol içerisinde çözülmüş ve denemelerde 50 µl kullanılmıştır.



Şekil 4.7 DEG11b, DEK14b ve DEK 20f numaralı endofitik mikroorganizma izolatlarından elde edilen fermentasyon sıvılarının test organizmalarına karşı göstermiş oldukları antimikrobiyal aktivite sonuçları

4.7.2. Broth mikrodilüsyon yöntemi ile antibiyotik üretici suşların belirlenmesi

Çalışmamızda elde ettiğimiz bütanol ekstrelerinden test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri konsantrasyon belirlemek amacıyla olarak mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Broth mikrodilüsyon ttesti 96 kuyucuklu plakalar kullanılarak yapılmıştır. Maddelerin MİK değerleri **çizelge 4.7'**de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. Bütanol ekstralarının test organizmalarına karşı göstermiş oldukları MİK değerleri

	Minimum İnhibitör Konsantrasyon Değerleri (µg/ml)					
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aureginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>MRSA</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida albicans</i>
DEK1f	-	-	-	-	-	-
DEK4f	-	-	-	-	-	-
DEY11f	-	-	-	-	-	-
DEY12f	-	-	-	-	-	-
DEK20f	512	512	1024	1024	-	1024
DEK22f	-	-	-	-	-	-
DEK1b	512	512	-	-	-	-
DEK3b	-	-	-	-	-	-
DEK4b	-	-	-	-	-	-
DEK7b	-	-	-	-	-	-
DEK8b	-	-	-	-	-	-
DEG11b	256	512	128	512	-	64
DEK12b	-	-	-	-	-	-
DEG13b	-	-	-	-	-	-
DEK14b	256	1024	256	512	-	-
DEK15b	-	-	-	-	-	-
BÜTANOL	-	-	-	-	-	-

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Endofitik mikroorganizmalar, tıp, zirai ve ilaç endüstrisi alanında geniş potansiyeli olan, biyoaktif ve kimyasal olarak yeni bileşikler için zengin ve güvenilir bir kaynak olarak az araştırılmış bir mikroorganizma grubudur. Bu grup doğadaki mevcut kaynaklardan yararlanmak için eşsiz bir potansiyel sunmaktadır (Kumar vd., 2014). Özellikle tıp alanında yolların tıkanması, klinik kullanımdaki ve pazardaki bütün antibiyotiklere karşı direnç gelişmesinden dolayı Dünya genelinde etkili, düşük toksisiteli ve yeni antibiyotiklere, kemoterapötik ajanlara ve agrokimyasallara büyük bir ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (Sreekanth, 2008). Ayrıca sürekli olarak ilk kez görünen ve yeniden görünen patojenlerin ortaya çıkması, ilaç keşfi için yeni ve biyolojik olarak aktif moleküllere olan ihtiyacı daha da arttırmaktadır. Ancak toprak kökenli organizmaların biyoteknoloji şirketleri tarafından uzun yıllar boyunca antimikrobiyal bileşikler bakımından taranmaları, yapısal olarak yeni bileşiklerin keşfinin açıkça giderek azalmasına neden olmuştur (Berdy 2005). Bu nedenle yararlı biyoaktif bileşikler üreten mikrobiyal kaynaklar için yeni ve keşfedilmemiş mikrobiyal habitatların araştırılması gerekmektedir. Nispeten gözden kaçan ve ümit verici olan bir niş ise yüksek bitkilerin iç dokularıdır. Yapılan çalışmalar bazı bakterilerin bitkilerle yakın ilişkiler kurduklarını ve fungusların da en çok izole edilen endofitik mikroorganizmalar olduklarını göstermiştir (Qin vd., 2011).

Türkiye, üç kıta arasında doğal bir köprü olması, çeşitli coğrafik özellikleri ve coğrafi farklılığın getirdiği iklim çeşitliliği nedeniyle dünyada oldukça fazla bitki çeşitliliğine sahip ülkeler arasındadır. Ülkemizde 9582 tane bitki türü vardır bunlardan 3155 tanesinin endemik olduğu bildirilmiştir (Bulut ve Tuzlacı, 2013). Bu çalışmada, Ege Bölgesi endemiği olan *Dianthus erinaceus* Boiss. var. *erinaceus* bitkisi seçilmiş, bu bitkiden endofitik mikroorganizmaların izolasyonu ve bu organizmalardan ekstrakte edilecek biyoaktif sekonder metabolitlerin keşfedilmesi hedeflenmiştir.

Dianthus türü binlerce yıldır çeşitli ülkelerde tıbbi olarak enfeksiyonlarla mücadele için kullanılmıştır. Diüretik etkileri, kardiyovasküler, intestinal sistem ve antibakteriyal etkisinin yanı sıra bazı parazitlerede etkisi olduğu bildirilmiştir. *Dianthus* türlerşerinden izole edilen esansiyel yağ olarak tanımlanan Eugenol bir

çok patojenik bakteriye karşı antibakteriyal etki göstermiştir. Özellikle *B.cereus*, *L.monocytogenes* ve *K.pneumoniae*'ye karşı güçlü antibakteriyel etkisi saptanmıştır. Eugenol mikroorganizmanın yapısına bağlanarak biyofilm tabakasının oluşmasını engelleyen benzen türevleri olarak iş görmektedir. Bu yüzden biyofilm oluşturan *P.aeruginosa* ve *C.albicans* türlerini inhibe eder. Bunun yanında *Dianthus caryophyllus* bitkisinden ekstrakte edilen iki benzoik asit türevi , vanilik asit ve protokatetirik asit, *Fusarium* sp. türlerine karşı inhibe edici etki göstermiştir. Aynı zamanda yine *Dianthus caryophyllus*'tan ekstrakte edilen flavon datisketin *Fusarium oxysporum*'a karşı fungitoksik etki göstermiştir (Al-Snafi., 2017). Bu bitki üzerinde yapılan çalışmalarda enfeksiyonlara karşı koruma sebepleri araştırılmıştır. Önemli yağ asitlerinin birçok hastalığın ve anormalliklerinin önlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu amaçla Durucasu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, bazı *Dianthus* türlerinden önemli yağ asitleri ekstrakte edilmiş ve yağ asitlerinin komponentleri hekzan ekstraksiyonu yapılarak GC-MS yöntemiyle saptanmıştır. Buna göre yağ asitlerinin, fitol, eikosanol ve eikosan bileşiklerinden oluştuğu saptanmıştır. Ancak *D.erinaceus* bitkisine ait ekstraksiyon sıvısının eikosan içermediği tespit edilmiştir. Daha sonra bu ekstraktlardan yapılan mikrobiyal test çalışmalarında, *Dianthus erinaceus* Boiss. var. *erinaceus* türünün ciddi deri enfeksiyonlarına sebep olan *Staphylococcus epidermidis*'e karşı aktivitesi olduğu gözlenmiştir (Durucasu vd.,2009). Buda bitki içerisinde önemli derecede bulunan yağ asitlerinden kaynaklı olduğunu göstermektedir. Ancak bu yağ asitlerinin bitkinin kendisi tarafından yada endofitik mikroorganizmalar tarafından üretilen metabolit olduğu hala netlik kazanmamıştır. Bu konu üzerine çalışmalar hala devam etmektedir. Birçok teoride bitkinin ekstrem koşullara, fitopatojenlere ve çeşitli iklim şartlarına karşı hayatta kalma stratejisi endofitlerin bitkiye destek sağladığını ve sekonder metabolitin mikroorganizma tarafından sentezlendiğini kanıtlar niteliktedir.

Bu çalışma kapsamında Ege bölgesi endemiği olan *Dianthus erinaceus* Boiss. var. *erinaceus* bitkisine ait, kök, gövde ve yaprak örnekleri toplanmıştır. Bu örnekler Bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı gibi yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş ve Bölüm 3.2.2.'de anlatıldığı şekilde farklı besi ortamları kullanılarak endofitik fungus ve bakteri izolasyonları gerçekleştirilmiştir. *Dianthus erinaceus* bitkisinin

farklı dokularından 6 fungus ve 10 bakteri olmak üzere toplamda 16 izolat elde edilmiştir.

Bitkinin farklı kısımlarından endofitik mikroorganizmaları izole edebilmek için izolasyon besiyeri olarak, pek çok araştırmacı tarafından önerilen, literatürde endofitik fungusların izolasyonunda iyi sonuç verdiği belirtilen 3 farklı besi ortamı kullanılmıştır. Burdan yola çıkarak endofitik fungusların izolasyonu için PDA, MEA ve RBKA besi ortamları denemiştir. Welington ve arkadaşları da yaptıkları bir çalışmada *Citrus* bitki kültivarlarının yapraklarından dominant olarak izole ettikleri *Colletotrichum gloeosporioides*, *Guignardia citricarpa* ve *Cladosporium sp.* gibi endofitik fungal türlerini PDA ve WA (Water Agar) besi ortamlarından saflaştırmıştır (Welington vd., 2001). Yapılan başka bir çalışmada *Colobanthus quitensis* bitkisinin farklı kısımlarından izole edilen 188 endofitik fungal tür, içerisinde kloromfenikol antibiyotiğinin bulunduğu PDA besi ortamından elde edilmiştir (Rosa vd., 2010). Kristina ve arkadaşları ise domates bitkisinin köklerinden izole ettikleri *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Humicola fuscoatra* ve *Penicillium sp.* türlerini içerisinde 200 mg/l kloramfenikol bulunan RBKA ortamından elde etmişlerdir (Kristina vd., 2015). Yapılan bir başka çalışmada *Garcinia* bitkisinin dal ve yapraklarından izole edilen 377 adet endofitik fungi çalışmasında antibiyotik içermeyen Patates Dekstroz Agar ortamından başarılı bir şekilde izole edilmiştir (Phongpaichit., 2006). Çalışmamızda *D.erinaceus* bitkisinin farklı kısımlarından izole edilen 6 fungal izolatın 3'ü (%50) PDA'dan; 2'si (%33,3) MEA'dan ve 1'i (%16,7) RBKA'dan elde edilmiştir. Bu durumda PDA en fazla izolatın elde edildiği en başarılı izolasyon besiyeri olarak göze çarpmaktadır. Bununla ilgili literatür taramalarına bakıldığında en fazla kullanılan besi ortamında PDA olduğu görülmektedir.

Moleküler karakterizasyon için fungus izolatlarından elde edilen genomik DNA'lardan ITS1F ve ITS4R primerleri kullanılarak 18S rDNA bölgelerinin PZR amplifikasyonu 3.2.7.3'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen PZR ürünleri, dizi analizine tabi tutulmuştur. Dizi analizinde yine aynı primer çifti kullanılmış ve analiz, Medsantek firması tarafından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Sekans analizi sonucunda elde edilen ham veriler önce

temizlenmiş, daha sonra da NCBI GenBank veri tabanında bulunan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı kullanılarak veri tabanında bulunan organizmalar ile eşleştirilmiştir. Eşleşme sonrasında fungus suşlarından elde edilen ITS bölgesi dizileri, veri tabanına kaydedilmiş ve erişim numaraları (MF182419- MF182424) alınmıştır. Ancak çalışılan kalmodulin bölgesinde sonuç alınmadığı için sonuçlar sadece ITS bölgesine göre değerlendirilmiştir. Bazı izolatların DNA dizi verileri birden çok organizma ile aynı oranda benzerlik gösterdiğinden tür düzeyinde ayırım yerine genus düzeyinde ayırım yapılmıştır. Örneğin, DEK1f izolatının gen dizisi veri tabanına yüklendiğinde, *Penicillium citrinum* ve *P.griseofulvum* türleriyle %100 benzerlik göstermiştir. Fenotipik olarak birbirinden ayrılan bu iki türün çalışmamızda petrilerden alınan mikroskopik örneklerinde yalnızca steril misel gözlenmesinden dolayı fenotipik ayırma gidilememiştir. Bu yüzden ITS sonucuna göre değerlendirilip *Penicillium* sp. olarak bildirilmiştir. Kökten izole edilen DEK4f suşu, ITS sonucua göre *Penicillium citrinum* ve *P.griseofulvum* türleriyle %92 benzerlik göstermiştir. Bu veri tabanındaki organizmalar ile düşük benzerlik oranı bulunması, izolatın yeni bir tür olabileceği düşüncesini güçlendirmektedir. Yapraktan izole edilen DEY11f izolatının moleküler tanılamasına göre, *Alternaria* sp., *A.infectaria*, *A.prasonis*, *A.arbusti*, *A.metachromatica*, *A.triticina* türleriyle % 100 benzerlik göstermiştir. Yine aynı şekilde yapraktan izole edilen DEY12f izolatı da *Alternaria murispora*, *Alternaria triticina*, *Alternaria murispora* türleriyle %99 homoloji göstermiştir. Fenotipik tanılaması yapıldığında konidial baş yapısı oluşmamıştır. Bu yüzden bu iki izolat ITS sonuçlarına göre değerlendirilip *Alternaria* sp. olarak genus düzeyinde bırakılmıştır. Kökten izole edilen DEK20f ve DEK22f izolatları moleküler tanılama sonucunda, *Aspergillus sclerotiorum*, *Aspergillus subramanianii*, *Aspergillus persii* türleriyle %100 benzerlik göstermiştir. Funguslardan alınan mikroskopik örneklemede yalnızca steril misel gözlemlendiğinden tayin anahtarından yararlanılamamıştır. Bu yüzden bu iki izolat ITS sonuçlarına göre değerlendirilip *Aspergillus* sp. olarak genus düzeyinde bırakılmıştır. Bu sonuçlara göre, *Dianthus erinaceus* Boiss. var. *erinaceus* bitkisine ait, kök ve yaprağından elde edilen toplam 6 adet fungus izolatının tamamının Ascomycota filumuna ait olduğu belirlenmiştir. Bunlar, Eurotiomycetes grubuna ait 2 tür (*Aspergillus* spp. ve *Penicillium* spp.) ve Dothideomycetes grubuna ait 1 tür (*Alternaria* spp.) olmak üzere 3 farklı genus

olarak bulunmuştur. Xu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *Dioscorea zingiberensis* rizomundan Ascomycota filumuna ait *Penicillium* spp. ve *Alternaria longissima* türleri izole edilmiştir (Xu vd.,2007). Buna benzer yapılan etnobotanik açıdan önemli bitki izolasyonu çalışmalarına bakıldığında bir bitkiden çok fazla sayıda endofitik fungus elde edildiği görülmüştür. Örneğin, Sette ve arkadaşları *Coffea arabica* bitkisinden 25 fungus türü izole etmişlerdir (Sette vd., 2006). Buna paralel olarak bir çalışmada Li ve arkadaşları da, *Argyrosomus argentatus* bitkisinden 16 fungus türü izole etmişlerdir (Li vd., 2006). Çalışmamızda izole edilen endofitik fungus sayısının az olmasının sebebi, kültür bağımlı metotlarda doğal habitatın, laboratuvar ortamından farklı olması aslında bitkide varolan endofitlerin izole edilememesi olarak gösterilebilir. Ayrıca, *Dianthus erinaceus* Boiss. var. *erinaceus* bitkisine ait, kök ve yapraklarında fungus endofitlerinin çeşitliliğinin daha az olması muhtemeldir. Tez çalışmamızda olduğu gibi Rosa ve arkadaşlarının Antartika'da yaptıkları bir çalışmada, Caryophyllaceae familyasına ait *Colobanthus quitensis* bitkisinin köklerinden *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Geomyces* sp., *Gyoeffyyella* sp., *Microdochium* sp., *Mycocentrospora* sp. ve *Phaeosphaeria* sp. türünü de içeren 188 adet fungus izole etmişlerdir (Rosa vd., 2010). Larran ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, 450 buğday yaprağından toplam 130 fungal izolat elde edilmiştir. Tüm izolatlardan 19 fungal tür tespit edilmiş olup; ayrıca bu fungal türler arasında spor oluşturmeyen misel yapısındaki SM I ve SM II kodlu iki fungus türü de saptanmıştır. İzole edilen endofitik fungusların çoğu Ascomycota grubuna aitken; az bir kısmı ise birkaç hifomisetin de dahil olduğu Deuteromycota grubuna ait olduğu keşfedilmiştir (Larran vd., 2002). Yapılan bu çalışma doğrultusunda 19 fungal tür arasından *Penicillium* sp. , *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp. ve fenotipik olarak tanılanamayan steril misel yapısındaki 2 endofitik fungus türü gözlemlenmiştir. Kendi çalışmamızın da buna paralel olarak fenotipik tanılamasında, steril misel yapısına sahip fungal endofit türleri gözlemlenmiştir.

Bakteriyal izolatların moleküler karakterizasyon için elde edilen genomik DNA'lardan 27F ve 1492R primerleri kullanılarak 16S rRNA bölgelerinin PZR amplifikasyonu 3.2.7.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen PZR ürünleri, dizi analizine tabi tutulmuştur. Dizi analizinde yine aynı primer çifti kullanılmış ve analiz, fungus izolatlarında olduğu gibi Medsantek firmasınca

hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Sekans analizi sonucunda elde edilen ham veriler önce temizlenmiş, daha sonra da NCBI GenBank veri tabanında bulunan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı kullanılarak veri tabanında bulunan organizmalar ile eşleştirilmiştir. Eşleşme sonrasında bakteriyal izolatlardan elde edilen 16S rRNA bölgesi dizileri, veri tabanına kaydedilmiş ve erişim numaraları (MF179861- MF179870) alınmıştır. Bazı izolatların DNA dizi verileri birden çok organizma ile aynı oranda benzerlik gösterdiği için türler hakkında kesin sonuca varılamamıştır. 16S rDNA dizileri birbirlerine çok yakın olduğundan dolayı bir organizma birçok organizmaya aynı oranda benzerlik göstermektedir. Bu durumda tür seviyesinde tanımlama yapabilmek için polifazik yaklaşım gereği fenotipik ve kemotaksonomik özelliklerin de belirlenmesi gerekmektedir (Kampfer, 2011). Organizmalara ait kültürel karakteristik çalışmalarında tanımlama için yetersiz kaldığından bakteriyal izolatlar genus düzeyinde bırakılmıştır. Kültürel ve moleküler biyolojik tanımlama sonucunda; *Dianthus erinaceus* Boiss. var. *erinaceus* bitkisine ait, kök ve gövde örneklerinden elde edilen 5 cinse (*Bacillus*, *Kocuria*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* ve *Ralstonia*) ait toplamda 10 adet bakteriyal izolat tanısı gerçekleştirilmiştir. DEK1b, DEK8b ve DEK 15b moleküler tanımlama sonucunda sırasıyla %99 (DEK1b ve DEK8b) ve %100 benzerlik oranıyla *Stenotrophomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas* sp. olarak belirlenmiştir. Yapılan fenotipik tanılamada gram negatif, sporsuz olarak belirlenen bu bakteri izolatları *Stenotrophomonas* sp. genusuyla benzerlik göstermiştir. Kökten izole edilen DEK3b ve DEK4b suşları yapılan moleküler karakterizasyon sonucunda *Bacillus oryzaecorticis*, *Bacillus simplex*, *Bacillus muralis* türleriyle %100 homoloji gösterdiği için bu izolatlar *Bacillus* sp. olarak genus düzeyinde saptanmıştır. DEK7b izolatı 16S rDNA dizi analizine göre *Kocuria rosea*, *Kocuria rhizophila* ve *Kocuria* sp. organizmalarıyla %99 homoloji göstermiştir. Yapılan fenotip çalışmalarıyla gram pozitif, kok olarak belirlendiği için moleküler çalışmalar ile uyum sağlamıştır. Gövdeden izole edilen DEG11b ve kökten izole edilen DEK12b ile DEK14b *Pseudomonas moraviensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas granadensis*, *Pseudomonas libanensis* *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas helmanticensis*, *Pseudomonas baetica* türleriyle %99 homoloji göstermiştir. Yapılan fenotip çalışmalarında gram negatif, basil olarak belirlenen bu izolatlar tür düzeyinde birçok *Pseudomonas* sp. suşuyla benzerlik gösterdiği

için genus düzeyinde bırakılmıştır. Son olarak gövdeden izole edilen DEG13b bakteri izolatının moleküler tanımlamasında *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia syzygii* ve *Ralstonia sp.* türleriyle %99 homoloji göstermiştir. Fenotipik tanımlamalar sonucunda gram negatif kokobasil olması *Ralstonia sp.* genusu olduğunu doğrular niteliktedir. Toprakta ve rizosfer bölgesinde oldukça yaygın olarak bulunan bu cinslerin endofitik bitki mutualisti olması oldukça muhtemeldir. Bitkiye birçok yarar sağlayan endofitler, rizosferik mikroorganizmalar arasındada yerini almaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum* ve *Pseudomonas* dahil olmak üzere çeşitli endofitik bakteri türleri rapor edilmiştir (Elbeltagy vd.,2001; McInroy ve Kloepper, 1994; Misko ve Germida, 2002;). Ayrıca *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Staphylococcus* ve *Stenotrophomonas* gibi çeşitli fırsatçı patojenler, bitki kök hücrelerinde kolonileşen cinsler olarak tanımlanmıştır (Berg vd., 2005). Özellikle *Pseudomonas* türleri birçok bitkinin gelişimini teşvik ederek önemli oranda bitki verimini artırmışlardır (Vessey, 2003). Örneğin, yapılan bir çalışmada *Pseudomonas* izolatlarının tarla koşullarında nohut, patlıcan, soya fasulyesi ve domatesin kök ve yeşil aksam ağırlıklarını ve tohum çimlenmesini teşvik ettiğini bildirmiştir (Bonfante ve Perotto, 1995). Sobral ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, glikofosfat açısından zengin bir toprakta yetişen soya fasulyesinin kökünden *Ralstonia pickettii* türünün yansira birçok endofitik bakteri türü izole edilmiştir (Kuklinsky-Sobral vd.,2005). Endofitik bakterilerin taranması sırasında saptanan bakteri türleri, havuç köklerinden *Pseudomonas* (Surette vd.,2003), kumul otu'nun kök ve rizomlarından *Stenotrophomonas* ve *Pseudomonas* türleri (Dalton vd.,2004), limon bitkisinin yapraklarından *Bacillus spp.* (Araujo vd., 2001) ve Kadife çiçeğinden *Kocuria sp.* (Sturz ve Kimpinski, 2004) türleri çalışmamızdaki gibi izole edilmiştir. Buğday yaprağından izole edilen üç bakteriyel izolatın tümü *Bacillus sp.* olarak belirlenmiştir (Larran vd., 2002).

Dianthus erinaceus Boiss. var. *erinaceus* bitkisinden izole edilen fungus ve bakterilerin antimikrobiyal bileşik üretme kapasiteleri fermentasyon sıvıları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Etil asetat (EtOAc) ve bütanol ekstraherlerinden aktivite kontrolü yapılmıştır. Yapılan etil asetat ile ekstraksiyon ve evaporasyonla elde edilen sekonder metabolitler test mikroorganizmalarına karşı denenmiş ancak

bir sonuç alınamamıştır. EtOAc, üretilen sekonder metabolitlerin birçoğu ile yakın bir polarite göstermekte olup, non-kovalent etkileşimler ile fermentasyon sıvısından sekonder metabolitleri özütleyebilmektedir. Ancak daha polar yapıya sahip moleküllerin ekstre edilebilmesi için n-bütanol kullanılmaktadır. Muhtemelen bu tez çalışması kapsamında üretilen sekonder metabolitlerin daha polar yapıda olması etil asetat yöntemini yetersiz kılmıştır. Bu yüzden çalışmamızda fermentasyon sıvılarının ekstraksiyon işlemi bütanol ile gerçekleştirilmiştir. Test edilen bu yöntemde, aktivite taramaları için, bazı gram negatif, gram pozitif türleri ve *C.albicans* seçilmiş ve ekstrelerin aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ve broth mikrodilüsyon yöntemiyle denenmiştir. Buna göre 8 bakteri ve 4 fungus izolatının test organizmalarına karşı antimikrobiyal etkisinin olduğu saptanmıştır. Özellikle fungal izolatlardan *Aspergillus* sp. olarak tanımlanan Dek20f, gram negatiflere karşı yüksek aktivite gösterirken, bakteriyal izolatlardan *Pseudomonas* sp. olarak tanımlanan Deg11b *C.albicans*'a karşı antifungal etki göstermiştir. Yapılan benzer bir çalışmada *Dioscorea zingiberensis* rizomundan endofitik funguslar izole edildikten sonra, sekonder metabolit elde edilmiş ve n-bütanol ekstraksiyonu yapılmıştır. Broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılan bu denemede, Dfz2 olarak adlandırılan türün gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı oldukça etkili olduğu bulunmuştur. Aktivite taramalarında kullanılan broth mikrodilüsyon yönteminde, minimum inhibisyon konsantrasyon değerlerinin 1024-64 µg/ml civarında belirlenmesi, mevcut konsantrasyonun yüksek olduğunu göstermektedir. Bunun sebebi ise yapılan aktivite taramalarında kullanılan biyoaktif molekülün saflaştırma basamağı yapılmadığından birçok molekülü barındırmaktadır. Buna ilaveten saflaştırma basamağı yapılmasıyla moleküller ayrışacağı için minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri düşecektir.

Toprakta ve rizosfer bölgesinde oldukça yaygın olarak bulunan *Pseudomonas* türleri, biyoaktif doğal bileşikler yönünden bitki gelişimini teşvik edici özelliklerinin yanında gölgede kalsada, insan patojeni fungus türlerine karşı oldukça aktif metabolit üreten önemli türler içermektedir. *Pseudomonas* bakterilerinden özellikle *P. fluorescens* ve *P. putida*'nın birçok bitkinin gelişimini teşvik ederek önemli oranda bitki verimini artırmışlardır. Bu bakteriler Kloepper ve arkadaşları tarafından bitki gelişimini teşvik edici bakteriler olarak tanımlanmıştır. Yararlı etkilerinin ise özellikle, bitki patojenlerinin bastırılması ile

meydana gelen antagonizm olduğu açıklanmıştır. *Pseudomonas* türlerinin bitkiler üzerine yapılan çalışmalarda, *Pseudomonas* izolatlarının tarla koşullarında nohut, patlıcan, soya fasulyesi ve domatesin kök ve yeşil aksam ağırlıklarını ve tohum çimlenmesini teşvik ettiğini bildirmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise, *Pseudomonas putida*'nın domateste *Phytium ultimum*'un neden olduğu zararı azalttığı, hastalık etmenlerinin bulunduğu toprakta, sağlıklı bitkilerin gelişimini arttırdığı incelenmiştir (Gravel vd., 2007). Örneğin, Miller ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, çimden izole ettikleri *Pseudomonas viridiflava* türünden ekstrakte edilen ekomisin B ve C insan ve bitki patojeni funguslara karşı aktivite göstermiştir. Özellikle düşük konsantrasyonlarda *C. neoformans* ve *C.albicans*'a karşı antimikotik özellik göstermiştir. Aynı çalışmada daha önce *Pseudomonas syringae*'den izole edilen syringomisin, *P.viridiflava*'dan izole edilmiş ve antimikotik etkisi gözlenmiştir. *Pseudomonas* genusunun farklı türleri birçok bitkiden izole edilmiştir. Örneğin, *P. putida* ve *P. fluorescens* havucun köklerinden, *P.citronellosis* soya fasulyesinden, *P.synxantha* İskoç çamından izole edilmiş türlerdir (Surette vd., 2003). Bu tez çalışmasında en etkili Deg11b ve Dek14b kodlu izolatlar *Pseudomonas sp.* olarak tanımlanmıştır. Bu mikroorganizmalar sırasıyla *D.erinaceus* bitkisinin gövde ve köklerinden izole edilmiştir. *Pseudomonas sp.* türlerinin bitkide kolonize olma durumu incelendiğinde çoğunlukla bitkinin kökünde yerleştikleri görülmektedir. Çünkü bu mikroorganizmalar azot fiksasyonuna yardımcı olmaktadır. Ayrıca izolatların antimikrobiyal etkisi bakıldığında Deg 11b kodlu bakteri izolatının, antimikotik etkisi gösterilmiştir. Bunun yanında bakteriyal izolatlardan Dek14b kodlu izolatın gram negatif ve gram pozitif organizmalara karşı etkinliği gösterilmiştir. Bu bulgular bize izole ettiğimiz *Pseudomonas* türünün hastane kaynaklı enfeksiyonlara sebep olan türlere karşı ilaç üretiminde umut ışığı olmuştur.

Stenotrophomonas türü gamaproteobacteria grubuna bağlı bir genustur. Bu türler ekolojik açıdan oldukça önemlidir. Çünkü bitki hastalığı yapan fungal türlerle rekabete girerek bitkiyi bitki patojenlerinden korur ve bitki gelişimine destek olur (Berg vd., 1994). Wolf ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptığı bir çalışmada çevresel ve klinik alanlardan 16 adet *Stenotrophomonas* türü izole edilmiştir. Bilindiği üzere *Stenotrophomonas* türleri fırsatçı bir nozokomiyal enfeksiyon etkenidir (Dürger ve Berktaş, 2007). Doğada ve hastane ortamında da

yaygın olarak bulunmaktadır. Ancak bu mikroorganizma insan patojeni olduğu gibi aynı zamanda insanda fırsatçı patojen olarak bulunan *C.albicans* türüne karşı oldukça etkili sekonder metabolit üretmektedir (Wolf vd., 2002). Dalton ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada *Ammophila arenaria* ve *Elymus mollis* bitkilerinin köklerinden azot fiksasyonuna yardımcı *Stenotrophomonas* türleri izole edilmiştir. Bu bitkilerin ve diğer kumul çayırlarının besin açısından yoksul ortamlarda hayatta kalma başarısının endofitik diazotrofik bakterileri içermesi olarak düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında Dek1b olarak kodlanan bakteri izolatu moleküler çalışmalar sonucunda *Stenotrophomonas* sp. olarak bulunmuştur. Ve fermentasyon sıvısıyla yapılan antimikrobiyal aktivitesi sonucunda gram negatif organizmalara karşı etkisinin olduğu saptanmıştır.

Aspergillus sp. türleri yaygın olarak, topraktan, bitki artıklarından ve endofit olarak çeşitli bitki türlerinden izole edilen kozmopolit bir cinistir. *Aspergillus* sp. türlerinde aseksüel spor üretimine yardımcı olan ve hormon benzeri yapılar olarak adlandırılan oksiporinlerin, sekonder metabolit üretimine yardımcı olduğu bildirilmiştir (Tsitsigiannis ve Keller, 2007). *Aspergillus* sp. türlerinden izole edilmiş başta tıp olmak üzere özellikle günümüzde çözümü hala bulunamayan kansere karşı, antikanser ajanı olarak iş gören podofilotoksin gibi birçok biyoaktif doğal ürün bulunmaktadır (Kusari vd., 2009). Aynı zamanda yine antitümör ajanı olarak kullanılabilen sequoiaton A 129 and B 130, kırmızı odunlarda endofit *Aspergillus parasiticus* türlerinden ekstrakte edilmiştir (Stierle vd., 1999). Bunun yanında *Aspergillus fumigatus* ile yapılan çalışmalarda, asperfumoit, fumigaklavin C, fumitremorgin C, fiskion, helvolik asit gibi değişik biyoaktivitelere sahip geniş aralıkta bileşikler rapor edilmiştir (Liu vd., 2004). Bu kapsamda *Aspergillus* sp. olarak tanımlanan DEK22f izolatu ele alınmış ve biyoaktivite taraması için küçük ölçekli üretimi gerçekleştirilmiştir. 1 haftalık fermentasyonun sonunda elde edilen fermentasyon sıvısı bütanol ile ekstrakte edilmiştir. DEK22f ekstresi mikrobiyolojik aktivite testlerinde, özellikle gram negatif bakterilere karşı yüksek aktivite göstermiştir.

Günümüzde sorun yaratan ve özellikle hastane enfeksiyonlarına neden olan ilaç dirençli patojenler (metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* (VRE), *Mycobacterium tuberculosis*

ve *Candida albicans*) bilinen bütün antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç geliştirmiştir. Bu direnç mekanizmaları yeni ilaçlara olan ihtiyacı göstermektedir. Ancak toprak kökenli organizmalar ve denizel türevli mikroorganizmaların antimikrobiyal bileşikler bakımından taranmaları, yapısal olarak yeni bileşiklerin keşfinin giderek azalmasına neden olmuştur (Berdy, 2005). Bu nedenle yararlı biyoaktif bileşikler üreten mikrobiyal kaynaklar için yeni ve keşfedilmemiş mikrobiyal habitatların araştırılması gerekmektedir. Bu amaçla özellikle Strobel ve arkadaşlarının yağmur ormanlarındaki habitatı keşfetmesiyle ortaya çıkan akım, yüksek bitkilerin ve endofitlerinin araştırılmasına sebep olmuştur.

Bu tez çalışması, *Dianthus erinaceus* Boiss. var. *erinaceus* bitkisinin kök, gövde ve yaprağından izole edilen endofitik fungus ve bakteri türlerinin tanımlanması ve bu izolatlara ait antimikrobiyal aktivitelerini gösteren ilk çalışmadır. Bu çalışma ile mikrobiyal topluluk çalışmalarına ve biyoçeşitliliğe katkı sağlanmıştır. Aynı zamanda antibakteriyal ve antifungal potansiyelleri belirlenerek yeni biyoaktif metabolitlerin keşfi için bir potansiyeli ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Al-Snafi, A. E.**, 2017, Chemical contents and medical importance of *Dianthus caryophyllus*-A review, *IOSR Journal of Pharmacy*, 7(3):61-71pp.
- Altomare, C., Perrone, G., Zonno, M. C., Evidente, A., Pengue, R., Fanti, F. and Polonelli, L.**, 2000, Biological characterization of fusapyrone and deoxyfusapyrone, two bioactive secondary metabolites of *Fusarium semitectum*, *Journal of natural products*, 63(8): 1131-1135p.
- Aly, A. H., Debbab, A., Kjer, J. and Proksch, P.**, 2010, Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products, *Fungal diversity*, 41(1): 1-16p.
- Ann Lila, M.**, 2006, The nature-versus-nurture debate on bioactive phytochemicals: the genome versus terroir, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(15):2510-2515pp.
- Araújo, W. L., Maccheroni Jr, W., Aguilar-Vildoso, C. I., Barroso, P. A., Saridakis, H. O. and Azevedo, J. L.**, 2001, Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks, *Canadian journal of microbiology*, 47(3): 229-236p.
- Araújo, W. L., Maccheroni Jr, W., Aguilar-Vildoso, C. I., Barroso, P. A., Saridakis, H. O. And Azevedo, J. L.**, 2001, Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks, *Canadian journal of microbiology*, 47(3), 229-236.
- Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kylo, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N. and Herre, E. A.**, 2003, Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26):15649-15654p.
- Arnone, A., Cardillo, R., and Nasini, G.**, 1986, Structures of melleolides BD, three antibacterial sesquiterpenoids from *Armillaria mellea*, *Phytochemistry*, 25(2):471-474p.
- Arora, N. K., Kang, S. C. and Maheshwari, D. K.**, 2001, Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut, *Current Science*, 673-677p.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Atlas, R.M.**, 2004, Handbook of Microbiological Media, 3th Ed., CRC Press, Boca Raton, 2051p.
- Augustine, S. K., Bhavsar, S. P. and Kapadnis, B. P.**, 2005, A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23, *Journal of Biosciences*, 30(2):201-211p.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K.**, 1992, Short protocols in molecular biology.
- Avcı, M.**, 2005, Çeşitlilik ve endemizm açısından Türkiye'nin bitki örtüsü, *İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü Coğrafya Dergisi*, 13(1):27-55s.
- Ballio, A., Bossa, F., Di Giorgio, D., Ferranti, P., Paci, M., Pucci, P. and Strobel, G. A.**, 1994, Novel bioactive lipodepsipeptides from *Pseudomonas syringae*: the pseudomycins, *FEBS letters*, 355(1): 96-100p.
- Balsanelli, E., Serrato, R. V., De Baura, V. A., Sassaki, G., Yates, M. G., Rigo, L. U. and Monteiro, R. A.**, 2010, Herbaspirillum seropedicae rfbB and rfbC genes are required for maize colonization, *Environmental microbiology*, 12(8):2233-2244pp.
- Berdy, J.**, 2005, Bioactive microbial metabolites, *J Antibiot.*, 58 (1):1-26pp.
- Berg, G., Eberl, L. and Hartmann, A.**, 2005, The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria, *Environmental Microbiology*, 7(11):673-1685pp.
- Berg, G., Knaape, C., Ballin, G. and Seidel, D.**, 1994, Biological control of *Verticillium dahliae* KLEB by naturally occurring rhizosphere bacteria, *Arch Phytopathol Dis Prot* 29:249–262pp.
- Bonfante, P. and Perotto, S.**, 1995, Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting hostplants, *New Phytol*, 130:3- 21pp.
- Borel, J. F. and Kis, Z. L.**, 1991, The discovery and development of cyclosporine (Sandimmune), In *Transplantation proceedings*, Vol. 23, No. 2, 1867p.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Böhm, M., Hurek, T. and Reinhold-Hurek, B.,** 2007, Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N₂-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72, *Molecular plant-microbe interactions*, 20(5):526-533pp.
- Büber, E. ve Açan, N. L.,**2004, Ribozom dışı yolla sentezlenen biyoaktif peptidler, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35, 43-48s.
- Carroll, G. C.,**1991, Beyond pest deterrence—alternative strategies and hidden costs of endophytic mutualisms in vascular plants. In *Microbial ecology of leaves*, Springer, New York, 358-375pp.
- Cassady, J. M., Chan, K. K., Floss, H. G. and Leistner, E.,** 2004, Recent developments in the maytansinoid antitumor agents, *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 52(1), 1-26, *Chem. Nat. Compd.* 45, 782–785pp.
- Chen, X., Luo, J. G. and Kong, L. Y.,** 2010, Two new triterpenoid saponins from *Dianthus superbis* L. Original Article, *Journal of Asian natural products research*, 12(6), 458-463pp.
- Ciddi, V. and Shuler, M. L.,** 2000, Camptothecine from callus cultures of *Nothapodytes foetida*, *Biotechnology letters*, 22(2):129-132pp.
- Claus, D.,** 1992, A standardized Gram staining procedure *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(4):451-452pp.
- CLSI,** 2007, Clinical and Laboratory Standards Institute. Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. CLSI document M100-S17.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. and Barka, E. A.,** 2005, Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects, *Applied and environmental microbiology*, 71(9):4951-4959pp.
- Dalton, D. A., Kramer, S., Azios, N., Fusaro, S., Cahill, E. and Kennedy, C.,**2004, Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila arenaria* and *Elymus mollis*) from Oregon, *FEMS microbiology ecology*, 49(3):469-479pp.
- Das, A. and Varma, A.,**2009, Symbiosis: the art of living, In *Symbiotic Fungi*, Springer Berlin Heidelberg, 1-28pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Davis, P.H.**, 1967. Flora of Turkey, 2. Edinburg University Press, pp. 126.
- Devaraju, R., & Satish, S. (2010). Endophytic fungi:" trapped" or" hidden" store houses of bioactive compounds within plants: a review. *Journal of Pharmacy Research*, 3(12, Co), 2986-2989.
- Diksha, S. and Amla, B.**, 2011, Ethnobotany and ethnopharmacology-past, present and future, *International Journal of Pharmaceutical Innovations*, 1, 86-92pp.
- Dreyfuss, M.M. and Chapela, I.H.**, 1994, Potential of Fungi in The Discovery of Novel, Low-Molecular Weight Pharmaceuticals. in: Gullo, V.P. (eds) The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential, Butterworth-Heinemann, Boston, 49pp.
- Dudeja, S. S., Giri, R., Saini, R., Suneja-Madan, P. and Kothe, E.**, 2012, Interaction of endophytic microbes with legumes, *Journal of Basic Microbiology*, 52(3):248-260pp.
- Duran, A., Martin, E., Oztuerk, M., Çetin, Ö., Dinc, M. and Özdemir, A.**, 2010, Morphological, karyological and ecological features of halophytic endemic *Sphaerophysa kotschyana* Boiss.(Fabaceae) in Turkey, *Biological Diversity and Conservation*, 3(2):163-169s.
- Durucasu, I., Mutlu, K., Sik, L., Yasa, I., Arda, N. and Kirmizigul, S.**,2009, Apolar constituents of some biologically active *Dianthus* species from Western Anatolia, *Chemistry of natural compounds*, 45(6):782-785s.
- Dülger D. Ve Berktaş M.**, 2007, *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarının klinik önemi, *Van Tıp Derg*, 14(3): 90-5s.
- Ensign, J. C.**, 1992, Introduction to the actinomycetes. The prokaryotes, 1, 811-815pp.
- Erik, S. ve Tarıkahya, B.**, 2004, Türkiye florası üzerine, *Kebikeç*, 17(1):139-163pp.
- Ersöz, M.**, 2006, *Dianthus Erinaceus* Boiss. var. *Erinaceus*'un biyosistematigi ve ekolojisi üzerine çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi.
- Eyberger, A. L., Dondapati, R. and Porter, J. R.**, 2006, Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin, *Journal of Natural Products*, 69(8), 1121-1124pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Findlay, J. A., Li, G. and Johnson, J. A.**,1997, Bioactive compounds from an endophytic fungus from eastern larch (*Larix laricina*) needles, *Canadian journal of chemistry*, 75(6), 716-719pp.
- Flores-Bustamante, Z. R., Rivera-Orduña, F. N., Martínez-Cárdenas, A. and Flores-Cotera, L. B.**, 2010, Microbial paclitaxel: advances and perspectives. *The Journal of antibiotics*, 63(8), 460-467pp.
- Freeman, E. M.**, 1904, The seed-fungus of *Lolium temulentum*, L., the Darnel, Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Containing Papers of a Biological Character, 196:1-27pp.
- Galeotti, F., Barile, E., Curir, P., Dolci, M. and Lanzotti, V.**, 2008, Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity, *Phytochemistry Letters*, 1(1):44-48pp.
- Gasparetto, J. C., Martins, C. A. F., Hayashi, S. S., Otuky, M. F. and Pontarolo, R.**, 2012, Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: a millennial herbal medicine, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(2):172-189pp.
- Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P. and Chhatpar, H. S.**, 2006, Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *African Journal of Biotechnology*, 5(2):54-72 pp.
- Golinska, P., Wypij, M., Agarkar, G., Rathod, D., Dahm, H. and Rai, M.**, 2015, Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 108(2):267-289pp.
- Gontang, E. A., Fenical, W. and Jensen, P. R.**, 2007, Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments, *Applied and environmental microbiology*, 73(10), 3272-3282pp.
- Grabley, S. and Sattler, I.**, 2003, Natural productsforleadidentification: nature is a valuable resource for providing tools, In *Modern Methods of Drug Discovery*, Birkhäuser Basel, 87-107pp.
- Gravel, V. , Antoun, H. and Tweddell, R. J.**, 2007, Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*, possible role of indole acetic acid (IAA), *Soil. Biol. Biochem*, 39:1968- 1977pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Grobe, N., Lamshöft, M., Orth, R. G., Dräger, B., Kutchan, T. M., Zenk, M. H. and Spiteller, M.,** 2010, Urinary excretion of morphine and biosynthetic precursors in mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(18), 8147-8152pp.
- Grünewald, J. and Marahiel, M. A.,** 2006, Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), 121-146pp.
- Gunatilaka, A. L.,** 2006, Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence, *Journal of Natural Products*, 69(3), 509-526pp.
- Guo, B., Wang, Y., Sun, X. and Tang, K.,** 2008, Bioactive natural products from endophytes: a review, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(2), 136-142 pp.
- Gupte, M., Kulkarni, P. and Ganguli, B.,** 2002, Antifungal antibiotics, *Applied microbiology and biotechnology*, 58(1), 46p.
- Gurney, K. A. and Mantle, P. G.,** 1993, Biosynthesis of 1-N-methylalbonoursin by an endophytic *Streptomyces* sp. isolated from perennial ryegrass. *Journal of natural products*, 56(7), 1194-1198pp.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S. and van Elsas, J. D.,** 2008, Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth, *Trends in microbiology*, 16(10), 463-471pp.
- Harper, J. K., Arif, A. M., Ford, E. J., Strobel, G. A., Porco, J. A., Tomer, D. P. and Grant, D. M.,** 2003, Pestacin: a 1, 3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities, *Tetrahedron*, 59(14), 2471-2476pp.
- Harrison, L., Teplow, D. B., Rinaldi, M. and Strobel, G.,** 1991, Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity. *Microbiology*, 137(12), 2857-2865pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Hawksworth, D.C. and Rossman. A.Y.**, 1987, Where are the undescribed fungi? *Phytopathology* 87, 888-891pp.
- Hill A.M.**, 2006, Thebiosynthesis, molecular genetics and enzymology of polyketide derived metabolites, *Nat. Prod. Rep.*, 23: 256pp.
- Hill, A. F.**, 1952, Economic botany, A textbook of useful plants and plant products. Economic botany. A textbook of useful plants and plant products, 2nd edn.
- Holding, A. J. and Collee, J. G.**, 1971, Chapter I Routine Biochemical Tests, *Methods in microbiology*, 6, 1-32pp.
- Hong, S. B., Cho, H. S., Shin, H. D., Frisvad, J. C. and Samson, R. A.**, 2006, Novel Neosartorya species isolated from soil in Korea, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(2), 477-486pp.
- Hong-Yu, L., Koike, K. and Ohmoto, T.**, 1994, Triterpenoid saponins from *Dianthus chinensis*, *Phytochemistry*, 35(3), 751-756pp.
- Hopwood, D. A., Sherman, D. H.**, 1990, Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis, *Annu. Rev. Genet.*, 24:37-66pp.
- Howitz,K.T.,and Sinclair,D.A.**,2008, Xenohormesis:sensing the chemical cues of other species, *Cell* 133:387–391pp.
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Xing, J., Corke, H. and Sun, M.**, 2007, A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants, *Economic Botany*, 61(1), 14-30pp.
- Iospenko, A. and Ignatov, V.**, 1995, Physiological aspects of phytohormon production by *Azospirillum brasilense* Sp7, *NATO ASIScr. G.*, 37:307-312pp.
- Isaka, M., Jaturapat, A., Rukseree, K., Danwisetkanjana, K., Tanticharoen, M.and Thebtaranonth, Y.**, 2001, Phomoxanthones A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species, *Journal of natural products*, 64(8):1015-1018pp.
- Iznaga, Y., Lemus, M., González, L., Garmendia, L., Nadal, L.and Vallin, C.**, 2004, Antifungal activity of actinomycetes from Cuban soils, *Phytotherapy Research*, 18(6), 494-496pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Ji, H. F., Li, X. J. and Zhang, H. Y.,** 2009, Natural products and drug discovery. *EMBO reports*, 10(3):194-200pp.
- Jimenez, J. T., Sturdikova, M. and Sturdik, E.,** 2010, Bioactive marine and terrestrial polyketide and peptide secondary metabolites and perspectives of their biotechnological production. *Acta Chimica Slovaca*, 3(1):103-119pp.
- Kaewkla, O. and Franco, C. M.,** 2013, Rational approaches to improving the isolation of endophytic actinobacteria from Australian native trees, *Microbial ecology*, 65(2):384-393pp.
- Kampfer, P.,** 2011, Genus *Streptomyces*, In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2:5.
- Keller N.P.,** 2005, Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics, *Nat Rev Microbiol*, 3:937-947pp.
- Kristiana, R.,** 2015, Keragaman kapang pada tanah rizosfer tanaman tomat di lahan pertanian konvensional, *Faktor Exacta*, 8(1):67-74pp.
- Kharwar, R.N. and Strobel, G.,** 2011, Fungal Endophytes: An Alternative Source Of Bioactive Compounds For Plant Protection in; Dubey, N.K. (Ed.), *Natural products in plant pest management*, Wallingford, Oxfordshire, CABI 306p.
- Khosla, C.,** 1997, Harnessing the Biosynthetic Potential of Modular Polyketide Synthases. *Chem. Rev.*, 97:2577-2590pp.
- Kour, A., Shahl, A. S., Rehman, S., Sultan, P., Qazi, P. H., Suden, P. and Verma, V.,** 2008, Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7):1115-1121pp.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araujo, W. L., Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A. A. and Azevedo, J. L.,** 2005, Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide, *Plant and soil*, 273(1-2):91-99pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Kusari, S. and Spiteller, M.,** 2011, Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes?, *Natural product reports*, 28(7):1203-1207pp.
- Kusari, S. and Spiteller, M.,** 2012b, Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities, In *Metabolomics*, U.Roessner,ed.(Rijeka,Croatia:InTech), 241–266pp.
- Kusari, S., Hertweck, C.and Spiteller, M.,**2012, Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites, *Chemistry and biology*, 19(7):792-798pp.
- Kusari, S., Lamshöft, M. and Spiteller, M.,** 2009, *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin, *Journal of applied microbiology*, 107(3):1019-1030pp.
- Kusari, S., Lamshöft, M. and Spiteller, M.,** 2009, *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin, *Journal of applied microbiology*, 107(3):1019-1030pp.
- Kusari, S., Lamshöft, M., Zühlke, S. and Spiteller, M.,** 2008, An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin, *Journal of Natural Products*, 71(2):159-162pp.
- Kusari, S.,Zuhlke, S.,Kosuth, J.,Cellarova ,E.,and Spiteller, M.,** 2009b, Light-Independent metabolomics of endophytic *Thielavia subthermophila* provides in sight into microbial hypericin biosynthesis, *J.Nat.Prod*, 72:1825–1835pp.
- Kusari, S. and Spiteller,M.,** 2012a, Camptothecin: recent advances in plant endophyte research. In *Natural Resources Conservation and Management*, L. R. Patro, ed. (New Delhi, India: Manglam Publications), 1–32pp.
- Kusari, S., Lamsho M. and Spiteller, M.,** 2009a, *Aspergillus fumigatus* Fresenius,an endophytic fungus from *Juniperus communis* L.Horstmannas

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- an ovel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin, *J.Appl.Microbiol*, 107:1019–1030pp.
- Larran, S., Perello, A., Simon, M. R. and Moreno, V.,** 2002, Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(7), 683-686.
- Lee, M. R., Winters, A. L., Scollan, N. D., Dewhurst, R. J., Theodorou, M. K. and Minchin, F. R.,** 2004, Plant-mediated lipolysis and proteolysis in red clover with different polyphenol oxidase activities, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(13):1639-1645pp.
- Li, Q. Y., Zu, Y. G., Shi, R. Z. and Yao, L. P.,** 2006, Review camptothecin:current perspectives, *Current medicinal chemistry*, 13(17):2021-2039pp.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R. and Pedersen, J.,** 2000, Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR, *J Clin Microbiol.*, 38, 471p.
- Liu, J. Y., Song, Y. C., Zhang, Z., Wang, L., Guo, Z. J., Zou, W. X. and Tan, R. X.,** 2004, *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites, *Journal of biotechnology*, 114(3):279-287pp.
- Liu, J.Y., Huang, L.L., Ye, Y.H., Zou, W.X., Guo, Z.J. and Tan, R.X.,** 2005, Antifungal and new metabolites of *Myrothecium* sp. Z16, a fungus associated with white croaker *Argyrosomus argentatus*, *J Appl Micobiol*, 100, 195–202pp.
- Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X. and Zhou, J.,** 2008, Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(2):241-247pp.
- Lu, H., Zou, W. X., Meng, J. C., Hu, J. and Tan, R. X.,** 2000, New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*, *Plant science*, 151(1):67-73pp.
- Malathi, U. and Suneetha, V.,** 2015, Qualitative, Biochemical and Nanoparticle-Antimicrobial Analysis of *Lactobacillus* SPS screened from

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

the various milk and curd samples of southern Tamilnadu, *International Journal of Drug Development and Research*, 7(1).

- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T. And Mootz, H. D.,** 1997, Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthetasis, *Chem Rev.*, 97:2651–2673pp.
- McInroy, J. A. and Kloepper, J. W.,** 1994, Studies on indigenous endophytic bacteria of sweet corn and cotton, *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the release of GMOs*, 19-28pp.
- Miller, C. M., Miller, R. V., Garton-Kenny, D., Redgrave, B., Sears, J., Condrón, M. M. and Strobel, G. A.,** 1998, Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava*, *Journal of applied microbiology*, 84(6):937-944pp.
- Misko, A. L. and Germida, J. J.,** 2002, Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola, *FEMS microbiology ecology*, 42(3):399-407pp.
- Mutlu, K., Sarikahya, N. B., Yasa, I. ve Kirmizigul, S.,** 2016, *Dianthus erinaceus* var. *erinaceus*: Extraction, isolation, characterization and antimicrobial activity investigation of novel saponins, *Phytochemistry Letters*, 16, 219-224s.
- Myers, A. A. and De Grave, S.,** 2000, Endemism: origins and implications. *Vie et Milieu*, 50(4):195-204pp.
- Nakano, T., Sugimoto, S., Matsunami, K. and Otsuka, H.,** 2011, Dianthosaponins A–F triterpene saponins, flavonoid glycoside, aromatic amide glucoside and-pyrone glucoside from *Dianthus japonicas*, *Chem. Pharm. Bull.* 59, 1141–1148pp.
- Nakayama, M., Koshioks, M., Yoshida, H., Kan, Y., Fukui, Y., Koike, A. and Yamagushi, M.,** 2000, Cyclic malyl anthocyanins in *Dianthus caryophyllus*, *Phytochemistry* 55, 937–939pp.
- Obmann, A., Purevsuren, S., Zehl, M., Kletter, C., Raznicek, G., Narantuya, S., Glasl, S.,** 2012, HPLC determination of flavonoid glycosides in Mongolian *Dianthus versicolor* Fish (Caryophyllaceae)

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

compared with quantification by UV spectrophotometry, *Phytochem. Anal.* 23, 254–259pp.

Obuchi, T., Kondoh, H., Watanabe, N., Tamai, M., Imura, S., Jun-Shan, Y. and Xiao-Tian, L., 1990, Armillaric acid, a new antibiotic produced by *Armillaria mellea*, *Planta medica*, 56(02):198-201pp.

Oshima, Y., Oshawa, T. and Hikino, H., 1984b, Structures of dianosides C, D, E and F: triterpenoid saponins of *Dianthus superbus* var. *longicalycinus* herbs, *Planta Med.* 50, 43–47pp.

Oshima, Y., Oshawa, T. and Hikino, H., 1984c, Structures of dianosides G, H and I, triterpenoid saponins of *Dianthus superbus* var. *longicalycinus* herbs. *Planta Med.* 50, 254–258pp.

Oshima, Y., Oshawa, T., Oikawa, K., Konno, C. and Hikino, H., 1984a, Structures of dianosides A and B, analgesic principles of *Dianthus superbus* var. *Longicalycinus* herbs. *Planta Med.* 50, 40–43pp.

Owen, N. L. And Hundley, N., 2004, Endophytes—the chemical synthesizers inside plants, *Science progress*, 87(2):79-99pp.

Özhatay, N., Byfield, A. ve Atay, S., 2008, Türkiye'nin 122 önemli bitki alanı, WWF Türkiye, Doğal Hayatı Koruma Vakfı.

Parker, M. P., 1995, Plant fitness variation caused by different mutualist genotypes, *Ecology*, 76(5):1525-1535pp.

Plouvier, V., Martin, M.T. and Brouard, J.P., 1986, Two pyrane type glycosides from *Saponaria* and *Dianthus*, *Phytochemistry* 25, 546–548pp.

Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., Rukachaisirikul, V. and Sakayaroj, J., 2006, Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 48(3), 367-372pp.

Priti, V., Ramesha, B. T., Singh, S., Ravikanth, G., Ganeshiah, K. N., Suryanarayanan, T. S. and Uma Shaanker, R., 2009, How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites?, *Current Science*, 97(4):477-478pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Puri, S. C., Nazir, A., Chawla, R., Arora, R., Riyaz-ul-Hasan, S., Amna, T. and Sharma, A.,** 2006, The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans, *Journal of Biotechnology*, 122(4):494-510pp.
- Puri, S. C., Verma, V., Amna, T., Qazi, G. N. and Spiteller, M.,** 2005, An Endophytic Fungus from *Nothapodytes foetida* that Produces Camptothecin, *Journal of natural products*, 68(12): 1717-1719pp.
- Qiao, K.,** 2012, Mechanism Studies on Fungal Type I Iterative Polyketide Synthases and Nonribosomal Peptide Synthetases, University of California, Los Angeles.
- Qin, S., Xing, K., Jiang, J. H., Xu, L. H. and Li, W. J.,** 2011, Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(3), 457-473pp.
- Reinhold-Hurek, B., Maes, T., Gemmer, S., Van Montagu, M., and Hurek, T.,** 2006, An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol., Plant-Microbe Interact.*, 19:181–188pp.
- Ren, Y., Strobel, G. A., Graff, J. C., Jutila, M., Park, S. G., Gosh, S. and Moore, E.,** 2008, Colutellin A, an immunosuppressive peptide from *Colletotrichum dematium*, *Microbiology*, 154(7):1973-1979pp.
- Rosa, L. H., Almeida Vieira, M. D. L., Santiago, I. F. and Rosa, C. A.,** 2010, Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl.(Caryophyllaceae) in Antarctica, *FEMS Microbiology Ecology*, 73(1):178-189pp.
- Rosenblueth, M. and Martínez-Romero, E.,** 2006, Bacterial endophytes and their interactions with hosts, *Molecular plant-microbe interactions*, 19(8):827-837pp.
- Samson, R. A., Noonim, P., Meijer, M., Houbaken, J. A. M. P., Frisvad, J. C. And Varga, J.,** 2007, Diagnostic tools to identify black aspergilli, *Studies in mycology*, 59:129-145pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Sarapatka, B. and Kraskova, M.**, 1997, Interactions between phosphatase activity and soil characteristics from some locations in the Czech Republic, *Rostiinna-Vyroba*, 43, 415-419pp.
- Sauer, M., Lu, P., Sangari, R., Kennedy, S., Polishook, J., Bills, G. and An, Z.**, 2002, Estimating polyketide metabolic potential among nonsporulating fungal endophytes of *Vaccinium macrocarpon*, *Mycological Research*, 106(4), 460-470pp.
- Schulz, B., Römmert, A. K., Dammann, U., Aust, H. J. and Strack, D.**, 1999, The endophyte-host interaction: a balanced antagonism?, *Mycological Research*, 103(10):1275-1283pp.
- Schulz, B. and Boyle, C.**, 2005, The endophytic continuum, *Mycol. Res.* 109, 661–686pp.
- Schwarzer, D., Finking, R. A. and Marahiel, M. A.**, 2003, Nonribosomal peptides: from genes to products, *Nature Product Reports*, 20, 275–287pp.
- Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I. and Milner, J. A.**, 2007, A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species, *The Journal of nutritional biochemistry*, 18(9):567-579pp.
- Sette, L.D., Passarini, M.R.Z., Delarmelina, C., Salati, F. and Duarte, M.C.T.**, 2006, Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants, *World J Micobiol Biotechnol*, 22, 1185-1195pp.
- Shaanker, R. U., Ramesha, B. T., Ravikanth, G., Gunaga, R., Vasudeva, R. and Ganeshaiah, K. N.**, 2008, Chemical profiling of *Nothapodytes nimmoniana* for camptothecin, an important anticancer alkaloid: towards the development of a sustainable production system, *Bioactive molecules and medicinal plant*, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, 197-213pp.
- Shweta, S., Zuehlke, S., Ramesha, B. T., Priti, V., Kumar, P. M., Ravikanth, G. and Shaanker, R. U.**, 2010, Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaeae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin, *Phytochemistry*, 71(1):17-122pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Sieber, S. A. and Marahiel, M. A., 2005,** Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics, *Chem Rev.*, 105:715-738pp.
- Singh, S. B., Ondeyka, J. G., Tsipouras, N., Ruby, C., Sardana, V., Schulman, M. and Olsen, D. B., 2004,** Hinnuliquinone, a C 2-symmetric dimeric non-peptide fungal metabolite inhibitor of HIV-1 protease, *Biochemical and biophysical research communications*, 324(1): 108-113pp.
- Specian, V., Sarragiotto, M. H., Pamphile, J. A. and Clemente, E., 2012,** Chemical characterization of bioactive compounds from the endophytic fungus *Diaporthe helianthi* isolated from *Luehea divaricata*, *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3):1174-1182pp.
- Sreekanth, D., 2008,** Secondary metabolites from endophytic fungi: isolation, purification, characterization and bioassay. Doktora Tezi, University of Pune Hindistan
- Sreekanth, D., 2008,** Secondary Metabolites From Endophytic Fungi: Isolation, Purification, Characterization and Bioassay. Doktora Tezi, University of Pune Hindistan.
- Staniek, A., Woerdenbag, H.J. and Kayser, O., 2008,** Endophytes:exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery,*J.Plant Interact*, 3,75–93pp.
- Stierle, A. A., Stierle, D. B. and Bugni, T., 1999,** Sequoiatones A and B: novel antitumor metabolites isolated from a redwood endophyte., *The Journal of organic chemistry*, 64(15):5479-5484p.
- Stierle, A., Strobel, G.A. and Stierle, D., 199,** Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew, *Science* 260, 214–216pp.
- Stinson, M., Ezra, D., Hess, W. M., Sears, J. and Strobel, G., 2003,** An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds, *Plant Science*, 165(4):913-922pp.
- Strobel, G. A. and Daisy, B., 2003,** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products, *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 491–502pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Strobel, G. A., Miller, R. V., Martinez-Miller, C., Condrón, M. M., Teplow, D. B. and Hess, W. M.,** 1999, Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *Quercina*, *Microbiology*, 145(8):1919-1926pp.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. and Harper, J.,** 2004, Natural products from endophytic microorganisms, *Journal of Natural products*, 67(2):257-268pp.
- Strobel, G., Ford, E., Worapong, J., Harper, J. K., Arif, A. M., Grant, D. M. and Chau, R. M. W.,** 2002, Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities, *Phytochemistry*, 60(2):179-183pp.
- Strobel, G., Li, J. Y., Sugawara, F., Koshino, H., Harper, J. and Hess, W. M.,** 1999, Oocydin A, a chlorinated macrocyclic lactone with potent anti-oomycete activity from *Serratia marcescens*, *Microbiology*, 145(12), 3557-3564pp.
- Sturz, A. V., Christie, B. R. and Nowak, J.,** 2000, Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production, *Critical reviews in plant sciences*, 19(1):1-30pp.
- Sturz, A., and Kimpinski, J.,** 2004, Endoroot bacteria derived from marigolds (*Tagetes* spp.) can decrease soil population densities of rootlesion nematodes in the potato root zone, *Plant Soil*, 262, 241-249pp.
- Suffness, M.,**1995, *Taxol: science and applications* (Vol. 22), CRC press.
- Surette, M. A., Sturz, A. V., Lada, R. R. and Nowak, J.,** 2003, Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth, *Plant and soil*, 253(2):381-390pp.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S.,** 2011, MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol Biol Evol.*, 28:2731-2739pp.
- Tan, R. X. and Zou, W. X.,** 2001, Endophytes: a rich source of functional metabolites, *Natural product reports*, 18(4):448-459pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Tejesvi, M.V., Nalini, M.S., Mahesh, B., Prakash, H.S., Kini, K.R., Shetty, H.S. and Subbiah, V.,** 2007, New hopes from endophytic fungal secondary metabolites, *Boletín de la Sociedad Química de México* 1(1):19–26pp.
- Tenguria, R. K., Khan, F. N. and Quereshi, S.,** 2011, Endophytes-mines of pharmacological therapeutics, *World Journal of Science and Technology*, 1(5):127-149pp.
- Tong, Y., Luo, J.G., Wang, R., Wanh, X.B., Kong, L.Y.,** 2012. New cyclic peptides with osteoblastic proliferative activity from *Dianthus superbus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 1908–1911pp.
- Tsitsigiannis, D. I. and Keller, N. P.,** 2007, Oxylipins as developmental and host–fungal communication signals, *Trends in microbiology*, 15(3):109-118pp.
- Ugulu, I.,** 2011, Traditional ethnobotanical knowledge about medicinal plants used for external therapies in Alasehir, Turkey, *Int. J. Med. Arom. Plants*, 1(2), 101-106pp.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J.,** 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The international journal of biochemistry and cell biology*, 39(1):44-84pp.
- Vessey, J. K.,** 2003, Plant growth promoting rhizobacteria as bio fertilizers, *Plant and Soil*, 255:571-586pp.
- Wall, M. E., Wani, M. C., Cook, C. E., Palmer, K. H., McPhail, A. A. and Sim, G. A.,** 1966, Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *camptotheca acuminata*1, 2, *Journal of the American Chemical Society*, 88(16):3888-3890pp.
- Walsh, T. J.,** 1992, Invasive fungal infections: problems and challenges for developing new antifungal compounds, In *Emerging Targets in Antibacterial and Antifungal Chemotherapy*, Springer US, 349-373pp.
- Wardecki, T., Brötz, E., De Ford, C., von Loewenich, F. D., Rebets, Y., Tokovenko, B. and Merfort, I.,** 2015, Endophytic *Streptomyces* in the

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

traditional medicinal plant *Arnica montana* L.:secondary metabolites and biological activity, *Antonie van Leeuwenhoek*, 108(2):391-402pp.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. and Taylor, J. L., 1990, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1):315-322pp.

Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Panphut, W., Thongon, N., Danwisetkanjana, K., Ruangrunsi, N. and Meevootisom, V., 2004, Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World journal of microbiology and biotechnology*, 20(3):265-272pp.

Wolf, A., Fritze, A., Hagemann, M. And Berg, G., 2002, *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(6):1937-1944pp.

Xu, L., Zhou, L., Zhao, J., Li, J., Li, X. and Wang, J., 2008, Fungal endophytes from *Dioscorea zingiberensis* rhizomes and their antibacterial activity, *Letters in applied microbiology*, 46(1):68-72pp.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı: TAN

Adı: Ezgi

E-mail: tan_ezgi@hotmail.com

Doğum tarihi: 25.05.1990

Doğum Yeri: Konak

EĞİTİM

İlkokul: Cengiz Han İlköğretim Okulu (1997-2004)

Lise: Eşrefpaşa Lisesi YDAL (2004 – 2008)

Lisans : Ege Üni., Fen Fak., Biyoloji Böl., Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji A.B.D. (2009 – 2014)

Yüksek Lisans : Ege Üni., Fen Fak., Biyoloji Böl., Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji A.B.D. (2015 – 2018)

Yüksek Lisans Tezi

Dianthus erinaceus Boiss. var. *erinaceus* Bitkisinden Endofitik Mikroorganizmaların İzolasyonu, Tanımlanması ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi