T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FATMA ANA ELİ BİTKİSİNİN BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE BİTKİ PATOJENLERİNE KARŞI ANTİFUNGAL ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

Ece AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Sevgi MARAKLI

Şubat, 2026

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FATMA ANA ELİ BİTKİSİNİN BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE BİTKİ PATOJENLERİNE KARŞI ANTİFUNGAL ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

Ece AYDIN tarafından hazırlanan tez çalışması 13.02.2026 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sevgi MARAKLI
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Sevgi MARAKLI, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Gözde YÜZBAŞIOĞLU, Üye
İstanbul Arel Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Sevgi MARAKLI sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Fatma Ana Eli Bitkisinin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi ve Bitki Patojenlerine Karşı Antifungal Etkilerinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Ece AYDIN

Aileme

ve

Sevdiklerime

TEŞEKKÜR

Lisansüstü tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimleriyle her aşamada yol gösteren, bilimsel bakış açısını bana kazandıran ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Sevgi MARAKLI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesi süreçlerinde değerli katkıları, yapıcı eleştirileri ve her zaman ulaşılabilir olmalarıyla bana büyük destek sağlayan Arş. Gör. Özlem SEFER ve Arş. Gör. Şener ÇİNTESUN'a içtenlikle teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, sabırları ve anlayışlarıyla beni motive eden aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu zorlu süreçte moral ve motivasyon kaynağım olan; destekleri, dostlukları ve paylaşımlarıyla yanımda bulunan Deniz ERTEKİN, Mehmet Mensur KARPUZ, Barış GÜL başta olmak üzere tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ece AYDIN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ viii

KISALTMA LİSTESİ ix

ŞEKİL LİSTESİ xi

TABLO LİSTESİ xiii

ÖZET xiv

ABSTRACT xvi

1 GİRİŞ 1

1.1 Literatür Taraması ... 1

1.2 Tezin Amacı ... 2

1.3 Hipotez ... 2

2 GENEL BİLGİLER 4

2.1 Fatma Ana Eli (*Anastatica hierochuntica* L.) ... 4

2.2 Bitki Sekonder Metabolitleri ... 5

2.2.1 Fenolikler ... 6

2.2.2 Flavonoidler ... 7

2.3 *Fusarium* cinsi funguslar ... 7

2.3.1 *Fusarium graminearum* ... 8

2.3.2 *Fusarium culmorum* ... 9

2.3.3 *Fusarium* Türlerinde Virülans, Stres Yanıtı ve Sekonder Metabolizmanın Düzenlenmesi ile İlgili Genler ... 10

3 MATERYAL VE METOT 13

3.1 Bitki Ekstraktının Hazırlanması ... 13

3.2 Bitki Ekstraktının Biyokimyasal ve Metabolomik Analizleri 14
3.2.1 Total Fenolik İçerik Analizi 14
3.2.2 Total Flavonoid İçerik Analizi 15
3.2.3 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) 15
3.2.4 Antioksidan Kapasitesi 16
3.3 *In vitro* Antifungal Özelliğin Belirlenmesi 18
3.4 Moleküler Analizler 19
3.4.1 Total RNA İzolasyonu 20
3.4.2 cDNA Sentezi 21
3.4.3 Gen Anlatım Analizleri 22
4 BULGULAR **24**
4.1 Bitki Ekstraktının Hazırlanması 24
4.2 Bitki Ekstraktının Total Fenolik ile Total Flavonoid İçeriği ve HPLC Analizi 25
4.2.1 Total Fenolik İçerik Analizi 25
4.2.2 Total Flavonoid İçerik Analizi 26
4.2.3 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) 28
4.2.4 Antioksidan Kapasitesi 30
4.3 *In vitro* Antifungal Özelliğin Belirlenmesi 34
4.3.1 *Fusarium graminearum* 35
4.3.2 *Fusarium culmorum* 40
4.4 Moleküler Analizler 45
4.4.1 Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi 45
4.4.2 Gen Anlatım Analizleri 45
5 SONUÇ **59**
KAYNAKÇA **71**

EK A **86**

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **92**

SİMGE LİSTESİ

+	Artı
>	Büyüktür
Δ	Delta
−	Eksi
=	Eşittir
g	Gram
<	Küçüktür
L	Litre
µ	Mikro
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
±	Standart Sapma
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

AAE	Askorbik Asit Eşdeğeri
ABTS	2,2′-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
$AlCl_3$	Alüminyum Klorür
CH_3CO_2K	Potasyum Asetat
CHS	Kalkon Sentaz
CWDE	Hücre Duvarı Parçalayıcı Enzimler
DON	Deoksinivalenol
DPPH	2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
EC_{50}	Büyüme Engelleyici %50 Etkin Konsantrasyon
FHB	Fusarium Başak Yanıklığı
FRR	Fusarium Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
H_2S	Hidrojen Sülfür
HAT	Histon Asetiltransferaz
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IC_{50}	%50 İnhibisyon Konsantrasyonu
KE	Kuersetin Eşdeğeri
MAPK	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
MFC	Minimum Fungisidal Konsantrasyon
MeJA	Metil Jasmonat
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B

NIV	Nivalenol
Nrf2	Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2
PAL	Fenilalanin Amonyak Liyaz
PDA	Patates Dekstroz Agar
PI3K/AKT	Fosfatidilinozitol-3-Kinaz / Protein Kinaz B Sinyal Yolu
RNA	Ribonükleik Asit
RNS	Reaktif Azot Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RSA	Radikal Süpürme Aktivitesi
SA	Salisilik Asit
SET	Tek Elektron Transferi
SPLET	Sıralı Proton Kaybı Elektron Transferi
TPC	Total Fenolik İçerik
TFC	Total Flavonoid İçeriği
TRI	Trikotesen Biyosentez Genleri
UV	Ultraviyole
ZEN	Zearalenon

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.1 *A. hierochuntica* bitkisinden toz ekstrakt eldesi **24**

Şekil 4.2 Gallik asit standart eğrisi **25**

Şekil 4.3 *A. hierohuntica* ekstraktının total fenolik içerik analizinde konsantrasyona bağlı absorbans değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi **26**

Şekil 4.4 Kuersetin standart eğrisi **27**

Şekil 4.5 *A. hierohuntica* ekstraktının total fenolik içerik analizinde konsantrasyona bağlı absorbans değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi **28**

Şekil 4.6 Ticari standart fenolik bileşik karışımına ait HPLC kromatogramı **29**

Şekil 4.7 *A. hierochuntica* ekstraktına ait HPLC kromatogramı **29**

Şekil 4.8 DPPH için askorbik asit standart eğrisi **31**

Şekil 4.9 *A. hierochuntica* ekstraktının DPPH serbest radikal süpürücü aktivitesinde konsantrasyona bağlı değişimin istatistiksel değerlendirilmesi **32**

Şekil 4.10 ABTS için askorbik asit standart eğrisi **33**

Şekil 4.11 *A. hierochuntica* ekstraktının ATBS serbest radikal süpürücü aktivitesinde konsantrasyona bağlı değişimin istatistiksel değerlendirilmesi **34**

Şekil 4.12 *A. hierochuntica* ekstraktı uygulanmış 4 günlük *F. graminearum* kültürleri **35**

Şekil 4.13 *A. hierochuntica* ekstraktı uygulanmış 7 günlük *F. graminearum* kültürleri **35**

Şekil 4.14 *F. graminearum*'un *A. hierochuntica* ekstraktına karşı doz-yanıt grafiği **36**

Şekil 4.15 *A. hierochuntica* ekstraktının farklı konsantrasyonlarının *F. graminearum'un* büyümesi üzerindeki etkisi **37**

Şekil 4.16 Talendo uygulanmış 4 günlük *F. graminearum* kültürleri **37**

Şekil 4.17 Talendo uygulanmış 7 günlük *F. graminearum* kültürleri **38**

Şekil 4.18 *F. graminearum*'un Talendo'ya karşı doz-yanıt grafiği **38**

Şekil 4.19 Talendo'nun farklı konsantrasyonlarının *F. graminearum*'un büyümesi üzerindeki etkisi **39**

Şekil 4.20 *A. hierochuntica* ekstraktı uygulanmış 4 günlük *F. culmorum* kültürleri **40**

Şekil 4.21 *A. hierochuntica* ekstraktı uygulanmış 7 günlük *F. culmorum* kültürleri **40**

Şekil 4.22 *F. culmorum*'un *A. hierochuntica* ekstraktına karşı doz-yanıt grafiği . **41**

Şekil 4.23 *A. hierochuntica* ekstraktının farklı konsantrasyonlarının *F. culmorum*'un büyümesi üzerindeki etkisi **42**

Şekil 4.24 Talendo uygulanmış 4 günlük *F. culmorum* kültürleri..... **42**

Şekil 4.25 Talendo uygulanmış 7 günlük *F. culmorum* kültürleri..... **43**

Şekil 4.26 *F. culmorum*'un Talendo'ya karşı doz-yanıt grafiği **43**

Şekil 4.27 Talendo'nun farklı konsantrasyonlarının *F. culmorum*'un büyümesi üzerindeki etkisi **44**

Şekil 4.28 Total RNA izolasyonu için agaroz jel elektroforez analizi **45**

Şekil 4.29 *F. graminearum* izolatında *CAT* genine ait gen anlatım **47**

Şekil 4.30 *F. graminearum* izolatında *hog1* genine ait gen anlatım düzeyleri..... **48**

Şekil 4.31 *F. culmorum* izolatında *hog1* genine ait gen anlatım düzeyleri **50**

Şekil 4.32 *F. graminearum* izolatında *mst20* genine ait gen anlatım düzeyleri **51**

Şekil 4.33 *F. culmorum* izolatında *mst20* genine ait gen anlatım düzeyleri..... **53**

Şekil 4.34 *F. graminearum* izolatında *atg5* genine ait gen anlatım düzeyleri..... **54**

Şekil 4.35 *F. culmorum* izolatında *atg5* genine ait gen anlatım düzeyleri **55**

Şekil 4.36 *F. graminearum* izolatında *stuA* genine ait gen anlatım düzeyleri..... **57**

Şekil 4.37 *F. culmorum* izolatında *stuA* genine ait gen anlatım düzeyleri **58**

Şekil Ek A.1 *F. graminearum*'da *btub* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği **86**

Şekil Ek A.2 *F. graminearum*'da *CAT* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği **86**

Şekil Ek A.3 *F. graminearum*'da *hog1* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği **87**

Şekil Ek A.4 *F. graminearum*'da *mst20* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği **87**

Şekil Ek A.5 *F. graminearum*'da *atg5* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği **88**

Şekil Ek A.6 *F. graminearum*'da *stuA* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği **88**

Şekil Ek A.7 *F. culmorum*'da *btub* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği..... **89**

Şekil Ek A.8 *F. culmorum*'da *hog1* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği.... **89**

Şekil Ek A.9 *F. culmorum*'da *mst20* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği .. **90**

Şekil Ek A.10 *F. culmorum*'da *atg5* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği... **90**

Şekil Ek A.11 *F. culmorum*'da *stuA* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği... **91**

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 HPLC koşulları **16**
Tablo 3.2 cDNA sentezinde kullanılan bileşenler..... **21**
Tablo 3.3 cDNA sentezi reaksiyon koşulları **21**
Tablo 3.4 Primer dizileri **22**
Tablo 3.5 qRT-PCR için kullanılan bileşenler..... **23**
Tablo 3.6 qRT-PCR koşulları **23**
Tablo 4.1 *A. hierochuntica* ekstraktında tespit edilen fenolik bileşikler ve ortalama miktarları..... **30**

ÖZET

Fatma Ana Eli Bitkisinin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi ve Bitki Patojenlerine Karşı Antifungal Etkilerinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi

Ece AYDIN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı
Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Sevgi MARAKLI

Çöl bitkileri, zorlu çevresel koşullara adaptasyon gösterirler ve sekonder metabolitler açısından zengindirler. Çalışmanın amacı, çöl bitkilerinden biri olan *A. hierochuntica* bitkisinden elde edilen ekstraktın biyokimyasal içeriğinin ve antioksidan kapasitesinin belirlenmesi, *in vitro* antifungal etkinliğinin ve ilişkili genlerin anlatımlarının analiz edilmesidir. Bitki ekstraktı, %50 izopropanol çözücü sistemi kullanılarak maserasyon yöntemiyle elde edilmiştir (verim %3.7). Total fenolik içerik, Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiştir (92.80 mg GAE/g). Total flavonoid içerik, $AlCl_3$ yöntemiyle saptanmıştır (7.44 mg KE/g). Sonuçlar, konsantrasyona bağlı olarak anlamlı biçimde artmıştır ($p<0.0001$). HPLC analizlerinde toplam 11 sekonder metabolit belirlenmiştir. Ekstraktta en fazla kafeik asit, polidatin ve kuersetinin olduğu görülmüştür. Ekstraktın DPPH için IC_{50} değeri, 3.329 mg/mL ve ABTS için IC_{50} değeri, 2.447 mg/mL olarak belirlenmiştir. Ekstraktın antifungal etkinliği *Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum* üzerinde gıda zehirleme yöntemiyle incelenmiş, pozitif kontrol olarak Talendo kullanılmıştır. *F. graminearum*'da ekstraktın ve Talendo'nun MİK değerleri

sırasıyla 1,960 mg/mL ve 0.365 0.006 mg/mL; *F. culmorum*'da ise 2.444 mg/mL ve 0.455 mg/mL olarak belirlenmiştir. Her iki patojende de konsantrasyona bağlı anlamlı inhibisyon gözlenmiştir ($p<0.0001$). Stres yanıtı (*hog1, mst20*), otofaji (*atg5*), gelişim ve morfogenez (*stuA*) ile oksidatif stres (*CAT*) ile ilişkili genlerin anlatımı qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Kontrolle kıyaslandığında; *CAT* anlatımı ekstrakt uygulamasının yapıldığı *F. graminearum* kültürlerinde 13 kat, Talendo uygulamasının yapıldığı kültürlerde ise 16 kat artmıştır. *hog1* anlatımı, ekstrakt uygulamasının yapıldığı *F. graminearum* kültürlerinde 3.7 kat, Talendo uygulamasının yapıldığı kültürlerde ise 6.3 kat artmıştır. *mst20* anlatımı, ekstrakt uygulamasının yapıldığı *F. graminearum* kültürlerinde 4.8 kat, Talendo uygulamasının yapıldığı kültürlerde ise 3.8 kat artmıştır. *F. culmorum*'da bu genin anlatımının 2.3 kat arttığı, Talendo uygulamasının yapıldığı kültürlerde ise azaldığı belirlenmiştir. *atg5* ve *stuA* genlerinin anlatımları incelendiğinde her iki fungusta da farklı sonuçlar elde edilmiştir ($p<0.0001$). Elde edilen bulgular, *A. hierochuntica* ekstraktının tarım ve bitki koruma uygulamalarında doğal, çevre dostu ve alternatif bir antifungal ajan olarak değerlendirilme potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Anastatica hierochuntica*, fenolik bileşikler, antioksidan aktivite, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*

ABSTRACT

Determination of the Biochemical Properties of Fatima Ana Hand Plant and Molecular Analysis of Its Antifungal Properties Against Plant Pathogens

Ece AYDIN

Department of Molecular Biology and Genetics
Molecular Biology and Genetics Program
Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Sevgi MARAKLI

Desert plants are adapted to harsh environmental conditions and are rich in biologically active secondary metabolites. The aim of this study is to determine the biochemical content and antioxidant capacity of the extract obtained from the desert plant *A. hierochuntica*, and to analyze its *in vitro* antifungal activity and the expression of related genes. The extract was obtained by maceration using a 50% isopropanol solvent system, yielding 3.7%. Total phenolic content was determined by the Folin–Ciocalteu method (92.80 mg GAE/g) and total flavonoid content by the $AlCl_3$ method (7.44 mg KE/g), both showing significant concentration-dependent increases ($p<0.0001$). HPLC analysis identified 11 secondary metabolites, with caffeic acid, polydatin, and quercetin as the predominant compounds. The IC_{50} values were 3.329 mg/mL for DPPH and 2.447 mg/mL for ABTS assays. Antifungal activity was assessed against *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* using the food poisoning method, with Talendo as the positive control. The MIC values of the extract and Talendo were 1.960 mg/mL and 0.365 mg/mL for *F. graminearum*, and 2.444 mg/mL and 0.455 mg/mL for *F. culmorum*,

respectively, with significant concentration-dependent inhibition observed in both pathogens ($p<0.0001$). Gene expression related to stress response (*hog1*, *mst20*), autophagy (*atg5*), development and morphogenesis (*stuA*), and oxidative stress (*CAT*) was analyzed by qRT-PCR. Compared to controls, *CAT* expression increased 13-fold in extract-treated and 16-fold in Talendo-treated *F. graminearum* cultures. *hog1* expression increased 3.7-fold in extract-treated and 6.3-fold in Talendo-treated *F. graminearum* cultures, while mst20 expression increased 4.8-fold and 3.8-fold, respectively. In *F. culmorum*, *mst20* expression increased 2.3-fold following extract treatment but decreased in Talendo treated cultures. When the expression of the *atg5* and *stuA* genes was examined, different results were obtained in both fungi. ($p<0.0001$). These results indicate that *A. hierochuntica* extract has strong potential as a natural and environmentally friendly antifungal agent for agricultural applications.

Keywords: *Anastatica hierochuntica*, phenolic compounds, antioxidant activity, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Taraması

Fatma Ana Eli bitkisi (*Anastatica hierochuntica* L.), kurak ve ekstrem çevre koşullarına uyum sağlamış, Orta Doğu ve Kuzey Afrika kökenli bir çöl bitkisi olup, geleneksel tıpta uzun süredir farklı amaçlarla kullanılan biyolojik açıdan dikkat çekici bir türdür. Bitki, zengin sekonder metabolit profili sayesinde son yıllarda fitokimyasal ve farmakolojik çalışmaların odağı haline gelmiştir [1]. *A. hierochuntica*'nın ekstrem koşullara adaptasyonu, fenilpropanoidler ve flavonoidler başta olmak üzere çeşitli fenolik bileşiklerin sentezini destekleyen geniş bir metabolik ağ ile ilişkilendirilebilir [2].

Fenolik bileşikler ve flavonoidler, bitkilerde fenilpropanoid yolak üzerinden sentezlenen ve antioksidan, antimikrobiyal ve savunma yanıtlarında önemli rol oynayan sekonder metabolitlerdir. Bu bileşikler, aromatik halka yapıları ve hidroksil grupları sayesinde reaktif oksijen türlerini (ROS) nötralize edebilme kapasitesine sahiptir [3]. *A. hierochuntica* ekstraktları üzerinde yapılan çalışmalarda, toplam fenolik ve flavonoid içeriklerin yüksek olduğu ve bu içeriğin radikal süpürme yöntemleriyle ölçülen güçlü antioksidan aktivitelerle pozitif korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir [4, 5].

Antioksidan özelliklerin yanı sıra, *A. hierochuntica* ekstraktlarının antifungal potansiyeli de çeşitli *in vitro* çalışmalarla ortaya konmuştur. Özellikle sulu ve alkolik ekstraktların farklı fungal patojenler üzerinde büyüme inhibisyonu oluşturduğu, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimum fungisidal konsantrasyon (MFC) değerleri ile desteklenmiştir [6]. Fenolik ve flavonoid bileşiklerin antifungal etkilerinin; hücre zarının bütünlüğünü bozma [7], ergosterol

biyosentezini etkileme [8] ve hücre içi oksidatif dengenin değişmesine [9] neden olma gibi mekanizmalar üzerinden gerçekleştiği bildirilmiştir.

Bununla birlikte, *A. hierochuntica*'nın antifungal etkilerini moleküler düzeyde ele alan çalışmalar sınırlıdır ve mevcut literatür ağırlıklı olarak fenotipik büyüme inhibisyonu üzerine odaklanmıştır. Ancak, yalnızca patojen büyümesinin baskılanmasının değil, aynı zamanda hedef organizmada stres yanıtı, gelişim ve hücresel homeostaz ile ilişkili gen anlatım değişimlerinin de değerlendirilmesi gerekli olduğu belirtilmektedir [10]. Bu kapsamda oksidatif stres yanıtı, mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal yolakları ve otofaji mekanizmaları, bitkisel ekstraktların antifungal etki mekanizmalarının aydınlatılmasında önemli moleküler hedefler olarak öne çıkmaktadır [11].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı; *Anastatica hierochuntica* bitkisinden elde edilen ekstraktın ayrıntılı biyokimyasal içerik analizlerinin (toplam fenolik madde içeriği, toplam flavonoid içeriği, HPLC analizi ve antioksidan kapasite) yapılması, *Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum* fungusları üzerindeki *in vitro* antifungal etkilerinin belirlenmesi ve bu antifungal etkinin moleküler düzeyde (*hog1*, *mst20*, *atg5*, *stuA*, *CAT* genleri) incelenmesidir.

1.3 Hipotez

Anastatica hierochuntica, geleneksel kullanım alanları ve biyolojik potansiyeli nedeniyle son yıllarda fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışmaları açısından dikkat çeken bir bitkidir. Bu çalışmada, *A. hierochuntica* ekstraktının yüksek fenolik ve flavonoid içeriğe sahip olduğu, buna bağlı olarak belirgin bir antioksidan aktivite sergilediği ve önemli fitopatojenler arasında yer alan *Fusarium graminearum* ile *Fusarium culmorum* üzerinde antifungal etki göstereceği öngörülmektedir. Ayrıca ekstrakt uygulamalarının *Fusarium* türlerinde oksidatif stres ve hücresel yanıtlarla ilişkili genlerin anlatım düzeylerini anlamlı şekilde değiştirebileceği ve bu etkinin funguslarda stres yanıtı, gelişimsel süreçler ve otofaji mekanizmaları ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Elde edilen bulguların, *Anastatica hierochuntica* ekstraktının antifungal etkilerini moleküler düzeyde

aydınlatarak, bitkilerden türetilmiş yeni antifungal bileşiklerin geliştirilmesine katkı sağlaması beklenmektedir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Fatma Ana Eli (*Anastatica hierochuntica* L.)

Şifalı bitkiler, binlerce yıldır insan sağlığını desteklemek ve çeşitli hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır. Antik çağlardan bu yana farklı kültürler, doğanın sunduğu bu bitkileri ilaç, gıda ve koruyucu tedavi yöntemleri olarak değerlendirmiştir. Modern tıp ve bilim, geleneksel bitkisel tedavilerin etkinliğini araştırarak birçok bitkinin sağlık üzerindeki olumlu etkilerini doğrulamış ve bu alanı genişletmiştir [12, 13]. Günümüzde hem geleneksel hem de modern tıpta doğal çözümler sunan şifalı bitkiler, sağlık ve yaşam kalitesini artırmak için önemli bir kaynak olmaya devam etmektedir [14, 15].

Anastatica hierochuntica, yaygın adıyla Gerçek Jericho Gülü veya Türkiye'de çoğunlukla Fatma Ana Otu olarak bilinen, *Brassicaceae* (turpgiller) ailesine ait tek türden oluşan bir çöl bitkisidir [16, 17]. Küçük, gri renkli, yıllık bir bitki olup genellikle 15 cm'den daha kısa boyda büyür ve küçük beyaz çiçekler açar. Kuraklık dönemlerinde dallarını içe doğru kıvırarak top şeklini alır ve nemle temas ettiğinde tekrar açılır. Bu özellik, tohumlarını koruyarak uzun süreli kuraklıklara dayanmasını sağlar [18]. Bu bitkinin genomu, model bir bitki olan *Arabidopsis thaliana* bitkisinin genomundan yaklaşık 4,5 kat daha büyüktür (2n=22) [19].

Coğrafi olarak, *A. hierochuntica* Batı Asya'nın kurak bölgelerine özgüdür ve İsrail, Mısır, Suudi Arabistan, İran, Irak, Ürdün ve Pakistan gibi ülkelerde bulunur. Bu bitki, özellikle yağış dönemlerinde suyu toplayan kuru kanallar veya vadi yatakları gibi mikrohabitatlarda yetişir [17]. Yüksek sıcaklık, düşük azot ve tuzluluk gibi çöl ortamlarının zorlu koşullarına karşı tolerans gösterir [1, 19]. *A. hierochuntica*, çöl ortamlarında hayatta kalma stratejileri ve stres toleransı üzerine yapılan araştırmalarda model bir organizma olarak çeşitli çalışmalarda kullanılmaktadır [20].

A. hierochuntica, özellikle köklerinden elde edilen bileşenler ve pigmentiyle kozmetik, gıda ve tıbbi alanlarda kullanılır. Bu bakımdan saç ve cilt bakım ürünlerinde doğal renklendirici ve nemlendirici olarak yer almaktadır [21, 22]. Ayrıca, yara iyileştirici [23], antibakteriyel [24], antifungal [6] ve antiinflamatuar [25] özellikleri sayesinde cilt hastalıklarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Geleneksel tıpta da yanıklar, egzama ve açık yaraların tedavisinde etkili olduğu, menstrüel sancılar ve doğum sürecinin kolaylaştırılması amacıyla kullanıldığı bilinmektedir [26].

2.2 Bitki Sekonder Metabolitleri

Bitki sekonder metabolitleri; hücresel ve moleküler düzeyde savunma, stres yanıtı ve ekolojik etkileşimlerde kritik rol oynayan bileşiklerdir [27, 28]. Bu metabolitler; enzimler, reseptörler ve patojenler gibi biyolojik hedeflerle doğrudan etkileşerek fizyolojik süreçleri düzenler [29, 30]. Bu metabolitler, güçlü antioksidan özellikler sergileyerek ROS'u doğrudan nötralize eder, pro-oksidan metalleri etkisizleştirir ve endojen savunma sistemlerine ait transkripsiyonel ağları aktive eder [29, 31]. Bu mekanizmalar; hidrojen atomu transferi (HAT), tek elektron transferi (SET) ve ardışık proton kaybı-elektron transferi (SPLET) yolakları üzerinden işler [5, 32].

Sekonder metabolitler; azot içeren alkaloidler, izopren türevi terpenoidler, fenilpropanoid kökenli fenolikler ve organosülfür bileşikleri gibi başlıca sınıflara ayrılır ve şikimat, mevalonat veya metil-eritritol fosfat gibi farklı biyosentetik yolaklar üzerinden sentezlenirler [33, 34]. Biyosentezleri, asetil-KoA veya amino asitler gibi primer metabolitlerle başlar. Stresle indüklenen transkripsiyon faktörleri, fenolikler için fenilalanin amonyak liyaz (PAL) ya da terpenoidler için terpen sentazlar gibi anahtar enzimlerin anlatımlarını arttırır [35, 36]. Salisilik asit (SA) veya metil jasmonat (MeJA) gibi elisitörler de ROS sinyallerinin oluşumunu tetikleyerek biyotik veya abiyotik uyarılara yanıt olarak metabolit birikimini arttırır [37, 38].

Sekonder metabolitler, patojen hücre duvarlarını bozarak veya mikrobiyal enzimleri inhibe ederek antimikrobiyal ajanlar olarak görev yapar. Örneğin bazı alkaloidler, bakteriyel ribozomlara bağlanarak protein sentezini durdurur [39]. Fenolikler ve flavonoidler, bakteriyel ve fungal patojenlere karşı bitki savunmasını güçlendiren, birbirinden farklı ancak kısmen örtüşen moleküler mekanizmalar

aracılığıyla etki gösterir [31, 40]. Fenolik bileşikler, proton transferi ve kovalent modifikasyonlar yoluyla mikrobiyal membranları ve enzimleri bozarken; flavonoidler, nükleik asitleri ve sterol biyosentez yolaklarını yüksek özgüllükle hedef alır [41, 42]. Bu etkiler, konakçıya ait sinyal yolaklarıyla bütünleşerek fiziksel bariyerlerin güçlenmesini ve indüklenebilir savunma yanıtlarının artmasını sağlar [43]. Bununla birlikte flavonoidler ve fenolikler, kuraklık veya UV maruziyetine bağlı oksidatif stres sırasında ROS'u süpüren antioksidanlar olarak işlev görür. Ayrıca, süperoksit dismutaz ve katalazın anlatımlarını arttıran yolaklar aracılığıyla membran stabilitesini korur ve fotosentetik verimliliği sürdürür [44, 45]. Terpenoidler ise böcek sinir sistemleri üzerindeki nörotoksik etkilerle herbivorları uzaklaştırır veya uçucu sinyaller yoluyla tozlayıcıları çekerek etkileşimleri düzenler. Ayrıca, terpenoidler saldırılar sırasında jasmonik asit üretimini de arttırabilir [46, 47].

Tuzluluk veya ağır metal gibi abiyotik stresler altında bitkiler, ozmotik dengeyi sürdürmek ve glutatyon yolakları aracılığıyla ROS'u detoksifiye etmek üzere flavonoidler ve prolinle ilişkili metabolitleri biriktirir [48]. Mikroorganizma kökenli elisitörler, MAPK yolaklarını aktive ederek sekonder metabolitlerde artışa yol açar. Bu durum rizosfer mikrobiyomlarını düzenler ve simbiyotik sinyalleşmeyi güçlendirir [49, 50]. Nitrik oksit ve hidrojen sülfür de *PAL* ve kalkon sentaz (*CHS*) gibi genlerin anlatımlarını düzenleyerek, büyümeyi olumsuz etkilemeden dayanıklılığı artıracak şekilde fenolik birikimini teşvik eder [51, 52].

2.2.1 Fenolikler

Fenolik bileşikler, bitki sekonder metabolitlerinin sınıflarından biri olup; flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler ve tanenler gibi çeşitli bileşikleri kapsar. Hücresel ile moleküler düzeyde antioksidan, antiinflamatuar ve antikanser özellikleriyle tanınır [31, 53]. Bu moleküller, ROS süpürme, anahtar enzimleri inhibe etme ve Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB) ile MAPK gibi sinyal yolaklarını düzenleme yoluyla biyolojik süreçleri modüle eder [54-56]. 2025 yılına ait güncel araştırmalar fenoliklerin; hücresel hedeflerle özgül etkileşimleri aracılığıyla inflamasyon, nörodejenerasyon ve kanser tedavisinde önemli bir terapötik potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır [57-59].

Fenolikler, başlıca şikimat ve fenilpropanoid yolaklarından köken alır. Bu süreçte fenilalanin ve tirozin öncülleri, PAL başta olmak üzere çeşitli enzimatik dönüşümlerden geçerek fenolik asitler ve flavonoidleri oluşturur [33, 35]. CHS ve glikoziltransferazlar gibi enzimler, yapı çeşitliliğini arttırarak vakuolde depolanmayı sağlar ve ROS sinyallemesi ile transkripsiyon faktörleri aracılığıyla strese bağlı birikimi destekler [2, 60]. Abiyotik stres koşulları, bu yolaklarda rol oynayan genlerin anlatımlarını tetikleyerek organel düzeyinde membran stabilizasyonu ve detoksifikasyon amacıyla fenolik üretimini arttırır [61, 63].

2.2.2 Flavonoidler

Flavonoidler; meyveler, sebzeler ve çaylarda bol miktarda bulunan polifenolik yapıda sekonder metabolitlerdir. İmmün hücreleri modüle etme, ROS süpürme ve NF-κB, nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) ile fosfoinozitid 3-kinaz (PI3K)/AKT gibi sinyal yolaklarını düzenleme yoluyla biyolojik düzeyde güçlü terapötik etkiler gösterirler [53, 55, 64]. Kuersetin, baikalin, apigenin ve luteolin gibi bileşikleri içeren bu grup; inflamasyon, oksidatif stres, apoptoz ve nörodejenerasyonu özgül moleküler etkileşimler aracılığıyla hedefler [42, 65]. Son yıllara ait güncel çalışmalar, flavonoidlerin immün düzenleme ve nöroproteksiyondaki rollerini vurgulamaktadır. Bununla birlikte flavonoidlerin gelişmiş taşıyıcı sistemlerin biyoyararlanımı artırarak klinik uygulamalara geçişi kolaylaştırdığını rapor eden araştırmalar da vardır [66, 67].

2.3 *Fusarium* cinsi funguslar

Fusarium, ağırlıklı olarak havada ve toprakta bulunan yaygın bir mantar grubudur. Bu mantarlar, hem saprofitik hem de parazit yaşam tarzına sahip olabilir, hızlı büyüme yeteneği, farklı çevresel koşullara adaptasyonu ve geniş bir konakçı yelpazesiyle tanınır [68]. *Fusarium* türleri, çok hücreli ve hilal şeklindeki makrokonidiler ve tek hücreli mikrokonidiler üretir [69]. Pembe, kırmızı, beyaz veya mor renklerde koloniler oluşturabilir. Birçok türü, bitki ve insan sağlığına zararlı fumonisin [70], trikotesen [71], zearalenon [72] gibi mikotoksinler üretir. *Fusarium* cinsine ait birçok tür bulunmaktadır, ancak tahıllar için yaygın görülen ve patojenik olanları *Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum* türleridir.

2.3.1 *Fusarium graminearum*

Fusarium graminearum, buğday ve arpada yıkıcı etkilere neden olan *Fusarium* başak yanıklığı (FHB) hastalığının başlıca etkenlerinden biridir. Bu hastalık, hem önemli ölçüde verim kaybına hem de tanelerin zararlı mikotoksinlerle kirlenmesine yol açarak ciddi gıda güvenliği sorununa neden olur [73]. Enfeksiyon genellikle çiçeklenme aşamasında başlar ve tane gelişimi süresince devam edebilir [74]. Bu süreçte, nekroz ve çiçek dokularında beyazlaşma olarak bilinen buruşuk, tebeşirimsi beyaz tanelerin oluşumu gibi tipik belirtiler ortaya çıkar [75].

F. graminearum, enfeksiyon sırasında hemibitotrofik bir yaşam tarzı sergiler. Önce canlı dokuları kolonize ederek biyotrofik evreyi, ardından konak hücrelerini öldürerek nekrotrofik evreyi başlatır. Patojenin enfeksiyonu, bitki yüzeyine konan sporların çimlenmesiyle başlar [76]. Epidermis dokusuna giriş, appressoryum gibi özelleşmiş yapılar aracılığıyla sağlanır. Bu yapılar, melaninle güçlendirilmiş olup kutikulayı fiziksel olarak delme yeteneğine sahip olabileceği gibi melanin içermeyen ve enzimatik bozunmaya dayalı giriş mekanizmalarıyla da işlev görebilir [76]. Bitki içine girdikten sonra, *F. graminearum* çok sayıda hücre duvarı parçalayıcı enzim (CWDE) salgılar. Bu enzimler arasında; pektinazlar, selülazlar, ksilanezler, proteazlar ve lipazlar yer alır. Bu enzimler, bitki hücre duvarlarını yıkarak dokuların istila edilmesini kolaylaştırır ve hastalığın ilerlemesini sağlar [77].

F. graminearum'un patojenitesinin en önemli unsurlarından biri, trikotesen grubundan deoksinivalenol (DON) ve zearalenon (ZEN) gibi mikotoksinlerin yanı sıra kulmorin gibi diğer ikincil metabolitleri üretebilme yeteneğidir [73]. Bu toksinler yalnızca ürünleri kontamine etmekle kalmaz, aynı zamanda bitki savunmasını baskılayarak hastalığın yayılmasına katkıda bulunur. Toksin biyosentezinden sorumlu genlerin, özellikle trikotesen ile ilişkili genlerin, enfeksiyon sırasında anlatımı artar ve sıkı şekilde düzenlenir [76].

Toksinlerin yanı sıra, *F. graminearum* aynı zamanda yüzlerce efektör protein salgılar. Bunların çoğu, küçük ve sistein açısından zengin proteinler olup, enfeksiyonun erken biyotrofik evresinde bitki bağışıklığını modüle eder, savunma mekanizmalarını baskılar ve nekrotrofik evrede hücre ölümünü tetikler [73, 77]. Transkriptomik çalışmalar bu efektör ve toksin genlerinin anlatımlarının,

enfeksiyon sırasında (özellikle mantarın aktif olarak konak dokularını istila ettiği bölgelerde) artacak şekilde düzenlendiğini ortaya koymuştur [76].

2.3.2 *Fusarium culmorum*

Fusarium culmorum, dünya genelinde önemli bir toprak kökenli fungal patojen olup, buğdayda FHB, kök ve kök boğazı çürüklüğü (FRR), fide yanıklığı ve başak çürüklüğü gibi birçok yıkıcı hastalığa neden olur [78, 79]. Patojen, özellikle Kuzey ve Batı Avrupa gibi daha serin ve ılıman bölgelerde yaygındır, ancak dünya genelinde ürünleri etkileyebilir [79]. Bazı diğer *Fusarium* türlerinin aksine, *F. culmorum* sadece eşeysiz olarak ürer, konidiler yoluyla yayılır ve klamidosporlar biçiminde toprakta ve bitki artıklarında yaşamını sürdürerek sezonlar arası kalıcılık sağlar [78].

Enfeksiyon süreci, havada taşınan veya sıçrayan konidilerin çiçeklenme dönemindeki duyarlı bitki dokularına ulaşmasıyla başlar [80]. Mantar, çiçek dokularını hızla kolonize eder, bitki hücrelerinin arasına ve içine sızarak yoğun misel ağları oluşturur. Sonuçta, nekroz oluşur [78]. Ayrıca kökleri ve alt sap kısımlarını da enfekte ederek FRR'ye neden olur [79]. Bu durum, su ve besin alımını engelleyerek bitki büyümesini sınırlar. *F. culmorum*, aynı zamanda hasat sonrası bir patojen olarak da önemlidir. Özellikle yeterince kurutulmamış veya uygun şekilde depolanmamış tahılları enfekte edebilir.

F. culmorum'un patojenitesinde kritik bir unsur, çeşitli mikotoksinleri sentezleyebilmesidir. Bu toksinler, tahılları kontamine ederek hem insan hem de hayvan sağlığı açısından önemli riskler oluşturur [78, 81]. Başlıca mikotoksinleri; tip B trikotesenler (özellikle DON, nivalenol (NIV) ve bunların asetillenmiş türevleri) ile ZEN ve fusarindir [81, 82]. DON, özellikle hastalık gelişiminde önemlidir, ökaryotik protein sentezini engeller ve apoptoza neden olur. Buğday ve arpada daha agresif hastalık fenotipleriyle ilişkilendirilir [81, 83]. DON, ısı veya etanol ile indüklenen programlanmış hücre ölümünü spesifik olarak engeller ve böylece fungal kolonizasyonu arttırır [84]. Buna karşılık DON-negatif mutantlar, programlanmış hücre ölümünü baskılayamadıkları için etkili biçimde yayılamaz [85]. NIV ve türevleri, *Chlamydomonas reinhardtii* ve arpa gibi model organizmalarda fitotoksisite göstererek büyümenin inhibisyonuna, kloroza ve kök uzunluğunda azalmaya neden olur. Detoksifikasyon ise glukoziltransferazlar

aracılığıyla gerçekleşir [86]. *Fusarium* kaynaklı ZEN ise doğrudan güçlü bir fitotoksisite göstermese de bitki-mantar etkileşimlerini modüle eder. *Metarhizium anisopliae* gibi endofitlerde sekonder metabolizmayı değiştirir ve konak sinyallemesini östrojenik etkilerle bozarak, dolaylı biçimde *Fusarium*'un stres yanıtlarına veya virülansına katkıda bulunabilir [87]. *Fusarinler* (örneğin, fusarin C), epoksit aracılı DNA hasarı ve mutajenite yoluyla *Fusarium*'un fitotoksisitesine katkı sağlar, ancak bitkilerdeki rolleri görece daha az çalışılmıştır. İlişkili bir toksin olan fusarik asit ise oksidatif stres, kaspaz-benzeri aktivasyon ve savunma genlerinin baskılanmasını tetikleyerek vasküler solgunluk virülansını arttırır [88-90]. Bu toksinler ile ilişkili genlerden *Tri7* gibi bazı genlerin varlığı, yokluğu ya da işlevselliği, izolatın hangi toksini üreteceğini belirler [91].

2.3.3 *Fusarium* Türlerinde Virülans, Stres Yanıtı ve Sekonder Metabolizmanın Düzenlenmesi ile İlgili Genler

Fusarium katalaz genleri, esas olarak katalaz-peroksidazları (KATG'ler) kodlar ve aktif bölgeleri aracılığıyla hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayarak bitki enfeksiyonu sırasında mantarı oksidatif strese karşı korur. *Fusarium graminearum* gibi fitopatojen türlerde iki paralog gen bulunur. *KatG1*, endojen veya konaktan kaynaklanmayan H_2O_2'yi detoksifiye ederken, *KatG2,* konak kaynaklı ROS'u hedefler [92]. Bu genler, mekânsal ve zamansal olarak düzenlenir. Özellikle nekrotrofik evrede *in planta* koşullarda anlatımları artar. Translasyon sonrasında N-glikozilasyon, KatG2'nin salgılanmasını ve konak-mantar arayüzünde birikimini sağlayarak hif penetrasyonu sırasında ROS süpürülmesine katkıda bulunur. *KatG2*'den yoksun mutantlar, H_2O_2'ye artmış duyarlılık, buğday ve mısırda azalmış invazyon yeteneği ve telafi edici *KatG1* artışı gösterir. Bu bulgular bitkinin oksidatif patlamasına karşı koymada *KatG2*'nin virülans için kritik rolünü ortaya koyar [92, 93].

Fusarium HOG1 (high osmolarity glycerol) geni, yüksek ozmolariteli gliserol sinyal yolunun merkezinde yer alan bir MAPK kodlar ve bitki patogenezi sırasında hiperozmolarite, oksidatif stres ve hücre duvarı stresine adaptasyonu sağlar [94]. *F. graminearum*, *F. oxysporum* ve *F. verticillioides* gibi fitopatojen türlerde, hif büyümesini, konidiyasyonu ve virülansı düzenler [94, 95]. Aktive olan *HOG1*, gliserol birikimine yönelik genlerin, ROS detoksifikasyonuna katılan genlerin ve efektör sekresyonunun anlatımını indükler. *HOG1* mutantları, artmış ROS

duyarlılığı ve bozulmuş ROS süpürülmesi nedeniyle azalmış invazyon gösterir. Buğday veya domates kökleri gibi konak bariyerlerini delmede başarısız olur [96].

Fusarium MST20 (mammalian sterile twenty like 20) geni bitki enfeksiyonu sırasında aktin iskeleti organizasyonu ve MAPK yolaklarının aktivasyonu yoluyla hücresel polariteyi, morfogenezi ve stres yanıtlarını düzenleyen, serin/treonin kinaz olarak işlev gören bir p21-aktive protein kinaz (PAK) homoloğunu kodlar. *F. graminearum* gibi fitopatojen *Fusarium* türlerinde *MST20*, G-proteinine kenetli reseptörlerden gelen sinyalleri bütünleştirir ve korunmuş C-terminal motifler üzerinden Gβ ile etkileşerek *MAPKKK*'leri fosforile eder. Bu düzenleme, hif büyümesini, konidiyasyonu ve apressoryum-benzeri penetrasyon yapılarının oluşumunu kontrol ederek bitki hücre duvarı bariyerlerine karşı koymayı sağlar [97-99]. *MST20* mutantları; azalmış hava hifleri, ciddi konidiyasyon kusurları ve biyokontrol stresi altında apoptoz-benzeri yanıtların değişmesi gibi fenotipler gösterir. Bu durum, konak savunmalarına karşı invaziv büyümeyi sürdürememeleri nedeniyle tahıllardaki virülansı zayıflatır. Ayrıca, *Fusarium*'da *MST20*, *in planta* kaynaklı hiperozmolar ve oksidatif sinyallere yanıt verir, antagonist varlığında anlatımı artar ve nekrotrofik geçiş sırasında programlanmış hücre ölümü modülasyonu ile bağlantılıdır [97, 98].

Fusarium ATG5 (Autophagy-Related Gene 5) geni, otofagozom oluşumu için zorunlu olan temel bir otofaji proteinini kodlar ve bitkilerde patogenez ile sınırlı besin koşullarında sitoplazmik bileşenlerin seçici olarak parçalanmasını sağlar. *F. graminearum* gibi fitopatojen türlerde ATG5–ATG16 kompleksi, hasarlı organeller ve lipid damlacıkları gibi parçalanacak hücresel bileşenlerin etrafında fagofor zarlarının oluşumunu başlatır [100, 101]. Bu yapı, otofagozomlara olgunlaşır ve lizozomla füzyon sonrası geri dönüşüm gerçekleşir. Fitopatolojik açıdan bakıldığında, ATG5 mutantları konidiyasyonu tamamen kaybeder, DON üretimi bloke olur ve buğday başaklarında virülans ciddi biçimde azalır. Bunun nedeni, nekrotrofik invazyon için gerekli lipid döngüsü, ROS homeostazı ve efektör sekresyonunun başarısız olmasıdır [100, 102]. Genin silinmesi, hif penetrasyonunu ve toksin biyosentezini bozar; bu durum otofajinin *Fusarium*'un hemibiyotrofik yaşam tarzı ile doğrudan bağlantılı olduğunu gösterir. Ayrıca, mitofajiyi düzenleyerek, mantarda konak benzeri programlanmış hücre ölümü yanıtlarını tetikleyebilecek mitokondriyal ROS birikimini önler [100, 103].

Fusarium stuA geni (sterigmatocystin/developmental regulator A), APSES (*Asm1*, *Phd1*, *StuA*, *Efg1* ve *Sok2*) ile karakterize edilen bir StuA/APSES transkripsiyon faktörünü kodlar. Bu gen, fitopatojen türlerde; eşeysiz gelişimi, sekonder metabolizmayı ve virülansı düzenler. *Fusarium verticillioides*'te, konidiyasyon genlerinin promotörlerine ve fumonisinler, fusarinler ve fusarik asit için mikotoksin gen kümelerine, diziye özgü motifler aracılığıyla doğrudan bağlanır [104]. Bu bağlanma, sporulasyonu ve mısır tanesinin kolonizasyonu için gerekli olan toksin üretimini artırır. *stuA* mutantları, radyal büyüme kusurları, konidiyasyonun tamamen kaybı ve mısırda %90'a varan virülans azalmasını gösterir. Bu etki fumonisinden bağımsız olup nekrotrofi sırasında efektörlerin etkin biçimde devreye sokulamaması ile ilişkilidir [104]. *F. graminearum*'da *stuA*, DON gen kümesi lokuslarında ve virülans genlerinde histon asetilasyonunu sağlar. Böylece buğday başak enfeksiyonu sırasında epigenetik aktivasyonu mümkün kılar. *F. culmorum*'da ise genin silinmesi hif penetrasyonunun ve buğday savunma baskılanmasının bozulması nedeniyle, toksinden bağımsız olarak kök çürüklüğünü engeller [105].

3
MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışması kapsamında, *A. hierochuntica* bitkisinden maserasyon yöntemi kullanılarak bitkisel ekstraktı elde edilmiştir. Daha sonra ekstrakt kullanılarak biyokimyasal analizler yapılmış, ekstraktın antifungal özelliklerinin belirlenmiş ve patojenlerle ilişkili genlerin anlatımları incelenmiştir. Bu amaçla, elde edilen ekstraktın kimyasal bileşimi ve biyoaktif özelliklerinin kapsamlı bir şekilde ortaya konulması amacıyla total fenolik içerik ve total flavonoid içerik analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca ekstraktın fenolik profili, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiş ve antioksidan kapasitesi (DPPH ve ABTS) uygun spektrofotometrik yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. *A. hierochuntica* ekstraktının antifungal etkileri de *Fusarium graminearum* PH1 ve *Fusarium culmorum* FcUK99 funguslarında araştırılmıştır. Antifungal etkinliğin moleküler düzeyde aydınlatılması amacıyla; hücre sinyal iletimi, oksidatif stres yanıtı, transkripsiyonel düzenleme ve otofaji ile ilişkili *mst20*, *hog1*, *CAT*, *stuA* ve *atg5* genlerinin anlatım seviyeleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

3.1 Bitki Ekstraktının Hazırlanması

Ekstraksiyon için maserasyon yöntemi kullanılmıştır [106]. Bu amaçla, ticari olarak satın alınan *A. hierochuntica* küçük parçalara ayrılarak %50'lik izopropil alkol ile karıştırılmıştır (10 gr kuru bitki için 100 mL solvent). Elde edilen örnekler, ev tipi elektrikli karıştırıcı ile pürüzsüz kıvam elde edildikten sonra ultrasonik homojenizatörle (Bandelin Sonopuls UW 3100) %80 genlikte 3 dakika sonikasyona (10 saniye açık ve 10 saniye kapalı) tabi tutulmuştur. Karışımlar, oda sıcaklığında gece boyunca çalkalandıktan sonra filtre kağıdıyla (Whatman No: 4) süzülmüştür. Elde edilen karışımdaki alkol, örneklerin rotary evaporatörde (Heidolph Laborota 4001 Efficient) 40 dakika süresince tutulmasıyla buharlaştırılmıştır. Son özütler 24 saat boyunca -80°C'de tutulmuş ve daha sonra 24 saat boyunca liyofilizatörde

(Telstar Cryodos-50) kurutulmuştur. Daha sonra özütler, tartılarak ekstraksiyon işleminin verimliliği hesaplanmış ve kullanılıncaya kadar -20°C'de dondurucuda saklanmıştır.

3.2 Bitki Ekstraktının Biyokimyasal ve Metabolomik Analizleri

A. hierochuntica bitkisinden elde edilen ekstraktın kimyasal içeriği ve biyoaktif potansiyelini ortaya koymak amacıyla, total fenolik ve total flavonoid madde içerikleri belirlenmiştir. Bununla birlikte, ekstraktın fenolik profilinin detaylı olarak aydınlatılması için HPLC analizi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi amacıyla serbest radikal süpürme aktiviteleri DPPH ve ABTS yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.1 Total Fenolik İçerik Analizi

Bitki ekstraktlarındaki toplam fenolik içerik (TPC), Folin-Ciocalteu yöntemiyle belirlenmiştir [107]. Standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanılmıştır. Bu amaçla, gallik asit etanol içerisinde çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra stok çözeltiden seri dilüsyon yapılarak 1, 0.5, 0.25, 0.125 ve 0.0625 mg/mL konsantrasyonlarında standart çözeltiler elde edilmiştir. Bitkisel ekstrakt için ise hazırlanan toz ekstrakt sulandırılarak kullanılmıştır. Stok ekstrakt çözeltisinden seri dilüsyon yapılarak 50.0, 25.0, 12.5, 6.25 ve 3.125 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır. Hem standart hem de ekstraktlardan çözeltilerden 20 µL alınarak üzerine 680 µL saf su, 400 µL %50'lik Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiş 8 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin üzerine 400 µL %5'lik sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisinden eklenmiştir. Hazırlanan reaksiyon karışımları 2 saat boyunca karanlıkta oda sıcaklığında çalkalayıcıda karıştırılmış ve süre sonunda UV-Vis spektrofotometresinde (Thermo Scientific GENESYS 180) 746 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Saf etanol, blank olarak kullanılmıştır. Gallik asit karışımlarının konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri standart grafiği oluşturmak için kullanılmıştır. Bitkisel ekstrakt konsantrasyon değerlerine karşılık gelen absorbans değerleri standart grafik denkleminde kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır, sonuç gallik asit eşdeğeri (mg/g) şeklinde belirlenmiştir.

Deney, üç biyolojik tekrarlı gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler, GraphPad Prism yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farkların

belirlenmesinde tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) uygulanmış ve çoklu karşılaştırmalar için Tukey testi kullanılmıştır.

3.2.2 Total Flavonoid İçerik Analizi

Bitki ekstraktındaki toplam flavonoid içerik (TFC), alüminyum klorür ($AlCl_3$) yöntemiyle belirlenmiştir [108]. Standart flavonoid bileşik olarak kuersetin kullanılmıştır. Bu amaçla kuersetin etanol içerisinde çözülerek stok çözelti hazırlanmış ve stok çözelti seri dilüsyon yapılarak ile 250, 125, 62.5, 31.25 ve 15.62 µg/mL konsantrasyonlarında standart çözeltiler elde edilmiştir. Bitkisel ekstrakt için hazırlanan toz ekstrakt sulandırılarak kullanılmış olup, stok ekstrakt çözeltisinden seri dilüsyon yapılarak 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden 92 µL alınarak üzerine 4 µL 1 M CH_3CO_2K, 4 µL %10'luk $AlCl_3$ ve 900 µL saf su eklenmiştir. Hazırlanan reaksiyon karışımları 40 dakika boyunca karanlıkta oda sıcaklığında çalkalanmış sonrasında absorbansı UV-Vis spektrofotometrede 425 nm'de belirlenmiştir. Saf etanol, blank olarak kullanılmıştır. Kuersetin karışımlarının konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri standart grafiği oluşturmak için kullanılmıştır. Bitkisel ekstrakt konsantrasyon değerlerine karşılık gelen absorbans değerleri standart grafik denkleminde kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır, sonuç kuersetin eşdeğeri (mg/g) şeklinde belirlenmiştir.

Deney, üç biyolojik tekrarlı gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler, GraphPad Prism yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farkların belirlenmesinde tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) uygulanmış ve çoklu karşılaştırmalar için Tukey testi kullanılmıştır.

3.2.3 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Ekstraktların fenolik profili, HPLC (Shimadzu) sistemi ile analiz edilmiştir. Sistem konfigürasyonu; LC-10AD VP model pompa, SPD-M20A diode array dedektör, CTO-10AS kolon fırını, SIL-20A otomatik örnekleyici ve DGU-20A gaz giderme ünitesinden oluşmaktadır. Kromatografik şartlar Tablo 3.1'da özetlenmiştir.

Tablo 3.1 HPLC koşulları

Kolon	XTERRA® RP-18 (25 cm x 4.6 mm, 5 µm)
Akış Hızı	0.85 mL/dk
Dalga Boyu	230 nm
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Kolon Sıcaklığı	20ºC
Enjeksiyon Süresi	25 dk
Akış sistemi	Gradient akış
Mobil Faz A	dH_2O + % 0.1 fosforik asit
Mobil Faz B	Etanol

Analitlerin tanımlanmasında, standart bileşiklerle karşılaştırılarak elde edilen retention time (tR) değerleri esas alınmıştır. Kantitatif analizler, dedektör tarafından kaydedilen kromatogramlarda analite ait pik alanlarının belirlenmesi ile yapılmış ve konsantrasyonlar, kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.4 Antioksidan Kapasitesi

A. hierochuntica bitkisinden elde edilen ekstraktın antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ve ABTS (2,2′-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) radikal süpürme yöntemleri kullanılmıştır. Bu iki yöntem, antioksidan bileşiklerin serbest radikalleri indirgeme ve nötralize etme kapasitelerinin farklı mekanizmalar üzerinden değerlendirilmesine olanak sağlaması nedeniyle birlikte tercih edilmiştir.

3.2.4.1 DPPH

Bitki ekstraktındaki antioksidan aktivitesi DPPH antioksidan aktivite yöntemine göre belirlenmiştir [109]. Standart olarak askorbik asit kullanılmıştır. Bu amaçla askorbik asit saf su içerisinde çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltiden seri dilüsyonlar yapılmış ve 250, 125, 62.5, 31.25 ve 15.62 µg/mL konsantrasyonlarında standart çözeltiler elde edilmiştir. Bitkisel ekstrakt için hazırlanan toz ekstrakt sulandırılarak kullanılmış olup, stok ekstrakt çözeltisinden seri dilüsyon yapılarak 10, 5, 2.5, 1.25 ve 0.625 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden 100 µL alınarak üzerine 900 µL

0,3 mM DPPH çözeltisi eklenmiştir. Hazırlanan reaksiyon karışımları 30 dakika boyunca karanlıkta oda sıcaklığında çalkalanmış ve süre sonunda örneklerin absorbansı UV-Vis spektrofotometrede 517 nm'de ölçülmüştür. Saf su, blank olarak kullanılmıştır. Askorbik asit karışımlarının konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri hesaplanarak radikal süpürme aktivitesi yüzdesi (%RSA) değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır ve standart grafiği oluşturmak için kullanılmıştır [110].

$$\%RSA=(A_{kontrol}-A_{örnek})/A_{kontrol}\times 100$$

$A_{kontrol}$: Radikal çözeltisinin (DPPH) örnek eklenmeden ölçülen absorbansı

$A_{örnek}$: Radikal ve test örneği içeren karışımın absorbansı

Bitkisel ekstrakt konsantrasyon değerlerine karşılık gelen absorbans değerleri hesaplanarak %RSA değerleri bulunmuş, standart grafik denkleminde kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. Sonuçlar, mg askorbik asit eşdeğeri 100 g^{-1} olarak belirlenmiştir. Deneyler, üç biyolojik tekrarlı gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler, GraphPad Prism yazılımı kullanılarak yapılmış, gruplar arasındaki farkların belirlenmesinde tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) uygulanmış ve çoklu karşılaştırmalar için Tukey testi kullanılmıştır.

3.2.4.2 ABTS

Bitki ekstraktındaki antioksidan aktivitesi, ABTS antioksidan aktivite yöntemine göre belirlenmiştir [111]. Standart olarak askorbik asit kullanılmıştır. Bu amaçla askorbik asit saf su içerisinde çözülerek stok çözelti hazırlanmış ve seri dilüsyonlar yapılarak 15.62, 7.81, 3.91, 1.95 ve 0.98 µg/mL konsantrasyonlarında standart çözeltiler elde edilmiştir. Bitkisel ekstrakt için hazırlanan toz ekstrakt sulandırılarak kullanılmış olup, stok ekstrakt çözeltisinden de seri dilüsyon yapılarak 2.5, 1.25, 0.625, 0.313 ve 0.156 mg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır. Daha sonra 5 mL (7 mM ABTS) ve 5 mL (2,45 mM potasyum persülfat) karıştırılarak $ABTS^{+}$ katyon radikali oluşturulmuştur ve karışım 24 saat boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. Sonra $ABTS^{\bullet+}$ çözeltisi saf etanol ile 732 nm'de 0,70 ± 0,02 absorbans değerine kadar seyreltilmiştir. Hazırlanan çözeltilerden 20 µL alınarak üzerine 980 µL $ABTS^{\bullet+}$ çözeltisi eklenmiştir. Hazırlanan reaksiyon karışımları 10 dakika boyunca karanlıkta oda sıcaklığında çalkalanmış sonrasında absorbansı UV-Vis spektrofotometrede 732 nm'de saf suya karşı okunmuştur. Askorbik asit

karışımlarının konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri hesaplanarak radikal süpürme aktivitesi yüzdesi (%RSA) değerleri bulunmuştur ve standart grafiği oluşturmak için kullanılmıştır. Bitkisel ekstrakt konsantrasyon değerlerine karşılık gelen absorbans değerleri hesaplanarak %RSA değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır ve standart grafik denkleminde kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır [111].

$$\%RSA=(A_{kontrol}-A_{örnek})/A_{kontrol} \times 100$$

$A_{kontrol}$: Radikal çözeltisinin (ABTS) örnek eklenmeden ölçülen absorbansı

$A_{örnek}$: Radikal ve test örneği içeren karışımın absorbansı

Sonuç mg askorbik asit eşdeğeri 100 g^{-1} (mg AAE/100 g) olarak belirlenmiştir. Deney, üç biyolojik tekrarlı yapılmıştır. İstatistiksel analizler, GraphPad Prism yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiş; gruplar arasındaki farkların belirlenmesinde tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) uygulanmış ve çoklu karşılaştırmalar için Tukey testi kullanılmıştır.

3.3 *In vitro* Antifungal Özelliğin Belirlenmesi

Çalışmada, *Fusarium graminearum* PH1 ve *Fusarium culmorum* FcUK99 suşları kullanılmıştır. Bu türler, Prof. Dr. Emre YÖRÜK'ün (İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Fen ve Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı) kültür koleksiyonundan elde edilmiştir. Belirtilen *Fusarium* kültürleri, 26 ± 1°C sıcaklıkta 7 gün boyunca patates dekstroz agar (PDA) üzerinde geliştirilmiştir. Çalışma süresince kurulacak tüm denemelerde 7 günlük taze kültürlere ait 5 mm çaplı miseliyal diskler kullanılmıştır.

A. hierochuntica ekstraktlarının antifungal aktivitesi, gıda zehirleme tekniği kullanılarak belirlenmiştir [112]. Ekstraktlar farklı konsantrasyonlarda (2.5, 2.0, 1.5, 1.0 ve 0.5 mg/mL) PDA ortamına eklenmiştir. Patojen kültürlerinden 5 mm çapında miseliyal disk alınarak farklı konsantrasyonlarda ekstrakt içeren PDA besi yerlerinin merkezine yerleştirilmiştir. Ekstrakt eklenmeyen petri kapları, çalışmanın negatif kontrolünü oluşturmuştur. Ayrıca, ekstraktların antifungal aktivitesinin kıyaslanabilmesi için aktif bileşen olarak proquinazid içeren ticari olarak temin edilebilen bir kimyasal fungisit (Talendo) kullanılmıştır ve antifungal aktivitesi değerlendirilmiştir. PDA içerisine farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.2, 0.3,

0.4 ve 0.5 mg/mL) eklenen kimyasal fungisit, pozitif kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. İnoküle edilen petri kapları, 26 ± 1°C sıcaklıkta 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. 4. gün ve 7. günde miseliyal çapları cetvel yardımı ile santimetre cinsinden ölçülmüştür. Bu sürenin sonunda elde edilen ölçümlerle miseliyal gelişim inhibisyonu aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır [113].

$$\text{Miseliyal Gelişim İnhibisyonu (\%)} = (C\text{-}T)/C \times 100$$

C: Kontrol grubundaki ortalama miseliyal büyüme

T: Uygulama grubuna ait ortalama miseliyal büyüme deney

Deney, üç biyolojik tekrarlı yapılmıştır. İstatistiksel analizler, GraphPad Prism yazılımı kullanılarak yapılmış, gruplar arasındaki farkların belirlenmesinde tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) uygulanmış ve çoklu karşılaştırmalar için Tukey testi kullanılmıştır.

3.4 Moleküler Analizler

Antifungal aktivite analizleri sonucunda en yüksek inhibisyon sağlayan konsantrasyonlar belirlenmiş olmasına karşın bu konsantrasyonlarda elde edilen örneklerden yeterli miktarda RNA izolasyonu yapılamayacağı ve konsantrasyonlar arasındaki gen anlatım düzeylerinin sağlıklı biçimde karşılaştırılamayacağı öngörüldüğünden, moleküler analizler için *F. graminearum* ve *F. culmorum*'da 0.5 ve 1.0 mg/mL ekstrakt konsantrasyonları seçilmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan Talendo® için ise 0.1, 0.2 ve 0.3 mg/mL konsantrasyonlar moleküler analizlerde değerlendirilmiştir.

Kontrol ve deney gruplarına ait örneklerde gerçekleştirilen moleküler analizler, istatistiksel değerlendirmeye olanak sağlamak amacıyla iki biyolojik ve iki teknik tekrar şeklinde tasarlanmıştır. Gen anlatım analizleri, hücresel sinyal iletimi, oksidatif stres yanıtı, transkripsiyonel düzenleme ve otofaji ile ilişkili *mst20, hog1, CAT, stuA* ve *atg5* genlerinin anlatım seviyeleri üzerinden gerçekleştirilmiştir ve housekeeping gen olarak *btub* geni kullanılmıştır. İstatistiksel analizler, GraphPad Prism yazılımı kullanılarak yapılmış, gruplar arasındaki farkların belirlenmesinde tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) uygulanmış ve çoklu karşılaştırmalar için Tukey testi kullanılmıştır.

3.4.1 Total RNA İzolasyonu

Kontrol ve deney gruplarına ait total RNA'lar, NucleoZOL (MACHEREY-NAGEL, ALMANYA) kullanılarak izole edilmiştir. Bu amaçla, deney öncesinde kullanılan tüm materyaller iki kez otoklavlanmış ve yalnızca nükleaz içermeyen su kullanılmıştır. İzolasyon işlemleri aşağıda belirtilmiştir:

1. 7 günlük *Fusarium* türlerine ait örnekler, steril havan ve havan eli yardımıyla sıvı azot içerisinde ezilmiştir.
2. Toz haline getirilen fungus örneklerine 750 µL NucleoZOL ilave edilerek homojenatlar santrifüj tüplerine aktarılmış ve tüplere 300 µL su eklendikten sonra hafifçe karıştırılıp 5 dakika oda sıcaklığında nükleoprotein komplekslerinin ayrışması için bekletildikten sonra 12.000 × g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
3. Santrifüj sonrası RNA içeren üst faz yeni bir tüpe aktarılmış, üzerine 1:1 oranında izopropanol eklenerek total RNA moleküllerinin bağlanması için 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler, 12.000 × g'de 10 dakika tekrar santrifüj edilmiştir.
4. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve total RNA peleti üzerine 700 µL %75 etanol eklenerek yıkanmıştır. Tüpler, son kez 10.000 × g'de 3 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılarak peletler kurumaya bırakılmıştır.
5. Peletler kurutulduktan sonra yaklaşık 50 µL nükleaz içermeyen steril su içerisinde çözündürülmüştür.
6. İzole edilen total RNA'ların kalite ve miktarları sırasıyla %1 agaroz jel elektroforezi (w/v) ve spektrofotometre kullanılarak kontrol edilmiştir.

İzole edilen RNA'ların kalitatif analizleri için yapılan agaroz jelde tampon olarak TAE (Tris-Asetat-EDTA) kullanılmıştır. Tampon için stok olarak 50X TAE tamponu hazılanmak üzere 242 g Tris baz, 57,1 mL glasiyal asetik asit ve 100 mL 0.5 M EDTA (pH 8,0), steril dH_2O içerisinde çözülmüş ve toplam hacim 1 litreye tamamlanmıştır. Çalışmalarda, 1X TAE tamponu kullanılmıştır. Agaroz jel hazırlanması için 0.5 g agaroz, 50 mL 1X TAE jel tamponu içerisine eklenerek mikrodalga fırında eritilmiştir. Ilık hale gelen jelin içerisine 4 µL etidyum bromür (10 mg/mL) ilave edilmiştir. Uygun tarak yerleştirildikten sonra jel yatay elektroforez kasetine dökülmüş ve oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmıştır.

Katılaşan jel, 1X TAE jel tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Daha sonra RNA örneklerinden 1 µL alınarak 5 µL 6X yükleme boyası ile karıştırılmış ve jel üzerine yüklenmiştir. Markır olarak RiboRuler™ High Range RNA Ladder (Fermentas, SM1823) kullanılmıştır. Jel, 80 V'de 40 dakika süresince yürütülmü ve UV transillüminatör (Thermo Scientific Multiskan GO) altında görüntülenmiştir. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları 260 nm (A_{260}), saflıkları ($A_{260/A280}$, $A_{260/230}$) belirlenmiştir. Örnekler kullanılıncaya kadar, -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.4.2 cDNA Sentezi

İzolasyondan sonra cDNA sentezi, kit (Nepenthe cDNA Synthesis Kit, NP041011610) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit protokolüne uygun olarak reaksiyon bileşenleri, tüplerin içerisinde Tablo 3.2'de verilen miktarlarda hazırlanmıştır. Her örnekten 2000 ng total RNA kullanılacak şekilde cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi Tablo 3.3'te belirtilen reaksiyon protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.2 cDNA sentezinde kullanılan bileşenler

Bileşen	Miktar (µL)
RNA kalıbı	5
Buffer-Mix (2x)	10
Enzyme Mix	2
Su	3
Toplam	20

Tablo 3.3 cDNA sentezi reaksiyon koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
Bağlanma	25	10
Ters transkripsiyon	47	60
Enzim inaktivasyonu	85	5
Son aşama	4	bekleme

3.4.3 Gen Anlatım Analizleri

cDNA sentezinin ardından Gerçek Zamanlı PCR (Real-Time PCR, qRT-PCR) analizlerinde kullanılacak primer dizileri, referans genom dizileri esas alınarak belirlenmiş, primerlerin özgüllük ve yapısal uygunluk analizleri IDT (Integrated DNA Technologies) OligoAnalyzer™ aracı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan primer dizileri Tablo 3.4'te sunulmuştur. Primerlerde self-dimer, hetero-dimer ve hairpin oluşumları değerlendirilmiş ve ikincil yapı oluşumu açısından düşük bağlanma eğilimine sahip (ΔG değeri -6 ile -2 arasında olan primer modelleri) primerler seçilmiştir. Tasarlanan primer dizilerinin bağlanma sıcaklıkları ve reaksiyon sonrası oluşan ürünlerin kontrolü amacıyla gradyan PCR gerçekleştirilmiştir. Uygun sıcaklıkların belirlenmesinden sonra Tablo 3.5'deki bileşenler kullanılarak ve Tablo 3.6'daki koşullarda qRT-PCR (Quant Studio 5, Thermo) analizleri yapılmıştır.

Tablo 3.4 Primer dizileri

Primer	Aksesyon Numarası	Primer Dizisi (5'-3')	Boyut (bp)
btub	GQ915440.1	F: AGGGTCATTACACCGAGGGT R: GTACCACCACCAAGAGAGTGG	121
CAT	XM_011328072.1	F: AATTCCACGTTCGTTTCGTC R: CCATACTAGGCTCGCTTTGC	130
hog1	DQ065608.1	F: CCTGGCAAAAATACGACGTT R: TGATGGAGAATTGGTTGACG	117
mst20	XM_011329927.1	F: CCTGAAAAGGAACGACGAGA R: GCCAGCATGATGGAATTTCT	117
atg 5	NQOC01000008.1	F: ATGTCTTCTCCCATCCCGC R: GCTGAAGCGTGGAATACTGG	108
stuA	FGSG_10129	F: GCCCCTACTGGATACGATCA R: TTGCCTTCTAGGGACATTGG	100

Tablo 3.5 qRT-PCR için kullanılan bileşenler

Komponent	Miktar (µL)	Final Konsantrasyon
SYBR Green supermix (2x)	6	1X
Forvard- Reverse primer	0.3-0.3	(6.5 pmol)
cDNA	2.4	60 ng
dH_2O	3	-
Total	12	-

Tablo 3.6 qRT-PCR koşulları

Aşama	Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	95	3 dk	1
Denatürasyon	95	15 sn	40
Bağlama/uzama	58	15 sn	
Son uzama	72	20 sn	1

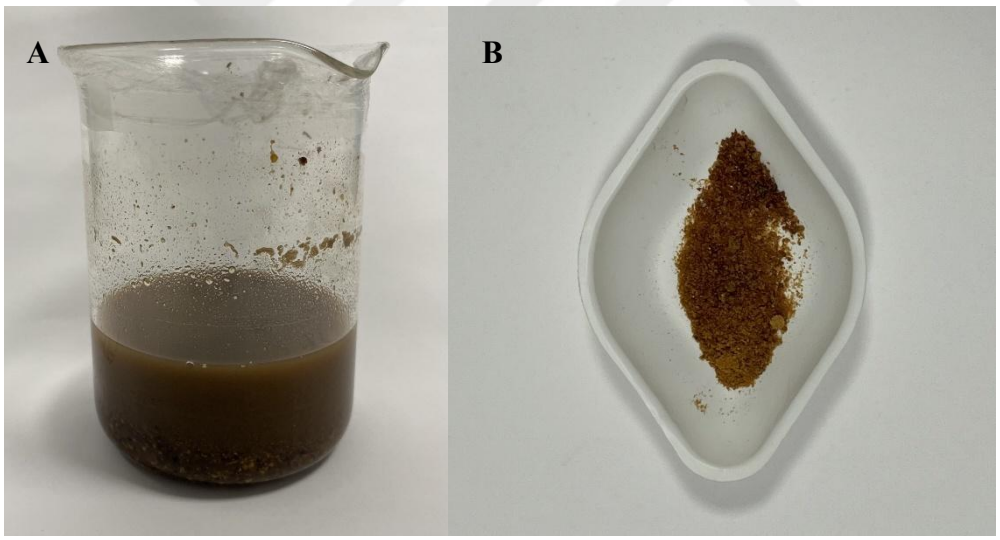
Erime eğrisi analizleri için 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 1 dakikalık inkübasyon uygulanmıştır.

Sonuçların istatistiksel anlamlılığı için deney iki biyolojik ve iki teknik tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Gen anlatımları arasındaki değişimlerin anlamlılık düzeyi, GraphPad Prism 9 yazılımında gerçekleştirilen tek yönlü ANOVA testi ile belirlenmiştir. Kontrol ve deney grupları arasındaki anlamlılık düzeyleri Tukey testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki gen anlatımındaki değişimleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalizasyon değeri kullanılarak hesaplanmıştır [114].

4
BULGULAR

4.1 Bitki Ekstraktının Hazırlanması

A. hierochuntica bitkisi, küçük parçalara ayrılarak %50'lik izopropil alkolle karıştırılıp oda sıcaklığında 24 saat çalkalanmıştır (Şekil 4.1.A). Çalkalama işlemi sonrasında döner buharlaştırıcıda alkolü tamamen uçurulmuş, -80°C'de dondurulduktan sonra liyofilizatör ile dondurularak kurutulmuş ve toz ekstrakt elde edilmiştir (Şekil 4.1B).



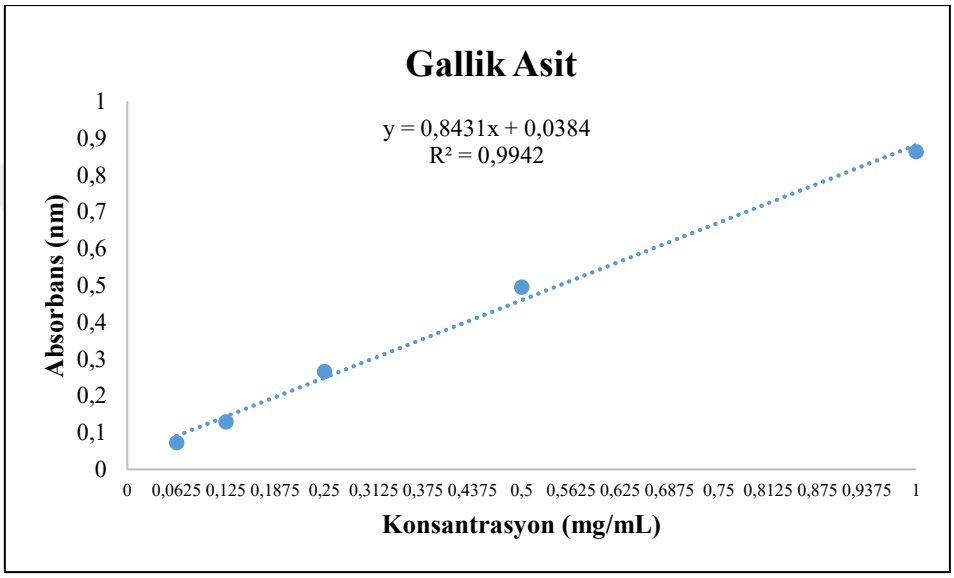
Şekil 4.1 *A. hierochuntica* bitkisinden toz ekstrakt eldesi A. Bitkinin %50 izopropanolle karışımı B. Toz ekstrakt

Ekstraksiyon işlemi sonrasında toz materyal tartılmıştır ve tartım sonucuna göre hesaplamalarda 1 gr kuru bitki materyalinden 0.037 ± 0.003 gr toz ekstrakt elde edildiği görülmüştür. Ekstraksiyon verimliliği %3.7 olarak hesaplanmıştır.

4.2 Bitki Ekstraktının Total Fenolik ile Total Flavonoid İçeriği ve HPLC Analizi

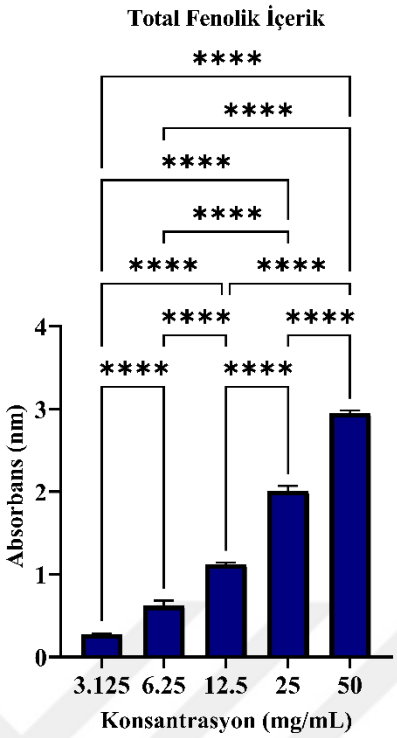
4.2.1 Total Fenolik İçerik Analizi

A. hierochuntica bitkisinden elde edilen ekstraktın total fenolik madde içeriği, Şekil 4.2'deki gallik asit standart eğrisi ve bu eğriyi tanımlayan eşitlikten yararlanılarak hesaplanmıştır. *A. hierochuntica* ekstraktında bulunan total fenolik içerik 92.802 ± 1.66 mg GAE/g olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2 Gallik asit standart eğrisi

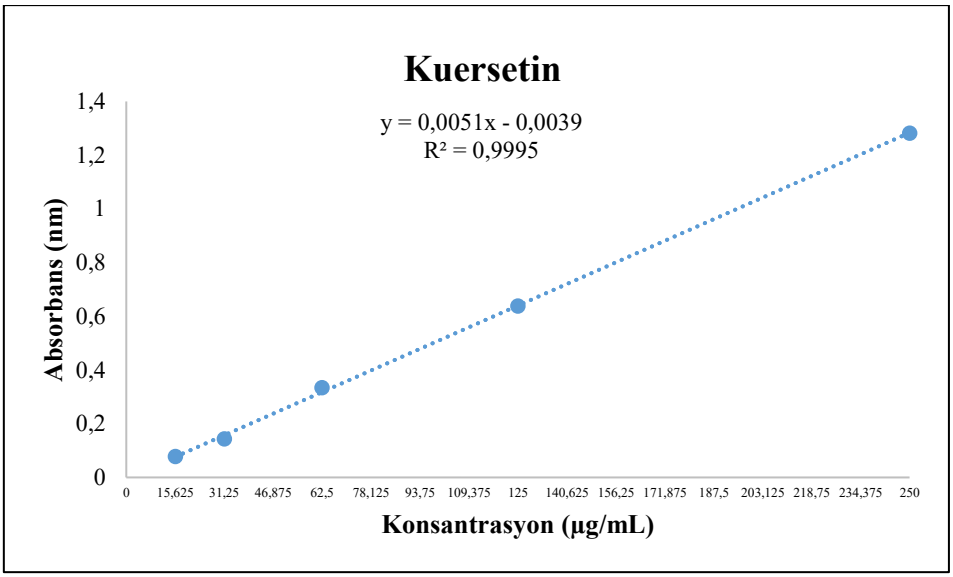
A. hierochuntica ekstraktının total fenolik içerik analizinde, artan konsantrasyonlara bağlı olarak absorbans değerlerinde kademeli ve belirgin bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.3). Konsantrasyona bağlı bu değişimin istatistiksel olarak anlamlılığı tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirilmiş ve gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir ($p<0.0001$). Anlamlılığın hangi konsantrasyon grupları arasında gerçekleştiğini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen Tukey çoklu karşılaştırma testi sonucunda ise 3.125-6.25 mg/mL, 3.125-12.5 mg/mL, 3.125-25 mg/mL, 3.125-50 mg/mL, 6.25-12.5 mg/mL, 6.25-25 mg/mL, 6.25-50 mg/mL, 12.5-25 mg/mL, 12.5-50 mg/mL, 25-50 mg/mL grupları olmak üzere bütün gruplar arasında yüksek anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p<0.0001$).



Şekil 4.3 *A. hierohuntica* ekstraktının total fenolik içerik analizinde konsantrasyona bağlı absorbans değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (*****p<0.0001*)

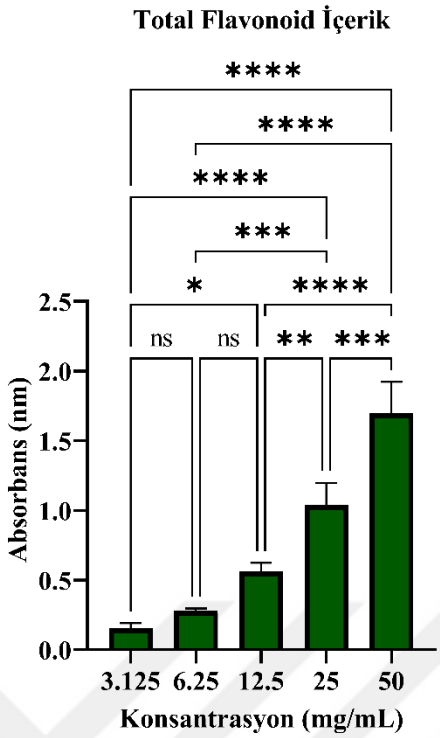
4.2.2 Total Flavonoid İçerik Analizi

A. hierochuntica bitkisinden elde edilen ekstraktın total flavonoid madde içeriği kuersetin standart eğrisi ve bu eğriyi tanımlayan eşitlikten yararlanarak hesaplanmıştır. Şekil 4.4'teki eğriyi tanımlayan eşitlikten yararlanılarak *A. hierochuntica* ekstraktında bulunan total flavonoid içerik 7.444 ± 1.449 mg KE/g olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4 Kuersetin standart eğrisi

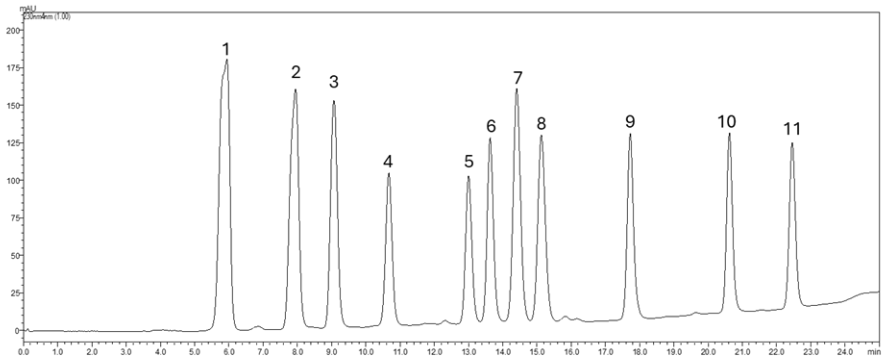
A. hierochuntica ekstraktının total flavonoid içerik analizinde, artan ekstrakt konsantrasyonlarına paralel olarak absorbans değerlerinde belirgin ve kademeli bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.5). Konsantrasyona bağlı bu değişimin istatistiksel açıdan anlamlılığı tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirilmiş ve gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir ($p<0.0001$). Anlamlı farklılıkların hangi konsantrasyon grupları arasında gerçekleştiğini ortaya koymak amacıyla uygulanan Tukey çoklu karşılaştırma testi sonucunda 3.125-50, 3.125-25, 6.25-50, 12.5-50 mg/mL konsantrasyonları arasında anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0.0001$). Bununla birlikte, 6.25-25 ve 25-50 mg/mL konsantrasyonları arasında belirli bir anlamlı fark görülmüştür ($p<0.0002$). Diğer gruplar kadar belirgin bir fark olmasa da 12.5-25 mg/mL arasında ($p<0.0072$) ve 3.125-12.5 mg/mL grupları arasında ($p<0.0182$) da istatistiksel olarak anlamlılık olduğu belirlenmiştir.



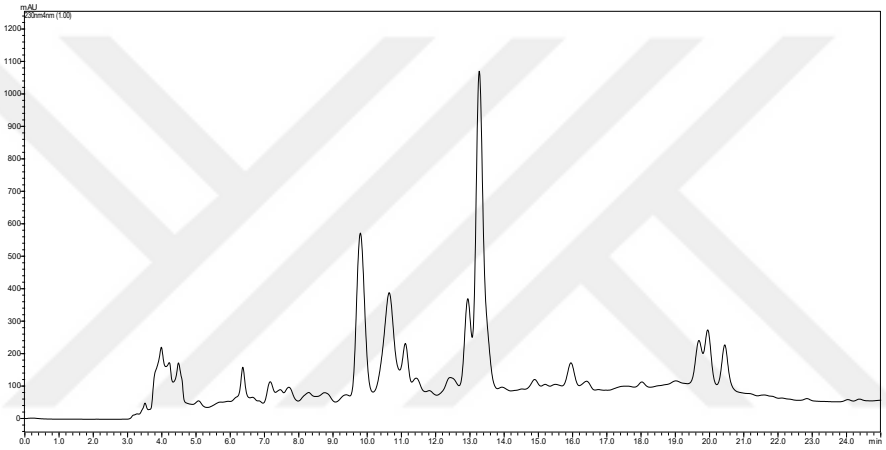
Şekil 4.5 *A. hierohuntica* ekstraktının total fenolik içerik analizinde konsantrasyona bağlı absorbans değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (*****p<0.0001*, ****p<0.0002, **p<0.0072*, **p<0.0182,* ns, anlamlılık yok)

4.2.3 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

A. hierochuntica bitkisinden elde edilen ekstraktın fenolik bileşik içeriği, HPLC yöntemiyle belirlenmiştir. Analizlerde, ticari standart çözeltiler kullanılarak elde edilen referans kromatogramlar ile örnek ekstraktta gözlemlenen pikler karşılaştırılmış ve ekstrakttaki fenolik bileşikleri tanımlanmıştır. Bununla birlikte kantitatif analizler ile fenolik bileşiklerin miktarları da belirlenmiştir. Şekil 4.6'da standart fenolik bileşiklere ait kromatogram, Şekil 4.7'de ise ekstraktın kromatogramı yer almaktadır. Her iki kromatogramda da 230 nm dedektör dalga boyu kullanılmıştır.



Şekil 4.6 Ticari standart fenolik bileşik karışımına ait HPLC kromatogramı (1. Hidroksitirosol, 2. Kateşin, 3. Eskuletin, 4. Kafeik asit, 5. Polidatin, 6. Kumarin, 7. Rutin, 8. Ellagik asit, 9. Resveratrol, 10. Kuersetin, 11. Apijenin)



Şekil 4.7 *A. hierochuntica* ekstraktına ait HPLC kromatogramı

Yapılan karşılaştırmalar sonucunda ekstraktta toplam 11 adet fenolik bileşik tanımlanmıştır. Kumarin hariç diğer bileşiklerin miktarları belirlenmiştir. Bu bileşiklerin alıkonma süreleri ve içerik miktarları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1 *A. hierochuntica* ekstraktında tespit edilen fenolik bileşikler ve ortalama miktarları

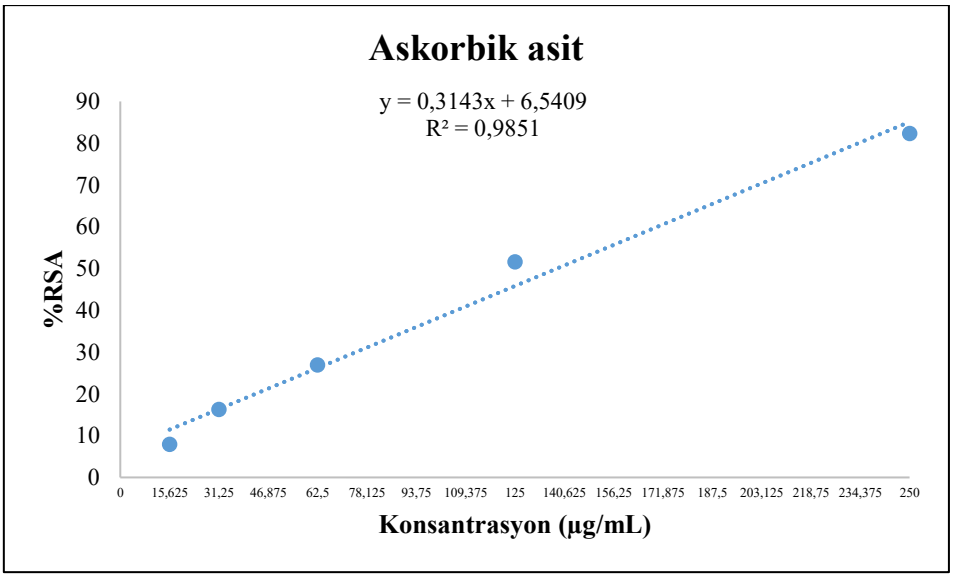
Bileşik	Alıkonma Zamanı (dk)	Miktar Tayini (µg/mg) ± SD
Hidroksitirosol	5.962	0.366 ± 0.018
Kateşin	7.741	0.347 ± 0.003
Eskuletin	8.798	0.255 ± 0.004
Kafeik asit	10.667	5.447 ± 0.023
Polidatin	12.969	1.976 ± 0.018
Kumarin	13.379	N.D.
Rutin	14.516	0.025 ± 0.003
Ellagik asit	14.887	0.344 ± 0.009
Resveratrol	17.576	0.136 ± 0.004
Kuersetin	20.439	1.376 ± 0.003
Apijenin	22.272	0.023 ± 0.001

(Ortalama ± Standart sapma), *ND, Tespit edilemedi

4.2.4 Antioksidan Kapasitesi

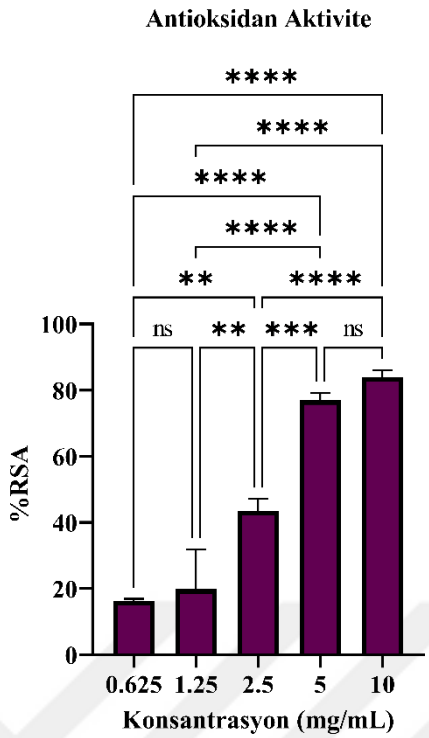
4.2.4.1 DPPH

A. hierochuntica bitkisinden elde edilen ekstraktın antioksidan kapasitesi DPPH için hazırlanan askorbik asit standart eğrisi ve bu eğriyi tanımlayan eşitlikten yararlanarak hesaplanmıştır. Şekil 4.8'deki eğriyi tanımlayan eşitlikten yararlanılarak *A. hierochuntica* ekstraktının antioksidan kapasitesi 3.950 ± 0.405 mg AAE/100 g ve DPPH absorbansını yarılamak için gereken antioksidan ekstrakt konsantrasyonu (IC_{50}) 3.329 ± 0.556 mg/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.8 DPPH için askorbik asit standart eğrisi

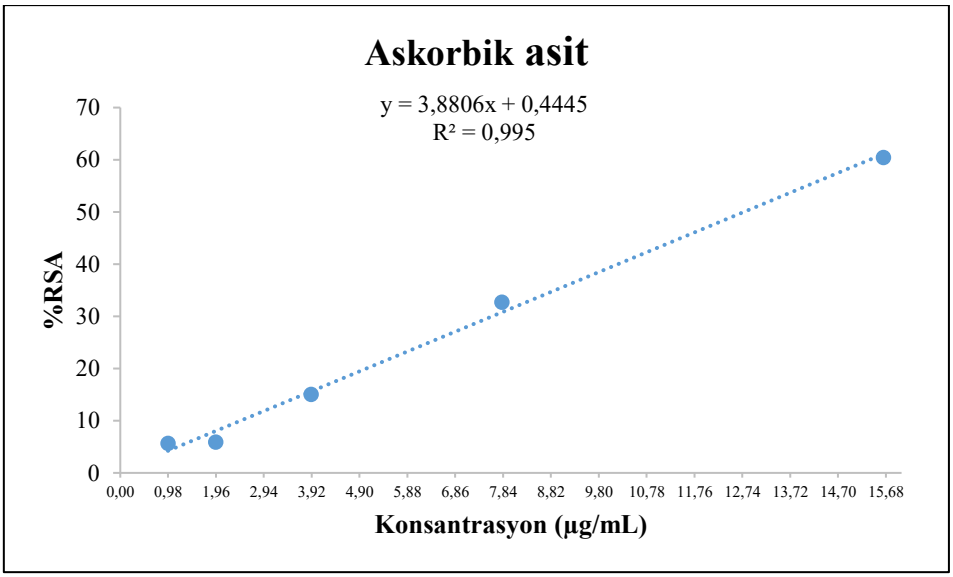
A. hierochuntica ekstraktının DPPH %RSA'sı, farklı konsantrasyonlar kullanılarak değerlendirilmiş ve artan konsantrasyonlara bağlı olarak antioksidan aktivitede belirgin bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.9). Konsantrasyona bağlı bu değişimin istatistiksel anlamlılığı tek yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu tespit edilmiştir ($p<0.0001$). Anlamlılığın hangi konsantrasyon grupları arasında gerçekleştiğini belirlemek amacıyla uygulanan Tukey çoklu karşılaştırma testi sonucunda, 0.625-5, 0.625-10, 1.25-5, 1.25-10, 2.5-10 mg/mL grupları arasında son derece yüksek anlamlı bir farkın olduğu görülmüştür ($p<0.0001$). 2.5-5 mg/mL arasında da belirli bir anlamlı fark olduğu belirlenmiştir ($p<0.0002$). Bununla birlikte, 0.625-2.5 ve 1.25-2.5 mg/mL arasında da anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0.0036$).



Şekil 4.9 *A. hierochuntica* ekstraktının DPPH serbest radikal süpürücü aktivitesinde konsantrasyona bağlı değişimin istatistiksel değerlendirilmesi (****$p<0.0001$*, ***$p<0.0002$*, **$p<0.0036$*, ns, anlamlılık yok)

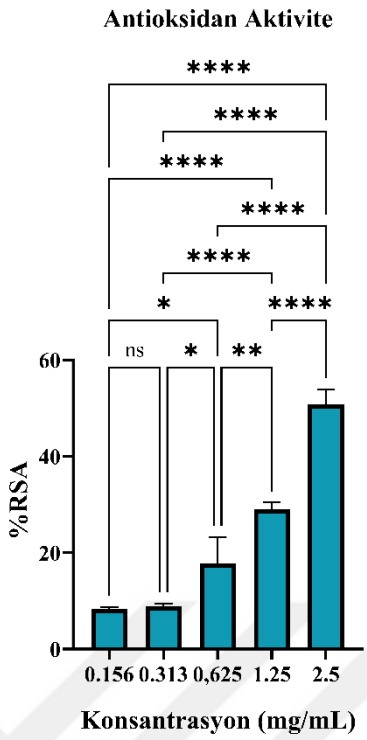
4.2.4.2 ATBS

A. hierochuntica bitkisinden elde edilen ekstraktın antioksidan kapasitesi ABTS için oluşturulan askorbik asit standart eğrisi ve bu eğriyi tanımlayan eşitlikten yararlanarak hesaplanmıştır. Şekil 4.10'daki eğriyi tanımlayan eşitlikten yararlanılarak *A. hierochuntica* ekstraktında bulunan antioksidan kapasitesi 0.525 ± 0.027 mg AAE/100 g ve ABTS absorbansını yarılamak için gereken antioksidan ekstrakt konsantrasyonu (IC_{50}) 2.447 ± 0.117 mg/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.10 ABTS için askorbik asit standart eğrisi

A. hierochuntica ekstraktının ATBS %RSA'sı, farklı konsantrasyonlar kullanılarak değerlendirilmiş ve artan konsantrasyonlara bağlı olarak antioksidan aktivitede belirgin bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.11). Konsantrasyona bağlı bu değişimin istatistiksel anlamlılığı tek yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu tespit edilmiştir ($p<0.0001$). Anlamlılığın hangi konsantrasyon grupları arasında gerçekleştiğini belirlemek amacıyla uygulanan Tukey çoklu karşılaştırma testi sonucunda, 0.156-2.5, 0.156-1.25, 0,313-2.5, 0,313-1.25, 0.626-2.5, 1.25-2.5 mg/mL grupları arasında son derece yüksek anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p<0.0001$). 0.625-1.25 mg/mL arasında da belirli bir anlamlılık olduğu tespit edilmiştir ($p<0.0055$). Ayrıca, 0.156-0.625 ve 0.313-0.625 mg/mL grupları arasında da anlamlılık olduğu belirlenmiştir ($p<0.0255$).



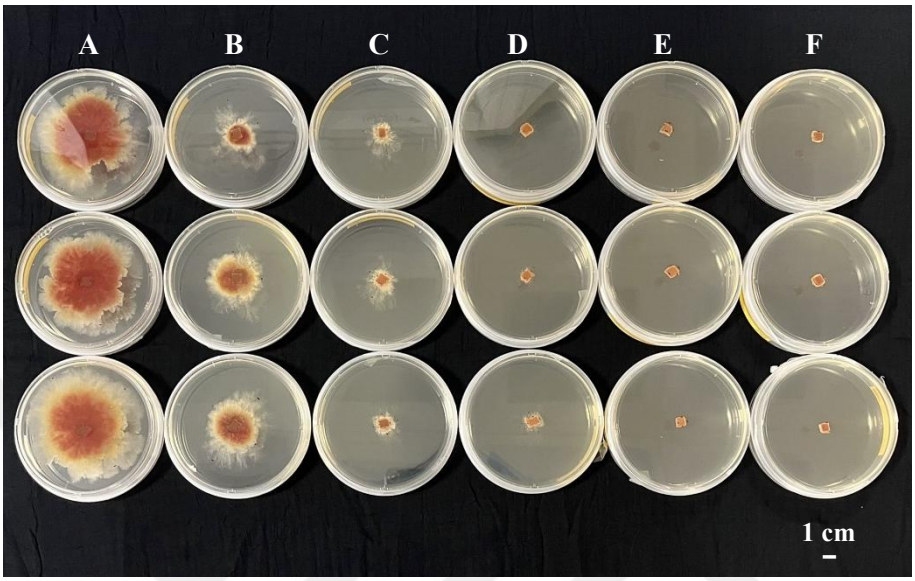
Şekil 4.11 *A. hierochuntica* ekstraktının ATBS serbest radikal süpürücü aktivitesinde konsantrasyona bağlı değişimin istatistiksel değerlendirilmesi (*****p*<0.0001*, ****p*<0.0055*, **p*<0.0255,* ns, anlamlılık yok)

4.3 *In vitro* Antifungal Özelliğin Belirlenmesi

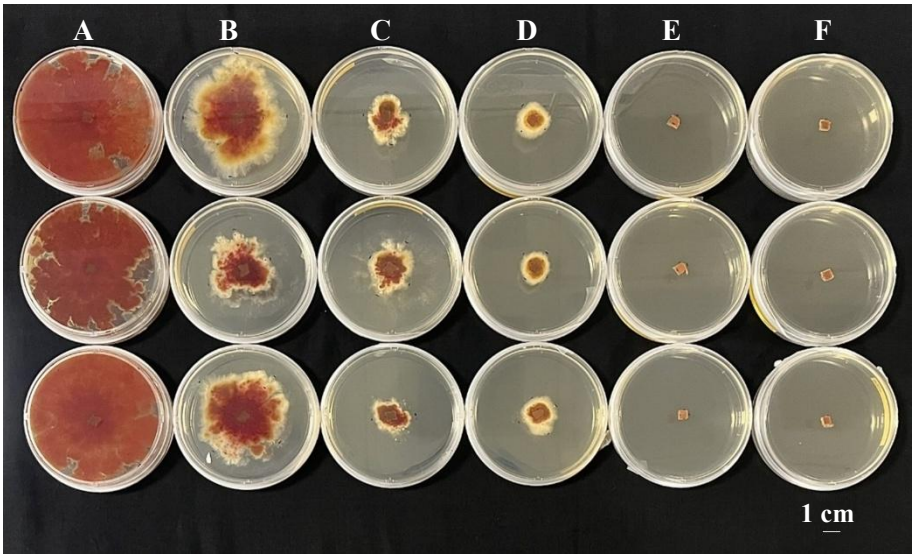
A. hierochuntica ekstraktının antifungal etkileri *F. graminearum* ve *F. culmorum* üzerinde gıda zehirleme tekniğiyle araştırılmıştır. Bu amaçla ekstrakt funguslara 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ve 2.5 mg/mL olmak üzere beş fraklı konsantrasyonda uygulanmıştır. Etken maddesi proquinazid olan ticari bir fungisit (Talendo) ise pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir. Bu fungusit; 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5 mg/mL olmak üzere beş farklı konsantrasyonda uygulanmıştır. Negatif kontrol grubunda PDA besiyerine herhangi bir ilave madde eklenmemiştir. Miselyal büyüme inhibisyonu yüzde (%) olarak belirlenmiştir. Miselyal büyüme 4 ve 7 günlük kültürlerde ölçülmüştür. Ölçümler hesaplanarak ekstrakt için konsantrasyona bağlı miselyal büyüme inhibisyon yüzdeleri kullanılarak doz-yanıt eğrileri oluşturulmuştur. Oluşturulan doz-yanıt eğrisi üzerinden yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu (EC_{50}) ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenmiştir.

4.3.1 *Fusarium graminearum*

Bitki ekstraktları *F. graminearum* fungusuna 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ve 2.5 mg/mL olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda uygulanmıştır. Uygulama sonrası 4 günlük (Şekil 4.12) ve 7 günlük (Şekil 4.13) kültürlerin miselyal büyüme oranları ölçülmüştür.

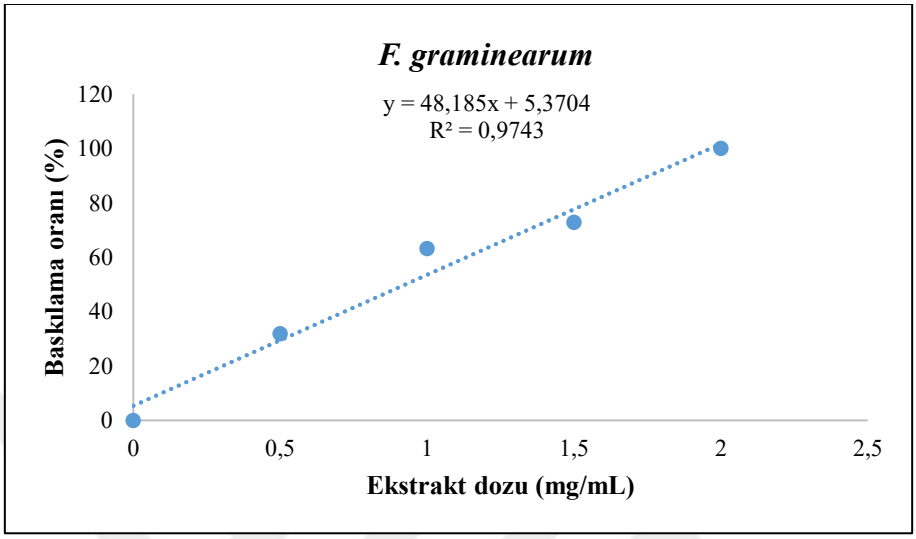


Şekil 4.12 *A. hierochuntica* ekstraktı uygulanmış 4 günlük *F. graminearum* kültürleri (A. Kontrol, B. 0.5 mg/mL ekstrakt, C. 1.0 mg/mL ekstrakt, D. 1.5 mg/mL ekstrakt, E. 2.0 mg/mL ekstrakt, F. 2.5 mg/mL ekstrakt)



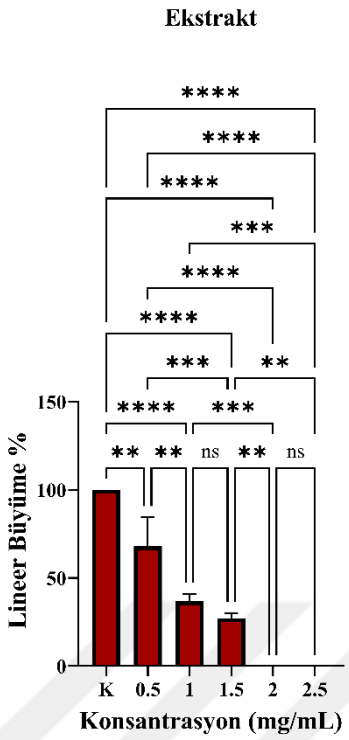
Şekil 4.13 *A. hierochuntica* ekstraktı uygulanmış 7 günlük *F. graminearum* kültürleri (A. Kontrol, B. 0.5 mg/mL ekstrakt, C. 1.0 mg/mL ekstrakt, D. 1.5 mg/mL ekstrakt, E. 2.0 mg/mL ekstrakt, F. 2.5 mg/mL ekstrakt)

A. hierochuntica ekstraktının *F. graminearum* üzerindeki etkileri doz-yanıt grafiği (Şekil 4.14) üzerinden hesaplanarak belirlenmiştir. *F. graminearum*'da ekstraktın EC_{50} değeri 0.920 ± 0.047 mg/mL olarak ve MİK değeri 1.960 ± 0.035 mg/mL olarak belirlenmiştir.



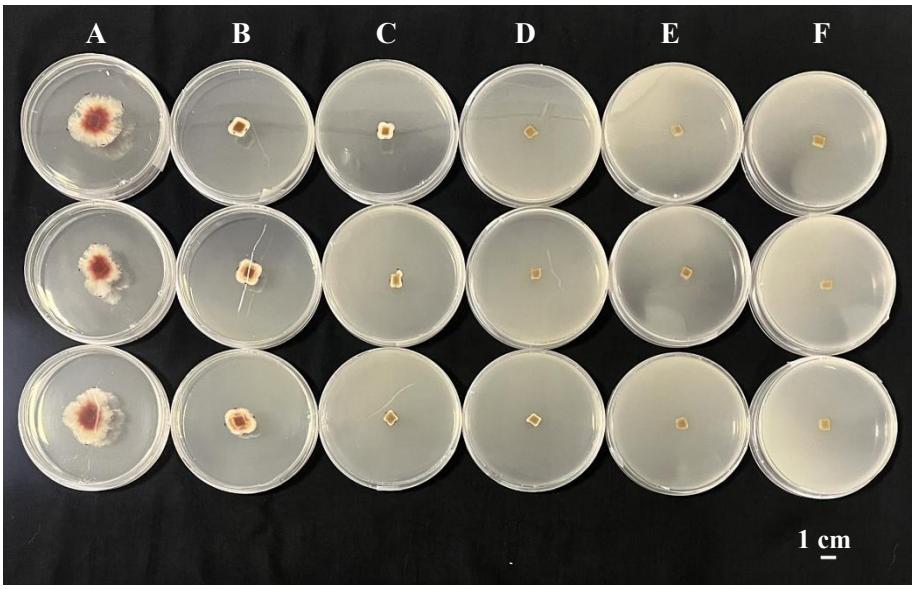
Şekil 4.14 *F. graminearum*'un *A. hierochuntica* ekstraktına karşı doz-yanıt grafiği

Konsantrasyona bağlı büyüme oranındaki değişimin istatistiksel açıdan anlamlılığı tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirilmiş ve gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir ($p<0.0001$). Anlamlı farklılıkların hangi konsantrasyon grupları arasında gerçekleştiğini ortaya koymak amacıyla uygulanan Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır (Şekil 4.15). Kontrol grubu ile 4 farklı dozun büyüme oranı karşılaştırıldığında (1.0 mg/mL, 1.5 mg/mL, 2.0 mg/mL, 2.5 mg/mL) kontrol ve 0.5 mg/mL karşılaştırıldığında ($p<0.0016$), 0.5 mg/mL ile dört farklı grup karşılaştırıldığında (1.0 mg/mL için $p<0.0016$, 1.5 mg/mL için $p<0,0004$, 2.0 mg/mL için $p<0.0001$, 2.5 mg/mL için ****$p<0.0001$), 1.0 mg/mL ile iki farklı grup karşılaştırıldığında (2.0 mg/mL, 2.5 mg/mL) ve 1.5 ile iki farklı grup karşılaştırıldığında (2.0 mg/mL ve 2.5 mg/mL için $p<0,0004$) aralarında son derece yüksek anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. Ayrıca, 1.0-1.5 mg/mL grupları karşılaştırıldığında da anlamlı bir farklılık ($p<0.0011$) belirlenmiştir.

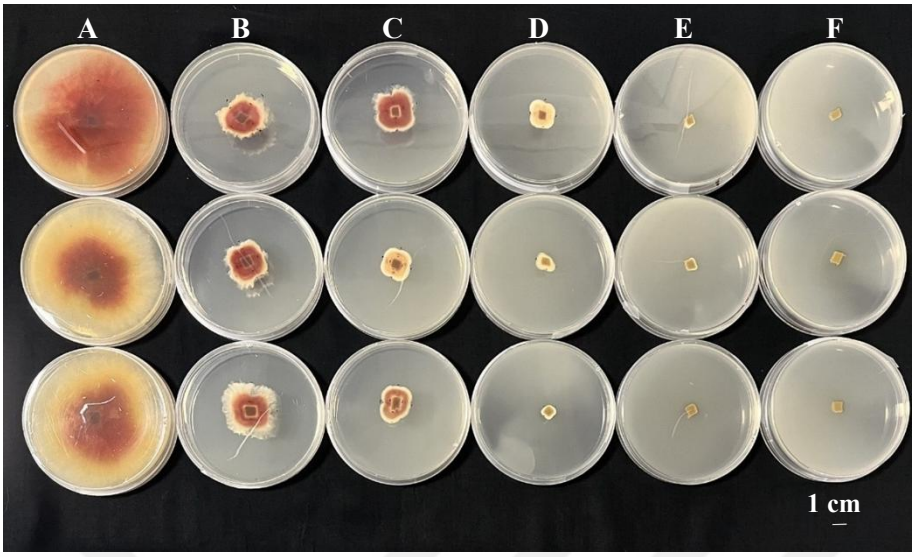


Şekil 4.15 *A. hierochuntica* ekstraktının farklı konsantrasyonlarının *F. graminearum'un* büyümesi üzerindeki etkisi (*****p<0.0001*, ******p<0,0004*, *******p<0.0016,* ns, anlamlılık yok)

Pozitif kontrol olarak Talendo fungusiti de *F. graminearum* fungusuna uygulanmıştır. Farklı Talendo konsantrasyonlarının (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL) 4 günlük (Şekil 4.16) ve 7 günlük (4.17) miselyal büyüme oranları ölçülmüştür.

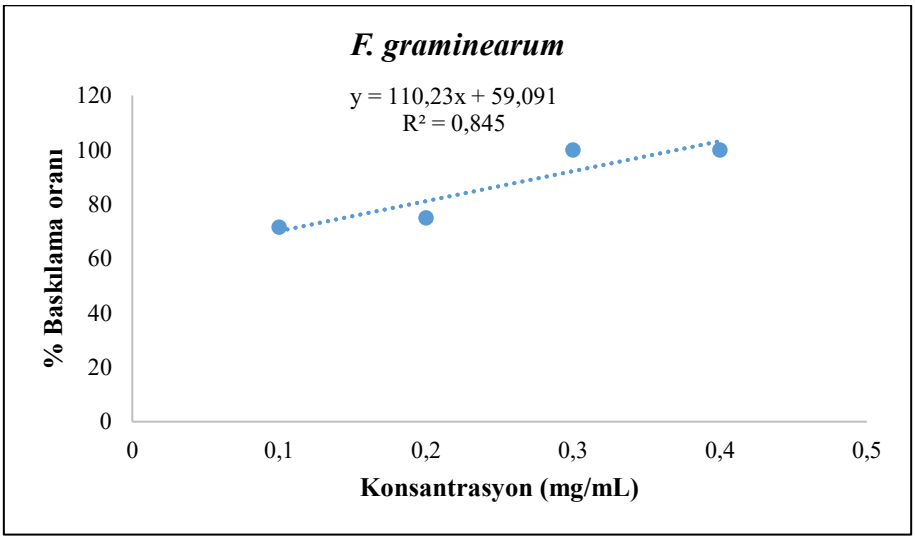


Şekil 4.16 Talendo uygulanmış 4 günlük *F. graminearum* kültürleri (A. Kontrol, B. 0.1 mg/mL, C. 0.2 mg/mL, D. 0.3 mg/mL, E. 0.4 mg/mL, F. 0.5 mg/mL)



Şekil 4.17 Talendo uygulanmış 7 günlük *F. graminearum* kültürleri (A. Kontrol, B. 0.1 mg/mL, C. 0.2 mg/mL, D. 0.3 mg/mL, E. 0.4 mg/mL, F. 0.5 mg/mL)

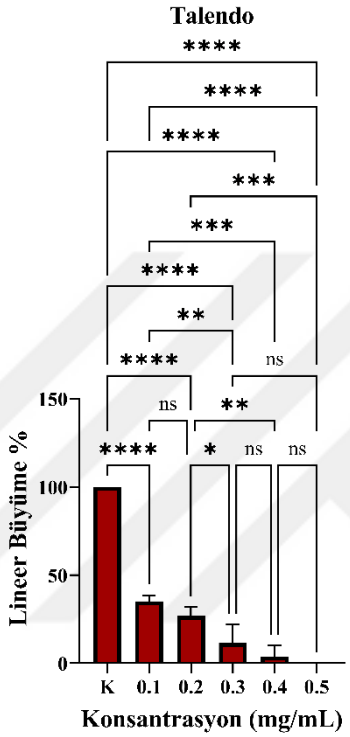
Talendo'nun *F. graminearum* üzerindeki etkileri doz-yanıt grafiği (Şekil 4.18) üzerinden hesaplanarak belirlenmiştir. *F. graminearum*'da Talendo'nun EC_{50} değeri 0.036 ± 0.102 mg/mL olarak ve MİK değeri 0.365 ± 0.006 mg/mL olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.18 *F. graminearum*'un Talendo'ya karşı doz-yanıt grafiği

Konsantrasyona bağlı büyüme oranındaki değişimin istatistiksel açıdan anlamlılığı tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirilmiş ve gruplar arasında anlamlı farklılıklar belirlenmiştir ($p<0.0001$). Kontrol grubu ile beş farklı doza göre büyüme oranı karşılaştırıldığında (0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.5 mg/mL)

ve 0.1-0.5 mg/mL karşılaştırıldığında aralarında son derece yüksek anlamlılık görülmüştür (*p<0.0001*). 0.1-0.4 mg/mL ve 0.2-0.5 mg/mL karşılaştırıldığında aralarında yüksek anlamlılık olduğu tespit edilmiştir (*p<0.0008*). Bununla birlikte, 0.1-0.3 mg/mL ve 0.2-0.4 mg/mL karşılaştırıldığında (*p<0.0029*) ve 0.2-0.4 mg/mL karşılaştırıldığında (*p<0.0497*) da anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19).

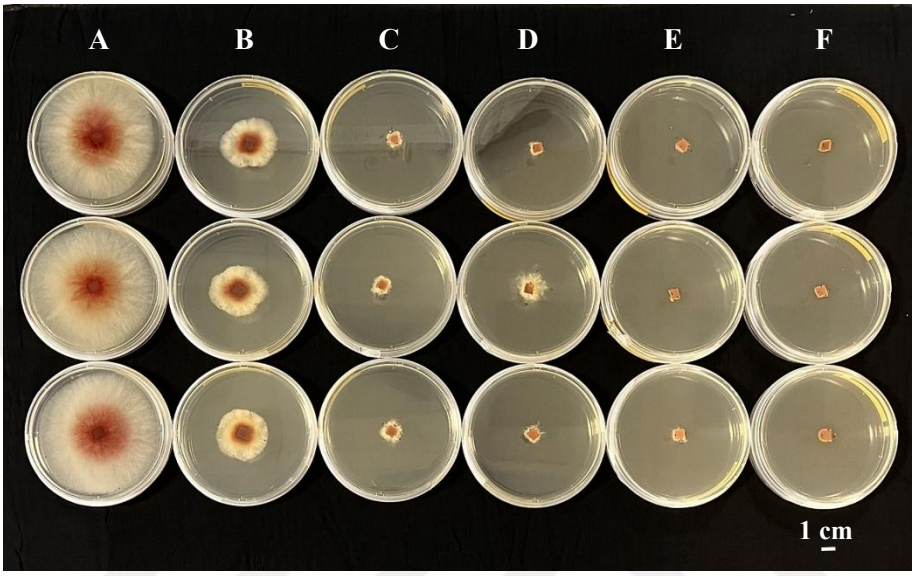


Şekil 4.19 Talendo'nun farklı konsantrasyonlarının *F. graminearum*'un büyümesi üzerindeki etkisi (****$p<0.0001$, ***$p<0.0008$, **$p<0.0029$, *$p<0.0497$, ns, anlamlılık yok)

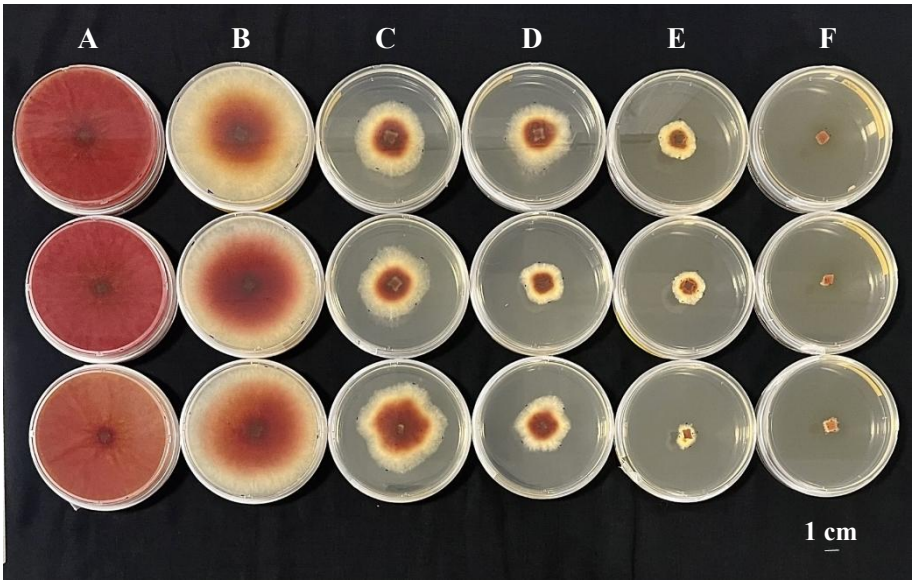
Tüm değerlendirmeler sonucunda, *F. graminearum* için ekstrakt uygulanan konsantrasyonlar arasında en yüksek inhibisyonun 1.5 mg/mL konsantrasyonda gözlendiği, Talendo uygulanan konsantrasyonlar arasında ise en yüksek inhibisyonun 0.4 mg/mL konsantrasyonda ortaya çıktığı belirlenmiştir. Ancak bu konsantrasyonlardan elde edilen örneklerden yeterli miktarda RNA izolasyonu gerçekleştirilemeyeceği ve konsantrasyonlar arasında gen anlatım düzeylerindeki farklılıkların sağlıklı bir şekilde karşılaştırılamayacağı öngörüldüğünden, moleküler analizler için ekstrakt uygulamalarında 0.5 ve 1.0 mg/mL, Talendo uygulamalarında ise 0.1, 0.2 ve 0.3 mg/mL konsantrasyonlarının kullanılması kararlaştırılmıştır.

4.3.2 *Fusarium culmorum*

Bitki ekstraktları *F. culmorum* fungusuna 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ve 2.5 mg/mL olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda uygulanmıştır. Uygulama sonrası 4 günlük (Şekil 4.20) ve 7 günlük (Şekil 4.21) kültürlerin miselyal büyüme oranları ölçülmüştür.

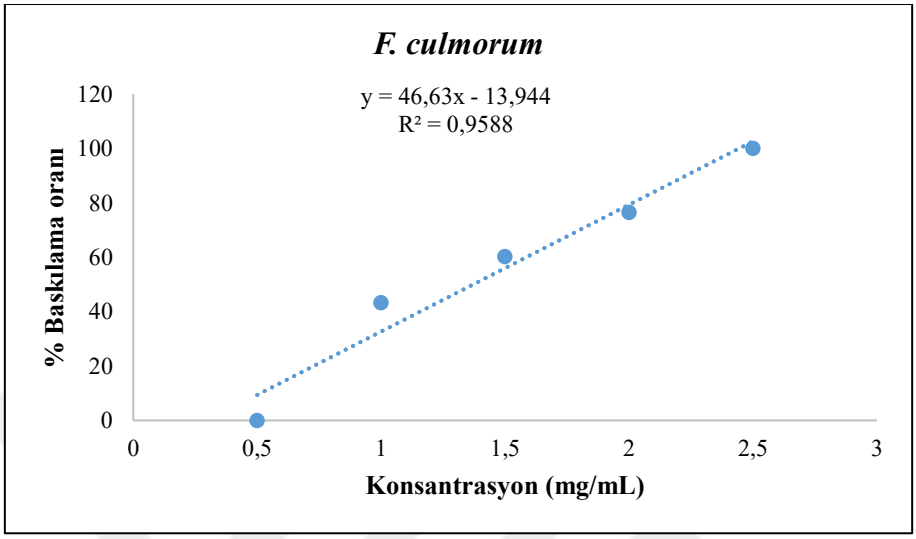


Şekil 4.20 *A. hierochuntica* ekstraktı uygulanmış 4 günlük *F. culmorum* kültürleri (A. Kontrol, B. 0.5 mg/mL ekstrakt, C. 1.0 mg/mL ekstrakt, D. 1.5 mg/mL ekstrakt, E. 2.0 mg/mL ekstrakt, F. 2.5 mg/mL ekstrakt)



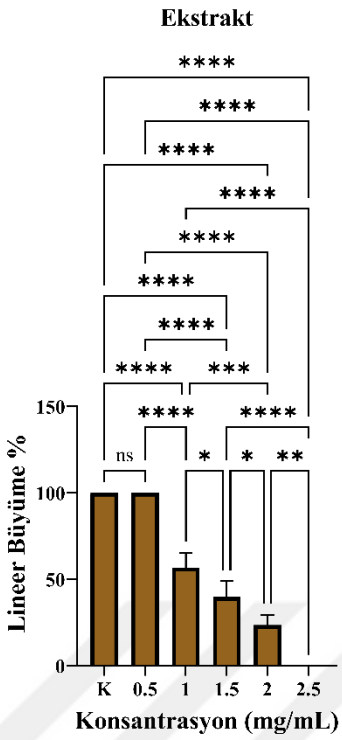
Şekil 4.21 *A. hierochuntica* ekstraktı uygulanmış 7 günlük *F. culmorum* kültürleri (A. Kontrol, B. 0.5 mg/mL ekstrakt, C. 1.0 mg/mL ekstrakt, D. 1.5 mg/mL ekstrakt, E. 2.0 mg/mL ekstrakt, F. 2.5 mg/mL ekstrakt)

A. hierochuntica ekstraktının *F. culmorum* üzerindeki etkileri doz-yanıt grafiği (Şekil 4.22) üzerinden hesaplanarak belirlenmiştir. *F. culmorum*'da ekstraktın EC_{50} değeri 1.369 ± 0.056 mg/mL olarak ve MİK değeri 2.444 ± 0.019 mg/mL olarak hesaplanmıştır.



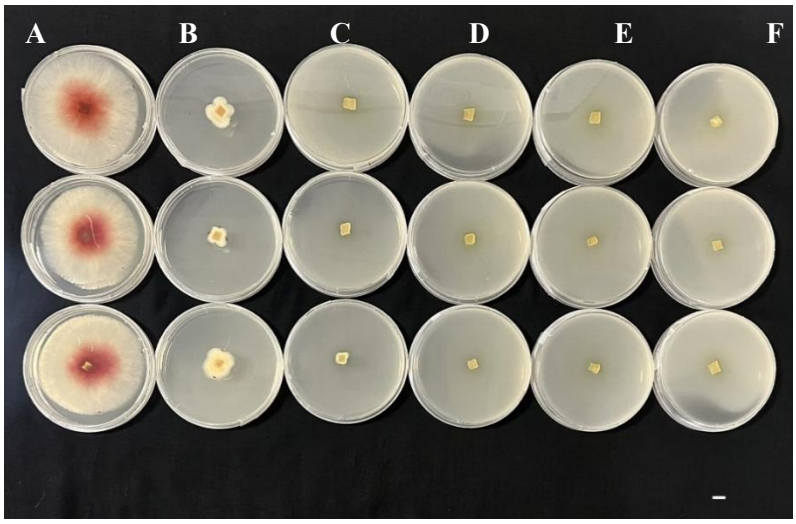
Şekil 4.22 *F. culmorum*'un *A. hierochuntica* ekstraktına karşı doz-yanıt grafiği

Konsantrasyona bağlı büyüme oranındaki değişimin istatistiksel açıdan anlamlılığı tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirilmiş ve gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir ($p<0.0001$). Kontrol grubu ile dört farklı doza göre büyüme oranı karşılaştırıldığında (1.0 mg/mL, 1.5 mg/mL, 2.0 mg/mL, 2.5 mg/mL), 0.5 mg/mL ile dört farklı grup karşılaştırıldığında (1.0 mg/mL, 1.5 mg/mL, 2.0 mg/mL, 2.5 mg/mL), 1.0-2.5 mg/mL ve 1.5-2.5 mg/mL karşılaştırıldığında aralarında son derece yüksek anlamlılık olduğu görülmüştür ($p<0.0001$). 1.0-2.0 mg/mL karşılaştırıldığında yüksek derece anlamlılık ($p<0.0002$) olduğu tespit edilmiştir. 2.0-2.5 mg/mL karşılaştırıldığında ($p<0.003$), 1.0-1.5 mg/mL ve 1.5-2.0 mg/mL karşılaştırıldığında ($p<0.0395$) ise anlamlı bir farklılık olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23).

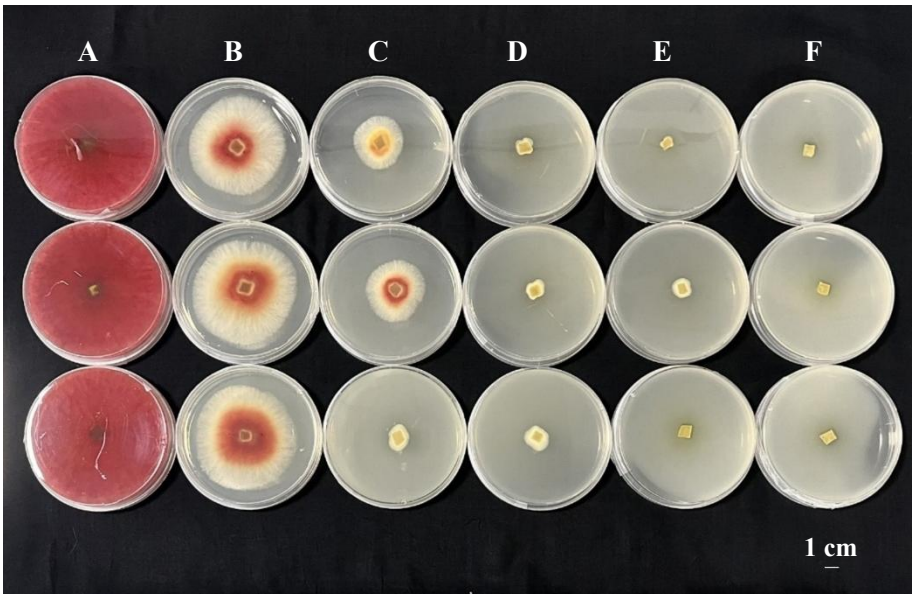


Şekil 4.23 *A. hierochuntica* ekstraktının farklı konsantrasyonlarının *F. culmorum*'un büyümesi üzerindeki etkisi (*****p<0.0001, ***p<0.0002, **p<0.003, *p<0.0395, ns,* anlamlılık yok)

Pozitif kontrol olarak Talendo fungusiti de *F. culmorum* fungusuna uygulanmıştır. Farklı Talendo konsantrasyonlarının (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL) 4 günlük (Şekil 4.24) ve 7 günlük (4.25) miselyal büyüme oranları ölçülmüştür.

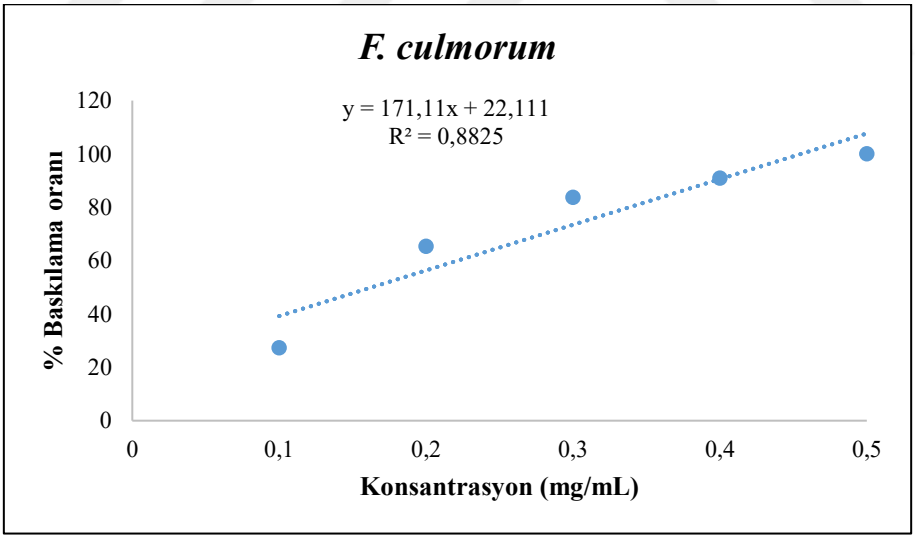


Şekil 4.24 Talendo uygulanmış 4 günlük *F. culmorum* kültürleri (A. Kontrol, B. 0.1 mg/mL, C. 0.2 mg/mL, D. 0.3 mg/mL, E. 0.4 mg/mL, F.0.5 mg/mL)



Şekil 4.25 Talendo uygulanmış 7 günlük *F. culmorum* kültürleri (A. Kontrol, B. 0.1 mg/mL, C. 0.2 mg/mL, D. 0.3 mg/mL, E. 0.4 mg/mL, F.0.5 mg/mL)

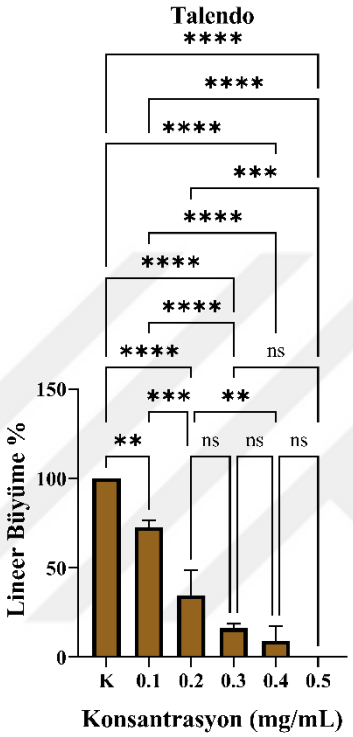
Talendo'nun *F. culmorum* üzerindeki etkileri doz-yanıt grafiği (Şekil 4.26) üzerinden hesaplanarak belirlenmiştir. EC50 değeri 0.162 ± 0.034 mg/mL olarak ve MİK değeri 0.455 ± 0.023 mg/mL olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.26 *F. culmorum*'un Talendo'ya karşı doz-yanıt grafiği

Konsantrasyona bağlı büyüme oranındaki değişimin istatistiksel açıdan anlamlılığı tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirilmiş ve gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir ($p<0.0001$). Anlamlı farklılıkların hangi konsantrasyon grupları arasında gerçekleştiğini ortaya koymak amacıyla uygulanan Tukey çoklu karşılaştırma testi sonucunda (Şekil 4.27); kontrol grubu ile dört farklı doza göre

büyüme oranı karşılaştırıldığında (0.2 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.5 mg/mL) ve 0.1 mg/mL ile üç farklı doz (0.3 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.5 mg/mL) karşılaştırıldığında aralarında son derece yüksek anlamlılık olduğu görülmüştür ($p<0.0001$). 0.1-0.2 mg/mL ve 0.2-0.5 mg/mL karşılaştırıldığında aralarında yüksek anlamlılık olduğu belirlenmiştir ($p<0.0005$). Kontrol ile 0.1 mg/mL ve 0.2-0.4 mg/mL karşılaştırıldığında da ($p<0.0065$) anlamlı bir fark tespit edilmiştir.



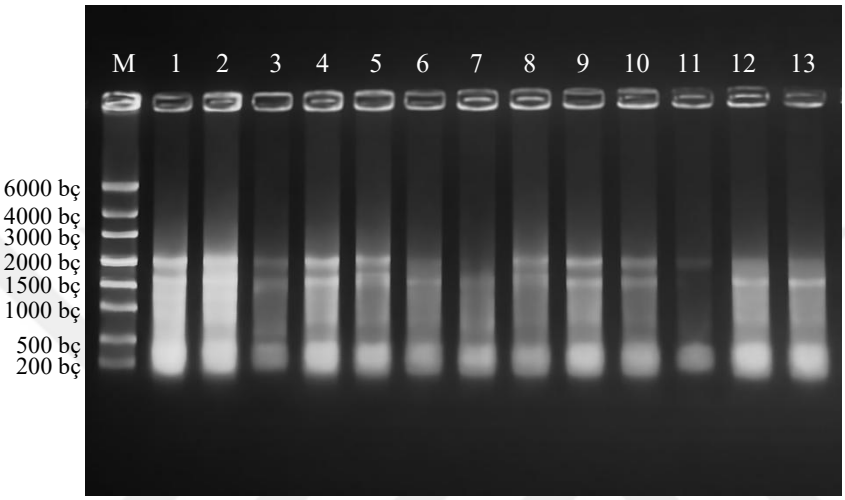
Şekil 4.27 Talendo'nun farklı konsantrasyonlarının *F. culmorum*'un büyümesi üzerindeki etkisi (****$p<0.0001$, ***$p<0.0005$, **$p<0.0065$, ns, anlamlılık yok)

Tüm değerlendirmeler sonucunda, *F. culmorum* için ekstrakt uygulanan konsantrasyonlar arasında en yüksek inhibisyonun 2.0 mg/mL konsantrasyonda gözlendiği, Talendo uygulanan konsantrasyonlar arasında ise en yüksek inhibisyonun 0.4 mg/mL konsantrasyonda ortaya çıktığı belirlenmiştir. Ancak bu konsantrasyonlardan elde edilen örneklerden yeterli miktarda RNA izolasyonu gerçekleştirilemeyeceği ve konsantrasyonlar arasında gen anlatımı düzeylerindeki farklılıkların sağlıklı bir şekilde karşılaştırılamayacağı öngörüldüğünden, moleküler analizler için ekstrakt uygulamalarında 0.5 ve 1.0 mg/mL, Talendo uygulamalarında ise 0.1, 0.2 ve 0.3 mg/mL konsantrasyonlarının kullanılması kararlaştırılmıştır.

4.4 Moleküler Analizler

4.4.1 Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen total RNA izolasyonu sonucunda elde edilen RNA örneklerinin bütünlüğü ve kalitesi agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. Jel görüntülerinde bantlarının belirgin ve bozulma göstermeden izlenmesi, RNA bütünlüğünün korunduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.28).



Şekil 4.28 Total RNA izolasyonu için agaroz jel elektroforez analizi (M, RNA Markırı; 1-7, *F. culmorum*: 1. Kontrol, 2. 0.5 mg/mL ekstrakt, 3. 1.0 mg/mL ekstrakt, 4. 1.5 mg/mL ekstrakt, 5. 0.1 mg/mL Talendo, 6. 0.2 mg/mL Talendo, 7. 0.3 mg/mL Talendo), 8-13 F. *graminearum*: 8. Kontrol, 9. 0.5 mg/mL ekstrakt, 10. 1.0 mg/mL ekstrakt, 11. 0.1 mg/mL Talendo, 12. 0.2 mg/mL Talendo, 13. 0.3 mg/mL Talendo)

Spektrofotometrik analiz sonuçlarına göre, izole edilen total RNA örneklerinin saflık oranları 1.9-2.0 aralığında bulunmuş olup, bu değerler yüksek saflıkta RNA elde edildiğini göstermektedir. Ayrıca RNA konsantrasyonlarının 0.5-2 µg/µL aralığında olduğu belirlenmiştir. Elde edilen kalite ve miktar değerleri, moleküler analizler için uygun nitelikte RNA izolasyonu gerçekleştirildiğini doğrulamıştır. Yüksek kaliteli total RNA örnekleri kullanılarak elde edilen cDNA'lar, gen anlatım analizlerinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

4.4.2 Gen Anlatım Analizleri

Çalışmada genlere ait anlatım düzeyleri, *F. graminearum* ve *F.culmorum* izolatlarında $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Genlere ait erime

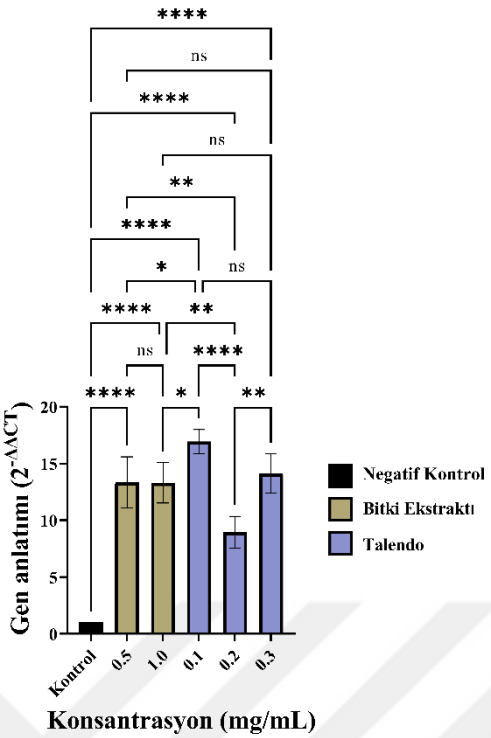
eğrisine (melt curve) ait grafikler, Ek A bölümünde Ek Şekil A.1-A.11 olarak verilmiştir. Sonuçlara tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve çoklu karşılaştırma için Tukey testi uygulanmıştır.

F. culmorum izolatında *CAT* genine ait qPCR amplifikasyonlarında ortalama Ct değerlerinin 35-36 aralığında olması ve güvenilir kantifikasyon sınırlarının dışında kalması nedeniyle, bu türe ait *CAT* gen anlatım verileri değerlendirmeye alınmamıştır. *CAT* genine ait tüm analizler, *F. graminearum* üzerinden yürütülmüştür.

F. graminearum'da *CAT* gen anlatımı kontrole göre değerlendirildiğinde, 0.5 mg/mL ekstrakt için 13.346 ± 2.240, 1.0 mg/mL ekstrakt için 13.294 ± 1.788, 0.1 Talendo için 16.924 ± 1.062, 0.2 mg/mL Talendo için 8.947 ± 1.407 ve 0.3 mg/mL Talendo için 14.125 ± 1.711 kat artış olduğu belirlenmiştir.

F. graminearum'da *CAT* gen anlatım seviyelerinin uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 4.29). Tukey çoklu karşılaştırma testine göre kontrol grubu–0.5 mg/mL ekstrakt, kontrol grubu–1.0 mg/mL ekstrakt, kontrol grubu–0.1 mg/mL Talendo, kontrol grubu–0.2 mg/mL Talendo ve kontrol grubu–0.3 mg/mL Talendo ile birlikte 0.1-0.2 mg/mL Talendo grupları karşılaştırıldığında aralarında yüksek derecede anlamlılık olduğu görülmüştür ($p<0.0001$). 0.5 mg/mL ekstrakt-0.2 mg/mL Talendo grubu, 1.0 mg/mL ekstrakt-0.2 mg/mL Talendo grubu, 0.2-0.3 mg/mL Talendo grupları karşılaştırıldığında ($p<0.0095$) ve 0.5 mg/mL–0.1 mg/mL Talendo ve 1.0 mg/mL ekstrakt–0.1 mg/mL Talendo grupları karşılaştırıldığında da ($p<0.0405$) aralarında anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir.

Ekstrakt uygulamalarında gen anlatımının en yüksek olduğu konsantrasyon 0.5 mg/mL (13.346 ± 2.240 kat) ve Talendo uygulamalarında gen anlatımının en yüksek olduğu konsantrasyon 0.1 mg/mL (16.924 ± 1.062) olarak belirlenmiştir. 0.5 mg/mL'lik uygulamadaki gen anlatımı 0.1 mg/mL'lik Talendo uygulamasına göre değerlendirildiğinde (aralarındaki anlamlılık düzeyi $p<0.0405$) ekstrakt uygulamasında gen anlatımının, Talendo uygulamasına kıyasla 1.268 kat daha düşük olduğu bulunmuştur.



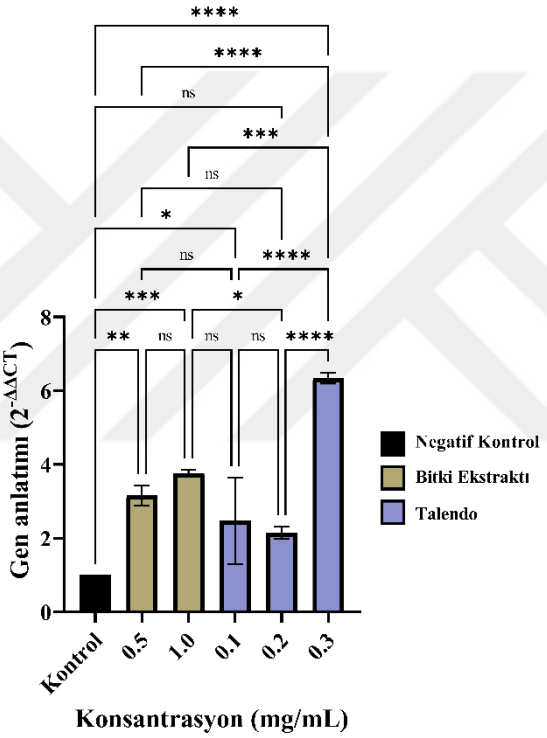
Şekil 4.29 *F. graminearum* izolatında *CAT* genine ait gen anlatım düzeyleri (****$p<0.0001$, **$p<0.0095$, *$p<0.0405$, ns, anlamlılık yok)

F. graminearum'da *hog1* gen anlatımı kontrole göre değerlendirildiğinde, 0,5 mg/mL ekstrakt uygulamasında 3.155 ± 0.266 kat, 1.0 mg/mL ekstrakt uygulamasında 3.767 ± 0.087 kat, 0.1 mg/mL Talendo uygulamasında 2.474 ± 1.177 kat, 0.2 mg/mL Talendo uygulamasında 2.144 ± 0.168 kat ve 0.3 mg/mL Talendo uygulamasında 6.342 ± 0.148 kat artış olduğu belirlenmiştir.

F. graminearum'da *hog1* gen anlatım düzeyleri, tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile değerlendirilmiş ve uygulama grupları arasında istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 4.30). Tukey çoklu karşılaştırma testine göre, kontrol grubu-0.3 mg/mL Talendo, 0.5 mg/mL ekstrakt-0.3 mg/mL Talendo, 0.1 mg/mL-0.3 mg/mL Talendo, ve 0.2 mg/mL-0.3 mg/mL Talendo, uygulama grupları arasındaki karşılaştırmalarda yüksek derecede anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0.0001$). Ayrıca, kontrol-1.0 mg/mL ekstrakt ve 1.0 mg/mL ekstrakt-0.3 mg/mL Talendo grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmiştir ($p<0.0005$). Kontrol-0.5 mg/mL ekstrakt grupları arasındaki karşılaştırmada anlamlılık düzeyi ($p<0.0022$) olarak belirlenirken, kontrol-0.1 mg/mL Talendo ve 1.0 mg/mL ekstrakt-0.2

mg/mL Talendo grupları arasında daha düşük düzeyde ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır (*p<0.0338*).

Ekstrakt uygulamalarında gen anlatımının en yüksek olduğu konsantrasyon 1.0 mg/mL (3.767 ± 0.087) ve Talendo uygulamalarında gen anlatımının en yüksek olduğu konsantrasyon 0.3 mg/mL (6.342 ± 0.148) olarak belirlenmiştir. 1.0 mg/mL'lik uygulamadaki gen anlatımı 0.3 mg/mL'lik Talendo uygulamasına göre değerlendirildiğinde (aralarındaki anlamlılık düzeyi *p<0.0005*) ekstrakt uygulamasında gen anlatımının, Talendo uygulamasına kıyasla 1.684 kat daha düşük olduğu tespit edilmiştir.



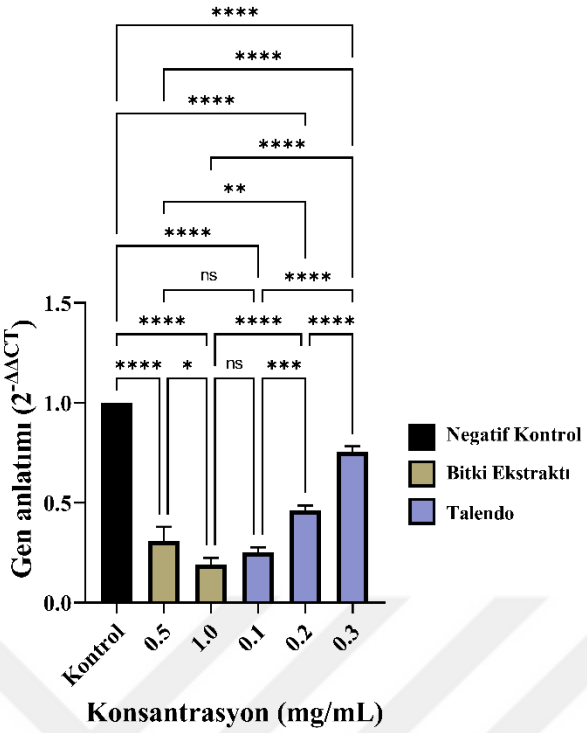
Şekil 4.30 *F. graminearum* izolatında *hog1* genine ait gen anlatım düzeyleri (****p<0.0001*, ***p<0.0005*, **p<0.0022, *p<0.0338,* ns, anlamlılık yok)

F. culmorum'da *hog1* gen anlatımı kontrole göre değerlendirildiğinde, 0.5 mg/mL ekstrakt için 0.309 ± 0.070 kat, 1.0 mg/mL ekstrakt için 0.192 ± 0.032 kat, 0.1 mg/mL Talendo için 0.252 ± 0.025 kat, 0.2 mg/mL Talendo için 0.464 ± 0.023 kat ve 0.3 mg/mL Talendo için 0.756 ± 0.027 kat olarak belirlenmiştir.

F. culmorum'da *hog1* gen anlatım seviyelerinin incelenmesi, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiş ve uygulama grupları arasında istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir (*p<0.0001*) (Şekil

4.31). Tukey çoklu karşılaştırma testine göre kontrol grubu–0.5 mg/mL ekstrakt, kontrol grubu–1.0 mg/mL ekstrakt, kontrol grubu-0.1 mg/mL Talendo, kontrol grubu-0.2 mg/mL Talendo ve kontrol grubu-0.3 mg/mL Talendo grupları karşılaştırıldığında aralarında yüksek derecede anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür ($p<0.0001$). Ayrıca 0.5 mg/mL ekstrakt-0.3 mg/mL Talendo, 1.0 mg/mL ekstrakt-0.2 mg/mL Talendo, 1.0 mg/mL ekstrakt-0.3 mg/mL Talendo, 0.1-0.3 mg/mL Talendo ve 0.2-0.3 mg/mL Talendo grupları arasındaki karşılaştırmalarda da istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p<0.0001$). 0.1-0.2 mg/mL Talendo grupları arasındaki karşılaştırmada anlamlılık ($p<0.0002$) olarak belirlenirken, 0.5-0.2 mg/mL Talendo ($p<0.0022$) ve 0.5-1.0 mg/mL ekstrakt ($p<0.0175$) grupları arasındaki karşılaştırmalarda ise istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır.

Ekstrakt uygulamalarında gen anlatımının en düşük olduğu konsantrasyon 1.0 mg/mL (0.192 ± 0.032), Talendo uygulamalarında gen anlatımının en düşük olduğu konsantrasyon 0.1 mg/mL (0.252 ± 0.025) olarak belirlenmiştir. Aralarında anlamlılık düzeyi bulunmadığı için 1.0 mg/mL'lik uygulamadaki gen anlatımı 0.2 mg/mL'lik (0.464 ± 0.023) Talendo uygulamasına göre (aralarındaki anlamlılık düzeyi $p<0.0001$) kıyaslanmıştır ve ekstrakt uygulamasında gen anlatımının, Talendo uygulamasına kıyasla 2.417 kat daha düşük olduğu bulunmuştur.



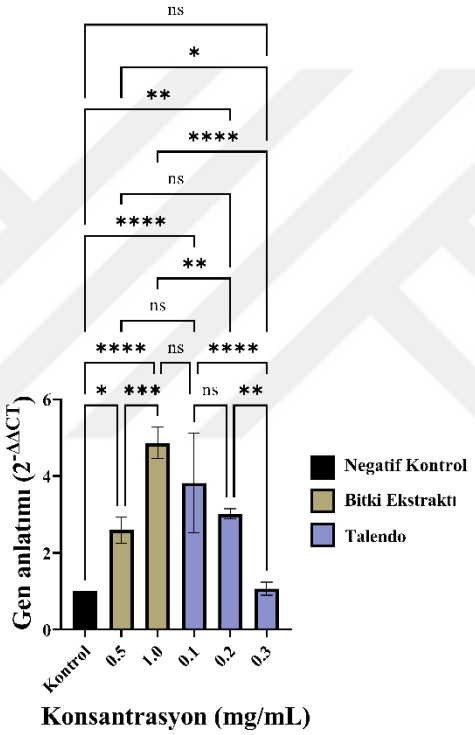
Şekil 4.31 *F. culmorum* izolatında *hog1* genine ait gen anlatım düzeyleri (*****p<0.0001*, ****p<0.0002*, ***p<0.0022,* **p<0.0175,* ns, anlamlılık yok)

F. graminearum'da *mst20* gen anlatımı kontrole göre değerlendirildiğinde, 0.5 mg/mL ekstrakt uygulamasında 2.591 ± 0.342 kat, 1.0 mg/mL ekstrakt uygulamasında 4.858 ± 0.408 kat, 0.1 mg/mL Talendo uygulamasında 3.818 ± 1.290 kat, 0.2 mg/mL Talendo uygulamasında 3.017 ± 0.131 kat artış belirlenirken, 0.3 mg/mL Talendo uygulamasında gen anlatımının 1.065 ± 0.171 kat ile sınırlı kaldığı tespit edilmiştir.

F. graminearum'da *mst20* gen anlatım düzeyleri, tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile değerlendirilmiş ve uygulama grupları arasında istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir (*p<0.0001*) (Şekil 4.32). Tukey çoklu karşılaştırma testine göre, kontrol grubu-1.0 mg/mL ekstrakt, kontrol grubu-0.1 mg/mL Talendo, 1.0 mg/mL ekstrakt-0.3 mg/mL Talendo ve 0.1-0.3 mg/mL Talendo grupları arasında yüksek derecede anlamlı farklılıklar saptanmıştır (*p<0.0001*). 0.5-1.0 mg/mL ekstrakt grupları arasındaki karşılaştırmada da anlamlı farklılık gözlenmiştir (*p<0.0003*). Ayrıca, kontrol-0.2 mg/mL Talendo, 1.0 mg/mL ekstrakt-0.2 mg/mL Talendo ve 0.2-0.3 mg/mL Talendo grupları arasındaki karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlenmiştir (*p<0.0031*). Kontrol-0.5 mg/mL ekstrakt ve 0.5 mg/mL

ekstrakt-0.3 mg/mL Talendo grupları arasındaki karşılaştırmalarda ise daha düşük düzeyde ancak anlamlı farklılıklar saptanmıştır (*p<0.0158*).

Ekstrakt uygulamalarında gen anlatımının en yüksek olduğu konsantrasyon 1.0 mg/mL (4.858 ± 0.408) ve Talendo uygulamalarında gen anlatımının en yüksek olduğu konsantrasyon 0.1 mg/mL (3.818 ± 1.290) olarak belirlenmiştir. Aralarında anlamlılık düzeyi bulunmadığı için 1.0 mg/mL'lik uygulamadaki gen anlatımı 0.2 mg/mL'lik (3.017 ± 0.131) Talendo uygulamasına göre (aralarındaki anlamlılık düzeyi *p<0.0031*) kıyaslanmıştır ve ekstrakt uygulamasında gen anlatımı, Talendo uygulamasına kıyasla 1.610 kat daha yüksek bulunmuştur.



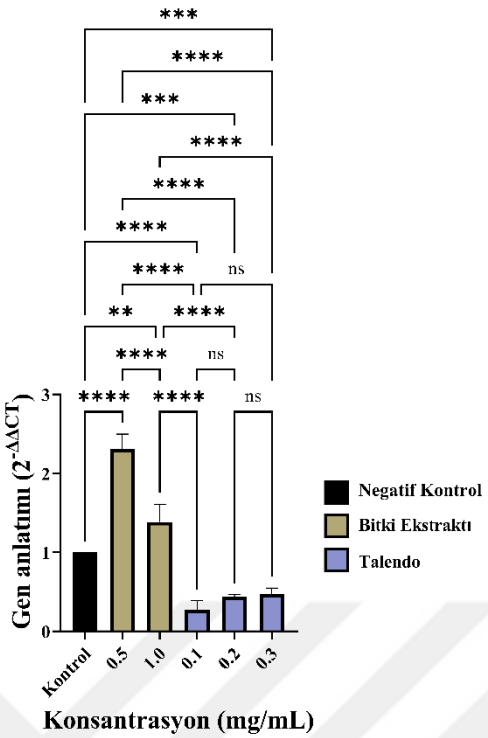
Şekil 4.32 *F. graminearum* izolatında *mst20* genine ait gen anlatım düzeyleri (****p<0.0001*, ***p< 0.0003*, **p<0.0031, *p<0.0158,* ns, anlamlılık yok)

F. culmorum'da *mst20* gen anlatımı kontrole göre değerlendirildiğinde, 0.5 mg/mL ekstrakt için 2.310 ± 0.189 kat, 1.0 mg/mL ekstrakt için 1.385 ± 0.227 kat, 0.1 mg/mL Talendo için 0.276 ± 0.112 kat, 0.2 mg/mL Talendo için 0.435 ± 0.033 kat ve 0.3 mg/mL Talendo için 0.476 ± 0.074 kat olarak belirlenmiştir.

F. culmorum'da *mst20* gen anlatım seviyelerinin incelenmesi, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiş ve uygulama grupları arasında istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir (*p<0.0001*) (Şekil

4.33). Tukey çoklu karşılaştırma testine göre kontrol grubu-0.5 mg/mL ekstrakt ve kontrol grubu-0.1 mg/mL Talendo grupları karşılaştırıldığında aralarında yüksek derecede anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür ($p<0.0001$). Ayrıca 0.5-1.0 mg/mL ekstrakt, 0.5 mg/mL ekstrakt-0.1 mg/mL Talendo, 0.5 mg/mL ekstrakt-0.2 mg/mL Talendo, 0.5 mg/mL ekstrakt-0.3 mg/mL Talendo, 1.0 mg/mL ekstrakt-0.1 mg/mL Talendo, 1.0 mg/mL ekstrakt-0.2 mg/mL Talendo ve 1.0 mg/mL ekstrakt-0.3 mg/mL Talendo grupları arasındaki karşılaştırmalarda da istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p<0.0001$). Kontrol-0.2 mg/mL Talendo ve kontrol-0.3 mg/mL Talendo grupları arasındaki karşılaştırmalarda anlamlı farklılıklar belirlenmiştir ($p<0.0003$). Kontrol-1.0 mg/mL ekstrakt grupları karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ($p<0.0076$).

Ekstrakt uygulamalarında gen anlatımının en yüksek olduğu konsantrasyon 0.5 mg/mL (2.310 ± 0.189) ve Talendo uygulamalarında gen anlatımının en yüksek olduğu konsantrasyon 0.3 mg/mL (0.476 ± 0.074) olarak belirlenmiştir. 0.5 mg/mL'lik uygulamadaki gen anlatımı 0.3 mg/mL'lik Talendo uygulamasına göre değerlendirildiğinde (aralarındaki anlamlılık düzeyi $p<0.0001$) ekstrakt uygulamasında gen anlatımı, Talendo uygulamasına kıyasla 4.853 kat daha yüksek bulunmuştur.



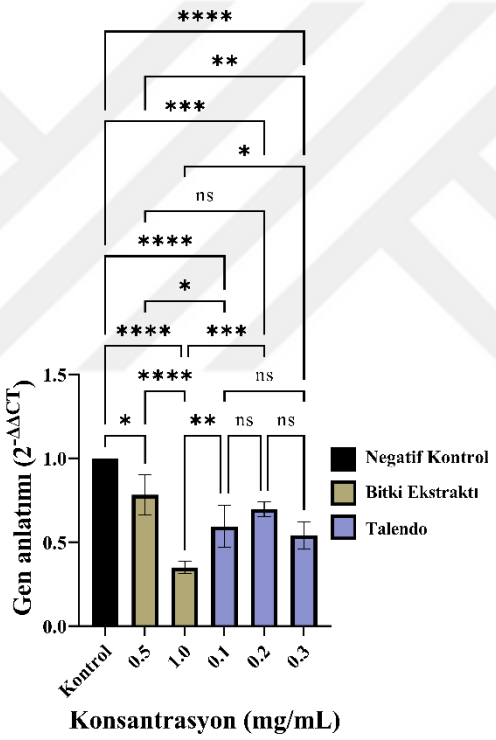
Şekil 4.33 *F. culmorum* izolatında *mst20* genine ait gen anlatım düzeyleri (*****p<0.0001*, ****p< 0.0003*, ***p<0.0076,* ns, anlamlılık yok)

F. graminearum'da *atg5* gen anlatımı kontrole göre değerlendirildiğinde, 0.5 mg/mL ekstrakt için 0.782 ± 0.119 kat, 1.0 mg/mL ekstrakt için 0.349 ± 0.036 kat, 0.1 mg/mL Talendo için 0.594 ± 0.127 kat, 0.2 mg/mL Talendo için 0.697 ± 0,043 kat ve 0.3 mg/mL Talendo için 0.540 ± 0.082 kat olarak belirlenmiştir.

F. graminearum'da *atg5* gen anlatım seviyelerinin incelenmesi, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiş ve uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir (*p<0.0001*) (Şekil 4.34). Tukey çoklu karşılaştırma testine göre kontrol grubu-1.0 mg/mL ekstrakt, kontrol grubu-0.1 mg/mL Talendo, kontrol grubu-0.3 mg/mL Talendo ve 0.5-1.0 mg/mL ekstrakt grupları karşılaştırıldığında aralarında yüksek derecede anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür (*p<0.0001*). Ayrıca kontrol-0.2 mg/mL Talendo ve 1.0 mg/mL ekstrakt-0.2 mg/mL Talendo grupları arasındaki karşılaştırmalarda da istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır (*p<0.0007*). 0.5 mg/mL ekstrakt-0.3 mg/mL Talendo ve 1.0 mg/mL ekstrakt-0.1 mg/mL Talendo grupları karşılaştırıldığında anlamlı farklılıklar belirlenmiştir (*p<0.0064*). Kontrol-0.5 mg/mL ekstrakt, 0.5 mg/mL ekstrakt-0.1 mg/mL Talendo ve 1.0 mg/mL ekstrakt-0.3 mg/mL Talendo

grupları arasındaki karşılaştırmalarda ise daha düşük düzeyde ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (*p<0.0446*).

Ekstrakt uygulamalarında gen anlatımının en düşük olduğu konsantrasyon 1.0 mg/mL (0.349 ± 0.036), Talendo uygulamalarında gen anlatımının en düşük olduğu konsantrasyon 0.3 mg/mL (0.540 ± 0.082) olarak belirlenmiştir. 1.0 mg/mL'lik uygulamadaki gen anlatımı, 0.3 mg/mL'lik Talendo uygulamasına göre değerlendirildiğinde (aralarındaki anlamlılık düzeyi *p<0.0446*) ekstrakt uygulamasında gen anlatımının, Talendo uygulamasına kıyasla 1.547 kat daha düşük olduğu görülmüştür.



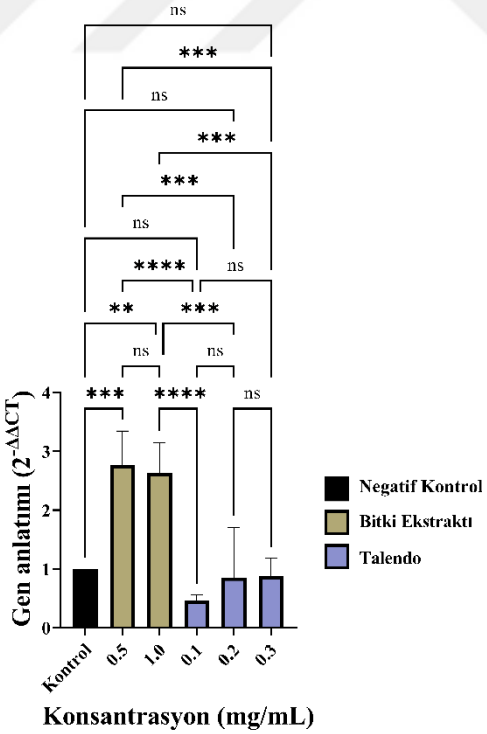
Şekil 4.34 *F. graminearum* izolatında *atg5* genine ait gen anlatım düzeyleri (****p<0.0001*, ***p<0.0007*, **p<0.0064, *p<0.0446,* ns, anlamlılık yok)

F. culmorum'da *atg5* gen anlatımı kontrole göre değerlendirildiğinde, 0.5 mg/mL ekstrakt için 2.768 ± 0.578 kat, 1.0 mg/mL ekstrakt için 2.632 ± 0.519 kat, 0.1 mg/mL Talendo için 0.460 ± 0.098 kat, 0.2 mg/mL Talendo için 0.858 ± 0.853 kat ve 0.3 mg/mL Talendo için 0.882 ± 0.302 kat olarak belirlenmiştir.

F. culmorum'da *atg5* gen anlatım seviyelerinin incelenmesi, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiş ve uygulama grupları arasında istatistiksel

olarak anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir (*p<0.0001*) (Şekil 4.35). Tukey çoklu karşılaştırma testine göre 0.5 mg/mL ekstrakt-0.1 mg/mL Talendo ve 1.0 mg/mL ekstrakt -0.1 mg/mL Talendo grupları arasındaki karşılaştırmalarda yüksek derecede anlamlı farklılıklar saptanmıştır (*p<0.0001*). Ayrıca kontrol-0.5 mg/mL ekstrakt, 0.5 mg/mL ekstrakt-0.2 mg/mL Talendo, 0.5 mg/mL ekstrakt-0.3 mg/mL Talendo, 1.0 mg/mL ekstrakt-0.2 mg/mL Talendo ve 1.0 mg/mL ekstrakt-0.3 mg/mL Talendo grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (*p<0.0010*). Kontrol-1.0 mg/mL ekstrakt grupları arasındaki karşılaştırmada ise anlamlılık düzeyi *p<0.0020* olarak belirlenmiştir.

Ekstrakt uygulamalarında gen anlatımının en yüksek olduğu konsantrasyon 0.5 mg/mL (2.768 ± 0.578) ve Talendo uygulamalarında gen anlatımının en yüksek olduğu konsantrasyon 0.3 mg/mL (0.882 ± 0.302) olarak belirlenmiştir. 0.5 mg/mL'lik uygulamadaki gen anlatımı 0.3 mg/mL'lik Talendo uygulamasına göre değerlendirildiğinde (aralarındaki anlamlılık düzeyi *p<0.0010*) ekstrakt uygulamasında gen anlatımı, Talendo uygulamasına kıyasla 3.138 kat daha yüksek bulunmuştur.

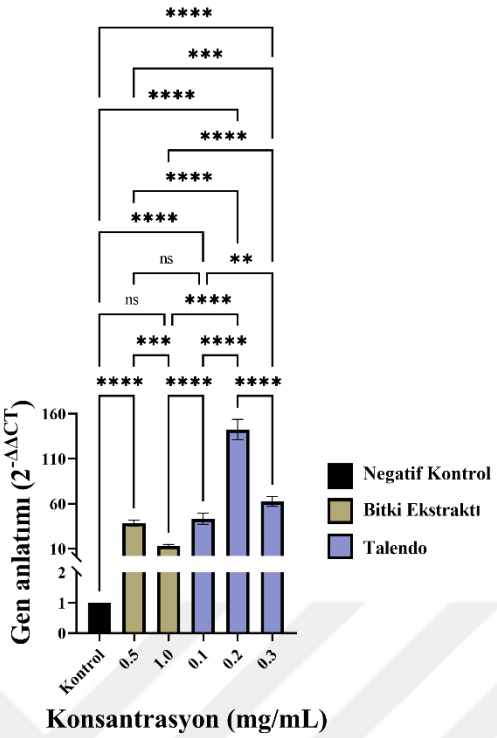


Şekil 4.35 *F. culmorum* izolatında *atg5* genine ait gen anlatım düzeyleri (****p<0.0001*, ***p<0.0010*, **p<0.0020,* ns, anlamlılık yok)

F. graminearum'da *stuA* gen anlatımı kontrole göre değerlendirildiğinde, 0.5 mg/mL ekstrakt için 38.642 ± 3.261 kat, 1.0 mg/mL ekstrakt için 13.290 ± 1.651 kat, 0.1 mg/mL Talendo için 43.475 ± 6.182 kat, 0.2 mg/mL Talendo için 142.453 ± 11.397 kat ve 0.3 mg/mL Talendo için 62.768 ± 5.464 kat olarak belirlenmiştir. $p<0.0001$

F. graminearum'da *stuA* gen anlatım seviyelerinin incelenmesi, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiş ve uygulama grupları arasında istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 4.36). Tukey çoklu karşılaştırma testine göre kontrol grubu-0.5 mg/mL ekstrakt, kontrol grubu-0.1 mg/mL Talendo, kontrol grubu-0.2 mg/mL Talendo ve kontrol grubu-0.3 mg/mL Talendo grupları karşılaştırıldığında aralarında yüksek derecede anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür ($p<0.0001$). Ayrıca 0.5 mg/mL ekstrakt-0.2 mg/mL Talendo, 1.0 mg/mL ekstrakt-0.1 mg/mL Talendo, 1.0 mg/mL ekstrakt-0.2 mg/mL Talendo, 1.0 mg/mL ekstrakt-0.3 mg/mL Talendo, 0.1-0.2 mg/mL Talendo ve 0.2-0.3 mg/mL Talendo grupları arasındaki karşılaştırmalarda da istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p<0.0001$). 0.5-1.0 mg/mL ekstrakt ve 0.5 mg/mL ekstrakt-0.3 mg/mL Talendo grupları arasındaki karşılaştırmalarda anlamlı farklılıklar belirlenmiştir ($p<0.0002$). 0.1-0.3 mg/mL Talendo grupları karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ($p<0,0026$).

Ekstrakt uygulamalarında gen anlatımının en yüksek olduğu konsantrasyon 0.5 mg/mL (38.642 ± 3.261) ve Talendo uygulamalarında gen anlatımının en yüksek olduğu konsantrasyon 0.2 mg/mL (142.453 ± 11.397) olarak belirlenmiştir. 0.5 mg/mL'lik uygulamadaki gen anlatımı 0.2 mg/mL'lik Talendo uygulamasına göre değerlendirildiğinde (aralarındaki anlamlılık düzeyi $p<0.0001$) ekstrakt uygulamasında gen anlatımının, Talendo uygulamasına kıyasla 3.686 kat daha düşük olduğu bulunmuştur.



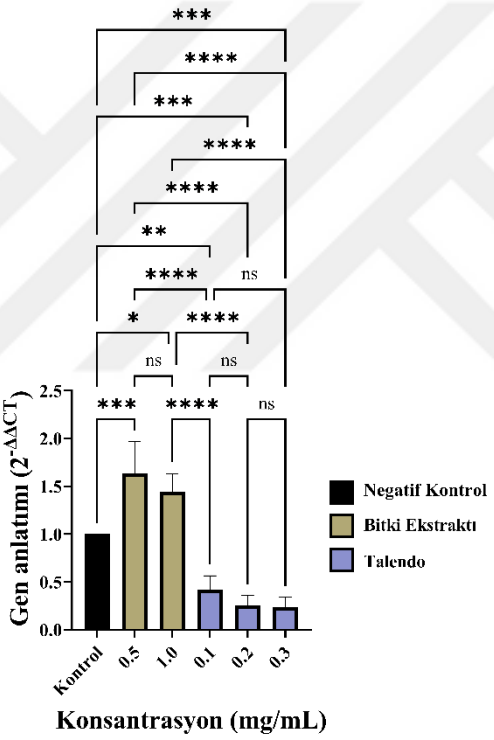
Şekil 4.36 *F. graminearum* izolatında *stuA* genine ait gen anlatım düzeyleri (*****p<0.0001*, ****p<0.0002*, ***p<0.0026,* ns, anlamlılık yok)

F. culmorum'da *stuA* gen anlatımı kontrole göre değerlendirildiğinde, 0.5 mg/mL ekstrakt için 1.639 ± 0.328 kat, 1.0 mg/mL ekstrakt için 1.441 ± 0.192 kat, 0.1 mg/mL Talendo için 0.416 ± 0.148 kat, 0.2 mg/mL Talendo için 0.253 ± 0.106 kat ve 0.3 mg/mL Talendo için 0.231 ± 0.108 kat olarak belirlenmiştir.

F. culmorum'da *stuA* gen anlatım seviyelerinin incelenmesi, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiş ve uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir (*p<0.0001*) (Şekil 4.37). Tukey çoklu karşılaştırma testine göre 0.5 mg/mL ekstrakt-0.1 mg/mL Talendo, 0.5 mg/mL ekstrakt-0.2 mg/mL Talendo, 0.5 mg/mL ekstrakt-0.3 mg/mL Talendo, 1.0 mg/mL ekstrakt-0.1 mg/mL Talendo, 1.0 mg/mL ekstrakt-0.2 mg/mL Talendo ve 1.0 mg/mL ekstrakt-0.3 mg/mL Talendo grupları arasındaki karşılaştırmalarda yüksek derecede anlamlı farklılıklar saptanmıştır (*p<0.0001*). Ayrıca kontrol grubu-0.5 mg/mL ekstrakt, kontrol grubu-0.2 mg/mL Talendo ve kontrol grubu-0.3 mg/mL Talendo grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür (*p<0.0009*). Kontrol-0.1 mg/mL Talendo grupları arasındaki karşılaştırmada anlamlılık düzeyi *p<0.0024* olarak belirlenirken, kontrol-1.0

mg/mL ekstrakt grupları arasındaki karşılaştırmada daha düşük düzeyde ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir (*p<0.0259*).

Ekstrakt uygulamalarında gen anlatımının en yüksek olduğu konsantrasyon 0.5 mg/mL (1.639 ± 0.328) ve Talendo uygulamalarında gen anlatımının en yüksek olduğu konsantrasyon 0.1 mg/mL (0.416 ± 0.148) olarak belirlenmiştir. 0.5 mg/mL'lik uygulamadaki gen anlatımı 0.1 mg/mL'lik Talendo uygulamasına göre değerlendirildiğinde (aralarındaki anlamlılık düzeyi *p<0.0001*) ekstrakt uygulamasında gen anlatımı, Talendo uygulamasına kıyasla 3.940 kat daha yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.37 *F. culmorum* izolatında *stuA* genine ait gen anlatım düzeyleri (****p<0.0001*, ***p<0.0009*, **p<0.0024, *p<0.0259,* ns, anlamlılık yok)

5
SONUÇ

Bu tez çalışmasında, *Anastatica hierochuntica* toz ekstraktı, literatürde oldukça sınırlı şekilde rapor edilen bir çözücü sistemi olan %50 izopropanol kullanılarak maserasyon yöntemiyle elde edilmiştir. *A. hierochuntica*'nın fitokimyasal çalışmalarında metanol/etanol/su temelli ekstraksiyonlar baskınken, izopropanol kullanımı sınırlı ve daha çok lipofilik fraksiyon/analitik süreçler bağlamında rapor edilmiştir [23, 115, 116]. Elde edilen ekstraksiyon veriminin %3.7 olarak hesaplanması, *A. hierochuntica*'nın sekonder metabolitler açısından orta düzeyde ekstrakt edilebilir bir bitkisel matrise sahip olduğunu göstermiştir.

A. hierochuntica ekstraktının total fenolik içeriğinin 92.802 ± 1.66 mg GAE/g olarak belirlenmesi, bitkinin fenolik bileşikler açısından zengin bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda *A. hierochuntica*'nın total fenolik içeriğinin kullanılan çözücü türüne, ekstraksiyon tekniğine ve bitkinin yetiştiği coğrafi koşullara bağlı olarak geniş bir aralıkta değiştiği bildirilmiştir [4, 20]. Özellikle polar çözücülerin fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda daha etkili olduğu ve daha yüksek fenolik verim sağladığı yaygın olarak vurgulanmıştır [117]. Bu çalışmada kullanılan %50 izopropanolün hem polar hem de yarı-polar özellik göstermesi, fenolik asitler ve flavonoidler gibi farklı polariteye sahip bileşiklerin birlikte etkin şekilde ekstrakte edilmesini sağlamaktadır. İzopropanol-su karışımlarının, fenolik bileşiklerin çözünürlüğünü artırarak ekstraksiyon verimliliğini yükselttiği daha önce farklı bitkiler üzerinde yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir [118, 119]. Ayrıca, konsantrasyona bağlı olarak total fenolik içeriğin istatistiksel açıdan anlamlı biçimde artması ($p<0.0001$), ekstraktın doz-yanıt ilişkisi sergilediğini ve biyolojik aktivite çalışmalarında güvenilir bir temel sunduğunu göstermiştir.

Total flavonoid içeriği ise 7.444 ± 1.449 mg KE/g olarak saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda *A. hierochuntica* flavonoid içeriğine ilişkin verilerin sınırlı olması nedeniyle, elde edilen bu sonuç bitkinin flavonoid profiline katkı sağlayan önemli bir bulgu olarak değerlendirilebilir. Flavonoidlerin çoğunlukla çözücü seçimine duyarlı bileşikler olduğu ve yarı-polar çözücülerin flavonoid ekstraksiyonunda daha etkili olduğu bildirilmiştir [4, 20]. Çalışmada flavonoid içeriğinin de konsantrasyona bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı biçimde arttığının gösterilmesi ($p<0.0001$), kullanılan ekstraksiyon yönteminin flavonoid bileşiklerin kazanımı açısından da etkili olduğunu ortaya koymuştur [119, 121]. Bu durum, *A. hierochuntica* ekstraktının antioksidan ve antifungal gibi biyolojik aktivitelerinin, yalnızca fenolik asitler değil aynı zamanda flavonoid bileşikler tarafından da desteklendiğini düşündürmüştür. Genel olarak değerlendirildiğinde, %50 izopropanol ile gerçekleştirilen maserasyon ekstraksiyonunun, *A. hierochuntica*'nın fenolik ve flavonoid bileşiklerce zengin bir ekstrakt elde edilmesine olanak sağladığı ve literatürde yaygın olarak kullanılan çözücülere kıyasla alternatif ve etkili bir yaklaşım sunduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmada, kolorimetrik yöntemlerle elde edilen toplam fenolik ve flavonoid içerik sonuçları, HPLC analiziyle spesifik bileşik düzeyinde doğrulanmıştır. Ayrıca, farklı biyolojik aktivitelere sahip çok sayıda fenolik bileşiğin aynı ekstrakt içerisinde birlikte tespit edilmesi, bitkinin çok yönlü bir biyolojik potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Analiz sonuçlarına göre ekstraktın başlıca fenolik bileşeni kafeik asit (5.447 ± 0.023 µg/mg) olarak belirlenmiş, bu sonucu polidatin (1.976 ± 0.018 µg/mg) ve kuersetin (1.376 ± 0,003 µg/mg) izlemiştir. Ayrıca hidroksitirosol, kateşin, eskuletin, ellagik asit ve resveratrol gibi biyolojik açıdan önemli fenolik bileşikler daha düşük konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. *A. hierochuntica* üzerinde gerçekleştirilen fitokimyasal çalışmalarda, fenolik bileşimin büyük ölçüde kullanılan çözücü türüne ve ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir. Metanol ve etanol bazlı ekstraktlarda sıklıkla kuersetin, kateşin ve kafeik asit türevlerinin baskın olduğu rapor edilmiştir [122, 123]. Bu çalışmada %50 izopropanol kullanılarak elde edilen ekstrakta kafeik asidin yüksek düzeyde saptanması, izopropanol–su karışımının özellikle fenolik asitlerin ekstraksiyonu açısından etkili bir çözücü sistemi olduğunu göstermiştir. Bu bulgu, izopropanolün

yarı-polar karakteri sayesinde farklı polariteye sahip fenolik bileşiklerin birlikte ekstrakte edilebildiğini bildiren çalışmalarla uyumludur [119].

Kafeik asidin ekstrakt içerisinde baskın bileşik olarak belirlenmesi, *A. hierochuntica*'nın güçlü antioksidan ve antifungal potansiyelini açıklayan önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Kafeik asidin ROS'ları süpürme, hücre duvarı biyosentezini baskılama ve fungal hücre membran bütünlüğünü bozma gibi mekanizmalar yoluyla antifungal etki gösterdiği daha önce birçok çalışmada rapor edilmiştir [40, 124]. Özellikle kafeik asit ve türevlerinin *Fusarium* türleri üzerinde büyüme baskılayıcı etki oluşturduğu, oksidatif stres mekanizmalarını tetikleyerek hücresel hasara yol açtığı bildirilmiştir [125]. Benzer şekilde, bu çalışmada yüksek düzeyde tespit edilen kuersetin ve polidatin gibi flavonoid ve stilben türevi bileşiklerin de antifungal ve antioksidan aktivitelere anlamlı katkı sağladığı literatürde yaygın olarak vurgulanmıştır. Kuersetinin fungal hücre zarında geçirgenlik artışına neden olduğu ve spor çimlenmesini baskıladığı; polidatinin ise özellikle oksidatif stresle ilişkili antifungal mekanizmaları güçlendirdiği bildirilmiştir [39, 126].

Resveratrol (0.136 ± 0.004 µg/mg) ve ellagik asit (0.344 ± 0.009 µg/mg) gibi bileşikler daha düşük konsantrasyonlarda tespit edilmiş olsa da, bu bileşiklerin yüksek biyolojik aktiviteye sahip olmaları nedeniyle ekstraktın toplam biyolojik etkisine anlamlı katkı sağlayabileceği düşünülmüştür. Özellikle resveratrolün antifungal etkinliği sinerjik mekanizmalar yoluyla artırabildiği ve düşük konsantrasyonlarda dahi hücresel sinyal yolaklarını etkileyebildiği çalışmalarda vurgulanmıştır [127, 128].

A. hierochuntica ekstraktının antioksidan kapasitesi ise serbest radikal süpürme yeteneğine dayalı DPPH ve ABTS yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. DPPH analizine göre ekstraktın antioksidan kapasitesi 3.950 ± 0.405 mg AAE/100 g olarak belirlenmiş, DPPH radikalinin %50 inhibisyonu için gerekli ekstrakt konsantrasyonu (IC_{50}) 3.329 ± 0.556 mg/mL olarak hesaplanmıştır. ABTS analizinde ise antioksidan kapasite 0.525 ± 0.027 mg AAE/100 g, IC_{50} değeri ise 2.447 ± 0.117 mg/mL olarak bulunmuştur. Her iki analizde de konsantrasyona bağlı değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.0001$). DPPH ve ABTS yöntemleri, farklı radikal türlerine dayalı olmaları nedeniyle antioksidan etkinliğin tamamlayıcı biçimde değerlendirilmesine olanak sağlamıştır. DPPH

yöntemi lipofilik serbest radikallere duyarlı iken ABTS yöntemi hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanların aktivitesini ölçebilmektedir [109, 111]. Bu çalışmada ABTS yönteminde elde edilen IC_{50} değerinin DPPH yöntemine kıyasla daha düşük olması, *A. hierochuntica* ekstraktının özellikle hidrofilik radikallere karşı daha yüksek süpürücü aktivite sergilediğini düşündürmüştür. Literatürde fenolik bileşiklerin ABTS radikali ile daha güçlü etkileşim gösterdiği, DPPH radikalinin inhibisyonu için ise genellikle daha yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir [5, 129]. Metanol ve etanol bazlı ekstraktlarda genellikle daha düşük IC_{50} değerleri bildirilmişken, yarı-polar çözücülerin kullanıldığı çalışmalarda orta düzey antioksidan aktivite gözlemlenmiştir [130, 131]. Bu çalışmada %50 izopropanol ile elde edilen ekstraktın her iki radikal sisteminde de anlamlı ve konsantrasyona bağlı antioksidan etki göstermesi, izopropanol-su karışımının fenolik antioksidanların ekstraksiyonu açısından etkili bir alternatif çözücü sistemi olduğunu ortaya koymuştur. Benzer şekilde, izopropanol-su karışımlarının fenolik bileşiklerin çözünürlüğünü artırarak antioksidan kapasiteyi yükselttiği farklı bitkiler üzerinde yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir [119].

Elde edilen antioksidan sonuçlar, aynı ekstrakta belirlenen yüksek total fenolik içerik ve HPLC analizleriyle tanımlanan kafeik asit, kuersetin, polidatin ve resveratrol gibi bileşiklerin varlığı ile uyumludur. Fenolik asitler ve flavonoidlerin serbest radikal süpürücü etkilerini, HAT ve elektron verme SET mekanizmaları yoluyla gerçekleştirdiği bilinmektedir [3, 132]. Özellikle kafeik asit ve kuersetin türevlerinin güçlü antioksidan aktivite sergilediği ve bitkisel ekstraktların toplam antioksidan kapasitesine önemli katkı sağladığı literatürde yaygın olarak vurgulanmıştır [40, 124].

A. hierochuntica ekstraktının *F. graminearum* ve *F. culmorum* üzerindeki antifungal etkinliği, doz-yanıt analizleri kullanılarak nicel olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen EC_{50} ve MİK değerleri, ekstraktın her iki patojen üzerinde de konsantrasyona bağlı, istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon oluşturduğunu göstermiştir ($p<0.0001$). *A. hierochuntica* ekstraktının *F. graminearum* üzerindeki EC_{50} değerinin 0.920 ± 0.047 mg/mL olarak belirlenmesi, ekstraktın düşük konsantrasyonlarda dahi belirgin bir antifungal etki sergilediğini ortaya koymuştur. Buna karşılık, MİK değerin 1.912 ± 0.020 mg/mL olması, tam büyüme baskılanması için daha yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duyulduğunu

göstermiştir. Bu durum, bitkisel ekstraktların genellikle fungistatik etkiyle başlayıp artan dozlarda fungisidal etkiye yaklaşmasıyla uyumludur. Literatürde fenolik asitler ve flavonoidlerden zengin bitkisel ekstraktların *Fusarium* türleri üzerinde benzer doz–yanıt davranışı sergilediği bildirilmiştir.

Karşılaştırma amacıyla kullanılan sentetik fungisit Talendo, *F. graminearum* üzerinde daha düşük EC_{50} (0.036 ± 0.102 mg/mL) ve MİK (0.365 ± 0.006 mg/mL) değerleri göstermiştir. Bu sonuç, beklenildiği üzere ticari fungisitlerin hedef organizmalara karşı daha yüksek özgüllük ve etki gücüne sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte, *A. hierochuntica* ekstraktının MİK değerinin Talendo'ya kıyasla yaklaşık 5.2 kat daha yüksek (1.912 ± 0.020 mg/mL) olması, doğal kökenli bir ekstrakt için dikkat çekici bir antifungal potansiyele işaret etmiştir.

F. culmorum üzerinde gerçekleştirilen analizlerde, *A. hierochuntica* ekstraktının EC_{50} değerinin 1.369 ± 0.056 mg/mL, MİK değerinin ise 2.444 ± 0.019 mg/mL olduğu belirlenmiştir. Bu değerler, *F. culmorum*'un *F. graminearum*'a kıyasla ekstrakta daha dirençli olduğunu göstermiştir. *Fusarium* türleri arasında hücre duvarı bileşimi, membran lipid yapısı ve detoksifikasyon mekanizmalarındaki farklılıkların antifungal duyarlılığı etkilediği literatürde sıklıkla vurgulanmıştır [133-135]. Dolayısıyla, türler arası bu duyarlılık farkı biyolojik olarak beklenen bir sonuçtur.

Talendo'nun *F. culmorum* üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde, EC_{50} (0.162 ± 0.034 mg/mL) ve MİK (0.455 ± 0.023 mg/mL) değerlerinin, bitkisel ekstrakta kıyasla belirgin biçimde daha düşük olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, *F. culmorum*'da Talendo'nun EC_{50} değerinin *F. graminearum*'a göre daha yüksek olması, bu türün sentetik fungisitlere karşı da görece daha toleranslı olduğunu göstermiştir. Bu bulgu, literatürde bildirilen fungisit toleransı ve direnç gelişimi eğilimleriyle uyumludur [136-138].

Çalışmada, *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarında bitkisel ekstrakt ve ticari fungisit (Talendo) uygulamalarının *CAT, hog1, mst20, atg5* ve *stuA* genleri üzerindeki etkileri qRT-PCR yöntemiyle değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, uygulamaların türlere özgü ve gen-spesifik farklı moleküler yanıtlar oluşturduğunu ortaya koymuştur. *F. culmorum* izolatında *CAT* genine ait qPCR

amplifikasyonlarında ortalama Ct değerlerinin 35-36 aralığında olması, ilgili koşullarda *CAT* geninin ya çok düşük düzeyde anlatımının yapıldığı ya da oksidatif stres yanıtının alternatif antioksidan mekanizmalar üzerinden yürütüldüğünü düşündürmüştür. *F. graminearum*'da *CAT* gen anlatımının hem ekstrakt hem de Talendo uygulamaları ile belirgin şekilde arttığı belirlenmiştir. Özellikle 0.2 mg/mL Talendo uygulamasında gözlenen yaklaşık 9 katlık artış, bu koşulda hücrelerin yoğun oksidatif strese maruz kaldığını ve katalaz aracılı savunma mekanizmasının güçlü biçimde aktive edildiğini göstermiştir. Bu bağlamda, elde edilen bulgular literatürde rapor edilen farklı bitkisel kökenli uçucu bileşik ve ekstrakt uygulamalarıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir bütünlük göstermiştir. *F. graminearum*'da *CAT* gen anlatımının kafur uygulamasında 1.996 ± 0.18 kat [139], mirsen uygulamasında ise 13.86 ± 1.82 kat artış göstermesi [140], bu bileşiklerin oksidatif stres yanıtı oluşturabildiğini ortaya koymuştur. Buna karşılık *Rosa damascena* ekstraktı uygulamasında *CAT* gen anlatımının 1.77 ± 0.43 kat ile sınırlı kalması [141], farklı bitkisel kaynakların ve bileşen profillerinin oksidatif stres düzeyi üzerinde belirleyici olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, çalışmada kullanılan bitkisel ekstraktın *F. graminearum*'da *CAT* gen anlatımını yaklaşık 13 kat artırmasıyla uyumlu olup ekstraktın içerdiği biyoaktif bileşiklerin hücrede ROS birikimine yol açarak katalaz aracılı savunma mekanizmalarını güçlü biçimde aktive ettiğini düşündürmüştür.

Ayrıca, *F. culmorum* izolatında kafur (2.512 ± 0.22 kat) [139] ve mirsen (5.08 ± 0.17 kat) [140] uygulamalarıyla *CAT* gen anlatımında belirgin artışlar rapor edilmiş olmasına rağmen, yapılan çalışmada *CAT* genine ait Ct değerlerinin 35-36 aralığında kalması, söz konusu türün uygulanan ekstrakt ve Talendo koşullarında farklı bir oksidatif stres adaptasyon stratejisi benimseyebileceğini düşündürmüştür.

F. graminearum'da *hog1* gen anlatımının tüm uygulamalarda artış göstermesi, hem ekstraktın hem de Talendo'nun hücrede stres yanıtını tetiklediğini ortaya koymuştur. Özellikle 0.3 mg/mL Talendo uygulamasında *hog1* gen anlatımının yaklaşık 6 kat artması, yüksek fungisit konsantrasyonlarında MAPK yolunun güçlü biçimde aktive edildiğini düşündürmüştür. Buna karşılık *F. culmorum*'da *hog1* gen anlatımının tüm uygulamalarda 1 katın altında kalması dikkat çekicidir. Bu baskılanma, *F. culmorum*'un uygulanan stres koşullarına *F. graminearum*'dan farklı bir adaptasyon stratejisi geliştirdiğini veya *hog1* aracılı sinyal iletimi yerine

alternatif stres yanıt yollarını kullandığını düşündürmüştür. Türler arası bu belirgin farklılık, *Fusarium* türlerinin fungisitlere ve bitkisel ekstraktlara verdikleri moleküler yanıtların genetik altyapısının farklı olduğunu göstermiştir [133, 142].

F. graminearum'da kafur uygulaması sonrası *hog1* gen anlatımının 3.965 ± 1.42 kat artması [139], bu bileşiğin hücrede belirgin bir stres yanıtı oluşturduğunu göstermiştir. Bu artış düzeyi, yapılan çalışmadaki Talendo'nun özellikle yüksek konsantrasyonlarında (0.3 mg/mL) gözlenen *hog1* indüksiyonu ile karşılaştırıldığında, kafurun da fungisit benzeri bir etki mekanizması sergileyerek ozmotik ve oksidatif stres sinyal yollarını tetikleyebildiğini düşündürmüştür Dolayısıyla, hem kimyasal fungisitlerin hem de uçucu bitkisel bileşiklerin *F. graminearum*'da *hog1* aracılı stres adaptasyonunu güçlendirdiği söylenebilir.

Buna karşılık *F. culmorum*'da kafur uygulaması sonrası *hog1* gen anlatımının 2.178 ± 0.09 kat ile sınırlı kalması [139], bu türün *hog1* yanıtının *F. graminearum*'a kıyasla daha zayıf olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan çalışmada *F. culmorum*'da *hog1* gen anlatımının tüm uygulamalarda 1 katın altında kalması da dikkate alındığında, literatürde bildirilen kafur kaynaklı sınırlı *hog1* artışı ile bu çalışmada gözlenen genel baskılanma eğilimi birlikte değerlendirildiğinde, *F. culmorum*'un stres toleransının daha çok alternatif sinyal yolakları veya hücresel savunma mekanizmaları üzerinden düzenlenebileceği düşünülmektedir.

Çalışmada analiz edilen diğer genin, *mst20*, anlatımı *F. graminearum*'da incelendiğinde, özellikle ekstrakt uygulamalarında belirgin şekilde artış olduğu ve 1.0 mg/mL ekstrakt uygulamasında yaklaşık 5 katlık bir yükseliş olduğu gözlenmiştir. Bu durum, bitkisel ekstraktın MAPK sinyal yolaklarını aktive ederek hücresel adaptasyon mekanizmalarını tetiklediğini göstermiştir. Talendo uygulamalarında ise *mst20* gen anlatımının doz arttıkça sınırlanması, yüksek fungisit konsantrasyonlarında sinyal iletim mekanizmalarının baskılanabileceğini veya hücresel hasarın artması nedeniyle düzenleyici yanıtların zayıfladığını düşündürmüştür. *F. culmorum*'da *mst20* gen anlatımının genel olarak düşük düzeylerde seyretmesi ve Talendo uygulamalarında baskılanması, bu türde MAPK yolaklarının stres koşullarında farklı biçimde düzenlendiğini destekler niteliktedir.

Bu bulgular, literatürde bildirilen farklı bitkisel bileşiklerin *mst20* gen anlatımı üzerindeki etkileriyle birlikte değerlendirildiğinde daha net bir çerçeve

kazanmaktadır. *F. graminearum*'da kafur uygulaması sonrası *mst20* gen anlatımının 2.318 ± 0.33 kat [139], mirsen uygulamasında ise 6.9 ± 0.72 kat artış göstermesi [140], özellikle monoterpen yapılı bileşiklerin MAPK yolaklarının üst düzenleyicilerinden biri olan *mst20*'yi güçlü biçimde indükleyebildiğini ortaya koymuştur. Buna karşılık flavonoid yapılı rutin uygulamasında *mst20* gen anlatımının 1.33 ± 0.33 kat ile sınırlı kalması [143], kimyasal yapı ve etki mekanizmasının sinyal iletimi üzerindeki belirleyici rolünü desteklemiştir. Yapılan çalışmada ekstrakt uygulamasıyla *F. graminearum*'da gözlenen yaklaşık 5 katlık *mst20* artışı, mirsen uygulamasıyla rapor edilen yüksek indüksiyon düzeyleriyle uyumlu olup, ekstraktın içerdiği uçucu ve fenolik bileşiklerin MAPK sinyal yolaklarını aktive eden bileşenler barındırdığını düşündürmüştür.

Öte yandan *F. culmorum*'da kafur (1.821 ± 0.29 kat) [139] ve mirsen (3.31 ± 1.38 kat) [140] uygulamaları sonrası *mst20* gen anlatımının sınırlı düzeylerde artması, bu türde MAPK yolaklarının *F. graminearum*'a kıyasla daha zayıf veya kontrollü bir şekilde aktive edildiğini göstermiştir. Yapılan çalışmada Talendo uygulamalarıyla *F. culmorum*'da *mst20* gen anlatımının baskılanması da dikkate alındığında, bu türün stres koşullarında *mst20* merkezli sinyal iletimi yerine alternatif düzenleyici mekanizmaları devreye soktuğu söylenebilir. Literatürde bildirilen kafur ve mirsen kaynaklı orta düzey *mst20* artışları ile bu çalışmada gözlenen düşük yanıt eğilimi birlikte değerlendirildiğinde, *F. culmorum*'un MAPK yolaklarını daha sınırlı kullanarak stres adaptasyonu sağladığı ve tür-spesifik sinyal iletim stratejilerinin belirgin olduğu sonucuna varılmıştır.

F. graminearum'da *atg5* gen anlatımının tüm uygulamalarda 1 katın altında kalması, hem ekstraktın hem de Talendo'nun otofaji yanıtının baskıladığını veya bu türde hücre ölümüne daha yatkın bir stres yanıtı oluşturduğunu düşündürmüştür. Buna karşın *F. culmorum*'da ekstrakt uygulamaları ile *atg5* gen anlatımının yaklaşık 2.5-2.7 kat artması, bu türün bitkisel ekstrakta karşı otofaji aracılı bir adaptasyon geliştirdiğini göstermiştir. Talendo uygulamalarında ise *atg5* gen anlatımının baskılanması, kimyasal fungisitin otofajik yanıtı inhibe ettiğini ve hücresel onarım mekanizmalarını sınırladığını düşündürmüştür.

F. graminearum'da *R. damascena* uygulaması sonrası *atg5* gen anlatımının 2.03 ± 0.42 kat [141], rutin uygulamasında ise 2.66 ± 0.48 kat artış göstermesi [143], bu bileşiklerin hücrede orta düzeyde bir stres oluşturarak otofaji mekanizmasını aktive

edebildiğini ortaya koymuştur. Bu durum, bitkisel kökenli bileşiklerin fungisitlere kıyasla daha kontrollü ve geri dönüşümlü bir hücresel stres yarattığını ve otofajiyi bir hayatta kalma stratejisi olarak devreye sokabildiğini düşündürmüştür. Buna karşılık, yapılan çalışmada *F. graminearum*'da hem ekstrakt hem de Talendo uygulamaları sonrasında *atg5* gen anlatımının 1 katın altında kalması, uygulanan stresin literatürde rapor edilen *R. damascena* ve rutin etkilerine kıyasla daha baskılayıcı veya sitotoksik bir nitelik taşıdığını düşündürmüştür. Literatürde *F. culmorum*'da yapılan antifungal çalışmalar incelendiğinde *atg5* gen anlatımının incelendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle yapılan çalışmayla karşılaştırma yapılamamıştır.

F. graminearum'da *stuA* gen anlatımının özellikle Talendo uygulamalarında çok yüksek düzeylerde artması (0.2 mg/mL Talendo'da ~142 kat), fungisit stresinin gelişimsel ve morfolojik düzenleyicileri güçlü biçimde etkilediğini göstermiştir. Bu aşırı artış, hücrelerin stres koşullarında gelişimsel programlarını yeniden düzenlemeye çalıştığını veya düzensiz bir transkripsiyonel yanıt geliştirdiğini düşündürmüştür. Buna karşılık *F. culmorum*'da *stuA* gen anlatımının tüm uygulamalarda sınırlı kalması veya baskılanması, bu türün gelişimsel düzenleme mekanizmalarının fungisit ve ekstrakt stresine karşı daha az duyarlı olduğunu göstermiştir. Özellikle Talendo uygulamalarında *stuA* gen anlatımının 1 katın altına düşmesi, gelişim ve sporulasyon süreçlerinin baskılandığını düşündürmüştür.

F. graminearum'da kafur uygulaması sonrası *stuA* gen anlatımının 6.359 ± 1.01 kat [139], mirsen uygulamasında ise 4.48 ± 1.2 kat artış göstermesi [140], bu bileşiklerin gelişimsel ve morfolojik düzenleyiciler üzerinde uyarıcı etki oluşturabildiğini ortaya koymuştur. Ancak bu artış düzeyleri, yapılan çalışmada özellikle 0.2 mg/mL Talendo uygulamasında gözlenen yaklaşık 142 katlık aşırı *stuA* indüksiyonu ile karşılaştırıldığında oldukça sınırlı kalmıştır. Bu durum, kimyasal fungisit stresinin *F. graminearum*'da gelişimsel transkripsiyon faktörlerini çok daha güçlü ve muhtemelen düzensiz bir biçimde aktive ettiğini; buna karşın kafur ve mirsen gibi bitkisel kökenli bileşiklerin daha kontrollü bir gelişimsel yanıt oluşturduğunu düşündürmüştür.

Öte yandan *F. culmorum*'da kafur uygulaması sonrası *stuA* gen anlatımının 1.297 ± 0.14 kat [139] ile sınırlı kalması, bu bileşiğin gelişimsel düzenleyici üzerindeki etkisinin oldukça zayıf olduğunu göstermiştir. Mirsen uygulamasında *stuA* gen

anlatımının 4.54 ± 1.83 kata [140] yükselmesi ise bazı bitkisel bileşiklerin *F. culmorum*'da gelişimsel yanıtları kısmen uyarabildiğini ortaya koymuştur. Nitekim, Talendo uygulamalarında *F. culmorum*'da *stuA* gen anlatımının 1 katın altına düşmesi, gelişim ve sporulasyon süreçlerinin güçlü biçimde inhibe edildiğini düşündürmüştür.

A. hierochuntica'dan %50 izopropanol kullanılarak maserasyon yöntemiyle elde edilen ekstraktın fitokimyasal profili ve antioksidan potansiyeli bütüncül olarak değerlendirildiğinde, kullanılan çözücü sisteminin literatürde sınırlı biçimde rapor edilmesine karşın etkili ve uygulanabilir bir alternatif sunduğu sonucuna varılmıştır. Orta düzeyde bir ekstraksiyon verimi (%3,7) elde edilmesine rağmen, ekstraktın yüksek toplam fenolik içeriğe (92.802 ± 1.66 mg GAE/g) ve anlamlı düzeyde flavonoid içeriğe sahip olması, %50 izopropanolün polar ve yarı-polar karakteri sayesinde farklı fenolik sınıfların birlikte ve etkin bir şekilde ekstrakte edilebildiğini göstermektedir. Total fenolik ve flavonoid içeriklerin konsantrasyona bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı biçimde artması, ekstraktın biyolojik aktivite çalışmalarında güvenilir bir doz-yanıt ilişkisi sergilediğini ortaya koymuştur. Kolorimetrik verilerin HPLC analizleriyle desteklenmesi sonucunda kafeik asidin başlıca fenolik bileşen olarak belirlenmesi; bunu polidatin ve kuersetin gibi biyolojik açıdan güçlü bileşiklerin izlemesi, ekstraktın antioksidan ve antifungal potansiyelinin moleküler temelini açıklayan önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. DPPH ve ABTS analizleriyle ortaya konan anlamlı ve konsantrasyona bağlı antioksidan aktivite, ekstraktın özellikle hidrofilik radikallere karşı etkili bir süpürücü kapasiteye sahip olduğunu göstermiştir ve bu sonuçlar yüksek total fenolik içerik ve HPLC ile tanımlanan fenolik profil ile uyumlu bulunmuştur. Genel olarak elde edilen bulgular, %50 izopropanol-su karışımıyla gerçekleştirilen maserasyon ekstraksiyonunun *A. hierochuntica'*dan fenolik ve flavonoid bileşiklerce zengin, biyolojik açıdan aktif bir ekstrakt elde edilmesine olanak sağladığını; yaygın olarak kullanılan metanol ve etanol bazlı sistemlere kıyasla alternatif, etkili ve literatüre katkı sunan bir yaklaşım olduğunu ortaya koymuştur.

F. graminearum ve *F. culmorum* üzerindeki antifungal etkinliği doz-yanıt parametreleriyle değerlendirildiğinde, ekstraktın her iki patojen üzerinde de konsantrasyona bağlı ve istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon oluşturduğu

açıkça ortaya konmuştur (*p<0.0001*). *F. graminearum* için belirlenen düşük EC_{50} değeri (0.920 ± 0.047 mg/mL), ekstraktın nispeten düşük konsantrasyonlarda dahi belirgin antifungal etki gösterebildiğini, buna karşın daha yüksek MİK değeri (1.960 ± 0.035 mg/mL) ise tam büyüme baskılanması için artan dozlara ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir. Bu durum bitkisel ekstraktların çoğunlukla fungistatik etkiden fungisidal etkiye doğru ilerleyen doz-yanıt profiliyle uyumludur. Karşılaştırma amacıyla kullanılan sentetik fungisit Talendo'nun her iki parametrede de daha düşük değerler sergilemesi, ticari fungisitlerin yüksek özgüllük ve etki gücünü teyit etmekle birlikte, *A. hierochuntica* ekstraktının MİK değerinin Talendo'ya kıyasla yalnızca yaklaşık 5.4 kat daha yüksek olması, doğal kökenli bir ürün için dikkate değer bir antifungal potansiyele işaret etmektedir. *F. culmorum* üzerinde elde edilen daha yüksek EC_{50} (1.369 ± 0.056 mg/mL) ve MİK (2.444 ± 0.019 mg/mL) değerleri ise bu türün ekstrakta karşı *F. graminearum*'dan daha dirençli olduğunu ortaya koymuştur. Benzer biçimde, Talendo'nun *F. culmorum*'da daha yüksek EC_{50} değerine sahip olması, bu türün sentetik fungisitlere karşı da görece daha toleranslı olduğunu desteklemiştir. Genel olarak, elde edilen bulgular *A. hierochuntica* ekstraktının her iki Fusarium türü üzerinde anlamlı ve biyolojik olarak tutarlı bir antifungal etki sergilediğini; sentetik fungisitlerle karşılaştırıldığında daha yüksek dozlar gerektirse de, doğal ve bitkisel kökenli alternatif antifungal ajanlar açısından umut vadeden bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Bitkisel ekstrakt ve Talendo uygulamalarının *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarında stres yanıtı, sinyal iletimi, otofaji ve gelişimsel düzenleme genleri üzerinde türlere özgü farklı etkiler oluşturduğu belirlenmiştir. *F. graminearum*'un özellikle *CAT, hog1 ve stuA* genleri üzerinden güçlü bir stres ve adaptasyon yanıtı geliştirirken *F. culmorum*'un ise otofaji (*atg5*) ve sınırlı MAPK yanıtları ile farklı bir adaptasyon stratejisi benimsediği düşünülmüştür. Bu farklılıklar, bitkisel kökenli ekstraktların ve kimyasal fungisitlerin *Fusarium* türlerine karşı moleküler etki mekanizmalarının anlaşılması açısından önemli bulgular sunmaktadır. Bu kapsamda çalışma, *A. hierochuntica*'nın çevre dostu ve sürdürülebilir antifungal ajan geliştirilmesine yönelik potansiyelini ortaya koyarken, gelecekte yapılacak araştırmalar için de güçlü bir temel sunmaktadır. İlerleyen çalışmalarda ekstraktın aktif bileşenlerinin fraksiyonlanarak tekil ve sinerjik etkilerinin değerlendirilmesi,

etki mekanizmalarının hücresel ve proteomik düzeyde detaylandırılması ve *in vivo* bitki patojenite modelleriyle tarımsal uygulanabilirliğinin araştırılması önerilmektedir. Ayrıca, stres yanıtı ve otofaji ile ilişkili genlerin hedeflenmesi, doğal ekstraktların kimyasal fungisitlere alternatif veya tamamlayıcı kullanımına yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayabilecek niteliktedir. Bu yönüyle çalışma, hem temel bilimler hem de uygulamalı tarımsal biyoteknoloji alanlarında ileri araştırmalar için sağlam ve bütünlüklü bir bilimsel zemin oluşturmaktadır.

KAYNAKÇA

[1] G. Eshel *et al.*, "Positive selection and heat-response transcriptomes reveal adaptive features of the Brassicaceae desert model, Anastatica hierochuntica," *New Phytologist*, vol. 236, no. 3, pp. 1006–1026, Nov. 2022,

[2] B. Winkel-Shirley, "Biosynthesis of flavonoids and effects of stress," *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 5, no. 3, pp. 218–223, Jun. 2002

[3] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, and G. Paganga, "Antioxidant properties of phenolic compounds," *Trends Plant Sci.*, vol. 2, no. 4, pp. 152–159, Apr. 1997

[4] T. I. Almundarij *et al.*, "Antioxidant Activity, Phenolic Profile, and Nephroprotective Potential of Anastatica hierochuntica Ethanolic and Aqueous Extracts against CCl4-Induced Nephrotoxicity in Rats," *Nutrients 2021, Vol. 13,* vol. 13, no. 9, Aug. 2021

[5] R. L. Prior, X. Wu, and K. Schaich, "Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 10, pp. 4290–4302, May 2005

[6] W. S. Daoowd, "In vitro antifungal activity of extracts of Anastatica Hierochuntica," *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences*, vol. 4, no. 1, pp. 142–148, Jun. 2013

[7] Y. Jiao *et al.*, "Antifungal activity of paeonol against Botrytis cinerea by disrupting the cell membrane and the application on cherry tomato preservation," *Front. Microbiol.*, vol. 15, p. 1509124, Dec. 2024

[8] H. Yehia, M. A. Ibrahim, S. A. Donia, N. M. Hassanein, and E. Ibrahim, "Antimicrobial activity, ergosterol content and phytochemical screening of Rorippa Islandica (Oeder ex Murr.) and Carrichtera annua (L.)," *Scientific Reports 2025 15:1*, vol. 15, no. 1, pp. 34890-, Oct. 2025

[9] Q. Ru *et al.*, "Antifungal activity and inhibitory mechanism of essential oil from fresh and fallen leaves of Cinnamomum camphora (L.) presl against

zearalenone-producing Fusarium graminearum," *LWT*, vol. 231, p. 118331, Sep. 2025

[10] L. P. Hamel, M. C. Nicole, S. Duplessis, and B. E. Ellis, "Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plant-Interacting Fungi: Distinct Messages from Conserved Messengers," *Plant Cell*, vol. 24, no. 4, pp. 1327–1351, Aug. 2012

[11] X. Guo *et al.*, "Comparative transcriptome analysis of Fusarium graminearum challenged with distinct fungicides and functional analysis of FgICL gene," *Genomics*, vol. 116, no. 4, p. 110869, Jul. 2024

[12] B. B. Petrovska, "Historical review of medicinal plants' usage," *Pharmacogn. Rev.*, vol. 6, no. 11, p. 1, Jan. 2012

[13] S. Al-Majmaie *et al.*, "Investigation Utilization of Medicinal Plants: From Historical Practices to Contemporary Medicine," vol. 1, no. 1, p. 100004, Sep. 2025

[14] R. Latif and T. Nawaz, "Medicinal plants and human health: a comprehensive review of bioactive compounds, therapeutic effects, and applications," *Phytochemistry Reviews 2025*, pp. 1–44, Nov. 2025

[15] C. C. Davis and P. Choisy, "Medicinal plants meet modern biodiversity science," *Current Biology*, vol. 34, no. 4, pp. R158–R173, Feb. 2024

[16] S. Rameshbabu *et al.*, "Anastatica hierochuntica (L.) methanolic and aqueous extracts exert antiproliferative effects through the induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells," *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 28, no. 8, pp. 985–993, Aug. 2020

[17] N. As-Syakirin Rostan, N. Manshoor, M. Selangor, and B. Puncak Alam, "Traditional Uses and Pharmacological Properties of Anastatica hierochuntica," *Research Journal of Pharmacognosy (RJP)*, vol. 11, no. 4, pp. 67–78, 2024

[18] A. K. Hegazy and H. F. Kabiel, "Size-class structure and growth traits of Anastatica hierochuntica L. populations as rainfall indicators in aridlands," *J. Adv. Res.*, vol. 1, no. 4, pp. 331–340, Oct. 2010

[19] G. Eshel *et al.*, "Anastatica hierochuntica, an arabidopsis desert relative, is tolerant to multiple abiotic stresses and exhibits species-specific and common stress tolerance strategies with its halophytic relative, Eutrema (Thellungiella) salsugineum," *Front. Plant Sci.*, vol. 7, p. 1992, Jan. 2017

[20] V. Thotathil, N. Sidiq, A. Fakhroo, and L. Sreerama, “Phytochemical Analysis of Anastatica hierochuntica and Aerva javanica Grown in Qatar: Their Biological Activities and Identification of Some Active Ingredients,” *Molecules*, vol. 28, no. 8, Apr. 2023

[21] B. S. . Middleditch and A. M. . Amer, “Kuwaiti Plants : Distribution, Traditional Medicine, Pytochemistry, Pharmacology and Economic Value,” p. 337, 2014

[22] A. Alqethami, A. Y. Aldhebiani, and I. Teixidor-Toneu, “Medicinal plants used in Jeddah, Saudi Arabia: A gender perspective,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 257, no. 1, p. 112899, Jul. 2020

[23] E. Abdelhakeem, M. M. Hashem, M. A. Farag, and J. M. Alsofany, “Unlocking the wound healing potential of Anastatica hierochuntica L. (Kaff Maryam) Extract’s nanosuspension: UPLC-MS/MS metabolic profiling, formulation development and statistical optimization,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 101, p. 106295, Nov. 2024

[24] E. Benyagoub, N. Nabbou, D. Razni, and S. Moghtet, “Antibacterial activity of Anastatica hierochuntical L. against some bacterial strains responsible for women’s uro-genital infection.,” *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 11, no. 7, pp. 222–227, 2018.

[25] A. Alqudah, R. AbuDalo, E. Qnais, M. Wedyan, T. Qudah, and M. Oqal, “Potential anti-inflammatory activity of the Anastatica hierochuntica essential oil,” *Journal of Essential Oil Research*, vol. 35, no. 1, pp. 1–10, Jan. 2023

[26] I. Daur, “Chemical properties of the medicinal herb Kaff Maryam (Anastatica hierochuntica L.) and its relation to folk medicine use,” *Afr. J. Microbiol. Res.*, vol. 6, no. 23, pp. 5048–5051, 2012

[27] E. Pichersky and R. A. Raguso, “Why do plants produce so many terpenoid compounds?,” *New Phytologist*, vol. 220, no. 3, pp. 692–702, Nov. 2018

[28] M. Erb and D. J. Kliebenstein, “Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy,” *Plant Physiol.*, vol. 184, no. 1, pp. 39–52, Sep. 2020

[29] A. M. L. Seca, D. C. G. A. Pinto, A. M. L. Seca, and D. C. G. A. Pinto, “Biological Potential and Medical Use of Secondary Metabolites,” *Medicines 2019, Vol. 6,* vol. 6, no. 2, p. 66, Jun. 2019

[30] Z. Pang *et al.*, "Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review," *Front. Plant Sci.*, vol. 12, p. 621276, Mar. 2021

[31] I. G. Rafał, B. J. Króliczewski, I. Górniak, R. Bartoszewski, and Á. J. Króliczewski, "Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids," *Phytochemistry Reviews 2018 18:1*, vol. 18, no. 1, pp. 241–272, Oct. 2018

[32] R. Amorati and L. Valgimigli, "Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants," *Free Radic. Res.*, vol. 49, no. 5, pp. 633–649, May 2015

[33] T. Vogt, "Phenylpropanoid Biosynthesis," *Mol. Plant*, vol. 3, no. 1, pp. 2–20, Jan. 2010

[34] A. Huchelmann, M. S. Brahim, E. Gerber, D. Tritsch, T. J. Bach, and A. Hemmerlin, "Farnesol-mediated shift in the metabolic origin of prenyl groups used for protein prenylation in plants," *Biochimie*, vol. 127, pp. 95–102, Aug. 2016

[35] R. A. Dixon and N. L. Paiva, "Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism," *Plant Cell*, vol. 7, no. 7, p. 1085, Jul. 1995

[36] Y. Li, Z. Li, C. Xu, and Q. Wang, "WRKYs as regulatory hubs of secondary metabolic networks: Diverse inducers and distinct responses," *Plant Commun.*, vol. 6, no. 9, p. 101438, Sep. 2025

[37] C. Wasternack and S. Song, "Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription," *J. Exp. Bot.*, vol. 68, no. 6, pp. 1303–1321, Mar. 2017

[38] A. Corina Vlot, D. A. Dempsey, and D. F. Klessig, "Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease," *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 47, no. Volume 47, 2009, pp. 177–206, Sep. 2009

[39] T. P. T. Cushnie and A. J. Lamb, "Antimicrobial activity of flavonoids," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 26, no. 5, pp. 343–356, Nov. 2005

[40] M. Daglia, "Polyphenols as antimicrobial agents," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 23, no. 2, pp. 174–181, Apr. 2012

[41] C. F. Rodrigues, L. Černáková, C. F. Rodrigues, and L. Černáková, "Farnesol and Tyrosol: Secondary Metabolites with a Crucial quorum-sensing Role in Candida Biofilm Development," *Genes 2020, Vol. 11,* vol. 11, no. 4, Apr. 2020

[42] S. Kumar, A. K. Pandey, K. P. Lu, and J. Sastre, “Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview,” *The Scientific World Journal*, vol. 2013, no. 1, p. 162750, Jan. 2013

[43] C. M. J. Pieterse, C. Zamioudis, R. L. Berendsen, D. M. Weller, S. C. M. Van Wees, and P. A. H. M. Bakker, “Induced systemic resistance by beneficial microbes,” *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 52, no. Volume 52, 2014, pp. 347–375, Aug. 2014

[44] G. Agati, E. Azzarello, S. Pollastri, and M. Tattini, “Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance,” *Plant Science*, vol. 196, pp. 67–76, Nov. 2012

[45] M. Di Ferdinando, C. Brunetti, A. Fini, and M. Tattini, “Flavonoids as Antioxidants in Plants Under Abiotic Stresses,” *Abiotic Stress Responses in Plants*, pp. 159–179, 2012

[46] J. Gershenzon and N. Dudareva, “The function of terpene natural products in the natural world,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 3, no. 7, pp. 408–414, Jun. 2007

[47] A. Guerrieri, L. Dong, and H. J. Bouwmeester, “Role and exploitation of underground chemical signaling in plants,” *Pest Manag. Sci.*, vol. 75, no. 9, pp. 2455–2463, Sep. 2019

[48] M. Hasanuzzaman *et al.*, “Regulation of Ascorbate-Glutathione Pathway in Mitigating Oxidative Damage in Plants under Abiotic Stress,” *Antioxidants 2019, Vol. 8,* vol. 8, no. 9, Sep. 2019

[49] J. Bigeard, J. Colcombet, and H. Hirt, “Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI),” *Mol. Plant*, vol. 8, no. 4, pp. 521–539, Apr. 2015

[50] P. Trivedi, J. E. Leach, S. G. Tringe, T. Sa, and B. K. Singh, “Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health,” *Nature Reviews Microbiology 2020 18:11*, vol. 18, no. 11, pp. 607–621, Aug. 2020

[51] J. M. Palma, L. Freschi, M. Rodríguez-Ruiz, S. González-Gordo, and F. J. Corpas, “Nitric oxide in the physiology and quality of fleshy fruits,” *J. Exp. Bot.*, vol. 70, no. 17, pp. 4405–4417, Aug. 2019

[52] J. Zhang *et al.*, “Hydrogen sulfide, a signaling molecule in plant stress responses,” *J. Integr. Plant Biol.*, vol. 63, no. 1, pp. 146–160, Jan. 2021

[53] D. Tungmunnithum *et al.*, “Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview,” *Medicines 2018, Vol. 5,* vol. 5, no. 3, p. 93, Aug. 2018

[54] H. Cory, S. Passarelli, J. Szeto, M. Tamez, and J. Mattei, “The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review,” *Front. Nutr.*, vol. 5, p. 370438, Sep. 2018

[55] C. Yu *et al.*, “Pharmacological Effects of Polyphenol Phytochemicals on the Intestinal Inflammation via Targeting TLR4/NF-κB Signaling Pathway,” *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23,* vol. 23, no. 13, Jun. 2022

[56] J. Xie *et al.*, “Phenolic acids from medicinal and edible homologous plants: a potential anti-inflammatory agent for inflammatory diseases,” *Front. Immunol.*, vol. 15, p. 1345002, Jun. 2024

[57] S. Cheng *et al.*, “Pharmacological Diversity of Flavonoids and Their Clinical Application Prospects in Neurological Disorders,” *Phytotherapy Research*, vol. 39, no. 11, pp. 5222–5248, Nov. 2025

[58] A. Russo *et al.*, “Emerging Ferroptosis Involvement in Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathogenesis: Neuroprotective Activity of Polyphenols,” *Molecules 2025, Vol. 30,* vol. 30, no. 6, Mar. 2025

[59] A. M. Saad *et al.*, “Dietary polyphenols and human health: sources, biological activities, nutritional and immunological aspects, and bioavailability– a comprehensive review,” *Front. Immunol.*, vol. 16, p. 1653378, Nov. 2025

[60] D. Bowles, E. K. Lim, B. Poppenberger, and F. E. Vaistij, “Glycosyltransferases of lipophilic small molecules,” *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 57, no. Volume 57, 2006, pp. 567–597, Jun. 2006

[61] D. Ma and C. P. Constabel, “MYB Repressors as Regulators of Phenylpropanoid Metabolism in Plants,” *Trends Plant Sci.*, vol. 24, no. 3, pp. 275–289, Mar. 2019

[62] L. Li, Q. Liu, T. Liu, X. Cui, and W. Ning, “Expression of putative luteolin biosynthesis genes and WRKY transcription factors in Taraxacum antungense kitag,” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 2021 145:3*, vol. 145, no. 3, pp. 649–665, Feb. 2021

[63] M. Abdelrahman *et al.*, “Integrating transcriptome and target metabolome variability in doubled haploids of Allium cepa for abiotic stress protection,” *Molecular Breeding 2015 35:10*, vol. 35, no. 10, pp. 195-, Oct. 2015

[64] W. Huang, Y. Zhong, B. Gao, B. Zheng, and Y. Liu, “Nrf2-mediated therapeutic effects of dietary flavones in different diseases,” *Front. Pharmacol.*, vol. 14, p. 1240433, Sep. 2023

[65] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, and D. J. Bobilya, “Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 13, no. 10, pp. 572–584, Oct. 2002

[66] B. O. Adetuyi, L. Vega, B. O. Adetuyi, and · L Vega, “Advancements in Nanocarrier-Mediated Drug Delivery: Precision Strategies for Targeted Therapeutics and Improved Treatment Outcomes,” pp. 673–757, 2024

[67] S. Jannati *et al.*, “Oleocanthal as a Multifunctional Anti-Cancer Agent: Mechanistic Insights, Advanced Delivery Strategies, and Synergies for Precision Oncology,” *International Journal of Molecular Sciences 2025, Vol. 26,* vol. 26, no. 12, Jun. 2025

[68] T. I. Ekwomadu and M. Mwanza, “Fusarium Fungi Pathogens, Identification, Adverse Effects, Disease Management, and Global Food Security: A Review of the Latest Research,” *Agriculture 2023, Vol. 13, Page 1810*, vol. 13, no. 9, p. 1810, Sep. 2023

[69] R. D. Moura, L. A. M. de Castro, M. P. Culik, A. A. R. Fernandes, P. M. B. Fernandes, and J. A. Ventura, “Culture medium for improved production of conidia for identification and systematic studies of Fusarium pathogens,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 173, p. 105915, Jun. 2020

[70] R. H. Proctor, R. D. Plattner, A. E. Desjardins, M. Busman, and R. A. E. Butchko, “Fumonisin Production in the Maize Pathogen Fusarium verticillioides: Genetic Basis of Naturally Occurring Chemical Variation,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 6, pp. 2424–2430, Mar. 2006

[71] A. E. Desjardins and R. H. Proctor, “Molecular biology of Fusarium mycotoxins,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 119, no. 1–2, pp. 47–50, Oct. 2007

[72] A. Rai, M. Das, and A. Tripathi, “Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 60, no. 16, pp. 2710–2729, Sep. 2020

[73] G. Hao, S. McCormick, T. Usgaard, H. Tiley, and M. M. Vaughan, “Characterization of Three Fusarium graminearum Effectors and Their Roles During Fusarium Head Blight,” *Front. Plant Sci.*, vol. 11, p. 579553, Nov. 2020

[74] E. Alisaac *et al.*, “Fusarium Head Blight: Effect of Infection Timing on Spread of Fusarium graminearum and Spatial Distribution of Deoxynivalenol within Wheat Spikes,” *Microorganisms 2021, Vol. 9,* vol. 9, no. 1, pp. 1–12, Dec. 2020

[75] A. Friskop *et al.*, “An Overview of Fusarium Head Blight,” Nov. 2021

[76] C. Miguel-Rojas, B. Cavinder, J. P. Townsend, and F. Trail, “Comparative Transcriptomics of Fusarium graminearum and Magnaporthe oryzae Spore Germination Leading up To Infection,” *mBio*, vol. 14, no. 1, pp. e02442-22, Jan. 2023

[77] Z. A. Buttar *et al.*, “Update on the Basic Understanding of Fusarium graminearum Virulence Factors in Common Wheat Research,” *Plants*, vol. 13, no. 8, Apr. 2024

[78] C. H. A. Snijders, “Fusarium head blight and mycotoxin contamination of wheat, a review,” *Netherlands Journal of Plant Pathology 1990 96:4*, vol. 96, no. 4, pp. 187–198, Jul. 1990

[79] A. Mesterhazy and A. Mesterhazy, “Updating the Breeding Philosophy of Wheat to Fusarium Head Blight (FHB): Resistance Components, QTL Identification, and Phenotyping—A Review,” *Plants 2020, Vol. 9,* vol. 9, no. 12, pp. 1–33, Dec. 2020

[80] M. McMullen *et al.*, “A Unified Effort to Fight an Enemy of Wheat and Barley: Fusarium Head Blight,” vol. 96, no. 12, pp. 1712–1728, Nov. 2012

[81] J. J. Pestka, “Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance,” *Archives of Toxicology 2010 84:9*, vol. 84, no. 9, pp. 663–679, Aug. 2010

[82] M. Pasquali and Q. Migheli, “Genetic approaches to chemotype determination in type B-trichothecene producing Fusaria,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 189, pp. 164–182, Oct. 2014

[83] D. M. Gardiner, K. Kazan, S. Praud, F. J. Torney, A. Rusu, and J. M. Manners, “Early activation of wheat polyamine biosynthesis during Fusarium head blight implicates putrescine as an inducer of trichothecene mycotoxin production,” *BMC Plant Biology 2010 10:1*, vol. 10, no. 1, pp. 289-, Dec. 2010

[84] X. Li *et al.*, “A barley UDP-glucosyltransferase inactivates nivalenol and provides Fusarium Head Blight resistance in transgenic wheat,” *J. Exp. Bot.*, vol. 68, no. 9, pp. 2187–2197, Apr. 2017

[85] M. Diamond *et al.*, “The Fusarium Mycotoxin Deoxynivalenol Can Inhibit Plant Apoptosis-Like Programmed Cell Death,” *PLoS One*, vol. 8, no. 7, p. e69542, Jul. 2013

[86] T. Suzuki and Y. Iwahashi, “Phytotoxicity Evaluation of Type B Trichothecenes Using a Chlamydomonas reinhardtii Model System,” *Toxins (Basel).*, vol. 6, no. 2, p. 453, 2014

[87] M. Nowak, P. Bernat, and S. Różalska, “Mutual interaction of the entomopathogenic and endophytic fungus Metarhizium anisopliae with zearalenone as a native component of crude Fusarium extract,” *Scientific Reports 2024 14:1*, vol. 14, no. 1, pp. 22493-, Sep. 2024

[88] L. Perincherry, J. Lalak-Kánczugowska, and L. Stepién, “Fusarium-Produced Mycotoxins in Plant-Pathogen Interactions,” *Toxins (Basel).*, vol. 11, no. 11, p. 664, Nov. 2019

[89] N. Iqbal, Z. Czékus, A. Ördög, and P. Poór, “Fusaric acid-evoked oxidative stress affects plant defence system by inducing biochemical changes at subcellular level,” *Plant Cell Rep.*, vol. 43, no. 1, p. 2, Jan. 2023

[90] C. López-Díaz *et al.*, “Fusaric acid contributes to virulence of Fusarium oxysporum on plant and mammalian hosts,” *Mol. Plant Pathol.*, vol. 19, no. 2, p. 440, Feb. 2017

[91] M. Pasquali, E. Cocco, C. Guignard, and L. Hoffmann, “The effect of agmatine on trichothecene type B and zearalenone production in Fusarium graminearum, F. culmorum and F. poae,” *PeerJ*, vol. 2016, no. 2, p. e1672, Feb. 2016

[92] S. Gao, S. E. Gold, and A. E. Glenn, “Characterization of two catalase-peroxidase-encoding genes in Fusarium verticillioides reveals differential responses to in vitro versus in planta oxidative challenges,” *Mol. Plant Pathol.*, vol. 19, no. 5, p. 1127, May 2017

[93] Y. Guo, S. Yao, T. Yuan, Y. Wang, D. Zhang, and W. Tang, “The spatiotemporal control of KatG2 catalase-peroxidase contributes to the invasiveness of Fusarium graminearum in host plants,” *Mol. Plant Pathol.*, vol. 20, no. 5, pp. 685–700, May 2019

[94] D. Segorbe, A. Di Pietro, E. Pérez-Nadales, and D. Turrà, “Three Fusarium oxysporum mitogen-activated protein kinases (MAPKs) have distinct and complementary roles in stress adaptation and cross-kingdom pathogenicity,” *Mol. Plant Pathol.*, vol. 18, no. 7, pp. 912–924, Sep. 2017

[95] H. Xia, X. Xia, M. Guo, W. Liu, and G. Tang, “The MAP kinase FvHog1 regulates FB1 synthesis and Ca2+ homeostasis in Fusarium verticillioides,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 473, p. 134682, Jul. 2024

[96] Y. Tang *et al.*, “White Collar 1 Modulates Oxidative Sensitivity and Virulence by Regulating the HOG1 Pathway in Fusarium asiaticum,” *Microbiol. Spectr.*, vol. 11, no. 3, Jun. 2023

[97] L. Li, C. Xue, K. Bruno, M. Nishimura, and J.-R. Xu, “Two PAK Kinase Genes, CHM1 and MST20, Have Distinct Functions in Magnaporthe grisea,” */ 547 MPMI*, vol. 17, no. 5, pp. 547–556, 2004.

[98] E. N. Keleş, A. F. Tufan Dülger, and E. Yörük, “Investigation of the Antifungal Activity of Bacillus megaterium Against Fusarium Species,” *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, vol. 33, no. 2, pp. 183–191, Jun. 2023

[99] C. Wang *et al.*, “Functional Analysis of the Kinome of the Wheat Scab Fungus Fusarium graminearum,” *PLoS Pathog.*, vol. 7, no. 12, p. e1002460, Dec. 2011

[100] X. Chai, Y. Liu, H. Ma, S. Wang, E. Niyitanga, and C. He, “Effects of Macroautophagy and Mitophagy on the Pathogenicity of Fusarium graminearum,” vol. 112, no. 9, pp. 1928–1935, Aug. 2022

[101] L. N. Nguyen *et al.*, “Autophagy-related lipase FgATG15 of Fusarium graminearum is important for lipid turnover and plant infection,” *Fungal Genetics and Biology*, vol. 48, no. 3, pp. 217–224, Mar. 2011

[102] W. Lv, C. Wang, N. Yang, Y. Que, N. J. Talbot, and Z. Wang, “Genome-wide functional analysis reveals that autophagy is necessary for growth, sporulation, deoxynivalenol production and virulence in Fusarium graminearum,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017

[103] L. Chen *et al.*, “The TRAPPIII complex regulates development and virulence of Fusarium graminearum by coordinating autophagy and intracellular transport,” *PLoS Pathog.*, vol. 21, no. 10, p. e1013627, Oct. 2025

[104] C. Xu *et al.*, “The transcription factor FgStuA regulates virulence and mycotoxin biosynthesis via recruiting the SAGA complex in Fusarium graminearum,” *New Phytologist*, vol. 240, no. 6, pp. 2455–2467, Dec. 2023

[105] M. Pasquali *et al.*, “FcStuA from Fusarium culmorum Controls Wheat Foot and Root Rot in a Toxin Dispensable Manner,” *PLoS One*, vol. 8, no. 2, p. e57429, Feb. 2013

[106] D. Rongai, P. Pulcini, B. Pesce, and F. Milano, “Antifungal activity of pomegranate peel extract against fusarium wilt of tomato,” *European Journal of Plant Pathology 2016 147:1*, vol. 147, no. 1, pp. 229–238, Jul. 2016

[107] V. L. Singleton and J. A. Rossi, “Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents,” *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 16, no. 3, pp. 144–158, Jan. 1965

[108] S. Cosmulescu, I. Trandafir, and V. Nour, “Chemical Composition and Antioxidant Activity of Walnut Pollen Samples,” *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj. Napoca.*, vol. 43, no. 2, pp. 361–365, Dec. 2015

[109] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity,” *LWT - Food Science and Technology*, vol. 28, no. 1, pp. 25–30, Jan. 1995

[110] M. S. Blois, “Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical,” *Nature 1958 181:4617*, vol. 181, no. 4617, pp. 1199–1200

[111] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 26, no. 9–10, pp. 1231–1237, May 1999

[112] M. M. Gakuubi, A. W. Maina, and J. M. Wagacha, “Antifungal Activity of Essential Oil of Eucalyptus camaldulensis Dehnh. against Selected Fusarium spp.,” *Int. J. Microbiol.*, vol. 2017, no. 1, p. 8761610, Jan. 2017

[113] S. Philippe *et al.*, “Chemical composition and antifungal activity of essential oil of fresh leaves of Cinnamomum zeylanicum from Benin against six mycotoxigenic fungi isolated from a traditional cheese wagashi,” 2012.

[114] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method,” *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, Dec. 2001

[115] A. O. Badmos, H. Onikola, S. Onigbinde, and R. Onikola, “Phytochemical Analysis and Antibacterial Effects of Anastatica hierochuntica Extracts on Foodborne and Clinical Pathogens,” *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, vol. 12, no. s4, pp. 2901–2906, Dec. 2024

[116] S. Keser, S. Celik, S. Turkoglu, Ö. Yilmaz, and I. Turkoglu, “Vitamin, sterol and fatty acid contents of some edible and medicinal plants from East and Southeast Anatolia (Turkey),” *Turk. J. Pharm. Sci.*, vol. 12, no. 2, pp. 133–146, Aug. 2015

[117] J. Dai, R. J. Mumper, J. Dai, and R. J. Mumper, “Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties,” *Molecules 2010, Vol. 15, Pages 7313-7352*, vol. 15, no. 10, pp. 7313–7352, Oct. 2010

[118] A. Wakeel, S. A. Jan, I. Ullah, Z. K. Shinwari, and M. Xu, “Solvent polarity mediates phytochemical yield and antioxidant capacity of Isatis tinctoria,” *PeerJ*, vol. 2019, no. 10, 2019

[119] Q. D. Do *et al.*, “Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica,” *J. Food Drug Anal.*, vol. 22, no. 3, pp. 296–302, Sep. 2014

[120] A. Khoddami, M. A. Wilkes, T. H. Roberts, A. Khoddami, M. A. Wilkes, and T. H. Roberts, “Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds,” *Molecules 2013, Vol. 18, Pages 2328-2375*, vol. 18, no. 2, pp. 2328–2375, Feb. 2013

[121] F. Chemat *et al.*, “Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects,” *Molecules 2019, Vol. 24,* vol. 24, no. 16, Aug. 2019

[122] H. Sadki, O. Amri, R. A. Taher, K. El Mehrach, and F. Fahmi, “Phytochemical and ethnobotanical investigation of 29 aromatic and medicinal plants from Dakhla-Oued Ed-Dahab region and their traditional uses,” 2025, Accessed: Jan. 14, 2026

[123] B. Kaboré *et al.*, “Phytochemical Profile, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities, Safety of Use and Spasmolytic Effects of Aqueous Decoction Extract of Diospyros mespiliformis Leaves Hochst. ex A. DC. (Ebenaceae) on the Isolated Duodenum of Rat dant, and Anti-Inflam…,” *Pharmacol. Pharm.*, vol. 14, pp. 513–529, 2023

[124] A. Borges, C. Ferreira, M. J. Saavedra, and M. Simões, "Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria, vol. 19, no. 4, pp. 256–265, Jul. 2013

[125] E. Díaz-García *et al.*, "Phenolic Compounds Synthesized by Trichoderma longibrachiatum Native to Semi-Arid Areas Show Antifungal Activity against Phytopathogenic Fungi of Horticultural Interest," *Microbiology Research 2024, Vol. 15, Pages 1425-1440*, vol. 15, no. 3, pp. 1425–1440, Aug. 2024

[126] A. Karami *et al.*, "Polydatin: Pharmacological Mechanisms, Therapeutic Targets, Biological Activities, and Health Benefits," *Molecules 2022, Vol. 27,* vol. 27, no. 19, Oct. 2022

[127] M. Adrian and P. Jeandet, "Resveratrol as an Antifungal Agent," *Resveratrol in Health and Disease*, pp. 475–497, Nov. 2005

[128] D. Xu *et al.*, "Synergistic Effects of Resveratrol and Pyrimethanil against Botrytis cinerea on Grape," *Molecules 2018, Vol. 23,* vol. 23, no. 6, Jun. 2018

[129] R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, and E. Çapanoğlu, "Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 64, no. 5, pp. 997–1027, Feb. 2016

[130] M. Khalid *et al.*, "Evaluating the Antioxidant, Antimicrobial, and Anticancer Effects of Eminium spiculatum Plant Extracts," *Nat. Prod. Commun.*, vol. 19, no. 11, Nov. 2024

[131] F. Al-Rimawi *et al.*, "Assessment of Antimicrobial, Anticancer, and Antioxidant Activity of Verthimia iphionoides Plant Extract," *Processes 2022, Vol. 10,* vol. 10, no. 11, Nov. 2022

[132] M. Leopoldini, T. Marino, N. Russo, and M. Toscano, "Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism," *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 108, no. 22, pp. 4916–4922, Jun. 2004

[133] P. Hellin, R. King, M. Urban, K. E. Hammond-Kosack, and A. Legrève, "The adaptation of Fusarium culmorum to DMI fungicides is mediated by major transcriptome modifications in response to azole fungicide, including the overexpression of a PDR transporter (FcABC1)," *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. JUN, p. 378418, Jun. 2018

[134] W. Chen *et al.*, “Host-induced silencing of Fusarium culmorum genes protects wheat from infection,” *J. Exp. Bot.*, vol. 67, no. 17, pp. 4979–4991, Sep. 2016

[135] Y. Z. Zhang *et al.*, “Fusarium graminearum FgCWM1 Encodes a Cell Wall Mannoprotein Conferring Sensitivity to Salicylic Acid and Virulence to Wheat,” *Toxins 2019, Vol. 11,* vol. 11, no. 11, Oct. 2019

[136] P. Hellin, J. Scauflaire, V. Van Hese, F. Munaut, and A. Legrève, “Sensitivity of Fusarium culmorum to triazoles: impact of trichothecene chemotypes, oxidative stress response and genetic diversity,” *Pest Manag. Sci.*, vol. 73, no. 6, pp. 1244–1252, Jun. 2017

[137] N. Matelionienė, R. Žvirdauskienė, G. Kadžienė, E. Zavtrikovienė, and S. Supronienė, “In Vitro Sensitivity Test of Fusarium Species from Weeds and Non-Gramineous Plants to Triazole Fungicides,” *Pathogens*, vol. 13, no. 2, p. 160, Feb. 2024

[138] A. Perczak, D. Gwiazdowska, K. Marchwińska, K. Juś, R. Gwiazdowski, and A. Waśkiewicz, “Antifungal activity of selected essential oils against Fusarium culmorum and F. graminearum and their secondary metabolites in wheat seeds,” *Archives of Microbiology 2019 201:8*, vol. 201, no. 8, pp. 1085–1097, May 2019

[139] A. Gazdağlı *et al.*, “Investigation of Camphor Effects on Fusarium graminearum and F. culmorum at Different Molecular Levels,” *Pathogens 2018, Vol. 7,* vol. 7, no. 4, Nov. 2018

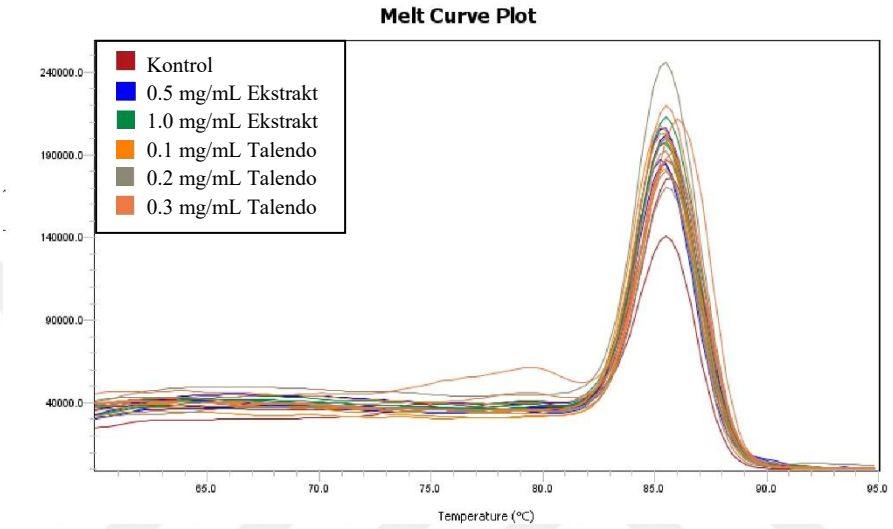
[140] G. Albayrak, E. Yörük, T. Teker, and Ö. Sefer, “Investigation of antifungal activities of myrcene on Fusarium reference strains,” *Archives of Microbiology 2023 205:3*, vol. 205, no. 3, pp. 82-, Feb. 2023

[141] E. Özsoy, T. H. Barak, E. Yörük, H. Servi, and T. Yli-Mattila, “Chemical Composition, Antifungal Activity, and Plant-Protective Potential of Rosa damascena Mill. Essential Oil Against Fusarium graminearum,” *Pathogens*, vol. 14, no. 4, p. 383, Apr. 2025

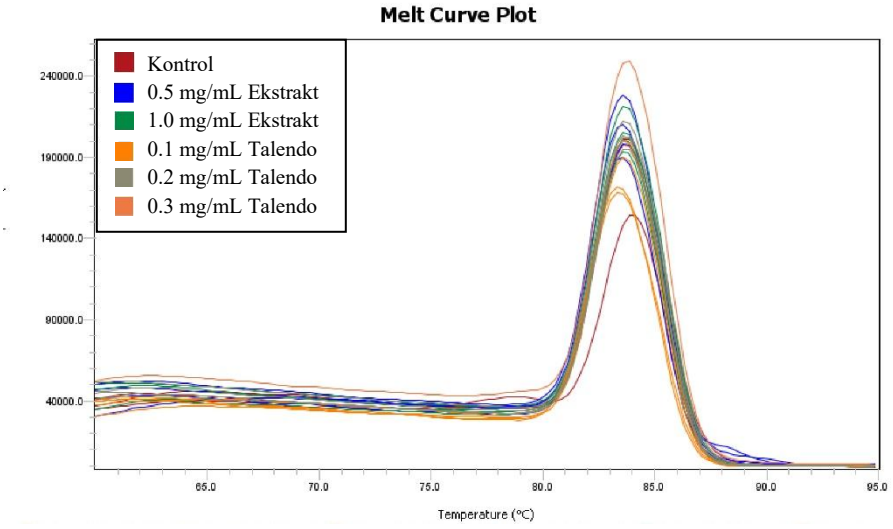
[142] A. A. Stakheev, D. V. Erokhin, E. A. Meleshchuk, O. D. Mikityuk, and N. V. Statsyuk, “Effect of Compactin on the Mycotoxin Production and Expression of Related Biosynthetic and Regulatory Genes in Toxigenic Fusarium culmorum,” *Microorganisms*, vol. 10, no. 7, Jul. 2022

[143] E. Yörük, “Rutin hydrate induces autophagic cell death and oxidative stress response in phytopathogenic fungus Fusarium graminearum,” *Zemdirbyste*, vol. 110, no. 4, pp. 375–382, 2023

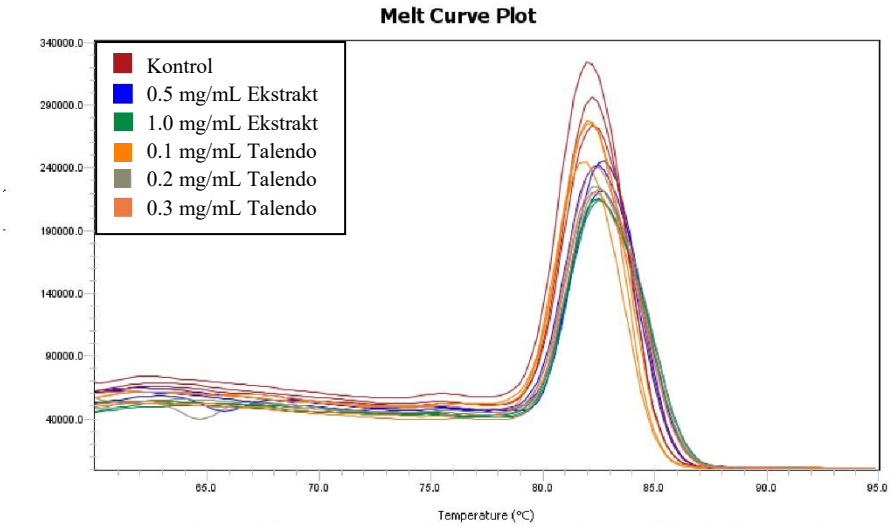
EK A
Erime Eğrisi Grafikleri



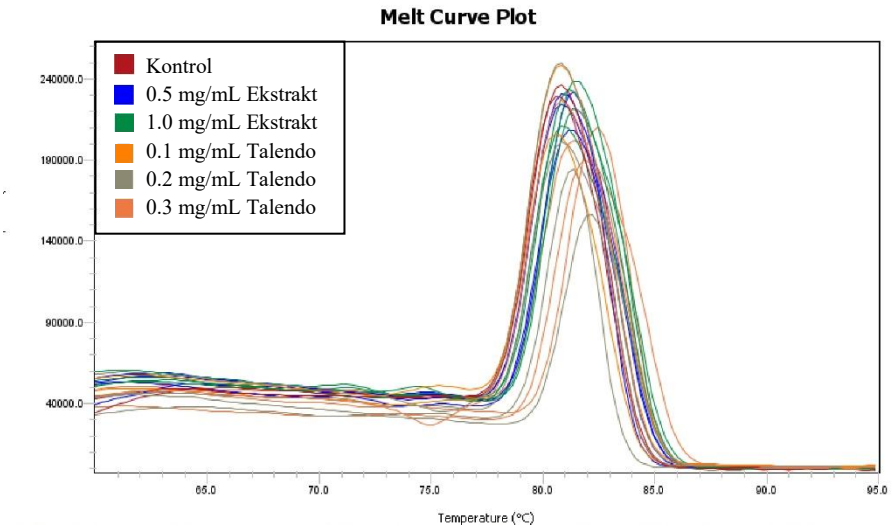
Şekil Ek A.1 *F. graminearum*'da *btub* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği



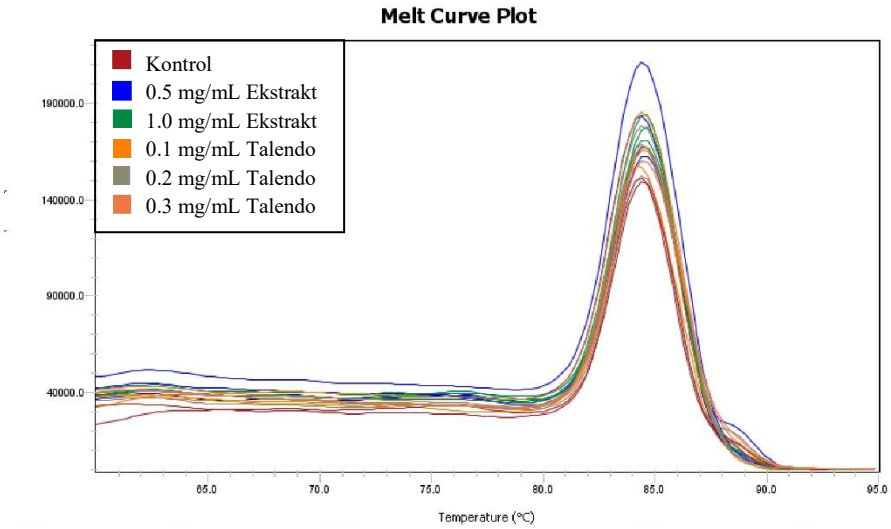
Şekil Ek A.2 *F. graminearum*'da *CAT* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği



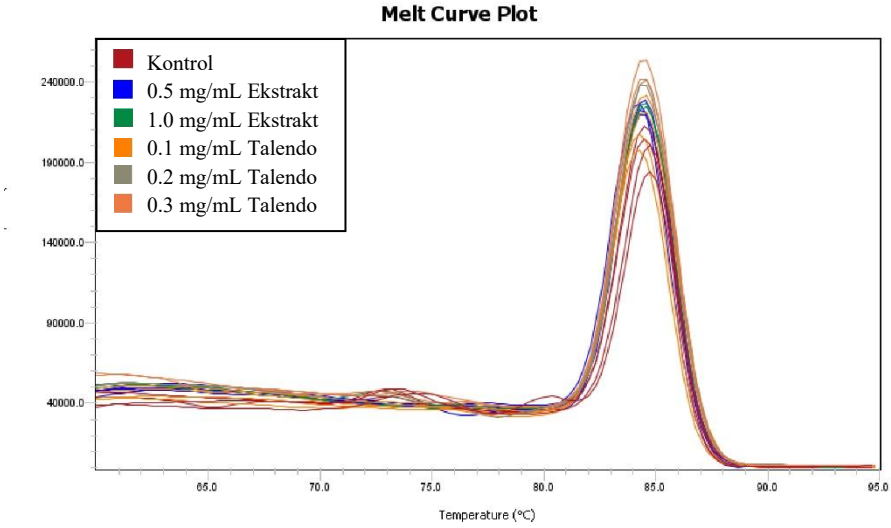
Şekil Ek A.3 *F. graminearum*'da *hog1* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği



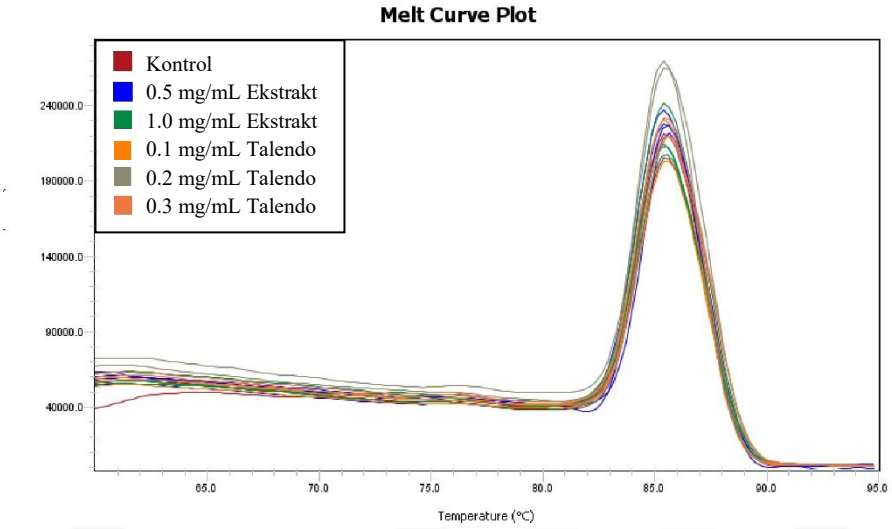
Şekil Ek A.4 *F. graminearum*'da *mst20* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği



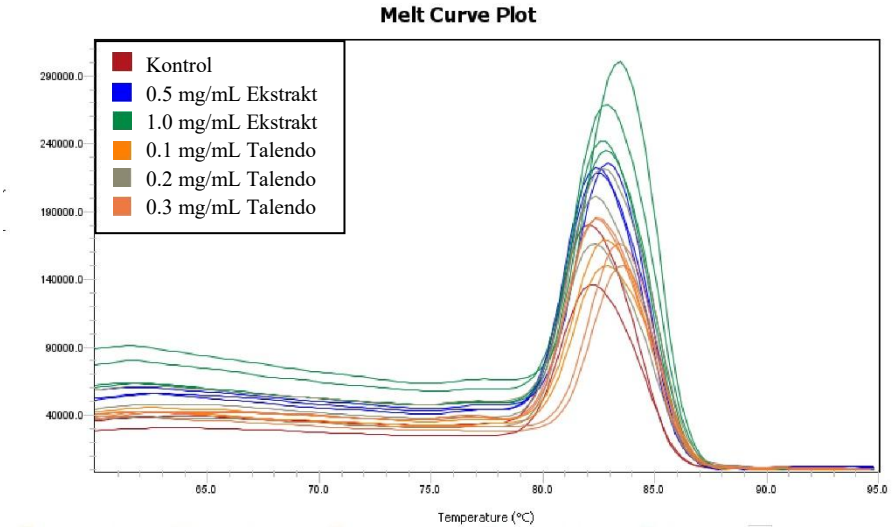
Şekil Ek A.5 *F. graminearum*'da *atg5* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği



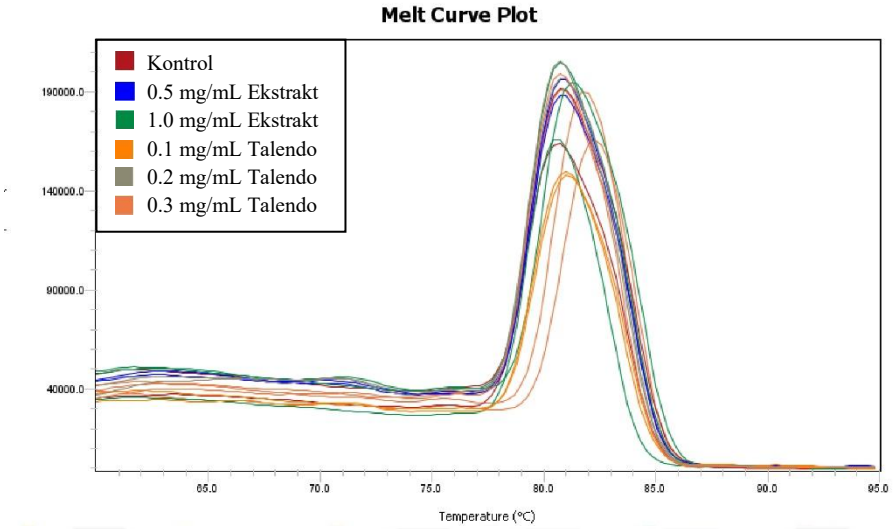
Şekil Ek A.6 *F. graminearum*'da *stuA* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği



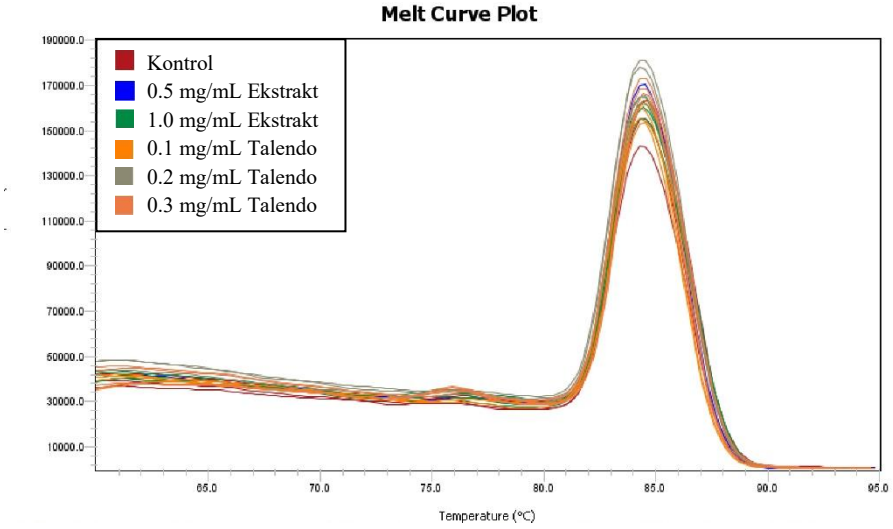
Şekil Ek A.7 *F. culmorum*'da *btub* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği



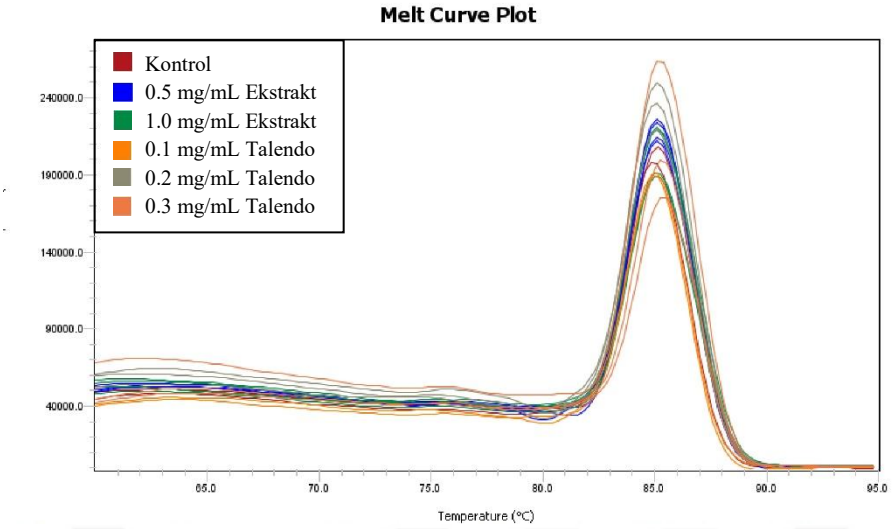
Şekil Ek A.8 *F. culmorum*'da *hog1* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği



Şekil Ek A.9 *F. culmorum*'da *mst20* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği



Şekil Ek A.10 *F. culmorum*'da *atg5* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği



Şekil Ek A.11 *F. culmorum*'da *stuA* geninin qRT-PCR'da erime eğrisi grafiği

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Aydin E. and Marakli S, Determination of total phenolic, flavonoid content, and antioxidant activity of rose of jericho (*Anastatica hierochuntica*), *8th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences*, Ankara, Turkey, December 17-19, 2025, pp. 96, ISBN: 978-605-72134-6-4.