

2,4-Dimetilpirol'ün Başak Yanıklığı Hastalığı Etmeni *Fusarium culmorum*'un Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Özlem SEFER^{1,*}, Emre YÖRÜK^{1,*}, Elif Sedef DEVELİ¹,
Ayşe Server SEZER¹, Zeynep KONUKCU¹

¹Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Ed. Fak., İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, 34010 İstanbul, Türkiye

Geliş: 31 Ocak 2017 - Düzeltme: 11 Nisan 2017 - Kabul: 19 Nisan 2017

Özet: Bitki patojeni *Fusarium culmorum* dünyada ve ülkemizde tahıllar üzerinde kök çürüklüğü ve başak yanıklığı başta olmak üzere çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Bu çalışmada *F. culmorum* ile mücadele kullanılabilecek yeni ve potansiyel bir ajan olarak 2,4-Dimetilpirol'ün patojen üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda 2,4-Dimetilpirol (0, 0.5, 1, 2 ve 4 mg mL⁻¹) uygulanmış *F. culmorum* 20F izolatında artan konsantrasyonlarda doğrusal büyüme oranındaki (DBO) değişim incelenmiş ve kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür. Ayrıca seksüel üreme ve hücre çeperi bütünlüğünden sorumlu *Mgv1* geninin anlatımı gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (k-PZR) ve ters transkripsiyon PZR (RT-PZR) ile incelenmiştir. Deney gruplarında kontrol gruplarına göre *Mgv1* geni için $5.21 \pm 0.05 \times 10^2$ kat artma saptanmıştır. Elde edilen bulgulara göre 2,4-Dimetilpirol'ün, *F. culmorum* türünde potansiyel bir antifungal etkili ajan olabileceği gösterilmiştir. İleriki çalışmalarda bu ajanın tarladaki fungal biyokütlenin ve toksin üretiminin azaltılmasını sağlayarak hastalık ile mücadelede yeni bir yaklaşım olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antifungal; Başak Yanıklığı; *Fusarium*; 2,4-Dimetilpirol

Investigation of the Effects of 2,4-Dimethylpyrrole on *Fusarium culmorum* Causal Agent of Head Blight Disease

Received: 31 January 2017 - Revised: 11 April 2017 - Accepted: 19 April 2017

Abstract: *Fusarium culmorum*, a phytopathogen, cause several diseases including root rot and head blight on cereals in worldwide and our country. In this study, effects of 2,4-Dimethylpyrrole, as a novel and potential agent on pathogen which can be used in fight with *F. culmorum* were investigated. For this purpose, alteration in linear growth rate (LGR) in *F. culmorum* 20F isolate, subjected to different concentrations of 2,4-Dimethylpyrrole (0, 0.5, 1, 2, 4 mg mL⁻¹) was investigated and the significant decrease between control and experiment sets was determined. Besides, expression of *Mgv1* gene, responsible for sexual stage and cell wall integrity, was investigated via quantitative real time polymerase chain reaction (q-PCR) and reverse transcription PCR (RT-PCR). In comparison to control groups, $5.21 \pm 0.05 \times 10^2$ fold increases in experiment set for *Mgv1* gene was detected. According to findings obtained, it was shown that 2,4-Dimethylpyrrole could be a potential antifungal agent for *F. culmorum*. In further works, it is suggested that this agent could be used as a novel approach in disease control including inhibition of fungal biomass and toxin production in field.

Keywords: Antifungal; Antifungal; Head Blight; *Fusarium*; 2,4-Dimethylpyrrole

*Corresponding Authors E-mail: ozlemsefer@outlook.com, emre.yoruk@yeniyuzuil.edu.tr

1. GİRİŞ

Tahıllar tüm dünyada ekonomik açıdan büyük bir öneme sahip olup pek çok ülke için önemli bir geçim kaynağıdır. Food and Agriculture Organization (FAO) 2013 verilerine göre, dünya genelinde 2.780.666.068 ton yıl⁻¹ tahıl üretimine ulaşılmıştır [<http://faostat.fao.org>]. 2013 yılında ülkemizde ise 37.475.264 ton yıl⁻¹ tahıl üretimi gerçekleşmiştir. Biyotik ve/veya abiyotik stresler sonucunda tahıllarda meydana gelecek ekonomik kayıplar, ülke ekonomilerini doğrudan ilgilendirmektedir. Tahıllarda meydana gelen en önemli biyotik stres faktörü olan fungal hastalıklar ile mücadele bu kapsamda büyük önem taşımaktadır [1].

F. culmorum tahıllar başta olmak üzere çok çeşitli bitkileri enfekte edebilmektedir. Bu etmen tahıllarda başak yanıklığı ve kök çürüklüğüne sebep olmaktadır. Her iki hastalık için de *F. culmorum* tahıl üretilen bölgelerde *F. graminearum* ile birlikte iki önemli patojenden birisidir [2]. Bu hastalıklardan başak yanıklığı, ekonomik değere sahip tahıllarda global anlamda ciddi bir hastalık konumundadır. *F. culmorum* bu hastalığı sıklıkla ılıman bölgelerde oluşturmakla birlikte, serin ve nem oranı yüksek bölgelerde de son yıllarda hastalığa neden olduğu bildirilmiştir [3]. Başaklar beyazlaşır, tohumlarda kuruyup büzüşme ile gelişim geriliği olur. Ürün kayıpları Kanada, Amerika ve Çin'de milyon dolarlara kadar ulaşabilmektedir [4, 5]. *F. culmorum* tarafından oluşturulan diğer bir global hastalık kök çürüklüğüdür. Başak yanıklığının aksine hastalığın belirtileri enfeksiyon zamanına göre değişkenlik gösterir. Erken gelişim döneminde bitkilerde enfeksiyon meydana gelmişse koleoptiller, sap ve kökler renksizleşir, buna karşın, ileriki dönemlerde meydana gelen enfeksiyonlarda, ana sapta kahverengi lezyonlar meydana gelir ve yeni sürgünler gelişemez. Başak yanıklığında olduğu gibi hastalık nemli bölgelerde de görülmektedir. [6]. Hastalığın özellikle su stresinin olduğu kurak alanlarda Türkiye'de orta Anadolu'da en önemli kök boğazı çürüklük etmeni *Fusarium* türü olduğu bazı çalışmalarda ortaya konulmuştur [7, 8].

F. culmorum taksonomik olarak Ascomycota şubesinden Hypocreales takımının bir üyesidir. Esas habitatı toprak olan *F. culmorum*, nekrotrofik yaşam döngüsüne sahiptir. Dünya genelinde Avustralya, Kuzey Afrika, Avrupa, Batı Asya ve Amerika'da bu türün varlığı rapor edilmişken ülkemizde de Marmara, İç Anadolu, Ege, Karadeniz ve Akdeniz bölgelerinde var olduğu kayıtlara geçmiştir [2, 3, 8-10]. *F. culmorum* 'a ait genom projesi resmi olarak tamamlanmamıştır. Haploit kromozom sayısı n=4 olan bu türde, FcUK99 izolatının kromozomal düzeyde dizilim bilgisine ait çok sayıda veri toplanmıştır. Genom boyutu 39 Mbp olarak tahmin edilmekte ve öncül veriler, veri tabanlarına yüklenmiştir [5]. Ayrıca bu türdeki bazı özgün genlere (toksin üretimi, eşem tipi genleri vb.) ait veriler veri tabanlarında mevcuttur [<http://www.embl.org>; www.ncbi.nlm.nih.gov]. Günümüzde mevcut gen/genom dizilim bilgileri baz alınarak *F. culmorum* türündeki çalışmalar giderek artmakta ancak *F. graminearum* türüyle gerçekleştirilen çalışmalar ile karşılaştırıldığı zaman nispeten nicelik olarak daha düşük seviyede kalmaktadır. Bu sebeple *F. culmorum* türüyle gerçekleştirilecek genomik ve transkriptomik düzeydeki çalışmaların artması patojenin karakterizasyonu ve hastalıkları ile mücadelede önem arz etmektedir.

Yurdumuzda tanı, genotiplendirme ve kemotiplendirme araştırmaları ile arpa ve buğday bitkilerinde *F. culmorum*'un varlığı saptanmıştır [10-12]. Ancak yurdumuzda çalışmaların çoğunluğu genetik çeşitlilik ve mikotoksin analizleri üzerine yoğunlaşmıştır [2, 5]. Mikotoksin analizlerinde ise çoğunlukla *tri5* gen kümesindeki polimorfizm üzerinde durulmuştur [10, 12]. Bu patojen ve oluşturduğu hastalıklarla mücadele kapsamındaki çalışmalar özellikle *F. culmorum* türü baz alındığında sınırlı düzeyde kalmıştır. *F. culmorum* ve başak yanıklığı ile mücadele çalışmalarında patojene dirençli bitki çeşitlerinin geliştirilmesi önemli bir yaklaşımdır. Ancak bu süreçte sınırlı sayıda çeşit geliştirilebilmesi, geliştirilen çeşitlerin agronomik kalitesinin düşük nitelikte olabilmesi ve çalışmaların uzun süre gerektirmesi önemli olumsuzluklardandır. Ayrıca, antagonistik mikroorganizmalar ile mücadele ve geleneksel

olarak fungusit uygulaması da diğer yaklaşımlardır. Tritikonazol, tebukanazol ve carbendazim fungusitleri bu kapsamda Türkiye de dahil olmak üzere çeşitli ülkelerde uygulanmıştır [13-15]. *F. culmorum* türünde genetik çeşitlilik seviyesinin yüksek olması, paraseksüel üremenin varlığı ve fungusların potansiyel antifungallere direnç geliştirebilme yetenekleri, *Fusarium* türleriyle mücadelede muhtemel yeni yaklaşımların uygulanmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır. *Fusarium* sp. tarafından üretilen toksinlerin üretiminin durdurulması hastalıkla mücadele stratejilerinin geliştirilmesi kapsamında moleküler genetik uygulamalarıyla gerçekleştirilmiştir [2, 16, 17]. Fungusun eşeysiz ve/veya paraseksüel üremesiyle ilişkilendirilmiş genlerin karakterizasyonu ise bu kapsamda incelenecek bir diğer alternatif yaklaşımdır. *Mgv1*, *FcStua*, *Vela*, *Top1* ve *chs1* genleri bu kapsamda ele alınabilecek en önemli potansiyel genler arasındadır. Bu genler arasından *Mgv1* geni, gen boyutu ve öncü dizilim bilgileri sebebiyle çeşitli bileşiklerin antifungal etkilerinin incelenmesi için muhtemel hedef genidir. *Mgv1* geni mitozu teşvik eden maddeler tarafından uyarılan ve fosforilasyonla aktive olan bir protein kinazı kodlamaktadır [18]. Genin boyutu 1543 bp olup 4 intron içermektedir. Genin protein ürünü toksin (butenolid ve trikotesen) üretimi, bitki enfeksiyonu ve hücre çeperi bütünlüğü açısından elzemdir. Bu noktada *Mgv1* geni ilişkili olduğu ciddi biyolojik süreçler vasıtasıyla muhtemel antifungal etkili bileşiklerin etkilerinin gösterilmesinde ve ispatlanmasında hedef bir genidir.

Bu çalışmada ilk kez bitki patojeni *F. culmorum*'da antifungal etkinliği araştırılmamış olan 2,4-Dimetilpirol incelenmiştir. 2,4-Dimetilpirol, çeşitli kompleks makrosiklik yapıların bileşeni olan pirollerin *N*-metilpirol ($C_4H_4NCH_3$) türevlerinden birisi olup C_6H_9N açık formülüne sahip bir moleküldür. 2,5-Dimetilpirol bileşiğinin antimikrobiyal etkileri *Candida tropicalis* ve *Aspergillus niger* üzerinde gösterilmiştir [19]. 2,4-Dimetilpirol'ün antifungal etkiye sahip olabileceği Arif ve diğ. (2009) tarafından ifade edilmiştir. Çalışma kapsamında 2,4-Dimetilpirol'ün fungus üzerindeki fenotipik ve transkriptomik etkileri *F. culmorum* 20F izolatında incelenmiştir. Doğrusal büyüme oranı (DBO) analizleri fenotipik düzeydeki incelemelerde kullanılırken, hücrede önemli biyolojik süreçlerin sürdürülmesinden sorumlu *Mgv1* geninin anlatım profilleri de transkriptomik araştırmalarda kullanılmıştır. Elde edilen verilerin sonucunda *F. culmorum*'a karşı mücadelede uygulanabilecek muhtemel etkili bir antifungal bileşiğin karakterizasyonu açısından önem arz etmektedir. Ayrıca farklı konsantrasyonlardaki 2,4-Dimetilpirol solüsyonlarının doğrudan uygulaması ve/veya püskürtme yaklaşımı ile tarlada hastalığın kontrol altında tutulabilmesine katkı sağlanabilecektir.

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Patojen ve Fenotipik Testler

F. culmorum 20F izolatı Prof. Dr. Berna Tunalı (Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Bitki Koruma Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonun)'dan temin edilmiştir. Kontrol grubuna ait örnek patates dekstroz agar (PDA: Hi-Media, India) besi ortamında, deney grubunda ise PDA'ya ek 0, 0.5, 1, 2 ve 4 mg mL⁻¹ artan konsantrasyonlarında 2,4-Dimetilpirol (Sigma, A.B.D.) içeren besi ortamında yedi gün süre ile 28°C'de inkübe edilmiştir. Araştırmada doğrusal büyüme oranını elde etmek ve minimum inhibisyon konsantrasyonunu hesaplamak için agar dilüsyon tekniği kullanılarak 0.25 cm² lik kültür plakları besi ortamlarına aktarılmıştır.

2.2. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Çevrimi

Tri-Reagent (Sigma, A.B.D.) kullanılarak *F. culmorum* 20F izolatının yedi günlük katı kültürlerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Total RNA izolasyonu 0.5 mL Tri-Reagent için 5-10 mg miselyum kullanılarak tavsiye edilen protokole göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen total RNA molekülleri UV ışık altında, %1'lik agaroz jel elektroforezi ile

görüntülenerek analiz edilmiştir. Total RNA'ların kantitatif analizleri ise GelQuant yazılımı (Biochemlabsolutions, A.B.D.) ve spektrofotometre (Shimadzu, Japonya) ile gerçekleştirilmiştir.

cDNA molekülleri, iki aşamalı ticari kit ile kPZR ve RT-PZR tekniğinde kullanılmak üzere total RNA moleküllerinden (Applied Biosystems, İngiltere) sentez edilmiştir. cDNA sentezi tavsiye edilen protokole göre tüm örnekler için başlangıç miktarı eş olacak şekilde 2 µg RNA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar 1/4 oranında sulandırılarak gen anlatımı analizlerinde kullanılmıştır.

2.3. Gen Anlatım Analizleri

Mgv1, (ve içsel kontrol gen olarak *β-tubulin*) anlatımının analizinde RT-PZR ve kPZR uygulamaları kullanılmıştır. RT-PZR deneylerinde bileşenler konsantrasyonları 1 X PZR tamponu, 0.25 mM dNTP karışımı, 10 pmol ileri ve geri primerler (Tablo 1), 2.5 mM MgCl₂, 2 µg RNA'ya denk gelen cDNA'dan 5 µL ve 1 U *Taq* DNA polimeraz enzimi (Thermo, A.B.D.) olacak şekilde toplam 25 µL hacimde birleştirildi. Çoğaltım, 94°C'de 5 dakikalık ön denatürasyonu takiben 45 tekrardan oluşan 94 °C'de 20 saniye, 59 °C'de 20 saniye ve 72 °C'de 40 saniye basamakları ile tamamlanmıştır. Süreç 72 °C'de 5 dakikalık final uzama basamağı ile tamamlandı. Çoğaltım ürünleri %1.7'lik agaroz jel ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. Gen anlatımı çalışmalarında kullanılan primer molekülleri.

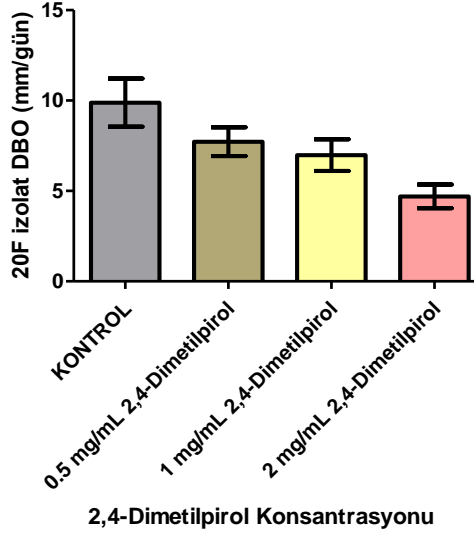
Primer	Primer Dizisi (5'-3')	Band Boyutu (bp)
QPCRf	AGGGTCATTACACCGAGGGT	121
QPCRr	GTACCACCACCAAGAGAGTGG	
MGVRf	AGGTTCAACGATTCCGACAG	100
MGVRr	GACCATTACCCTGAGGCAGA	

Gerçek zamanlı gen anlatımı analizlerinde *β-tubulin* geni içsel kontrol, *Mgv1* geni hedef gen olarak kullanılmış olup; oransal değişimlerinin analizi için kPZR cihazına ait yazılımından elde edilen veriler kullanılmıştır (Roche LightCycler 480 II, İsviçre). kPZR işleminde Eva Green (Biorad, Fransa) floresan boya olarak kullanılmıştır. Toplam hacim 20µl olacak şekilde kPZR bileşenleri 1 X Eva Green karışımı, 5 pmol ileri primer, 5 pmol geri primer ve 1 µg RNA'ya denk gelen miktarda cDNA olacak şekilde mikrotüplerde bir araya getirilmiştir. PZR koşulları 95 °C'de 10 dakika ile ilk denatürasyonu takiben 45 tekrardan oluşan 95°C'de 20 saniye, 59 °C'de 20 saniye, 72°C'de 40 saniye bekleme süresinden ve son olarak da 40°C'de 30 saniyelik soğutma aşamasından oluşmaktadır. Erime eğrisi analizleri ve 4 logaritmik fazdan oluşan standart serileri, PZR etkinliğinin ve doğruluğunun analizi için gerçekleştirilmiştir. Gen anlatım profilleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalizasyon değerleri göre elde edilmiştir [21]. Çalışmalar en az iki tekrar ile gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler GraphPad Prism 5.0 yazılımı kullanılarak (Tukey Testi, Tek Yönlü ANOVA Analizi) gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. *In vitro* Üreme ve 2,4-Dimetilpirol Uygulaması

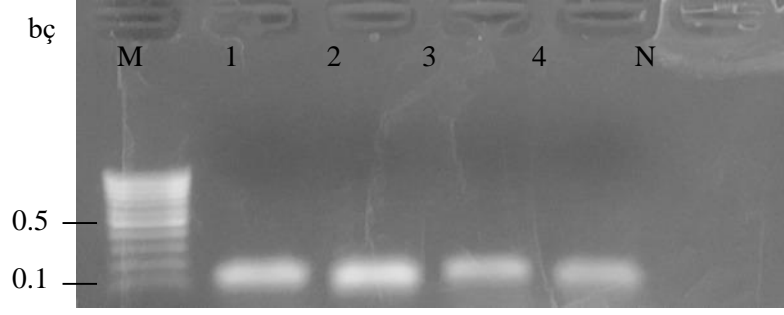
F. culmorum 20F izolatı 2,4-Dimetilpirol içeren ve içermeyen (0, 0.5, 1, 2 ve 4 mg mL⁻¹ 2,4-Dimetilpirol) PDA besi ortamlarında üreme göstermiştir. Üremenin görülmediği 2,4-Dimetilpirol konsantrasyonu 4 mg mL⁻¹ 2,4-Dimetilpirol olarak saptandığından IC₅₀ konsantrasyonu 2 mg mL⁻¹ 2,4-Dimetilpirol olarak belirlenmiş ve gen anlatım çalışmalarında bu deney seti kullanılmıştır. Deney ve kontrol grupları arasında DBO açısından anlamlı bir farklılık (p<0.01) görülmüştür (Şekil 1). DBO değerleri kontrol grubunda 9.88±0.54 iken, bu değerlerin deney setlerinde 4.7±0.27 – 7.72-0.32 arasında olduğu saptanmıştır.



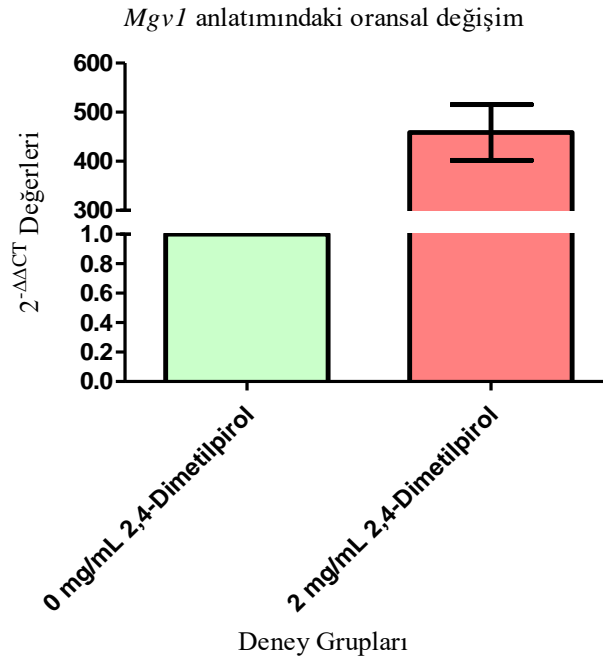
Şekil 1. Farklı konsantrasyonlarda 2,4-Dimetilpirol içeren besi ortamlarında üretilen 20F izolatının doğrusal büyüme oranı verilerine ait grafik.

3.2. Gen Anlatımı Analizleri

20F izolatına ait deney ve kontrol setlerinde yüksek kalite ($\Delta_{260/280} = 1.9-2.0$) ve miktarda (0.5-2 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) total RNA molekülleri izole edilmiştir. Total RNA moleküllerinden çevrilen cDNA molekülleri RT-PZR ve kPZR çalışmalarında kullanılmıştır. Normalizasyon, hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -*tubulin* amplifikasyonu ile sağlanmıştır. RT-PZR analizlerinde, agaroz jel elektroforezi sonucunda içsel kontrol gene ait 121 bç'lik, *Mgv1* genine ait 100 bç'lik amplifikasyon ürünü elde edilmiştir (Şekil 2). Bulgular kPZR ile doğrulanmıştır. kPZR analizlerinde, $\bar{X}E$ (ortalama etkinlik) değeri 2.04 ± 0.03 olarak saptanmıştır. Ortalama erime eğrisi skorları içsel kontrol gen ve *Mgv1* geni için sırasıyla 0.94 ± 0.01 ve 0.97 ± 0.01 olarak belirlenmiştir. Bu veriler kPZR işleminin etkin bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir. $\bar{X}\Delta C_p$ (ortalama eşik döngüsü farkı) değerleri deney grubu için 1.48 ± 0.015 iken, kontrol grubu için 10.51 ± 0.03 olduğu belirlenmiştir. Normalizasyon bulgularına göre; deney setleri kontrol grubu ile kıyaslandığında $\bar{X}2^{-\Delta\Delta C_T}$ (ortalama gen anlatımındaki oransal değişim) değeri *Mgv1* geni için $5.21 \pm 0.05 \times 10^2$ olarak belirlenmiştir. Bu durum gen anlatımındaki oransal değişimlerin yaklaşık 5×10^2 kat (Şekil 3) oranında arttığını göstermiştir. İstatistiksel verilere göre gen anlatımındaki bu oransal değişimler anlamlı farklılık göstermektedir (p<0.001).



Şekil 2. 20F izolatının hedef (1, 2) ve içsel kontrol gene (3,4) ait RT-PZR profili. M: 100 bç DNA boyut markırı (Sibenzyme, Rusya), N: negatif kontrol, 1 ve 3 sırasıyla kontrol grubu, 2 ve 4 ise deney grubuna ait ampliconlar.



Şekil 3. *Mgv1* gen anlatımındaki oransal değişim profili.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitki patojeni funguslar tahıllarda en önemli stres faktörlerinden birisidir [1]. Bitki patojenlerinin mısır ve buğday başta olmak üzere ekonomik öneme sahip bitkilerde kayıp meydana getirmesinin yanı sıra üretilen mikotoksinlerin bu bitkilerde birikmesi; dolaylı olarak insan ve hayvan sağlığını olumsuz etkilemektedir [2, 22]. *Fusarium* başak yanıklığı ve kök çürüklüğü hastalıkları tahıllarda görülen ve ülkemizde de varlığı tespit edilen hastalıklar arasında yer almaktadır [10]. Bu çalışmalarda detaylı olarak patojenlerin genotiplendirmeleri ve mikotoksin üretme potansiyelleri genetik ve analitik metotlar ile araştırılmıştır. Bu şekilde bu çalışmalarla birlikte hastalıkla mücadeledeki elzem bir başlangıç basamağı olan patojenin tanımlanması gerçekleştirilmiştir [2, 10, 12].

Fusarium başak yanıklığı ve kök çürüklüğü ile ilgili kapsamlı tarımsal biyoteknoloji ve moleküler genetik çalışmalarında; patojenlerinin tanımlanmasını genellikle patojenin meydana getirdiği zararların indirgenmesi ve hatta mümkünse bu hasarların ortadan kaldırılması takip eder. Deoksinivalenol mikotoksininin *F. graminearum* ve *F. culmorum* türlerinde 'quelling' süreci ile üretiminin durdurulması bu bağlamda gerçekleştirilmiştir [16, 17]. Ancak, bu güncel

teknoloji kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda hem gen anlatımı hem de toksin üretiminde beklenenin aksine trajik seviyelerde artış da gözlemlendiğinden global anlamda etkili bir çözüme ulaşılamamıştır. Benzer şekilde çeşitli fungusit uygulamaları başak yanıklığı ve kök çürüklüğü etmenleri üzerinde denenmiş patojen üzerinde %80 civarında etkili oldukları gösterilmiştir [13, 14]. Son yıllarda farklı tipte potansiyel antifungal niteliği taşıyan bitki ve mikroorganizma türevli metabolitler *Fusarium* türleri üzerinde denenmektedir. *Fusarium* türleri ile ilişkili çalışmaların çoğunluğu genom projeleri tamamlanmış iki tür, *F. graminearum* ve *F. oxysporum* üzerinde yoğunlaşmıştır. Buna karşın *F. culmorum* üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar nispeten daha sınırlıdır [23, 24]. Hastalıkla mücadelede yeni bakış açılarının elde edilmesinde, *F. culmorum* üzerinde yapılacak antifungal aktivite çalışmaları, kapsamlı ve yararlı verilere ulaşılmasını sağlayacaktır.

Pirol içeren bazı çeşitli bileşikler bitkilerde, hayvanlarda çok fazla sayıda biyolojik bileşiğin bir parçası olarak bulunmaktadır. Pigmentasyon, antimikrobiyal etki, enzimatik süreçler ve diğer bazı önemli biyolojik faaliyetlerde rol oynayan moleküllerde yer alırlar. Hint yağı bitkisi, su yasemini ve diğer bazı bitkilerden elde edilebilen dimetilpirol formlarının ilaç ve antimikrobiyal etkileri günümüzde araştırılmaya başlanmıştır [20, 25, 26]. Bununla beraber dimetilpirol formlarının *F. culmorum* üzerine etkisi bilinmemektedir. Bu sebeple bu çalışmada çeşitli bitkilerden elde edilebilen 2,4-Dimetilpirol bileşiğinin saf molekülünün potansiyel antifungal etkileri, daha önceki çalışmalarda tür düzeyinde tanımlanmış ve toksin (deoksivalenol) üretme yeteneği araştırılmış olan *F. culmorum* 20F izolatu üzerinde gerçekleştirilmiştir [12]. Yoshi ve diğ. (2013) farklı mikroorganizmalarda 2,5-Dimetilpirol'ün IC₅₀ değer aralığının 0,5-250 µg mL⁻¹ arasında değiştiğini rapor etmiştir. Bu çalışmada ise *F. culmorum* 20F izolatında IC₅₀ değerinin 2 mg mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. DBO verileri bu bileşiğin *F. culmorum* türü için potansiyel bir antifungal ajan olabileceğini göstermektedir. Ayrıca DBO'ya ait bilimsel olarak anlamlı farklılıklar, bitki enfeksiyonu, hücre çeperi bütünlüğünde iş gören ve seksüel/aseksüel üremede görevli Mgv1 genine ait normalizasyon verileri ile desteklenmiştir.

Fungusun üremesiyle ilişkili genlerin anlatımının incelenmesi, herhangi bir antimikrobiyal bileşiğin fungusta oluşturacağı değişiklikleri araştırılmasına yönelik fenotipik testlerin doğrulanması için potansiyel bir yaklaşımdır. Mgv1, FcStua ve VelA genleri bu açıdan incelenebilecek en önemli potansiyel genler arasındadır. Mgv1 geni veri tabanlarında dizilim bilgilerinin yer almasından dolayı bileşiklerin antifungal etkilerinin incelenmesinde olası bir hedef genidir. Mgv1 geni mitojen ile aktive edilen bir protein kinazı kodlamaktadır [18]. Genin protein ürünü toksin üretimi, bitki enfeksiyonu ve hücre çeperi bütünlüğü açısından anlatımı elzem bir genidir. Çalışmada 2,4-Dimetilpirol uygulanmamış örnek ile gerçekleştirilen normalizasyon verilerine göre Mgv1 anlatımı 5x10² kat artış göstermiştir. Bu durum, potansiyel bir antifungal uygulaması sonucunda funguslarda görülen ve anlatımı yaşam çevriminin devamlılığı için gerekli olan genlerin anlatımındaki artışa bir örnektir [28]. Antimikrobiyal bileşiğin varlığı hücrede abiyotik bir stres olarak tanımlanmış ve yaşamın devamlılığı için Mgv1 geninin anlatımında potansiyel bir artış olduğu saptanmıştır. Veriler başak yanıklığı ve kök çürüklüğü hastalık etmenleri ile mücadelede potansiyel ve yeni bir uygulama sunması açısından önemlidir. Bu çalışmadan kullanılan bileşiğin daha önce *F. culmorum* üzerindeki etkilerinin incelenmemiş olması çalışma sonunda yeni veriler sunmuştur. Çalışma daha önceden bu bileşiğin *F. culmorum* üzerindeki fenotipik ve transkriptomik etkilerinin incelenmemesi açısından yeni veriler sunmuştur. Ayrıca Mgv1 geninin eşeyli üremede görev aldığı bilindiğinden eşeyli üreme görülen diğer *Fusarium* spp.' de de, bu bileşik, potansiyel bir ajan olarak kullanılabilir. 2,4-Dimetilpirol uygulanmış fungusta görülen ve dramatik seviyelere ulaşan gen anlatımındaki aşırı artış, bu kimyasalın fungusun homeostasisinde kuvvetli değişim meydana getirebildiğini göstermektedir. Bu durum bileşiğin

potansiyel bir biyolojik mücadele ajanı olduğunu göstermektedir. Bu bileşiğin diğer bazı nekrotrofik ve biyotrofik *Fusarium* türlerinde uygulanmasını içeren ileriki çalışmalar gelecek uygulamaları başak yanıklığı ve kök çürüklüğü ile mücadelede önemli verilerin ulaşılmasını sağlayabilir. *Fusarium* spp.'de de, bu bileşik, potansiyel bir ajan olarak kullanılabilir. Çalışmadan elde edilen veriler *F. culmorum*'un tahıllarda meydana getirdiği hastalıklarla mücadele için yeni stratejilerinin geliştirilmesi bakımından önem arz etmektedir.

Teşekkür

Yazarlar fungal materyal temininden dolayı Prof. Dr. Berna Tunalı'ya müteşekkirdir. Bu çalışma TÜBİTAK 2209-A projesi (1919B011600084) ve İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Mütevelli Heyeti tarafından desteklenmiştir. Özlem Sefer ve Emre Yörük çalışmaya eş katılım göstermişlerdir.

5. KAYNAKLAR

- [1]. Dyakov, T. Y., Dzhavakhly, V. G., and Korpela, T. (2007). *Comprehensive and molecular phytopathology*. Amsterdam: Elsevier.
- [2]. Miedaner, T., Cumagun, C. J. R., & Chakraborty, S. (2008). Population genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*. *Journal of Phytopathology*, 156: 129-139
- [3]. Yli-Mattila, T., Rämö, S., Hietaniemi, V., Hussien, T., Carlobos-Lopez, A. L., & Cumagun, C. J. R. (2013). Molecular quantification and genetic diversity of toxigenic *Fusarium* species in Northern Europe as compared to those in Southern Europe. *Microorganisms*, 1: 162-174.
- [4]. Wang, J. H., Ndoeye, M., Zhang, J.B., Li, H. P. & Liao, Y. C. (2011). Population Structure and Genetic Diversity of the *Fusarium graminearum* Species Complex. *Toxins*, 3: 1020-1037. [http:// dx.doi.org/10.3390/toxins3081020](http://dx.doi.org/10.3390/toxins3081020)
- [5]. Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, G., & Migheli, Q. (2013). *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology*, 14 (4): 323-341.
- [6]. Chakraborty, S., Liu, C. J., Mitter, V., Scott, J. B., Akinsanmi, O. A., Ali, S., Dill-Macky, R., Nicol, J., Backhouse, D., and Simpfendorfer, S. (2006). Pathogen population structure and epidemiology are keys to wheat crown rot and *Fusarium* head blight management. *Australasian Plant Pathology*, 35(6): 643-655.
- [7]. Aktaş, H., Kınacı, E., Yıldırım, A.F., Sayın L and Kural A. (1999). Determination of root and foot rot pathogens which are problems in Konya province and research and solution. Cereal Symposium CMB 1999, p. 392-403. Konya, Turkey.
- [8]. Tunalı, B., Nicol, J. M., Uçkun, Z., Büyük, O., Erdurmuş, D., Hekimhan, H., Aktaş, H., Hodson, D., Aydın Akbudak, M. and Bağcı, S. A. (2008). Root and crown rot fungi associated with spring and winter wheat in Turkey. *Plant Disease*. 92 (9):1299-1306.
- [9]. Bentley, A.R., Tunalı, B., Nicol, J.M., Burgess, L.W., and Summerell, B.A. (2006). A survey of *Fusarium* species associated with wheat and grass stem bases in northern Turkey. *Sydowia*, 58 (2): 163-177.
- [10]. Tok, F. M., & Arslan, M. (2016). Distribution and genetic chemotyping of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* populations in wheat fields in the eastern Mediterranean region of Turkey. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 30(2): 254-260.

- [11]. Çepni, E., Gürel, F., Tunalı, B. (2012). Genetic diversity and mating types of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* isolates in Turkish crop breeding areas. *Journal of Basic Microbiology*, 52: 1-9.
- [12]. Yörük, E., Tunalı, B., Kansu, B., Ölmez, F., Uz, G., Zümrüt, I. M., Sarıkaya, A., & Meyva, G. (2016). Characterization of high-level deoxynivalenol producer *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates caused head blight and crown rot diseases in Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 123: 177–186.
- [13]. Arslan, Ü., ve Baykal, N. (2002). Kök ve kökboğazı fungal patojenlerine karşı bazı buğday çeşitlerinin reaksiyonları ve tohum koruyucu fungusitlerin *Fusarium culmorum* (w.g.sm.) *sacc.*'a etkisi. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16: 69-76.
- [14]. Bernardo, A., Bai, G., Guo, P., Xiao, K., Guenzi, A. C., and Ayoubi, P. (2007). *Fusarium graminearum*-induced changes in gene expression between *Fusarium* head blight-resistant and susceptible wheat cultivar. *Functional and Integrative Genomics*, 7: 69-77.
- [15]. Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., & Fujimura, M. (2007). Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecen pathways gene and evolution. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 71: 2105-2123.
- [16]. McDonald, T., Brown, D., Keller, N. P., & Hammond, T. M. (2005). RNA silencing of mycotoxin production in *Aspergillus* and *Fusarium* species. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18 (6): 539-545.
- [17]. Scherm, B., Orru, M., Balmas, V., Spanu, F., Azara, E., Delogu, G., Hammond, T. M., Keller, N.P., & Migheli, Q. (2011). Altered trichothecene biosynthesis in *TRI6*-silenced transformants of *Fusarium culmorum* influences the severity of crown and foot rot on durum wheat seedlings. *Molecular Plant Pathology*, 12 (8): 759-771.
- [18]. Hou, Z., Xue, C., Peng, Y., Katan, T., Kistler, H. C., and Xu, J. (2002). A mitogen-activated protein kinase gene (MGV1) in *Fusarium graminearum* is required for female fertility heterokaryon formation, and plant infection. *International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11: 1119-1127.
- [19]. Joshi, S. D, More, U. A, and Kulkarni, V. H. (2013). Synthesis, Antimicrobial and cytotoxic activity of new heterocyclic hybrids based on 2,5-Dimethylpyrrole and pyrrole scaffolds. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, 75 (3): 310-323.
- [20]. Arif, T., Bhosale, J. D., Kumar, N., Mandal, T. K., Bendre, R. S., Lavekar, G. S., & Dabur, R. (2009). Natural products-antifungal agents derived from plants. *Journal of Asian Natural Products Research*, 11(7): 621-638.
- [21]. Livak, J. K., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 402-408.
- [22]. Sudakin, D. L. (2003). Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters*, 143: 97-107.
- [23]. Al-Burtamani, S. K., Fatope, M. O., Marwah, R. G., Onifade, A. K., & Al-Saidi, S. H. (2005). Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum Tuberculatum* from Oman. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1-2): 107-112.
- [24]. Cabral, L. C., Pinto, V. F., and Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 166: 1–14.
- [25]. Varshney, H., Ahmad, A., Rauf, A., Husain, F. M., & Ahmad, I. (2014). Synthesis and antimicrobial evaluation of fatty chain substituted 2,5-dimethyl pyrrole and 1,3-benzoxazin-4-one derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*,

- [26]. Yoshi, S. D., More, Y., Vagdevi, H. M., Vaidya, V. P., Gadaginamath, G. S., & Kulkarni, V. H. (2013). Synthesis of new 4-(2,5-dimethylpyrrol-1-yl)/4-pyrrol-1-yl benzoic acid hydrazide analogs and some derived oxadiazole, triazole and pyrrole ring systems: a novel class of potential antibacterial, antifungal and antitubercular agents. *Medicinal Chemistry Research*, 22: 1073-1089.
- [27]. Yoshi, S. D., More, U. A., & Kulkarni, V. H. (2013). Synthesis, Antimicrobial and cytotoxic activity of New Heterocyclic Hybrids Based on 2,5-Dimethylpyrrole and Pyrrole Scaffolds. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75 (3): 310-323.
- [28]. Karababa, M., Coste, A. L., Rognon, B., Bille, J., & Sanglard, D. (2004). Comparison of gene expression profiles of *Candida Albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drug inducing multidrug transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (8): 3064-3079.

SUMMARY

Purpose

Fusarium spp. is one of the major mycotoxin producing phytopathogenic fungi. Presence of more than 10 phytopathogenic species of this genus are reported in Turkey. *Fusarium culmorum* is a phytopathogenic species cause several diseases on all small grain cereals, especially on wheat, barley, oat and rye which are economically important crops, in Turkey and worldwide. This species lead to severe yield loses in crops including reduction in crop quality and quantity. Contamination of food by mycotoxins, especially class B-trichothecenes and zearalenon, produced by *F. culmorum* have been detected worldwide as well as in Turkey. *F. culmorum* is a causal agent of head blight and root rot in wheat and barley. Struggle with *F. culmorum* has critical importance in terms of development of novel disease management strategies worldwide. Genetically modified plants or *Fusarium* resistant cultivars usage, antagonistic approaches and gene silencing technologies are currently used in fight with *F. culmorum* diseases. Each approach has several disadvantages, whereas investigating the effects of novel or unexperienced antifungal compounds for *F. culmorum* present promising strategy in disease management. For this purpose, effects of 2,4-Dimethylpyrrole on *F. culmorum* 20F isolate which was obtained from diseased plants in Turkey was tested via phenotypic and transcriptomics analysis in this study.

Results and Discussion

In this study, phenotypic and transcriptomics effects of 2,4-Dimethylpyrrole on Turkish *F. culmorum* 20F isolate were investigated. *F. culmorum* 20F isolate was subjected to 2,4-Dimethylpyrrole with different concentrations (0.5, 1, 2 ve 4 mg mL⁻¹). Seven-day-old cultures were used in Minimum inhibitory concentration (MIC) value determination. IC₅₀ value was determined at PDA medium supplemented with 2 mg mL⁻¹ 2,4-Dimethylpyrrole. Moreover, increased concentrations of 2,4-Dimethylpyrrole led to the decrease in the linear growth rate (LGR) values. The significant difference (p<0.01) was detected among control and each experiment set as well as in the increased concentrations for experiments sets in LGR values. Experiment set with IC₅₀ value was used in transcriptomics analysis. First, total RNA molecules were extracted from control and experiment sets and then total RNAs were immediately converted to cDNA molecules. Expression of *Mgv1* gene, responsible for sexual stage and cell wall integrity, was investigated via quantitative real time polymerase chain reaction (q-PCR) and reverse transcription PCR (RT-PCR). β -tubulin gene was used as endogenous control. qPCR analysis were conducted on Eva Green dye detection on Roche LightCycler 480 II

system. Except values were as 2.04 ± 0.03 , mean melting scores were ranged from 0.94 ± 0.01 to 0.97 ± 0.01 for endogenous and target genes. Mean ΔC_p values were ranged from 1.48 ± 0.015 to 10.51 ± 0.03 . In comparison to control groups, $5.21 \pm 0.05 \times 10^2$ fold increases in experiment set for *Mgv1* gene was detected. In RT-PCR analysis, 121 bp and 100 bp amplicons belonging to endogenous and target genes, respectively, were obtained from control and experiment sets. According to findings obtained, it was shown that 2,4-Dimethylpyrrole could be a potential antifungal agent for *F. culmorum*. In further works, it is suggested that this agent could be used as a novel approach in disease control including inhibition of fungal biomass and toxin production in field.

Conclusion

In current study, significant changes in LGR and fold changes in gene expression for *Mgv1* were determined. Presence of 2,4-Dimethylpyrrole at high level of concentrations (up to 2 mg mL^{-1}) could be described as a potential antimicrobial against *F. culmorum*. Especially dramatic increase in *Mgv1* gene expression obtained from relative quantification analysis supported that 2,4-Dimethylpyrrole could be a potential antifungal compound to *F. culmorum*. Further analysis including 2,4-Dimethylpyrrole exposure to necrotrophic and biotrophic *Fusarium* sp. could provide a detailed and comprehensive strategy to fight with head blight and root rot diseases.