

Kaempferol'ün Başak Yanıklığı Etmeni *Fusarium culmorum*'un Üremesi ve Toksin Üretimi Üzerine Olan Etkileri

Özlem SEFER Emre YÖRÜK* Elif Sedef DEVELİ Işıl Melis ZÜMRÜT
Ayşe Server SEZER Zeynep KONUKÇU

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,
İstanbul
Sorumlu yazar: emreyoruk@outlook.com

Geliş tarihi: 02.09.2016, Yayına kabul tarihi: 13.07.2017

Özet: *Fusarium* türleri buğday ve arpada, kök çürüklüğü ve başak yanıklığı hastalıklarına neden olmaktadır. Bu çalışmada kaempferol uygulaması sonucunda başak yanıklığı etmeni *F. culmorum* F24 izolatında niceliksel olarak spor üretimi, DON üretiminde sorumlu genlerden *tri4* geninin anlatımı ve kalitatif olarak DON üretimi incelenmiştir. Spor üretiminin artan kaempferol konsantrasyonlarında (0, 10 ve 20 µg mL⁻¹ kaempferol) düştüğü ve bu farkın anlamlı olduğu (p<0.001) saptanmıştır. Kaempferol uygulanmış ve uygulanmamış örneklerden izole edilen total RNA molekülleri cDNA'ya çevrildikten sonra Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nda (RT-PZR) *tri4* anlatımının incelenmesinde kullanılmıştır. Kontrol grubunda gen anlatımı belirlenirken, deney gruplarında gen anlatımı saptanmamıştır. Benzer şekilde ince tabaka kromatografisinde de kontrol grubunda 0.27 R_f (ing., 'Retention factor') değerine sahip spot görülürken, deney gruplarında DON'a ait spot saptanmamıştır. Elde edilen veriler kaempferol'ün düşük konsantrasyonlarda bile *F. culmorum* türünde spor üretimini azalttığını ve DON üretimini baskılayabildiğini göstermiştir. Elde edilen veriler kaempferol'ün daha önce bu türde antifungal etkisinin araştırılmaması sebebiyle özgünlük içermekte; veriler bitki patolojisi araştırmaları açısından önem arz etmektedir.

Anahtar kelimeler: Antifungal, başak yanıklığı, deoksinivalenol, *Fusarium*, kaempferol.

Effects of Kaempferol on Growth and Toxin Production of Head Blight Agent *Fusarium culmorum*

Abstract: *Fusarium* species cause root rot and head blight diseases on wheat and barley. In this study, quantitative spore production, expression of *tri4* gene which is one of genes responsible for DON production, and qualitative DON production were examined in *F. culmorum* F24 isolate, agent of head blight. It was determined that spore production was decreased by increasing concentrations of kaempferol (0, 10 ve 20 µg mL⁻¹ kaempferol) and these differences were significant (p<0.001). Total RNA molecules isolated from samples subjected or non-subjected to kaempferol were used in Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) in order to examine the *tri4* expression after they were converted to cDNA. While gene expression was determined in control group, it was not determined in experimental groups. Similarly, spot of 0.27 R_f value was detected on control group on thin layer chromatography, but no spot belonging to DON was detected on experimental groups. Findings obtained from this study showed that kaempferol even at low concentrations decreased the production of spores and repressed the biosynthesis of DON in *F. culmorum* species. Results of the study is original since that the antifungal effects of kaempferol on this species was not investigated before; output data have importance in terms of plant pathology research.

Key words: Antifungal, head blight, deoxynivalenol, *Fusarium*, kaempferol.

* Bu çalışma İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Mütevelli Heyeti ve TÜBİTAK 2209-A projesi (1919B011600084) tarafından desteklenmiştir

Giriş

Buğday ekonomik açıdan tüm dünyada önemli bir tahıl bitkisidir. 2013 yılı Food and Agriculture Organization (FAO) verilerine göre dünya genelinde 713.182.914 ton yıl⁻¹ buğday üretimi gerçekleştirilmiştir (<http://faostat.fao.org>). Ülkemizde ise 2013 yılında 22.050.000 ton buğday üretilmiştir. Abiyotik ve biyotik stres faktörleri buğdayda ciddi ekonomik kayıplara neden olabilmektedir (Windels, 2000; Dyakov et al., 2007).

Buğdayda görülen başak yanıklığı *Fusarium* türleri tarafından oluşturulan önemli bir hastalıktır (Parry et al., 1995). Bu hastalık tarlada ekin miktar ve kalitesinde ciddi azalmaya sebebiyet vererek nihayetinde ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Miedaner et al., 2008; Scherm et al., 2013). Ayrıca hastalığın görüldüğü tahıllarda, B-tipi trikotesenler, zearalenon ve diğer bazı mikotoksinlerle kontaminasyon gerçekleşmektedir (Desjardins and Proctor, 2007). Hastalıklı bitkilerde sıklıkla B-tipi trikotesenlerden deoksinivalenole (DON) rastlanmaktadır. DON hastalığın yayılmasında etkili olup, ökaryotik protein sentez inhibitörü olarak etki göstermektedir. DON besin zinciri aracılığıyla da insan ve hayvanların sağlığını tehdit etmektedir (Bai et al., 2001; Gutleb et al., 2002).

Başak yanıklığı etmeni olan *Fusarium* türlerinin konukçu bitki aralığı geniş olup; patojenler tahıllardan süs bitkilerine kadar çeşitli bitkilerde hastalık oluşturabilmektedir (Özer ve Soran 1991). *Fusarium* türlerinin zararı yurdumuzda da gözlenmektedir (Tunalı et al., 2006; Miedaner et al., 2008). *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* tür kompleksi ile birlikte, başak yanıklığı hastalığının dünya genelinde iki başlıca patojeninden birisidir (Parry et al., 1995; Bai and Shaner, 2004). *F. culmorum* taksonomik olarak Ascomycota bölümünden, Sordariomycetidae sınıfının, Hypocreales takımının bir üyesidir. Nekrotrofik yaşam döngüsüne sahip olan bu türün esas habitati topraktır; üremesi için ideal sıcaklık 24-32 °C iken, uygun pH değeri aralığı ise 5-7'dir. Ülkemizde Marmara, İç Anadolu, Ege, Karadeniz ve Akdeniz bölgelerinde rapor edilmiştir (Özer ve Soran 1991; Parry et al.,

1995; Tunalı et al., 2006; Miedaner et al., 2008; Mert-Türk ve Gencer 2013; Yli-Mattila et al., 2013). Haploid kromozom sayısı n=4 olan *F. culmorum* genom projesi resmi olarak tamamlanmamıştır. Ancak 3-ADON kemotipindeki FcUK99 izolatının kromozomal düzeyde dizilim bilgisine ait ilk veriler toplanmış ve veritabanlarına yüklenmiştir (Scherm et al., 2013). Ayrıca özgün bazı genlere ait veriler veritabanlarında kayıt altına alınmıştır (www.ncbi.nlm.nih.gov). Bununla birlikte *F. culmorum* genomunun dizilim bilgisinin veritabanlarında kayıtlı olması diğer genom projesi bulunmayan *Fusarium* türleriyle yapılacak işlevsel genomik çalışmaları için önemli bir ön bilgi sağlamaktadır.

Yurdumuzda da farklı araştırmalar ile arpa ve buğday bitkilerinde *F. culmorum* varlığı saptanmıştır (Tunalı et al., 2006; Mert-Türk ve Gencer, 2013; Yörük et al., 2016). Dünya'da olduğu gibi yurdumuzda da *F. culmorum* ile yapılan çalışmalar çoğunlukla genetik çeşitlilik ve mikotoksin analizleri üzerine yoğunlaşmıştır. Bu kapsamda Polymeraz Zincir Reaksiyon (PZR) temelli çeşitli yaklaşımlar ile genetik çeşitlilik analizleri gerçekleştirilmiştir (Llorens et al., 2006; Miedaner et al., 2008, 2013). Mikotoksin analizlerinde ise çoğunlukla DON üretiminden sorumlu *tri5* gen kümesindeki polimorfizmi üzerinde durulmuş; *tri7*, *tri3*, *tri13* ve *tri5* genlerinde kemotiplendirme gerçekleştirilmiştir (Haratian et al., 2008; Yörük et al., 2014; Tok ve Arslan, 2016). Bu patojen ve oluşturduğu hastalıklarla mücadele kapsamındaki çalışmalar sınırlı düzeyde kalmıştır. Hastalıkla yapılan çalışmalarda çoğunlukla patojene dirençli bitki çeşitlerinin geliştirilmesine yönelik olmuştur. Ancak bu süreç sınırlı sayıda çeşit geliştirilebilmesi, geliştirilen çeşitlerin agronomik açıdan düşük nitelikte olabilmesi ve çalışmaların uzun süre gerektirmesi açısından sıkıntı oluşturabilmektedir. Ayrıca antagonistik mikroorganizmalar ile mücadele de gerçekleştirilebilmektedir. Geleneksel olarak fungisit uygulaması da bir diğer yaklaşımdır. Bu kapsamda tiabendazole, tebuconazole ve carbendazim

etken maddeli fungusitler denenmiş, ancak patojenler söz konusu fungusitlere karşı direnç geliştirebildiklerinden hala dünya genelinde hastalıkla mücadelede kesin ve etkin bir çözüm bulunamamıştır (Arslan ve Baykal, 2002; Bernardo et al., 2007; Kimura et al., 2007). Bu durum *Fusarium* türleriyle mücadelede yeni yaklaşımların uygulanmasını gerektirmektedir.

Bu çalışmada *F.culmorum* türünde etkinliği daha önce incelenmemiş olan kaempferol'ün antifungal etkinliği araştırılmıştır. Kaempferol'ün antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Castillo et al., 2012). Bu çalışma kapsamında bu bileşiğin buğday patojeni *F. culmorum* üzerindeki fenotipik, transkriptomik ve metabolomik etkileri ilk defa patojenin F24 izolatında incelenmiştir. Elde edilen bulgular zirai mücadelede *Fusarium* türlerine uygulanabilecek potansiyel bir fungusitin karakterizasyonu açısından önem taşımakla birlikte, hastalıkla mücadele stratejilerinin geliştirilmesine de katkı sağlayabilecektir.

Materyal ve Yöntem

Patojen izolattı, in vitro üretim ve spor sayımı

Türkiye'de hastalıklı buğday bitkisinden elde edilmiş *F. culmorum* F24 izolatı Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir. *F. culmorum* F24 izolatına ait kontrol grubu patates dekstroz agar/özütü (PDA/PDB) besi ortamlarında, deney setleri ise 10 ve 20 µg mL⁻¹ kaempferol içeren PDA/PDB besi ortamlarında oda sıcaklığında yedi gün inkübe edilmek suretiyle üretilmiştir.

Minimum inhibisyon konsantrasyon değeri araştırması için konsantrasyon logaritmik olarak arttırılmıştır. Spor sayımı yedi günlük *in vitro Fusarium* kültürlerinde gerçekleştirilmiştir.

Total RNA izolasyonu ve cDNA çevrimi

F. culmorum F24 izolatının yedi günlük kültürlerinden total RNA izolasyonu Tri-Reagent (Sigma, A.B.D.) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Total RNA izolasyonu 5-10 mg miselyumdan 0.5 mL Tri-Reagent kullanılarak üreticinin tavsiye ettiği protokole göre gerçekleştirilmiştir. İzole edilen total RNA moleküllerinin kalitatif analizleri %1'lik agaroz jel elektroforezi ile UV ışık altında jel görüntüleme sistemi (Maestrogen, Tayvan) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RNA'ların kantitatif analizleri ise spektrofotometre ve GelQuant yazılımı (Biochemlabsolutions, A.B.D.) ile analiz edilmiştir.

RT-PZR uygulamasında kullanılmak üzere hazırlanan cDNA molekülleri total RNA moleküllerinden iki aşamada ticari kit kullanılarak (Hibrigen, Türkiye) sentezlenmiştir. cDNA sentezi 1 µg RNA kullanılarak üreticinin tavsiye ettiği protokol ile gerçekleştirilmiştir.

Gen anlatım analizleri

tri4 geninin anlatımının analizinde RT-PZR yöntemi kullanılmıştır. RT-PZR deneylerinde bileşenler konsantrasyonları 1 X PZR tamponu, 0.25 mM dNTP karışımı, 10 pmol ileri ve geri primerler (Çizelge 1), 2.5 mM MgCl₂, 1 µg RNA'ya denk gelen cDNA ve 1 U *Taq* DNA polimeraz enzimi (Hibrigen, Türkiye) olacak şekilde toplam 25 µL hacimde bir araya getirilmiştir.

Çizelge 1. Gen anlatımı çalışmalarında kullanılan primer molekülleri.

Table 1. Primer molecules used in gene expression studies.

Gen (Gene)	Primer (Primer)	Primer Dizisi (5'-3') Primer Sequence (5'-3')	Band Boyutu (bç) Band Size (bp)
<i>tri4</i>	Tri4ileri Tri4geri	ATGGATGAAAGGCTCGAGGT ACTGTCGGTGCTTTTGACG	139
β -tubulin	FusTblileri FusTblgeri	GAAGCCATTGATGTTGTTTCGT TCCGACCATGAAGAAGTGAAG	465

Hem deney hem de kontrol gruplarında başlangıç miktarı eş cDNA molekülleri kullanılmıştır. Çoğaltım, 94°C'de 5 dakikalık ön denatürasyonu takiben 35 tekrardan oluşan 94 °C'de 20 saniye, 59 °C'de 20 saniye ve 72 °C'de 40 saniye basamakları ile yapılmış ve süreç 72 °C'de 5 dakikalık final uzama basamağı ile tamamlanmıştır. PZR ürünleri %1.7'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. İçsel kontrol gen olarak β -tubulin, hedef gen olarak DON üretimiyle ilişkili *tri4* geni seçilmiştir.

İnce tabaka kromatografisi

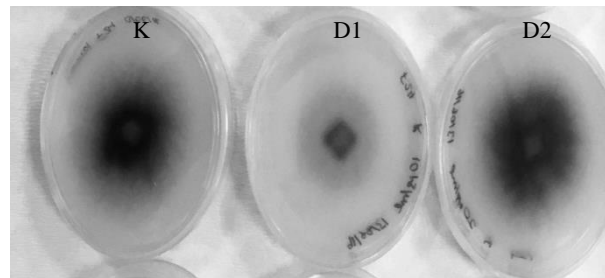
Çalışmada F24 izolatına ait kontrol grubu ve deney setlerinin 7 günlük kültürlerinden mikotoksin izolasyonu gerçekleştirilmiş ve ince tabaka kromatografisinde kullanılmıştır. Bu amaçla 100 mg kültür 5 mL etil asetat ile homojenize edilmiş, 5 dakika +4 °C'de 5000 *xg*'de santrifüj yapıldıktan sonra etil asetat uzaklaştırılmıştır. Kuruyan örnekler 1:1 metanol:su ile çözündürülmüştür. İnce tabaka analizinde sabit faz olarak silika jel 60 F254

(Merck, Almanya), hareketli faz olarak etil asetat:toluen (1:1), reaktif madde olarak ise etanol:alüminyum klorür (99:1) kullanılmıştır. Örnekler en az 10 μ L hacimde, referans markırı ile birlikte (Sigma, ABD) yüklenmiştir. Örneklerin yüklendiği plaka tanka yerleştirilmiş ve örnekler 1 saat yürütüldükten sonra plaka kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan plakalara etanol:alüminyum klorür (99:1) karışımı spreyle uygulandıktan sonra kurutulmuştur. Plakalar 365 nm dalga boyundaki UV ışık altında incelenmiş ve örneklerin R_f (ing., "retention factor") değerleri hesaplanmıştır.

Bulgular

Kaempferol uygulamasının F. culmorum'un in vitro spor üretimine etkisi

F. culmorum F24 izolatı kaempferol içeren ve içermeyen PDA ve PDB besi ortamlarında sporulasyon yapmıştır (Şekil 1).

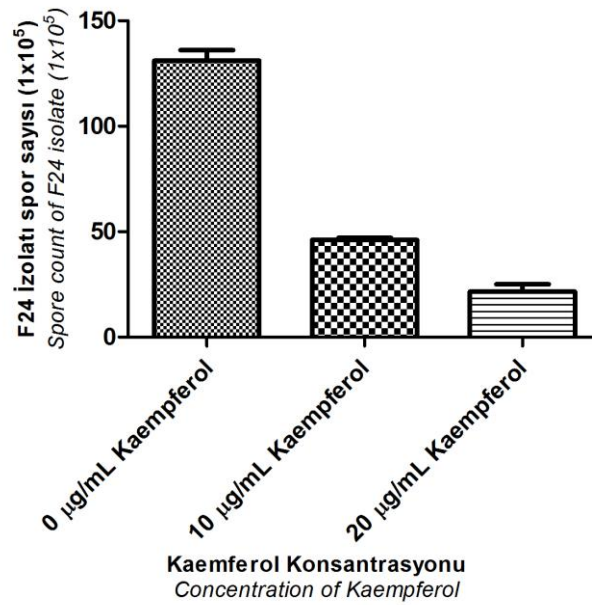


Şekil 1. PDB (K), PDB + 10 μ g mL⁻¹ Kaempferol (D1) ve PDB + 20 μ g mL⁻¹ Kaempferol (D2) besi ortamlarında üretilen *F. culmorum* F24 izolatları

Figure 1. *F. culmorum* F24 isolates grown on media of PDB (K), PDB + 10 μ g mL⁻¹ Kaempferol (D1) ve PDB + 20 μ g mL⁻¹ Kaempferol (D2)

Doğrusal üreme oranları kontrol ve deney setleri arasında bir farklılık göstermemiştir (bilgi verilmedi). Ayrıca gen anlatımı ve ince tabaka kromatografisi analizlerinde kullanılan 10 ve 20 μ g mL⁻¹ kaempferol konsantrasyonlarına ilaveten 2ⁿ kuvvetinde arttırılan kaempferol konsantrasyonlarında da fungal sporulasyon görülmüş ve bu analizlerde iki deney seti (PDA/PDB + 10 μ g mL⁻¹ ve PDA/PDB + 20 μ g mL⁻¹

kaempferol) kullanılmıştır. Ancak bu patojenin enfeksiyonunda etkili olan makrokonidilerinin miktarlarında anlamlı düşüşler gözlenmiştir. *F. culmorum* F24 izolatı PDB besi ortamında geliştirildiğinde spor sayısı 131 \pm 5 x 10⁵ iken, bu değer PDB + 10 μ g mL⁻¹ besi ortamında 46 \pm 1 x 10⁵, PDB + 20 μ g mL⁻¹ besi ortamında ise 21.5 \pm 3.5 x10⁵ olarak belirlenmiştir (Şekil 2).

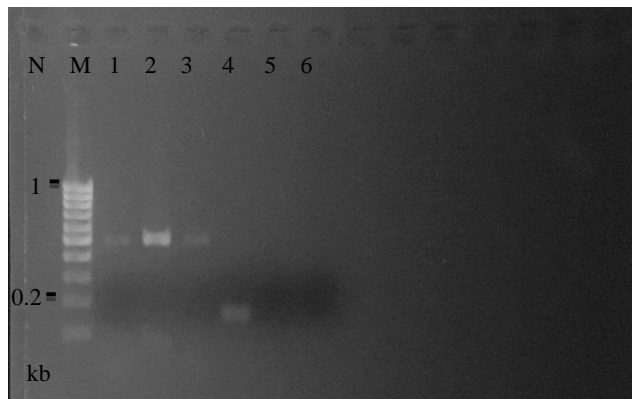


Şekil 2. 0, 10 ve 20 µg mL⁻¹ Kaempferol konsantrasyonlarındaki besiyerlerinde üretilen *F. culmorum* F24 izolatına ait spor sayısı değerleri
 Figure 2. Spore count values belonging to *F. culmorum* F24 isolate grown on media with kaempferol concentrations of 0, 10 ve 20 µg mL⁻¹

Kaempferol uygulamasının patojenin *tri4* gen anlatımına etkisi

F. culmorum F24 izolatına ait kontrol ve deney setlerinde 1-2.5 µg µL⁻¹ konsantrasyonda total RNA molekülleri izole edilmiştir. İzolasyonu takiben cDNA sentezinde kullanılan RNA molekülleri gen anlatımı analizlerinde kullanılmıştır. İçsel

kontrol gen anlatımı hem kontrol grubu hem de deney setlerinde belirlenmiş ve agaroz jel elektroforezi sonucunda 465 bp boyutunda PZR ürünleri saptanmıştır (Şekil 3). Buna karşın hedef gen anlatımı sadece kontrol grubunda belirlenmiş; deney setlerinde RT-PZR bandı saptanmamıştır.



Şekil 3. RT-PZR bantlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü. N: negatif kontrol, M: 100 bp DNA markırı (Sybenzyme, Rusya), 1-3: *β-tubulin*, 4-6: *tri4* gen çoğaltım profilleri, 1 ve 4: kontrol grubu, 2 ve 5: 10 µg mL⁻¹ Kaempferol uygulanmış örnekler, 3 ve 6: 20 µg mL⁻¹ Kaempferol uygulanmış örnekler.

Figure 3. Agarose gel electrophoresis profile of RT-PCR bands. N: no template control, M: 100 bp DNA marker (Sybenzyme, Russia), 1-3: *β-tubulin*, 4-6: *tri4* gene expression profiles, 1 and 4: control groups, 2 and 5: 10 µg mL⁻¹ Kaempferol subjected samples, 3 and 6: samples subjected to 20 µg mL⁻¹ kaempferol.

139 bç'lik PZR bandı (Şekil 3) PDA besi ortamında geliştirilen *F. culmorum* F24 izolatında saptanmıştır. RT-PZR verileri toksin üretimi ile ilişkili gen anlatımının kaempferol etkisinde ya tamamen baskılandığını ya da yüksek düzeyde düştüğünü göstermektedir. Ayrıca gerçek zamanlı PZR çalışması ile rölatif kantitasyon analizleri sonucu *tri4* gen anlatımı deney gruplarında belirlenmemiştir (veri sağlanmadı).

tri4 gen anlatımı RT-PCR ile semi kantitatif olarak analiz edildiğinde sadece kontrol grubunda beklenen ampikon saptandı. Buna karşın deney gruplarında

yatay elektroforezde *tri4* transkriptine ait bant görülmedi (veri sağlanmadı).

Kaempferol uygulamasının DON oluşumuna etkisi

Kaempferol uygulanmamış kontrol grubu ve iki farklı konsantrasyonda kaempferol uygulanmış gruplara ait örneklerden DON izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DON örnekleri ince tabaka kromatografisinde yürütülmüş ve kontrol grubunda 0.27 *Rf* değerine sahip spot belirlenirken (Şekil 4), deney setlerinde DON'a ait bir spot gözlenmemiştir.



Şekil 4. İnce tabaka kromatografisi görüntüsü. 1: referans markırı, 2: kontrol grubu, 3: 10 µg mL⁻¹ Kaempferol uygulanmış örnek ve 4: 20 µg mL⁻¹ Kaempferol uygulanmış örnek.

Figure 4. Thin layer chromatography profile. 1: reference marker, 2: control set, 3: 10 µg mL⁻¹ Kaempferol subjected samples and 4: 20 µg mL⁻¹ Kaempferol subjected samples.

Tartışma

Bitkiler yaşamları boyunca abiyotik ve biyotik streslerle karşılaşmaktadır. Tuz ve kuraklık stresi tahıllarda görülen en ciddi abiyotik stresler arasında yer alırken; funguslar biyotik stresin en büyük etmen grubunu teşkil etmektedir (Dyakov et al., 2007). Tahıllarda görülecek verim kayıpları insanları dolaylı da olsa ciddi derecede etkilemektedir. Özellikle yurdumuzda da son yıllarda varlığı rapor edilmiş *Fusarium* başak

yanıklığı bu hastalıklardan birisidir ve global anlamda ciddi bir ekonomik tehdit haline gelmiştir (Windels 2000; Tunali et al., 2006; Tok ve Arslan, 2016). Son yirmi-otuz yıl içerisinde bu hastalıkla mücadele çalışmaları önemli derecede artmıştır. Bu kapsamda hastalık etmenlerinin genetik kimliklendirmeleri gerçekleştirilmiştir (Miedaner et al., 2008; Wang et al., 2011). Benzer şekilde fitopatojenlerin mikotoksin

profilleri genetik ve analitik teknikler ile ortaya konmuştur (Tunali et al., 2006; Haratian et al., 2008; Yörük et al., 2014; Tok ve Arslan, 2016). Hastalığa dayanıklı ve agronomik karakterleri açısından kıymetli tahıl hatları geliştirilmeye ve/veya keşfedilmeye çalışılmıştır (Anand et al., 2003; Bernardo et al., 2007; Arıcı ve Koç, 2008).

Fusarium başak yanıklığı ile ilişkili patojenlerin kısmen veya detaylı bir şekilde tanımlanmasından sonraki önemli bir basamak hastalık etmeninin meydana getirdiği hasarı ortadan kaldırmaya çalışmaktır. Bu kapsamda genetik mühendisliği uygulamalarıyla gen susturma teknolojileri ile *Fusarium* türlerinin mikotoksin üretiminin durdurulması amaçlanmış ancak dramatik verilere ulaşılmıştır (McDonald et al., 2005; Scherm et al., 2011). Benzer şekilde farklı fungusit uygulamaları denenmiş ancak global anlamda etkili bir çözüm bulunamamıştır (Arslan ve Baykal, 2002; Bernardo et al., 2007). Bu sonuçlarla birlikte güncel olarak bitki ve mikroorganizma türevli metabolitlerin veya çeşitli bitki özütlerinin antifungal etkileri bazı *Fusarium* türleri üzerinde denenmektedir. *Fusarium* türleri ile ilişkili çalışmaların çoğunluğu kavun ve domateste hastalık etmeni olan *F. oxysporum* üzerinde yoğunlaşmış iken, *F. culmorum* üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar sınırlı kalmıştır (Al-Burtamani et al., 2005; Cabral et al., 2013). Bu bağlamda *F. culmorum* izolatları ile gerçekleştirilecek antifungal aktivite çalışmaları hastalıkla mücadele anlamında önem taşımaktadır.

Kaempferol birçok bitkide bulunan (çay, brokoli, fasulye, domates vb.) flavonoid bir bileşiktir (Calderón-Montaño et al., 2011). Kaempferol kullanılarak bazı mekanizmaların (nükleik asit sentezi, enerji metabolizması vb.) inhibe edilip antimikrobiyal etki gösterdiği bilinmektedir (Hendra et al., 2011). Bu çalışmada daha önceden *Fusarium culmorum* ve başak yanıklığı ve diğer bitki hastalıklarıyla ilişkili *Fusarium* türlerinde etkisi gösterilmemiş kaempferolün, patojen üzerine etkisi fenotipik, transkriptomik ve metabolomik düzeylerde incelenmiştir. Artan kaempferol konsantrasyonları patojenin doğrusal üreme

oranları üzerine anlamlı bir etki göstermemiştir (veri sunulmadı). Ancak enfeksiyonunu yaymada iş gören makrokonidilerin sayısında düşüş görülmüştür. Buna ilaveten hastalığın ilerlemesinde iş gören DON mikotoksininin (Bai et al., 2001) üretiminin düşmesine neden olmuştur. Gen anlatımı düzeyinde DON üretiminden sorumlu *tri5* gen kümesinde yer alan ve toksin biyosentezi için anlatımı elzem olan, monooksigenaz proteini kodlayan, *tri4* geninin anlatımı (Kimura et al., 2007) kaempferol uygulanmış örneklerde saptanmamıştır. Semi-kantitatif gen anlatımı bulguları göstermektedir ki bu kimyasal etkisindeki patojenlerde mikotoksin üretimi ile ilişkili gen anlatımı ya tamamen ya da büyük oranda baskılanabilmektedir. Bu veriler gerçek zamanlı PZR analizleri ile rölatif olarak ayrıca doğrulanmış ve *tri4* gen anlatımı deney gruplarında saptanmamıştır (veri sağlanmadı). Bu durum ise kaempferolün B sınıfı trikotesenlerin üretimini baskılayabilecek bir ajan olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde kaempferolün, *Candida albicans* patojeninde *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* gen anlatımını düşürdüğü ve patojen enfeksiyonunu baskıladığı da belirlenmiştir (Yordanov et al., 2008; Shao et al., 2016). Ayrıca kaempferolün nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıkların mekanizma çalışmalarında da monositlerde *MCP-1* gen anlatımını baskıladığı saptanmıştır (Kowalski et al., 2005). Bu çalışmada gen anlatımı verileri ince tabaka kromatografisi analizleri ile doğrulanmıştır. Bu sonuçlar ışığında, kaempferolün *in vitro* ve *in planta* fungus yaşam çevriminde letal etkileri olmayan ancak, özellikle bitkideki olumsuz etkileri azaltmaya yarayan potansiyel bir ajan olarak kullanılabilceği ortaya konulmuştur. Benzer potansiyel antifungal uygulamaları içeren çalışmalar göz önünde bulundurulursa; yıllar bazında *in vivo* veya *in vitro* çalışmalarda kaempferol uygulamaları sonucunda patojenin geliştirilebileceği muhtemel direnç mekanizmaları (Arslan ve Baykal, 2002; Hogg, 2005; Bernardo et al., 2007; Kimura et al., 2007) fenotipik ve moleküler düzeyde ileriki çalışmalarda ele alınabilir. Çalışmada

elde edilen veriler başak yanıklığı etmenleri için muhtemel bir mücadele uygulaması sunması açısından önem arz etmektedir.

Sonuç

Bu çalışmada daha önceden *F. culmorum* türünde antifungal etkisi araştırılmamış kaempferol molekülünün etkileri yurdumuzda hastalık oluşturan *F. culmorum* F24 izolatında araştırılmıştır. Elde edilen veriler bu molekülün özellikle toksin üretimi ve hastalığın yayılmasının engellenmesinde potansiyel bir etmen olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Veriler *F. culmorum*'un tahıllarda meydana getirdiği hastalıklarla mücadelede yeni stratejilerinin geliştirilmesi bakımından önem arz etmektedir.

Teşekkür

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

Kaynaklar

- Al-Burtamani, S.K., Fatope, M.O., Marwah, R.G., Onifade, A.K. and Al-Saidi S.H. 2005. Chemical Composition, Antibacterial and Antifungal Activities of the Essential Oil of *Haplophyllum Tuberculatum* From Oman. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 4;96 (1-2): 107-112.
- Anand, A., Zhou, T., Trick, H.N., Gill, B.S., Bockus, W.W. and Muthukrishnan S. 2003. Greenhouse and Field Testing of Transgenic Wheat Plants Stably Expressing Genes for Thaumatin-Like Protein, Chitinase and Glucanase Against *Fusarium graminearum*. *Journal of Experimental Biology*, 2003, 54 (384): 1101-1111.
- Arıcı, Ş.E. ve Koç, N.K. 2008. *in vitro* Seleksiyon Tekniği ile Buğday (*Triticum aestivum*)'da *Fusarium* (*Fusarium spp*)'a Dayanıklı Hücre Hatlarının Elde Edilmesi ve Bitki Regenerasyonu. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2008, 21 (1): 55-64.
- 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*, 2002, 16: 69-76.
- Bai, G., Desjardins, A.E. and Plattner, R.D. 2001. Deoxynivalenol-Nonproducing *Fusarium graminearum* Causes Initial Infection, But Does Not Cause Disease Spread İnwheat Spikes. *Mycopathologia*, 2001, 153: 914-98.
- Bai, G. and Shaner, G. 2004. Management and Resistance in Wheat and Barley to *Fusarium* Head Blight. *Annual Review of Phytopathology*, 2004, 42: 135-161.
- 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*, 2007, 7: 69-77.
- 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*, 2013, 166: 1-14.
- Calderón-Montaño, J.M., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C. and López-Lázaro, M. 2011. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11: 298-344.
- Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Rodriguez, R. and Aguilar, C.N. 2012. Antifungal Properties of Bioactive Compounds from Plants. (Ed. Dhanasekaran, D.), *Fungicides for Plant and Animal Diseases*, InTech, Mexico, pp. 81-106.
- Desjardins, A.E. and Proctor, R.H. 2007. *Molecular Biology of Fusarium*

- Mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 119: 47-50.
- Dyakov, T.Y., Dzhavakhly, V.G. and Korpela, T. 2007. *Comprehensive and Molecular Phytopathology*, (1th edition), Elsevier, Amsterdam.
- FAO, 2013. *Prodstat Crops*. <http://faostat.fao.org> (erişim tarihi: 28. 08. 2016)
- Gutleb, A.C., Morrison, E. and Murk. A.J. 2002. Cytotoxicity Assay for Mycotoxins Produced by *Fusarium* Strains. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2002, 11: 309-320.
- Haratian, M., Sharifnabi, B., Alizadeh, A. and Safaie, N. 2008. PCR Analysis of the *tr13* Gene to Determine the Genetic Potential of *Fusarium graminearum* Isolates from Iran to Produce Nivalenol And Deoxynivalenol. *Mycopathologia*, 2008, 166:109–116.
- Hendra, R., Ahmad, S., Sukari, A., Shukor, M.Y. and Oskoueian, E. 2011. Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of Phaleria Macrocarpa (Scheff.) Boerl Fruit. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12: 3422-3431.
- Hogg, S. 2005. *Essential Microbiology*, (1th edition), John Wiley and Sons, West Sussex.
- Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S. and Fujimura, M. 2007. Molecular and Genetic Studies of *Fusarium* Trichothecen Pathways Gene and Evolution. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2007, 71: 2105-2123.
- Kowalski, J., Samojedny, A., Paul, M., Pietsz, G. and Wilczok, T. 2005. Effect of kaempferol on the production and gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 in J774.2 macrophages. *Pharmacological Reports*, 2005, 57: 107-112.
- Llorens, A., Hinojo, M.J., Mateo, R., Medina, A., Valle-Algarre, F.M., Gonzalez-Jaen, M.T. and Jimenez, M. 2006. Variability and Characterization of Mycotoxin Producing *Fusarium spp.* Isolates by PCR-RFLP Analysis of the IGS-rDNA Region. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2006, 89: 465-478
- McDonald, T., Brown, D., Keller, N.P. and Hammond, T.M. 2005. RNA Silencing of Mycotoxin Production in *Aspergillus* and *Fusarium* Species. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18 (6): 539-545.
- Mert-Türk, F. ve Gencer, G. 2013. Distribution of the 3-AcDON, 15-AcDON, and NIV Chemotypes of *Fusarium culmorum* in the North-West of Turkey. *Plant Protection Science*, 2013, 49 (2): 57-64.
- Miedaner, T., Cumagun, C.J.R. and Chakraborty, S. 2008. Population Genetics of Three Important Head Blight Pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*. *Journal of Phytopathology*, 2008, 156: 129-139.
- Miedaner, T., Caixeta, F. and Talas, F. 2013. Head-blighting Populations of *Fusarium culmorum* from Germany, Russia and Syria Analyzed by Microsatellite Markers Show a Recombining Structure. *European Journal of Plant Pathology*, 2008, 137: 743-752.
- NCBI, 2016. *Genome*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (erişim tarihi: 28. 08. 2016)
- Özer, N. ve Soran, H. 1991. *Fusarium* Species of Turkey. *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 1991, 6: 259-271.
- Parry, D.W., Jenkinson, P. and McLeod, L. 1995. *Fusarium* Ear Blight (scab) in Small Grain Cereals-A Review. *Plant Pathology*, 1995, 44: 207-238.
- Scherm, B., Orru, M., Balmas, V., Spanu, F., Azara, E., Delogu, G., Hammond, T.M., Keller, N.P. and 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*, 2011, 12 (8): 759-771.
- Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, G. and Migheli,

- Q. 2013. *Fusarium culmorum*: Causal Agent of Foot and Root Rot and Head Blight on Wheat. *Molecular Plant Pathology*, 2013, 14 (4): 323-341.
- Shao, J., Zhang, M.X., Wang, T.M., Li, Y. And Wang, C.Z. 2016. The roles of CDR1, CDR2, and MDR1 in kaempferol-induced suppression with fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Pharmaceutical Biology*, 2016, 54 (6): 984-992.
- Tok, F.M. ve 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*, 2016, 30 (2): 254-260.
- Tunali, B., Özseven, İ., Büyük, O., Erdurmuş, D. ve Demirci, A. 2006. Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol Accumulation of Wheat in Marmara Region and Reactions of Wheat Cultivars and Lines to *F. graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Plant Pathology Journal*, 2006, 5 (2): 150-156.
- Wang, J.H., Ndoye, M., Zhang, J.B., Li, H.P. and Liao, Y.C. 2011. Population Structure and Genetic Diversity of the *Fusarium graminearum* Species Complex. *Toxins*, 2011, 3 (8): 1020-1037.
- Windels, C.R. 2000. Economic and Social Impacts of Fusarium Head Blight: Changing Farms and Rural Communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology*, 2000, 90 (1): 17-21.
- Yli-Mattila, T., Rämö, S., Hietaniemi, V., Hussien, T., Carlobos-Lopez, A.L. and 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*, 2013, 1: 162-174.
- Yordanov, M., Dimitrova, P., Patkar, S., Saso, L. and Ivanovska, N. 2008. Inhibition of *Candida albicans* extracellular enzyme activity by selected natural substances and their application in *Candida* infection. *Canadian Journal of Microbiology*, 2008, 54: 435-440.
- Yörük, E., Gazdağlı, A. ve Albayrak, A. 2014. Class B Trichothecene Chemotyping in *Fusarium* Species by PCR Assay. *Genetika-Belgrade*, 2014, 46 (3): 661-669.
- Yörük, E., Tunali, B., Kansu, B., Ölmez, F., Uz, G., Zümrüt, İ.M., Sarıkaya, A. ve 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*, 2016, 123:177-186.