



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**3-ADON KEMOTİPİNDEKİ *Fusarium* İZOLATLARININ HEDEFLİ
GENOTİP ANALİZİ**

Gülin İnci VAROL

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK**

**II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Emre YÖRÜK**

Aralık, 2019

İSTANBUL

Bu çalışma, 25.12.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

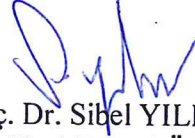
Tez Jürisi



Prof. Dr. Gülnur ALBAYRAK(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Bedia PALABIYIK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Sibel YILMAZ
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2018-29782 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam süresince hiç bitmeyen sabrı, ilgisi ve sevgisiyle her daim yol gösteren, desteğini üzerimden hiç eksik etmeyen kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK’a,

Tez çalışmam boyunca konu ile ilgili tüm bilgisini ve deneyimlerini aktarmaktan bir an olsun geri kalmayan, her daim kıymetli vaktini ayıran ikinci danışman hocam İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Emre YÖRÜK’e,

İ.Ü. Fen Fakültesi - Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü mensubu değerli öğretim üyeleri başta olmak üzere, üzerimde emeği olan bütün saygıdeğer hocalarıma,

Çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen Araş. Gör. Aylin GAZDAĞLI ve Uzm. Tuğba TEKER başta olmak üzere bütün ekip arkadaşlarıma,

Tez çalışmamın fonlanmasına olanak sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne ve çalışmam boyunca her türlü imkânından faydalandığım İ.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanlığı’na,

Destekleri ve fedakârlıklarıyla ellerini bir an olsun omzumdan eksik etmeyen canım annem ve canım babama,

Teşekkürü borç bilirim ve tüm içtenliğimle şükranlarımı sunarım.

Aralık 2019

Gülin İnci VAROL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET.....	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	2
2.1 <i>Fusarium</i> 'DA GENOTİPLENDİRME, MOLEKÜLER KEMOTİPLENDİRME VE HEDEFLİ GENOTİPLENDİRME	2
2.1.1 Trikotesen Üretiminden Sorumlu Genler	5
2.1.2 Kemotiplendirme, Genotiplendirme ve Mikotoksin Analizi Yöntemleri.....	10
2.1.2.1 Gen Bölgesi Analizine Dayalı Yöntemler	10
2.1.2.2 Analitik Yöntemler	10
2.1.2.3 Biyosensör Yöntemleri	11
2.2 <i>Fusarium</i> GENUSU, <i>F. graminearum</i> VE <i>F. culmorum</i>	11
2.3 BİTKİLERDE <i>Fusarium</i> TEMELLİ HASTALIKLAR VE HAYVANLAR ÜZERİNDEKİ ETKİSİ	14
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	17
3.1 <i>Fusarium</i> İZOLATLARI VE <i>İN VİTRO</i> ÜRETİMİ.....	17
3.2 GENOMİK DNA İZOLASYONU VE ANALİZİ	19
3.3 GENOTİPLENDİRME VE MOLEKÜLER KEMOTİPLENDİRME	20
3.3.1 Genotiplendirme	20
3.3.1.1 Çoğaltım Ürünlerinin Saflaştırılması ve Nükleotid Dizi Bilgisi Analizi.....	22
3.3.2 Moleküler Kemotiplendirme.....	22
3.3.2.1 DON ve NIV Tanısı	22
3.3.2.2 Alt Kemotip (3-ADON ve 15-ADON) Tanısı	24
3.3.3 Hedefli Genotip Analizi ile NX-2 Tanısı.....	25
3.3.3.1. Oligonukleotid Primer Tasarımı ve Hedef Gen Bölgesinin Çoğaltımı	25

3.3.3.2 Çoğaltım Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi	26
3.3.3.3 Çoğaltım Ürünlerinin Dizi analizi	26
3.3.4 DON Kemotipindeki İzolatların Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi	26
4. BULGULAR	28
4.1 <i>Fusarium</i> İZOLATLARINDA ÇOĞALTIM	28
4.2 MOLEKÜLER TANI İLE İLGİLİ BULGULAR	28
4.2.1 Alem Düzeyinde Tanı Bulguları	29
4.2.2 SCAR Markırları ile Tür Düzeyinde Tanı Bulguları	29
4.2.3 <i>TEF1α</i> Çoğaltımı ile Tür Düzeyinde Tanı Bulguları	30
4.3 MOLEKÜLER KEMOTİP VE ALT KEMOTİP ANALİZ BULGULARI	31
4.3.1 DON ve NIV Kemotipi Bulguları	31
4.3.2 3-ADON ve 15-ADON Alt Kemotipi Bulguları	31
4.4 HEDEFLİ GENOTİPLENDİRME BULGULARI	32
4.4.1 NX-2 Bulguları	32
4.4.2 İzolatların DON Üretim Kapasitelerine Ait Bulgular	36
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	38
KAYNAKLAR	47
EKLER	53
EK 1. 13 izolatta <i>TEF1α</i> sekansının referans <i>F. proliferatum</i> <i>TEF1α</i> dizisi ile hizalama bulguları	53
EK 2. <i>TEF1α</i> sekansının referans <i>F. oxysporum</i> ile hizalama bulgusu	54
EK 3. İzolatların trikotesen mikotoksini üretim profili tablosu	55
ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Trikotesen iskeletinin; a) genel kimyasal yapısı b) 3 boyutlu konformasyonu.	4
Şekil 2.2: A, B, C ve D tipi trikotesenlerin genel çekirdek yapıları (Foroud ve diğ., 2016).....	5
Şekil 2.3: <i>Tri5</i> gen kümesinde bulunan trikotesen biyosentezinden sorumlu genler. Okların yönü promotör bölgenin pozisyonunu ve okların uzunluğu göreceli gen boyutunu ifade etmektedir.	7
Şekil 2.4: NIV ve DON üreticilerinde gen bölgelerindeki a) <i>tri7</i> geni b) <i>tri13</i> geni için insersiyon ve delesyon mutasyonlarının şekilsel gösterimi (Chandler ve diğ., 2003).	8
Şekil 2.5: B tipi trikotesenlerden a) DON b) NIV ve A tipi trikotesen olan c)T-2 toksininin biyosentetik yolağı. Mavi oklar enzimatik, mor oklar enzimatik olmayan basamakları belirtmektedir.	9
Şekil 2.6: <i>Fusarium</i> spp. tarafından üretilen a) mikrokonid b) makrokonid c) klamidospor yapıları (Nelson ve diğ., 1994).	12
Şekil 4.1: Bazı <i>Fusarium</i> izolatlarının PDA besi ortamındaki 7 günlük <i>in vitro</i> kültürleri. Bar: 3cm.	28
Şekil 4.2: Bazı <i>Fusarium</i> izolatlarına ait gDNA izolasyonunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: λ +Hind3 (Thermo Scientific, SM0101, ABD).	28
Şekil 4.3: <i>Fusarium</i> izolatlarından UNIF/R primerlerinin kullanıldığı PZR çoğaltımından elde edilen 28S rRNA bölgesine ait 620 bç boyutlu fragmentlerin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kb (Thermo Scientific, SM0311, ABD), NK: Negatif kontrol.	29
Şekil 4.4: <i>Fusarium</i> izolatlarında özgün SCAR markırlarının tarandığı PZR analizlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü a) <i>F. culmorum</i> izolatlarından OPT18F/R primerleri ile çoğaltılan 472 bç boyutlu fragmentler b) <i>F. graminearum</i> izolatlarından UBC85F/R primerleri ile çoğaltılan 332 bç boyutlu fragmentler. M: 100 bp (Thermo Scientific, SM0241, ABD), NK: Negatif kontrol.	30
Şekil 4.5: <i>Fusarium</i> izolatlarında PZR ile çoğaltılan ve agaroz jel elektroforezinde görüntülenen 700 bç boyutlu <i>TEF1α</i> gen fragmentleri. M: 1 kb (Thermo Scientific, SM0241, ABD), NK: Negatif kontrol.	30

Şekil 4.6: 15-ADON kemotip tayini için Tri315F/R primerleri ile gerçekleştirilen çoğaltım reaksiyonundan elde edilen 863 bç boyutlu fragmentler. M: 100 bp (Thermo Scientific, SM0241, ABD), NK: Negatif kontrol.....	32
Şekil 4.7: <i>tri1</i> gen bölgesinin çoğaltımı için Tri1-AF/R primerleri ile gerçekleştirilen çoğaltım reaksiyonundan elde edilen 821 bç boyutlu fragmentler. M: 100 bp (Thermo Scientific, SM0241, ABD), NK: Negatif kontrol.....	33
Şekil 4.8: Restriksiyon haritalama programı ile belirlenen, 17-11 izolatının <i>tri1</i> geni içerisinde yer alan ApoI RE kesim bölgesi.....	34
Şekil 4.9: Hizalama programı ile dizileme bulgusu elde edilen 11 izolata ait <i>tri1</i> çoğaltım bölgesinin referans ile hizalanması.....	35
Şekil 4.10: Az ve çok üretici tanısı için a) Tablo 3.1.a’da verilen izolatların N1-2/N1-2R primer çifti ile gerçekleştirilen çok üretici tanısında çoğaltımı hedeflenen 200 bç boyutlu fragmentleri b) 3551/4056 primer çifti ile az üretici olduğu belirlenen 14-1’den çoğaltılan 525 bç boyutlu fragment c) Tablo 3.1.b’de verilen izolatların N1-2/N1-2R primer çifti ile gerçekleştirilen çok üretici tanısında çoğaltımı hedeflenen 200 bç boyutlu fragment. M: 100 bp (Thermo Scientific, SM0241, ABD), NK: Negatif kontrol.....	37

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan <i>Fusarium</i> izolatları.....	17
Tablo 3.2: Kullanılan besi ortamları, bileşenleri ve miktarları.....	19
Tablo 3.3: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlara ait bileşenler ve derişimler.....	20
Tablo 3.4: Alem ve tür tanısında kullanılan primerler ve özellikleri.....	21
Tablo 3.5: Alem ve tür tanısı PZR bileşenleri ve final derişimleri.....	21
Tablo 3.6: Alem ve tür tanısı PZR koşulları ve döngü sayısı.....	21
Tablo 3.7: DON ve NIV tanısında kullanılan primerler ve özellikleri.....	23
Tablo 3.8: DON ve NIV tanısı PZR bileşenleri ve final derişimleri.....	23
Tablo 3.9: DON ve NIV tanısı PZR koşulları ve döngü sayısı.....	23
Tablo 3.10: 3-ADON ve 15-ADON tanısında kullanılan primerler ve özellikleri.....	24
Tablo 3.11: 3-ADON ve 15-ADON tanısı PZR bileşenleri ve final derişimleri.....	24
Tablo 3.12: 3-ADON ve 15-ADON tanısı PZR koşulları ve döngü sayısı.....	24
Tablo 3.13: <i>tri1</i> gen bölgesinin çoğaltımında kullanılan özgün primer çifti ve özellikleri.....	25
Tablo 3.14: <i>tri1</i> gen bölgesi PZR bileşenleri ve final derişimleri.....	26
Tablo 3.15: <i>tri1</i> gen bölgesi PZR koşulları ve döngü sayısı.....	26
Tablo 3.16: <i>tri5-tri6</i> intergenik bölgenin çoğaltımında kullanılan özgün primerler ve özellikleri.....	27
Tablo 3.17: <i>tri5-tri6</i> intergenik bölgesi PZR bileşenleri ve final derişimleri.....	27
Tablo 4.1: <i>F. culmorum</i> ve <i>F. graminearum</i> olarak tanımlanmış izolatların <i>TEF1α</i> geninin nukleotid hizalamalarına ait veriler (tüm izolatlar için E değeri: 0,0).....	31

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

%	: Yüzde
°C	: Derece Santigrat
bç	: Baz çifti
M	: Molar
mM	: Milimolar
mL	: Mililitre
rpm	: Dakikadaki devir sayısı, “Revolutions per minute”
nm	: Nanometre
ng	: Nanogram
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
U	: Ünite
V	: Volt

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

BEA	: Beauverisin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DON	: Deoksinivalenol
ELISA	: Enzim İlintili İmmün Test, “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
ENN	: Enniatin
FA	: Fusarik Asit
FB1	: Fumonisin B1
GC-MS	: Gas Kromatografisi-Kütle Spektrofotometrisi, “Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry”
gDNA	: Genomik Deoksiribonükleik Asit
HPLC	:Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi, “High Pressure Liquid Chromatography”
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrofotometrisi, “Liquid Chromatography - Mass Spectrophotometry”

MON	: Moniliformin
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi, “National Center for Biotechnology Information”
NIV	: Nivalenol
OD	: Optik Yoğunluk, “Optical Density”
PDA	: Patates Dekstroz Agar
rDNA	: Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
SCAR	: Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler, “Sequence Characterized Amplified Region”
SNA	: Sentetik Nutrient Agar
TEF	: Translasyon Elongasyon Faktör
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi, “Thin Layer Chromatography”
15-ADON	: 15-Asetildeoksinivalenol

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

3-ADON KEMOTİPİNDEKİ *Fusarium* İZOLATLARININ HEDEFLİ GENOTİP ANALİZİ

Gülin İnci VAROL

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Gülrüh ALBAYRAK

II. Danışman : Doç. Dr. Emre YÖRÜK

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında tür düzeyinde tanımlanmış *Fusarium* izolatlarının moleküler düzeyde kemotiplendirmesi ve hedefli genotip analizi ile hem henüz dağılımı bilinmeyen bir mikotoksinin (NX-2) taraması hem de izolatların mikotoksin üretim kapasitelerinin ortaya konması amaçlandı. Bu kapsamda, yurdumuzun ve İran'ın çeşitli bölgelerinden izole edilen toplam 78 *Fusarium* izolatı ile çalışıldı.

Bu izolatlardan 30'unda 28S rDNA bölgesi (620 bp) çoğaltılarak, fungal tanı gerçekleştirildi. İzolatlar *F. culmorum*'a özgün OPT18 ve *F. graminearum*'a özgün UBC85 SCAR markırları taranarak tür düzeyinde tanımlandı. 9 izolattan çoğaltılan 478 bp boyutlu fragment izolatların *F.culmorum*; 6 izolattan çoğaltılan 332 bp boyutlu fragment de izolatların *F. graminearum* olduğunu ortaya koydu. 14 örneğin tür tayini için *TEF1α* (Translasyon Elongasyon Faktör 1α) geni çoğaltıldı. Çoğaltım ürünleri (700 bp) dizilendi ve veri tabanındaki referans *Fusarium* genomlarındaki dizilimlerle biyoinformatik araçlar kullanılarak hizalandı. 14 izolatın *F. proliferatum* ile (%97,60-99,55), birinin ise *F. oxysporum* (%99,55) ile yakınlığı belirlendi.

Deoksinivalenol (DON) ve nivalenol (NIV) kemotiplerinin identifikasyonu için *Tri5* gen kümesinde bulunan *tri13*'ün çoğaltımı hedeflendi. 282 bp'lik çoğaltım ürünü DON kemotipinin, 1075 bp'lik fragment de NIV kemotipinin seçimini sağladı. İlginç olarak, her iki çoğaltım ürünü 17-16 kodlu izolatta gözlemlendi. *tri3* genini 583 bp boyutlu olarak taşıyan 15 izolat

3-asetildeoksinivalenol (3-ADON), 863 bç boyutlu olarak taşıyan 3 izolat ise 15-asetildeoksinivalenol (15-ADON) olarak belirlendi.

Hedefli genotip analizi için *tri1* genine ait 821 bç'lik bölge 53 izolatın 30'undan çoğaltıldı. Çoğaltım ürünleri *ApoI* restriksiyon endonükleazı (RE) ile kesime bırakıldığında 346 ve 475 bç boyutlu fragmentler elde edilemediğinden, NX-2 kemotipi deneysel olarak saptanamadı. Ancak, *F. graminearum* 17-11'in çoğaltım bölgesi içerisinde *ApoI* RE kesim noktasını taşıdığı dizileme temelli olarak biyoinformatik araçlar kullanılarak gösterildi. Ek olarak, 17-11'in referans gen bölgesi ve diğer izolatlara ait diziler ile gerçekleştirilen çoklu hizalaması sonucunda bu izolatın 120 bç'lik bir insersiyona sahip olduğu ortaya kondu.

78 izolat DON mikotoksini üretme kapasitesi bakımından *tri5-tri6* intergenik bölgenin hedefli genotip analizi ile tarandı. 45 izolatın çok üretici 1'inin ise az üretici olduğu çoğaltılan sırasıyla 200 bç ve 650 bç'lik fragmentlerle ortaya kondu.

Moleküler yaklaşımlarla kemotiplendirme ve hedefli genotiplendirme çalışmalarından elde edilen bulgular, fitopatojenin etkili olduğu agro-ekolojik bölgedeki potansiyel toksikolojik risklerinin haritalanmasına katkıda bulunacaktır. Bu gibi çalışmalardan elde edilecek veriler, tanı kitlerinin geliştirilmesinde kullanılabilecektir. Bu durumda infeksiyöz ajan ve toksinleri erken dönemde tarlada saptanabilecek ve besin zincirinin kontaminasyonunun önüne geçilerek halk sağlığının korunmasına katkıda bulunulabilecektir.

Aralık 2019, 69 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Fusarium* spp., kemotiplendirme, hedefli genotiplendirme, Deoksinivalenol (DON), Nivalenol (NIV), az/çok DON üreticisi, NX-2.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

TARGETED GENOTYPE ANALYSIS of *Fusarium* ISOLATES in 3-ADON CHEMOTYPE

Gülin İnci VAROL

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK

Co-Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Emre YRK

Within the scope of this master's thesis, it was aimed to perform molecular level chemotyping of *Fusarium* isolates, to investigate a mycotoxin (NX-2) with unknown distribution yet via targeted genotype analysis and also to reveal the mycotoxin production capacity of isolates. In this context, a total of 78 *Fusarium* isolates which are isolated from various regions of our country and Iran were studied.

In 30 of these isolates, fungal identification was performed by amplification of 28S rDNA region (620 bp). The isolates were identified at the species level by scanning OPT18, which is specific to *F. culmorum* and UBC85, which is specific to *F. graminearum*, SCAR markers. 478 bp fragments, which are amplified from 9 isolates, revealed the isolates as *F. culmorum*; 332 bp fragments amplified from 6 isolates revealed that the isolates as *F. graminearum*. *TEF1 α* (Translated Elongation Factor 1 α) gene was amplified for species identification of 14 samples. Amplification products (700 bp) were sequenced and aligned with the sequences in the reference *Fusarium* genomes in database by using bioinformatic tools. The impedance of 13 isolates with *F. proliferatum* (97.60-99.55%) and one with *F. oxysporum* (99.55%) was determined.

For identification of deoxynivalenol (DON) and nivalenol (NIV) chemotypes, amplification of *tri13* in the *Tri5* gene cluster was targeted. 282 bp amplified product provided the selection of DON chemotype and the 1075 bp fragment allowed selection of NIV chemotype. Interestingly, both amplified products were observed in 17-16 coded isolate. 15 isolates carrying the *tri3* gene as 583 bp were identified as 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON) and 3 isolates carrying the *tri3* gene as 863 bp were identified as 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON).

For targeted genotype analysis, 821 bp regions belongs to *tri1* gene were amplified from 30 out of 53 isolates. As the amplification products were not cut with *ApoI* restriction endonuclease (RE) to 346 and 475 bp fragments, NX-2 chemotype could not be determined experimentally from these isolates. However, it was shown that *F. graminearum* 17-11 amplification site carries the *ApoI* RE cut site by the using bioinformatic tools based on sequencing. Additionally, it is revealed that 17-11 has 120 bp insertion via multiple alignment with gene region of reference isolate and the sequences belongs to other isolates.

78 isolates were screened in terms of DON mycotoxin production capacity by targeted genotype analysis of *tri5-tri6* intergenic region. It was revealed that 45 isolates become large amount producers and one is small amount producer with of 200 bp and 650 bp fragments, respectively.

Findings from molecular genotyping and targeted genotyping studies will contribute to the mapping of potential toxicological risks in the agro-ecological region where phytopathogen is effective. Data from such studies can be used to develop diagnostic kits. In this case, infectious agents and toxins can be detected in the field in an early period and it can be contributed to the protection of public health by preventing the food chain contamination

December 2019, 69 pages.

Keywords: *Fusarium* spp., chemotyping, targeted genotyping, Deoxynivalenol (DON), Nivalenol (NIV), small / large amount DON producer, NX-2.

1. GİRİŞ

Fusarium spp. özellikle tahıl ve süs bitkilerinde gözlenen çeşitli hastalıkların (*Fusarium* başak yanığı (FBY), kök ve kök boğazı çürüklüğü gibi) mikrobiyal etmenidir. Bu hastalıkların neden olduğu ürün kayıpları ülke tarımını olumsuz etkilemekle kalmaz, aynı zamanda patojenlerin ürettiği mikotoksinler aracılığıyla halk sağlığını da tehdit etmektedir (Nelson ve diğ., 1994).

Kemotip tayininde, organizmada meydana gelen metabolik faaliyetler ile açığa çıkan çeşitli sekonder metabolitlerdeki farklılıklar ortaya konmaktadır. Morfolojik olarak çok az etkili olabilen veya hiç etkisi olmayan genetik varyasyonların metabolizma yan ürünleri bakımından incelendiğinde aynı tür içinde dahi büyük farklılıklar meydana getirebildiği bilinmektedir. Bu nedenle, kemotiplendirme çalışmaları ve devamında hedefli genotip analizleri ile bu farklılıkların ortaya konması büyük önem taşımaktadır. *Fusarium* tarafından üretilen sekonder metabolitlerden olan mikotoksinlerin coğrafi dağılımının incelenmesi, patojenin yol açabileceği etkilerin değerlendirilmesine katkı sağlamaktadır (Yörük ve Albayrak, 2012).

Tez çalışmasında toplamda 78 *Fusarium* izolatu moleküler analizlerle alem ve tür düzeyinde tanımlandıktan sonra izolatların kemotiplendirme çalışmaları biyosentez yolağında bulunan genlerin PZR yöntemi ile moleküler düzeyde çoğaltımıyla gerçekleştirilmiştir. Kemotip tayini gerçekleştirilen izolatların moleküler genotiplendirmesi ise yine PZR aracılı çoğaltım ve çoğaltım ürünlerinin restriksiyon endonükleazları ile kesimi temelli olarak karakterize edilmiştir. Çalışma ile elde edilen bulguların *Fusarium* izolatlarının mikotoksin üretim profillerini ortaya koyarak agro-ekolojik dağılım haritalandırmasının gerçekleştirilmesine katkı sağlamaktadır. Gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışması, *Fusarium* spp.'e karşı geliştirilecek mücadele yöntemlerine dair temel düzeyde veri sağlamaktadır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1 *Fusarium*'DA GENOTİPLENDİRME, MOLEKÜLER KEMOTİPLENDİRME VE HEDEFLİ GENOTİPLENDİRME

Bir hücreye ait bütün fenotipik karakterlerin, epigenetik ve çevresel faktörler ile birlikte ortaya çıkmasından sorumlu olan genetik yapının tümü genotip olarak adlandırılmaktadır. Genotip terimi ilk olarak bilim insanı Wilhelm Johannsen tarafından 1911'de kullanılmıştır (Johannsen, 1911). Bir populasyon içinde aynı genotipe sahip bireylerin fenotipleri farklı olabileceği gibi, fenotipik olarak benzer olanların genotipleri de büyük farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle genomun tümünün kaynak olarak kullanıldığı, kodlama yapan ve yapmayan bölgelerinin hedeflendiği genotiplendirme çalışmaları ile populasyonu oluşturan bireylerin genetik yapılarının ortaya konması büyük önem taşımaktadır. Hedefli genotiplendirme; kodlamadan sorumlu olan veya düzenleme işlevine sahip, ya da genomun çok büyük bir kısmını kaplayan kodlanmayan bölgelerin tümü yerine daha sınırlı bir bölgede tiplendirme yapma imkanı sağlamaktadır. Sınırlandırma ile genomda sadece hedef bölgeye ait, özellikle insersiyon ya da delesyon kaynaklı, yüksek varyasyon başarılı biçimde ortaya konabilmektedir (Lee ve diğ., 2001; Chandler ve diğ., 2003).

Kemotip, aynı morfolojik özelliklere sahip bitki, mantar ve bakteri türlerinde metabolik faaliyetler sonucunda açığa çıkan, doğrudan normal büyüme, gelişim ve üreme ile ilişkili olmayan sekonder metabolitlerin analizleri ile belirlenen, türe ait kimyasal profile verilen isimdir (Ismaiel ve Papenbrock, 2015). Mantarlar metabolik faaliyetlerinin doğal bir ürünü olarak çok fazla miktarda kimyasal çeşitliliğe sahip sekonder metabolit üretmektedir. Minör düzeyde meydana gelen genetik ya da epigenetik varyasyonlar organizmanın morfolojisi ve temel fenotipik karakterini dikkate değer düzeyde değiştirmese de, anlatımı gerçekleştirilen gen bölgeleri aracılığıyla üretilen sekonder metabolitlerinde büyük değişiklikler meydana getirebilmektedir. Bu nedenle dünya genelinde yaygın bitki fungal patojenlerinde organizmaların ürettikleri sekonder metabolitlerin tanımlandığı kemotiplendirme çalışmaları populasyonun coğrafi dağılım profilinin belirlenmesini de sağlamaktadır (Kimura ve diğ., 1998; Meng ve diğ., 2017; Yörük ve Albayrak, 2012).

Mikotoksinler, filamentli mantarlar tarafından üretilen, bitkilerde, hayvanlarda ve insanlarda hastalık ve ölüme neden olabilen sekonder metabolitlerdir. Yapısal olarak ve biyolojik aktivite

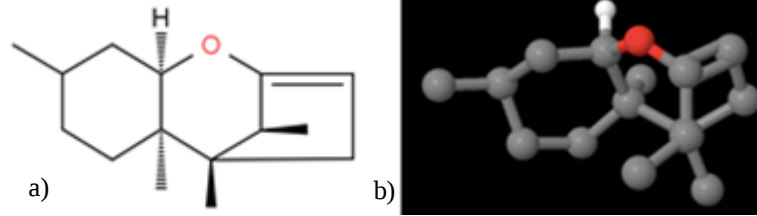
açısından çok çeşitlilik göstermektedirler. Mikotoksin üreten mantarlardan olan *Fusarium*, görülme sıklığı, toksik özelliklerinin çeşitliliği ve sağlık üzerine etkilerinden dolayı en çok çalışılan türler arasında yer almaktadır (Yörük ve Albayrak, 2012). *Fusarium* türlerinin her biri kendine özgü mikotoksin profiline sahip olabildiğinden, geliştirilecek tanı kitleri bu türlerin erken tanısı ve etkili mücadele yöntemlerini seçmeyi sağlayabilecektir (Moretti, 2009). Gerçekleştirilecek kemotiplendirme çalışmaları, kontaminasyon sonucunda mikotoksin birikimi olan bitkilerde meydana gelebilecek potansiyel toksikolojik risklerin belirlenmesine ve bu mikotoksinlerin besin zincirine girerek hayvan ve insanlarda mikotoksikoza neden olmasının önlenmesine katkıda bulunacak kullanışlı veri girdisi sağlayacaktır (Meng ve diğ., 2017).

Doğada 300'den fazla mikotoksinin üretildiği bildirilmekle birlikte; aflatoksin, sitrin, patulin, okratoksin A, deoksinivalenol (DON), nivalenol (NIV), fumonisin, fusarin C ve zearalenon bitkiler tarafından en çok taşınan mikotoksinlerdir (Ismaiel ve Papenbrock, 2015). *Fusarium* genusu; *Alternaria*, *Penicillium* ve *Aspergillus* ile birlikte majör mikotoksin üreticisi olan dört genustan biridir (Sabuncuoğlu ve diğ., 2008). Mantarlar ya endofit oluşturarak ya da bitki dokularını enfekte ederek hastalığa yol açarken ürettikleri ve bitkide biriktirdiği sekonder metabolitleri ile tohum kalitesini, çimlenmeyi, sağ kalımı, fide oluşumunu, kök ve koleoptil büyümesini de etkilemektedir (Ismaiel ve Papenbrock, 2015).

Fusarium fitopatojenleriyle enfekte ekinlerde biriken mikotoksinler, bitkilerin biyolojik aktiviteleri üzerinde zararlı etkilere neden olmakla kalmaz aynı zamanda besin piramidi aracılığıyla bulaştıkları hayvanlar ve insanlarda da çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmişlerdir (Moretti, 2009). Mikotoksinle bulaşmış bitkisel gıdaların veya yemlerin tüketimi insan ve hayvanlarda mikotoksikoz adı verilen hastalıkla yakından ilişkilendirilmiştir (Nelson ve diğ., 1994).

Fusarium türleri; trikotesen, fusarik asit (FA), fumonisin B1 (FB1), enniatin (ENN) ve moniliformin (MON) gibi farklı kimyasal içerikleri olan mikotoksinler üretmektedir. Trikotesenler, kimyasal yapı olarak tetrasiklik seskiterpenoid özellikteki bir mikotoksin ailesidir. Tüm trikotesen mikotoksinleri, altı üyeli oksijen içeren bir halka, C-12 ve C-13 pozisyonunda bir epoksit grubu ve C-9 ve C-10 pozisyonunda bir olefinik bağ ile tetrasiklik seskiterpen yapısına sahiptir. Trikotesenlerin toksik özelliğinden C-12 ve C-13'teki epoksi grubu sorumludur. Çekirdek 12,13-epoksi-trikotek-9-en iskeletine (Şekil 2.1) eklenen işlevsel

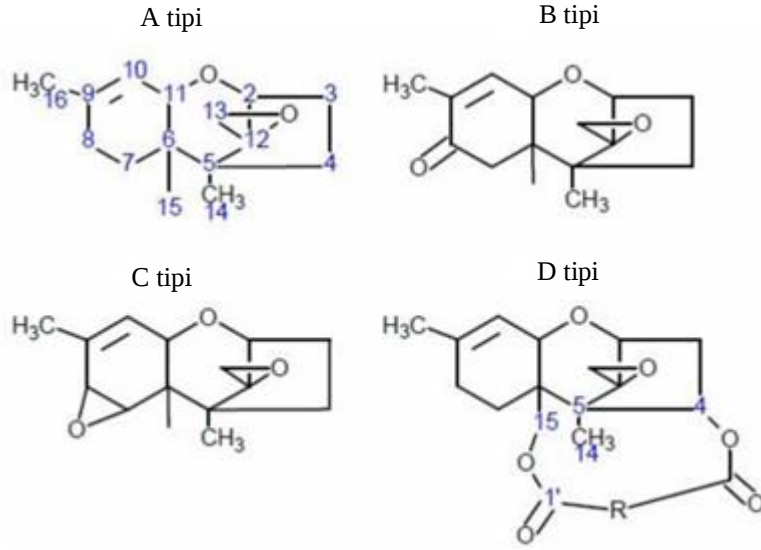
grupların tipine, pozisyonlarına ve sayılarına göre, kemotiplerin meydana gelmesinden sorumludur (Kimura ve diğ., 2007).



Şekil 2.1: Trikotesen iskeletinin; a) genel kimyasal yapısı b) 3 boyutlu konformasyonu¹.

Trikoteseenler kimyasal yapılarına göre gruplandırılmaktadır. Birinci sınıflandırma yöntemi C-4 ve C-15'i diesterler (roridin serisi) ve triesterler (verukarin serisi) ile bağlayan bir makrosiklik halkanın varlığına veya yokluğuna dayanmaktadır. Bu şekilde trikoteseenler makrosiklik ve nonmakrosiklik olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. T-2 toksini, HT-2 toksini, diasetoksiskirpenol (DAS), Deoksinivalenol (DON) ve Nivalenol (NIV) *Fusarium* genusu tarafından üretilen nonmakrosiklik trikoteseen örnekleridir (Haschek ve Beasley, 2009). Kemotiplendirmede daha çok tercih edilen diğer bir sınıflandırma yönteminde; trikoteseen iskeletinin C-3, 4, 7, 8 veya 15 pozisyonunda konumlanan fonksiyonel gruplar temel alınarak yapılmaktadır (Şekil 2.2). A tipi trikoteseenler C-3, 4, 7, 8 veya 15 pozisyonunda hidroksil veya esterlenmiş hidroksillere sahiptir. Bu gruba T-2 toksini, HT-2 toksini, DAS örnek olarak verilebilir (Alexander ve diğ., 2011). B tipi trikoteseenleri, A tipinde taşınan fonksiyonel gruplara ek olarak C-8'de bir keto grubu ve C-7'de bir hidroksil grubu içermektedir. DON ve NIV kemotipi trikoteseenlerde bu özellikler bulunmaktadır. B tipi trikoteseenler, C8'de keto fonksiyonel grubu içermeyen A tipi trikoteseenlerinden daha az toksiktir (Alexander ve diğ., 2011). C tipi trikoteseenlerde C-7 ve 8'de ikinci bir epoksi halkası bulunmaktadırlar. D tipi trikoteseenlerde ise C-4 ve C-15'i bağlayan bir makrosiklik halkaya sahiptir. C ve D tipi trikoteseenler *Fusarium* spp. tarafından üretilmemektedirler (Kimura ve diğ., 2007).

¹ <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.19975934.html> [ziyaret tarihi: 05.09.2019]



Şekil 2.2: A, B, C ve D tipi trikotesenlerin genel çekirdek yapıları (Foroud ve diğ., 2016).

2.1.1 Trikotesen Üretiminden Sorumlu Genler

Trikotesen biyosentezinde *Fusarium* genomunda bulunan üç farklı lokustan şifrelenen proteinler görevlidir. *Tri5* gen kümesi trikotesen biyosentezinden sorumlu çekirdek lokustur (Brown ve diğ., 2002). Diğer lokuslar *tri101* (Kimura ve diğ., 1998; McCormick ve diğ., 1999) ve *tri1-tri16* lokuslarıdır (Brown ve diğ., 2003; Meek ve diğ., 2003; Kimura ve diğ., 2003; Peplow ve diğ., 2003).

A tipi ya da B tipi trikotesen ayırımı *tri1* geni tarafından şifrelenen sitokrom P450 enziminin katalizlediği hidroksillenme tepkimesinin meydana geldiği C atomuna göre yapılmaktadır. Reaksiyon C-7 ve C-8'de gerçekleştiğinde B tipi trikotesen, (McCormick ve diğ., 2006; McCormick ve diğ., 2011; Alexander ve diğ., 2011) yalnızca C-8'de meydana geldiğinde A tipi trikotesen üretimi gerçekleşmektedir (Meek ve diğ., 2003; Alexander ve diğ., 2011; McCormick ve diğ., 2011). Bu kemotipte, *tri16* geninin ürünü (asetiltransferaz) hidroksillenen C-8'in asetilasyonunda görev almaktadır (Peplow ve diğ., 2003). Son yıllarda *tri1* geninde meydana gelen varyasyonların C-8 yerine yalnızca C-7'nin hidroksillenmesini katalizlediği ortaya konmuştur (Varga ve diğ., 2015). Bu varyasyon, *tri1* geninden anlatımı gerçekleşen sitokrom P450 enziminde meydana gelen fonksiyonel çeşitlilikten kaynaklanmaktadır. Bu yapısal varyasyon, A tipi grubunda bulunan ve toksisite mekanizması B tipi trikotesenlerden 3-ADON kemotipine benzerlik gösteren yeni bir tür trikotesenin, NX-2'nin, sentezine yol

açmaktadır (Varga ve diğ., 2015; Kelly ve diğ., 2016).

Tri5 gen kümesi 12 adet açık okuma çerçevesinden oluşmaktadır ve trikotesen üretim yolağından sorumlu hem yapısal hem de düzenleyici genleri içermektedir. Bu 12 gen prmotör bölgenin pozisyonu ve açık okuma çerçevesinin yönüne göre artı ve eksi iplik olarak veritabanlarında kayıtlıdır (Desjardins, ve diğ., 1993; Brown ve diğ., 2002; McCormick ve Alexander, 2002).

Tri5 gen kümesinin karakterizasyonu amacıyla bütün gen bölgesinin sekans analizleri farklı *Fusarium* izolatları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Kimura ve diğ., 2003; Lee ve diğ., 2001; Brown ve diğ., 2004). Bu amaçla 15-ADON kemotipi H-11, 3-ADON kemotipi F15 ve NIV kemotipi 88-1 *F. graminearum* izolatlarında aydınlatılmıştır (Brown ve diğ., 2001; Lee ve diğ., 2001; Kimura ve diğ., 2003). Gen kümesinin dizilemesi, farklı kemotipler ile izolatlarda taşınan gen kümesinin boyutu arasında ilişkinin olduğunu ortaya koymuştur. Boyut farkına ek olarak belli genlerdeki işlevsel farklılık sonucu gözlenen kemotip genlerin delesyonları ile ilişkilendirilmiştir (Yörük ve Yli-Mattila, 2019). Gen kümesinin toplam boyutu H-11’de 27 022 bç, GZ3639’da 57840 bç ve 88-1’de 30159 bç olarak bildirilmiştir. Psödogenler, insersiyon/delesyonlar ve tam boyutlu delesyonlar farklı kemotip profillerinin ortaya çıkmasından sorumludurlar (Yörük ve Yli-Mattila, 2019).

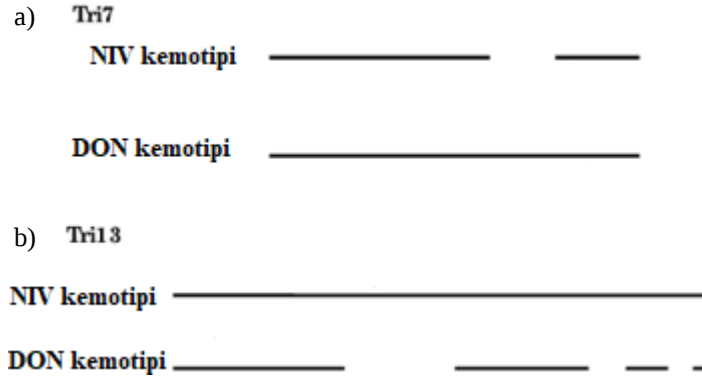
Tri5 gen kümesi (Şekil 2.3) trikotesen yapısının çekirdek formunun oluşumdan sorumlu proteinleri şifreleyen genler (*tri3*, *tri4*, *tri5* ve *tri6* gibi) ile birlikte farklı trikotesenlerin oluşumunda rol oynayan yapısal farklılıkları meydana getiren diğer genleri (*tri13* (1801 bç) ve *tri7* (1376 bç)) de içermektedir. *tri3* (1762 bç), *tri4* (1741 bç), *tri5* (1179 bç), *tri6* (656 bç), *tri8* (1334 bç), *tri9* (131 bç), *tri10* (1352 bç), *tri11* (1740 bç), *tri12* (1904 bç) ve *tri14* (1176 bç) kemotipten bağımsız olarak trikotesen üretiminden sorumludur ve bütün izolatlarda anlatımı gerçekleştirilen genlerdir (Kimura ve diğ., 2003; Kimura ve diğ., 2007). Bu 10 gen, B tipi trikotesen üreten bütün *Fusarium* izolatlarında homoloji göstermektedir (Kimura ve diğ., 2007). Kümesinin kalan 2 elemanı (*tri13* ve *tri7*) izolatlar arasında gen anlatımı farklılıklarından dolayı farklı tipteki trikotesenlerin sentezinden sorumludurlar (Lee ve diğ., 2002).



Şekil 2.3: *Tri5* gen kümesinde bulunan trikotesen biyosentezinden sorumlu genler. Okların yönü promotör bölgenin pozisyonunu ve okların uzunluğu göreceli gen boyutunu ifade etmektedir.

Trikotesen üretimi tirikodien sentaz enzimini şifreleyen ve trikotesen üretiminden sorumlu en temel gen olan *tri5* ile başlamaktadır. (Kimura ve diğ., 2003). *tri6*, ekspresyon ürünü olarak trikotesen biyosentezinden sorumlu enzimleri şifreleyen *tri5* gibi genlerin yolak boyunca anlatımını düzenleyen bir proteini kodlamaktadır. *tri5* aktivitesinin devamında seskiterpen siklaz üretiminden sorumlu olan *tri3* ve *tri4* genleri biyosentez yolağında görev almaktadır. (Kimura ve diğ., 2003).

Üretilen mikotoksinde yapısal farklılıktan sorumlu olan genler ise *tri13* ve *tri7*'dir. Bu genler, NIV mikotoksini ve asetilenmiş türevinin oluşumundan sorumludur. Bu genlerin kodladığı C-4 hidroksilaz ve asetilaz enzimleri NIV kemotipinin konformasyonel belirleyicisi olan C-4'de hidroksillenme ve asetillenmeye neden olmaktadır (Kimura ve diğ., 2003, Lee ve diğ., 2002; Alexander ve diğ., 2011). DON üreticisi olan *Fusarium* izolatlarında *tri7* genine ait ORF bölgesinde çeşitli insersiyonlar ve ardışık tekrarlar (Şekil 2.4a) bulunmaktadır. *tri13* geni ise DON kemotipindeki izolatlarda ekspresyonu engelleyici 3 adet korunmuş delesyon bölgesine sahiptir (Lee ve diğ., 2002; Chandler ve diğ., 2003). *tri13* ve *tri7* genlerinin inaktivasyonu, delesyonu veya disfonksiyonu (Şekil 2.4b) sonucunda DON kemotipi meydana gelmektedir (Mugrabi de Kuppler ve diğ., 2011; Lee ve diğ., 2002).



Şekil 2.4: NIV ve DON üreticilerinde gen bölgelerindeki a) *tri7* geni b) *tri13* geni için insersiyon ve delesyon mutasyonlarının şekilsel gösterimi (Chandler ve diğ., 2003).

3-ADON ve 15-ADON kemotiplerinin oluşumu çekirdek trikotesen yapısının C-3 ya da C-15'ten asetillenmesi sonucunda belirlenmektedir (Şekil 2.5). Bu sürecin düzenlenmesinde *tri101*, *tri3* ve *tri8* genleri görevlidir (Alexander ve diğ., 2011). *tri101* kodladığı asetiltransferaz enzimi ile C-3 oksijen atomunun asetillenmesini sağlamaktadır (Kimura ve diğ., 1998). *tri3* C-15 oksijen atomunun esterifikasyonunu gerçekleştiren enzimi kodlamaktadır. *tri8* ise asetil grubunun C-3'ten uzaklaştırılmasını düzenlemektedir. Bu süreç 15-ADON kemotipinin ortaya çıkmasıyla sonuçlanmaktadır (McCormick ve Alexander, 2002; Kimura ve diğ., 2003; Alexander ve diğ., 2011). 3-ADON kemotipindeki izolatlarda TRI6 transkripsiyon faktörüne ait bağlanma bölgesinin olmaması *tri8* anlatımının yapılmamasına neden olmaktadır (Kimura ve diğ., 2003).

Farklı trikotesen üreten *Fusarium* türlerinde sadece kemotip çeşitliliği değil aynı zamanda üretim miktarları açısından da çeşitlilik görülmektedir. Bazı izolatlar yüksek miktarda trikotesen üretirken, bazıları ise az hatta tespiti kromotografik yöntemlerle belirlenemeyecek kadar az üretilmektedir. *tri5* promotör bölgesinde tespit edilen TNAGGCCT motifi, *tri6* regülatör proteininin bu bölgeye bağlanması ve *tri5* geninin ekspresyonunun gerçekleşmesi için kilit önem taşımaktadır. Bu motifte gerçekleşen tek nukleotid polimorfizmleri (ing., single nucleotide polymorphism; SNP) *tri6* geninden şifrelenen proteininin bağlanmasında ve trikotesen üretiminde azalma ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle *tri5-tri6* intergenik bölgesinin nukleotid dizilimi DON üreticisi olan *Fusarium* izolatlarının mikotoksin üretim miktarlarının tespiti açısından önem taşımaktadır. Buna ek olarak bu bölgenin analizi ile NIV kemotipinde olan bazı izolatların NIV ile birlikte az miktarda DON mikotoksini de üretebildikleri ortaya konmaktadır (Bakan ve diğ., 2002).

2.1.2 Kemotiplendirme, Genotiplendirme ve Mikotoksin Analizi Yöntemleri

2.1.2.1 Gen Bölgesi Analizine Dayalı Yöntemler

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) hedeflenen gen bölgesinin çoğaltımına dayalı hızlı sonuç veren, yüksek doğruluk oranına sahip, ekonomik ve hazırlık süreci basit olan bir analiz yöntemi olması sebebiyle *Fusarium* türlerinin mikotoksin üretim profillerinin incelenmesi ve kemotiplendirme çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Günümüze kadar gerçekleştirilmiş olan çalışmalarda, trikotesen üretiminden sorumlu gen kümeleri ve farklı kemotiplerin meydana gelmesinden sorumlu gen bölgeleri PZR temelli çalışmalar ile ilgili bölgelerin çoğaltımını hedefleyen özgün primerin kullanımıyla gerçekleştirilmiştir (Niessen, 2007). A ve B tipi trikotesen üretiminden *tri1* ve *tri16* genlerinin sorumlu olduğu, bu gen bölgelerine özgü tasarlanan primerler ile gerçekleştirilen çoğaltım sonucunda belirlenmiştir (Meek ve diğ., 2003; Peplow ve diğ., 2003). DON ve NIV kemotipindeki izolatlar *tri7* ve *tri13* genlerinin çoğaltımı ile tanımlanmıştır (Chandler ve diğ., 2003). DON kemotipindeki bireylerin asetillenmiş türevleri (3-ADON ve 15-ADON) *tri3* ve *tri12* genleri hedeflenerek saptanmıştır (Jennings ve diğ., 2004; Ward ve diğ., 2002) PZR sonuçlarının analizi, çoğaltımı hedeflenen ampikonların varlığı ve boyut farkına göre gerçekleştirilmiştir. Bu yüksek lisans tez çalışmasında kullanılan *Fusarium* izolatlarında da ilgili gen bölgeleri hedeflenerek farklı kemotipteki bireylerin hedefli genotip analizi gerçekleştirilmiştir.

2.1.2.2 Analitik Yöntemler

Mikotoksinle bulaşmış canlılardan ekstraksiyonu gerçekleştirilen endotoksinlerin analizinde kromatografik ve ELISA gibi yöntemler kullanılmaktadır. Trikotesenlerin kalitatif ve kantitatif tayininde kullanılan kromatografik yöntemlerin başında ince tabaka kromatografisi (ing., thin layer chromatography; TLC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (ing., high performance liquid chromatography; HPLC), sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (ing., liquid chromatography-mass spectrophotometry; LC-MS) ve gaz kromatografi-kütle spektrometrisi (ing., gas chromatography-mass spectrophotometry; GC-MS) gelmektedir (Nielsen ve diğ., 1999). TLC mikotoksin tespitinde sonuçlara hızlı ulaşmayı sağladığı için tercih edilen kalitatif bir yöntemdir (Haratian ve diğ., 2008). HPLC, LC-MS ve GC-MS ise TLC'ye göre çok daha hassas yöntemlerdir ve hem kalitatif hem de kantitatif analiz olanağı sağlamaktadır. Üç yöntem

de verdikleri sonuçların kesinliği sebebiyle çok daha güvenilir olup mikotoksin tayininde etkin olarak kullanılmaktadır (Bertuzzi ve diğ., 2011; Varga ve diğ., 2015).

Mikotoksin konsantrasyonları ELISA testi ile de belirlenebilmektedir. ELISA, sabit katı yüzeylere enzim aracılı tutuklanan antikorlara bağlanan mikotoksinlerin analizi temeline dayanmaktadır. ELISA, HPLC gibi standart kimyasal yöntemler ile karşılaştırıldığında operasyonel açıdan kolay olması, maddi açıdan ucuz olması, hızlı ve yüksek kalitede sonuç eldesi gibi çeşitli avantajları sunmaktadır. Fakat kromatografik yöntemler ile kıyaslandığında, hata payı ve mikotoksin konsantrasyonunun olduğundan daha yüksek değerde bildirimi gibi dezavantajları da göz ardı edilmemelidir (Bolduan ve diğ., 2009).

HPLC gibi kromatografik yöntemlere alternatif olan çeşitli spektroskopik yöntemler de hem mikotoksigenik funguslardan *Fusarium* biyokütlesinin hem de ürettiği toksik metabolitlerin ölçümünde kullanılmaktadır. “Near Infrared” (NIR) spektroskopisi bu analizlerde kullanılan yöntemlerden biridir. Özellikle HPLC’ye kıyasla pratik, operasyonel açıdan kolay, hızlı sonuç eldesi, doğruluk ve maddi olarak uygunluğu, ekinlere zarar vermemesi ve gerçek zamanlı olarak sonuç sağlaması gibi özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir (Berardo ve diğ., 2005).

2.1.2.3 Biyosensör Yöntemleri

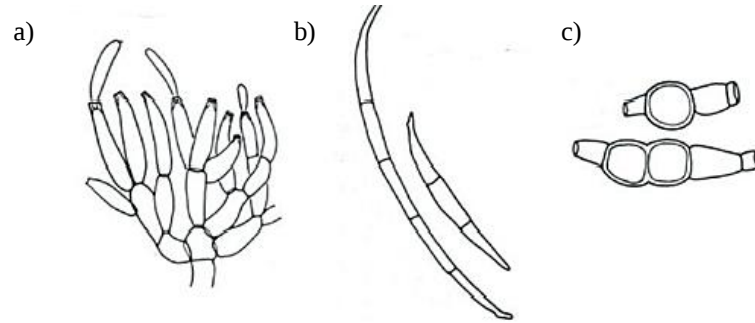
Moleküler ve analitik yöntemler zamana, pahalı ekipmanlara, analizleri gerçekleştirecek uzmanlara ve test edilecek örneklerin laboratuvarlara taşınmasına ihtiyaç duymaktadır. Hızlı, ucuz, az miktarda örnek ile verimli sonuç verebilen ve uzman gerektirmeksizin işlemin gerçekleştirilebildiği tanımlama sistemlerine olan ihtiyaç, mikotoksin türünün tanısı için günümüzde biyosensör geliştirme ihtiyacına yol açmıştır. Tarlalardan alınan numunenin biyosensere yüklenmesinin ardından trikotesen tiplerine uygun antikorlarla yüzeyi kaplanan elektrodların verdiği sinyallere göre hızlı ve zahmetsiz bir şekilde mikotoksin analizinin gerçekleştirilmesi hedeflenmektedir (Olcer ve diğ., 2014).

2.2 *Fusarium* GENUSU, *F. graminearum* VE *F. culmorum*

Fusarium genusu; Ascomycota şubesi, Sordariomycetes sınıfı, Hypocreales takımında yer almaktadır. 80 türü çok iyi bilinen genusun 300 olası türden oluştuğu bildirilmektedir (Moretti, 2009). Bunlardan 17’si tahıllarda hastalık etmeni olduğundan tarımsal alanlar için risk faktörü olan patojenlerdir (Yörük ve Yli-Mattila, 2019).

Fusarium türleri, yaşamsal faaliyetleri için gerekli optimum çevresel koşullar ve konak seçimi açısından geniş bir biyoçeşitliliğe sahiptir. Metabolik aktivitesi için gerekli optimum pH 5,0-7,0 ve optimum sıcaklık 24-32°C aralığında değişmektedir (Yörük ve Yli-Mattila, 2019). Buna ek olarak, konak bitkiler üzerinde çeşitli tür kompleksleri halinde bir arada kolonize oldukları bilinmektedir. Bu durum genusa bitki-patojen etkileşimi ve mikotoksin üretimi açısından büyük çeşitlilik sağlamaktadır (Moretti, 2009).

Fusarium türlerinin tanımlanmasında; morfolojik, biyolojik ve filogenik karakterler dikkate alınmaktadır. Morfolojik sınıflandırma temel olarak *Fusarium* türlerinin meydana getirdiği spor türlerinin mikroskopik düzeyde incelemesine dayanmaktadır. *Fusarium* türleri makrokonid, mikrokonid ve klamidospor olarak isimlendirilen üç tip spor üretmektedir (Şekil 2.6). Makrokonid, sporodosyum adı verilen özel bir yapı içerisinde ya da hava hiflerindeki monofialidler ve polifialidler üzerinde üretilmektedir. Mikrokonid, hava hiflerinde hem monofialidler hem de polifialidlerde kümeler ya da zincirler halinde yer alır, ancak sporodosyumda üretilmemektedir. Yapı ve boyutları farklı olabilmektedir. Klamidosporlar, uygun bir konakçı bulunamadığı koşullarda, örneğin kış aylarında toprakta canlılığın sürdürmesinde etkili olan, lipid benzeri materyal içeren, düzgün veya pürüzlü kalın bir duvardan oluşan spor tipidir. Klamidosporlar; tekli, çift olarak, kümeler veya zincirler halinde bulunabilmektedir. Makrokonid şeklindeki farklılıkları türleri morfolojik olarak ayırt etmede kullanılan en önemli özelliktir. Mikrokonid ve klamidosporlar da *Fusarium* tür tayininde kullanılan özellikler arasındadır (Moretti, 2009).



Şekil 2.6: *Fusarium* spp. tarafından üretilen a) mikrokonid b) makrokonid c) klamidospor yapıları (Nelson ve diğ., 1994).

Morfolojik kriterlerle tür tayininin zahmetli ve zor olması, belirli gen bölgelerinin moleküler düzeyde çoğaltımına dayanan sınıflandırma yöntemlerinin kullanımının yolunu açmıştır (Barik ve Tayung., 2012). Moleküler tanıda hedeflenen bölgelerden biri translasyon elongasyon faktörü 1 α (*TEF1 α*) genidir. Bu gen ökaryotik hücrelerde translasyonda görevli faktörü kodladığı için esansiyel role sahiptir. *Fusarium* türlerinde ortolog kopyaları bulunan genin yüksek seviyede sekans polimorfizmi göstermesi, bu genin tür tanısı ve filogenetik ilişkilendirme çalışmalarında markır gen olarak kullanılmasını sağlamıştır (Geiser ve diğ., 2004; Barik ve Tayung., 2012). Ayrıca mitokondride görevli küçük altbirim rRNA geni ve rRNA genleri arasındaki ayırıcı diziler (ing., internal transcribed spacer; ITS) de yüksek genetik çeşitliliğe sahip populasyonlarda genetik mesafeye bağlı olarak tür tanısında kullanılmaktadır (Nirmaladevi ve diğ., 2016).

Çoğu mantar türünde olduğu gibi *F. graminearum* da yaşam siklusunun çoğunu anamorf evrede, haploid olarak geçirmektedir. Gerçekleştirilen detaylı morfolojik ve moleküler araştırmalar, türün bireylerinin, yüksek varyasyona sahip izolatların oluşturduğu tür kompleksi üyeleri olduklarını ortaya konmuştur. Filogenetik açıdan farklı ancak morfolojik olarak ayırt edilemeyen tür kompleksi üyeleri, farklı agro-ekolojik bölgelerde bulunmakta ve farklı kemotiplere sahip olabilmektedirler (Yörük ve Yli-Mattila, 2019).

Konak çeşitliliği açısından daha geniş yayılım alanına sahip patojen filogenetik olarak *F. graminearum* tür kompleksi ile yakından ilişkilidir (Scherin ve diğ., 2013). Bu türün bireylerinde üreme aseksüel ve paraseksüel olarak gerçekleşir (Miedaner ve diğ., 2008).

Günümüzde 57 *Fusarium* türüne ait genom dizi bilgisi NCBI veritabanında kayıt altına alınmıştır. *Fusarium* nüklear genomu yaklaşık olarak 36-51 Mb boyutunda olup, % 47-51 GC içeriğine sahiptir. Organizmaya ait kromozom sayısı ise türler arasında değişkenlik göstermekle birlikte kromozom sayısının 4-20 aralığında olduğu gerçekleştirilen karyotiplendirme çalışmalarıyla belirlenmiştir (Waalwijk ve diğ., 2018). *F. graminearum*'a ait genom projesi 2006 yılında PH-1 ve GZ3639 suşları kullanılarak tamamlanmıştır. Genomu 36,1 Mb boyutunda olup 13 939 gen bölgesine sahiptir ve % 48,33 GC içeriğine sahiptir (Cuomo ve diğ., 2007; Yörük ve Yli-Mattila 2019).

F. culmorum türünün genomu Kuzey Polonya'da yetişen buğday başağından saflaştırılan izolattan dizilenmiştir. Genom kütüphanesinin kurulması amacıyla rekombinant vektörler

miselyumdan elde edilen gDNA fragmentlerinin öncelikle bakteri yapay kromozlarına (ing., bacterial artificial chromosome; BAC) bağlanmasıyla oluşturmuşlardır. 250 bp'lik fragmentler yeni nesil dizileme sistemi (Illumina Miseq platformu- Illumina Inc., San Diego, CA) ile her ucundan dizilenerek veri tabanı kurulmuştur. Genom projesi henüz resmi olarak yayınlanmamış olsa da ilk taslağı sunulmuş durumdadır (Urban ve diğ., 2016). *F. culmorum* FcUK99 referans suşuna ait özgün gen bölgeleri, mikrosatellit markır bölgeleri, RNA polimeraz enzim genleri, mikotoksin üretiminde görev alan enzimleri şifreleyen genleri ve patogeneze ile ilişkili gen bölgelerine dair nukleotid dizi bilgileri ise veritabanlarında kayıt altına alınmıştır. Elde edilen bu sekanslar biyoinformatik araçlarla *F. graminearum* PH-1 referans suşuna ait dizilerle hizalanarak karşılaştırılmasıyla analizler gerçekleştirilmektedir. (Cuomo ve diğ., 2007; Yörük ve Yli- Mattila, 2019).

2.3 BİTKİLERDE *Fusarium* TEMELLİ HASTALIKLAR VE HAYVANLAR ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Bitkilerdeki *Fusarium* kaynaklı hastalıklar hem patojenin hem de konak bitkinin türüne bağlı olmakla birlikte, bitkinin vejetatif ve generatif evreleri ile de ilişkilidir (Moretti, 2009). *F. graminearum* dünya çapında Fusarium Başak Yanıklığı (FBY), kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalıklarından sorumlu olan en yaygın fitopatojen olmakla birlikte (Tunalı ve diğ., 2006; Yli- Mattila, 2010) *F. culmorum* da aynı hastalıkların ortaya çıkmasından sorumludur (Scherin ve diğ., 2013). Bu türlerin neden olduğu hastalıklar ciddi ekin kayıplarıyla sonuçlanmaktadır. Ek olarak ekinlerde mikotoksin birikimine sebep olduklarından, gıda ve yem üretim zincirlerini de kontamine etmektedirler. Gıdaların işlenmesi aşamalarına ve yüksek sıcaklığa karşı oldukça dirençli olduklarından mikotoksinler hayvan ve insan sağlığı için de ciddi bir risk faktörüdür (Mugrabi de Kuppler ve diğ. 2011). Mikotoksine uzun süreli maruziyet mikotoksikoz ile sonuçlanmaktadır (Pinson-Gadais ve diğ., 2008).

Canlılarda mikotoksikoz olgularının ortaya çıkmasından sorumlu çok sayıda faktör bir araya gelmelidir. Öncelikle patojenik izolat mikotoksin üretmeli, mikotoksine duyarlı konak bitki bu etmenle enfekte olmalıdır. Çevresel faktörler hastalığın gelişmesine elverişli olmalıdır. Patojen hayvan veya insana zararlı olan metabolit/leri üretmelidir. Mikotoksine uzun süreli maruziyet sonucu mikotoksikoza yol açacak miktarda sekonder metabolit birikimi olmalıdır. Mikotoksin içeren bitki materyali endotoksine hassas bir tüketici tarafından yeterli miktarda alınmalıdır

Dünya geneline bakıldığında tüm bu şartların bir araya gelerek oluşturduğu mikotoksikoz vakaları bildirilmiştir (Nelson ve diğ., 1994).

Gıda kaynaklı mikotoksin maruziyeti; çevresel faktörler, gıda üretimi koşulları ve insanların sosyo-ekonomik durumları ele alındığında, özellikle gelişmekte olan ülkelerde halk sağlığı için risk faktörüdür. Mikotoksinlere ilk olarak gastro-intestinal epitel hücreleri maruz kalmaktadır. Bu maruziyet, dokulara ait savunma mekanizmalarında değişimlere sebep olmaktadır. Epitel dokunun bütünlüğü, hücre proliferasyonu, mukus tabakası ve imünoglobulin ile sitokinler gibi immun sistem ile ilişkili proteinlerin üretiminde değişimler meydana gelmektedir. Devamında mikotoksinler epitel dokuyu geçerek dolaşıma katılabilmekte ve immun sistemi tetikleyecek ya da baskılayacak tipte sonuçlar doğurabilmektedir (Nelson ve diğ., 1994).

Dünya genelinde çeşitli hastalıkların etmeni olan *Fusarium* türlerinin kemotiplendirilmesi ve genotiplendirilmesi üzerinde çok çeşitli çalışılmalar yürütülmektedir (Yörük ve Yli-Mattila, 2019). *Fusarium* kaynaklı epidemilerde ürün kaybı ve ekinlerin kalitesinde düşüş yaşanmaktadır. Bununla birlikte, hasatı yapılan ekinlerde organizmanın enfekte ettiği bitkiler üzerinde gerçekleştirdiği normal metabolik aktivitesinin bir yan ürünü olan mikotoksinlerle kontaminasyon gözlenmektedir. Kontamine olmuş bitkilerin gıda ve yem üretiminde kullanımı, insanlarda ve hayvanlarda mikotoksikoz vakalarının ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Gen bölgesi hedeflenerek gerçekleştirilen kemotiplendirme çalışmalarına ek olarak, son yıllarda hedefli genotip analizi ile de organizmanın mikotoksin üretim ve coğrafik dağılım profillerinin belirlenmesi hız kazanmıştır. 3-ADON kemotipinde olduğu belirlenmiş bazı *Fusarium* izolatlarının ileri moleküler analizlerle 3-ADON yerine NX-2 kemotipinde olduğunun saptanması, kemotiplendirme çalışmalarına ek olarak hedefli genotip analizinin önemini ortaya koymuştur (Varga ve diğ. 2015; Lofgren ve diğ., 2017). Bununla birlikte, son yıllarda mikotoksin üretim kapasitesinin moleküler düzeyde belirlenmesi amacıyla genomda belli bir bölgenin analizinin hedeflendiği çalışmalar da bulunmaktadır (Bakan ve diğ. 2002; Quarta ve diğ. 2005). Tüm bu çalışmalar *Fusarium* türlerine ait agro-ekolojik yayılım profillerini ortaya koyarak, hastalık etmeni organizmanın ayrıntılı tanımlanmasına ve organizmaya yönelik mücadele yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır.

Yüksek lisans tez çalışmasında Türkiye ve İran'ın farklı bölgelerinden izole edilmiş arpa, buğday ve mısır bitkilerinde hastalığa yol açan *Fusarium* izolatlarının alem ve tür düzeyinde tanımlanması, kemotip ve alt kemotip tayinlerinin moleküler yaklaşımlarla belirlenmesi ve

hedefli genotip analizi ile hem henüz dağılımı hakkında bilgi eksik olan yeni bir mikotoksinin taranması hem de izolatların mikotoksin üretim kapasitelerinin ortaya konması amaçlanmıştır.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 *Fusarium* İZOLATLARI VE *in vitro* ÜRETİMİ

Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda üretilip İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonunda saklama altına alınan 30 adet *Fusarium* spp. izolatu (Tablo 3.1.a) ile birlikte İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonunda yer alan 48 *Fusarium* spp. izolatu (Tablo 3.1.b, c) tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde mantar materyali olarak kullanıldı. *Fusarium* izolatları, Türkiye ve İran'ın farklı bölgelerinde yetiştirilen ve patojenle infekte olmuş hasta arpa, buğday ve mısır bitkilerinden tek spor analizi ile saflaştırılmışlardır (Gerlach ve Nirenberg, 1982).

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan *Fusarium* izolatları.

	Kod	Tür	Konak	Bölge
a)	09-1	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Çördük-Kastamonu
	09-2	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Polatlı-Ankara
	10-2	<i>Fusarium</i> spp.	Mısır	Bafra-Samsun
	12-1	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Kadınhanı-Konya
	14-1	<i>Fusarium</i> spp.	Arpa	Yıldızeli-Sivas
	14-2	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Kavak-Samsun
	14-3	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Yozgat-Merkez
	14-4	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Pazar-Tokat
	14-5	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Amasya-Merkez
	14-6	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Pazar-Tokat
	14-7	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Amasya
	14-8	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Suluova-Amasya
	14-9	<i>Fusarium</i> spp.	Arpa	Yıldızeli-Sivas
	15-1	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Tekirdağ
	15-2	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Hamidiye-Edirne
	15-3	<i>Fusarium</i> spp.	Arpa	Tekirdağ
	15-4	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Keşan-Edirne
	17-5	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Ovabaşı-Samsun
	17-6	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Merzifon-Amasya
b)	17-7	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Merzifon-Amasya
	17-8	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Merzifon-Amasya
	17-9	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Ovabaşı-Samsun
	17-11	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Ovabaşı-Samsun
	17-12	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Ovabaşı-Samsun
	17-14	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Ovabaşı-Samsun
	17-15	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Ovabaşı-Samsun
	17-16	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Ovabaşı-Samsun
	17-17	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Ovabaşı-Samsun
	17-18	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Boyabat-Samsun
	17-19	<i>Fusarium</i> spp.	Buğday	Tekkeköy-Samsun
	F1	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Marmara

Tablo 3.1 (devam): Çalışmada kullanılan *Fusarium* izolatları.

	F2	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Marmara
	F3	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Konya
	F4	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Marmara
	F10	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Bilecik
	F12	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Balıkesir
	F14	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Bilecik
	F16	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Sarayönü-Konya
	F17	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Merkez-Konya
	F19	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Sarayönü-Konya
	F20	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Bilecik
	F21	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Banaz-Uşak
	F24	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Cumra-Konya
	8F	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Ayaş-Ankara
	10F	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Tekkeköy-Samsun
	11F	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Akyazı-Çorum
	12F	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Gümüşhacıköy-Amasya
	13F	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Çumra-Konya
	14F	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Kastamonu-Hacıhamza
	20F	<i>F. culmorum</i>	Arpa	Afyon-Dinar
	Sh7	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran
	FgSh14	<i>F. graminearum</i>	Buğday	İran
	FgSh15	<i>F. graminearum</i>	Buğday	İran
c)	FgM1	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran
	FgM3	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran
	FgM5	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran
	FgM6	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran
	FgM7	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran
	FgM9	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran
	FgM10	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran
	Fg4	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Mazandaran
	Fg5	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Dashtenaz-Sari
	Fg18	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Parsabad, Moghon
	Fg56	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Gorgan
	Fg165	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Kordkooy
	Fg170	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Gorgan
	Fg174	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Gorgan
	FgSh4	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran
	FgSh5	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran
	FgSh10	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran
	FgT2	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran
	FgT3	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran
	FgT7	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran
	FgT9	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran
	FgT10	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran
	FgT11	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran
	FgT12	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran
	FgT16	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Neka-Mazandaran

Uzun süreli saklamaya alınmış gliserol stokların canlandırılmasında Sentetik Nutrient Agar (SNA) besi ortamı kullanıldı (Tablo 3.2). Kültürler 25°C’de % 50 nem oranı ile 16 saat

gündüz/8 saat gece döngüsünde 7 gün süre ile inkübe edilerek üretildi. Canlandırılan izolatlardan alınan örnekler patates dekstroza agar (PDA) besiy ortamına aktarıldı (Tablo 3.2). Alt kültürler de aynı ortam koşullarında (25°C’de % 50 nem oranı ile 16/8 saat gündüz/gece döngüsü) 7 gün süre ile *in vitro* üretildi.

Tablo 3.2: Kullanılan besiy ortamları, bileşenleri ve miktarları.

Besiy Ortamı	Bileşenler	Miktarlar
SNA (pH 5,6)	KH ₂ PO ₄	1 g/l
	KCl	0,5 g/l
	KNO ₃	1 g/l
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g/l
	Glukoz	0,2 g/l
	Sukroz	0,2 g/l
	Agar	20 g/l
PDA (pH 5,6)	Patates dekstroza özütü	15 g/l
	Agar	20 g/l

3.2 GENOMİK DNA İZOLASYONU VE ANALİZİ

İzolatların genomik DNA’ları (gDNA) yedi günlük kültürlerin miselyumlarından, TNES (pH 7,5; Tris 50mM, NaCl 0,4M, EDTA 100mM (pH 8), SDS 0,5%) tamponu kullanılarak Doyle ve Doyle (1987)’e göre izole edildi. İzolasyon için kültürlerden 50 mg yaş ağırlığa sahip miselyum örneği süpürülerek toplandı. *Fusarium* örneği porselen havana alınarak sıvı azot ile parçalandı. Parçalama işlemine 500 µl TNES tamponu eklenerek devam edildi. Homojen hale getirilen örnekler 1,5 ml’lik mikrotüplere toplandı. Mikrotüp içindeki parçalanmış örneklerin üzerine 350 µl LiCl (8M) eklendi ve karıştırıldı. Homojenat üzerine 700 µl kloroform:izoamilalkol (24:1) eklendikten sonra 13000 rpm’de 1 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan faz ayrımında üst sıvı mikropipet ile toplanarak yeni bir mikrotüpe aktarıldı. Homojenat üzerine 10 µl RNazA (10 mg/ml) eklendi. Her 5 dakikada bir ters yüz edilmek suretiyle karıştırılan tüpler 65°C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Eşit hacimde kloroform:izoamilalkol (24:1) eklendikten sonra 13000 rpm’de 1 dakika süre ile santrifüj gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası oluşan faz ayrımında üst sıvı yeni bir mikrotüpe aktarıldı. Mikrotüpe toplanan homojenatın üzerine 1/10 hacim NaOAc (3M) ve 2 hacim soğuk etanol eklendi ve tüpler -70°C’de 30 dakika bekletildi. İnkübasyon sonunda 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra üst sıvı uzaklaştırılarak örnekler kurumaya bırakıldı. Kuruma işleminin ardından gDNA pelleti 50 µl destile su içinde çözdürüldü.

gDNA'nın nitel ve nicel analizi elektroforetik ve spektral yöntemler kullanılarak gerçekleştirildi. Elektroforez %1'lik hazırlanan agaroz jelde gerçekleştirildi. Bu amaçla tartılan 0,7g agaroz 70 ml 1X tris-asetik asit-EDTA (TAE) tamponunda (Tablo 3.3) çözdürüldü. Jele fragmentlerin UV ışık altında görüntülenebilmesi için etidyum bromür (10 mg/ml) eklendi. gDNA örnekleri yükleme tamponuyla (Tablo 3.3) kuyulara çöktürüldü. Elektroforetik analiz için molekül ağırlığı bilinen fragmentleri içeren standart DNA örnekleri (Lambda DNA/HindIII; Thermo Scientific, SM0101, ABD) de jele yüklendi. Elektroforez 70 V ve 120 A sabit güçte gerçekleştirildi. gDNA miktarı, boyutu ve saflığı jelde ayrılan standart DNA fragmentleri ile transiluminatör UV ışık altında karşılaştırılarak kontrol edildi. Son olarak jel görüntülerinin fotoğrafları Avegene, X-lite 2000 kullanılarak çekildi.

Tablo 3.3: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlara ait bileşenler ve derişimler.

Tampon	Bileşenler	Derişim
Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE) Tamponu (50X)	Tris bazı	2 M
	Glasiyal asetik asit	1 M
	EDTA (pH 8.0)	0,05 M
Yükleme Tamponu (6X)	Tris-HCl (pH 7.6)	10 mM
	Bromophenol Blue	%0,03
	Xylene Cyanol FF	%0,03
	Glycerol	%60
	EDTA	60 mM

gDNA'nın nicel analizi spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarındaki UV ışığı emme değerleri ölçülerek gerçekleştirildi. gDNA miktarları; $DNA(\mu g/ml) = A_{260} \times \text{sulandırım oranı} \times OD$ formülüne (OD: Optik yoğunluk) göre hesaplandı (çift iplikli DNA molekülü için 1 OD değeri 50 $\mu g/ml$ 'ye karşılık gelir). DNA saflık kontrolü için 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri oranlandı (A_{260}/A_{280}) ve 1,8-2,0 aralığındaki değerlere sahip gDNA'ların çoğaltıma uygun saflıkta olduğu kabul edildi (Maniatis ve diğ., 1982).

3.3 GENOTİPLENDİRME VE MOLEKÜLER KEMOTİPLENDİRME

3.3.1 Genotiplendirme

İzolatlardan alemlerin tanımlanması için 28S ribozomal DNA (rDNA) bölgesi, tür düzeyinde tanımlanması için transkripsiyon elongasyon faktör 1 α (*TEF1 α*) bölgesi (Roger ve diğ., 1999), tür tayini için de türe özgün SCAR markırlarına ait hedef bölgeler (Schilling ve diğ., 1996) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı. PZR analizi her bir primer çifti (Tablo 3.4) için Tablo 3.5'de verilen reaksiyon bileşenlerinin belirtilen sıra ve final derişimlerde bir araya getirilerek toplam

25 µl hacimde gerçekleştirildi. Bileşenlerinden dNTP'nin final konsantrasyonu 28S rDNA için UNIF/R primer çifti için 0,1mM, TEF1α için EF1/2 primer çifti için 0,2mM ve UBC85F/R ile OPT18F/R primer çiftleri için 0,25mM olacak şekilde kullanıldı. Negatif kontrol için tüpler kalıp DNA yerine aynı miktarda iki kere saflaştırılmış su ile hazırlandı. PZR analizlerinin tümü her bir primer çifti için iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Primer bağlanma sıcaklıkları her gen için her iki türde de optimize edildi.

Tablo 3.4: Alem ve tür tanısında kullanılan primerler ve özellikleri.

Hedef Gen	Primer	Nükleotid Dizisi (5'→3')	ÜB (bp)	BS (°C)
28S rDNA	UNIF	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	620	64
	UNIR	GGTCCGTGTTTCAAGACG		
TEF1α	EF1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	700	55
	EF2	GGARGTACCAGTSATCATGTT		
SCAR markırı	UBC85F	GCAGGGTTTGAATCCGAGAC	332	63
	UBC85R	AGAATGGAGCTACCAACGCGC		
SCAR markırı	OPT18F	GATGCCAGACCAAGACGAAG	472	55
	OPT18R	GATGCCAGACGCACTAAGAT		

Ürün boyutu: ÜB; Bağlanma Sıcaklığı: BS

Tablo 3.5: Alem ve tür tanısı PZR bileşenleri ve final derişimleri.

Bileşenler	Final derişimi
ddH ₂ O	-
Reaksiyon tamponu	1X
MgCl ₂	1,5mM
dNTP	Değişken*
İleri primer	10pmol
Geri primer	10pmol
DNA	50ng
Taq DNA polimeraz	1U

* İlgili gen bölgeleri için 0,1, 0,2 ve 0,25 mM kullanıldı (bkz. 3.3.1).

Hedeflenen gen bölgelerinin izolatların gDNA'larından çoğaltımı Tablo 3.6'da verilen koşullar uygulanarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.6: Alem ve tür tanısı PZR koşulları ve döngü sayısı.

Reaksiyon Basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	94	5'	1
Denatürasyon	94	1'***	35
Primer bağlanma	Değişken*	1'***	
Uzama	72	2'***	
Final uzama	72	5'	1

* Her primer için bağlanma sıcaklığı Tablo 3.6'da verildi.

**TEF1α gen bölgesinin çoğaltımında denatürasyon, primer bağlanma ve uzama süreleri sırasıyla 30", 30", 1' olarak uygulandı.

Çoğaltım ürünleri agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. Elektroforez yöntemi Bölüm 3.2’de verildiği şekilde gerçekleştirildi. Fragmentlerin değerlendirilmesinde “GeneRuler 100 bp DNA ladder” (Thermo Scientific, SM0241, ABD) DNA standardı olarak jele yüklendi.

3.3.1.1 Çoğaltım Ürünlerinin Saflaştırılması ve Nükleotid Dizi Bilgisi Analizi

25 µl hacimde PZR ile çoğaltılan nükleotid dizilimi belirlenecek örnekler ticari PZR ürünü saflaştırma kiti (Plus PCR Clean-Up Kit, GeneMark) ile saflaştırıldı. Bu bağlamda PZR ürünleri yeni mikrotüplere alındı ve üzerinde üç hacim Bağlama Solüsyonu eklenerek karıştırıldı. Spin Kolonu ile toplama tüpü bir araya getirilerek mikrotüpte bulunan solüsyon kolona aktarıldı ve 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj gerçekleştirilerek üst sıvı uzaklaştırıldı. Yeni bir toplama tüpüne alınan spin kolonuna 700 µl Yıkama Solüsyonu eklenerek 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj gerçekleştirildi. Üst sıvı uzaklaştırılarak spin kolonu yeni bir toplama tüpüne alındı ve 100 µl Elüsyon Solüsyonu eklenerek 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Maksimum hızda 2 dakika süreyle santrifüj gerçekleştirilerek saf PZR ürünleri elde edildi.

Saflaştırılmış çoğaltım ürünlerinin nükleotid dizilim bilgisi hizmet alımı ile Sanger metoduna göre belirlendi. Dizileme işleminde çoğaltım için hedef bölgeye özgün olarak tasarlanan oligonükleotid primerler kullanıldı. Tek yönlü olarak gerçekleştirilen dizileme sonucunda gen bölgelerine ait ileri dizi bilgisi FASTA formatı halinde “Chromas Lite” programı kullanılarak elde edildi. FASTA formatındaki dizi bilgisi NCBI (National Center for Biotechnology of Information) veri tabanında çevrimiçi olarak kullanılan hizalama arama aracında (BLASTn)² veri giriş penceresine yapıştırıldı. Organizma olarak *Fusarium* genusu seçilerek çoğaltımı sağlanan *TEF1α* gen bölgesinin hangi türe ait olduğu hizalama ile belirlendi.

3.3.2 Moleküler Kemotiplendirme

3.3.2.1 DON ve NIV Tanısı

Temel kemotip tayini *Tri5* gen kümesinde yer alan *tri7* gen bölgesinin Tri7F/Tri7R ve Tri7FgC/Tri7R primer çiftleri; *tri13* gen bölgesinin ise Tri13F/Tri13DONR ve Tri13F/Tri13R primer çiftleri ile çoğaltımına dayalı olarak gerçekleştirildi (Tablo 3.7).

² <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Tablo 3.7: DON ve NIV tanısında kullanılan primerler ve özellikleri.

Gen	Primer	Nükleotid Dizisi (5'→3')	ÜB (bp)	BS (°C)
<i>tri7</i>	Tri7F	TGCGTGGCAATATCTTCTCTA	458-535*	60
	Tri7R	TGTGGAAGCCGCAGA	436**	
<i>tri7</i>	Tri7FgC	CGCCAATGCCGAGC	349-426*	62
	Tri7R	TGTGGAAGCCGCAGA	327**	
<i>tri13</i>	Tri13F	CATCATGAGACTTGTTCRAGTTTGGG	282	55
	Tri13DONR	GCTAGATCGATTGTTGCATTGAG		
<i>tri13</i>	Tri13F	CATCATGAGACTTGTTCRAGTTTGGG	799*	55
	Tri13R	TTGAAAGCTCCAATGTCGTG	1075**	

Ürün boyutu: ÜB; Bağlanma Sıcaklığı: BS; *DON, **NIV için kullanıldı.

tri7 ve *tri13* geni çoğaltımı için kullanılan PZR bileşenleri ve final derişimleri Tablo 3.8'de verildi.

Tablo 3.8: DON ve NIV tanısı PZR bileşenleri ve final derişimleri.

Bileşenler	Final derişimi
ddH ₂ O	-
Reaksiyon tamponu	1X
MgCl ₂	2mM*
dNTP	0,4mM**
İleri primer	5pmol***
Geri primer	5pmol****
DNA	50ng
Taq DNA polimeraz	1U

tri13 geni için; *1,5 mM, **0,25 mM, ***10 pmol/μl, ****10 pmol/μl kullanıldı.

Çoğaltım için kullanılan sıcaklık değerleri ve süreleri ise Tablo 3.9'daki gibi uygulandı. Çoğaltım ürünlerinin elektroforetik analizi Bölüm 3.3.1'deki gibi gerçekleştirildi.

Tablo 3.9: DON ve NIV tanısı PZR koşulları ve döngü sayısı.

Reaksiyon Basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	94	2'	1
Denatürasyon	94	30"	35
Primer bağlanma	Değişken*	30"***	
Uzama	72	30"	
Final uzama	72	10'****	1

*Bkz. Tablo 3.7; *tri13* geni için; **45" ve ***5' kullanıldı.

3.3.2.2 Alt Kemotip (3-ADON ve 15-ADON) Tanısı

DON kemotipindeki izolatların alt kemotiplendirilmesinde 3-ADON alt kemotipi *tri3* geninin çoğaltımını hedefleyen Tri303F/R oligonukleotid primer çiftinin (Tablo 3.10); 15-ADON alt kemotipi *tri3* geninin çoğaltımını hedefleyen Tri315F/R primer çiftinin (Tablo 3.10) kullanıldığı PZR ile ortaya kondu.

Tablo 3.10: 3-ADON ve 15-ADON tanısında kullanılan primerler ve özellikleri.

Gen	Primer	Nükleotid Dizisi (5'→3')	ÜB (bp)	BS (°C)
<i>tri3</i>	Tri303F	GATGGCCGCAAGTGGA	583	58
	Tri303R	GCCGGACTGCCCTATTG		
<i>tri3</i>	Tri315F	CTCGCTGAAGTTGGACGTAA	863	55
	Tri315R	GTCTATGCTCTCAACGGACAAC		

Ürün boyutu: ÜB; Bağlanma Sıcaklığı: BS

Bileşenler Tablo 3.11’de verilen final derişimlerde bir araya getirildi ve çoğaltım Tablo 3.12’deki (Tri303F/R primer çiftine ait değerler) koşullarda sağlandı. Çoğaltım ürünlerinin elektroforetik analizi Bölüm 3.3.1’deki gibi gerçekleştirildi.

Tablo 3.11: 3-ADON ve 15-ADON tanısı PZR bileşenleri ve final derişimleri.

Bileşenler	Final derişimi
ddH ₂ O	-
Reaksiyon tamponu	1X
MgCl ₂	1,5mM
dNTP	0,25mM
İleri primer	10pmol
Geri primer	10pmol
DNA	25ng
Taq DNA polimeraz	1U

Tablo 3.12: 3-ADON ve 15-ADON tanısı PZR koşulları ve döngü sayısı.

Reaksiyon Basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	94	2’*	1
Denatürasyon Primer bağlanma Uzama	94	30"	35
	58**	30"	
	72	45'***	
Final uzama	72	10'	1

Tri315F/Tri315R primer çifti için *ön denatürasyon süresi 5'; **bağlanma sıcaklığı 55°C; *** uzama süresi 1' kullanıldı.

3.3.3 Hedefli Genotip Analizi ile NX-2 Tanısı

İzolatların A tipi trikotesen ailesinden NX-2 mikotoksinini üretme potansiyeli temel alınarak kemotip tayini çoğaltımı yapılan *tri1* gen bölgesinin restriksiyon endonukleazları (RE) ile kesimi ile tarandı. *tri1* gen bölgesinin çoğaltımı Tri-1F/Tri-1R primer çifti (Tablo 3.13) ile gerçekleştirildi. PZR bileşenleri Tablo 3.14’te verilen final derişimlerde bir araya getirildi ve çoğaltım Tablo 3.15’te verilen koşullarda gerçekleştirildi.

3.3.3.1. Oligonukleotid Primer Tasarımı ve Hedef Gen Bölgesinin Çoğaltımı

tri1 gen bölgesinin çoğaltımının sağlanması için özgün primer çifti ilk defa bu çalışmada tasarlandı. Bu amaçla öncelikle *F. graminearum* referans genomunda yer alan *tri1* gen dizisi NCBI veri tabanından elde edildi. Gen bölgesine ait kodlama dizisinin tümüne (complete cds) ait dizi bilgisi FASTA formatında “Primer3”³ programına girildi. Primer çiftine ait GC bazları için en fazla % 50 oranı, boyutların yaklaşık 20 baz olması, her iki oligonukleotidin erime noktası (T_m) sıcaklık aralıklarının uyumlu olması (yaklaşık 55-60°C) kriterlerine dikkat edildi. Primer çiftlerinin hairpin, heterodimer ve homodimer oluşturma olasılıkları “Oligo Analyzer”⁴ ile test edildi ve ΔG değeri -6 kcal/mol ile +2 kcal/mol aralığında olanlar seçildi. *Fusarium* izolatlarının NX-2 üretme potansiyelini dolaylı olarak belirlemede, *tri1* geni çoğaltımı için tasarlanan primer çifti (Tri1F/Tri1R) ve özellikleri Tablo 3.13’te verildi.

Tablo 3.13: *tri1* gen bölgesinin çoğaltımında kullanılan özgün primer çifti ve özellikleri.

Gen	Primer	Nükleotid Dizisi (5'→3')	ÜB (bp)	BS (°C)
<i>tri1</i>	Tri1F	ATGGCTCTCATCACCAG	1740	53
	Tri1R	CAATTCCAATCGCAGACAA		
	Tri1-AF	CTCATCACCAGTTTGCAGGA	821	58
	Tri1-AR	GTTTGCGACCTCGAGACTGT		

Ürün boyutu: ÜB; Bağlanma Sıcaklığı: BS

Çoğaltım için bileşenler final derişimleri Tablo 3.14’te verildiği şekilde bir araya getirildi ve reaksiyon koşulları Tablo 3.15’e göre uygulandı. Çoğaltım ürünlerinin elektroforetik analizi Bölüm 3.3.1’deki gibi gerçekleştirildi.

³ <http://bioinfo.ut.ee/primer3/>

⁴ <https://eu.idtdna.com/calc/analyser>

Tablo 3.14: *tri1* gen bölgesi PZR bileşenleri ve final derişimleri.

Bileşenler	Final derişimi
ddH ₂ O	-
Reaksiyon tamponu	1X
MgCl ₂	2mM
dNTP	0.2mM*
İleri primer	10pmol
Geri primer	10pmol
DNA	50ng
Taq DNA polimeraz	1U

Tri1F/R primer çifti için *0,4 mM olarak kullanıldı

Tablo 3.15: *tri1* gen bölgesi PZR koşulları ve döngü sayısı.

Reaksiyon Basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	94	2'	1
Denatürasyon	94	45"	35
Primer bağlanma	58*	45"	
Uzama	72	1,5'	
Final uzama	72	2'	1

Tri1F/R primer çifti için *bağlanma sıcaklığı 53°C

3.3.3.2 Çoğaltım Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi

tri1 gen bölgesine ait çoğaltım ürünleri *ApoI* enzimi ile kesildi. Kesim reaksiyonu toplam 10 µl hacimde; 2 µl ampikon, 1 µl NEB tamponu ve 0,2 µl *ApoI* (5U/ µl) içerecek şekilde bir araya getirilen bileşenlerin 50°C' de, 90' tutulması ile gerçekleştirildi. Tüplerde enzim inaktivasyonu 80°C'de 5' inkübasyonla sağlandı. Kesim ürünlerinin elektroforetik analizi Bölüm 3.3.1'deki gibi gerçekleştirildi

3.3.3.3 Çoğaltım Ürünlerinin Dizi analizi

PZR analizi ile çoğaltımı gerçekleştirilen *tri1* geninin dizi analizi bölüm 3.3.1.2'de detaylandırıldığı şekilde gerçekleştirildi. NCBI-BLASTn çevrimiçi aracında *Fusarium* genusuna ait *tri1* gen bölgesinin veri tabanında bulunan dizi bilgisi ile dizi analizi gerçekleştirilen örneklerin hizalaması sağlanarak polimorfizm profilleri belirlendi ve 'Restriction Mapper' çevrimiçi biyoinformatik aracı kullanılarak RE kesim bölgesi tarandı.

3.3.4 DON Kemotipindeki İzolatların Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi

B tipi trikotesen üreten izolatların üretim kapasiteleri *tri5* ile *tri6* genleri arasında yer alan intergenik bölgenin PZR çoğaltımı aracılığıyla az ya da çok üretici olanların moleküler düzeyde

belirlenerek ortaya kondu. Az ve çok üretici tayini Bakan ve diğ. (2002) tarafından geliştirilen sırasıyla 4056/3551 ve N1-2/N1-2R primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirildi. Primerler ve özellikleri Tablo 3.16’da verilmektedir.

Tablo 3.16: *tri5-tri6* intergenik bölgenin çoğaltımında kullanılan özgün primerler ve özellikleri.

Hedef	Primer	Nükleotid Dizisi (5'→3')	ÜB (bp)	BS (°C)
tri5-tri6	4056	ATCCCTCAAAAAGTGCCGCT	525	53
	3551	ACTTTCCCACCGAGTATTC		
	N1-2	CTTGTTAAGCTAAGCGTTTT	200	
	N1-2R	AACCCCTTTCCTATGTGTTA		

Ürün boyutu: ÜB; Bağlanma Sıcaklığı: BS

Çoğaltım için bir araya getirilen bileşenler final derişimleri ile birlikte Tablo 3.17’de verildi. Reaksiyon koşulları ise Tablo 3.6’ya göre uygulandı (primer bağlanma sıcaklığı için bkz. Tablo 3.13). Çoğaltım ürünlerinin elektroforetik analizi Bölüm 3.3.1’deki gibi gerçekleştirildi.

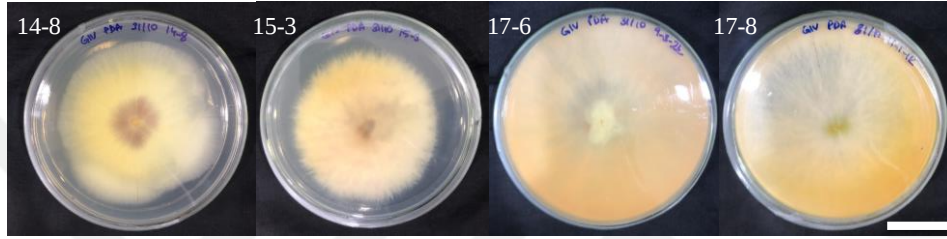
Tablo 3.17: *tri5-tri6* intergenik bölgesi PZR bileşenleri ve final derişimleri.

Bileşenler	Final derişimi
ddH ₂ O	-
Reaksiyon tamponu	1X
MgCl ₂	2,5mM
dNTP	0.1mM
İleri primer	10pmol
Geri primer	10pmol
DNA	50ng
Taq DNA polimeraz	1U

4. BULGULAR

4.1 *Fusarium* İZOLATLARINDA ÇOĞALTIM

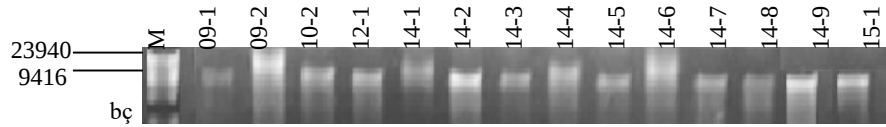
Morfolojik gözlemlerle 35'i *F.culmorum*, 18'i *F. graminearum* olarak belirlenmiş, gliserol stok halinde saklanan toplamda 53 adet *Fusarium* izolatı SNA besi ortamında 7 gün boyunca canlandırıldı ve PDA besi ortamında 7 günlük inkübasyon sonucunda etkin olarak çoğaltıldı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Bazı *Fusarium* izolatlarının PDA besi ortamındaki 7 günlük *in vitro* kültürleri. Bar: 3cm.

4.2 MOLEKÜLER TANI İLE İLGİLİ BULGULAR

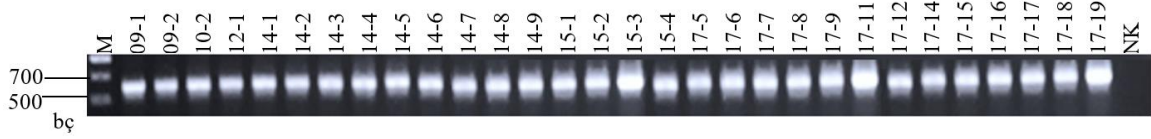
53 *Fusarium* izolatından izole edilen gDNA'ların spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda gerçekleştirilen ölçümleri sonucunda miktarları 70-120 ng/μl olarak hesaplandı. gDNA'ların saflık düzeylerini gösteren OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranlarının da 1,7-1,9 değer aralığında olduğu belirlendi. İzole edilen gDNA'ların bütünlüğünün korunduğu, gDNA'ların PZR analizinde kullanılabilir kalitede olduğu %1'lik agaroz jel elektroforezi ile saptandı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Bazı *Fusarium* izolatlarına ait gDNA izolasyonunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: λ+Hind3 (Thermo Scientific, SM0101, ABD).

4.2.1 Alem Düzeyinde Tanı Bulguları

UNIF/R primer çiftinin kullanıldığı PZR'de Tablo 3.1a'da verilen tüm izolatlardan 620 bp boyutundaki 28S rRNA bölgesi çoğaltılarak toplanda 30 örneğin alem düzeyindeki tanıları gerçekleştirildi (Şekil 4.3). Tablo 3.1.b'de yer alan ve ilk kez Yörük ve Albayrak (2012) tarafından alem tanıları gerçekleştirilen izolatların da tanıları kontrol edildi.

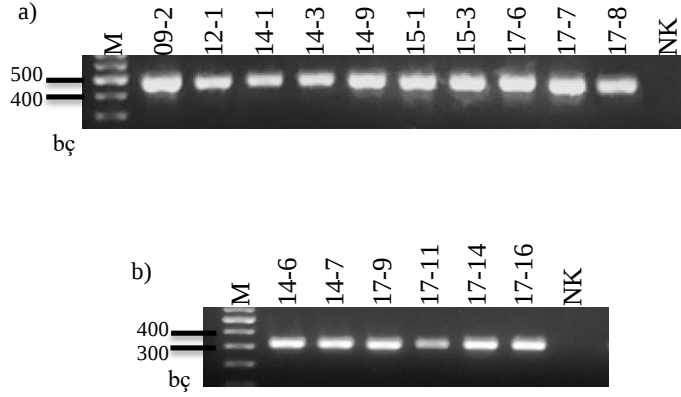


Şekil 4.3: *Fusarium* izolatlarından UNIF/R primerlerinin kullanıldığı PZR çoğaltımından elde edilen 28S rRNA bölgesine ait 620 bp boyutlu fragmentlerin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kb (Thermo Scientific, SM0311, ABD), NK: Negatif kontrol.

4.2.2 SCAR Markırları ile Tür Düzeyinde Tanı Bulguları

SCAR markırlarının çoğaltımı temeline dayalı tür tayini analizinde, OPT18F/R primerleri ile 10 izolatta elde edilen 472 bp'lik çoğaltım ürünü bu izolatların *F. culmorum* türüne ait bireyler olduklarını ortaya koydu (Şekil 4.4.a). Benzer şekilde 6 izolatın *F. graminearum* türü bireyleri olduğu UBC85F/R primer çifti ile çoğaltılan 332 bp'lik fragment ile belirlendi (Şekil 4.4.b).

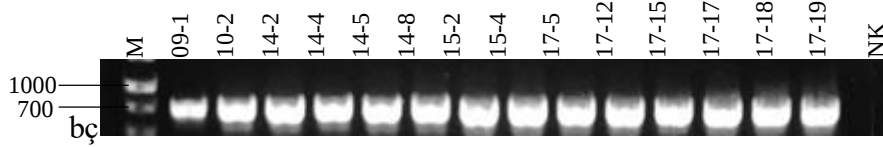
Morfolojik olarak 6'sı *F. culmorum* (09-1, 14-2, 14-8, 15-2, 15-4 ve 17-5 kodlu izolatlar) ve 8'i *F. graminearum* (10-2, 14-4, 14-5, 17-12, 17-15, 17-17, 17-18 ve 17-19 kodlu izolatlar) olarak tanımlanan 14 izolatta SCAR markırlarına ait fragmentler çoğaltılamadı (Bkz. Tablo 4.1).



Şekil 4.4: *Fusarium* izolatlarında özgün SCAR markırlarının tarandığı PZR analizlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü a) *F. culmorum* izolatlarından OPT18F/R primerleri ile çoğaltılan 472 bç boyutlu fragmentler b) *F. graminearum* izolatlarından UBC85F/R primerleri ile çoğaltılan 332 bç boyutlu fragmentler. M: 100 bp (Thermo Scientific, SM0241, ABD), NK: Negatif kontrol.

4.2.3 *TEF1α* Çoğaltımı ile Tür Düzeyinde Tanı Bulguları

SCAR markırına ait çoğaltım ürünü elde edilemeyen morfolojik olarak 6'sı *F. culmorum* ve 8'i *F. graminearum* olarak tanımlanmış 14 izolatta *TEF1α* geni özgün EF1/2 primerleri ile çoğaltıldı ve 700 bç boyutlu fragmentler agaroz jel elektroforezinde gözlemlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: *Fusarium* izolatlarında PZR ile çoğaltılan ve agaroz jel elektroforezinde görüntülenen 700 bç boyutlu *TEF1α* gen fragmentleri. M: 1 kb (Thermo Scientific, SM0241, ABD), NK: Negatif kontrol.

TEF1α genine ait çoğaltım ürünleri saflaştırma işleminin ardından “Sanger” yöntemine göre tek yönlü dizilendikten sonra gerçekleştirilen hizalama analizleri; morfolojik kriterlere göre *F. culmorum* olarak tanımlanan altı izolatta *F. proliferatum* referans sekansları ile %98,80-99,55 oranında ve *F. graminearum* olarak tanımlanan sekiz izolattan yedisinin %97,60-99,39 oranında *F. proliferatum* ve birinin %99,55 oranında *F. oxysporum* ile yakın ilişkili olduğunu ortaya koydu (Tablo 4.1). İzolatlara ait çoklu hizalama nukleotid dizi bilgileri ile *F. proliferatum* olarak belirlenen izolatlar için Ek 1’de, *F. oxysporum* olarak belirlenen izolat için ise Ek 2’de hizalama analizleri verildi.

Tablo 4.1: *F. culmorum* ve *F. graminearum* olarak tanımlanmış izolatların *TEF1 α* geninin nukleotid hizalamalarına ait veriler (tüm izolatlar için E değeri: 0,0).

Kod	Tür	Tanı	SK (%)	BY (%)
09-1	<i>F. culmorum</i>	<i>F. proliferatum</i>	88	99,55
14-2		<i>F. proliferatum</i>	88	98,96
14-8		<i>F. proliferatum</i>	98	98,80
15-2		<i>F. proliferatum</i>	97	98,81
15-4		<i>F. proliferatum</i>	88	99,40
17-5		<i>F. proliferatum</i>	86	99,39
10-2	<i>F. graminearum</i>	<i>F. proliferatum</i>	96	97,60
14-4		<i>F. proliferatum</i>	95	98,79
14-5		<i>F. proliferatum</i>	86	99,09
17-12		<i>F. proliferatum</i>	98	97,94
17-15		<i>F. proliferatum</i>	95	98,35
17-17		<i>F. proliferatum</i>	98	98,83
17-18		<i>F. proliferatum</i>	95	99,39
17-19		<i>F. oxysporum</i>	95	99,55

SK: Sorgu kapsamı; BY: Benzerlik yüzdesi.

4.3 MOLEKÜLER KEMOTİP VE ALT KEMOTİP ANALİZ BULGULARI

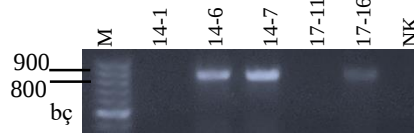
4.3.1 DON ve NIV Kemotipi Bulguları

Yeni Yüzyıl Üniversitesi Kültür Koleksiyonu'ndan (Tablo 3.1.a) sağlanan izolatların moleküler kemotip analizlerinde *tri7* gen bölgesi PZR aracılığıyla Tri7F/R ve Tri7FgC/Tri7R primer çiftleri kullanılarak çoğaltılamadı. Bu nedenle kemotip tayini *tri13* gen bölgesinin çoğaltımı ile gerçekleştirildi. Tri13F/Tri13DONR primer çifti ile 10 izolat (09-1, 14-2, 14-6, 14-7, 15-1, 15-2, 15-4, 17-11, 17-14, 17-16) elde edilen 282 bç'lik çoğaltım ürünleri izolatların DON kemotipine sahip olduklarını ortaya koydu. Agaroz jel elektroforezinde silik bant veren dört izolatın (09-1, 14-6, 15-2, 15-4) gDNA'ları Tri13F/R primer çifti ile 799 bç'lik çoğaltım ürünlerini verdiği için bu izolatların DON kemotipi doğrulandı. Beş izolat (14-1, 14-9, 17-5, 17-16 ve 17-17) bu primer çifti ile çoğaltılan 1075 bç'lik çoğaltım ürünü izolatların NIV kemotipinde olduklarını ortaya koydu (Ek 3).

4.3.2 3-ADON ve 15-ADON Alt Kemotipi Bulguları

Moleküler alt kemotip analizlerinde *tri3* gen bölgesinin çoğaltımı hedeflenerek 3-ADON ve 15-ADON alt kemotipleri belirlendi. 15 izolat Tri303F/R primer çifti ile elde edilen 583 bç'lik çoğaltım ürünü bu izolatların 3-ADON alt kemotipine sahip olduklarını ortaya koydu. 18 izolatın gDNA'larından bu bölgenin çoğaltımı sağlanamadı (Ek 3). Bu 18 izolatın 15-ADON alt kemotip tayini Tri315F/R primer çifti ile gerçekleştirilen PZR ile araştırıldı. Sadece üç

izolatın (14-6, 14-7, 17-16) gDNA'larından 863 bç'lik fragmentler elde edilerek 15-ADON alt kemotipinde oldukları ortaya kondu (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: 15-ADON kemotip tayini için Tri315F/R primerleri ile gerçekleştirilen çoğaltım reaksiyonundan elde edilen 863 bç boyutlu fragmentler. M: 100 bp (Thermo Scientific, SM0241, ABD), NK: Negatif kontrol.

4.4 HEDEFLİ GENOTİPLENDİRME BULGULARI

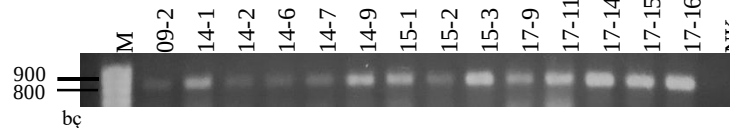
4.4.1 NX-2 Bulguları

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Kültür Koleksiyonu'ndan kullanılan 30 izolatın (Tablo 3.1.a) *tri1* çoğaltımı öncelikle 1740 bç'lik çoğaltım ürünü veren Tri1F/R primer çifti ile denendi. Bu oligonukleotidler ile izolatlarda PZR optimizasyonunun sağlanamaması, aynı gen üzerinde yeni bir çoğaltım bölgesini hedefleyen primer çiftinin tasarlanması ve PZR analizinin bu primerler ile gerçekleştirilmesiyle sonuçlandı.

İstanbul Üniversitesi Kültür Koleksiyonu'na ait 3-ADON kemotipinde olduğu Yörük ve Albayrak (2012) tarafından belirlenmiş 23 izolatta (Tablo 3.1.b) PZR analizi *tri1* gen bölgesinin çoğaltımını hedefleyen Tri1-AF/R primer çifti ile gerçekleştirildi. Çoğaltımı hedeflenen 821 bç'lik fragment sadece 14F izolatından elde edildi. Diğer 22 örnekte çoğaltım sağlanamadı. 14F izolatından elde edilen çoğaltım ürününün *ApoI* RE ile kesiminde NX-2 kemotipi için hedeflenen 346 bç ve 475 bç'lik iki fragment yerine agaroz jelde kesilmemiş tam boydaki çoğaltım ürünü gözlemlendi.

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Kültür Koleksiyonu izolatlarının (Tablo 3.1.a) Tri1F/R primer çifti ile *tri1* gen bölgesi 29 izolatta hedeflenen 821 bç'lik fragment halinde çoğaltıldı (Şekil 4.7). Bu primer çifti 17-8 kodlu izolatta çoğaltımı sağlamadı. 16 izolattan (09-2, 14-1, 14-2, 14-6, 14-7, 14-9, 15-1, 15-2, 15-3, 17-9, 17-11, 17-14, 17-15, 17-16, 17-17 ve 17-19) elde edilen yüksek miktardaki çoğaltım ürünleri *ApoI* RE ile kesime bırakıldığında kesim reaksiyonu

gerçekleşmedi. NX-2 kemotipinin belirlenmesi için beklenen 346 bç ve 475 bç'lik iki fragment agaroz jelde gözlenmedi.



Şekil 4.7: *tri1* gen bölgesinin çoğaltımı için Tri1-AF/R primerleri ile gerçekleştirilen çoğaltım reaksiyonundan elde edilen 821 bç boyutlu fragmentler. M: 100 bp (Thermo Scientific, SM0241, ABD), NK: Negatif kontrol.

RE kesimi temelli NX-2 tayini gerçekleştirilememesi üzerine 12 izolatın (09-2, 14-6, 14-7, 15-1, 15-1, 15-2, 15-3, 17-9, 17-11, 17-14, 17-16 ve 17-19) *tri1* genine ait çoğaltım ürünleri saflaştırılarak “Sanger” yöntemine göre dizilendi. Dizi analizlerinin biyoinformatik araçlarla gerçekleştirilen *ApoI* kesim noktası taramasında 17-11 izolatına ait *tri1* çoğaltım fragmentinin 437. noktasında hedeflenen kesim noktası saptandı (Şekil 4.7).

17-11 digest					
Enzymes: ApoI					
Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
437	none	1	ApoI	437	GGCTCGACAT GCTGGCATAT TTTGTTGCCT TTCTCGTCGT AGTATCCGTC GTACGAAGAG AAGCTGGCCC CGCAACCCAG CGCATACTTG CTCAACCCCA GACGCTGGTA CGAGTTTACC GATGCTCGTG CAGTCTCAGA AGTCCTTCAC ACCACCCGCC AAACCCCTCGA AGAATGGTTC CACAAGCACC CAACAACCCC TGTCCGCCTG ACAACCGATT TCGGTGAAAT GACCTTTTGG CCTCCCACTC TGGCCGATGA AATCAAGAGC GATAAGCGCC TCAGCTTCAT CAAGGCAGCT AACGATTCGG TATGTGGAAC AATCAAGAGC GATAAGCGCC TCAGCTTCAT CAAGGCAGCT AACGATTCGG TATGTGGAAC TTGTTGAATA AATGACTGGT CCATATAGCT AAACAACCAATAGGCCTTCC AACTGA
415	ApoI	438	none	852	AATTTGTTGA ATAAATGACT GGTCCATATA GCTAAACAAC CAATAGGCCT TCCCACTGA AATCCCCGGT TTTGAGCCTT TCCGCGAGGG CGGAAGAAAT GAGGCAGCAC TGATCAAGGAGGTTATTAC GGTCAATTAA AGAAAACCTCT GAGTAAGCCG GCAAACCCCG TCCAGATTAT AACATGCCAT GTCGATGCTA ATTGTTTTGT TAAGACAAA TGACCTTTCC ATTGGGTCAA GAAACCCAGC TGGCTGTTGA AACTACCTC GGTGCTAACA AGGTAAGGACCATCGCGAC ACGTTGTTGA CTTAAGCTGA TTGCTATAG AATGGCACAA GATTCGACTC AGGGACGCCC TGCTACCCCC GGACACTAGA ATCTCAACAC GTATCCTTTT TGGTGGGGTT GAAGG

Şekil 4.8: Restriksiyon haritalama programı ile belirlenen, 17-11 izolatının *tri1* geni içerisinde yer alan ApoI RE kesim bölgesi.

Ek olarak, *tri1* geninde insersiyon meydana gelmiş 120 nukleotidlik bölgenin varlığı bu izolatta ortaya kondu (Şekil 4.8).

09-2	CGCCTGACAACCGATTTTCGGTGAAATGACCTTTTTGCCTCCCACTCTGGCCGATGAAATC
15-1	CGCCTGACAACCGATTTTCGGTGAAATGACCTTTTTGCCTCCCACTCTGGCCGATGAAATC
15-2	CGCCTGACAACCGATTTTCGGTGAAATGACCTTTTTGCCTCCCACTCTGGCCGATGAAATC
15-3	CGCCTGACAACCGATTTTCGGTGAAATGACCTTTTTGCCTCCCACTCTGGCCGATGAAATC
14-7	CGCCTGACAACCGATTTTCGGTGAAATGACCTTTTTGCCTCCCACTCTGGCCGATGAAATC
17-16	CGCCTGACAACCGATTTTCGGTGAAATGACCTTTTTGCCTCCCACTCTGGCCGATGAAATC
Fusarium	CGCCTGACAACCGATTTTCGGTGAAATGACCTTTTTGCCTCCCACTCTGGCCGATGAAATC
17-9	CGCCTGACAACCGATTTTCGGTGAAATGACCTTTTTGCCTCCCACTCTGGCCGATGAAATC
17-19	CGCCTGACAACCGATTTTCGGTGAAATGACCTTTTTGCCTCCCACTCTGGCCGATGAAATC
17-14	CGCCTGACAACCGATTTTCGGTGAAATGACCTTTTTGCCTCCCACTCTGGCCGATGAAATC
14-6	CGCCTGACAACCGATTTTCGGTGAAATGACCTTTTTGCCTCCCACTCTGGCCGATGAAATC
17-11	CGCCTGACAACCGATTTTCGGTGAAATGACCTTTTTGCCTCCCACTCTGGCCGATGAAATC

09-2	AAGAGCGATAAGCGCCTCAGCTTCATCAAGGCAGCTAACGATTCGGTATGTGGAAC----
15-1	AAGAGCGATAAGCGCCTCAGCTTCATCAAGGCAGCTAACGATTCGGTATGTGGAAC----
15-2	AAGAGCGATAAGCGCCTCAGCTTCATCAAGGCAGCTAACGATTCGGTATGTGGAAC----
15-3	AAGAGCGATAAGCGCCTCAGCTTCATCAAGGCAGCTAACGATTCGGTATGTGGAAC----
14-7	AAGAGCGATAAGCGCCTCAGCTTCATCAAGGCAGCTAACGATTCGGTATGTGGAAC----
17-16	AAGAGCGATAAGCGCCTCAGCTTCATCAAGGCAGCTAACGATTCGGTATGTGGAAC----
Fusarium	AAGAGCGATAAGCGCCTCAGCTTCATCAAGGCAGCTAACGATTCGGTATGTGGAAC----
17-9	AAGAGCGATAAGCGCCTCAGCTTCATCAAGGCAGCTAACGATTCGGTATGTGGAAC----
17-19	AAGAGCGATAAGCGCCTCAGCTTCATCAAGGCAGCTAACGATTCGGTATGTGGAAC----
17-14	AAGAGCGATAAGCGCCTCAGCTTCATCAAGGCAGCTAACGATTCGGTATGTGGAAC----
14-6	AAGAGCGATAAGCGCCTCAGCTTCATCAAGGCAGCTAACGATTCGGTATGTGGAAC----
17-11	AAGAGCGATAAGCGCCTCAGCTTCATCAAGGCAGCTAACGATTCGGTATGTGGAACAAATC

09-2	-----
15-1	-----
15-2	-----
15-3	-----
14-7	-----
17-16	-----
Fusarium	-----
17-9	-----
17-19	-----
17-14	-----
14-6	-----
17-11	AAGAGCGATAAGCGCCTCAGCTTCATCAAGGCAGCTAACGATTCGGTATGTGGAACCTGT

09-2	-----TTGT
15-1	-----TTGT
15-2	-----TTGT
15-3	-----TTGT
14-7	-----TTGT
17-16	-----TTGT
Fusarium	-----TTGT
17-9	-----TTGT
17-19	-----TTGT
17-14	-----TTGT
14-6	-----TTGT
17-11	TGAATAAATGACTGGTCCATATAGCTAAACAACCAATAGGCCTTCCACACTGAAATTTGT

09-2	TGAATAAATGACTGGTCCATATAGCTAAACAACCAATAGGCCTTCCACACTGAAATCCCC
15-1	TGAATAAATGACTGGTCCATATAGCTAAACAACCAATAGGCCTTCCACACTGAAATCCCC
15-2	TGAATAAATGACTGGTCCATATAGCTAAACAACCAATAGGCCTTCCACACTGAAATCCCC
15-3	TGAATAAATGACTGGTCCATATAGCTAAACAACCAATAGGCCTTCCACACTGAAATCCCC
14-7	TGAATAAATGACTGGTCCATATAGCTAAACAACCAATAGGCCTTCCACACTGAAATCCCC
17-16	TGAATAAATGACTGGTCCATATAGCTAAACAACCAATAGGCCTTCCACACTGAAATCCCC
Fusarium	TGAATAAATGACTGGTCCATATAGCTAAACAACCAATAGGCCTTCCACACTGAAATCCCC
17-9	TGAATAAATGACTGGTCCATATAGCTAAACAACCAATAGGCCTTCCACACTGAAATCCCC
17-19	TGAATAAATGACTGGTCCATATAGCTAAACAACCAATAGGCCTTCCACACTGAAATCCCC
17-14	TGAATAAATGACTGGTCCATATAGCTAAACAACCAATAGGCCTTCCACACTGAAATCCCC
14-6	TGAATAAATGACTGGTCCATATAGCTAAACAACCAATAGGCCTTCCACACTGAAATCCCC
17-11	TGAATAAATGACTGGTCCATATAGCTAAACAACCAATAGGCCTTCCACACTGAAATCCCC

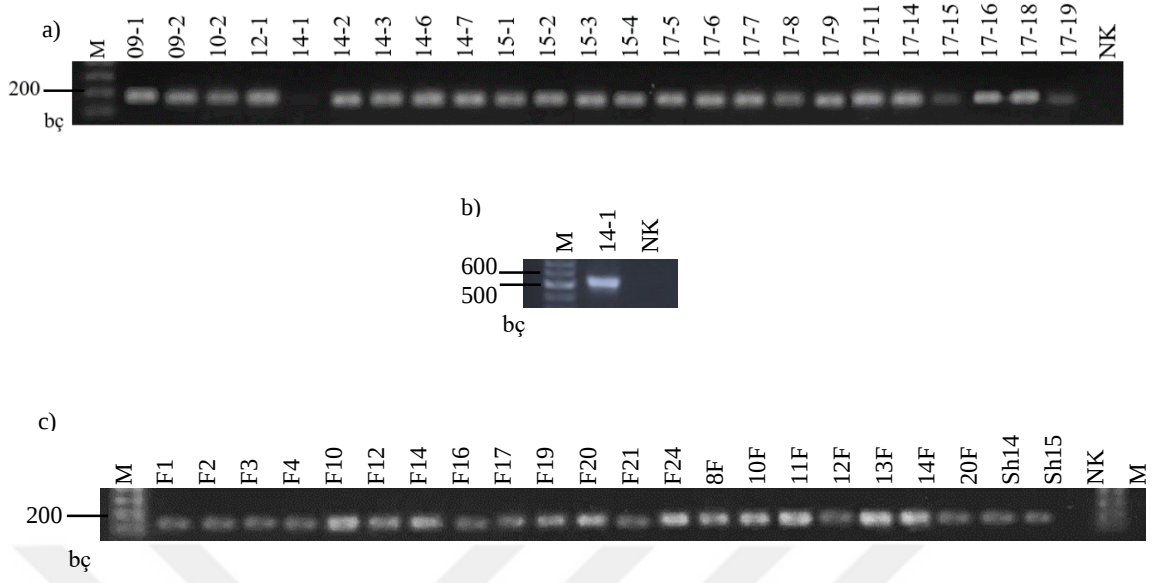
Şekil 4.9: Hizalama programı ile dizileme bulgusu elde edilen 11 izolata ait *tri1* çoğaltım bölgesinin referans ile hizalanması.

4.4.2 İzolatların DON Üretim Kapasitelerine Ait Bulgular

B tipi trikotesen üretimi saptanan İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Kültür Koleksiyonu izolatlarından (30 izolat) 23'ünde (bkz. Tablo 3.1.a) *tri5-tri6* intergenik bölgesine ait 200 bç'lik fragment N1-2/N1-2R primer çifti ile çoğaltılarak bu izolatların çok üretici oldukları gösterildi (Şekil 4.9.a). 3551/4056 primer çifti ile gerçekleştirilen az üretici tanısında sadece 14-1 izolatından 525 bç'lik fragment elde edildi (Şekil 4.9.b). Her iki primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen analizde *tri5-tri6* intergenik bölgesi 14-4, 14-5, 14-8, 14-9, 17-12 ve 17-17 kodlu altı izolatta çoğaltılamadı.

Yörük ve Albayrak (2012) tarafından 3-ADON kemotipinde olduğu belirlenmiş İstanbul Üniversitesi Kültür Koleksiyonu izolatlarının (23 izolat, bkz. Tablo 3.1.b) 22'sinden N1-2/N1-2R primer çifti ile 200 bç'lik fragment elde edildi (Şekil 4.9.c). Sh7 izolatında *tri5-tri6* intergenik bölgesi iki primer çifti ile de çoğaltılamadı (Ek 3).

İstanbul Üniversitesi Kültür Koleksiyonu'na ait NIV kemotipinde olduğu belirlenmiş (Yörük ve Albayrak, 2012) 25 adet izolatta (Tablo 3.1.c) 3551/4056 primer çifti ile 650 bç boyutlu ürün elde edilemedi. NIV kemotipindeki bu izolatların az üretici olmadıkları ortaya kondu (Ek 3).



Şekil 4.10: Az ve çok üretici tanısı için a) Tablo 3.1.a’da verilen izolatların N1-2/N1-2R primer çifti ile gerçekleştirilen çok üretici tanısında çoğaltımı hedeflenen 200 bç boyutlu fragmentleri b) 3551/4056 primer çifti ile az üretici olduğu belirlenen 14-1’den çoğaltılan 525 bç boyutlu fragment c) Tablo 3.1.b’de verilen izolatların N1-2/N1-2R primer çifti ile gerçekleştirilen çok üretici tanısında çoğaltımı hedeflenen 200 bç boyutlu fragment. M: 100 bp (Thermo Scientific, SM0241, ABD), NK: Negatif kontrol.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Fusarium spp. ülkemizde ve dünyada ekinlerde çeşitli hastalıklara neden olan bitki patojenleridir. Kontamine olmuş ürünlerde *Fusarium*'un metabolik aktivitesi sonucunda biriken mikotoksinler ciddi ürün kayıplarına neden olmaktadır. Mikotoksinler hastalıklı ekinlerin hasatından sonra gıda ve yem üretim zincirine karışmaktadır. Toksin kontamine ürünlerin tüketimi sonucunda insanda ve hayvanlarda mikotoksikoz meydana gelmektedir. Ciddi maddi kayıplarla birlikte sebep olduğu sağlık risk faktörlerinden dolayı *Fusarium* izolatlarına ait tür düzeyinde tanı ve belirli agro-ekolojik bölgelere ait kemotiplendirme ve hedefli genotiplendirme çalışmaları *Fusarium*'a karşı etkin mücadele yöntemlerinin geliştirilmesinde önem arz etmektedir. Gerçekleştirilecek benzeri çalışmalarla türlerin ve izolatların mikotoksin üretim profilleri belirlenerek infeksiyöz ajan erken dönemde ve hassas biçimde tanımlanabilecektir. Bu fitopatojenlerin potansiyel toksikolojik riskleri haritalanabilecek, toksinlerin besin zincirindeki mevcudiyetleri azaltılabilecektir (Moretti, 2009).

Gerçekleştirilen bu yüksek lisans tezi kapsamında, farklı dönemlerde yurdumuz ve İran'ın farklı coğrafik bölgelerinden toplanmış, hastalıklı arpa, buğday ve mısır bitkilerinden izolasyonu gerçekleştirilmiş ve tür düzeyinde tanımlanmış olan 78 *Fusarium* izolatına ait moleküler kemotiplendirme ve hedefli genotiplendirme analizlerinin tamamlanması amaçlanmıştır.

Fusarium türlerinin; konidyum ve konidiyofor yapısı ve boyutu, renklenme gibi çeşitli morfolojik karakterleri incelenerek tayin edilmektedir. Tez kapsamında kullanılan, tek spor analizi ile saflaştırılmış *Fusarium* izolatlarından Türkiye kökenli olanlar Prof. Dr. Berna Tunalı, İran kökenli olanlar ise Prof. Dr. Bahram Sharifnabi tarafından morfolojik ve fizyolojik karakterlere göre tanımlanmıştır. Ancak, *in vitro* yetiştirme koşullarındaki farklılıklarla meydana gelebilen morfolojik özelliklerdeki tür içi ve türler arası varyasyonlar, zaman alan ve zahmetli olan bu yaklaşımlarla gerçekleştirilen tanı çalışmalarında ciddi problemlere yol açabilmektedir (Wu ve diğ., 2002). Özellikle tür kompleksi üyelerinden oluşan *F. graminearum* türünün izolatları hatalı olarak tanımlanabilmektedir. Bu nedenle infekte tahıl bitkilerindeki mikrobiyal topluluk üyelerinin ya da saf kültürdeki örneklerin ayırt edilmesinde ve kesin tanısında; doğru, güvenilir ve hızlı sonuçlar veren, doğrudan genomun hedeflendiği moleküler yaklaşımlar geniş çaplı kullanılmaktadır (Wu ve diğ., 2002; Koncz ve diğ., 2008).

Günümüzde fungal patojenlerin tanısı, moleküler düzeydeki genotiplendirme ve özellikle kemotiplendirme çalışmalarından elde edilen veriler türlere ait agro-ekolojik yayılım alanlarının da ortaya konmasına katkı sağlamaktadır (Yörük ve Albayrak 2012). Genomik hedefleri temel alan moleküler markır çalışmaları ve dizileme yöntemleri fungal patojenlerin tanımlamasında etkili olarak kullanılmaktadır. rRNA'ları kodlayan gen bölgelerinin analizi ve dizilenerek karşılaştırılması bu kapsamda en çok tercih edilen yaklaşımlardır. rDNA bölgesinin, geliştirilen evrensel oligonukleotid primerlerle, PZR aracılı çoğaltıldığı organizmalarda ortaya konan çoğaltım ürünlerinin boyut polimorfizmi, bilgi verici moleküler markırların eldesine olanak sağlamaktadır (Haynes ve diğ., 1995). Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında *Fusarium* izolatlarının genomundaki 28S rDNA bölgesi evrensel UNIF/R primer çifti kullanılarak çoğaltılmıştır. Literatürde ürün boyutu değer aralığı 650-700 bp olarak bildirilmekle birlikte tez kapsamında gerçekleştirilen analizlerde, Yörük ve Albayrak (2012)'ın sonuçları ile paralellik gösterecek şekilde, 650 bp'lık tek bir fragment elde edilerek izolatlar alem düzeyinde tanımlanmıştır.

Fungal düzeyde tanımlanmış bu izolatlar; genomda daha çok kodlanmayan bölgeleri içeren ve tür içinde kararlı taşınan RAPD fragmentlerinden geliştirilmiş SCAR (ing., sequence characterized amplified region) markırları çoğaltılarak tür düzeyinde ayırt edilmiştir (Schilling ve diğ., 1996). Bu amaçla türe özgün SCAR markırları, tek spor analizinden elde edilen ve konidiyospor biçimi vb. kriterlere göre *F. culmorum* veya *F. graminearum* olarak tanımlanmış 30 örnekte özgün primerler (*F. culmorum* tanısı için OPT18F/R primer çifti, *F. graminearum* tanısı için UBC85F/R primer çifti) kullanılarak taranmıştır. SCAR markırlarının bu iki özgün oligonukleotid primerle *F. culmorum* ve *F. graminearum* türlerini doğru biçimde ayırt ettiği çeşitli araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Brandfass ve Karlovsky, 2008; Yörük ve Albayrak, 2012). 30 örneğin 10'undan elde edilen 472 bp boyutlu ürünler bu izolatların *F. culmorum*, altısından çoğaltılan 332 bp'lık fragmentler de izolatların *F. graminearum* türleri üyesi olduklarını ortaya koymuştur. Her iki SCAR markırının varlığı 14 izolatın genomunda gösterilememiştir. Markır çoğaltımı primer bağlanma bölgesi ile yakın ilişkilidir. Bu bölgede meydana gelen mutasyonlar primer bağlanma bölgesi varyasyonlarına neden olarak allelin çoğaltılamamasına yol açabilmektedir. 14 izolatta primer bağlanma bölgesi varyasyonlarının null allel eldesi ile sonuçlanmış olabileceği düşünülmüş, aynı bölgenin farklı bir primer tasarlanarak çoğaltımının hedeflenmesi yerine, bu izolatlar translasyon mekanizmasında görevli proteini kodlayan *TEF1α* geni analiz edilerek tür düzeyinde tanımlanmıştır.

Ortolog olmayan gen kopyaları genus içinde saptanmayan *TEF1 α* gen bölgesi türler arasında yüksek seviyede sekans polimorfizmi gösterdiğinden, tür tanısında markır gen olarak kullanılmaktadır (Geiser ve diğ., 2004). Ayrıca bu genin sekansı *Fusarium* izolatlarının filogenetik ilişkilerinin belirlenmesinde de kullanışlı veriler sunmaktadır. O'Donnell ve diğ. (1998) tarafından tasarlanmış oligonukleotidlerin (EF1/EF2) kullanıldığı analizlerde Geiser ve diğ. (2004)'nin elde ettiği boyuttaki fragmentler (700 bp) 14 izolattan da çoğaltılmıştır. *F. culmorum* ve *F. graminearum* türlerine ait SCAR markırlarının üretilmediği 14 örneğin *TEF1 α* bölgesinin çoğaltımı EF1/EF2 primer çifti ile gerçekleştirilerek 700 bp boyutlu fragmentler elde edilmiştir. Bu fragmentlere ait sekans bilgilerinin NCBI veritabanında bulunan *TEF1 α* genine ait referans nukleotid dizi bilgileri ile hizalanmasında çevrimiçi biyoinformatik araçlardan faydalanılmıştır. Çoklu hizalama analizi sonucunda morfolojik tayin ile *F. culmorum* olarak tanımlanmış altı izolatın (09-1, 14-2, 14-8, 15-2, 15-4, 17-5) gen bölgesi, *F. proliferatum*'a ait *TEF1 α* referans sekansları ile % 98,80-99,55 oranında; morfolojik tayin ile *F. graminearum* olarak tanımlanmış sekiz izolattan yedisinin (10-2, 14-4, 14-5, 17-12, 17-15, 17-17, 17-18) % 97,60-99,39 oranında *F. proliferatum* ve birinin (17-19) de % 99,55 oranında *F. oxysporum* *TEF1 α* gen bölgeleri ile benzerlik göstermiştir. Bulgular morfolojik ve fizyolojik kriterlere göre yapılan tür tayinlerinin moleküler yaklaşımlarla teyidinin önemini ortaya koymaktadır. Bu izolatların tür düzeyindeki kesin tanısı ancak detaylı analizlerinden elde edilecek verilerle gerçekleştirilecektir.

Fusarium türlerinin kimyasal profillerinin belirlenmesi, özellikle sekonder metabolizma ürünü olan ve mikotoksikoz etmeni olan mikotoksinlerinin üretim potansiyellerinin ortaya konması, bu türlerin olası toksikolojik dağılım profillerinin saptanmasına olanak sunacaktır. Alem ve tür düzeyindeki tanılarının ardından toplamda 78 *Fusarium* izolatında kemotiplendirme ve hedefli genotip analizi ile geniş çaplı kimyasal profil taraması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle izolatların kemotipleri (DON ve NIV) *tri7* geni hedeflenerek araştırılmıştır. DON kemotipindeki bireylerde *tri7* geni genomda tam boyda, ardışık tekrara sahip bölgeyi de içerecek şekilde, taşınmaktadır. Ardışık tekrarların varlığı genin işlevselliğini kaybetmesine sebep olmaktadır. NIV kemotipindeki izolatlarda bu ardışık tekrar bölgesinin delesyonu sonucu genin anlatımının gerçekleşmesi, NIV kemotipinin ortaya çıkması ile sonuçlanmaktadır (Lee ve diğ., 2002). Chandler ve diğ. (2003) tarafından geliştirilen oligonukleotidler (Tri7F/Tri7R ve Tri7FgC/Tri7R) kullanılarak bu gen bölgesinden, ardışık tekrarlı bölgenin varlığı ya da yokluğuna göre elde edilen farklı boyutlu çoğaltım ürünleri izolatların sırasıyla DON veya NIV

kemotipinin tayinini sağlamaktadır (Jennings ve diğ., 2004). Ancak PZR analizlerinde iki primer çifti ile de *tri7* genine ait çoğaltım ürünlerinin elde edilememiştir. Bu durumun tez çalışmasında kullanılan izolatların genomlarında primer bağlanma bölgelerinin yokluğundan veya bağlanma bölgesindeki varyasyonlardan kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu nedenle bu izolatlar için kemotip tayini aynı gen kümesinde yer alan *tri13* geni hedeflenerek gerçekleştirilmiştir.

DON kemotipindeki izolatlarda, delesyona uğramış üç bölgeden (178, 61 ve 37 bp uzunluğunda) dolayı *tri13* gen anlatımı yapılamamaktadır. NIV kemotipindeki izolatlarda ise tam boyutlu taşınan *tri13* geni işlevseldir. Bu nedenle *tri13* geninin anlatımı yalnızca NIV kemotipindeki bireylerde görülmektedir. DON kemotipi, Chandler ve diğ. (2003) tarafından geliştirilen primerler (Tri13F/Tri13DONR) ile 37 bp'lik delesyonlu fragmenti içeren bölge çoğaltılarak belirlenebilmektedir. Aynı araştırmacıların geliştirdiği Tri13F/Tri13R primer çifti ise genin tam boyutta çoğaltımını hedeflediğinden elde edilen fragment boyutuna göre DON veya NIV olarak kemotip ayırımını sağlamaktadır. Çalışma kapsamında kullanılan 30 yeni örnekten 10'unun (09-1, 14-2, 14-6, 14-7, 15-1, 15-2, 15-4, 17-11, 17-14, 17-16) DON kemotipinde olduğu, Yörük ve Albayrak (2012) tarafından da kullanılan, Tri13F/Tri13DONR primer çiftinin çoğalttığı 282 bp'lik fragment ile gösterilmiştir. Ancak bu izolatlar arasından yetersiz miktarda ürün elde edilen 09-1, 14-6, 15-2, 15-4'te kemotip Tri13F/R primer çifti ile çoğaltılan 799 bp'lik ürünlerin agaroz jelde gözlenmesi ile teyid edilmiştir. Bu primerle 30 izolatın beşinde (14-1, 14-9, 17-5, 17-16 ve 17-17) üretilen 1075 bp'lik fragment, bu izolatların NIV kemotipine sahip olduklarını ortaya koymuştur. Haratian ve diğ. (2008) 57 *F. graminearum* izolatının kemotipini benzer şekilde *tri13* gen bölgesini hedefleyerek belirlemişler, 799 bp ve 1075 bp boyutlu fragmentlerin sırasıyla DON ve NIV kemotipine özgün olduklarını bildirmişlerdir. Yüksek lisans tezi kapsamında *tri13* hedefli kemotip tayini dört izolat (14-4, 14-5, 14-8, 17-12) yapılamamıştır. Bu durumun primer bağlanma bölgelerinde taşınan varyasyonlardan kaynaklanmış olma olasılığı bulunmakla birlikte, izolatların farklı türe (*F. proliferatum*) ait olma olasılığından (bkz. *TEF1α* nukleotid dizilim bulguları) da kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Geriye kalan 12 izolatın alt kemotipi 3-ADON olarak belirlenmiştir. Ancak bu izolatlar için kemotiplendirmenin tez kapsamında yapılmamış olması eksiklik olarak görülmektedir. Çalışmada kapsamına dahil edilen 23 izolatın (Tablo 3.1.b) kemotiplendirmesi Yörük ve Albayrak (2012) tarafından gerçekleştirilmiştir. Haratian ve

diğ. (2008)'nin kullandığı NIV kemotipindeki 25 izolat (Tablo 3.1.c) da yüksek lisans tez çalışması kapsamında hedefli genotiplendirme analizinde kullanılmıştır.

Alt kemotiplendirme için, gen kümesinde yer alan *tri3* geni Jennings ve diğ. (2004)'nin geliştirdiği primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. *tri3* tetrasiklik seskiterpen halkasının C-15 oksijen atomunun esterifikasyonundan sorumlu enzimi kodlamaktadır. 15-ADON alt kemotipindeki izolatlarda bu gen tam boyutlu olarak taşınmaktadır. *tri3* gen bölgesinde meydana gelen delesyonlar genin işlev kaybı ile sonuçlanmakta ve bu durumda 3-ADON kemotipi gözlenmektedir. Üç izolatta (14-6, 14-7, 17-16) çoğaltılan (primer: Tri315F/R) 863 bp boyutlu fragment izolatların 15-ADON alt kemotipine; 15 izolattan çoğaltılan (primer: Tri303F/R) 583 bp boyutlu fragment ise izolatların 3-ADON alt kemotipine sahip olduğunu göstermiştir. Yörük ve diğ. (2016)'den farklı olarak 13 izolatın (bkz. Tablo 3. 1 a'daki 17-kodlu izolatlar) alt kemotiplendirmesi ilk defa bu yüksek lisans tezi kapsamında çalışılmıştır. Kemotip tayini gerçekleştirilememiş dört izolatın (14-4, 14-5, 14-8, 17-12) alt kemotiplerinin de beklendiği şekilde belirlenememesi bu örneklerden null allel eldesi olasılığını dışarıda bırakmıştır. İlginç olarak bu izolatlardan 14-4 ve 14-5 Yörük ve diğ. (2016) tarafından 15-ADON; 14-8 ise 3-ADON olarak bildirilmiştir. Bu çalışma kapsamında Yörük ve diğ. (2016)'den farklı olarak *TEF1α* geni temelli tür tayini analizi gerçekleştirildiğinde bulgular dört izolatın farklı türün (*F. proliferatum*) bireyleri olabileceğini işaret etmiştir. 3-ADON ve 15-ADON tanısı beklendiği şekilde moleküler kemotiplendirmede NIV üretme potansiyeli ortaya konan 4 izolatta (14-1, 14-9, 17-5 ve 17-17) gerçekleştirilememiştir. DON mikotoksinini üretme potansiyeli gösterilmiş 09-1 (*F. culmorum*) ve 17-11 (*F. graminearum*) izolatlarında olası primer bağlanma bölge varyasyonundan dolayı alt kemotip tayini yapılamadığı düşünülmektedir. *TEF1α* sekans bulgusuna göre *F. proliferatum* türü ile yakınlığı saptanan diğer iki izolatta da (14-2 ve 15-2) alt kemotip tayini başarılamamıştır. Tablo 3.1.b'de yer alan 23 izolatın alt kemotipleri Yörük ve Albayrak (2012) tarafından belirlenmiştir.

Tür düzeyinde *F. graminearum* olduğu teyid edilmiş 17-16 izolatının moleküler kemotiplendirme analizlerinden birbirleri ile uyumlu olmayan bulgular elde edilmiştir. PZR analizi ile *tri13* geninin delesyonlu taşındığı agaroz jelde silik bir bant halinde gözlenmiş de olsa bu izolatın DON mikotoksinini üretme kapasitesinde olduğu düşünülmüştür. Yapılan ikinci kemotip tayini *tri13* geninin tam boyda taşındığını bu nedenle bu izolatın kemotipinin NIV olduğunu ortaya koymuştur. Ancak 17-16'nın *tri3* geni hedefli alt kemotip analizi bu genin tam

boyda taşındığını, izolatin 15-ADON pozitif olduğunu ortaya koymuştur. Tür kompleksi üyelerinden oluşan ve yüksek düzeyde genetik çeşitliliğe sahip *F. graminearum* popülasyonlarının klonal olarak uyumlu olan bireyleri arasında meydana gelen paraseksüel rekombinasyon mekanizması heterokaryon oluşumu ile sonuçlanabilmektedir (Busso ve diğ., 2007; Maheshwari, 2012). Kiflerin apikal uçları aracılı füzyonu allelleri identik olarak taşındığında *het* ve *vic* lokusları tarafından kontrol etmektedir ve genetik özellikleri bakımından iki farklı izolatin hifleri füzyonla prototrof hiflerden farklı özellikte yeni bir heterokaryon oluşturabilmektedir (Maheshwari, 2012). 17-16 izolatinın uyumsuz kemotip bulgularının *tri* genleri farklı iki hif arasında meydana gelen paraseksüel rekombinasyondan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Fusarium izolatlarının NX-2 kemotipi, *tri1* geninin çoğaltım ürününün *ApoI* RE ile kesiminden elde edilen fragmentlerin boyut analizine göre belirlenmektedir. Bu kapsamda Liang ve diğ. (2014) *tri1* gen bölgesine ait 1740 bp'lik fragmenti, geliştirdikleri korunmuş *Tri1-F/R* primer çifti ile çoğaltmışlardır. DON kemotipindeki bireylerden çoğalttıkları gen ürününü *ApoI* enzim muamelesine bıraktıklarında kesim sonucunda agaroz jelde 888 bp ve 851 bp boyutunda iki fragmentin ayrıldığını, NX-2 kemotipinde ise 851 bp, 482 bp ve 407 bp boyutlu 3 fragmentin elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu yaklaşım Tablo 3.1.a'da verilen 30 izolatin hedefli NX-2 kemotiplendirmesi için uygulanmış, ancak referans primer çifti ile *tri1* bölgesi etkin olarak çoğaltılamamıştır. Biyoinformatik araçlar kullanılarak genin referans dizisine uygun yeni bir primer çifti (*Tri1F/R*) bu çalışma için tasarlanmış, RE kesim noktalarının çoğaltılacak bölgede yer alması sağlanmıştır. DON kemotipindeki izolatlarda gen bölgesi içinde kesim noktası bulunmayacağından çoğaltım ürün boyutu enzim muamelesi ile değişmeyeceken; NX-2 kemotipindeki örneklerde *ApoI* RE kesimi ile 475 ve 346 bp boyutlu iki fragmentin ayrılması sağlanacaktır. Tez kapsamında *tri1* geni Tablo 3.1.a'da verilen 30 izolatin genomundan bu primer çifti ile çoğaltılmış ve hedeflenen 821 bp boyutlu fragment elde edilmiştir. Tablo 3.1.b'de verilen 23 izolatın ise yalnızca 14F'de çoğaltım ürünü gözlenmiştir. *ApoI* RE muamelesi ile NX-2 kemotipi için beklenen 475 bp ve 346 bp boyutlu kesim ürünleri izolatlardan elde edilememiş, tam boydaki çoğaltım ürünleri izolatların DON kemotipini teyid etmiştir. Restriksiyon polimorfizminin çoğaltım ve kesim temelli olarak belirlenememesi üzerine hedefli genotiplendirme, *tri1* geni etkin olarak çoğaltılan 11 izolat (09-2, 14-6, 14-7, 15-1, 15-2, 15-3, 17-9, 17-11, 17-14, 17-16, 17-19) dizileme temelli olarak gerçekleştirilmiştir. Bu izolatların sekans dizilimleri tek tek taranmış, *tri1* bölgesi içinde taşınan *ApoI* kesim noktası

biyoinformatik araçlar kullanılarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen taramalar sonucunda 17-11'e ait *tri1* sekansında 437. pozisyonda *ApoI* kesim noktasını taşıdığı, bu izolatın NX-2 kemotipinde olabileceği ortaya konmuştur (Şekil 4.8). Bu izolatın NX-2 kemotip teyidi üzerinde çalışma sürdürülmektedir.

Aynı türün izolatlarında trikotesen üretim kapasitesindeki farklılıkların ortaya konması, üretim kapasitesinin (çok ve az üretici) belirlendiği hedefli genotiplendirme çalışmalarını öne çıkarmıştır. Bu çalışma kapsamında da Tablo 3.1.a'da verilen 30 izolatın DON trikotesenini üretme kapasitesi moleküler düzeyde incelenmiştir. Bu amaçla *Tri5* gen kümesinde yer alan *tri5* ve *tri6* genleri arasındaki bölgenin analizi hedeflenmiştir. İntergenik bölgede meydana gelen varyasyonların DON üretim miktarını etkileyebildiği, bu nedenle de az ve çok DON üreticilerinin hedefli olarak seçilebildiği ortaya konmuştur. Bakan ve diğ. (2002) tasarlamış oldukları özgün primerlerle (N1-2/N1-2R) çoğalttıkları 200 bç boyutlu fragmentleri yüksek miktarda DON üreticilerini seçmede; benzer şekilde 3551/4056 primer çifti ile elde ettikleri 650 bç'lik ürünleri de az miktarda DON üreticilerini belirlemede kullanmışlardır. Aynı çalışmada bazı NIV üreticilerinin az miktarda DON mikotoksinini de üretme kapasitesine sahip olabileceklerini az üreticilerin belirlenmesini sağlayan primerlerle ortaya koymuşlardır. Yörük ve diğ. (2016) çeşitli *Fusarium* türlerinde DON mikotoksininin az ve çok üreticilerini bu yaklaşımla belirlemişlerdir. Yüksek lisans tez çalışması kapsamında da Tablo 3.1.a'da yer alan 17- kodlu 13 izolat ilk defa bu çalışma kapsamında taranmış ve 11 izolatın DON üretimi bakımından çok üretici grubunda yer aldığı ortaya konmuştur. Yörük ve diğ. (2016) ile ortak analiz edilen Tablo 3.1.a'da yer alan 17 izolattan 12'sinin üretim kapasiteleri bakımından çok üretici oldukları teyid edilmiştir. Tablo 3.1.a'da yer alan 30 izolattan birinin (NIV kemotipindeki *F. culmorum* 14-1) 3551/4056 primer çifti ile 525 bç'lik çoğaltım ürünü vermesi ile az üretici olduğu belirlenmiştir. Biri *F. culmorum* 14-9, *F. proliferatum* türüne yakın olan beş izolatta (14-4, 14-5, 17-12 ve 17-17) mikotoksin üretme kapasitesi çoğaltım temelli olarak tayin edilememiştir. Altı izolattan çoğaltımın sağlanamaması *tri5-tri6* intergenik bölgesinde delesyon taşındığını düşündürmüştür. Bakan ve diğ. (2002) 3551/4056 primer çifti ile çoğaltılan ürün boyutunu 650 bç olarak belirtmişler ve bu izolatları DON trikoteseninin az üreticileri olarak tanımlamışlardır. Ancak Quarta ve diğ. (2005) gerçekleştirdikleri benzer çalışmalarında 525 bç boyutundaki çoğaltım ürününün az miktardaki DON üreticileri ile ilişkili olmadığını tam tersine NIV üreticilerinin belirlenmesini sağladığını savunmuşlardır. 3551/4056 primer çifti ile 525 bç'lik bölgenin çoğaltıldığı 14-1 izolatının *tri13* geni hedefli kemotiplendirmesi

NIV üreticisi olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgu Quarta ve diğ. (2005)'nin çalışmalarından elde ettikleri ile paralellik göstermektedir. Bununla birlikte, *tri13* geninin çoğaltımı ile NIV kemotipinde olduğu belirlenmiş 2 örnek (17-5 ve 17-16) ise bu çalışmada N1-2/N1-2R primer çifti ile çok miktarda DON üreticisi çoğaltım ürünü vermiştir. Yörük ve Albayrak (2012) tarafından 3-ADON alt kemotipinde olduğu belirlenmiş 23 örnekten (Tablo 3.1.b) 22'sinde N1-2/N1-2R primer çifti ile 200 bç'lik çoğaltım ürün elde edilerek Yörük ve diğ. (2016) ile paralel bulgular elde edilmiş ve bu izolatların çok üretici olduğu moleküler seviyede gösterilmiştir. Bir izolat (FgSh7) ise iki primer çifti ile de çoğaltım ürünü vermemiştir. Haratian ve diğ. (2008) tarafından NIV kemotipinde olduğu belirlenmiş 25 izolatta (Tablo 3.1.c) az üretici 3551/4056 primer çifti ile gerçekleştirilen PZR analizinden ise sonuç alınamamıştır.

Gerçekleştirilen tez çalışması ile *Fusarium* izolatlarının tamamının fungal tanısı yapılmıştır. İzolatların tür tanımları hem gen bölge hedefli çoğaltım hem de çoğaltım ürünlerine ait dizi analizlerinin veri tabanında bulunan referans diziler ile hizalanmasıyla elde edilmiştir. Dizi analizleri sonucunda morfolojik kriterler ışığında tür tayini gerçekleştirilmiş izolatların moleküler düzeyde yapılan taraması, bazı izolatların tür düzeyinde tanımlarında morfolojik tayinden farklı bulgularla sonuçlanmıştır. Bu durum moleküler yaklaşımların tanımlama çalışmalarındaki önemini ortaya koymuştur. Kemotip tayinlerinin sağlanması amacıyla gerçekleştirilen gen bölgesi hedefli analizlerde ise bazı izolatlarda çoğaltım ürünü elde edilememiştir. Bu durum gen bölgelerindeki polimorfizm kaynaklı primer bağlanma bölgelerindeki varyasyonlar ile ilişkilendirilmiştir ve tür içi çeşitliliğin varlığını ortaya koymuştur. Benzer şekilde bir izolatta kemotip tayini analizlerinde farklı kemotiplere dair çoğaltım ürünleri elde edilmiş olması, izolatlarda hifler aracılı paraseksüel rekombinasyonun meydana gelmiş olma ihtimalini ortaya koymuştur. Hedefli genotip analizi kapsamında çoğaltımı sağlanan gen bölgesinin biyoinformatik analizinde bir örnekte hedeflenen kesim noktası saptanmıştır. Örneğe ait bu kesim profili, ülkemizden daha önce bildirimi gerçekleşmemiş NX-2 kemotipinin varlığına yönelik bulgu niteliği taşımaktadır. Bu kesim noktasının varlığının moleküler düzeyde de kanıtlanmasına yönelik çalışmalar sürdürülmektedir. Hedefli genotip analizi altında gerçekleştirilen mikotoksin üretim kapasitesinin belirlenmesine yönelik moleküler taramada ise izolatların büyük çoğunluğunun çok üretici oldukları belirlenmiştir. Gerçekleştirilen kemotiplendirme çalışmaları izolatların mikotoksin üretimleri temelli coğrafi dağılım profillerini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, üretim kapasitesine dair analizlerinden elde edilen yüksek üretici bulguları bu izolatların hem

tarımsal açıdan hem de insan ve hayvan sağığı açısından ciddi risk faktörü oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Çalışma sonucunda elde edilen bulguların, *Fusarium* izolatlarında hem tür içi hem de türler arası genetik ilişkinin tayinine yönelik literatüre ciddi katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Çalışma bulgularının, farklı coğrafi bölgelerde hastalık etmeni olan bu izolatlar arasındaki çeşitliliğe ve evrimsel süreçlere dair moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında temel niteliğı taşıdığı düşünülmektedir. Genotiplendirme çalışmaları ile *Fusarium* izolatlarının patojenitesine dair belirli moleküler bulgular ortaya konmuştur. Bu bulgular organizma ile mücadele ve organizmanın neden olduğu hastalıkların engellenmesine yönelik gelecek çalışmalara temel sağlayıcı niteliktedir.



KAYNAKLAR

- Alexander, N. J., McCormick, S. P., Waalwijk, C., Theo V. L., Proctor, R. H., 2011, The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*, *Fungal Genetics and Biology*, 48(5), 485-495.
- Bakan, B., Giraud-Delville, C., Pinson, L., Richard-Molard, D., Fournier, E., Brygoo, Y., 2002, Identification by PCR of *Fusarium culmorum* strains producing large and small amounts of deoxynivalenol, *Applied Environmental Microbiology*, 68(11), 5472-5479.
- Barik, B.P. ve Tayung, K., 2012, Molecular differentiation of *Fusarium* spp. with varied lifestyles based on TEF 1 alpha gene sequence analysis, *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 4(3), 201-8.
- Berardo, N., Pisacane, V., Battilani, P., Scandolara, A., Pietri, A., Marocco, A., 2005, Rapid detection of kernel rots and mycotoxins in maize by near-infrared reflectance spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8128-8134.
- Bertuzzi, T., Rastelli, S., Mulazzi, A., Donadini, G., Pietri, A., 2011, Mycotoxin occurrence in beer produced in several European countries, *Food Control*, 22(12), 2059-2064.
- Bolduan, C. Montes, J.M., Dhillon, B.S., Mirdita V., Melchinger A.E., 2009, Determination of mycotoxin concentration by ELISA and near-infrared spectroscopy in *Fusarium*-inoculated maize, *Cereal Research Communications*, 37(4), 521-529.
- Brandfass, C. ve Karlovsky, P., 2008, Simultaneous detection of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in plant material by duplex PCR with melting curve analysis, *BMC Microbiology*, 23(6).
- Brown, D. W. McCormick, S. P., Alexander, N. J., Proctor, R. H., Desjardins, A. E., 2001, A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*, *Fungal Genetics and Biology*, 32(2), 121-133.
- Brown, D. W., McCormick, S. P., Alexander, N. J., Proctor, R. H., Desjardins, A. E., 2002, Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species, *Fungal Genetics and Biology*, 36(3), 224-233.
- Brown, D. W. Proctor, R.H., Dyer, R.B., Plattner, R.D., 2003, Characterization of a *Fusarium* 2-Gene Cluster Involved in Trichothecene C-8 Modification, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7936-7944.
- Brown, D. W., Proctor, R. H., Dyer, R. B., Plattner, R. D., 2004, Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster, *Fungal Genetics and Biology*, 41(4), 454-462.

- Busso, C., Kaneshima, E.N., de Assis Franco, F., Querol, C.B., Alves de Castro-Prado, M. A., 2007, Vegetative compatibility and molecular characterization of *Fusarium graminearum* isolates from the State of Paraná, Brazil, *Ciência Rural*, 37(6), 1813-1816.
- Chandler, E. A., Simpson, D. R., Thomsett, M. A., Nicholson, P., 2003, Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62(6), 355-367.
- Cuomo C.A., Gldener U, Xu J.R., Trail F., Turgeon B.G., Di Pietro A., Adam G., 2007, The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science*, 317(5843), 1400-1402.
- Doyle J.J., Doyle J.L, 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochemical Bullutein*, 19, 11-15.
- Desjardins, A. E., Hohn, T. M. and McCormick, S. P., 1993, Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: Chemistry, genetics, and significance, *Microbiological Reviews*, 57(3), 595-604.
- Foroud, N. A. ve Eudes, F., 2016, Solvent and water mediated structural variations in deoxynivalenol and their potential implications on the disruption of ribosomal function, Trichothecenes in cereal grains. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 147-173.
- Geiser D. M., Jimenez-Gasco M. M., Kang S., Makalowska I, Veeraraghavan N., Ward T. J., Zhang N., Kuldau G. A., O'Donnell K., 2004, FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*, *European Journal of Plant Pathology*, 110, 473-479.
- Gerlach, W., Nirenberg, H., 1982, *The genus Fusarium, a pictorial atlas*, Kommissions Paul Parey, Berlin-Hamburg, ISBN: 0067-5849.
- Haratian, M., Sharifnabi, B., Alizadeh, A., Safaie, N., 2008, PCR analysis of the *tri13* gene to determine the genetic potential of *Fusarium graminearum* isolates from Iran to produce nivalenol and deoxynivalenol, *Mycopathologia*, 166(2), 109-116.
- Haschek, W. M. ve Beasley V. R., 2009, *Trichothecene Mycotoxins*, Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents, In: Gupta, R. C. (ed.), Chapter 26, Elsevier, ISBN: 9780128004944, 353-369.
- Haynes, K.A., Westerneng, T.J., Fell, J.W., Moens, W., 1995, Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA, *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 33(5), 319-325
- Ismail, A. A. ve Papenbrock, J., 2015, Mycotoxins: Producing fungi and mechanisms of phytotoxicity, *Agriculture*, 5(3), 493-537.
- Jennings, P, Coates, M. E., Turner, J. A., Chandler, E. A., Nicholson, P., 2004, Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay, *Molecular Plant Pathology*, 182-190.

- Johannsen, W., 1911, The genotype conception of heredity, *The American Naturalist*, 45(531), 129-159.
- Kelly, A., Proctor, R. H., Belzile, F., Chulze, S. N., Clear, R.M., Cowger, C., Elmer, W., Lee, T., Obanor, F., Waalwijk, C., Ward, T. J., 2016, The geographic distribution and complex evolutionary history of the NX-2 trichothecene chemotype from *Fusarium graminearum*, *Fungal Genetics and Biology*, 95, 39-48.
- Kimura, M., Matsumoto, G., Shingu, Y., Yoneyama, K., Yamaguchi, I., 1998, The mystery of the trichothecene 3-O-acetyltransferase gene. Analysis of the region around *Tri101* and characterization of its homologue from *Fusarium sporotrichioides*, *FEBS Letters*, 435(2-3), 163-168.
- Kimura, M. Tokai, T., O'Donnell, K., Ward, T. J., Fujimura, M., Hamamoto, H., Shibata, T., Yamaguchi, I., 2003, The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes, *FEBS Letters*, 539(1-3), 105-110.
- Kimura, M. Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., Fujimura, M., 2007, Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: Pathways, genes, and evolution, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71(9), 2105-2123.
- Koncz, Z.S., Huszti, K., Naar, Z., Kiss, A., Szecsi, A., 2008, PCR identification of *Fusarium graminearum* isolated from wheat grain, *Cereal Research Communications*, 36(4), 623-630.
- Lee, T., Oh, D.W., Kim, H.S., Lee, J., Kim, Y.H., Yun, S.H., Lee, Y.W., 2001, Identification of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR, *Applied Environmental Microbiology*, 67(7), 2966-2972.
- Lee, T., Han Y. K., Kim K.H., Yun S.H., Lee, Y.W., 2002, *Tri13* and *tri7* determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*, *Applied Environmental Microbiology*, 68(5), 2148-2154.
- Liang, J.M., Xayamongkhon, H., Broz, K., Dong, Y., McCormick, S.P., Abramova, S., Ward, T.J., Ma, Z.H., Kistler, H.C., 2014, Temporal dynamics and population genetic structure of *Fusarium graminearum* in the upper Midwestern United States, *Fungal Genetics and Biology*, 73, 83-92.
- Lofgren, L. Riddle, J., Dong, Y., Kuhnem, P. R., Cummings, J. A., Del Ponte, E. M., Bergstrom, G. C., Kistler, H. C., 2018, A high proportion of NX-2 genotype strains are found among *Fusarium graminearum* isolates from northeastern New York State, *European Journal of Plant Pathology*, 150(3), 791-796.
- Maheshwari, R., 2012, *Species: their diversity and populations*, Fungi Experimental Methods in Biology, In: Bennett, J.W. (ed.), Chapter 15, CRC Press ISBN: 9780429106521, 267-283.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, ISBN: 0-87969-136-0.

- McCormick, S. P., Alexander, N. J., Trapp, S. E., Hohn, T.M., 1999, Disruption of TRI101, the gene encoding trichothecene 3-O- acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichioides*, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5252-5256.
- Mccormick, S. P. ve Alexander, N. J., 2002, *Fusarium Tri8* encodes a trichothecene C-3 esterase, *Applied Environmental Microbiology*, 68(6), 2959-2964.
- McCormick, S. P., Alexander, N. J. ve Proctor, R. H., 2006, Heterologous expression of two trichothecene P450 genes in *Fusarium verticillioides*, *Canadian Journal of Microbiology*, 52(3), 220-226.
- McCormick, S. P., Stanley, A. M., Stover, N. A., Alexander N. J., 2011, Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins, *Toxins*, 3(7), 802-814.
- Meek, I. B., Peplow, A. W., Ake, C., Phillips, T. D., Beremand, M. N., 2003, *Tri1* encodes the cytochrome P450 monooxygenase for C-8 hydroxylation during trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides* and resides upstream of another new *tri* gene, *Mycology*, 69(3), 1607-1613.
- Meng, Y. Hao J., Mayfield D., Luo L., Munkvold G.P., Li J., 2017, Roles of genotype-determined mycotoxins in maize seedling blight caused by *Fusarium graminearum*, *Plant Disease*, 101(7), 1103-1112.
- 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(3), 129-139.
- Moretti, A., 2009, Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and splitters, *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, (117), 7-13.
- Mugrabi de Kuppler, A. L., Steiner U., Sulyok M., Krska R., Oerke E.C., 2011, Genotyping and phenotyping of *Fusarium graminearum* isolates from Germany related to their mycotoxin biosynthesis, *International Journal of Food Microbiology*, 151(1), 78-86.
- Nelson, P. ., Dignani, M., Anaissie, E., 1994, Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species, *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4), 479-504.
- Nielsen, K. F., Gravesen, S., Nielsen, P. A., Andersen, B. Thranei, U., Frisvadi, J. C. 1999, Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials, *Mycopathologia*, 145, 43-56.
- Niessen, L., 2007, PCR-Based diagnosis and quantification of mycotoxin-producing fungi, *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2), 38-46.
- Nirmaladevi, D., Venkataramana, M., Srivastava, R. K., Uppalapati, S. R., Gupta, V. K., Yli-Mattila, T., Clement Tsui, K. M., Srinivas, C., Niranjana, S. R., Chandra, N. S., 2016, Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Scientific Reports*, 1-14.

- O'donnell K., Kistler H. C., Cigelnik, E., Ploetz, R.C., 1998, Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies, *Applied Biological Sciences*, 95, 2044–2049.
- Olcer, Z., Esen, E., Muhammad, T., Ersoy, A., Budak, S., Uludag, Y., 2014, Fast and sensitive detection of mycotoxins in wheat using microfluidics based real-time electrochemical profiling, *Biosensors and Bioelectronics*, 62, 163-169.
- Peplow, A. W., Meek, I. B., Wiles, M. C., Phillips, T. D., Beremand, M. N., 2003, *Tri16* is required for esterification of position C-8 during trichothecene mycotoxin production by *Fusarium sporotrichioides*, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 5935-5940.
- Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Frasse, P., Barreau, C., Cahagnier, B., Richard-Molard, D., Bakan, B., 2008, Magnesium represses trichothecene biosynthesis and modulates *Tri5*, *Tri6*, and *Tri12* genes expression in *Fusarium graminearum*, *Mycopathologia*, 165(1), 51-59.
- Roger A.J., Sandblom O., Doolittle W.F., Philippe H., 1999, An evaluation of elongation factor 1 alpha as a phylogenetic marker for eukaryotes, *Molecular Biology and Evolution*, 16(2), 218-33.
- Quarta, A. Mita, G., Haidukowski, M., Santino, A., Mulè, G., Visconti, A., 2005, Assessment of trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* occurring in Europe, *Food Additives and Contaminants*, 22(4), 309-315.
- Sabuncuoğlu, S. A., Baydar, T., Giray, B., Şahin, G., 2008, Mikotoksinler: toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması, *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 28(1) 63-92.
- Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M., Migheli, Q., 2013, *Fusarium culmorum*: Causal agent of foot and root rot and head blight on wheat, *Molecular Plant Pathology*, 14(4), 323-341.
- Schilling, A. G., Möller, E. M., Geiger, H. H., 1996, Polymerase chain reaction based assays for species specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*, *Molecular Plant Pathology*, 86(5), 515-522 .
- Tunali, B., Ozseven, I. , Buyuk, O., Erdurmus, D., 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 *F. culmorum*, *Plant Pathology Journal*, 5(2), 150-156.
- Urban, M., King, R., Andongabo, A., Maheswar, U., Pedro, H., Kersey, P., Hammond-Kosack, K., 2016, First draft genome sequence of a UK Strain (UK99) of *Fusarium culmorum*, *Genome Announcements*, 4(5).
- Varga, E., Wiesenberger, G., Hametner, C., Ward, T. J., Dong, Y., Schöfbeck, D., McCormick, S., Broz, K., Stücker, R., Schuhmacher, R., Krska, R., Kistler, H. C., Berthiller, F., Adam

- G., 2015, New tricks of an old enemy: Isolates of *Fusarium graminearum* produce a type A trichothecene mycotoxin, *Environmental Microbiology*, 17(8), 2588-2600.
- Waalwijk, C. Taga, M., Zheng, S. L., Proctor, R. H., Vaughan, M., O'Donnell, K., 2018, Karyotype evolution in *Fusarium*, *IMA Fungus*, 9(1), 13-33.
- Ward T.J., Bielawski, J.P., Kistler H.C., Sullivan, E., O'Donnell, K., 2002, Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(14), 9278–9283.
- Wu Z., Wang X.R., Blomquist G., 2002, Evaluation of PCR primers and PCR conditions for specific detection of common airborne fungi, *Journal of Environmental Monitoring*, 4(3), 377-382.
- Yli-Mattila, T., 2010, Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in northern europe and asia, *Journal of Plant Pathology*, 92(1), 7-18.
- Yörük, E. ve Albayrak, G., 2012, Chemotyping of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* Isolates from Turkey by PCR Assay, *Mycopathologia*, 173(1), 53-61.
- Yörük E, Tunali, 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*, 16(10), 101-108.
- Yörük, E. ve Yli-Mattila, T., 2019, Class B-trichothecene profiles of *Fusarium* species as causal agents of head blight, *Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology*, Elsevier, 347-376.

EKLER

EK 1. 13 izolatta *TEF1α* sekansının referans *F. proliferatum* *TEF1α* dizisi ile hizalama bulguları.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

17-12      GCTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCAAGTGC GGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAG
17-15      GCTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCAAGTGC GGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAG
17-5       GCTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCAAGTGC GGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAG
15-2       GCTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCAAGTGC GGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAG
14-8       GCTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCAAGTGC GGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAG
15-4       GCTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCAAGTGC GGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAG
14-5       GCTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCAAGTGC GGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAG
17-17      GCTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCAAGTGC GGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAG
09-01      GCTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCAAGTGC GGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAG
17-18      GCTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCAAGTGC GGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAG
LT970774.1_11-672 GCTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCAAGTGC GGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAG
14-2       GCTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCAAGTGC GGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAG
14-4       GCTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCAAGTGC GGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAG
10-2       GCTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCAAGTGC GGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAG
*****

17-12      AAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCTTCGATCGCGCGTCCCTGCCCCACCGATTTCAC
17-15      AAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCTTCGATCGCGCGTCCCTGCCCCACCGATTTCAC
17-5       AAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCTTCGATCGCGCGTCCCTGCCCCACCGATTTCAC
15-2       AAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCTTCGATCGCGCGTCCCTGCCCCACCGATTTCAC
14-8       AAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCTTCGATCGCGCGTCCCTGCCCCACCGATTTCAC
15-4       AAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCTTCGATCGCGCGTCCCTGCCCCACCGATTTCAC
14-5       AAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCTTCGATCGCGCGTCCCTGCCCCACCGATTTCAC
17-17      AAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCTTCGATCGCGCGTCCCTGCCCCACCGATTTCAC
09-01      AAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCTTCGATCGCGCGTCCCTGCCCCACCGATTTCAC
17-18      AAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCTTCGATCGCGCGTCCCTGCCCCACCGATTTCAC
LT970774.1_11-672 AAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCTTCGATCGCGCGTCCCTGCCCCACCGATTTCAC
14-2       AAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCTTCGATCGCGCGTCCCTGCCCCACCGATTTCAC
14-4       AAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCTTCGATCGCGCGTCCCTGCCCCACCGATTTCAC
10-2       AAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCTTCGATCGCGCGTCCCTGCCCCACCGATTTCAC
*****

17-12      TTGCGATTTCGAAACGTGCCTGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAAATTTTGCATATGACCGT
17-15      TTGCGATTTCGAAACGTGCCTGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAAATTTTGCATATGACCGT
17-5       TTGCGATTTCGAAACGTGCCTGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAAATTTTGCATATGACCGT
15-2       TTGCGATTTCGAAACGTGCCTGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAAATTTTGCATATGACCGT
14-8       TTGCGATTTCGAAACGTGCCTGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAAATTTTGCATATGACCGT
15-4       TTGCGATTTCGAAACGTGCCTGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAAATTTTGCATATGACCGT
14-5       TTGCGATTTCGAAACGTGCCTGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAAATTTTGCATATGACCGT
17-17      TTGCGATTTCGAAACGTGCCTGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAAATTTTGCATATGACCGT
09-01      TTGCGATTTCGAAACGTGCCTGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAAATTTTGCATATGACCGT
17-18      TTGCGATTTCGAAACGTGCCTGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAAATTTTGCATATGACCGT
LT970774.1_11-672 TTGCGATTTCGAAACGTGCCTGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAAATTTTGCATATGACCGT
14-2       TTGCGATTTCGAAACGTGCCTGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAAATTTTGCATATGACCGT
14-4       TTGCGATTTCGAAACGTGCCTGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAAATTTTGCATATGACCGT
10-2       TTGCGATTTCGAAACGTGCCTGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAAATTTTGCATATGACCGT
*****

17-12      AATTTT TTTGGTGGGGCATTATACCCCGCCACTCGAGCGATGGGCGCGTTTTTGCCTTTTC
17-15      AATTTT TTTGGTGGGGCATTATACCCCGCCACTCGAGCGATGGGCGCGTTTTTGCCTTTTC
17-5       AATTTT TTTGGTGGGGCATTATACCCCGCCACTCGAGCGATGGGCGCGTTTTTGCCTTTTC
15-2      AATTTT TTTGGTGGGGCATTATACCCCGCCACTCGAGCGATGGGCGCGTTTTTGCCTTTTC
14-8      AATTTT TT-GGTGGGGCATTATACCCCGCCACTCGAGCGATGAGCGCGTTTTTGCCTTTTC
15-4      AATTTT TT-GGTGGGGCATTATACCCCGCCACTCGAGCGATGAGCGCGTTTTTGCCTTTTC
14-5      AATTTT TT-GGTGGGGCATTATACCCCGCCACTCGAGCGATGAGCGCGTTTTTGCCTTTTC
17-17     AATTTT TTTGGTGGGGCATTATACCCCGCCACTCGAGCGATGGGCGCGTTTTTGCCTTTTC
09-01     AATTTT TTTGGTGGGGCATTATACCCCGCCACTCGAGCGATGGGCGCGTTTTTGCCTTTTC
17-18     AATTTT TTTGGTGGGGCATTATACCCCGCCACTCGAGCGATGGGCGCGTTTTTGCCTTTTC
LT970774.1_11-672 AATTTT TTTGGTGGGGCATTATACCCCGCCACTCGAGCGATGGGCGCGTTTTTGCCTTTTC
14-2      AATTTT TT-GGTGGGGCATTATACCCCGCCACTCGAGCGATGAGCGCGTTTTTGCCTTTTC
14-4      AATTTT TT-GGTGGGGCATTATACCCCGCCACTCGAGCGATGAGCGCGTTTTTGCCTTTTC
10-2      AATTTT TT-GGTGGGGCATTATACCCCGCCACTCGAGCGATGAGCGCGTTTTTGCCTTTTC
*****

```

EK 2. *TEF1 α* sekansının referans *F. oxysporum* ile hizalama bulgusu.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

MK059958.1      GTCTGAGTGATATGTTAGTACGAAAGAGAAGTAGAATGAAGCATGAGCGACAACATACCAA
17-19           GTCTGAGTGATATGTTAGTACGAAAGAGAAGTAGAATGAAGCATGAGCGACAACATACCAA
*****

MK059958.1      TGACGGTGACATAGTAGCGAGGAGTCTCGAACTTCAGAGAGCAATATCGATGGTGATAC
17-19           TGACGGTGACATAGTAGCGAGGAGTCTCGAACTTCAGAGAGCAATATCGATGGTGATAC
*****

MK059958.1      CACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCAGGCCTACTTGAAGGAACCCCTTAC
17-19           CACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCAGGCCTACTTGAAGGAACCCCTTAC
*****

MK059958.1      CGAGCTCAGCGGCTTCCTATTGTTGAATGGTTAGT GACTGCTTGACACGTGACGACGCAC
17-19           CGAGCTCAGCGGCTTCCTATTGTTGAATGGTTAGT GACTGCTTGACACGTGACGACGCAC
*****

MK059958.1      TCATTGAGGTTGTGAGAATGGTTAAGAGGGCAAACGCTCCCGTCGCTCAAGTGGCGGGGT
17-19           TCATTGAGGTTGTGAGAATGGTTAAGAGGGCAAACGCTCCCGTCGCTCAAGTGGCGGGGT
*****

MK059958.1      AAGTGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATTGCAAAATTTTGGTCTCGAGCGGGGTA
17-19           AAGTGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATTGCAAAATTTTGGTCTCGAGCGGGGTA
*****

MK059958.1      GCGGGCACATTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCGATGGGCAAAGGACGCGCGATCGAAGGGAA
17-19           GCGGGCACATTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCGATGGGCAAAGGACGCGCGATCGAAGGGAA
*****

MK059958.1      AGTGACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTCGATACCACCGCACTGGTAGA
17-19           AGTGACTAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTCGATACCACCGCACTGGTAGA
*****

MK059958.1      TCAAGTGACCGGTCGTGAAACGATGTCAGTATGTTGACTTTGAGAAATACCCACCAGG
17-19           TCAAGTGACCGGTCGTGAAACGATGTCAGTATGTTGACTTTGAGAAATACCCACCAGG
*****

MK059958.1      TCTTGGTCGGGATTGACGATGGCAGATAAGCTCATTGTCGAGGAGAGTACTCACAGTGGT
17-19           TCTTGGTCGGGATTGACGATGGCAGATAAGCTCATTGTCGAGGAGAGTACTCACAGTGGT
*****

MK059958.1      CGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAGGTGAGTCTTGTCTCTCTT
17-19           CGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCCGATGACGACGACGTTAAGGTGAGTCTTGTCTCTCTT
*****

```

EK 3. İzolatların trikotesen mikotoksini üretim profili tablosu.

Kod	Tür	Trikotesen Mikotoksini Üretim Profili					
		B tipi					A tipi
		Kemotip		Alt Kemotip		ÜK	NX-2
		NIV	DON	3-ADON	15-ADON		
09-1	<i>F. culmorum</i>		+	-	-	Ç	x
09-2	<i>F. proliferatum</i>			+		Ç	x
10-2	<i>F. proliferatum</i>			+	-	Ç	x
12-1	<i>F. culmorum</i>			+		Ç	x
14-1	<i>F. culmorum</i>	+		-	-	A	x
14-2	<i>F. proliferatum</i>		+	-	-	Ç	x
14-3	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	x
14-4	<i>F. proliferatum</i>			-	-	-	x
14-5	<i>F. proliferatum</i>			-	-	-	x
14-6	<i>F. graminearum</i>		+	-	+	Ç	x
14-7	<i>F. graminearum</i>		+	-	+	Ç	x
14-8	<i>F. proliferatum</i>			-	-	-	x
14-9	<i>F. culmorum</i>	+		-		-	x
15-1	<i>F. culmorum</i>			+		Ç	x
15-2	<i>F. proliferatum</i>		+	-	-	Ç	x
15-3	<i>F. culmorum</i>			+		Ç	x
15-4	<i>F. proliferatum</i>		+	+	-	Ç	x
17-5	<i>F. proliferatum</i>	+		-	-	Ç	x
17-6	<i>F. culmorum</i>			+		Ç	x
17-7	<i>F. culmorum</i>			+		Ç	x
17-8	<i>F. culmorum</i>			+		Ç	x
17-9	<i>F. graminearum</i>			+		Ç	x
17-11	<i>F. graminearum</i>		+	-	-	Ç	x
17-12	<i>F. proliferatum</i>			-	-	-	x
17-14	<i>F. graminearum</i>		+	+		Ç	x
17-15	<i>F. proliferatum</i>			+	-	Ç	x
17-16	<i>F. graminearum</i>	+		-	+	Ç	x
17-17	<i>F. proliferatum</i>	+		-	-	-	x
17-18	<i>F. proliferatum</i>			+	-	Ç	x
17-19	<i>F. oxysporum</i>			+	-	Ç	x
F1	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
F2	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
F3	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
F4	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
F10	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
F12	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
F14	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
F16	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
F17	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
F19	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
F20	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
F21	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
F24	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
8F	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
10F	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
11F	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
12F	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
13F	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
14F	<i>F. graminearum</i>		+	+		Ç	x

EK 3 Devam: İzolatların trikotesen mikotoksini üretim profili tablosu.

20F	<i>F. culmorum</i>		+	+		Ç	-
FgSh7	<i>F. graminearum</i>		+	+		-	-
FgSh14	<i>F. graminearum</i>		+	+		Ç	-
FgSh15	<i>F. graminearum</i>		+	+		Ç	-
FgM1	<i>F. graminearum</i>	+				*	
FgM3	<i>F. graminearum</i>	+				*	
FgM5	<i>F. graminearum</i>	+				*	
FgM6	<i>F. graminearum</i>	+				*	
FgM7	<i>F. graminearum</i>	+				*	
FgM9	<i>F. graminearum</i>	+				*	
FgM10	<i>F. graminearum</i>	+				*	
Fg4	<i>F. graminearum</i>	+				*	
Fg5	<i>F. graminearum</i>	+				*	
Fg18	<i>F. graminearum</i>	+				*	
Fg56	<i>F. graminearum</i>	+				*	
Fg165	<i>F. graminearum</i>	+				*	
Fg170	<i>F. graminearum</i>	+				*	
Fg174	<i>F. graminearum</i>	+				*	
FgSh4	<i>F. graminearum</i>	+				*	
FgSh5	<i>F. graminearum</i>	+				*	
FgSh10	<i>F. graminearum</i>	+				*	
FgT2	<i>F. graminearum</i>	+				*	
FgT3	<i>F. graminearum</i>	+				*	
FgT7	<i>F. graminearum</i>	+				*	
FgT9	<i>F. graminearum</i>	+				*	
FgT10	<i>F. graminearum</i>	+				*	
FgT11	<i>F. graminearum</i>	+				*	
FgT12	<i>F. graminearum</i>	+				*	
FgT16	<i>F. graminearum</i>	+				*	

ÜK: Trikotesen üretim kapasitesi

Ç: N1-2/N1-2R primer çifti ile *tri5-tri6* intergenik bölgenin çoğaltımı ile 200 bç'lik çoğaltım ürünü vererek trikotesen üretim kapasitesi açısından çok üretici olduğu belirlenen izolatlar

A: 4056/3551 primer çifti ile *tri5-tri6* intergenik bölgenin çoğaltımı ile 525 bç'lik çoğaltım ürünü vererek trikotesen üretim kapasitesi açısından az üretici olduğu belirlenen izolatlar

*: NIV kemotipindeki bireylerde trikotesen üretim kapasitesi açısından az üretim yaptığını belirleyici 4056/3551 primer çifti ile PZR gerçekleştirildi. Beklenen 525 bç boyutlu çoğaltım fragmentleri agaroz jel elektroforezinde gözlenmedi.

x: *tri1* geninin TRI1F/R primer çifti ile çoğaltımı sonucunda elde edilen 800 bç'lik fragmentlerin *ApoI* ile kesimi sonucunda NX-2'ya ait kesim profili elde edilememiş izolatlar

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Gülin İnci VAROL
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	18.09.1991
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	0552 497 5397
E-Posta Adresi	gulin.varol@istanbul.edu.tr
Web Adresi	-



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Orta Doğu Teknik Üniversitesi
Fakülte	Fen ve Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	01.02.2016

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	
Gazdağlı A., Sefer O., Yörük E., Varol G.İ., Teker T., Albayrak G., "Investigation of Camphor Effects on <i>Fusarium graminearum</i> and <i>F. culmorum</i> at Different Molecular Levels", <i>Pathogens</i> , vol.7, 2018.	
Gazdağlı A., Sefer Ö., Yörük E., Varol G.İ., Albayrak G., "Investigation on the terpinolene effects in <i>Fusarium graminearum</i> and <i>F. culmorum</i> (at different molecular levels)", <i>Academic Studies In Science and Mathematics</i> , Aina A. T., Demirçalı A., Ed., Gece Kitaplığı, Ankara, ss.33-42, 2018.	