

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**ANTALYA DOMATES ÜRETİM ALANLARINDAN İZOLE EDİLEN
FUSARIUM İZOLATLARININ GENOTİPİK VE FENOTİPİK
KARAKTERİZASYONU**

**Gülşen ERBERK
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

AĞUSTOS 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



ANTALYA DOMATES ÜRETİM ALANLARINDAN İZOLE EDİLEN
FUSARIUM İZOLATLARININ GENOTİPİK VE FENOTİPİK
KARAKTERİZASYONU

Gülşen ERBERK
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

AĞUSTOS 2020

ANTALYA

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

**ANTALYA DOMATES ÜRETİM ALANLARINDAN İZOLE EDİLEN
FUSARIUM İZOLATLARININ GENOTİPİK VE FENOTİPİK
KARAKTERİZASYONU**

**Gülşen ERBERK
BİTKİ KORUMA
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2019-4945 nolu proje ile desteklenmiştir.**

AĞUSTOS 2020

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTALYA DOMATES ÜRETİM ALANLARINDAN İZOLE EDİLEN
***FUSARIUM* İZOLATLARININ GENOTİPİK VE FENOTİPİK**
KARAKTERİZASYONU

Gülşen ERBERK
BİTKİ KORUMA
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 17/08/2020 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Özer ÇALIŞ (Danışman)

Doç. Dr. Şerife Evrim ARICI

Doç. Dr. Hakan FİDAN

ÖZET

ANTALYA DOMATES ÜRETİM ALANLARINDAN İZOLE EDİLEN *FUSARIUM* İZOLATLARININ GENOTİPİK VE FENOTİPİK KARAKTERİZASYONU

Gülşen ERBERK

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Ağustos 2020; 59 sayfa

Türkiye’de çok miktarda yetiştirilen ve tüketilen domatesin üretimini kısıtlayan önemli biyotik hastalıklar bulunmaktadır. Toprak kökenli fungal *Fusarium* hastalık etmenleri domates bitkilerinde kök ve kök boğazı hastalıklarının nedeni olarak domates üretiminde önemli ürün kayıplarına sebep olmaktadır. Kışlık domates üretim merkezi olan Antalya ve ilçelerinde daha önce yapılan sürveylerle elde edilen 20 *Fusarium* izolatının bu çalışmada moleküler yöntemlerle avirulenslik ve virulenslik durumları karakterize edilmiştir. Farklı 5 genotip domates çeşidi bu 20 izolat ile patojenisite testlerine tabi tutulmuştur. *Fusarium* patojenlerinin virulenslikten sorumlu genlerini içeren spesifik primerler kullanılarak hastalık etmenlerinin genotipik yapıları araştırılmıştır. Patojenisite testlerinde fenotipik olarak FORL izolatlarının 1 ve 9 izolatları, FOL içerisinde 8 ırk 2 ve FOL 2 ırk 3 izolatları en virulent izolatlar olarak bulunmuştur. Test edilen 4 dayanıklı ve 1 hassas ticari çeşit ile 13 FOL ve 7 FORL arasında gen-için-gen ilişkisi ortaya konmuştur. Moleküler çalışmalar 13 FOL ve 7 FORL izolatında Avr1 geninin olmadığını gösterirken FOL 5 ırk 3 ve FOL 13 ırk 3 izolatlarında Avr2 ve Avr3 genleri tespit edilmiştir. Tüm 13 FOL ve 7 FORL izolatlarının hücre duvarını parçalayan *Fga1*, *Snf1*, *Frp1*, *Chsv*, *Xy12*, *Fem1*, *Arg* genlerini içerdiği bu moleküler çalışmalarda belirlenmiştir. Böylece *Fusarium* patojenlerinin sahip oldukları avirulens genlerle bitkilerin dayanıklılık genleri arasındaki konukçu-patojen ilişkisi bu çalışmayla gösterilmiştir. Bu durum gelecekte *Fusarium* patojenlerinin konukçu domates bitkilerinde hedef aldığı proteinlerin belirlenmesine ve bu ilişkilerin konukçu lehine düzenlenmesine olanak sağlayacaktır.

ANAHTAR KELİMELEER: Domates, *Fusarium*, Patojenisite, Virülenslik

JÜRİ: Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Doç. Dr. Şerife Evrim ARICI

Doç. Dr. Hakan FİDAN

ABSTRACT

GENOTYPIC AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF *FUSARIUM* ISOLATES OBTAINED FROM ANTALYA TOMATO PRODUCTION AREAS

Gülşen ERBERK

M.Sc. Thesis in Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özer ÇALIŞ

August 2020; 59 pages

There are important biotic pathogens limiting production of tomatoes and their consume in Turkey. Soil-borne fungal *Fusarium* pathogens cause tomato root rot, browning in vascular tissues, wilting and chlorosis on leaves leading significant yield loss in tomato grown areas. Antalya and its districts are center of winter grown tomato where surveys were previously conducted, total 20 *Fusarium* isolates were determined. In this study, we aim to characterize avirulence and virulence situations of the *Fusarium* isolates by molecular methods. There are 5 different tomato genotypes were inoculated with the 20 *Fusarium* isolates in pathogenicity tests. Specific primers which were developed from *avirulence* and *virulence* gene's regions of *Fusarium* isolates were amplified for their genotypes in molecular analyses. The pathogenicity tests revealed that 1st and 9th isolates of FORL and FOL 8 race 2 and FOL 2 race 3 isolates were most virulent found. Pathogenicity test also exhibited that 4 resistant and 1 susceptible commercial tomato varieties have gene-for-gene interaction with 13 FOL and 7 FORL isolates. Molecular studies with 13 FOL and 7 FORL isolates showed that they do not have *Avr1* gene but *Avr2* and *Avr3* genes were present in 5th and 13th FOL isolates. All tested 13 FOL and 7 FORL isolates have cell wall degrading *Fga1*, *Snf1*, *Frp1*, *Chsv*, *Xy12*, *Fem1*, *Arg* genes in the molecular analyses. The molecular and pathogenicity studies have identified possible *virulence* genes of *Fusarium* isolates and their counterpart in *resistance* genes of tomato plants revealing host-pathogen interactions. These results already enlightened *Fusarium* pathogens, further studies will reveal their target proteins in host tomato plants to gain resistance for host tomato plants.

KEYWORDS: Tomato *Fusarium*, Pathogenicity, Virulence

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Özer ÇALIŞ

Assoc. Prof. Dr. Şerife Evrim ARICI

Assoc. Prof. Dr. Hakan FİDAN

ÖNSÖZ

Domates bitkilerinde *Fusarium* solgunluğu hastalığı önemli ve geniş ekonomik ürün kayıplarına neden olmaktadır. Domates *Fusarium* solgunluğu hastalığı olarak bilinen bu fungal etmenler *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL) ve *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) olup domateste kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalıklarına neden olmaktadır. Hastalığın kontrolünde en uygun mücadele yöntemi dayanıklı domates çeşitlerinin kullanılmasıdır.

Bu proje de, 20 *Fusarium* izolatının moleküler yöntemlerle avirulenslik ve virulenslik durumları belirlenmiştir. 5 farklı genotip domates çeşidi bu 20 izolat ile patojenisite testlerine tabi tutulmuştur. Tüm izolatların hücre duvarını parçalayan enzimleri kodlayan genleri içerdiği yine bu çalışmalarda bulunmuştur. Böylece *Fusarium* patojenlerinin sahip oldukları *avirulens* genlerle bitkilerin dayanıklılık genleri arasındaki ilişkiler ortaya konulabilmiştir.

Bu tez çalışmasının tümü Fitopatoloji Anabilim Dalı Bitki Moleküler Mikoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında kullanılan tüm teknikleri ve gerekli alt yapıyı sağlayan Sayın Doç. Dr. Özer ÇALIŞ hocama göstermiş olduğu destek ve sabrından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmada projeyi destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine, çalışma alt yapısını sunan Akdeniz Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Başkanlığına, çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen bölüm arkadaşlarıma, bana yüksek lisans döneminde her türlü desteği esirgemeyen değerli babam Mehmet ERBERK'e, annem Zeynep ERBERK'e ve Kardeşlerime yaptıkları tüm fedakârlıklardan dolayı sonsuz teşekkürlerimi bir borç biliyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Domates (<i>Solanum lycopersicum.</i>) Hakkında Genel Bilgiler	4
2.2. <i>Fusarium</i> Kök Hastalığı	5
2.2.1. <i>Fusarium</i> yayılışı ve zararı.....	5
2.2.2. <i>Fusarium</i> hastalık etmeni.....	6
2.2.2.1. FOL	6
2.2.2.2. FORL	7
2.2.3. FOL ve FORL ile yapılan çalışmalar	7
2.3. Domates Üretiminde <i>Fusarium</i> Karşı Mücadele Yöntemleri	8
2.3.1. FOL ve FORL hastalık etmenine karşı dayanıklılık genleri	9
2.6. <i>Fusarium oxysporum</i> 'un Avirulens/Virülenslik Moleküler Mekanizmaları.....	10
2.6.1. Effektör proteinleri.....	10
2.6.2. Transkripsiyon faktörler ve bitki hücre duvarın enzimatik bozulması.....	12
3. MATERYAL VE METOT	16
3.1. Bitki Materyalleri	16
3.1.1. Bitkilerin yetiştirilmesi	16
3.2. FOL ve FORL İzolatları	17
3.3. FOL ve FORL Genotipik Çalışmalar	20
3.3.1. Toplam DNA izolasyonu	20
3.3.2. Virülenslik genleri ve avirulens genlerin primerlerin belirlenmesi	21
3.3.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyon) çalışmalar	23

3.4. FOL ve FORL Fenotipik Çalışmalar	24
3.4.1. FOL ve FORL izolatlarının geliştirilmesi ve testlemeler	25
3.4.1.2. <i>Fusarium</i> yoğunluğunun belirlenmesi	25
3.4.2. <i>Fusarium</i> izolatlarının bitkiye inokülasyonu	26
3.4.3. Hastalıkların skorlanması ve ölçümlemesi	27
4. BULGULAR	29
4.1. Fenotipik Çalışmalar	29
4.1.1. Simptomoloji bulgular ve değerlendirme	29
4.1.1.1. HX-520 domates çeşidinde simptomlar ve hastalık skorlaması	29
4.1.1.2. HX- 596 domates çeşidinde simptomlar ve hastalık skorlaması	31
4.1.1.3. HT-5160 domates çeşidinde simptomlar ve hastalık skorlaması	32
4.1.1.4. Fb18-627 domates çeşidinde simptomlar ve hastalık skorlaması	34
4.1.1.5. H-2274 Hassas domates çeşidinde simptomlar ve hastalık skorlaması	35
4.2. Moleküler Çalışmalar	37
4.2.1. Avr genleri	37
4.2.1.1. Avr1 genin <i>Fusarium</i> izotlarındaki varlığı	37
4.2.1.2. Avr2 genin <i>Fusarium</i> izotlarındaki PCR çalışması	38
4.2.1.3. Avr3 genin <i>Fusarium</i> izotlarındaki PCR çalışmaları	38
4.2.2. Hastalık yapabilme virulenslik genlerinin PCR çalışmaları	39
4.2.2.1. 13 FOL ve 7 FORL izolatlarında <i>Fga1</i> geni için yapılan PCR çalışmaları	39
4.2.2.2. FOL ve FORL izolatlarının <i>Snf1</i> geni ile PCR çalışmaları	39
4.2.2.3. FOL ve FORL izolatlarının <i>Frp1</i> geni ile PCR çalışmaları	40
4.2.2.4. FOL ve FORL izolatlarının <i>ChsV</i> geni ile PCR çalışmaları	40
4.2.2.5. FOL ve FORL izolatlarının <i>Pg1</i> ve <i>Pl1</i> genleri ile PCR çalışmaları	41
4.2.2.6. FOL ve FORL izolatlarının <i>Xy12</i> geni ile PCR çalışmaları	42
4.2.2.7. FOL ve FORL izolatlarının <i>Fem1</i> geni ile PCR çalışmaları	42
4.2.2.8. FOL ve FORL izolatlarının <i>Arg1</i> geni ile PCR çalışmaları	43
4.2.2.9. FOL ve FORL izolatlarının <i>Fmk1</i> geni ile PCR çalışmaları	44
4.2.2.10. FOL ve FORL izolatlarının <i>Fow1</i> ve <i>Fow2</i> genleri ile PCR çalışmaları	44
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇLAR	48
7. KAYNAKLAR	49

8. EKLER.....	59
---------------	----

ÖZGEÇMİŞ



AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Antalya Domates Üretim Alanlarından İzole Edilen *Fusarium* İzolatlarının Genotipik Ve Fenotipik Karakterizasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

17/08/2020

Gülşen ERBERK



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
bp	: Base Pair
dak	: Dakika
ml	: Mili Litre
ng	: Nano Gram
rpm	: Revolutions Per Minute
sn	: Saniye
µl	: Mikro Litre
µM	: Mikro molar

Kisaltmalar

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
<i>Arg</i>	: Argininosuccinate Lyase
AÜ	: Akdeniz Üniversitesi
<i>Avr</i>	: <i>Avirulens</i>
<i>Chs</i>	: Chitinase Class
CTAB	: Cetyltrimethylammonium Bromide
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ETI	: Effector-Triggered Immunity
F	: <i>Fusarium</i>
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
<i>Fem</i>	: <i>Fusarium</i> Extracellular Matrix
<i>Fga</i>	: G Protein A Subunit
<i>Fmk</i>	: Mitogen-Activated Protein Kinase Gene

FO : *Fusarium oxysoprum*

FOL : *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

FORL : *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*

Fow : Zn(II)2Cys6 Transcription Factor

Frp : F Box Protein

LRR : Leucine-Rich Repeat

MAP : Mitogen-Activated Protein

NBS : N klotit Binding Sequence

PAM : Pathogen-Associated Molecular

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDA : Patates Dekstro  Agar

PDB : Patates Dekstro  Broth

Pg : Endo-Polygalacturonase

Pl : Pectate Lyase

SGE : SIX Gene Expresion

Six : Secreted In Xylem

Snf : Sucrose Non-Fermenting

sp. : T rleri

T   K : T rkiye İstatistik Kurumu

vd : Ve Diğ rleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> ırklarının Avirulens genleri ile domates bitkilerindeki <i>I</i> dayanıklılık genleri arasındaki ilişkiye göre şekilsel sınıflandırılması (Garcia-Enciso vd. 2018).....	12
Şekil 3. 1. Domates Fidelerinin iklimlendirme odasında gelişimleri. a) Tohumların ekildikten 2 hafta sonrası gelişimleri; b) HX-596, HX-520, HT-5160, Fb18-627 ve H2-2274 çeşitlerin 1 ay sonra viyollerdeki gelişimleri; c) iklimlendirme odasında gelişen çeşitlerin şaşırtılması; d) H2-2274 standart çeşidin tohumlarının çimlenmesi...	17
Şekil 3. 2. PDA ortamın hazırlanması; a) Patates Dekstroz Agar; b) Otoklavdan çıkan PDA' nın petrilere dağıtılması.....	19
Şekil 3. 3. Çalışmalarda kullanılan 13 FOL ve 7 FORL izolatlarının Patates Dekstroz Agar ortamında görünüşleri.....	19
Şekil 3. 4. Moleküler çalışmalarda kullanılan ekipmanlar; a) Elektroforezde koşturulmuş agaroz jelin görüntülenmesi; b) Polimeraz Zincir Reaksiyon analizlerinin yapıldığı Thermocycle	24
Şekil 3. 5. <i>Fusarium</i> izolatlarının bitki inokulasyonu öncesinde hazırlıkları; a) 7 FORL izolatının PDA ortamında gelişimleri; b) 13 FOL izolatının PDA ortamında gelişimleri; c) Sporların saf suya geçmesi hücre yayıcı ile kazılması	25
Şekil 3. 6. Patojenisite testleri için 13 FOL ve 8 FORL izolatın yoğunluklarının ayarlanması; a) Işık mikroskobu (Leica) X10 büyütme ile spor sayımı; b) Spor sayımı için Thoma lamı kullanımı ok işareti bölgesine belli miktarda solüsyonun konulması; c) Patojenisite testi için kullanılan 1×10^7 spor /ml konsantrasyonu ayarlanmış <i>Fusarium</i> izolat solüsyonu; d) Işık mikroskopunda <i>Fusarium</i> ' un spor yapılarının görünümü	26
Şekil 3. 7. İnokulasyon için hazırlanmış spor solüsyonu ve domates fideleri	27
Şekil 4. 1. HX-520 domates çeşidinde; a) FORL 1; b) FORL 18; c) FOL8 ırk 3; d) FORL 15 izolatların oluşturdukları belirtiler	30
Şekil 4. 2. HX-596 domates çeşidinin 7 FORL ve 13 FOL izolatıyla yapılan patojeniste testleri. İnokulasyondan 7 gün sonra; a, b) FORL 1; c) FORL 12; d) FORL 20 izolatlarının oluşturdukları belirtiler	31
Şekil 4. 3. HT-5160 domates çeşidinin; a) FORL 20; b) FORL 15; c) FOL 10 ırk 3 izolatlarıyla inokulasyondan 16 gün sonraki görünüşleri.....	33
Şekil 4. 4. Fb18-627 domates çeşidinin 13 FOL ve 7 FORL izolatlarıyla inokulasyonundan sonraki görünüşleri; a ve c) FOL2 ırk 3 izolatı; b) FOL 8 ırk 2 izolatıyla inoküle edildikten sonraki 21. gündeki görünüşleri	34

Şekil 4. 5. H-2274 Domates çeşidinin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla inokulasyonundan sonra 7. gündeki görünümü; a) 13 FOL ve 7 FORL izolatin H-2274 çeşidi üzerindeki belirtileri; b) H-2274 domates bitkisinin distile su ile inokule edilen kontrol bitkisinin görünümü	36
Şekil 4. 6. H-2274 Hassas çeşidin Fusarium patojen (FORL 15.izolat) inokulasyondan sonra hastalıklığın bitki üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi; a) bitkinin gövde ve kökte enine kesit alınması; b) bitkinin gövde kısmından boyuna kesitler alınması; c) alınan kesitle besi ortamı olan PDA izolatin gelişimi için yüzey dezekfesiyonun aşaması; d) bitkinin yapraktaki etkisi: sararma; e) 15. izolatin bitkideki genel etkisinin değerlendirilmesi	36
Şekil 4. 7. <i>Avr1</i> geni için spesifik primer setiyle yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu ürünlerinin %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsü	38
Şekil 4. 8. Toplam 20 <i>Fusarium</i> izolatinin <i>Avr2</i> geniyle PCR analizlerinden sonra %1.5 luk agaroz jel görüntüsü	38
Şekil 4. 9. Toplam 20 <i>Fusarium</i> izolatinin <i>Avr3</i> geniyle PCR analizlerinden sonra %1.5'luk agaroz jel görüntüsü	39
Şekil 4. 10. <i>Fga1</i> virulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5 luk agaroz jeldeki görüntüsü	39
Şekil 4. 11. <i>Snf1</i> virulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5 luk agaroz jeldeki görüntüsü	40
Şekil 4. 12. <i>Frp1</i> avirulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5'luk agaroz jeldeki görüntüsü	40
Şekil 4. 13. <i>ChsV</i> virulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5'luk agaroz jeldeki görüntüsü	41
Şekil 4. 14. <i>Pg1</i> virulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsü	41
Şekil 4. 15. <i>Pl1</i> genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsü	42
Şekil 4. 16. <i>Xy12</i> virulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsünün jel görüntüsü	42
Şekil 4. 17. <i>Fem1</i> virulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsü	43
Şekil 4. 18. <i>Arg1</i> virulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsü	43
Şekil 4. 19. <i>Fmk1</i> virulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsü	44

Şekil 4. 20. *Fow1 virulenslik* genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsü genin jel görüntüsü44

Şekil 4. 21. *Fow2 virulenslik* genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsü45



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 1. Türkiye de 2010-2017 yılları arasındaki sebze üretimi (yıl/ton)	1
Çizelge 2. 1. Domatesin sistematığı	4
Çizelge 3. 1. Bitki materyallerin <i>Fusarium</i> 'ların dayanım özellikleri	16
Çizelge 3. 2. Karakterize edilmiş <i>Fusarium</i> izolatları ve moleküler analizlerle ırkları ..	18
Çizelge 3. 3. CTAB solüsyonu 1 litre olarak hazırlanması	21
Çizelge 3. 4. Patojenin avirülens genleri için kullanılan primerler	21
Çizelge 3. 5. <i>Fusarium oxysporum</i> virülensliği sağlayan genlerin primerler	22
Çizelge 3. 5. Devamı	23
Çizelge 3. 6. Moleküler testlemelerde kullanılan PCR reaksiyon çözeltisinin bileşenleri	23
Çizelge 3. 7. Moleküler testleme için PCR döngü parametresi	24
Çizelge 3. 8. FOL ile inokule edilen domates bitkilerinde hastalık miktarının ölçümlemesinde kullanılan skala	27
Çizelge 3. 9. FORL ile inokule olmuş domates bitkilerinde hastalık miktarının ölçümlemesinde kullanılan skala	28
Çizelge 4. 1. Test edilen tüm bitkilerde 7 FORL ve 13 FOL izolatlarıyla yapılan patojenisite testi sonucundaki hastalık oranları	29
Çizelge 4. 2. HX-520 bitkisinde 7 FORL ve 13 FOL izolatlarıyla yapılan patojenisite testi sonucundaki hastalık oranları	30
Çizelge 4. 3. HX-596 bitkilerinin 13 FOL ve 7 FORL izolatu ile yapılan patojenisite sonuçları	32
Çizelge 4. 4. HT-5160 bitkisinin izolatlardaki hastalık oranları	33
Çizelge 4. 5. Fb18-627 domates bitkilerinin 13 FOL ve 7 FORL izolatlarıyla inokulasyondan sonraki hastalık oranları	35
Çizelge 4. 6. H-2274 hassas domates bitkisi- izolatlardaki hastalık oranları	37

1. GİRİŞ

Domates dünyada en çok üretilen, tüketilen ve ticarete konu olan tarım ürünlerinin başında gelmesi, insan beslenmesinde vazgeçilmez ürünlerden olması ve gıda sanayinde dondurulmuş, konserve, salça, ketçap, turşu gibi çok çeşitli kullanım alanlarına sahip olması nedeniyle vazgeçilmez bir sebzedir. İnsanlık için bünyesinde B6, B1, A ve C vitaminlerini içermesi, antikanserojen ve yaşlanmayı önleyici (antiaging) gibi birçok özelliği nedeniyle önemli bir üründür (Vural vd. 2000).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) 2019 verilerine göre 1.1 milyar ton olan yaş sebze üretiminde domates 177 milyon ton ile %13'lük paya sahiptir. Dünyada domates yetiştiriciliğinde üretim değerleri 2017 yılı itibarıyla 57 milyon tonluk üretim ile Çin ilk sırada, 18,4 milyon tonluk üretimi ile Hindistan ikinci, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) 13,03 milyon ton ile üçüncü ve 12,8 milyon tonluk üretimi ile Türkiye ise dördüncü sırada yer almaktadır. Dünyada lider konumda olan Çin, toplam dünya domates üretiminin %31'lik kısmını tek başına karşılamaktadır (Anonim 2018). Ülkemizde ise Türkiye İstatistik Kurumu'nun (TÜİK) 2017 yılı verilerine göre; sebze üretimi içinde, domates 12.750.000 ton üretim miktarıyla toplam sebze üretimi içerisinde ilk sırada yer almaktadır. Domates üretiminden sonra 1.827.782 ton ile hıyar üretimi izlemektedir (Anonim 2018).

Çizelge 1. 1.Türkiye de 2010-2017 yılları arasındaki sebze üretimi (yıl/ton)

	Domates	Hıyar	Kavun	Karpuz	Soğan(Kuru)
2010	10.052.000	1.739.191	1.611.695	3.683.103	1.900.000
2011	11.003.433	1.749.174	1.647.988	3.864.489	2.141.373
2012	11.350.000	1.741.878	1.688.687	4.022.296	1.735.854
2013	11.820.000	1.754.613	1.699.550	3.887.324	1.904.846
2014	11.850.000	1.780.472	1.707.302	3.885.617	1.790.000
2015	12.615.000	1.822.636	1.719.620	3.918.558	1.879.189
2016	12.600.000	1.811.681	1.854.356	3.928.892	2.120.581
2017	12.750.000	1.827.782	1.813.422	4.011.313	2.131.513

Kaynak: TÜİK (08.01.2020)

Domatesin ilk kez Meksika veya Peru'da yaşayan yerli kabileler tarafından Güney Amerika'da kültüre alındığı ve tarımının yapıldığı bilinmektedir. Aztek dilinden kökenini alan 'xitomate' veya 'zitotomate' kelimelerinden geliştirilen ismiyle birlikte 16. yüzyılda Avrupa'ya, 18. yüzyılda buradan Kuzey Amerika'ya getirildiği, daha sonra da tüm dünya üzerine yayıldığı kabul edilmektedir (Gould 1983).

Dünya'da ve Türkiye'de en çok üretilen sebze türü olan domatesin yetiştiriciliğinde, hastalık ve zararlılar ciddi problemler oluşturmaktadır. Bugüne kadar bilinen yaklaşık 200 farklı hastalık etmeninin varlığı domates bitkisinde tespit edilmiş olup domates üretimini fungus, bakteri, virüs ve viroid biyotik etmenleri devamlı tehdit etmektedir (Jones vd. 1991).

Toprak kökenli bitki hastalıklarına neden olan fungal patojenler arasında *Fusarium* cinsi fungusların önemi oldukça fazladır. Dünya da Antartika kıtası hariç tüm kıtalarda tropikal ve subtropikal alanlarda bu fungusun varlığına rastlanmıştır. *Fusarium* cinsi funguslar birçok türe ait bitkide patojenik olabildiği gibi bazıları da saprofitik özellik göstermektedirler. Patojenik olanlar bitkilerin çeşitli organlarında meydana getirdikleri enfeksiyonlar sonucu kök, gövde ve meyve çürüklüklerine ve yapraklarda solgunluk belirtilerine yol açarak önemli derecede ürün kayıplarına hatta bitkilerde ölümlere neden olmaktadır (Singleton vd. 1992). *Fusarium* türleri içinde domatesten en yaygın görülen ve en bilinen hastalık etmeni *Fusarium oxysporum*'dur. *Fusarium oxysporum*'un domatesi hastalandıran *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) ve *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (FORL) olmak üzere iki alt türü bulunmaktadır. FOL *Fusarium* solgunluğuna, FORL ise *Fusarium* kök ve kök boğazı çürümelerine sebep olmaktadır (Attitalla vd. 2004; Bogale vd. 2007; Agrios 2005).

Toprak kaynaklı patojenlerle mücadele de etkili olan toprak fumigantı Methyl bromide'nin uygulamadan kaldırılmasıyla alternatif mücadele yöntemlerine gerek duyulmaktadır (Katan, 1980). Gelişmiş olan ülkelerde son yıllarda kimyasal mücadelenin neden olduğu olumsuz durumları yok edebilmek için, biyolojik mücadele yöntemleri kullanarak hem bitkinin toprak patojenlerinden korunması hem de bitkinin gelişmeye teşvik edici biyo preparatlar ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda bitkinin gelişimini sağlayan savunma mekanizmaların gelişmesini teşvik etmiştir (Cook, 1993; Benitez vd. 2004). *Fusarium* solgunluğunun gelişimini sınırlandırarak bitki kök yüzeylerine kolonize olan, antagonistik etki gösteren bazı bakteri türleri birçok araştırmacı tarafından potansiyel biyolojik mücadele etmeni olarak rapor edilmiştir. Bu biyolojik mücadele ajanları *Bacillus subtilis*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. ve *Pseudomonas* spp.'dir. (Thirumalachar vd. 1970; Turhan 1981; Podile vd. 1985; Kapoor ve Kar, 1988; El-Abyad vd. 1993; Nejad ve Johnson, 2000; Altınok vd. 2013).

Toprak kaynaklı bitki patojeni funguslarla uzun süreli ve etkili bir mücadelenin kültürel, fiziksel, biyolojik ve kimyasal yöntemlerin bir araya gelmesiyle başarılı olunacağı bildirilmektedir (Katan vd. 1976; Chet vd. 1982; Parry, 1990). Yabancı otlar, birçok fungal patojen için potansiyel konukçu olarak görev yapmaktadır ve bazı patojenler tarafından kolonize olduklarında herhangi bir hastalık semptomu sergilememektedirler. *F. oxysporum*'ların patojenik türlerinin konukçu dışı bitkilerde özellikle yabancı otlarda kök kolonizasyonu bu patojenin kalıcılığını sağladığı ve nadas alanları da dahil bu gibi alanlarda solgunluk hastalığı ile mücadelede yabancı ot mücadelesinin de önemli olduğu belirtilmektedir (Hennessey vd. 2005; Altınok 2013).

Etmenin mücadelesine yönelik olarak etkili yöntemler geliştirmek için patojen popülasyonlarının kapsamlı olarak karakterize edilmesi gerekmektedir. Bitki patojeni fungusların klasik tanısı gelişme ortamları üzerindeki kültür karakteristiklerine ve konukçu üzerinde verdiği semptomlara göre yapılmaktadır. Bununla birlikte morfolojik kriterler gibi dış görünüme göre yapılan fungal teşhisler her zaman doğru sonuçlar vermemekte ve hatalı teşhisler neden olabilmektedir (Baayen vd. 2000). Morfolojik karakterler ve klasik yöntemlerle yapılan teşhisler göre moleküler yöntemlerin kullanımı daha güvenilir ve hızlı sonuçlar vermektedir. Son zamanlarda ülkemizde moleküler karakterizasyon tekniklerinin kullanıldığı bilimsel araştırmalar hız kazanmıştır. Türkiye'de yapılan araştırmalarda en fazla kullanılan moleküler karakterizasyon

tekniklerinin başında tanı primerleri, PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) gibi moleküler teknik çalışmalar gelmektedir (Çetinkaya ve Ayhan 2012).

Hastalık üçgeni gözetilerek bitki patojeni *Fusarium*'un spor çimlenmesiyle başlayan bir dizi zincirleme reaksiyon sonucunda hassas bitkide sistemik bir enfeksiyonun oluşmasıyla sonuçlanan belirli süreçte hastalık oluşturabilmektedir. Bu süreç içerisinde fungal etmenin sahip olduğu virulenslik genleri ve bunların kodladığı proteinler örneğin hücre duvarı bozucu enzimler (Cell Wall degrading enzymes: CWDE); ksilanazlar, pektat liyazlar, proteazlar gibi, karbonhidratların, bazı besin maddelerinin serbest bırakılması için konukçu hücre duvarlarının ve zarlarının (membran) parçalanmasını sağlamaktadır (García-Enciso vd.2018).

Bu tez kapsamında, 2016 ve 2017 yıllarında Akdeniz Bölgesinde yer alan Antalya merkez ve ilçelerinde domatesta survey çalışmaları yapılmıştır. *Fusarium* solgunluk hastalık etmenleri olan *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) ve *F. oxysporum* f. sp. *radiciis-lycopersici* (FORL) oluşan toplamda 20 izolat elde edilmiştir. Elde edilen izolatların 13 adedi FOL ve 7 adedi FORL olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada izole edilen 13 FOL ve 7 FORL hastalık etmenlerinin virulensliği sağlayan genler moleküler çalışmalarla karakterize edilirken patojenisite testleriyle bu fungal izolatların dayanıklılık gen(ler)i içeren ve içermeyen domates bitkilerinde oluşturdukları hastalık miktarları ölçülünerek konukçu-patojen ilişkilerini ortaya koyulmaya çalışılmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Domates (*Solanum lycopersicum*.) Hakkında Genel Bilgiler

Domates, anavatanı Güney ve Orta Amerika olan, tek yıllık, çift çenekli ve meyvesi yenilebilen bir kültür bitkisidir. Bitkinin tırtıklı kenarlara sahip 5-9 yaprakçık barındıran pinnat yapraklarının boyu 10-25 santimetre arasında değişmektedir. Tüylü yapıdaki yaprakçıkların boyları 8 santimetreye kadar çıkmaktadır. Çiçekleri beşlidir ve 1-2 santimetre çapında taç yapraklar bulundurmaktadır (Acquaah 2002). Domates kuvvetli bir kök sistemine sahiptir, dallanmış kazık kökler ve bunlardan çıkan sekonder kökler şeklinde gelişme göstermektedir. Yapraklar bileşik şekilde ve tüylerle kaplıdır. (Vural vd. 2000)

Solanaceae familyasının *Lycopersicum* cinsi (Çizelge 2.1.) içinde yer alan domates (*Solanum lycopersicum*), meyveleri yenilebilen, otsu bir kültür bitkisidir. Bu cins içinde yer alan çok farklı domates türleri bulunmaktadır. Ortaçağ da özellikle Avrupa ya getirilen domates birçok insanın dikkatini çekmiş olup, aynı zamanda zehirli olduğu düşünülerek süs ve bahçe bitkisi olarak yetiştirilmeye başlanmıştır. Zaman geçtikçe, insanlar, yenilebildiği ve faydalı olduğu düşünülerek bu bitki dünyanın her yerine yayılmıştır. Ülkemizde 1900 yıllarında domates yetiştiriciliği Adana bölgesinde ilk defa gözlenmiştir (Yoksuloğlu 2001).

Çizelge 2. 1. Domatesin sistematığı

Sınıf:	<i>Dicotyledonae</i>
Alt Sınıf:	<i>Sympetale</i>
Takım:	<i>Personatae (Tubiflore)</i>
Familya:	<i>Solanaceae</i>
Cins:	<i>Lycopersicon</i>
Tür:	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (1768) (= <i>Solanum lycopersicum</i> L.) (= <i>Lycopersicon lycopersicum</i> Karsten)(1900).

Kaynak: <https://tr.wikipedia.org/wiki/Domates>

Türkiye’de domates üretimi iklimsel ve çevre şartlarına uygun bir şekilde yetiştirilmektedir. Antalya cam ve plastik seralardan oluşan uygun yetiştirme alanları nedeniyle kışlık domates üretiminin merkezi olup kışın yetiştirilen domatesin %60’dan fazlasını tek başına karşılamaktadır. Bununla birlikte 200’den fazla hastalık ve zararlının domates yetiştiriciliğinde ciddi problemlere neden olduğu saptanmıştır. Bu hastalıklar; virüsler, bakteriler, nematodlar ve funguslar olarak belirlenmiştir. Fungal ve bakteriyel patojenlerden kaynaklanan hastalıklar arasında domates mildiyösü (*Phytophthora infestans*), erken yaprak yanıklığı (*Alternaria solani*), külleme (*Leveillula taurica*), antraknoz (*Colletotrichum phomides*), kurşuni küf (*Botrytis cinerea*), solgunluk (*Fusarium* spp.), yaprak lekesi (*Septoria lycopersici*), bakteriyel solgunluk (*Pseudomonas solanacearum*), bakteriyel benek (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*),

bakteriyel leke (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) ve yaş çürüklük (*Erwinia carotovora*) hastalıkları sayılmaktadır (Kütevin ve Türkeş 1994).

Seralarda biyotik hastalık faktörlerinin başında toprak kaynaklı fungal patojenler gelmektedir. Toprak kökenli bir hastalığın oluşabilmesinde genellikle abiyotik stres faktörlerinin etkisi büyüktür. Domatesin tüm dünyada yaygın ve önemli bir fungal hastalığı olan *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) (W. C Snyder & H. N Hans 1941) ve *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) (Jarvis ve Shoemaker 1978)' nin neden olduğu *Fusarium* kök ve kök boğazı çürüklüğü son yıllarda ülkemizde domates yetiştiriciliği yapılan açık ve sara alanlarında önemli kayıplara neden olmaya başlamıştır (Ozan ve Maden 2004; Agrios 2005).

2.2. *Fusarium* Kök Hastalığı

Fusarium oxysporum (FO) türleri toprakta bulunan lignin ve karbonhidratı parçalayarak saprofit olarak yaşama yeteneğine funguslardır (Kistler 2001). Bunlar bitki köklerine kolonize ederek endofitik bir yaşam sürdürmektedirler. Bunların büyük bir çoğunluğu faydalı olup bitkilerde endofitik veya toprakta saprofitik olarak yaşamalarına karşın, birçok türü de bitkilerde patojenik özellikle yaşayabilmektedir. *F. oxysporum*'ların patojenik türleri 100 yıldan günümüze kadar çalışılmaktadır. Bu gözlemlerin sonucunda, *F. oxysporum*'ların konukçuya özelleştiği "special form: özel form" veya "formae speciales: bitki türüne özelleşmiş" alt-türlerinin olduğu bildirilmiştir. Bitki paraziti fungusların özel konukçularında hastalık oluşturma yeteneği, morfolojik bir bakış açısından çok fizyolojik bir bakış açısı olarak karakterize edilmiştir (Booth 1971; Nelson vd. 1994; Kistler 2001).

F. oxysporum Patates Dekstroz Agar (PDA) gibi sentetik besi ortamında çoğaltılabilmektedir. Genellikle, miselleri önce beyaz görünürken daha sonra *F. oxysporum*'un ırkına ya da türüne göre mordan koyu pembeye değişen renge dönüşebilmektedir. Eğer sporlar çok yoğun bir şekilde bulunuyorsa kültür krem ya da turuncu renginde görünebilmektedir (Gonsalves vd. 1993). *Fusarium spp.* sınıflandırılması besi yerlerindeki belirli değişimler ile yapılmaktadır (Aoki vd. 2014). *Fusarium* türleri morfolojik karakteristiklerine göre seçici ortamlarda tanılabilmesine rağmen; *Fusarium oxysporum*'un patojenite tiplerinin ayrımı, alt tür tanıları ve ırkların ayrımı morfolojik olarak gerçekleştirilemez (Hirano ve Arie 2006).

Fusarium oxysporum tür kompleksleri tipik belirtiler olarak yaprak ve gövde solmalarına, kök ve kök boğazı çürümelerine ve ayrıca 100'den fazla farklı bitki türünde aniden bulunduğu yerde çökmelerine (damping off) neden olan farklı belirtiler ortaya koyabilir. Ekonomik açıdan önemli dört özel alt türü özelliğinin: *cubense*, *lycopersici*, *radicis-lycopersici* ve *melonis*'in nükleer ve mitokondriyal gen soyağacına dayalı karmaşık bir yapıda olduğu gösterilmiştir (O'Donnell vd. 1998).

2.2.1. *Fusarium* yayılışı ve zararı

Fusarium oxysporum, çok çeşitli tarımsal ve süs bitkilerinin toprak kaynaklı bir patojeni olup toprakta bitki artıkları üzerinde saprofitik olarak yaşayabilmektedir. Toprakta, çürüyen bitki artıkları üzerinde miselyum olarak veya aseksüel mikro ve makro

sporlar veya olumsuz şartlarda klamidosporeler olarak hayatta kalabilirler (Abawi ve Lorbeer 1972). Bitkilerin kök epidermisine, kök uçlarında veya yan köklerin oluşumu sırasında oluşan doğal yaralardan giren *F. oxysporum* konidial germ tüplerinin veya miselyumun dokularda büyümesiyle enfeksiyon oluşturmaktadır (Cooper ve Bishop 1983; Hutson ve Smith 1983). *Fusarium* hifleri, kökt epital hücreler, arasındaki doğal açıklıklardan enfekte ederek, ksilem damarlarına ulaşmaya kadar kök korteksindeki hücrelerarasında büyümesini sürdürmektedir. Ksilem damarlarını da enfekte olan miselyum hifleri, bitkinin özünde klamidosporeleri üretebilmektedir (Van der Does ve Duyvesteijn 2008; Michielse ve Rep 2009). *Fusarium* etmenleri bitkiye giriş yaptıktan sonra ksilemin çoğalmaktadır. Bitki enfekte olma sırasında savunma mekanizmasını aktive etmektedir. Savunma mekanizmasında bitki de pektik jeller, sakızlar ve tilozların üretilmesi sağlamaktadır.(Beckman 1987). Dayanıklı domates bitkileri, *Fusarium* etmenine karşı dah hızlı savunma mekanizmaları aktive ederek ksilemde pektik jel, tilos ve sakız üretimi kalloz birikimi sağlamaktadır (Mes vd. 2000).

2.2.2. *Fusarium* hastalık etmeni

Fusarium oxysporum'un bu iki patojenik formu da domates yetiştiriciliği yapılan bölgelerde mevcuttur. Bu nedenle, aynı tarlada ve serada her iki form birlikte bulunabilmektedir. Böylece, domates yetiştirilen bölgelerde ve alanlarda bitkiler sadece bunlardan birisi tarafından enfekte edilebildiği gibi, aynı domates bitkileri her iki patojen formu tarafından birlikte de enfekte edilerek karışık enfeksiyonlar gerçekleştirebilmektedir (Laine vd. 1999). FOL sadece *Solanaceous* türlerini hastalandırırken, FORL *Solanaceae*, *Leguminosae*, *Cucurbitaceae* ve *Chenopodiaceae*'ya dahil olmak üzere 37 bitki tür ve çeşidini hastalandırabilmektedir (Rowe 1977; Menzies vd. 1990).

2.2.2.1. FOL

Toprak kökenli bitki patojeni olup *Hyphomycetes* sınıfı bir fungustur. Domateste köklerde sorunlar oluşturmakta *Fusarium* solgunluğu (*Fusarium wilt*) olarak bilinen hastalığı yapmaktadır. Bu hastalık etmeni ilk defa 1895 yılında İngiltere'de tanımlanmıştır. Günümüzde Dünya genelinde en az 32 ülkede hastalık rapor edilmiştir. FOL özellikle sıcak sera ortamlarında sahip alanlarda sıklıkla büyük ürün kayıplarına neden olmaktadır. Amerika Birleşik Devletlerinde tek bir üretim sezonunda Florida ve diğer Güney eyaletlerde tüm domates üretimini ciddi bir şekilde zarar yaptığı bilinmektedir (Agrios 2007). Meksika'da 2005 yılında domates alanlarında ekonomik kayıplara neden olan solgunluk hastalığı etmeni *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* olarak belirlenmiştir. Meksika'dan elde edilen izolatların ırk-2 ve ırk-3 olduğu tespit edilmiş ve ülke için ilk kayıt olduğu bildirilmiştir (Pena, 2005).

Cai vd. (2003), Kaliforniya'da domates yetiştiriciliğinde sorun olan FOL izolatları ile patojenite ve vejetatif uyum grupları (Vegetative Compatibility Group: VCG) testleri yapmışlardır. Elde edilen 39 FOL izolatından yapılan VCG testleri sonucunda üç izolatın non-patojenik (VCG 0031), 13 izolat FOL-ırk 3, 9 izolatın FOL-ırk 2 (VCG 0030), 3 izolatın FOL-ırk 1 ve 6 izolatın FOL-ırk2 (VCG 0035) olduğu saptanmıştır. VCG çalışmaları sonucunda elde edilen sonuçlar restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA'nın kesilerek polimorfizmin (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP) bulunması tekniğinde de benzer olmuştur.

Reis vd. (2005), tarafından Brezilya’da yapılan bir çalışmada *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*’nin domates alanlarında ciddi sorunlara neden olduğu ve ticari olarak domates yetiştiriciliğinin yapılan bu alanlarda ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonucunda dünyada bilinen 3 ırktan sadece ırk-1 ve ırk-2’nin Brezilya’da tespit edildiği bildirilmiştir. Katan vd. (1997), İsrail’de yaptıkları benzer bir çalışmada domateste solgunluk etmeninin *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* olduğunu, bu patojenin bitkilerde solgunluk ve gövdelerinde zayıflamalara neden olduğunu, saptanan ırkların ırk-1 ve ırk-2 olduklarını belirlemişlerdir.

2.2.2.2. FORL

FORL ilk olarak Japonya’da belirlenmiştir. Daha sonra Amerika, Kanada, Avrupa ve İsrail başta olmak üzere birçok ülkede de tespit edilmiştir. 1988 yılında İngiltere’de kaydedilmiştir (Omar vd. 2006) Türkiye’de ise bu patojen ilk olarak Adana- Mersin illerinde bulunmuştur (Can vd. 2004). Hastalığın uzun zamandır domates üretilen alanlarda çok yaygın olduğu ayrıca önemli verim kayıplarına sebep olduğu da bilinmektedir. Hastalığın erken belirtileri domates fidelerinde bodurlaşma, sararma ve yaprakların sayısında azalma olarak görülürken, ileri dönemde kök çürümeleri, solma ve ölümlere neden olmaktadır (Roberts vd. 2000). FORL özellikle seralarda mevsim içinde mikrokonidilerin yayılması sonucu tekrarlı enfeksiyonlara sebep olup örtü altı domateslerde %90’a kadar varan ürün kaybına neden olabilmektedir (Rekah vd. 2001).

Toprak kökenli bitki patojeni fungus ile etkili, uzun vadeli bir mücadelenin kültürel, kimyasal, biyolojik ve fiziksel metotların kombinasyonu ile başarılı olabileceği bildirilmektedir (Chet vd. 1982). Son yıllarda gelişmiş ülkelerde kimyasal mücadelenin meydana getirdiği olumsuz etkileri ortadan kaldırmak için biyolojik mücadele etmenlerinin bitki kök kısımlarına kolonize etmesi teşvik edilmekte ve savunma sistemi oluşturmak suretiyle, bitkilerin hastalanması engellenmeye çalışılmaktadır (Cook 1993; Benítez vd. 2004).

2.2.3. FOL ve FORL ile yapılan çalışmalar

Yıldız ve Döken (2001), Aydın ili ve ilçelerinde açık alanda domates üretimi yapılan bölgelerde sorun olan *Fusarium* spp.’yi saptamak amacıyla 1996-1997 yıllarında sörvey çalışmaları yapmışlardır. Hastalık belirtisi gösterdiği öngörülen bitkilerden örnekler toplamış ve izolasyon yapmışlardır. Bu izolasyonlar sonucunda %81.08 oranında *Fusarium* spp. elde edilmiş olup, bunun büyük bir bölümünün FOL ‘a (%48.15) ait olduğu anlaşılmıştır. Köklerin iletim demetlerine enfekte olup su taşınmasını engelleyerek bitkinin hızlı bir şekilde ölmesine sebep olan FOL un domates tarımının yapıldığı alanlarda en fazla karşılaşılan etmenlerden biri olduğu bildirilmiştir.

Pena (2005), Meksika ve California Sur eyaletinde FOL üzerine yaptığı bir çalışmada bölgede ticari domates üretimi yapılan alanlarda bu etmenin varlığını saptamıştır. İzole ettiği ırkları ırk 2 (%62,5’i) ve ırk 3 (% 25’i) olarak tanımlamıştır ve bu kayıtların ülke için ilk kayıtlar olduğunu bildirmiştir.

Çolak ve Biçici (2013) Adana’da yaptıkları bir survey çalışmasında *F. oxysporum*’un neden olduğu FORL ve FOL hastalıklarının hastalık çıkışı ve şiddeti sırasıyla %35,1, %18,8 ve %43,3, %20,4 olarak saptamışlardır. Ayrıca bu survey

çalışmasında hastalığın yaygınlık oranı Adana’da inceleme yapılan domates seralarında %56,1, hastalıklı sera alanı açısından ise %68,1 olarak belirlemişlerdir. Aynı çalışmada Mersin ilinde hastalık yaygınlık oranı, hastalıklı sera açısından ve hastalıklı sera alanı açısından sırasıyla %58,8 ve %54,4 olarak tespit edilmiştir. Patojenite çalışmaları sonucunda bölgede simptomatolojik olarak belirlenen 87 izolatin yaklaşık %70’i FORL izolatu ve %30’u FOL olarak tespit edilmiştir.

Çolak Ateş vd. (2020)’de Kuzey Kıbrıs’ta farklı bölgelerden toplanan domates örneklerinde 62’sini *F. oxysporum* olarak bulmuştur. Yapılan PCR çalışmalarında ırka ait 4 primerlerle (uni, sp13, sp23 ve sprl) testlenmiş olup %81’i FOL ve %19 ‘u FORL bulunmuştur. FOL örneklerinden %37’si ırk 1, %15’i ırk 2 ve %29’u ırk 3 bulunmuştur. Böylece *Fusarium oxysporum* formae specialis ve ırklarının moleküler tekniklerde doğru ve güvenilir bir şekilde tanımlayabileceği ortaya konmuştur.

2.3. Domates Üretiminde *Fusarium* Karşı Mücadele Yöntemleri

Fusarium kök çürüklüğüne karşı mücadelede, domateste bu hastalığa karşı henüz etkili bir savaş yöntemi bulunmamaktadır. Domates bitkilerinin mümkün olduğunca uzun süre hastalığa dayanabilmesi için eski nekroz oluşturmuş köklerin yerine geçebilecek yeni köklerin oluşabilmesi için kök boğazı doldurması tavsiye edilmiştir (Anonim 2020). Topraksız kültürde (torf veya volkanik tüf+torf) daha fazla kök elde etmek için kök boğazına çekilmelidir. Sistemik etkili köklere fungusit uygulamaları bitki köklerine lokal sulama ile veya gübre uygulama sistemleri ile verilebilir. Ancak uygulamanın etkili olup olmadığı şüphelidir. Çünkü *Fusarium*’un ırkları bu sistemik fungusitlere karşı birkaç uygulamadan sonra dayanıklı hale geçmektedirler. Üstelik bu ilaçlar kaya yünü üzerinde bazı fitotoksiste riskini taşımaktadırlar. Ölen bitkiler, bilhassa kök sistemleri ve kök boğazları düzenli olarak kontrol edilmeli, çünkü fungus kök sistemi ve kök boğazı üzerinde aşırı düzeyde konidiospor üretebilmektedir (Anonymous 1991; Blancard 1994).

Baysal vd. (2007)’de *Bacillus subtilis* (EU07) izolatını FORL’e karşı saksı pot denemelerinde etkili olduğunu rapor etmiştir. Bu EU07 izolatu ticari *B. subtilis* (QTS 713) preparatı ile karşılaştırmıştır. EU07, QTS 713’ten farklı bir DNA yapısına sahip olduğunu ve aynı zamanda domates köklerinde daha fazla kolonizasyon oluşturduğunu göstermiştir. Baysal ve Yeşil (2007) FORL’ye karşı domateste savunma tepkisinin artmak için DL-β-aminobutrik asit (BABA) kullanmış olup, bitkinin bu FORL ye karşı dayanıklılığında azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

Arıcı vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, FORL ve FOL etmenlerine karşı 7 uçucu yağın (kimyon, timus, lavandula, okaliptüs, biberiye, çörek otu, dereotu), 2 sirke (elma ve üzüm) ve 2 kimyasal elisitörün (BABA, JA) antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. Kimyon, timus, çörek otu ve dereotundan elde edilen uçucu yağlar, patojenlere karşı en yüksek antagonistik etkiyi göstermiştir. Çalışmada uygulanan kimyasal elisitörlerinde FOL ve FORL’in misel büyümesini azalttığını belirlemişlerdir.

FOL ve FORL tarafından oluşturulan enfeksiyonlar genel olarak dayanıklı çeşitlerin kullanılmasıyla kontrol altına alınabilmektedir. FOL’ün ırk 1 ve 2’ye karşı hem poligenik hem de monogenik genler dayanıklılığı sağlamaktadır. ırk 3’e karşı son zamanlarda monogenik dayanıklı domatesler geliştirilmiştir. Toprağa uygulanan fumigant ya da solarizasyon ile hastalığın kontrolünde etkili olunabilmektedir. Toprak

pH sınır 6,5-7,0'ye çıkarılması uygulamaları da hastalığı kontrol altına alabilmektedir. Özellikle fazla azotlu gübrelemeden de kaçınılmalıdır (Agrios 2007).

2.3.1. FOL ve FORL hastalık etmenine karşı dayanıklılık genleri

Sarfatti vd. (1990), FOL ırkI'e dayanıklı bir genin kalıtım ve bağlantı ilişkileri analiz etmişlerdir. Dayanıklı olan *Lycopersicon pennellii* ile hassas olan *L. esculentum* bitkileri arasındaki melezlemeler yapılmış olup, *L. esculentum*'a geri çaprazlama ile haritalama popülasyonu oluşturulmuştur. Geri melezleme popülasyonun *FOL* 'a dayanıklı olduğunu göstermişlerdir (Bohn ve Tucher 1939). *I* dayanıklılık geni, *L. pimpinellifolium* bitkilerinde bulunmuş olup FOL ırk 1 karşı dayanıklılığı sağladığı anlaşılmıştır. Sarfatti vd. tarafından bu *I* dayanıklılık genine allelik olmayan bir baskın gen tarafından kontrol edildiğini ortaya konmuştur. Domates in FOL ırk 1'e karşı *I* ve *I1* genlerinin olduğunu bulunmuştur. FOL ırk 2 ye karşı dayanıklılık *L. pimpinellifolium*'dan gelen baskın krakterde *I2* geni tarafından kontrol edildiği bulunmuştur (Stall ve Walter 1965, Cirulli ve Alexander 1966).

I ve *I2* genlerinin sağladığı dayanıklılığın FOL 3 ırkını kontrol etmediği Avustralya, California ve Florida'dan izole edilen izolatlarda belirlemişlerdir (Grattidge ve O'Brien 1982; Davis vd. 1988; Volin ve Jones 1982). Daha sonra yeni bir baskın dayanıklılık geni *I3* ise *L. Pennellii* ile *L. Esculentum* bitkilerinin melezlenmesiyle elde edilmiştir (McGrath vd 1987).

Günümüzde 4 adet dayanıklılık geni genetik olarak haritalanmış ve yabani çeşitlerden ticari çeşitlere aktarılmıştır (Huang ve Lindhout 1997; Frary vd. 2000). Bu genlerden *I-1* ve *I-3* 7. kromozomda *I* ve *I-2* genlerinin ise 11. kromozomda yer aldığı (Stall ve Walter 1965) *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* bulunan üç 1, 2 ve 3 ırkları domatese kolonize olduğu aşamasında avirülens veya efektör proteinleri incelenmiştir ve tanımlanmıştır (Parmar ve Subramanian 2013).

FORL ile ilgili genetik dayanıklılık tek bir *Frl* geni tarafından dominant yapıda kontrol edildiği bulunmuştur (Roberts vd. 2000). Dayanıklılık kaynağı domatesin yabani bir türü olan *Solanum peruvianum* bitkisi olup dayanıklılığı ifade eden gen *Frl* olarak sembolize edilmiştir (Laterrot ve Moretti, 1991).

Frl ile ilişkili markör belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalarda *Frl*'nin domatesin 9. kromozomunda yer aldığı tespit edilmiştir. Domateste FORL ye dayanıklılık *Frl* lokusu tarafından ve Tobacco mosaic virus e dayanıklılığı sağlayan *Tm-2* lokusu arasında ilişkinin araştırıldığı çalışmada, 'IRB-301-31' ıslah hattı ile 'Motelle' melezlenerek, 222 *F2* bitkisi kendilenmiş ve her bir *F3* grubundan 15-60 fide FORL ve TMV'nin "0" ırkına karşı test edilmiştir. *Frl* ve *Tm-2* arasında 5.1±1.07 harita mesafesinde sıkı bir bağlantı bulunduğunu göstermişlerdir (Vakalounakis vd. 1997).

Kabaş vd. (2012)' de yaptıkları çalışmada FORL' e karşı dayanıklılık kalıtımı araştırılmıştır. Çalışmada Dayanıklı Fla. 7781 ile hassas 560 numaralı domates hattının melezlenmesinden elde edilen *F1*, *F2*, *BC1* ve ebeveynler, FORL izolatıyla testlenmiştir. Testlenme sonucunda *F2* popülasyonunda 3:1 dayanıklı: hassas dağılımı hipotezinde ve

BC₁ popülasyonda 1:1 dağılım oranları bulunmuş ve FORL etmeninin tek ve bir dominant gen olduğunu doğrulamışlardır.

Mutlu vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada *Frl* genine yakın bir kodominant markör geliştirilmiştir. Homozigot dayanıklı bitkilerde band 950 bp iken hassas band 1000 bp olup heterozigot dayanıklı bireyler her iki band bulunmaktadır. Geliştirilen bu markörün ıslah çalışmalarında rutin olarak kullanabileceğini bildirmişlerdir.

Çolak Ateş vd. (2019)' da yaptıkları çalışmada 418 tane domates genotipi hem FORL hem de TYLCV karşı klasik ve moleküler yöntemlerle test ederek raporlamıştır. Çalışmalarda *Frl*, Ty1 ve Ty3 dayanıklılık genlerini taşıyan domates bitkileri belirlenemez iken, ürün miktarı ve bazı meyve kalite karakteristikleri iyi olan 7 domates hattının hem FORL hem de TYLCV'e dayanıklı olduğunu bulmuşlardır.

2.6. *Fusarium oxysporum*'un Avirulens/Virülenslik Moleküler Mekanizmaları

Fungal patojen genleri, konukçuda sporların tutunması, çimlenmesi, enfeksiyonu ve kolonizasyonu gibi olayların oluşumunu içermektedir. Bu genler enfeksiyon yapısının formasyonu, hücre duvarı parçalanması, toksin biyosentezi ve sinyal iletimi gibi konularda kategorilere ayrılmaktadır (Idnurm ve Howlett 2001). Bazı virülenslik genleri konukçu savunma mekanizmasını yok eden veya baskı altına alan proteinleri kodlayan genlerden oluşmaktadır (Chi vd. 2009).

Konukçuya bağlı veya ondan bağımsız olarak gelişen uzun evrim süreci boyunca, hastalığa neden olan bu patojenik organizmalar, karmaşık bir biyosentetik yollardan proteinler veya diğer biyomoleküller üretebilme ve oluşturdukları bu kompleks yapılarla çeşitli virülans mekanizmaları geliştirmişlerdir. Fungal virülans genlerinin kodladığı proteinler konukçu ile ilişkilerini sağlamaktadır. Mikrobiyal organizma sisteminin neden olduğu hastalık derecesi, barındırılan virülans faktörleri ve konukçu sistemde uygulanan mikrobiyal varlıkların sayısı, uygulama yolu ve bir konukçuya özgü savunma mekanizmaları gibi diğer içsel mekanizmalar tarafından belirlenir. (Khan vd. 2009).

Bitki patojeni funguslardan *F. oxysporum* türleri genomlarında bulunan Hücre duvarını parçalayıcı enzimler (Cell wall degrading enzymes: CWDE) üreten genler ve çok sayıda konukçuda kolonizasyonu sağlayan diğer genleri üretebilmektedirler (Zhao vd.2013; Williams vd.2016; Aamir vd. 2018).

2.6.1. Effektör proteinleri

Konukçunun birincil savunma mekanizması patojenle ilişkili moleküler patern (Pathogen-Associated Molecular Patterns: PAMP) ile tanınması yoluyla aktive edildiğinde, FOL, bu tür aktif tepkileri bastırmasına izin veren mekanizmalar kullanmaktadır. Enfeksiyon işlemi sırasında sistein bakımından zengin küçük proteinler (efektör veya virülans proteinleri) salgılamaktadır. Bu proteinlerin işlevi, sinyal transdüksiyonu gibi çeşitli hücresel işlemleri bozarak veya konukçu bitkideki proteinleri modifiye ederek konukçu bitkide enfeksiyon ve kolonizasyonu teşvik ettiği belirtilmiştir (He vd. 2007). Effektörler konukçunun özgünlüğünü ve patojenin konukçu bağışıklığını manipüle etme yeteneğini belirlemektedir (Ma vd. 2015; Oliveira-Garcia vd. 2015). FOL'de bu efektörler, ksilemde (*Six*) salgılanan proteinler olarak tanımlanır ve bunları

kodlayan altı genin olduğu bildirilmiştir (Hauterman vd. 2007). Virulensiğe bağlı bu genler, FOL genomu içindeki küçük bir kromozom üzerinde bulunmuştur (Kashiwa vd. 2017).

Bitkilerdeki efektörlerin tanınması, C (Karbon)-amino terminalinde, bir nükleotit bağlanma yeri (NBS) ve değişken sayıda lösin açısından zengin tekrarlar (LRR) olarak işlev gören dayanıklılık (resistance: R) proteinleri olarak bilinen reseptör proteinlerle gerçekleşmektedir (McHale vd. 2006). Proteinlerin bu LRR alanının, patojenlerin ürettiği çeşitli ligandların tanınmasına katkıda bulunabileceği düşünülürken, amino terminal alanı patojenden gelen proteinin özgünlüğünü belirlemektedir. Bitkide bulunan bu reseptör proteinlere genel olarak NBS-LRR yapısı denilmektedir (Caplan vd. 2008; Elmore vd. 2008; Takken vd. 2006).

Efektör proteinlerin konukçu tarafından algılanması, bitki savunma sistemini oluşturmaktadır. FOL ya da FORL hastalık etmenine karşı R genlerine *I* genleri adı verilmiş olup gen için gen teorisine dayanmaktadır (Flor 1971). Bu nedenle FOL hastalık etmeninin ırklarına karşı domates bitkisinde farklı dayanıklılık genleri bulunmuştur (Şekil 2.1). Bu nedenle, konukçu-patojen arasındaki uyumlu veya uyumsuz etkileşimler FOL etmeninin üç *avirülans* (*Avr 1-3*) geni ile domates bitkisinde karşılık buna karşılık gelen 3 *dayanıklılık* (*I-I3*) genleri arasında olduğu bildirilmiştir (Inami vd. 2012).

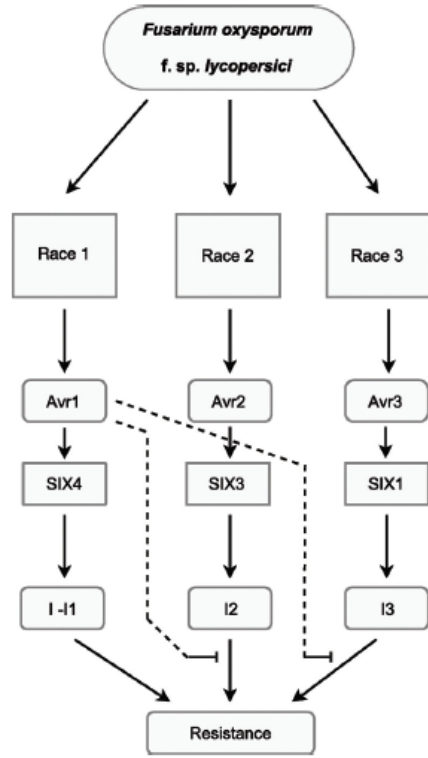
FOL Six4 proteinleri proteini, *Avr1* geni tarafından kodlanan, fungusun bir virülans efektör proteindir. Bu Six4 proteini 184 amino asitten oluşmakta olup yapısında 6 sistein amino asit içermektedir. Çalışmalar SIX4 proteininin FOL ırk 1 de bulunduğunu bu karşılık domates bitkilerinde *I* ve *I-1* genlerinin bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca, domates *I-2* ve *I-3* dayanıklılık genlerinin hastalığın kontrolünde patojenden gelen Six3 proteinini tanıdığını ve bu proteinin de FOL *Avr2* geni tarafından üretildiğini ortaya koymuştur (Hauterman vd. 2008).

Domates *I* ve *I-1* genleri sadece FOL ırk 1'e dayanıklılığı sağlamaktadır. Domates bitkilerinde bulunan *I-2* geni FOL ırk 2'ye *I-3* geni ise FOL ırk 3'e karşı dayanıklılığı kontrol eden genlerdir (Rep 2005). Bir başka ifadeyle *I*, *I-1*, *I-2* ve *I-3* genleri taşıyan domates bitkileri FOL tarafından üretilen Six1, Six3 ve Six4 proteinlerini tanıyarak domates bitkilerinin hastalık etmenini kontrol etmesini sağlamaktadır. Six1, Six3 ve Six4 proteinleri sırasıyla FOL'un *Avr1*, *Avr2* ve *Avr3* avirulens genleri tarafından oluşturulmaktadır (Rep vd. 2004).

Gen mutasyonu deneyleri *I* ve *I-1* dayanıklılık geni için FOL *Avr1* geninin kodladığı Six4, *I-2* dayanıklılık geni için *Avr2* genin kodladığı Six3, *I-3* geninin kontrol ettiği dayanıklılık için *Avr3* geninin kodladığı Six1 proteinini gerekli olduğunu gösterilmiştir (Hauterman vd. 2008; Hauterman vd. 2009). Çalışmalar Six4 proteinin sadece FOL ırk 1 de FOL ırk 2 ve ırk 3 izolatlarında ise sadece Six3 protein amino asitlerinde farklılık olduğunu göstermiştir. (Lievens vd. 2009). Bu nedenle, FOL ırk 2 nin FOL ırk 1 den farklı olarak sahip olduğu Six4 proteininin kaybıyla evrimleşirken Six3 proteinindeki mutasyonlar FOL ırk 3 ırklarının gelişmesine yol açtığını göstermiştir (Hauterman vd. 2009).

Six1 proteinini kodlayan *Avr3* geni FOL etmeninin domateste virülans için gerekmektedir. Yapısı 189 amino asitten oluşur ve 8 tekrarlanan sistein amino asidi

içermektedir. *Avr3* genin kodladığı *Six1* proteini domates bitkisindeki *I-3* dayanıklılık geninin kontrol ettiği bir mekanizmayla dayanıklılığı kontrol ettiği bildirmiştir. (Şekil 2.1) FOL *Avr3* geni canlı bitki hücrelerinde etmenin kök korteksinden penetrasyonundan hemen sonra *Six1* proteinini üretmeye başladığı ortaya konmuştur (Van der Does ve Duyvesteijn 2008; Rep 2005).



Şekil 2. 1. *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ırklarının Avirulens genleri ile domates bitkilerindeki *I* dayanıklılık genleri arasındaki ilişkiye göre şekilsel sınıflandırılması (Garcia-Enciso vd. 2018)

FOL etmenlerinin *Avr* genleri *Six* Gene Expression 1 (SGE1) adı verilen proteinler üretmektedir. Bu SGE1 proteini FOL fungusunun konukçu dokularında vejetatif büyümesi, etmenin kolonizasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Michielse vd. 2009). Ayrıca domates bitkilerinde dayanıklılık genleri ile doğrudan veya dolaylı olarak etkileşime giren FOL tarafından üretilen *Six* efektör proteinleri tanımlanmıştır (Takken ve Rep 2010).

2.6.2. Trankripsiyon faktörler ve bitki hücre duvarın enzimatik bozulması

Fusarium patojenlerinin hastalık oluşturan formlarının gelişmesinde virülans genleri önemli role sahiptir. Bu genler temel olarak yatay gen transferi yoluyla diğer *Fusarium* etmenlerinden kazanılmaktadır. Bu avirulens genleri patojenin konukçuda virülansla ilgili arginler, toksinler, adezinler ve aggressinler gibi moleküllerin oluşturulmasından sarumludurlar (Saunders vd. 2001).

Fungusun hastalık oluşturmasında moleküler mekanizmaların hassas konukçularda oluşmasını sağlayan virölenslik genleri ilginç bir yapıya sahiptirler. Bu virölenslik genleri konukçunun moleküler ve hücresel yapılarını değiştirerek konukçu içeriğindeki besinlerin alınmasını sağladığı ortaya konmuştur. Bir fungusun hastalık yapabilmesi konukçu dokularına adapte olma ve konukçu savunma mekznimzlarını geçebilme yeteneğine bağlıdır. Nitekim virölens faktörü olarak bilinen enzim molekülleri bu *virölenslik* genleri tarafından üretilmektedir (DeZwaan vd. 1999).

Fga1 geni G proteininin α alt-birimi üretmekte olup bu protein fungusun konukçu köklerine yapışmayı sağlayan ve elisitörproteinlerinin üretilmesini sağlayan bir gendir. Hastalık oluşabilmesi için bu G proteinlerin alt birimleri α ve β , *Fga1* ve *Fgb1* yapıları gereklidir. Yapılan çalışmalar bu genler üzerinde mutasyonlar oluşturulduğunda bu mutant *Fusarium*'larda ısıya karşı çok bir reaksiyon oluşturduğu, bunun sonucunda da *Fusarium* etmeninin konidia oluşumunun değiştiği bulunmuştur (Jain vd 2002).

Snf1 geni protein kinaz üretmekte olup konukçu hücrelerinde karbon yapılarının oluşmasını baskılayan, *Fusarium*'un bu hücrelerden hızlıca karbon ve enerjiyi almasını sağlayan gendir. *F. oxysporum*'un sükroz fermente etmeyen bu *SNF1* geni değiştirildiğinde *Arabidopsis thaliana* konukçu bitkisi üzerinde azalmış bir virölenslik gösterdiği ve hücre duvarını parçalayan enzim etkisinin de aynı oranda azaldığı gösterilmiştir (Ospina - Giraldo vd. 2003).

Frp1 geni *Fusarium* etmeninin F box proteinini ve ubiquitin liyaz kompleks proteinini oluşturan bir gendir. Konukçu hücre yapısının bozulmasında ve değişiminde rol oynamaktadır. FOL etmeninin penetrasyonunu sağlamaktadır. Ayrıca, *FRP1* geni *F. oxysporum* etmeninin hastalık yapabilme yeteneğinde rol alan ubiquitin-proteazom sinyal proteinlerinin oluşmasını sağlamaktadır. *Frp1* geni mutantlarının FOL etmeninin enfeksiyon yapabilme yeteneğinkaybolmasına neden olduğu bildirilmektedir (Duyvesteijn 2005). Domates bitkisinde hastalık yapan *Fusarium* fungusları *Frp1* Sıx1 (Secreted In Xylem), gibi spesifik virölens genlerini üretebilmektedir. (Rep vd. 2004; Rep 2005). FOL patojenleri Polygalakturonozmutantı, konukçu hücrelerinin duvarlarını parçalayan enzim mutantları karbonhidratlar gibi bazı besinlerin serbest kalarak PG, ksilanazlar, pektat liyazlar, proteazlar ve hücre duvarını parçalayan enzimlerin oluşmasını engellediği bulunmuştur (Yadeta ve Thomma, 2013).

ChsV geni sınıf V kitin sentaz proteinlerini kodlamakta olup *Fusarium* N-asetilglukozamin polimerizasyonunu katalize eden çok sayıda kitin sentaz proteinini üretmektedir. Bu gen FOL hiflerinin gelişimini sağlamakta olup kitin sentaz pproteinlerinin oluşturulmasında görev aldığı belirtilmiştir (Munro ve Gow 2001; Ruiz-Herrera vd. 2001; Roncero 2002). FOL hücre zarındaki kitinin sentezi konukçu hücre duvarı yapısında fiziksel değişikliklerin oluşmasını sağlamaktadır. Kitin sentaz proteinlerifunguslarda aminoasit sekansı benzerliklerine dayanarak yedi sınıfa ayrılmıştır. Domates bitkilerinde FOL un kitin sentezinde rol oynayan *chs1*, *chs2*, *chs3*, *chs7* ve *chsV* genleri izole edilmiş ve bunlar karakterize edilmiştir. Bu *Chs1*, *Chs2*, *Chs3* ve *ChsV* genleri sırasıyla I, II, III ve V sınıflarına ait olup bitkide fungusun hastalık yapabilme yeteneğini göstermektedir (Di Pietro vd. 2003). *ChsV* geni mutasyona uğratılmıştır ve FOL ile inokule edilen domates bitkilerinin enfekte olmadığı ve bu bitkiler üzerinde kolonizasyon oluşturmadığı gösterilmiştir. (Madrid vd. 2003).

Günümüze kadar 4 yapısal ksilanaz geni *F. oxysporum*'dan klonlanmıştır ve bunların hepsi domates bitkilerinin enfeksiyonu sırasında rol oynamaktadır (Gómez-Gómez vd. 2001, 2002; Ruiz-Roldán vd. 1999). Genomu dizilenen *F. graminearum* un farklı karbon kaynaklarında büyüme sırasında 30'dan fazla farklı ksilanaz geninin üretildiği saptanmıştır (Hatsch vd. 2006). Bu enzimlerin enfeksiyon sürecine katkıda bulunduğu görülmüştür (Gómez-Gómez vd. 2002; Calero-Nieto vd. 2007).

Pg1 geni Endopoligalakturonaz proteini kodlamakta olup konukçu hücrelerindeki pektinin tamamen yok olmasına neden olmaktadır. *Fusarium* etmenlerinin konukçu bitkideki kolonizasyonu ve enfeksiyonu aşamalarında bu enzimin rolü oldukça önemlidir. Bu enzim, enfeksiyon sırasında ilk oluşan enzim olup poligalakturonaz enzimi ile oldukça benzer bir yapıya sahiptir. Hastalık etmeninin endo ya da ekzo *PG* aktivitesi göstermesine neden olarak konukçu hücre ölümü ve parçalanmasına neden olmaktadır (Huertas-González vd. 1999).

PL1 geni Pektat liyaz proteini kodlamakta olup bu proteinin karboksil ucunda glikozidik bağları kıran bir yapı bulunmaktadır. *PL1* geni 240 amino asit uzunluğunda bir polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Huertas-González vd. (1999) yaptıkları çalışmada, *PL1* geninin kodladığı pektat liyaz proteininin poligalakturonik asitle birlikte domates vasküler dokularında oluştuğunu bulmuşlardır. Yapılan RT-PCR çalışmaları, FOL ile enfekte olan domates bitkilerinin köklerinde ve saplarında *PL1* geninin proteinlerinin hızla üretildiğini, göstermiştir. *F. oxysporum*'un neden olduğu vasküler solgunlukta pektat liyazın vasküler sisteme ulaşmak için kök korteksin farklı katmanlarının penetrasyonu sırasında ve konukçuda kolonizasyon sırasında önemli rolü olduğu ispatlanmıştır (Beckman 1987).

Xy12 geni ksilanaz proteinin, üretmekte olup bitkilerdeki temel yapı taşı olan hemiselülozun parçalanmasını sağlamaktadır. Ksilan, b-l, 4-D ksilopiranosil gibi kimyasal yapılardan oluşan, heterojen bir karbonhidrat yapısındaki bu enzim bitki hücre duvarlarının parçalanmasını sağlamaktadır (Biely 1993). *XY12* geninin ürettiği ksilanazlar çok çeşitli bakteriyel ve fungal bitki patojenlerinden izole edilmiştir (Walton 1994). *F. oxysporum* etmenlerinde bu ksilanazların varlığı detaylı olarak rapor edilmiştir (Jones vd. 1991; Alconada ve Martõñez 1994; Christakopoulos vd. 1996; Ruiz vd. 1997).

Fem1 geni *Fusarium* hücre dışı matriks proteinini üretmekte olup bu protein hastalık etmeninin elisitör proteinlerini ve bunların konukçudaki karşılığı olan reseptör proteinlerle etkileşimini sağlamaktadır (Schoffemeer vd. 2001).

Schoffemeer vd. (2001) yaptıkları bir çalışmada, domates bitkisinde hastalık yapan FOL'ün hücre duvarını yıkan glikoproteinlerini karakterize etmişlerdir. FOL etminin 60 kilodalton büyüklüğünde glikoprotein üreten *Fem1* geninin klonlanmıştır. Sonuç olarak *Fem1* protein mutantının konukçu bitki hücrelerindeki matriks yapılarına bağlanamadığı ve hastalık yapma yeteneğini kaybettiğini ortaya koymuşlardır.

Arg1 geni argininosükinat liyaz proteini üretmekte olup hücre duvarını parçalanmasında görev alan bir enzimdir. Namiki vd. (2001) yaptıkları bir çalışmada, özel bir mutasyon sistemiyle *Arg1* geni üzerinde değişiklik yaparak bu geninin *F. oxysporum*'un hastalık yapma yeteneğini nasıl değiştirdiğini araştırmışlardır. Test edilen

1129 mutantından 13'ü hassas çeşitlerde azalmış bir patojenisite oluşturmuşlardır. Mutantlar argininosüksinat liyazı ve arginin biyosentezini katalize eden *ARG1* genini tanımlanmıştır. Bu geninin üretimiyle *Fusarium oxysporum* patojeninin hastalık yapma yeteneğinin arttığını ortaya koymuşlardır. .

Fmk1 geni mMitogenle aktive olan protein kinaz proteinini üretmektedir. Bu protein serin ve treonin aminoasitleri içeren özel bir protein kinazdır. Konukçu hücrelerinde dayanıklılık reaksiyonunun oluşturulmasında da rolü vardır. Di Pietro vd. (2001) bir çalışmada, mitogenle aktive edilmiş protein kinazı (MAPK) kodlayan *F. oxysporum*'un *Fmk1* ya da *fmk1* genini izole etmişlerdir (Xu 2000;(Li vd. 1997; Di Pietro vd. 2001). Fitopatogenik fungusların MAPK'ları çeşitli bitki enfeksiyonlarında morfolojik değişimlere ve hastalık yapma yeteneğinde anahtar bir rol oynamaktadır (Xu 2000).

Son olarak *Fow1* geni mitokodriyal taşıyıcı proteinleri oluşturmaktadır *Fusarium* etmenin fonksiyonunda işlev görmekte olup bitki köklerinde hastalık etmeninin kolonize olmasını sağlamaktadır. *Fow1* geni virülensliğe etki eden anahtar faktörler olarak gösterilen hücre duvarını parçalayan enzimleri ve bitki saponinlerini detoksifiye edici enzimlerin oluşmasındagörev alan genlerdir (Arie vd.1998; Di Pietro ve Roncero 1998; Huertas-González vd.1999; Roldán-Arjona vd.1999; Ruiz-Roldán vd.1999; García-Maceira vd.2000).

Inoue vd. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, *F. oxysporum* f. sp. *melonis* 'te restriksiyon enzim aracılı DNA entegrasyon mutasyonu oluşturularak B60 mutanlığı elde edilmiştir. B60 mutanlığının fungustaki mitokodriyal taşıyıcı proteinini kodlayan *Fow1* geni mutanlığı olarak tanımlanmıştır. FOL etmeninin bitki dokusunda kolonizasyonu için *Fow* geninin önemli olduğu ve virülenslik için gerekli olduğu doğrulanmıştır.

Fow2 geni transkripsiyon faktörü olarak bilinen bir proteini üretmektedir. Bu genin ürettiği protein bitki köklerinde enfeksiyonun başlangıcından kolonizasyona kadar tüm aşamalar bitki dokusunda zararlanmanın oluşumundansorumludur. FOW2 geninin varlığı sadece yüksek derecede virulent izolatlarda bulunan protein olarak tanımlanmıştır (Michielse vd. 2009; Imazaki vd. 2007; Ramos vd. 2007; Asuncion vd. 2010).

3. MATERYAL VE METOT

Bu bölümde; araştırmada kullanılan materyaller, denemenin kurulumu ve laboratuvar çalışmalarında uygulanan yöntemlerle ilgili bilgilere yer verilmektedir.

3.1. Bitki Materyalleri

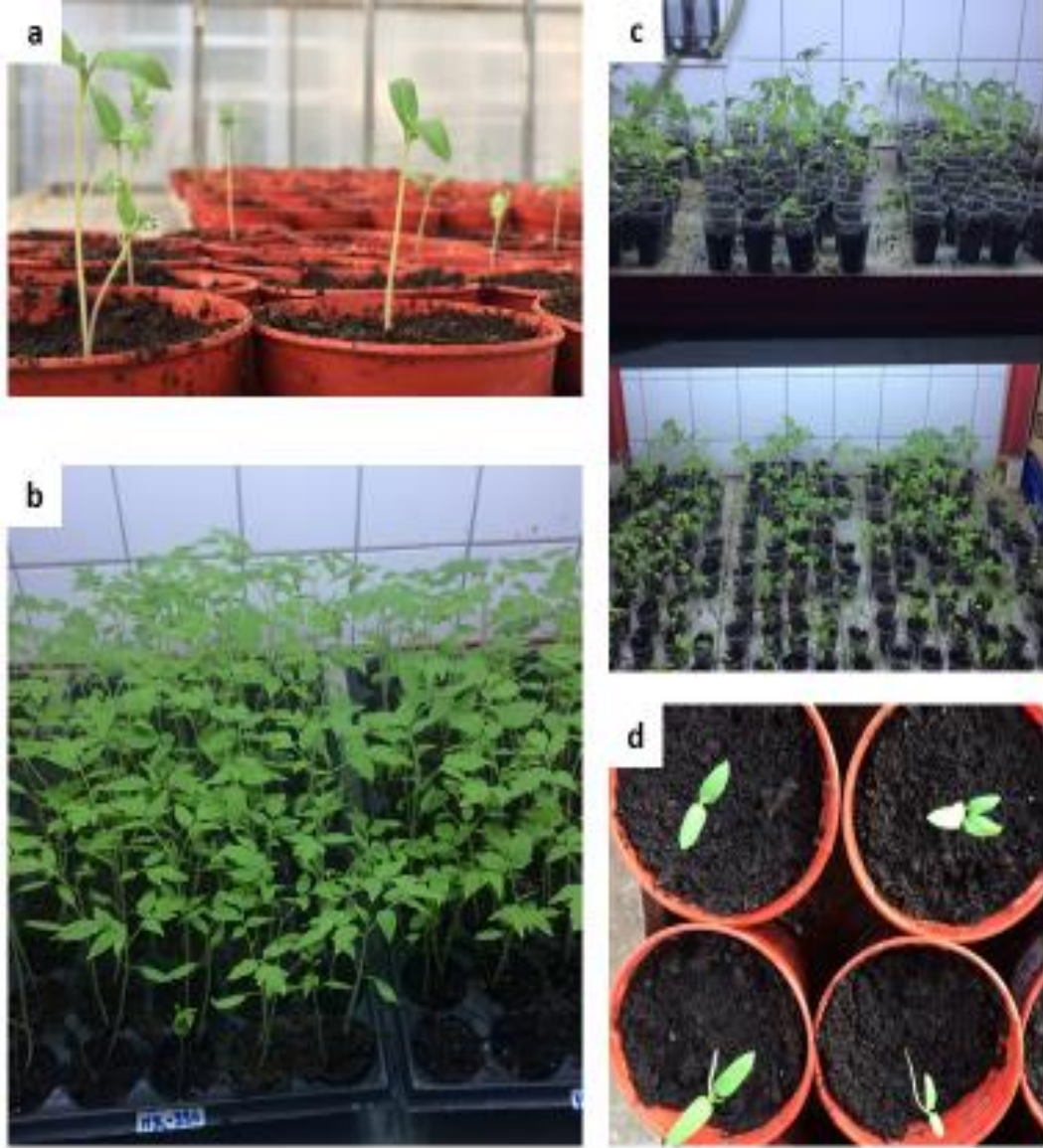
Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü 3 no'lu iklim odasında denemeler kurulmuştur (Şekil 3.1). Denemede 5 domates çeşidi kullanılmış olup bunlardan 4 tanesinde *Fusarium* spp.'ye dayanıklılığı sağlayan farklı *I-11*, *I2*, *I3*, *Frl* genleri bulunmaktadır. Diğer bir ticari çeşit ise hassas olup, kontrol bitkisi olarak kullanılmıştır. (Çizelge3.1) Her bir deneme 5 tekerrür olup tesadüf deneme parselleri düzene göre kurulmuştur.

Çizelge 3. 1. Bitki materyallerin *Fusarium*'ların dayanım özellikleri

Çeşit	Dayanım
HX-596	FOL-0,1,2,3
HX-520	F3
HT-5160	F1, F2
Fb18-627	FORL
H2-2274	HASSAS

3.1.1. Bitkilerin yetiştirilmesi

Temin edilen domates çeşitleri steril torf içeren viyollere ekilmiştir. Ekilen viyoller 16 saat gündüz 8 saat gece periyodunda, %50 nispi nem ve 25 ± 3 °C olan Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü İklimlendirme odasına yerleştirilmiştir. Gelişen fidelerin sağlıklı yetişebilmesi için torf içerisine sıvı besin elementi (SuperEnergy,) takviyesi yapılmıştır. Bitkilerin sağlıklı gelişebilmeleri için beyazsinek, afit gibi zararlılara karşı rutin insektisit uygulamaları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 1. Domates Fidelerinin iklimlendirme odasında gelişimleri. a) Tohumların ekildikten 2 hafta sonrası gelişimleri; b) HX-596, HX-520, HT-5160, Fb18-627 ve H2-2274 çeşitlerin 1 ay sonra viyollerdeki gelişimleri; c) iklimlendirme odasında gelişen çeşitlerin şaşırtılması; d) H2-2274 standart çeşidin tohumlarının çimlenmesi

3.2. FOL ve FORL İzolatları

2016-2017 yılında Antalya ve çevresinde yapılan survey çalışmasında domates üretimin alanlarından *Fusarium* izolatları toplanmıştır. Bu izolatların *Fusarium* alt-türleri ve ırkları belirlenmiştir. Bu izolatların büyük çoğunluğu en fazla sera üretiminin yapıldığı Kumluca ilçesinden temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan toplam 20 FOL ve FORL izolatlarından oluşan bu funguslar Çizelge 3.2 de verilmiştir.

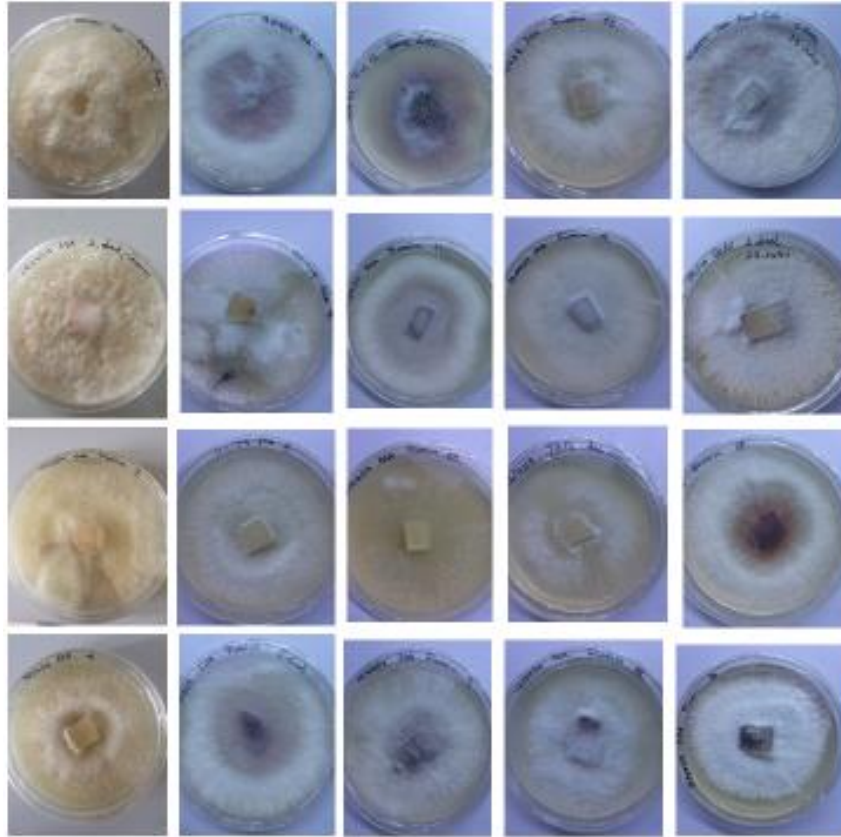
Çizelge 3. 2. Karakterize edilmiş *Fusarium* izolatları ve moleküler analizlerle ırkları

İzolat No	Lokasyon	<i>Fusarium</i> Suspecies/Irk
1	Kumluca	FORL
2	Turunçova	FOL Irk 3
3	Demre	FOL Irk 2
4	Serik	FOL Irk 3
5	Serik	FOL Irk 3
6	Serik	FOL Irk 3
7	Gazipaşa	FOL Irk 3
8	Kumluca	FOL Irk 2
9	Elmalı	FORL
10	Gazipaşa	FOL Irk 2
11	Kumluca	FOL Irk 2
12	Kumluca	FORL
13	Demre	FOL Irk 3
14	Kumluca	FOL Irk 3
15	Kumluca	FORL
16	Kumluca	FORL
17	Kumluca	FOL Irk 2
18	Kumluca	FORL
19	Demre	FOL Irk 2
20	Serik	FORL

Fusarium izolatların misel ve spor gelişimleri için Patates Dekstroz Agar (PDA) hazırlanmıştır. (Ek 1 verilmiştir.) PDA ortamının hazırlanması: 500 ml ddH₂O, 20 gr Patates Dekstroz Agar (Merck) kullanılmıştır. Hazırlanan ortam otoklavda 121 °C’de sıcaklıkta 1 atm basınçta 20 dakikada steril yapılmıştır. Steril plastik Petrilere 25 ml ortam konmuştur. Elde edilen FOL ve FORL izolatları -20°C’de Patates Dekstroz Agar (PDA) ortamı içerisinde geliştirilmiştir. Steril kabin içerisinde stoktan alınan misel parçaları PDA üzerine bırakılarak Petrilerin çevresi parafilm ile kaplanarak Petriler 28°C’de etüve yerleştirilmiştir. Geliştirilen 12 FOL ve 7 FORL izolatları (Şekil 3.2) fenotipik ve genotipik çalışmalarda ve DNA izolasyonları çıkarılarak moleküler testlemelerde kullanılmıştır.



Şekil 3. 2. PDA ortamın hazırlanması; **a)** Patates Dekstroz Agar; **b)** Otoklavdan çıkan PDA' nın petrilere dağıtılması



Şekil 3. 3. Çalışmalarda kullanılan 13 FOL ve 7 FORL izolatlarının Patates Dekstroz Agar ortamında görünüşleri

3.3. FOL ve FORL Genotipik Çalışmalar

Petride geliştirilen 13 FOL ve 7 FORL izolatından DNA izolasyonu CTAB Protokolü kullanılarak yapılmıştır (Doyle ve Doyle 1990). Genotipik çalışmalarda Fusarium izolatlarının avirulens genlerini ve virulenslikten sorumlu genlerini tespit edebilmek için polimeraz zincir reaksiyonları (Polymerase Chain Reaction: PCR) analizleri kullanılmıştır.

3.3.1. Toplam DNA izolasyonu

Fusarium izolatlarından toplam DNA ekstrasyonunda CTAB protokolü (Doyle ve Doyle 1990) takip edilmiş olup kullanılan ekstrasyon solüsyonları aşağıda verilmiştir. Bunun için PDA besi ortamında 28°C de 7 gün gelişen misel ve sporları öze yardımıyla 1,5 ml eppendorf tüplerine konulup üzerine 500 µl CTAB tampon çözeltisi bu - CTAB solusyonu aşağıda 1 litre hazırlanması Çizelge 3.3 'te verilmiştir. Daha sonra miselleri plastik ezme çubukları (pessle) ile her tüp için farklı bir çubuk kullanılarak iyice ezilmiştir. Ezme işleminin ardından DNA'ların sıvıya geçmesini sağlamak için 65 °C'de 2 saat 900 rpm hızıyla çalkalayan inkübatörde tutulmuştur. İnkübasyondan sonra örneklerden proteinin uzaklaştırılması için 600 µl kloroform-isoamil alkol (25 volume: 1 v) çözeltisi konularak 1-3 dakika (d) kadar hafifçe ters düz edilerek çalkalanmıştır. Örnekler daha sonrasında 15 d boyunca 12000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen örneklerde tüpün alt kısmında kloroform, orta tabakada protein ve üst fazda ise DNA bulunduğu sıvı olmak üzere fazlara ayrılmıştır. Tüpün içerisinde bulunan süpernatant (üstteki sulu kısım) yeni 1,5 ml'lik steril eppendorf tüplere yaklaşık 500 µl olarak alınmıştır. Bu kısım içerisindeki DNA'nın çökmesi için üzerine 500 µl hacimde -20 °C'de bulunan soğuk izopropanol konulup 15 saniye kadar hafifçe ters düz edilerek çalkalanmıştır ve ardından -20 °C'de derin dondurucuya konularak 1,5 saat kadar bekletilmiştir. Daha sonra -20 °C'den alınan örneklerin DNA'larının çökmesi amacıyla 14000 rpm hızıyla 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlemin sonunda tüplerin dibinde pellet oluşmuştur. Pelet yerinden oynatılmadan tüpün içerisindeki sıvı boşaltılmış ve pelet üzerine -20 °C'de bulunan %70'lik etanolden 500 µl konularak peletler yıkanmış ve 14000 rpm hızında 5 dakika boyunca tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen tüplerin dibindeki pelete zarar vermeden sıvılar dikkatlice boşaltılmış ters çevrilerek 1 saat boyunca ağzı açık vaziyette tüp içerisinde kalan etanolün uzaklaşması sağlanmıştır. İyice kurduğundan emin olduğumuz tüplerin içerisine 80 µl oda sıcaklığında distile su konmuştur. DNA'ların suda çözülmesi için örnekler +4 °C'de bir gece bekletilmiştir. Daha sonrasında ise DNA'ların denatüre olmaması için -20 °C'de derin dondurucuda kullanılıncaya kadar saklanması sağlanmıştır.

DNA izolasyonu yapılan örneklerin DNA kalitelerine bakmak amacı ile %1,5'lik agarose jel hazırlanarak örnekler jele yüklenmiştir. Elektroforez cihazında 65 voltta 15 dakika koşan örnekler UV transilluminatör cihazı ile görüntülenmiştir.

Çizelge 3. 3. CTAB solüsyonu 1 litre olarak hazırlanması

Kimyasal	Molar (M)	Miktar (ml)
Tris pH 8.0	1 M	100 ml
EDTA (Ethylenediaminetetra Acetic acid Di-sodium salt) pH 8.0	0.5 M	40 ml
NaCl (Sodium Chloride)	5 M	280 ml
H ₂ O		400 ml

Yukarıda verilen CTAB solüsyonun hazırlanması Ph 8 olarak ayarlanmıştır. CTAB (Hexadecyl trimethyl-ammonium bromide) 20 gram eklendikten sonra manyetik karıştırıcı karıştırarak H₂O ilave edilmiştir. (EK 2 verilmiştir.)

3.3.2. Virulenslik genleri ve avirulens genlerin primerlerin belirlenmesi

Bu çalışmada *Fusarium* funguslarının virülensliği sağlayan genlerin ve avirulens genlerin primerlerini moleküler çalışmalarda kullanılmıştır. Çalışmalarda 13 FOL ve 7 FORL izolatının aşağıda belirlenen genleri PCR reaksiyonları ile çoğaltılarak yapılmıştır. Bu amaçla kullanılan virülensliği ve avirülensliği sağlayan genlerin primer çiftleri, bağlanma sıcaklığı ve ürün boyutları Çizelge 3.3 ve Çizelge 3. 4 gösterilmiştir.

Çizelge 3. 4. Patojenin avirülens genleri için kullanılan primerler

Primer	Sequence (5' - 3')	Hedef gen	Ürün Boyutu (Bp)	Bağlanma Sıcaklığı	Referans
P12-F2B	GTATCCCTCCGGATT TTGAGC	<i>Avr3</i> (<i>SIX1</i>)	992 bp	55 C°	Vander Does vd. (2008)
P12-R1	AATAGAGCCTGCAA AGCATG				
SIX4-F1	TCAGGCTTCACTTAG CATAC	<i>Avr1</i> (<i>SIX4</i>)	967 bp	55 C°	Lievens vd. (2009)
SIX4-R1	GCCGACCGAAAAAC CCTAA				
SIX3-F1	GGCAATTAACCACT CTGCC	<i>Avr2</i> (<i>SIX3</i>)	608 bp	55 C°	Hortman vd. (2009)
SIX3-R1	CCAGCCAGAAGGCC AGTTT				

Çalışmalarda kullanılan avirulens genleri *Fusarium* türlerinin konukçu ile ilişkilerini ayarlarken virulenslik genleri *Fusarium* etmeninin hastalık yapabilme yeteneğini

belirlenmektedir. Bu nedenle *Fusarium* türlerindeki virulenslik ve avirulenslik genleri ayrı ayrı verilmiştir.

Çizelge 3. 5. *Fusarium oxysporum* virülensliği sağlayan genlerin primerler

Primer	Sequence (5' - 3')	Hedef gen	Ürün boyutu (Bp)	Anneling sıcaklığı	Referans
FGA1-F	GATCGTGGTGTGC AAGAATG	<i>Fga1</i>	180 bp	59-60	Jain vd. (2002)
FGA1-R	GGAGGACATCCTG GTCGTTA				
SNF1-F	GGTCGGTATCTTG CCTTCAA	<i>Snf1</i>	117 bp	60	Ospina-Giraldo vd. (2003)
SNF1-R	GGGAGGTTCGTCG TTGATAA				
FRP1-F	TCGTGGCATACTC TCGTCAC	<i>Frp1</i>	180 bp	59-60	Duyvesteijn vd. (2005); Jonkers vd. (2009)
FRP1-R	CATTAGAAAGGCG AGCTTGG				
CHSV-F	GGCCAAGACGTTT CCAAGTA	<i>ChsV</i>	180 bp	60	Madrid vd. (2003)
CHSV-R	CAGGATAGATGCG AGCATGA				
PG1-F	GCCCGACCATTTT ATCGTTG	<i>Pg1</i>	725 bp	62	Di Pietro ve Roncero (1998)
PG1-R	GGCACCAGAGGG				
PL-F	AGTACACTGCCAT CCTCGCC	<i>Pl</i>	340-350 bp	62	Huertas-Gonzalez vd. (1999)
PL-R	GCAGCTCGTGGTA ACTCCA				
XY12-F	ACGTCGTTAACGA GATCTTCG	<i>Xy12</i>	509 bp	60-61	Gomez-Gomez vd. (2002)
XY12-R	AGCGTTGACAACA GCAGTGTA				
FEM1-F	ACCTCCGCCACTG GTGACTC	<i>Fem1</i>	358 bp	67	Schoffelmeyer (2001)
FEM1-R	ACCGCTCTCAGGG AACTGG				
ARG-F	GCATGGTCTGCTT GAAGTGA	<i>Arg1</i>	145 bp	61-62	Namiki vd. (2001)
ARG-R	GACGCTCGTTTGC AGTATGA				
FMK-F	GGAGCTGATGGA GACGGATA	<i>Fmk1</i>	90 bp	62	Di Pietro vd. (2001)
FMK-R	CGGAGGGTCTGGT AGATGAA				

Çizelge 3. 6. Devamı

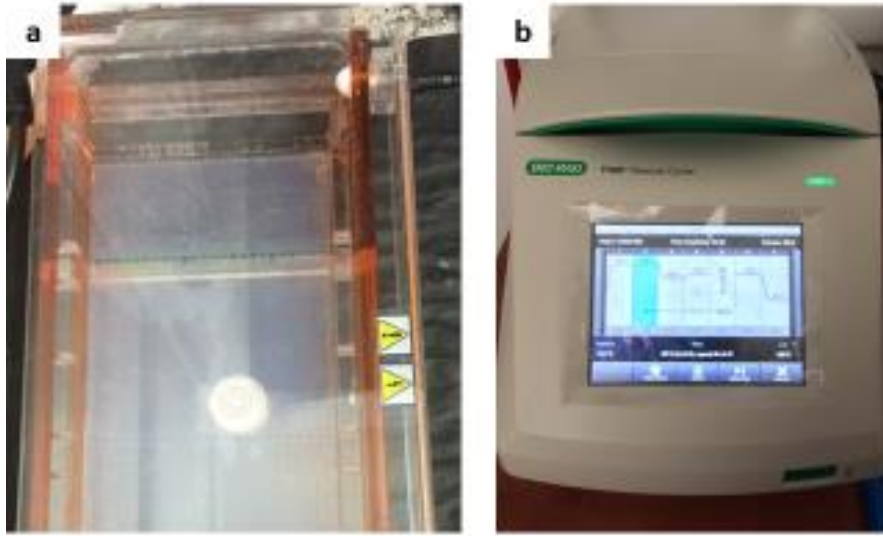
FOW1-F	CGAGATCACCAAG CACAAGA	<i>Fow1</i>	116 bp	60	Inoue vd. (2002)
FOW1-R	CGTTGACACCCTT GTTGATG				
FOW2-F	ATGCCACCCTGTT TGAGAAG	<i>Fow2</i>	148 bp	60-61	Imazaki vd. (2007)
FOW2-R	GAGGAGCCATCGT CGAGTAG				

3.3.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyon) çalışmaları

Çalışmalarda belirlenen virülenslik ve avirülens genlerin primerlerini 13 FOL ve 7 FORL izolatlarıyla testlenmiştir. PCR testlemelerin de genelde 25 µl hacimde bir reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Aşağıdaki PCR bileşenleri ve PCR döngü parametreleri Çizelge 3.5. ve Çizelge 3.6.'ta gösterilmiştir.

Çizelge 3. 7. Moleküler testlemelerde kullanılan PCR reaksiyon çözeltisinin bileşenleri

PCR Bileşenleri	Miktarı
2x Dream Taq Buffer (MgCl ₂)	2,5 µl
2.5 mM dNTP	0,5 µl
Taq polimeraz	0,25 µl
10 µM F-Primer	0,75 µl
10 µM R-Primer	0,75 µl
Template DNA (25 ng)	3,0 µl
ddH ₂ O	17,25 µl
Toplam Hacim	25,00 µl



Şekil 3. 4. Moleküler çalışmalarda kullanılan ekipmanlar; **a)** Elektroforezde koşturulmuş agaroz jelin görüntülenmesi; **b)** Polimeraz Zincir Reaksiyon analizlerinin yapıldığı Thermocycle

Çizelge 3. 8. Moleküler testleme için PCR döngü parametresi

Aşama	Sıcaklık(°C)	Süre(sn)	Döngü
Ön Denatürasyon	94	180	1
Denetürasyon	94	30	37
Bağlanma	60	30	
Uzama	72	60	
Son uzama	72	300	1

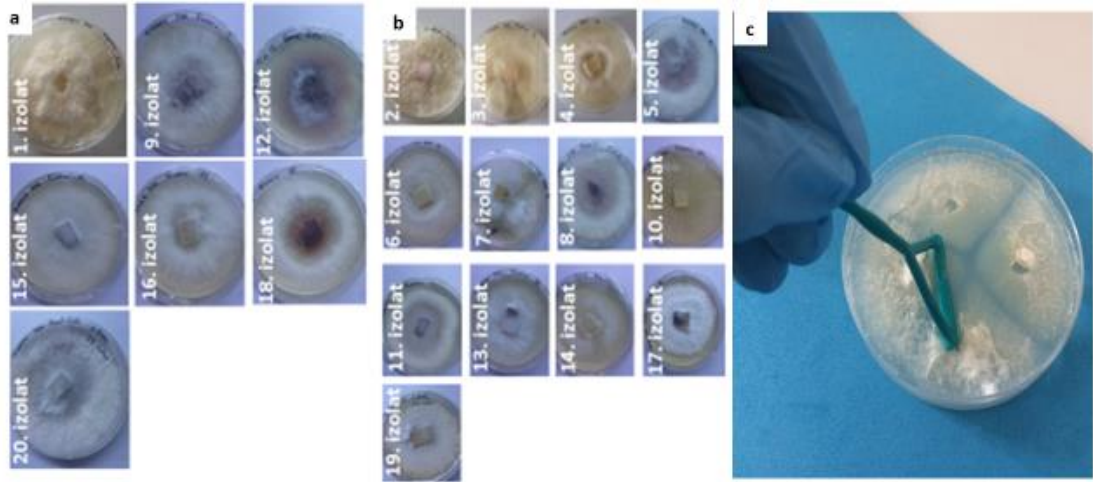
Her bir primer set için bağlanma sıcaklıkları farklı olmasına rağmen yukarıdaki Çizelge 3,6.'da verilen PCR parametrelerindeki denatürasyon, uzama ve reaksiyon döngüleri ve süreleri aynıdır.

3.4. FOL ve FORL Fenotipik Çalışmalar

Fenotip çalışmalarda 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla domates bitkilerinde patojenisite testlemeleri yapılmıştır. Çalışmada 5 farklı domates çeşidi 5 tekerrürlü 3-4 gerçek yaprağın olduğu dönemde inoküle edilmiştir. Bitkileri simptomolojik olarak değerlendirmeleri FOL için 0-4 skalası (Altınok ve Kamberoğlu 2005) ve FORL için 0-4 skalası (Chandler ve Santelman 1968) kullanılarak yapılmıştır.

3.4.1. FOL ve FORL izolatlarının geliştirilmesi ve testlemeler

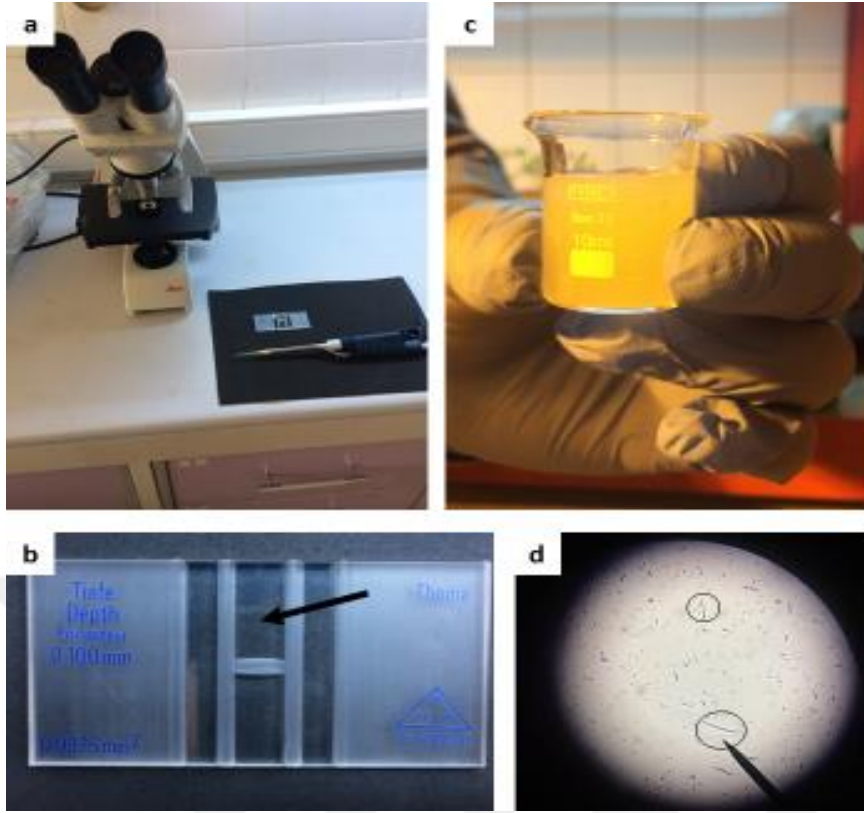
Çalışmada 13 FOL ve 7 FORL izolatları derin dondurucuda saklanan stok solüsyonlarından 150 µl alınarak PDA ortamına iyice yayıldıktan sonra +28°C’de inkübatörde 7-8 gün gelişmeleri sağlanmıştır. Gelişen misel ve sporları distile su ile hücre yayıcı malzemeye (Şekil 3.5. c) hasat edilerek makro ve mikrosporların suya geçmesi sağlanmıştır. Su içerisinde toplanan sporlar haemocytometre (Thoma lamı) yardımıyla 1×10^7 spor/ml yoğunlukta ayarlanarak köklere verilmiştir.



Şekil 3. 5. Fusarium izolatlarının bitki inokulasyonu öncesinde hazırlıkları; **a)** 7 FORL izolatının PDA ortamında gelişimleri; **b)** 13 FOL izolatının PDA ortamında gelişimleri; **c)** Sporların saf suya geçmesi hücre yayıcı ile kazılması

3.4.1.2. *Fusarium* yoğunluğunun belirlenmesi

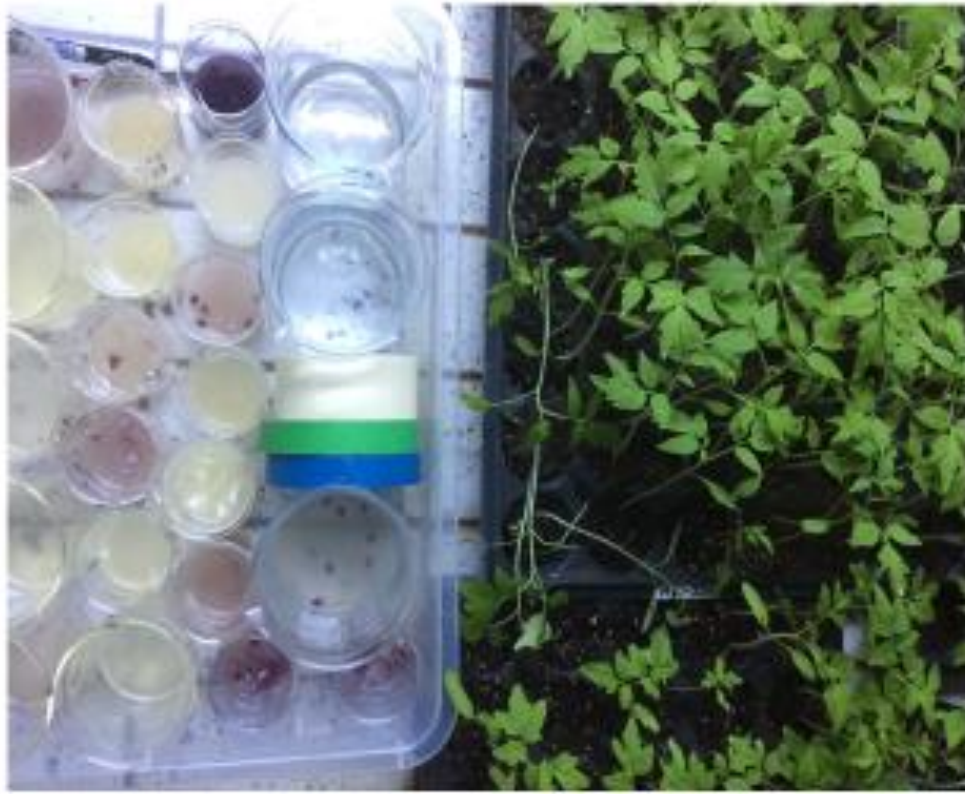
PDA ortamında distile su ile miselleri hücre yayıcı ile kazınarak sporların suya geçmesi sağlanmıştır. Hazırlanan su içerisindeki spor konsantrasyonunu belirlemek için Thoma lamında sayım yapılmıştır. Thoma lamın spor sayımı için kenarlardaki 4 noktasındaki alanlarda (0.1 mm en $\times$ 0.1 mm boy $\times$ 0.1 derinlik) sporlar sayılır. Ak bu 4 alandaki sporların ortalaması alınarak spor konsantrasyonları bulunmuştur. Spor konsantrasyonları faz kontrast Leica marka (Almanya) ışık mikroskopunda sayılmıştır. Sporların ayarlanan son konsantrasyonları 1×10^7 spor/ml dir.



Şekil 3. 6. Patojenisite testleri için 13 FOL ve 8 FORL izolatın yoğunluklarının ayarlanması; **a)** Işık mikroskobu (Leica) X10 büyütme ile spor sayımı; **b)** Spor sayımı için Thoma lamı kullanımı ok işareti bölgesine belli miktarda solüsyonun konulması; **c)** Patojenisite testi için kullanılan 1×10^7 spor /ml konsantrasyonu ayarlanmış *Fusarium* izolat solüsyonu; **d)** Işık mikroskobunda *Fusarium*' un spor yapılarının görünümü

3.4.2. *Fusarium* izolatlarının bitkiye inokülasyonu

İklimlendirme odasında geliştirilen bitkilerin kökleri bistüri ile yaralar açılarak inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan inokülasyon solüsyonu içerine bitki kökleri 5-10 dakika arası daldırılarak inokülasyon sağlanmıştır. (Şekil 3.6.)



Şekil 3. 7. İnokulasyon için hazırlanmış spor solüsyonu ve domates fideleri

3.4.3. Hastalıkların skorlanması ve ölçülmesi

Domates fidleri 13 FOLizolatı ile inokule edildikten sonra domates bitkilerdeki hastalık gelişmeleri aşağıda verilen 5 basamaklı 0-4 skalası kullanılarak ölçümlenmiştir (Altınok ve Kamberoğlu 2005). Ölçümler inokülasyonda sonra 7., 14., 21., ve 28. günlerde yapılmıştır.

Çizelge 3. 9. FOL ile inokule edilen domates bitkilerinde hastalık miktarının ölçülmesinde kullanılan skala

Hastalık Skoru	Fenotipik Hastalık Değerlendirme
0	Köklerde simpton göstermeyen bitkiler(dayanıklı)
1	Köklerde %25 hastalık(hassas)
2	Kök dokusunda %50 hastalık(hassas)
3	Köklerde %75 hastalık(hassas)
4	Kökler %100 hastalık(çok hassas)

İnokulasyonda kullanılan 7 FORL patojeni ile inokule edilen domates bitkileri nin sökülerek kök ve kök boğazları incelenerek yapılan hastalık miktarı ölçümlemesinde 0-4 skalasına kullanılmıştır (Chandler ve Santelman 1968).

Çizelge 3. 10. FORL ile inokule olmuş domates bitkilerinde hastalık miktarının ölçümlemesinde kullanılan skala

Hastalık Skoru	Fenotipik Hastalık Değerlendirme
0	Fidede herhangi bir zararlanma yok (Dayanıklı)
1	Fidenin toprak yüzeyi ile birleştiği yerde renk açılması ve küçük lezyonlar
2	Daha büyük lezyonlar gövdeyi çevirmiş durumda (Hassas)
3	Gövdeyi çevreleyen büyük lezyonlar, sonuçta konkav bir görünüm (Hassas)
4	Organizma zararı sonucu ölü bitki (Çok Hassas)

Hastalık şiddetin ölçümlemesi için:

Townsend- Heuberger formülüne göre hesaplama yapılmıştır. Hastalık şiddeti ölçümlemeleri Excel programına aktarılıp burada Tukey testine tabi tutulmuşlardır

$$\% P = \frac{\sum(n \times v)}{4N} \times 100$$

P: Hastalık şiddeti

n: Her skor derece için bitkilerin sayısı

v: Simptom göstermiş olan domates bitkilerin skor derecesi

N: Toplam bitki sayısı

İstatik analizlerde 13 FOL ve 7 FORL ile inokule edilen domateslerde ayrı ayrı hesaplanmıştır. Towsend-Heuberg ile % enfekteli bitki oranları bulunmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Fenotipik Çalışmalar

Fenotipik çalışmalar, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Binası içerisinde bulunan 3 No'lu İklimlendirme odasında gerçekleştirilmiştir. Survey çalışmalarında toplanan 13 FOL ve 7 FORL izolatu hassas ve dayanıklı domates bitkilerine inokule edilmiştir. İnoküle edilen hassas ve dayanıklı domates bitkileri en virulent, avirulent izolatları belirlenmesini sağlamıştır. Çalışmalar FOL 8 ırk 2 ve FORL 1 izolatlarını en virulent izolatlar olarak ortaya koymuştur.

Çizelge 4. 1. Test edilen tüm bitkilerde 7 FORL ve 13 FOL izolatlarıyla yapılan patojenisite testi sonucundaki hastalık oranları

İzolatlar	Hastalık Oranları (%)*	İzolatlar	Hastalık Oranları (%)*
FOL 8 ırk 2	18,75 ^a	FORL 15	4,38 ^e
FORL 1	15,94 ^b	FOL 5 ırk 3	4,38 ^e
FORL 19	15,94 ^b	FOL 6 ırk 3	3,44 ^e
FORL 12	14,06 ^c	FOL 17 ırk 2	1,88 ^f
FORL 20	13,13 ^c	FOL 11 ırk 2	0,94 ^g
FORL 9	11,56 ^c	FOL 3 ırk 2	0,0 ^h
FORL 18	6,88 ^d	FOL 13 ırk 3	0,0 ^h
FOL 2 ırk 3	6,25 ^d	FORL 16	0,0 ^h
FOL 14 ırk 2	6,25 ^d	FOL 10 ırk 2	0,0 ^h
FOL 4 ırk 3	6,25 ^d	FOL 7 ırk 3	0,0 ^h

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistik olarak önemlidir ($P \geq 0.05$).

Çizelge 4.1.'de yapılan Tukey testinde olasılık (Probability: P) değeri 0.05' ten büyüktür. Yapılan çalışmalarda aynı harfte bulunan hastalık oranların aynı şiddette hastalık yaptığını göstermiştir. en virulent FOL 8 ırk 2 ve FORL 1 izolatları bulunmuştur.

4.1.1. Simptomoloji bulgular ve değerlendirme

Simptomolojik bulgular, FOL ve FORL hastalık etmenlerinin genel belirtileri yapraklarda sararma, solma, köklerde kahverengi nekrozlar ve kahverengileşmeler şeklinde gözlemlenmiştir. Her domates çeşidinde aynı tipik belirtilerle karşılaşmıştır. Ancak domates çeşidine göre simptomolojik bulgular aşağıdaki gibi gruplandırılmıştır.

4.1.1.1. HX-520 domates çeşidinde belirtiler ve hastalık skorlaması

Çalışmalar, *I-11* ve *I3* dayanıklılık genlerini içeren HX-520 domates çeşidinin 13 FOL ve 7 FORL izolatlarıyla inokulasyon sonucunda elde edilen belirtiler Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 1. HX-520 domates çeşidinde; **a)** FORL 1; **b)** FORL 18; **c)** FOL 8 ırk 3; **d)** FORL 15 izolatların oluşturdukları belirtiler

Patojenisite testleri HX-520 bitkilerinin FORL izolatlarına karşı bir dayanıklılığa sahip olmadığını göstermektedir.. FORL 1 izolatı bitkilerde yapraklarda sararma ve solgunluk belirtileri (Şekil 4.1. a) oluşturmaktadır Aynı belirtiler FORL 18 izolatı içinde geçerli olup yoğun bir kloroz yapraklarda görülmektedir (Şekil 4.1. b). FORL 15 izolatı solgunluk göstermeyip yapraklarda tek taraflı sararma oluşturmaktadır (Şekil 4.1. d). HX-520 bitkisinde bulunan aynı zamanda FOL ırk 3 hastalandırmayan izolatlar tespit edilmiştir. Bunlar ise 7 ve 13 izolatlardır. HX-520 domates için izolatlar ve tekerrürler arasında varyans analizi yapılmıştır. Aşağıdaki Çizelge 4.1 gösterilmiştir.

Çizelge 4. 2. HX-520 bitkisinde 7 FORL ve 13 FOL izolatlarıyla yapılan patojenisite testi sonucundaki hastalık oranları

İzolatlar	Hastalık Oranları (%) [*]	İzolatlar	Hastalık Oranları (%) [*]
FORL 12	4,4 ^a	FOL 5 ırk 3	0,0 ^f
FORL 19	3,8 ^b	FOL 3 ırk 2	0,0 ^f
FOL 8 ırk 2	3,2 ^c	FOL 13 ırk 3	0,0 ^f
FORL 1	2,4 ^d	FOL 6 ırk 3	0,0 ^f
FORL 20	2,0 ^d	FORL 15	0,0 ^f
FORL 9	1,0 ^e	FORL 16	0,0 ^f
FOL 14 ırk 2	0,0 ^f	FOL 10 ırk 2	0,0 ^f
FOL 17 ırk 2	0,0 ^f	FOL 4 ırk 3	0,0 ^f
FOL 2 ırk 3	0,0 ^f	FOL 7 ırk 3	0,0 ^f

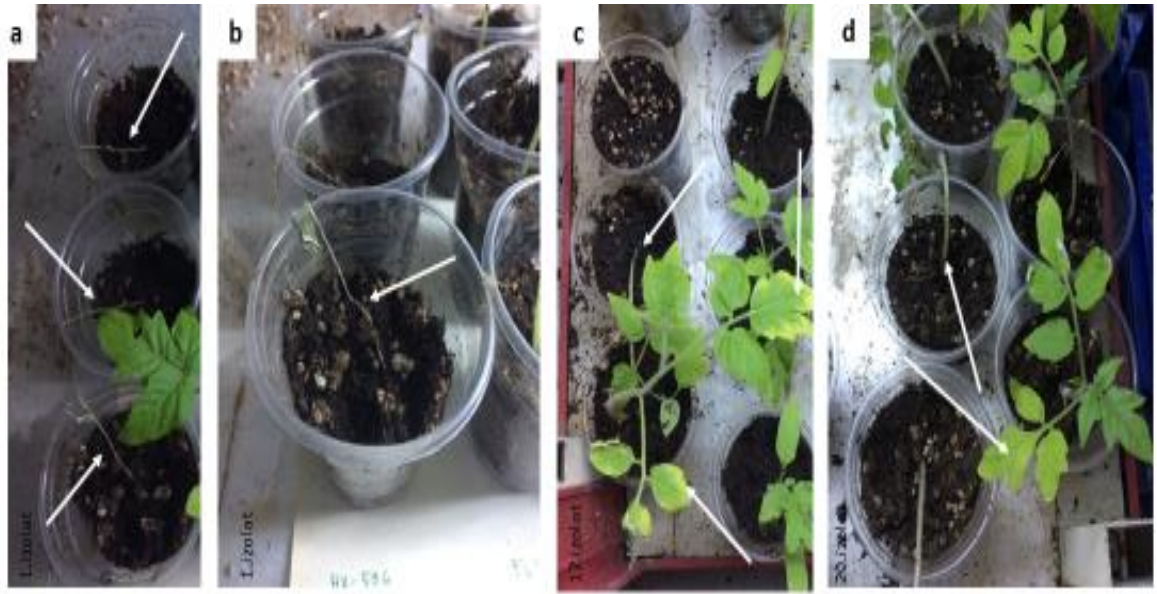
^{*}Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistik olarak önemlidir ($P \leq 0.05$).

Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi HX-520 domates bitkisi üzerinde en virulent FORL 12 izolatı olduğu bulunmuştur. İzolatların kendi aralarında HX-520 domates çeşidine

oluşturdukları hastalık oranlarının ortalamaları birbirinden farklı çıktığı gösterilmiştir. Yapılan Tukey testinde olasılık (Probability: P) değeri 0.05' ten büyüktür.

4.1.1.2. HX- 596 domates çeşidinde belirtiler ve hastalık skorlaması

HX-596 domates bitkisinin I0, I1, I2 ve I3 dayanıklılık genlerine sahip olup bu bitkiler 13 FOL ve 7 FORL izolatı ile inokule edilmiştir. İnokülasyondan sonraki 7 gün içerisinde FORL izolatlarının bu bitkileri şiddetli olarak hastalandırarak ölmelerine sebep olmuşlardır (Şekil 4.2 a, b, c ve d).



Şekil 4. 2. HX-596 domates çeşidinin 7 FORL ve 13 FOL izolatıyla yapılan patojeniste testleri. İnokülasyondan 7 gün sonra; **a, b)** FORL 1; **c)** FORL 12; **d)** FORL 20 izolatlarının oluşturdukları belirtiler

Şekil 4.2’de HX-596 bitkilerinin FORL1, 12 ve 20 (Şekil 4.2. a,b ve c) izolatlarıyla oluşturduğu tipik belirtiler göstermiştir. HX-596 domates bitkisi bu 3 FORL izolatlarıyla yoğun bir şekilde hastanmış olup, oklarla gösterildiği gibi gövdelerde incelmeler ve kahverengileşmeler, köklerde kahverengileşmeler ve yaprak kenarlarında tipik sararmalar göstermiştir. HX-596 domates bitkilerinde FOL ırk 2 ve ırk 3 izolatlarının hastalık oluşturduğu bulunmuştur. Bu izolatların hastalık belirtileri hafif olsa da bitkilerde zayıf gelişme olduğunda kendilerini daha belirgin olarak gösterebilirler. Örneğin FOL ırk 2, FOL3, FOL7, FOL8 ve FOL ırk 3 HX-596 domates bitkilerinde hafif belirtiler göstermiştir. Bunların oluşturduğu belirtiler gövdede incelmeler ve köklerde zayıf gelişme şekline olup laboratuvar ortamında yapılan re-izolasyonlarda bu hastalık etmenlerinin besin ortamında misel gelişimlerini başarı ile sürdürdükleri bulunmuştur.

Çizelge 4. 3. HX-596 bitkilerinin 13 FOL ve 7 FORL izolatu ile yapılan patojenisite sonuçları

İzolatlar	Hastalık Oranları (%) [*]	İzolatlar	Hastalık Oranları (%) [*]
FOL 4 ırk 3	4,0 ^a	FORL 20	1,6 ^c
FORL 9	4,0 ^a	FOL 17 ırk 2	1,2 ^{cd}
FORL 1	4,0 ^a	FOL 3 ırk 2	0,6 ^{de}
FOL 14 ırk 2	4,0 ^a	FOL 13 ırk 3	0,0 ^e
FOL 19 ırk 2	4,0 ^a	FOL 10 ırk 2	0,0 ^e
FOL 8 ırk 2	3,2 ^{ab}	FORL 12	0,0 ^e
FOL 2 ırk 3	3,0 ^b	FORL 16	0,0 ^e
FOL 5 ırk 3	2,8 ^b	FOL 7 ırk 3	0,0 ^e
FOL 6 ırk 3	2,8 ^b	FORL 18	0,0 ^e
FORL 15	2,8 ^b	FOL 11 ırk 2	0,0 ^e

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistik olarak önemlidir ($P \geq 0.05$).

Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi HX-596 domates bitkisi üzerinde en virulent FOL 4 ırk 3 izolatu olduğu bulunmuştur. İzolatların kendi aralarında HX-596 domates çeşidine oluşturdukları hastalık oranlarının ortalamaları birbirinden farklı çıktığı gösterilmiştir. Yapılan Tukey testinde olasılık (Probability: P) değeri 0.05’ ten büyüktür.

4.1.1.3. HT-5160 domates çeşidinde belirtiler ve hastalık skorlaması

HT-5160 domates çeşidi I0, I1 ve I2 dayanıklılık genlerine sahip çeşittir. İnokülasyon sonraki 14. Günde bitkilerde hiçbir belirtiler görülmezken 16. günden sonra bitkilerde sararmalar ve ani olarak solgunluk göstermiştir. HT-5160 domates çeşitlerinin FORL ve FOL izolatlarıyla olan inokülasyon sonuçları Şekil 4.3’te gösterilmiştir.



Şekil 4. 3. HT-5160 domates çeşidinin; **a)** FORL 20; **b)** FORL 15; **c)** FOL 10 ırk 3 izolatlarıyla inokulasyondan 16 gün sonraki görünüşleri

Şekil 4.3 (a) bakıldığında, FORL 20 izolatının bitkideki belirtileri göstermiştir. simptomolojik olarak *Fusarium*'un tipik belirtiler bulunmuştur; gövde de kahverengileşme, bitkinin tek taraflı yaprak sararması ve kökte zayıflık, kahverengileşmiş nekrotik lekeler ve saçak köklerde sıyrılma siyah oklarla belirtilmiştir. Şekil 4.3 (b) bakıldığında, FORL 15 izolatı gösterilmiştir. Bitki de sararıp solma şekilde belirtiler göstermiştir. FOL (ırk 3) 10 izolatıyla inoküle edilmiştir. (Şekil 4.3. c) Ancak HT-5160 dayanım gösterdiği için hiçbir belirti göstermemiştir. Sağlam bir bitki olarak gelişime devam etmiştir. HT-5160 domates çeşidi *I0*, *I1* ve *I2* dayanıklılık genleriyle çoğu FOL ırk 3, FORL ve FOL ırk 2 ye karşı dayanıklılığı sağlamaktadır. Ancak FORL nin özellikle 12 ve 1 no'lu ırklarının hastalık yaptığı görülmektedir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4. 4. HT-5160 bitkisinin izolatlardaki hastalık oranları

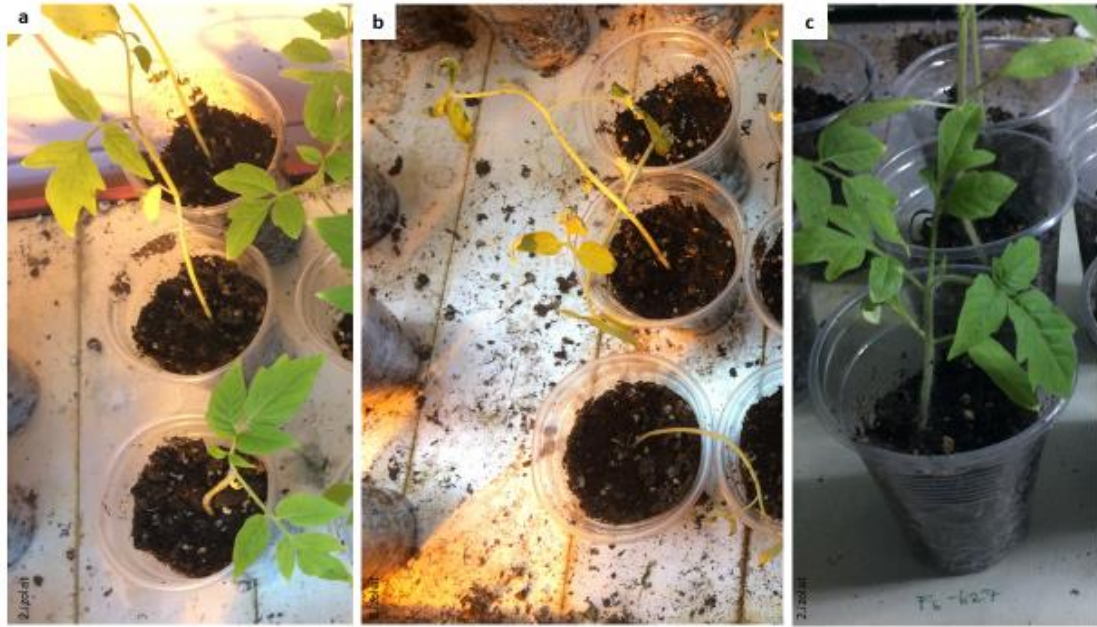
İzolatlar	Hastalık Oranları (%) [*]	İzolatlar	Hastalık Oranları (%) [*]
FORL 12	4,0 ^a	FOL 13 ırk 3	0,0 ^e
FORL 1	3,4 ^b	FOL 5 ırk 3	0,0 ^e
FOL 8 ırk 2	3,2 ^b	FOL 6 ırk 3	0,0 ^e
FOL 19 ırk 2	2,4 ^c	FOL 4 ırk 3	0,0 ^e
FORL 18	2,2 ^c	FORL 9	0,0 ^e
FORL 20	1,4 ^d	FORL 15	0,0 ^e
FOL 2 ırk 2	1,0 ^d	FOL 10 ırk 2	0,0 ^e
FOL 14 ırk 2	0,0 ^e	FOL 11 ırk 2	0,0 ^e
FOL 17 ırk 2	0,0 ^e	FOL 3 ırk 3	0,0 ^e
FORL 16	0,0 ^e	FOL 7 ırk 3	0,0 ^e

^{*}Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistik olarak önemlidir ($P \leq 0.05$).

Çizelge 4.3'te HT-5160 domates bitkisinde izolatların hastalık oranlarındaki farklılığını göstermektedir. Tukey testinde P değeri küçük çıkmıştır. İzolatlar arasında hastalık yapma şiddetinin farklı olduğunu ortaya çıkıştır. HT-5160 domates çeşidinde en şiddetli FORL izolatları olduğunu göstermiştir. Teste bakıldığında; FOL ırk 2'nin orta düzeyde şiddetli hastalandırdığını göstermiştir.

4.1.1.4. Fb18-627 domates çeşidinde simptomlar ve hastalık skorlaması

Fb18-627 domates çeşidi *Frl* dayanıklılık genine sahip olup Patojenisite testlerinde FORL izolatlarını kontrol ettiğini bu nedenle hafif simptomlar oluşturduğu görülmüştür. İnokule edilen bitkiler sağlıklı görülsede inokulasyondan sonra zayıf gelişme göstermişlerdir. Fb18-627 bitkilerinin kökleri incelendiğinde saçak köklerde incelmeler görülmüş ve kahverengi nekrotik belirtiler oluşmamıştır. Besi ortamına alınan enfekteli köklerde misel gelişimi gözlemlenmiştir. FOL8 ırk 2. izolatı en virulent hastalık ırkı olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4).



Şekil 4. 4. Fb18-627 domates çeşidinin 13 FOL ve 7 FORL izolatlarıyla inokulasyonundan sonraki görünümü; **a ve c)** FOL2 ırk 3 izolatı; **b)** FOL 8 ırk 2 izolatıyla inoküle edildikten sonraki 21. gündeki görünümü

Şekil 4.4 ve Çizelge 4.4 görüldüğü gibi *Frl* dayanıklılık genini içeren bitkiler FORL izolatlarına karşı dayanıklılığı sağlarken FOL izolatlarına karşı dayanıklılığı kontrol etmemektedir. Çalışmalar Fb18-627 domates çeşidinde FOL8 ırk 2 nin en yüksek hastalık oranına sahip olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4. 5. Fb18-627 domates bitkilerinin 13 FOL ve 7 FORL izolatlarıyla inokulasyondan sonraki hastalık oranları

İzolatlar	Hastalık Oranları (%)*	İzolatlar	Hastalık Oranları (%)*
FORL 9	4,0 ^a	FOL 17 ırk 2	0,0 ^e
FOL 8 ırk 2	3,0 ^{ab}	FOL 19 ırk 2	0,0 ^e
FORL 20	2,6 ^b	FOL 13 ırk 3	0,0 ^e
FORL 18	2,2 ^c	FOL 4 ırk 3	0,0 ^e
FORL 1	0,6 ^d	FORL 15	0,0 ^e
FOL 3 ırk 3	0,0 ^e	FORL 16	0,0 ^e
FOL 2 ırk 2	0,0 ^e	FOL 7 ırk 3	0,0 ^e
FOL 6 ırk 3	0,0 ^e	FOL 11 ırk 2	0,0 ^e
FOL 14 ırk 3	0,0 ^e	FOL 10 ırk 2	0,0 ^e
FOL 5 ırk 3	0,0 ^e	FORL 12	0,0 ^e

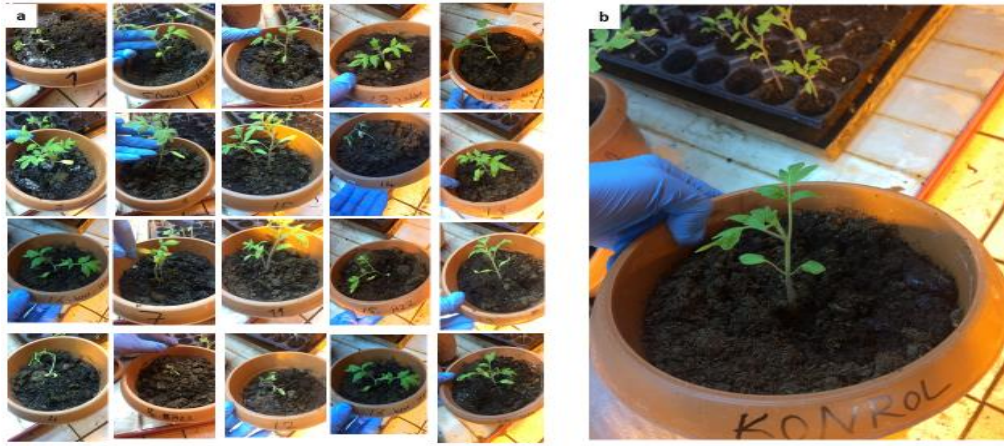
* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistik olarak önemlidir ($P \geq 0.05$).

Çizelge 4.4'te Fb18-627 bitkisinin izolatlardaki hastalık oranların ortalamalardaki Tukey testi yapılmıştır. Ve izolatların birbiriyle olan ortalamalardaki farklı olmadığını göstermiştir. P değerinin 0.05'ten büyük çıkmıştır. bu domates çeşidinin en şiddetli FORL 9, FORL 18 ve FORL 20 izolatları ve FOL (ırk2) 8 izolatı olduğunu göstermiştir.

4.1.1.5. H-2274 Hassas domates çeşidinde belirtiler ve hastalık skorlaması

H-2274 domates çeşidi içerisinde Fusarium hastalık etmenlerine karşı bir dayanıklılık geni içermeyen hassas bir domates çeşididir. Bu domates çeşidi 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla inokule edildiğinde FORL izolatlarının FOL izolatlarına göre daha virulent olduğu bulunmuştur. (Çizelge 4.5.) Bu domates çeşidi 20 FOL ve FORL izolatlarında en virulent olanı ortaya konulmuştur.

Patojenisite testlerinde inokule edilen H-2274 domates bitkilerinde 7. Günde tipik solgunluk ve ölümlerin başladığı bulunmuş iken (Şekil 4.5 a) kontrol bitkilerinde her hangi bir belirti bulunmamaktadır (Şekil 4.5 b).



Şekil 4. 5. H-2274 Domates çeşidinin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla inokulasyonundan sonra 7. gündeki görünüşleri; **a)** 13 FOL ve 7 FORL izolatın H-2274 çeşidi üzerindeki belirtileri; **b)** H-2274 domates bitkisinin distile su ile inokule edilen kontrol bitkisinin görünümü

Aşağıdaki Şekil 4.6'de FORL 15 izolatın simptomolojik olarak değerlendirilmiştir. H-2274 bitkisinin 21 günlük inoküle edilmiş incelenmiştir. Siyah oklar ile gösterilen yerde kökten gövdeye doğru ilerleyen kahverengileşmeler gözlenmiştir. (Şekil 4.6. a, b, e) bitkinin yapraklarındaki sararmalarına bakılarak skala değerlendirmesi yapılmıştır. (Şekil 4.6.)



Şekil 4. 6. H-2274 Hassas çeşidinin Fusarium patojeni (FORL 15.izolat) inokulasyondan sonra hastalıklı bitki üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi; **a)** bitkinin gövde ve kökte enine kesit alınması; **b)** bitkinin gövde kısmından boyuna kesitler alınması; **c)** alınan kesitle besiy ortamı olan PDA izolatın gelişimi için yüzey dekontaminasyonu aşaması; **d)** bitkinin yapraklarındaki etkisi: sararma; **e)** 15. izolatın bitkideki genel etkisinin değerlendirilmesi

Çizelge 4. 6. H-2274 hassas domates bitkisi- izolatlardaki hastalık oranları

İzolatlar	Hastalık Oranları (%)*	İzolatlar	Hastalık Oranları (%)*
FORL 1	4,0 ^a	FOL 19 ırk 2	4,0 ^a
FORL 9	3,8 ^b	FOL 5 ırk 3	3,5 ^b
FORL 12	4,0 ^a	FOL 6 ırk 3	2,3 ^d
FORL 15	2,5 ^c	FOL 17 ırk 2	0,0 ^f
FORL 18	4,0 ^a	FOL 3 ırk 2	0,0 ^f
FORL 20	4,0 ^a	FOL 11 ırk 2	0,0 ^f
FOL 2 ırk 3	4,0 ^a	FOL 13 ırk 3	0,0 ^f
FOL 4 ırk 3	4,0 ^a	FORL 16	0,0 ^f
FOL 14 ırk 3	4,0 ^a	FOL 10 ırk 2	0,0 ^f
FOL 8 ırk 2	4,0 ^a	FOL 7 ırk 3	0,0 ^f

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistik olarak önemlidir ($P \leq 0.05$).

Çizelge 4.5'te hassas domates bitkilerini 20 *Fusarium* izolatlarında hastalanma şiddetlerindeki oranları gösterilmiştir. Tukey testinde P değerinin 0.05'ten küçük olduğunu göstermiştir. izolatların kendi arasındaki ortalamaların farklı olduğunu göstermiştir.

4.2. Moleküler Çalışmalar

Moleküler çalışmalar, Akdeniz Üniversitesi Moleküler Mikoloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Moleküler çalışmalar da domateste sorun olan kök ve kök boğazı hastalık etmeni 13 FOL ve 7 FORL izolatları genotip olarak karakterize edilmiştir. *Fusarium* etmenine ait virulensliği sağlayan ve ifade eden genleri National Center for Biotechnology Information üzerinden araştırılmıştır. Bu genlerin üretimini sağlayan specific primerler araştırılarak karakterize edeceğimiz toplam 20 izolat için kullanılmıştır. Böylece bu tez çalışmasında 13 FOL ve 7 FORL izolatının genopitik karakterizasyonu ortaya konmuştur.

4.2.1. Avr genleri

Moleküler çalışmalar da *Fusarium* izolatlarının hastalık yapabilme yeteneğinden sorumlu konukçu ile ilişkilerini sağlayan Avr1, Avr2 ve Avr3 genlerinin varlığı araştırılmıştır.

4.2.1.1. Avr1 genin *Fusarium* izotlarındaki varlığı

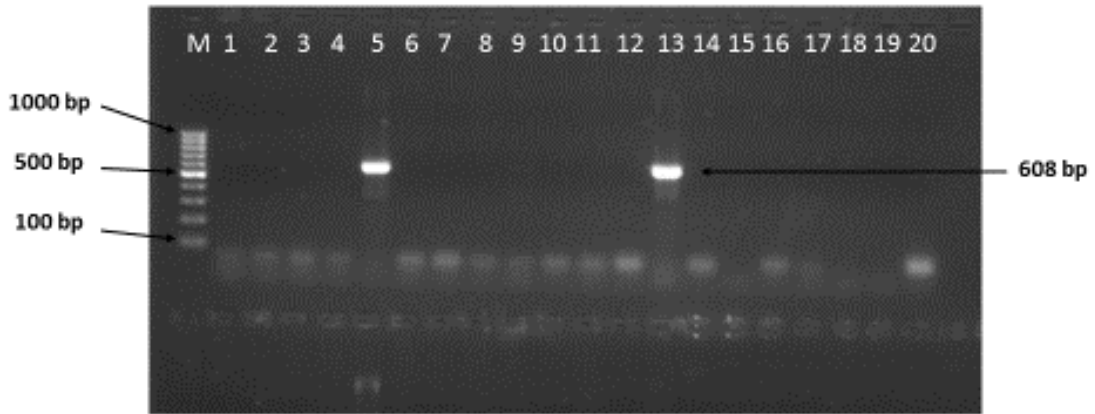
Avr1 geninin durumu DNA'ları izole edilen 13 FOL ve 7 FORL izolatı kullanılarak PCR ile varlığı araştırılmıştır (Şekil 4.7). Çalışma 3 defa farklı zamanlarda 13 FOL ve 7 FORL izolatlarıyla tekrarlanmıştır. Tüm PCR analizlerinde Avr1 geninin varlığı 13 FOL ve 7 FORL izolatında tespit edilmemiştir (Şekil 4.7). Yapılan amplifikasyon çalışmalarında Avr1 geni için *Fusarium* izolatlarında 967 bp lik bir bant beklenirken herhangi bir bant üretimi bulunamamıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4. 7. *Avr1* geni için spesifik primer setiyle yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu ürünlerinin %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsü

4.2.1.2. *Avr2* genin *Fusarium* izotlarındaki PCR çalışması

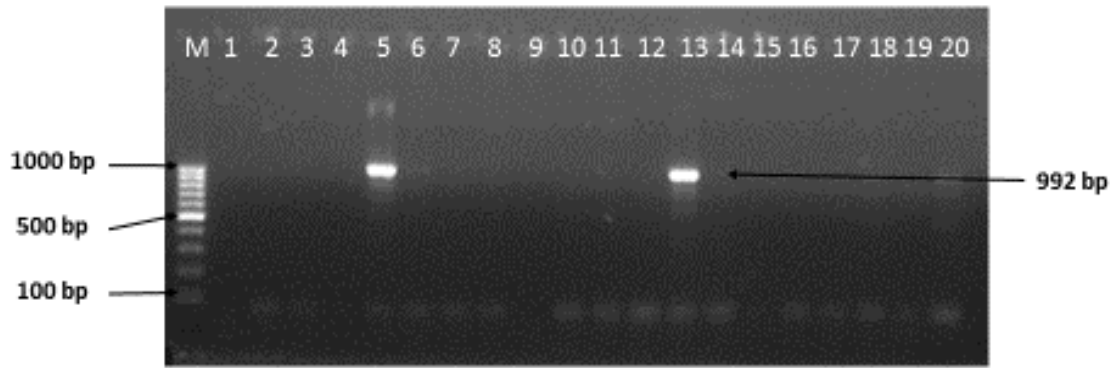
Yapılan moleküler çalışmalarda *Avr2* geninin varlığı 13 FOL ve 7 FORL için araştırılmış sadece FOL 5 ırk 3 ve FOL 13 ırk 3 izolatlarında varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Yapılan PCR analizleri *Avr2* geninin bu iki FOL izolatında 608 bp büyüklüğünde bant oluşturduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4. 8. Toplam 20 *Fusarium* izolatının *Avr2* geniyle PCR analizlerinden sonra %1.5 luk agaroz jel görüntüsü

4.2.1.3. *Avr3* genin *Fusarium* izotlarındaki PCR çalışmaları

Avr3 genin 13 FOL ve 7 FORL izolatlarıyla yapılan PCR analizlerinde *Avr3* geni FOL 5 ırk 3 ve FOL 13 ırk 3 izolatlarında 992 bp büyüklüğünde bant vermiştir (Şekil 4.9). Böylece *Avr3* geninin varlığı sadece FOL5 ırk 3 ve FOL13 ırk 3 izolatlarında bulunmuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4. 9. Toplam 20 *Fusarium* izolatının *Avr3* geniyle PCR analizlerinden sonra %1.5'luk agaroz jel görüntüsü

4.2.2. Hastalık yapabilme virulenslik genlerinin PCR çalışmaları

Moleküler çalışmalar 13 FOL ve 7 FORL izolatının, genotipik olarak karşılaştırma olanağı sağlamıştır. Hastalık yapabilme yeteneğini belirleyen *virulensliklik* genleri PCR çalışmalarıyla analiz edilmiş ve bu genlerin oluşturan amplifikasyon ürünleri PCR ile çoğaltılmıştır.

4.2.2.1. 13 FOL ve 7 FORL izolatlarında *Fga1* geni için yapılan PCR çalışmaları

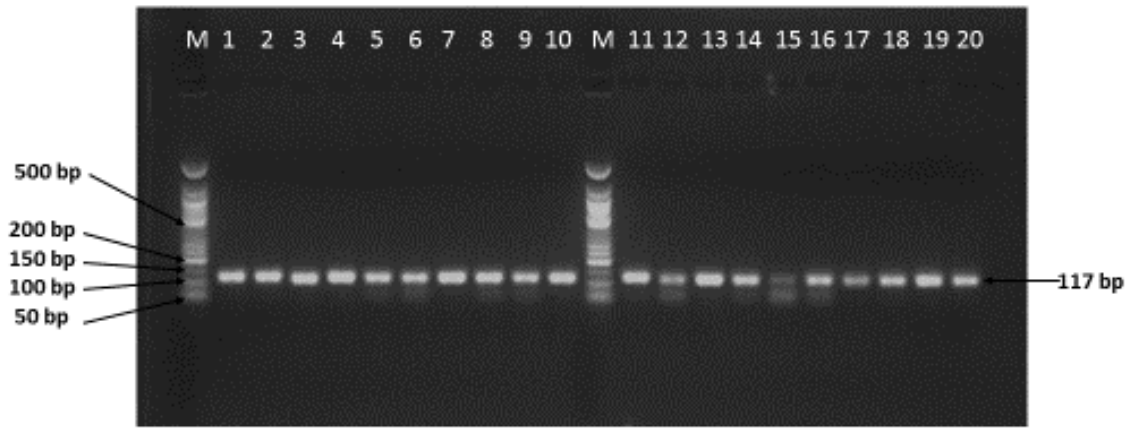
Moleküler çalışmalarda *Fusarium* izolatlarında virulensliği sağlayan *Fga1* geninin varlığı araştırılmıştır. Çalışmalarda PCR yöntemiyle 13 FOL ve 7 FORL izolatında 180 bp bant elde edilmiştir (Şekil 4.10). Virulenslikten sorumlu olan *Fga1* geninin durumu tüm izolatlarda ve bu genin kodladığı proteinlerin de tüm izolatlarda bulunduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4. 10. *Fga1* virulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5 luk agaroz jeldeki görüntüsü

4.2.2.2. FOL ve FORL izolatlarının *Snf1* geni ile PCR çalışmaları

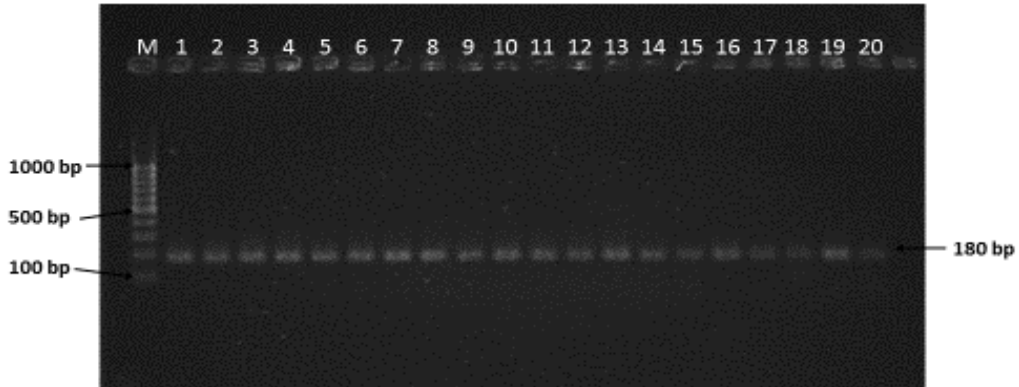
Moleküler olarak yapılan PCR çalışmalarında *Snf1* virulenslik geninin test edilen 13 FOL ve 7 FORL izolatında 117 bp büyüklüğünde bant oluşturduğu bulunmuştur (Şekil 4.11).



Şekil 4. 11. *Snf1* virulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5 luk agaroz jeldeki görüntüsü

4.2.2.3. FOL ve FORL izolatlarının *Frp1* geni ile PCR çalışmaları

Çalışmalarda 13 FOL ve 7 FORL izolatları *Frp1* geninin spesifik primerleriyle PCR yönteminde amplifikasyonları yapılmıştır. PCR analizlerinde tüm 13 FOL ve 7 FORL izolatının %1.5 luk agaroz jelde 180 bp büyüklüğünde bant oluşturduğu bulunmuştur (Şekil 4.12).



Şekil 4. 12. *Frp1* avirulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5'luk agaroz jeldeki görüntüsü

4.2.2.4. FOL ve FORL izolatlarının *ChsV* geni ile PCR çalışmaları

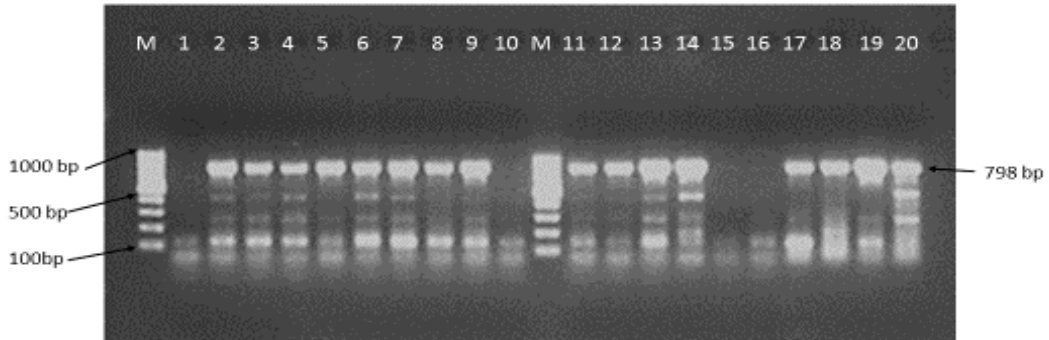
Çalışmalarda *Fusarium* izolatlarında kitin sentaz geni olan *ChsV* moleküler PCR analizleriyle araştırılmıştır. PCR analizleri 13 FOL ve 7 FORL izolatında *chsV* geninin 180 bp büyüklükte bant oluşturduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4. 13).



Şekil 4. 13. *ChsV* virulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsü

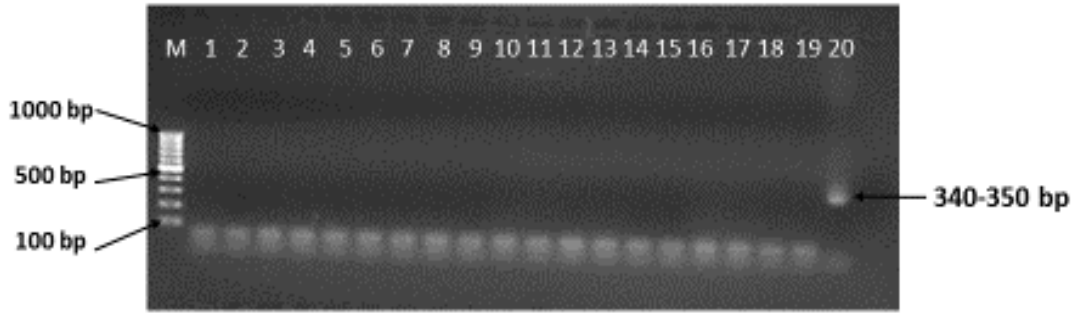
4.2.2.5. FOL ve FORL izolatlarının *Pg1* ve *Pl1* genleri ile PCR çalışmaları

Moleküler çalışmalar, *Fusarium* etmenlerinin konukçudaki hücre duvarında bulunan pektinleri yok etmesini sağlayan ve pektinaz enzimi üretiminden sorumlu *Pg1* ve *Pl1* genlerinin durumu 13 Fol ve 7 FORL için araştırılmıştır. *Pg1* geni test edilen FORL1, FROL15, FORL16 ve FOL10 ırk 2 de 798 bp lik bir ampifikasyon üretmediği 1.5 luk agaroz jel üzerindeki görüntüsünden anlaşılmıştır (Şekil 4. 14).



Şekil 4. 14. *Pg1* virulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsü

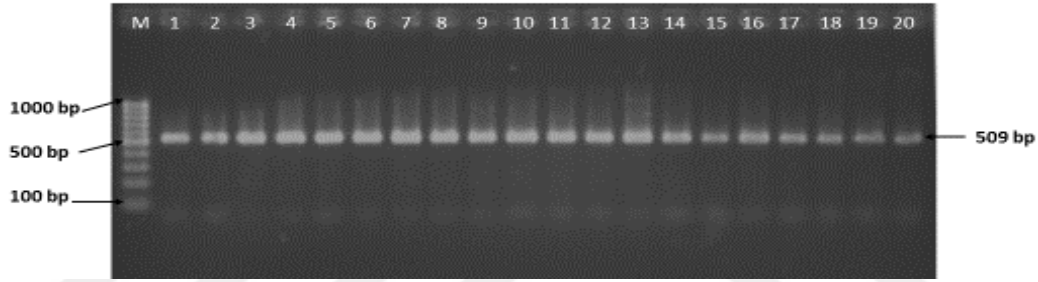
Diğer taraftan *Fusarium* patojenlerinde pektat liyaz üretimini sağlayan *pl1* geni sadece FORL20 izolatında 340-350 bp büyüklüğünde bir bant oluşturmuştur (Şekil 4.15).



Şekil 4. 15. *Pl1* genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsü

4.2.2.6. FOL ve FORL izolatlarının *Xy12* geni ile PCR çalışmaları

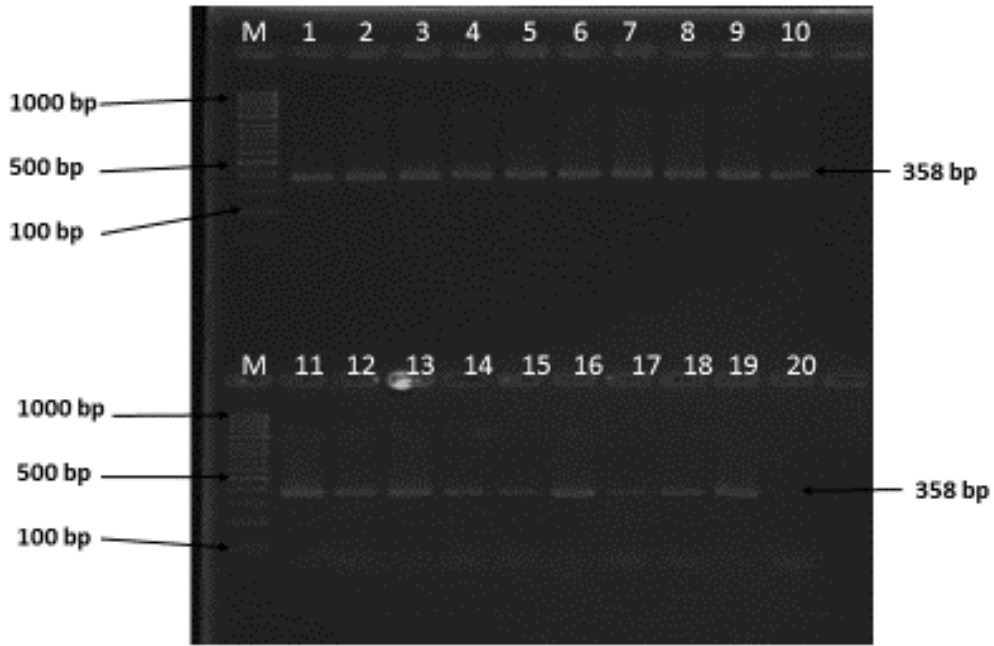
PCR çalışmalarında *Xy12* geni 13 FOL ve 7 FORL izolatlarıyla analiz edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan tüm izolatlar 509 bp bant vermiştir (Şekil 4).



Şekil 4. 16. *Xy12 virulenslik* genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsünün jel görüntüsü

4.2.2.7. FOL ve FORL izolatlarının *Fem1* geni ile PCR çalışmaları

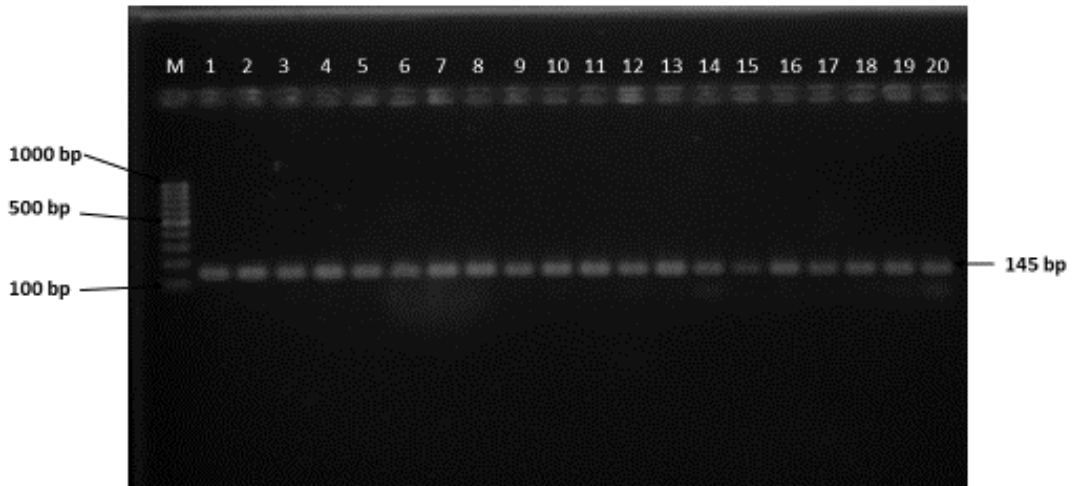
Moleküler çalışmalarda, test edilen 13 FOL ve 7 FORL izolatından FORL 20 dışındaki izolat hariç tüm izolatlar 358 bp büyüklüğünde bant oluşturmuşlardır (Şekil 4. 17). Bu sonuç *Fem1* geni ile önceki *Pl1* geni arasında ters bir ilişki olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 17. *Fem1* virulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsü

4.2.2.8. FOL ve FORL izolatlarının *Arg1* geni ile PCR çalışmaları

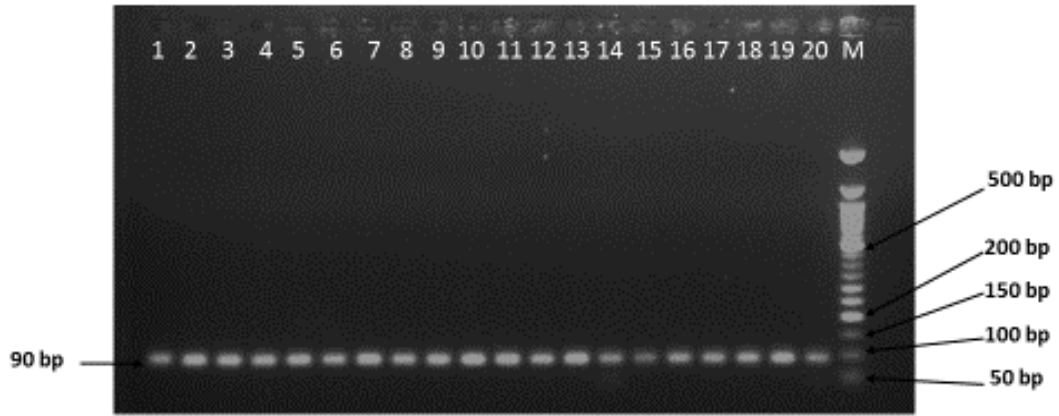
Yapılan moleküler çalışmalarda, *Argininosükinat liyaz* (*Arg1*) genine bakılmıştır. PCR analizlerinde tüm test edilen 13 FOL ve 7 FORL izolatının 145 bp büyüklüğünde *Arg1* genini amplifike ettiği bulunmuştur (Şekil 4. 18).



Şekil 4. 18. *Arg1* virulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsü

4.2.2.9. FOL ve FORL izolatlarının *Fmk1* geni ile PCR çalışmaları

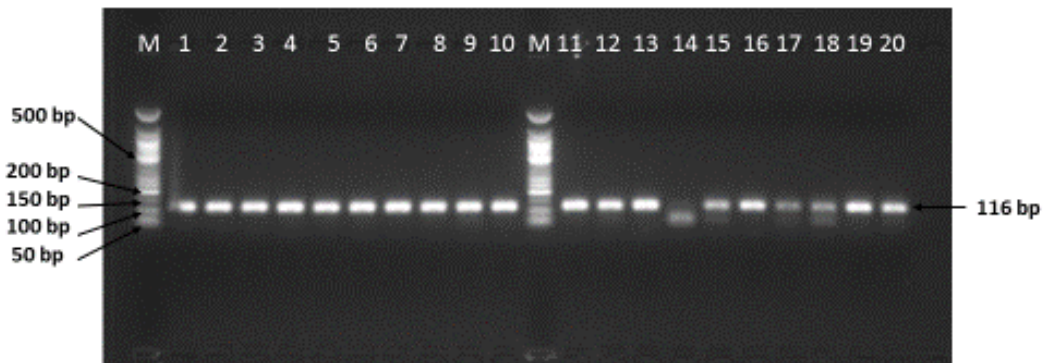
Çalışmalarda, *Fusarium* etmenlerinde bulunan en önemli *virulenslik* genlerinden biri olan mitojenle aktive edilen protein kinaz oluşumundan sorumlu *Fmk1* geni araştırılmıştır. PCR analizleri sonucunda elde edilen ürünlerin %1.5' luk agaroz jeldeki görüntülerinden tüm 13 FOL ve 7 FORL izolatının 90 bp büyüklükte bant ürettikleri bulunmuştur (Şekil 4.19).



Şekil 4. 19. *Fmk1* virulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsü

4.2.2.10. FOL ve FORL izolatlarının *Fow1* ve *Fow2* genleri ile PCR çalışmaları

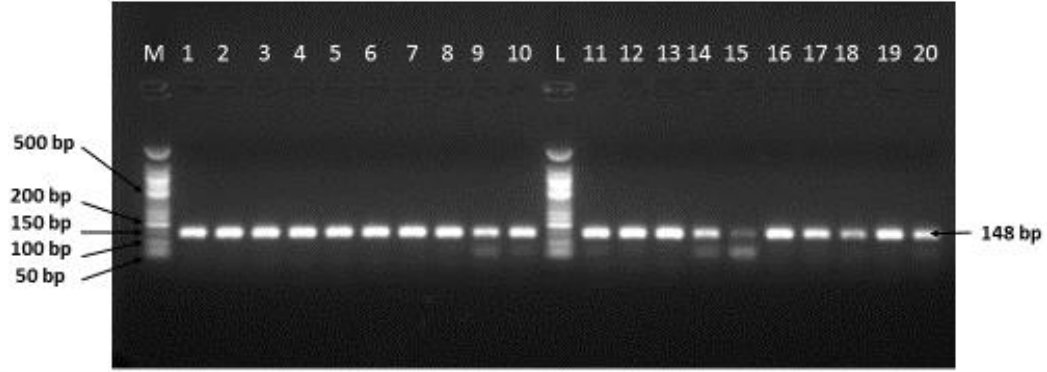
Moleküler çalışmalarda, *Fusarium*'un virülensliğini sağlayan ve hücresel olayları aktive eden *mitokodriyal taşıyıcı* (*Fow1*) ve *transkripsiyon faktörü* (*Fow2*) genlerinin varlığı araştırılmıştır. Bu *Fow1* ve *Fow2* genleri özellikle *Fusarium* etmenlerinin konukçu domates tarafından oluşturulan savunma ve dayanıklılık mekanizmalarının aşılmasında kullanılan proteinleri oluşturmaktadırlar.



Şekil 4. 20. *Fow1* virulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsü

PCR analizlerinde FOL14 ırk 3 dışındaki tüm 12 FOL ve 7 FORL izolatının 116 bp büyüklükte bant oluşturduğu bulunmuştur (Şekil 4.21). Yukarıda en virulen olarak bulunan FOL14 ırk 2 nin bu geni üretmemesi onun virülensliğinde farklı bir genin

sorumlu olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan *Fow 2* geni ile yapılan PCR çalışmalarında tüm test edilen 13 FOL ve 7 FORL izolatu 148 bp de bant vermektedir (Şekil 4.21).. Bu durum *Fow2* geninin virulenlikte tüm FOL ve FORL izolatları için önemli olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 21. *Fow2* virulenslik genin 13 FOL ve 7 FORL izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5' luk agaroz jeldeki görüntüsü

5. TARTIŞMA

Bu çalışma ile kışlık domatesin merkezi olan Antalya Domates Üretim Alanlarından İzole Edilen *Fusarium* İzolatlarının Genotipik Ve Fenotipik Karakterizasyonu gerçekleştirilerek, domates üretimi yapılan yerlerde hangi FOL ve FORL hattının bulunduğu anlaşılmıştır. Böylece *Fusarium* hastalıklarının olduğu seralarda hangi ticari dayanıklı çeşitlerin kullanılması gerektiğine karar verilebilecektir. Gelecekte yapılacak çalışmalar için *Fusarium* genotipleri tespit edilmiş olup, bitkilerdeki bu *Fusarium* izolatlarının hangi genlerini aktive ederek konukçu domates bitkilerinde hastalıklar oluşturduğu konularında çok önemli bilgiler elde edilmiştir. Konukçu dayanıklılık genleri ile *Fusarium* izolatları arasındaki gen-için gen teorisine uygun ilişkiler ortaya koymuş olup gelecekte CRISPR-CAS9 gibi tek bir bazlık moleküler editing teknolojileri kullanılarak tüm izolatlara dayanıklı domates çeşitleri üretililecektir.

Çalışmalarda 13 FOL ve 7 FORL izolatları kullanılmış olup bunlardan FOL 5 ırk 3 ve FOL13 ırk 3 izolatlarında Avr2 ve Avr 3 geni bulunmuş olup bu genlerin kodladığı proteinlerin bu izolatların hastalık yapabilmesinde görev aldığı anlaşılmaktadır. Kullanılan 5 ticari domates çeşitleri üzerinde dayanıklılık genleri ile 13 FOL ve 7 FORL izolatı arasında konukçu-patojen ilişkisini varlığı anlaşılmıştır. Nitekim, ticari domateslerin sahip olduğu. *I* ve *I-1* dayanıklılık genlerinin patojenin Avr1 geni, *I-2* dayanıklılık geninin patojenin Avr2 geniyle ve *I-3* dayanıklılık geninin patojenin Avr3 geni ile ilişki içerisinde olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla aynı sonuçları içermektedir (Houterman vd. 2008; Houterman vd. 2009). Patojen Avr1 geni tarafında kodlanan Six4 proteini sadece FOL ırk 1 izolatlarında bulunurken, Avr2 tarafından üretilen Six3 proteini ise FOL ırk 2 ve ırk 3 izolatlarında bulunmaktadır. Bu sonuçlar Lievens vd. 2009 buldukları sonuçlarla örtüşmektedir. Aynı zamanda H-2274 domates çeşidi FOL ırk2 ve ırk 3 etmenlerinin kodladığı Six4 ve Six3 proteinlerinin karşılık herhangi bir dayanıklılık proteinin bulunmadığı göstermektedir (Houterman vd. 2009).

Moleküler çalışmalarda poligalakturanaz enzimini üreten *Pg1* geni bulunmayan izolatlar FORL 1, FOL 10 ırk 2, FORL 15 ve FORL 16 olarak bulunmuştur. Bu izolatların patojenite testlerinde virulensliğinin diğer test edilen izolatlara göre daha az olmasının nedeninin poligalakturanaz proteininin üretilmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim FORL 1 izolatında *Pg1* geninin bulunmamasının bu izolatın virulenslenliğinin azaldığı rapor edilmiştir (Huertas-González vd.1999). Çünkü poligalakturanaz proteini konukçu hücrenin suda eriyebilen polimer yapılarının parçalanmasından sorumlu olup bu polimer yapılar *Fusarium* etmenleri tarafından besin olarak kullanılmaktadır (Huertas-González vd.1999).

Bu tez çalışmasında 13 FOL ve 7 FORL izolatında PCR analizleri sonucunda Avr1 geninin varlığı tespit edilememiştir. Ancak FOL 5 ırk 3 ve FOL 13 ırk 3 izolatlarında Avr2 v Avr3 geni olduğu bulunmuştur. Yapılan patojenisite testlerinde bu FOL 5 ırk 3 ve FOL 13 ırk 3 orta derece hastalık oluşturmuştur. Bu sonuçlar bize Avr1 geninin özellikle patojenik *Fusarium* izolatlarında bulunmadığı göstermektedir. Daha önce Livens vd. 2009, Vander Does vd. 2008 ve Rabiei- Motlagh vd. 2017 tarafından yapılan çalışmalarda Avr1, Avr2 ve Avr3 geni içeren FOL012 izolatının non-patojenik bir izolat olduğu

belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmalar *Fusarium* etmenlerinde virulensliği belirleyen genin *Avr3* geni olduğu öne sürülmüştür. Ancak bu öngörünün doğruluğu tartışılmakla birlikte *Avr3* genine sahip 2 FOL izolatu orta derece virulent olması çalışmada elde edilen sonuçların güvenilirliğini artırmaktadır.

Moleküler çalışmalar 13 FOL ve 7 FORL izolatlarının konukçu hücre duvarlarını parçalayıp besinlerini almayı sağlayan *Snf1*, *Frp1* ve *Chsv* genlerinin varlığını ortaya koymuş olup bu genlerin tüm test edilen izolatların virulensliklerinde etkili olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla örtüşmekte olup konukçu hücrenin duvarını parçalayan *virulenslik* genlerinin önemini ortaya koymaktadır (Jonkers ve Rep 2009, Ospina - Giraldo vd. 2003).

Rana vd. (2017) yaptığı çalışmada *Fusarium graminearum*, FOL, *Fusarium solani* ve *Fusarium verticillioides* türlerini karşılaştırmışlar ve konukçuya özgü virulensliği sağlayan genleri tanımlamışlardır. Ancak konukçuyla hastalık etmeninin virulensliği arasındaki ilişki de hala hangi genlerin önemli rolleri olduğu tartışılmaktadır. Bu *virulenslik* genlerinden 12 tanesi bizim çalışmalarımızda test edilmiş ve 13 FOL ile 7 FORL izolatındaki durumları belirlenmiştir. Ancak çalışmalarda kullanılan *I* dayanıklılık genlerini içeren domates çeşitlerinde durumları da moleküler olarak testlenmeliydi. Bu çalışmada ticari domates çeşitlerinde *I* genlerinin durumlarının testlenmemesi konukçu-patojen ilişkilerinde bir noksanlık olarak görülebilir. Bu nedenle ticari domates çeşitlerinin *I* dayanıklılık genlerinin testlenmesi ve hastalık oranlarının bu açıdan tekrar analizleri çalışmamızı farkındalık katacaktır.

Birçok farklı çalışmalarda ‘H-2274’ çeşidin *Fusarium* a karşı hassas olduğunu bildirilmiştir. Bu çalışma da 20 FOL ve FORL izolatın bazı izolatlara karşı tolerans olduğunu gösterilmiştir. Bunun nedeni ise; *Fusarium* patojenisiteyi sağlayan genlerin mutasyonu ve bu genlerin fonksiyon yapıların değiştirdiğini ve virulensliği azalttığını düşünülmektedir.

Can ve Çalış (2017) yaptıkları tez çalışmasında 20 yabani domates hatları testlenmiştir çalışmada FORL 12 ve FOL (ırk 3) 14 izolatları kullanılmıştır. Daha önceki çalışmalarda bu izolatların daha virulent olduğunu gözlenmiştir. Bu tez çalışmasında ticari çeşit kullanılmıştır. 20 FOL ve FORL izolatlarını test edilmiştir. Ticari çeşitlerle FORL 12 ve FOL (ırk 3) 14 izolatlarında en virulent olduğunu yine bu çalışmada doğrulanmıştır.

Antalya merkez ve ilçelerinde domateste survey çalışmaları yapılmış olup, *Fusarium* solgunluk hastalık etmenleri olan FOL ve FORL oluşan toplamda 20 izolat elde edilmiştir. Elde edilen izolatların 13 adedi FOL ve 7 adedi FORL olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada izole edilen 13 FOL ve 7 FORL hastalık etmenlerinin virulensliği sağlayan genler moleküler çalışmalarla karakterize edilirken patojenisite testleriyle bu fungal izolatların dayanıklılık gen(ler)i içeren ve içermeyen domates bitkilerinde oluşturdukları hastalık miktarları ölçülünerek konukçu-patojen ilişkilerini ortaya koyulmaya çalışılmıştır.

6. SONUÇLAR

Bu çalışma ile test edilen 13 FOL izolatın farklı domates fenotiplerinde FOL 8 ırk 2 ve FOL 19 ırk 2 izolatlarının hastalık şiddetinin yüksek olduğu bulunmuştur. Çalışmalarda test edilen 7 FORL izolatın farklı domates fenotiplerinde FORL 1 ve FORL 9 izolatlarının hastalık şiddetinin yüksek olduğunu göstermiştir. Böylece çalışmalar 13 FOL ve 7 FORL izolatının test edilen bitkiler üzerindeki virulensliği açıkça ortaya konmuştur. Gelecekte çalışmaların yapıldığı alanlarda bu izolatların genotipik özellikleri belirlendiği için hangi dayanıklı ticari çeşitlerin kullanılması gerektiği, hangilerinin kullanılmaması gerektiği anlaşılmıştır.

Akdeniz Bölgesi Antalya ili ve ilçelerinde 2015-2016 yıllarında yapılan survey çalışmaların da elde edilen toplam 20 izolatın ilk defa genotipik ve fenotipik özellikleri bu çalışmayla ortaya konmuştur. Genotipik karakterizasyonda moleküler olarak yapın PCR analizlerinde 13 FOL ve 7 FORL izolatın F box protein, endoglukinaz, MAP kinazı, argunulinaz, transkripsiyon faktörleri ve Kitin sentaz proteinleri üreten genlerin durumları analiz edilmiştir. Özellikle bu genlerin *Fusarium* etmenlerinin virulentliğini nasıl etkiledikleri bulunmuştur. Yine bu PCR analizlerinde avirulentlik genlerinden 3 tanesi test edilmiş bunlarla ticari domatesler arasındaki gen-için-gene ilişkisi ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Çalışmalarda 13 FOL ve 7 FORL izolatlarında FOL 5 ırk 3 ve FOL 13 ırk 3 izolatlarının Avr2 ve Avr3 genlerini içerdikleri bulunmuştur.

Fenotipik çalışmalar da 13 FOL ve 7 FORL izolatlarının farklı domates genotiplerinde oluşturmuş olduğu belirtiler ve hastalık oranları ortaya konmuştur. Bu sonuçlara dayanıklı bitkilerle *Fusarium* izolatları arasında konukçu-patojen ilişkileri ortaya konmuştur.

7. KAYNAKLAR

- Aamir M., Kumar S.V., Kumar D.M., Pratap K.S., Zehra A., Sanmukh U.R., Singh S. 2018. Structural and functional dissection of differentially expressed tomato WRKY transcripts in host defense response against the vascular wilt pathogen (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*).
- Abawi, G. S. and Lorbeer, J. W. 1972. Several aspects of ecology and pathology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Phytopathology*. 62, 870-876.
- Acquaah G. 2002. Principles of Crop Production: Theory, Techniques, and Technology. Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, New Jersey.
- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. Fifth edit., Elsevier Academic Pres, Amsterdam, 922 pp.
- Agrios, G.N. 2007. Plant Pathology. Fourth Edition, Academic Press Newyork, 635pp.
- Alconada, T.M.; Martínez, M.J. 1994. Purification and characterization of an extracellular endo-1,4- β -xylanase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 118, 305-310.
- Altinok, H. H. , Can, C., & Çolak, H. 2013. Vegetative Compatibility, Pathogenicity and Virulence Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp *melongenae* Recovered from Eggplant. *JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY*, cilt.161, 651-660.
- Anonim 2018. TÜİK. <http://www.tuik.gov.tr>. [Son erişim tarihi: 25.11.2018].
- Anonim 2020. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Domates>. [Son erişim tarihi: 18.07.2020].
- Anonim 2020. <https://www.tarimorman.gov.tr>. [Son erişim tarihi: 01. 09. 2020].
- Anonymous 1991. Compedium of Tomato Diseases. Ed: J.B. Jones, J.P. Jones, R.E Stall, T.A Zitter. APS Press American Phytopathological
- Aoki T., O'Donnell K., Geiser D. M. 2014. Journal of General Plant Pathology 80, pages189–201.
- Arıcı Ş. E., Bozat G., Akbulut İ. 2013. Investigation of potantial biological control of *Fusarium oxysporum* f sp *radicis lycopersici* and *F oxysporum* f Sp *lycopersici* by essential oils plant extract and chemical elicitors in vitro. *Pakistan Journal Of Botany*, 45, 2119-2124.
- Arie, T., Goutha, S., Shimazaki, S., Kamakura, T., Kimura, N., Inoue, M., Takio, K., Ozaki, A., Yoneyama, K., and Yamaguchi, I. 1998. Immunological detection of endopolygalacturonase secretion by *Fusarium oxysporum* in plant tissue and sequencing of its encoding gene. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 64, 7–15.
- Asuncion Garcia-Sanchez, M., Martin-Rodrigues, N., Ramos, B., de Vega-Bartol, J. J., Perlin, M. H. and Diaz-Minguez, J. M. 2010. Fost12, the *Fusarium oxysporum* homolog of the transcription factor Ste12, is upregulated during plant infection and required for virulence. *Fungal genetics and biology*: 47, 216-25.
- Attitalla, I. H., Fatehi, J., Levenfors, J., and Brishammar, S. 2004. A Rapid molecular method for differenting two special forms (*lycopersici* and *radicis-lycopersici*) Of *Fusarium oxysporum*. *Mycol. Res.* 108 (7):787-794.

- Baayen, R. P., O'Donnell, K., Bonants, P. J. M., Cigelnik, E., Kroon, L. P. N. M., Roebroek, E. J. A. and Waalwijk, C. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non-monophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology*. 90, 891-900.
- Baysal Ö. and Yeşil Ö. 2007. Low abiotic stress leads to priming by DL- aminobutyric acid (BABA) treatment against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* Second International Tomato Disease Symposium 8-12 October Kusadası - Turkey. Proceeding abstracts s.95.
- Baysal Ö., Çalışkan M., Yeşilova Ö. 2007. Performance of EU07 in biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. Second International Tomato Disease Symposium Kusadası -Turkey. 8- 12 October Kusadası-Turkey. Proceeding abstracts s.77.
- Beckman, C.H. 1987. The Nature of Wilt Diseases of Plant. APS Press, St. Paul, MN, USA
- Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C. and Codon, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7 (4), p: 249-260.
- Benitez T, Rincon AM, Limon MC, Codon A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol.* ;7:249–260.
- Biely P. 1993. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In: Hemicellulose and Hemicellulases (Coughlan, M.P. and Hazlewood, G.P., Eds.), pp. 29–52. Portland Press, London.
- Bishop, C. D. and Cooper, R. M. 1983. An ultrastructural-study of vascular colonization in 3 vascular wilt diseases. 1. colonization of susceptible cultivars. *Physiological Plant Pathology*. 23, 323-343.
- Blancard, D. 1994. A Colour Atlas of Tomato Diseases Observation, Identification and Control. INRA Vegetable Pathology Unit France, 210p.
- Bogale, M., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., and Steenkamp, E.T. 2007. Species-specific primers for *Fusarium redolens* and PCR-RFLP technique to distinguish among three clades of *Fusarium oxysporum*. *FEMS Microbiol Lett*, 271:27-32.
- Bohn, G.W. and Tucker C.M. 1939. Immunity to *Fusarium* wilt of tomato. *Science* 89: 603–604.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 237.
- Cai, G., Rosewich, G.L., Schneider, R.W., Kistler, H.C., Davis, R.M., Elias, K.S. and Miyao, E.M. 2003. Origin of race -3 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* at a single site in California. *Ecology and Population Biology*, APS Pres, Phtopathology, p: 1014-1022.
- Calero-Nieto, F., Di Pietro, A., Roncero, M. I. G. and Hera, C. 2007. Role of the transcriptional activator XInR of *Fusarium oxysporum* in regulation of xylanase genes and virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20, 977-985.

- Can S. ve Çalış Ö. 2017. Domates Genetik Kaynakları Merkezinden Temin Edilen Domates Hatlarının Fusarium Solgunluk Etmenlerine (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ve *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*) Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi, BAP, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi.
- Can, C., S. Yucel, Korolev N. and Katan T. 2004. First report of fusarium crown and root rot of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* in Turkey, Plant Pathology, 53(6):814 -814.
- Caplan J, Padmanabhan M, Dinesh-Kumar S. 2008. Plant NB-LRR immune receptors: From recognition to transcriptional reprogramming. Cell Host & Microbe.;3(3):126-135.
- Chandler, J. M., & Santelmann, P. W. 1968. Interactions of four herbicides with *Rhizoctonia solani* on seedling cotton. Weed Science, 16(4), 453-456.
- Chet I., Elad Y., Kalfon A., Hadar Y. and Katan J. 1982. Integrated control soil-borne and bulb-borne pathogens in iris. Phytoparasitica, 10:229-231.
- Chi MH, Park SY, Kim S, Lee YH. 2009. A quick and safe method for fungal DNA extraction. Plant Pathol J. ;25:108–111.
- Christakopoulos P., Nerinckx W., Kekos D., Macris B., Claeysens M. 1996. Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from *Fusarium oxysporum* F3. J. Biotechnol. 51, 181–189.
- Cirulli, M. and Alexander L.J. 1966. A comparison of pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and different sources of resistance in tomato. Phytopathology 56: 1301–1304.
- Colak A.,A., Fidan, A., Karacaoğlu, M., Daşgan, H.Y. 2019. The identification of the resistance levels of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and *Tomato yellow leaf curl viruses* in different tomato genotypes through traditional and molecular methods. Appl. Ecol. Environ. Res., 17(2), 2203–2218.
- Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathology 31: 53 -80.
- Çetinkaya E. ve Ayhan K. 2012. Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler, Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi /Karaelmas Science and Engineering Journal 2 (1), 53-62.
- Çolak, A. ve Biçici, M. 2013. PCR detection of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* of tomato in protected tomato growing areas of Eastern Mediterranean Region of Turkey. Turk. J. Agric. For., 37(4), 457–467.
- Çolak, A.A., Fidan, H., Gökhan, B. 2020. Molecular characterization of *Tomato yellow leaf curl virus* and *Fusarium oxysporum* formae speciales and races of tomato areas in Northern Cyprus. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus, 19(3), 25–35.
- Davis RM., Kimble KA., Farrar JJ. 1988. A third race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* identified in California. Plant Dis 72:453.
- DeZwaan T. M., Carroll A. M., Valent B., Sweigard J. A. 1999. Magnaporthe grisea pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium

- differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell* 11, 2013–2030. 10.1105.
- Di Pietro, A. and Roncero, M.I. G. 1998. Cloning, expression, and role in pathogenicity of *pg1* encoding the major extracellular *endo* polygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 91–98.
- Di Pietro, A., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J. and Roncero, M. I. G. 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*. 4, 315–325.
- Di Pietro, A.D., García-Maceira, F.I., Męglecz, E., and Roncero, I.G. 2001. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 39, 1140–1152.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1999. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990;12:13–15.
- Duyvesteijn, R. G. E., van Wijk, R., Boer, Y., Rep, M., Cornelissen, B. J. C. and Haring, M. A. 2005. Frp1 is a *Fusarium oxysporum* F-box protein required for pathogenicity on tomato. *Molecular Microbiology*. 57, 1051–1063.
- El-Abyad M.S., El-Sayed M.A., El-Shansoury A.R. and Elsabbagh S.A. 1993. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. *Plant Soil* 14:185–195.
- Elmore J, Lin Z, Coaker G. 2011. Plant NB-LRR signaling: Upstreams and downstreams.
- Frery, A., T.C. Nesbitt, S. Grandillo, E. Knaap, B. Cong, J. Liu, J. Meller, R. Elber, K.B. Alpert and S.D. Tanksley 2000. *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 289: 85–88.
- García-Enciso E.L., Benavides-Mendoza A., Flores-López M.L., Robledo-Olivo A., Juárez-Maldonado A. and González-Morales S. 2018. Molecular Vision of the Interaction of Tomato Plants and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Plant Diseases, Pathogen Diversity, Genetic Diversity, Resistance and Molecular Markers.; *crapt*:6:79-99.
- García-Maceira, F.I., Di Pietro, A., and Roncero, M.I. 2000. Cloning and disruption of *pgx4* encoding an in planta expressed exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 359–365.
- Gómez-Gómez E, Ruiz-Roldán MC, Di Pietro A, Roncero MI, Hera C. 2002. Role in pathogenesis of two *endo*- β -1,4-xylanase genes from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* 35: 213– 222.
- Gonsalves, A. K. and Ferreira S. A. 1993. *Fusarium oxysporum*, Crop Knowledge Master.
- Gould, W.A. 1983. Tomato Production, Processing and Quality Evaluation. Avi. Pub. Co., Westport, CO., 445.
- Grattidge R. and O'Brien RG. 1982. Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. *Plant Disease* 66: 165-166.
- Hatch, C.E., Fisher, A.T., Revenaugh, J.S., Constantz, J., and Ruehl, C. 2006. Quantifying surface water–groundwater interactions using time series analysis of

- streambed thermal records: Method development. *Water Resour. Res.* 42: W10410.
- He, C., Long, Y., Pan, J., Li, K., and Liu, F. 2007. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70: 133–150.
- Hennessy C, Walduck G, Daly A, Padovan A. 2005. Weed hosts of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in northern Australia. *Australas Plant Path* 34: 115– 117.
- Hirano, Y. and Arie, T. 2006. PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* ff. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J Gen Plant Pathology* 72: 273–283.
- Houterman P.M., Speijer D., Dekker H.L., De Koster C.G., Cornelissen B.J.C., Rep M. 2007. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Mol. Plant Pathol.* ;8(2):215–221.
- Houterman, P. M., Cornelissen, B. J. C., Rep, M. 2008. Suppression of Plant Resistance Gene-Based Immunity by a Fungal Effector. *PLoS pathogens*, 4: e1000061.
- Houterman, P. M., Ma, L., van Ooijen, G., de Vroomen, M. J., Cornelissen, B. J., Takken, F. L. and Rep, M. 2009. The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 58: 970-978.
- Huang, C. C. and Lindhout, P. 1997. Screening for resistance in wild *Lycopersicon* species to *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici* race 1 and race 2. *Euphytica*. 93, 145-153.
- Huertas-Gonzalez, M. D., Ruiz-Roldan, M. C., Maceira, F. I. G., Roncero, M. I. G. and Di Pietro, A. 1999. Cloning and characterization of p11 encoding an in planta-secreted pectate lyase of *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics*. 35, 36-40.
- Hutson, R. A. and Smith, I. M. 1983. The response of tomato seedling roots to infection by *Verticillium albo-atrum* or *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Annals of Applied Biology*. 102, 89.
- Idnurm A. and Howlett BJ. 2001. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology* 2: 241– 255.
- Imazaki I., Kurahashi M., Iida Y., Tsuge T. 2007. Fow2, a Zn(II)₂Cys₆-type transcription regulator, controls plant infection of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol Microbiol* 63:737–753.
- Inami K, Yoshioka-Akiyama C, Morita Y, Yamasaki M. A. 2012. Genetic mechanism for emergence of irks in *Fusarium oxysporum* f. Sp. *lycopersici*: Inactivation of avirulence gene AVR1 by transposon insertion. *PLoS One*.;7(8):e44101.
- Inoue I., Namiki F. and Tsuge T. 2003. Plant Colonization by the Vascular Wilt Fungus *Fusarium oxysporum* Requires FOW1, a Gene Encoding a Mitochondrial Protein, *The Plant Cell*, Vol. 14, 1869-1883.

- Jain S, Akiyama K, Mae K, Ohguchi T, Takata R. 2002. Targeted disruption of a G protein α subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics* 41: 407–413.
- Jarvis, W. R., and Shoemaker, R. A. 1978. Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root rot of tomato. *Phytopathology*, 68 (12):1679-1680.
- Jones JP. 1991. Fusarium wilt. In: Jones Jb; Jones Jp; Stall Re; Zitter TA. (eds.). *Compendium of Tomato Diseases*. Saint Paul, Minnesota, APS PRESS, p.15.
- Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E., and Zitter, T. A. 1991. *Compendium of Tomato Diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN., p:14-15.
- Kabaş A., İlbi H., Mutlu N. ve Ünlü A. 2012. Domateste Kök Ve Kök Boğazı Çürüklüğüne Neden Olan *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*'ye Dayanıklılığın Kalıtımı, Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi, 29 (1):1-8.
- Kapoor I. J., and Kar B. 1988. Antagonistic effects of soil microbes *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* causing tomato wilt, *International Journal of Tropical Plant Diseases* 6, 257-262.
- Kashiwa T, Kozaki T, Ishii K, Turgeon B. 2017. Sequencing of individual chromosomes of Current Opinion in Plant Biology.;14(4):365-371.
- Katan J. 1980. Solar pasteurization of soils for disease control: Status and Prospects. *Plant Disease* 64(5): 450-454.
- Katan, J., Greenberger, A., Alon, H. and Grinstein, A. 1976. Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soilborne
- Katan, T., Shlevin, E. and Katan, J. 1997. Sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on stem surfaces of tomato plants and aerial dissemination of inoculum. *Phytopathology* 87: 712–719.
- Khan MR., Altaf S., Mohiddin FA., Khan U., Anwer A. 2009. Biological control of plant nematodes with phosphate solubilizing microorganisms. In: Khan MS, Zaidi A (eds) *Phosphate solubilizing microbes for crop improvement*. Nova Science Publishers, Inc, New York, pp 395–426.
- Kistler, H. C. 2001. Evolution of host specificity in *Fusarium oxysporum*. *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. St Paul, Amer Phytopathological Soc: 70-82.
- Kütevin Z. ve Türkeş T. 1994. Sebzeçilik genel sebze tarımı prensipleri ve pratik sebzeçilik yöntemleri. Meyveleri yenilen sebzeler/biber. Ankara Üniversitesi Ziraat Fak. Muhlis Tekmen Kürsüsü.
- Laine, U. L., Pettway, R. E., Katan, T., and Kistler, H. C. 1999. Population genetic analysis corroborates dispersal of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis -lycopersici* from Florida to Europe. *Phytopathology*, 89: 623-631.
- Laterrot, H. & Moretti A. 1991. Allelism of various FORL resistance sources. *Rep Tomato Genet Coop* 41: 28–30.

- Li, D., Rogers, L., and Kolattukudy, P.E. 1997. Cloning and expression of cDNA encoding a mitogen-activated protein kinase from a phytopathogenic filamentous fungus. *Gene* 195, 161–166.
- Lievens, B., Houterman, P. M. and Rep, M. 2009. Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other formae speciales. *FEMS Microbiology Letters*, 300: 201-215.
- Ma L., Houterman P. M., Gawehns F., Cao L., Sillo F., Richter H., et al. . 2015. The AVR2-SIX5 gene pair is required to activate I-2-mediated immunity in tomato. *New Phytol.* 208, 507–518. 10.1111/nph.13455.
- Madrid M.P., Di Pietro A. and Isabel M., Roncero G. 2003. Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds, *Molecular Microbiology* 47 (1), 257–266.
- McGrath, D.J., Gillespie D. & Vawdrey L. 1987. Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 2 and race 3 in *L. pennellii*. *Aust. J. Agric. Res.* 38: 729–733.
- Menzies, J. G., Koch, C., and Seywerd, F., 1990. Additions to the host range of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Disease*, 74:569-572.
- Mes, J. J., van Doorn, A. A., Wijbrandi, J., Simons, G., Cornelissen, B. J. C. and Haring, M. A. 2000. Expression of the *Fusarium* resistance gene *I-2* colocalizes with the site of fungal containment. *Plant Journal*. 23, 183-193.
- Michielse, C. B. and Rep, M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*. 10, 311-324.
- Munro, C.A., and Gow, N.A. 2001. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med Mycol* 39 (Suppl. 1): 41–53.
- Mutlu N., Demirelli A., Ilbi H. and Ikten C. 2015. Development of co-dominant SCAR markers linked to resistant gene against the *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Theoretical and Applied Genetics* volume 128, pages1791–1798.
- Namiki, F., Matsunaga, M., Okuda, M., Inoue, I., Nishi, K., Fujita, Y. and Tsuge, T. 2001. Mutation of an arginine biosynthesis gene causes reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14, 580-584.
- Nejad P. and P.A. Johnson 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. *Biological Control* 18, 208– 215.
- Nelson, A.J., Dignani, M.C., Anaissie, E.J. 1994. Taxonomy, biology, ve clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 479-504.
- O'Donnell, K., Kistler H. C., Cigelnik E. and Ploetz R. C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 2044-2049.

- Oliveira-Garcia E, Valent B. 2015. How eukaryotic filamentous pathogens evade plant recognition. *Current Opinion in Microbiology*.;26:92-101.
- Omar,I., O'neill T. M. and Rossall S. 2006. Biological control of fusarium crown and root rot of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim. *Plant Pathology* 55: 92-99.
- Ospina-Giraldo M.D., Mullins E. and Kang S. 2003. Loss of function of the *Fusarium oxysporum* SNF1 gene reduces virulence on cabbage and *Arabidopsis*, *Current Genetics* volume 44, pages49–57.
- Ozan S., Maden S. 2004. Ankara ili domates ekiliş alanlarında solgunluk ve kök ve kökboğazı çürüklüğüne neden olan fungal hastalık etmenleri. *Bitki Koruma Bülteni*, 44(1-4): 105-120.
- Parmar P. and Subramanian R. B. 2013. Isolation of NBS-LRR class resistant gene (I2 gene) from tomato cultivar Heamsona, *Academic Journal*, Vol. 12(42), pp. 6076-6078, 16.
- Parry M. 1990. *Climate change and world agriculture*. Earthscan Publications Limited, London, page: 157.
- Pena, R. J. H. 2005. Fusarium wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3, in Baja California Sur, Mexico. *Plant Disease* 89: 1360.
- Podile, A.R., Prasad, G.S., Dube, H.C. 1985. *Bacillus subtilis* as antagonist to vascular wilt pathogens, HARVEST (Holistic Access to Research on Vegetables, Economies, Societies and Technology), v.54(17):864-865.
- Rabiei-Motlagh E, Rouhani H, Shokouhifar F, Falahati Rastegar M, Taher P. 2017. Molecular identification of formae specialis and racial identity in Iranian strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: detection of avirulence genes. *JCP*. 6 (1) :67-77.
- Ramos, B., Alves-Santos, F. M., Garcia-Sdnehez, M. A., Martin-Rodrigues, N., Eslava, A. P. and Diaz-Minguez, J. M. 2007. The gene coding for a new transcription factor (ftfl) of *Fusarium oxysporum* is only expressed during infection of common bean. *Fungal Genetics and Biology*. 44, 864-876.
- Rana A., Sahgal M. and Johri B. N. 2017. *Fusarium oxysporum*: Genomics, Diversity and Plant–Host Interaction. *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology* 10:159-199.
- Reis, A., Costa, H., Boiteux, L. S. and Lopes, C. A. 2005. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil, *Fitopatologia Brasileira*, 30(4):426-428.
- Rekah, Y., Shitienberg, D., and Katan J. 2001. Population dynamics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in relation to the onset of Fusarium crown and root rot of tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 107 (4):367-375.
- Rep, M. 2005. Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS Microbiology Letters*. 253, 19-27.

- Rep, M., van der Does, H. C., Meijer, M., van Wijk, R., Houterman, P. M., Dekker, H. L., de Koster, C. G. and Cornelissen, B. J. C. 2004. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular Microbiology*. 53, 1373-1383.
- Roldán-Arjona, T., Pérez-Espinosa, A., and Ruiz-Rubio, M. 1999. Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* defines a new class of saponinases. *Mol. Plant-Microbe Interact.*12, 852–861.
- Roncero, C. 2002. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr Genet* 41: 367–378.
- Rowe, R.C., Farley, J.D. and Coplin, D.L. 1977. Airborne spore dispersal and recolonization of steamed soil by *Fusarium oxysporum* in tomato greenhouses. *Phytopathology* 67: 1513– 1517.
- Ruiz, A., Ranz, J.M., Caceres, M., Segarra, C., Navarro, A., Barbadilla, A. 1997. Chromosomal evolution and comparative gene mapping in the *Drosophila repleta* species group. *Revta bras. Genet.* 20(4): 553--565.
- Ruiz-Herrera, J., González-Prieto, J.M., and Ruiz-Medrano, R. 2001. Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res* 1438: 1–10.
- Ruiz-Herrera, J., J. Manuel Gonzá'lez-Prieto, and R. Ruiz-Medrano 2002. Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res.* 1:247–256.
- Ruiz-Roldán, M.C., Di Pietro, A., Huertas-González, M.D., and Roncero, M.I.G. 1999. Two xylanase genes of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* are differentially expressed during infection of tomato plants. *Mol. Gen. Genet.* 261, 530–536.
- Saunders, DF, Meredith, FI and Voss, KA. 2001. Control of fumonisin: effects of processing. *Environ Health Perspect*, 109: 333–336.
- Schoffelmeer E. A., Vossen J. H., van Doorn A. A., Cornelissen B. J., Haring M. A. 2001. FEM1, a *Fusarium oxysporum* glycoprotein that is covalently linked to the cell wall matrix and is conserved in filamentous fungi, *Mol Genet Genomics* 2001 Mar;265(1):143-52.
- Singleton, L. L., Mihail, J. D., Rush, C. M. 1992. *Methods for Research on Society*, St. Paul, Mn. 100p.
- Snyder WC. and Hansen H. N. 1941. The species concept in *Fusarium* with reference to section *Martiella*. *Amer J Bot* 28:738–742.
- Stall, R.E. and Walter, J.M. 1965. Selection and inheritance of resistance in tomato to isolates of races 1 and 2 of the *Fusarium* wilt organism. *Phytopathology*, 55, 1213– 1215.
- Takken F, Albrecht M, Tameling W. 2006. Resistance proteins: Molecular switches of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology.*;9(4):383-390
- Takken, F. ve Rep, M. 2010. The arms ırk between tomato ve *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 11: 309-314.

- Thirumalachar M.J., P.W. Rhalkar, R.S. Sukapure, P.H. Pawar and P.V. Desia 1970. Control of damping-off and root rot with use of *Streptomyces* species. Hindustan Antibiotics Bulletin 12, 138–141.
- Townsend G.K., Heuberger J.W. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. Plant Disease Report, 27: 340-343.
- Turhan, G. 1981. A new race of *Streptomyces ochraceiscleroticus* in the biological control of some soil-borne plant pathogens II. In vivo studies on the possibilities of using C/2-9 against some important diseases. Journal of Plant Diseases and Protection 88, 422–434.
- Vakalounakis, D.J., H. Laterrot, A. Moretti, E.K. Ligoixigakis & Smardas K. 1997. Linkage between *Frl* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* resistance) and *Tm-2* (tobacco mosaic virus resistance-2) loci in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Ann Appl Biol 130: 319–323.
- Van der Does, H. C., Duyvesteijn, R. G. E., Goltstein, P. M., van Schie, C. C. N., Manders, E. M. M., Cornelissen, B. J. C. and Rep, M. 2008. Expression of effector gene *SIX1* of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. *Fungal Genetics and Biology*. 45, 1257-1264.
- Volin Rb; Jones JP. 1982. A new race of *Fusarium* wilt of tomato in Florida and sources of resistance. *Proceedings of Florida State Horticultural Society* 95: 268-270.
- Vural, H., Eşiyok, D., Duman, İ. 2000. Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme), Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 440 s., İzmir.
- Williams, A. H., Sharma, M., Thatcher, L. F., Azam, S., Hane, J. K., Sperschneider, J., Kidd, B. N., Anderson, J. P., Ghosh, R., Garg, G., Lichtenzweig, J., Kistler, H. C., Shea, T., Young, S., Buck, S. A., Kamphuis, L. G., Saxena, R., Pande, S., Ma, L. J., Varshney, R. K., and Singh, K.B. 2016. Comparative genomics and prediction of conditionally dispensable Page 28 of 50 sequences in legume-infecting *Fusarium oxysporum* formae speciales facilitates identification of candidate effectors. *BMC Genomics* 17:191
- Xu, J.-R. 2000. MAP kinases in fungal pathogens. *Fungal Genet. Biol.* 31, 137–152.
- Yadeta K.A., Thomma J.B.P.H. 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Front. Plant Sci.* ;4:97.
- Yoksuloğlu, F. 2001. Domates yetiştiriciliği ve Domates Virüs Hastalıkları. ÇÜ Bitki Koruma Bölümü, Mezuniyet Tezi. Zubiaur M., 2008. First Report of Tomato chlorosis virus Infecting Tomato in Singleand Mixed Infections with Tomato yellow leaf curl virus in Cuba. *Plant Dis* 92: 836.
- Zhao Z, Liu H, Wang C, Xu JR. 2013. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics*.;14:274. doi: 10.1186/1471-2164-14-274.

8. EKLER**EK 1: PDA besi ortamın hazırlanması**

500 ml ddH₂O

20 gr Patates Dekstroz Agar (Merck)

Otoklavda 121 °C’de sıcaklıkta 1 atm basınçta 20 dakikada steril yapılmıştır.

EK 2: Total nükleik Asit izolasyonun CTAB solüsyonu

1 M Tris pH 8.0 100 ml;

0.5 M EDTA (Ethylenediaminetetra Acetic acid Di-sodium salt) pH 8.0 40 ml;

5 M NaCl (Sodium Chloride) 280 ml;

H₂O 400 ml;

20 gr CTAB (Hexadecyl trimethyl-ammonium bromide)

Manyetik karıştırıcıda 60°C’de karıştırarak CTAB kmyasalın erimesine sağlanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

GÜLŞEN ERBERK
gl.brk512@hotmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2018-2020	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Endüstri, Bitki Koruma Bölümü, Antalya
Lisans 2013-2017	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya