



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



DOKTORA TEZİ

***Fusarium* TÜRLERİNDE TRİKOTESEN ÜRETİMİNİN
DURDURULMASI**

Emre YÖRÜK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Gülruh ALBAYRAK

Haziran, 2014

İSTANBUL

Bu çalışma 10/06/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



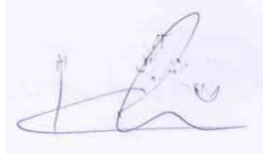
Doç. Dr. Gülrüh ALBAYRAK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Şule ARI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Kadir TURAN
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Muhsin KONUK
Üsküdar Üniversitesi
Mühendislik ve Doğa Bilimleri
Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 23489 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Akademik eğitim hayatım boyunca her aşamada ilgi, destek ve sevgisini gördüğüm Danışmanım Doç. Dr. Gülruh ALBAYRAK'a en içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Başta Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Nazlı ARDA olmak üzere bütün saygıdeğer Öğretim üyelerine, tez jüri üyeleri Prof. Dr. Şule ARI ve Prof. Dr. Kadir TURAN'a ve çalışma arkadaşlarıma çalışmalarım esnasında bulundukları katkılardan ötürü teşekkür ederim.

Sadece doktora tez çalışmalarında değil bütün çalışmalarında maddi ve manevi desteğini her zaman hissettiğim çalışma arkadaşım Mol. Biy. Aylin Gazdağlı'ya teşekkür ederim.

Akademik çalışmalarında çok zaman beyin fırtınası gerçekleştirdiğim ve desteklerini gördüğüm Araş. Gör. Dr. Murat PEKMEZ ve Dr. Sibel YILMAZ'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında kullandığım patojen organizmaları kendi kültür koleksiyonundan teminini sağlayan Sayın Prof. Dr. Berna TUNALI Hoca'ma (Samsun 19 Mayıs Üniversitesi), yardımcı plazmid sağladıkları için Hitokshi Nakayashiki ve Peter J. Punt'a, floresan mikroskop çalışmalarındaki desteğinden ötürü Sayın Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI Hoca'ma ve Araş. Gör. Sevgi MARAKLI'ya, patojen materyalin faz kontrast mikroskobu ile fotoğraflanmasındaki emeği ve desteği için Sayın Prof. Dr. Neslihan BALKIS Hocama ve Dr. Muharrem Bal'a teşekkür ederim.

Doktora öğrenimim boyunca beş yıl süre ile bursiyeri olduğum Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK)'a teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi manevi her türlü desteği sağlayan sevgili AİLEME en içten teşekkürlerimi, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Haziran, 2014

Emre YÖRÜK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. RNA İNTERFERANS (RNAi) SÜRECİ.....	5
2.1.1. Ökaryotlarda Gen Anlatımı ve Kontrolü	5
2.1.2. RNAi Tarihçesi ve Genel Mekanizması	7
2.1.3. siRNA Aracılı Transkripsiyonel Susturma	9
2.1.4. siRNA Aracılı Post-Transkripsiyonel Susturma	10
2.1.5. RNAi Kullanım Alanları.....	13
2.2. BİTKİ PATOLOJİSİ VE BİTKİ PATOJENİ ORGANİZMALAR	16
2.3. BİTKİ PATOJENİ OLARAK <i>Fusarium</i> TÜRLERİ	17
2.3.1. <i>Fusarium graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> Türlerinin Genel Özellikleri ve Genom Projeleri	19
2.4. B SINIFI TRİKOTESENLER VE DİĞER <i>Fusarium graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> MİKOTOKSİNLERİ	23
2.4.1. B Sınıfı Trikotesenler	25
2.5. <i>Fusarium graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> ; GENETİK YAKLAŞIMLAR	32
2.5.1. Mutantlarla Yapılan Çalışmalar	32
2.5.2. Moleküler Markır Aracılı Genetik Karakterizasyon	33
2.5.3. Gen Susturma Çalışmaları	36
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	39
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN <i>Fusarium</i> İZOLATLARI.....	39
3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN MİKROORGANİZMALARIN ÜRETİMİ	39
3.2.1. <i>Fusarium</i> İzolatlarının Kültür Koşulları ve Saklaması	40

3.2.2. <i>Escherichia coli</i> DH5 α Üretimi	41
3.3. DENENEN ORTAM KOŞULLARI	42
3.3.1. Farklı Koşullarda F15 İzolatının <i>in vitro</i> Kültürlerinin Kurulması.....	42
3.3.2. Total RNA İzolasyonu.....	42
3.3.3. RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi	43
3.3.4. Total RNA Moleküllerinin Agaroz Jel Elektroforezi.....	43
3.3.5. cDNA Çevrimi	44
3.3.6. F15 İzolatında <i>tri4</i> Anlatımının Gerçek Zamanlı PZR ile Belirlenmesi	44
3.3.7. F15 İzolatında <i>tri4</i> Gen Anlatımının RT-PZR ile Doğrulanması	45
3.3.8. Verilerin Analizi.....	46
3.4. SUSTURMA ÇALIŞMALARINDA KULLANILACAK <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> İZOLATLARININ SEÇİMİ.....	46
3.4.1. <i>tri4</i> , <i>tri5</i> ve β - <i>tubulin</i> Genlerinin 38 İzolatın Genomunda PZR ile Çoğaltımı	46
3.4.1.1. Genomik DNA İzolasyonu	46
3.4.1.2. Genomik DNA'nın Nicel ve Nitel Analizi.....	47
3.4.1.3. Genomik DNA'nın PZR ile Çoğaltımı ve Analizi	47
3.4.2. En Yüksek <i>tri4</i> ve <i>tri5</i> Gen Anlatımı Yapan İzolatların Belirlenmesi.....	48
3.4.2.1. Primer ve TaqMan Prob Tasarımı.....	48
3.4.2.2. RNA İzolasyonu ve cDNA Kitaplıklarının Kurulması.....	50
3.4.2.3. <i>Fusarium</i> İzolatlarında <i>tri4</i> , <i>tri5</i> ve β - <i>tubulin</i> Genlerinin Gerçek Zamanlı PZR Analizi.....	50
3.4.2.4. <i>tri4</i> , <i>tri5</i> ve β - <i>tubulin</i> Gen Anlatımının RT-PZR ile Kontrolü.....	51
3.5. <i>tri4</i> ve <i>tri5</i> GENLERİNİN NUKLEOTİD DİZİLİMLERİNİN <i>F. graminearum</i> 4F, <i>F. culmorum</i> 9F VE 20F İZOLATLARINDA BELİRLENMESİ.....	51
3.5.1. Tam Boydaki <i>tri4</i> ve <i>tri5</i> Genlerinin PZR ile Çoğaltımı.....	52
3.5.2. Çoğaltım Ürünlerinin <i>E. coli</i> DH5 α Suşuna Transformasyonu.....	52
3.5.2.1. Transformasyona Yeterli Hücre Eldesi.....	53
3.5.2.2. Çoğaltım Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu.....	53
3.5.2.3. Transformasyon	53
3.5.2.4. Transformantların Seçimi.....	54
3.5.2.5. Plazmid İzolasyonu	54
3.5.2.6. Plazmidin Taşıdığı <i>tri4</i> ve <i>tri5</i> Genlerinin PZR ile Çoğaltımı ve Analizi	55
3.5.2.7. Dizileme.....	55
3.6. PROTOPLAST KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI.....	56

3.6.1. Parçalama.....	56
3.6.2. Saflaştırma	57
3.6.3. Protoplast Sayısının Belirlenmesi	57
3.7. 4F, 9F VE 20F İZOLATLARINDA siRNA TRANSFEKSİYONU	57
3.7.1. İzolatlarda Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi.....	58
3.7.2. siRNA Molekül Tasarımı	58
3.7.3. Transfeksiyonda Kullanılan Yardımcı Plazmidler.....	59
3.7.3.1. Yeterli Hücre Eldesi ve Transformasyon	60
3.7.3.2. Transformantların Seçimi.....	60
3.7.3.3. Plazmid İzolasyonu ve Plazmidlerin Doğrulanması.....	61
3.7.4. Plazmid Moleküllerinin Birlikte Aktarıldığı siRNA Transfeksiyonu	61
3.7.4.1. Deney Grubu I ve II'nin Oluşturulması	62
3.7.4.2. Deney Grubu III ve IV'ün Oluşturulması.....	63
3.7.5. siRNA Aktarımının Doğrulanması.....	63
3.7.5.1 Fluoresan Mikroskobu İncelemesi.....	63
3.7.5.2 Transformasyon Frekansının Belirlenmesi	63
3.7.5.3 Spektrofluorometrik Analiz.....	64
3.7.5.4 PZR ile Doğrulama.....	64
3.8. siRNA AKTARILMIŞ İZOLATLARDA TRANSKRİPTOMİK ve METABOLOMİK ANALİZLER	65
3.8.1. Gerçek Zamanlı PZR ile Transkriptom Düzeyinde Gösterim	65
3.8.1.1. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	65
3.8.1.2. Gerçek Zamanlı PZR ile <i>tri4</i> ve <i>tri5</i> Gen Anlatımının Analizi.....	66
3.8.1.3. RT-PZR ile Gen Anlatımının Doğrulanması	66
3.8.2. İnce Tabaka Kromatografisi	66
4. BULGULAR.....	68
4.1. ORTAM KOŞULLARININ TRIKOTESEN ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ.....	68
4.1.1. Trikotesen Üretimini Etkileyen Ortam Koşulunun Belirlenmesi	68
4.1.2. Total RNA ve cDNA Analiz Sonuçları.....	68
4.1.3. Gerçek Zamanlı PZR ile <i>tri4</i> Gen Anlatımı Analiz Sonuçları.....	69
4.1.4. RT-PZR ile <i>tri4</i> Gen Anlatımının Doğrulanması	71
4.2. SUSTURMA ÇALIŞMALARINDA KULLANILACAK <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> İZOLATLARININ MOLEKÜLER ANALİZİ.....	71
4.2.1. Genomik DNA'da <i>tri4</i> , <i>tri5</i> ve β - <i>tubulin</i> Genlerinin PZR ile Analizi.....	72
4.2.2. Gerçek Zamanlı PZR ile <i>tri4</i> , <i>tri5</i> ve β - <i>tubulin</i> Gen Anlatımının Analizi	72

4.2.3. RT-PZR ile Gen Anlatımının Kontrolü	74
4.3. 4F, 9F VE 20F İZOLATLARINDA <i>tri4</i> ve <i>tri5</i> GEN DİZİLİMLERİNİN BELİRLENMESİ.....	75
4.3.1. Tam Boyda <i>tri4</i> ve <i>tri5</i> Genlerinin PZR ile Analiz Sonuçları ve pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanma Bulguları.....	75
4.3.2. Dizilim Bilgilerinin Analizi	76
4.4. PROTOPLAST KÜLTÜRLERİNİN ELDESİ.....	79
4.5. <i>Fusarium</i> İZOLATLARINDA siRNA TRANSFEKSİYONU	80
4.5.1. Üremeyi Engelleyen Minimum Antibiyotik Konsantrasyonu	80
4.5.2. Tasarlanan siRNA'lar	81
4.5.3. Transfeksiyon İçin Yardımcı Plazmid Eldesi	85
4.5.4. Plazmid Moleküllerinin Birlikte Aktarıldığı siRNA Transfeksiyonun Analizi.....	88
4.5.4.1. <i>pAN 7-1</i> Yardımcı Plazmidli siRNA Aktarımının Doğrulanma Bulguları.....	88
4.5.4.2. <i>pEGFP75</i> Yardımcı Plazmidli siRNA Aktarımının Doğrulanma Bulguları.....	89
4.6. siRNA AKTARILAN İZOLATLARDA TRANSKRİPTOMİK ve METABOLOMİK ANALİZ BULGULARI	93
4.6.1. siRNA Aktarılmış İzolatlarda Gerçek Zamanlı PZR ile Transkriptomik Analiz.....	93
4.6.2. RT- PZR Analizi	95
4.6.3. Kromatografik Analizler.....	95
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	96
KAYNAKLAR.....	107
ÖZGEÇMİŞ	122

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Özgün ve özgün olmayan çift iplikli RNA susturma yolları (Thakur, 2003).....	11
Şekil 2.2: Deoksinivalenol molekülünün genel formülü.....	27
Şekil 2.3: (A) <i>Fusarium graminearum</i> 88-1 ırkında <i>tri5</i> gen kümesinde yer alan genler, (B) <i>tri4</i> ve <i>tri5</i> genlerinin ekzon (mavi) ve intron (siyah) bölgelerinin gösterimi, (C) TRI5, (D) TRI4 proteinlerinin sürdürdüğü enzimatik reaksiyonlar.	28
Şekil 3.1: (A) F15 ve 1F izolatlarının katı PDA’da üretilen, (B) 4F, 9F ve 20F izolatlarının sıvı PDB besi ortamında üretilen yedi günlük kültürleri.	41
Şekil 3.2: <i>tri4</i> (A), <i>tri5</i> (B) ve β - <i>tubulin</i> geni (C) için tasarlanan primer ve prob molekülleri. Mavi oklar problemleri, siyah oklar primer çiftlerini göstermektedir.....	49
Şekil 3.3: (A) pEGFP75 ve (B) pAN 7-1 yardımcı plazmidlerinin haritaları.	59
Şekil 4.1: Altı farklı besi ortamında üretilen F15 izolatının bir haftalık kültürleri. (1) pH 5.6/25°C PDA kontrol, (2) pH3/25°C PDA, (3) pH7/25°C PDA, (4) pH 5.6/8°C PDA, (5) pH 5.6/15°C PDA ve (6) pH5.6/25°C/0.5 mM H ₂ O ₂ PDA besi ortamları.	68
Şekil 4.2: Altı farklı koşulda üretilen F15 kültürlerine ait total RNA molekülleri. (1) pH 5.6/25°C PDA kontrol, (2) pH3/25°C PDA, (3) pH7/25°C PDA, (4) pH 5.6/8°C PDA, (5) pH 5.6/15°C PDA ve (6) pH5.6/25°C/0.5 mM H ₂ O ₂ PDA besi ortamları.	69
Şekil 4.3: Altı koşulda üretilen F15 izolatının <i>tri4</i> gen anlatımındaki oransal değişimler.....	70
Şekil 4.4: Altı farklı koşulda üretilen F15 izolatında <i>tri4</i> gen anlatımı profili. N: Negatif kontrol, M: 100 bp DNA markırı.	71
Şekil 4.5: (A) Tri4 ileri/right primer çifti ile elde edilen 139 bp’lik ve (B) Tox5-1/2 primer çifti ile elde edilen 658 bp’lik çoğaltım ürünleri. N: Negatif kontrol, M: 100 bp DNA boyut markırı.....	72
Şekil 4.6: “Tripure” kullanılarak 14 <i>F. graminearum</i> izolatından izole edilen total RNA molekülleri.	72
Şekil 4.7: <i>tri4</i> gen anlatımına ilişkin $\Delta\Delta CT$ değerlerine göre <i>F. graminearum</i> izolatlarının grafikte gösterimi.	74
Şekil 4.8: (A) 658 bp boyutundaki <i>tri5</i> ve (B) 465 bp boyutundaki endojen gen ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. N: negatif kontrol, M: 1kb/100 bp DNA boyut markırı.	75

Şekil 4.9: 4F ve 20F izolatlarında 1.7 kb boyutundaki <i>tri4</i> geninin, 4F ve 9F izolatlarında 1.2 kb boyutundaki <i>tri5</i> geninin çoğaltım ürünleri. N: negatif kontrol, M: 1 kb DNA boyut markırı.	75
Şekil 4.10: Antibiyotikli besi ortamında üretilen transformant koloniler.	76
Şekil 4.11: Transformant kolonilerden elde edilen pGEM- <i>tri4</i> ve pGEM- <i>tri5</i> vektörlerinden çoğaltılan 4F, 9F ve 20F izolatlarına ait <i>tri4</i> ve <i>tri5</i> gen ürünleri. N: negatif kontrol, M: 1 kb DNA boyut markırı.	76
Şekil 4.12: 20 izolatının genomik DNA'sından çoğaltılan <i>tri5</i> genine ait ileri yönlü (A) ve geri yönlü (B) primerler ile elde edilen 500-600. nukleotidlere ait dizilim bilgilerine ait kromatogramlar.	77
Şekil 4.13: 20F izolatına ait <i>tri4</i> gen dizilim bilgisinin ileri (A) ve geri (B) yönlü dizilim bilgilerinin veritabanında BLASTN analizi sonucu çıkan benzerliklerin şematik gösterimi.	77
Şekil 4.14: 9F izolatının genomuna ait <i>tri5</i> dizilim bilgisinin ileri (A) ve geri (B) yönlü karşılaştırma analizi.	78
Şekil 4.15: Üç <i>Fusarium</i> izolatı ile referans ırkın trikodien sentaz proteinine ait amino asit dizilimlerinin BLASTP analizi.	78
Şekil 4.16: 6 saatlik litik enzim uygulaması ile elde edilen protoplastların 40X ışık mikroskobu görüntüleri.	80
Şekil 4.17: Higromisin B içeren PDB besi ortamındaki 4F, 9F ve 20F izolatlarına ait yedi günlük kültürler. Tüpler üzerindeki değerler ml'deki µg cinsinden antibiyotik konsantrasyonunu göstermektedir.	81
Şekil 4.18: Veritabanına kayıtlı altı farklı ırka ait <i>tri5</i> geninin ClustalW analizi sonucu elde edilen 1. (A) ve 2. (B) ekzonuna ait kısmi dizilimleri. Üzeri karartılmış dizilimler siRNA tasarımı için seçilen bölgeyi, * tüm ırklarda identik olan nukleotidleri göstermektedir.	82
Şekil 4.19: Altı farklı ırka ait <i>tri4</i> geninin CLUSTALW analizi sonucu elde edilen 1. (A), 2. (B), 3. (C) ve 4. (D) ekzonlarına ait kısmi dizilimler. Üzeri karartılmış dizilimler tüm referanslarda identik olan ve siRNA tasarımı için seçilen bölgeyi, * tüm ırklarda identik olan nukleotidleri göstermektedir.	83
Şekil 4.20: 6 siRNA molekülünün <i>tri4</i> ve <i>tri5</i> gen dizilim bilgileri ile homoloji karşılaştırması. *İzolatlardaki özgün siRNA bölgelerini göstermektedir.	85
Şekil 4.21: pAN 7-1 ve pEGFP75 plazmidlerini taşıyan beyaz kolonilerden, koloni PZR sonucu elde edilen 0.7 kb'lık <i>hph</i> ve <i>GFP</i> gen ürünleri. N: negatif kontrol, M: 1 kb DNA boyut markırı.	86
Şekil 4.22: Çalışmada kullanılan pAN 7-1 (A) ve pEGFP75 (B) yardımcı plazmidlerin <i>XhoI</i> restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesimi sonucu elde edilen kesim profilleri. M: 1 kb DNA boyut markırı, P1: kesime uğratılmamış pAN 7-1, P2: kesime uğratılmamış pEGFP75, I: kesime uğratılmış pAN 7-1, II: kesime uğratılmış pEGFP75 plazmidleri. ..	87

Şekil 4.23: pAN 7-1 ve pEGFP75 plazmidlerinden PZR sonucu elde edilen 0.7 kb'lık <i>hph</i> ve <i>GFP</i> gen ürünleri. N: negatif kontrol, M: 1 kb DNA boyut markırı.	87
Şekil 4.24: (A) Tekli, (B) ikili, (C) üçlü ve (D) dördü siRNA aktarımı yapılmış 4F izolatlarının PDB+25µg/ml besi ortamındaki yedi günlük kültürleri.....	88
Şekil 4.25: pAN 7-1 vektörlerinin aktarıldığı 4F, 9F ve 20F örneklerinin antibiyotikli PDB besi ortamında üreyen yedi günlük kültürleri.	89
Şekil 4.26: <i>tri4</i> ve <i>tri5</i> genlerine özgün siRNA aktarılmış 4F, 9F ve 20F izolatların genomik DNA'larında <i>hph</i> geninin çoğaltımı. N: negatif kontrol, M: 100 bç DNA boyut markırı.	89
Şekil 4.27: pEGFP75 vektörünü alan <i>Fusarium</i> izolatlarında ışıma yapan 4F ve 9F (20X) izolatları ile 20F (40X) izolatına ait miselyum/miselyumların floresan mikroskobu görüntüleri.	90
Şekil 4.28: Farklı siRNA kombinasyonlarının pEGFP75 yardımcı plazmidi ile birlikte aktarımı sonucu spektrofotometrik analiz ile elde edilen RFU değerlerinin (A) <i>F. graminearum</i> 4F, (B) <i>F. culmorum</i> 20F ve 9F izolatlarında grafikte gösterimi.	91
Şekil 4.29: RFU değerlerine göre pozitif ve negatif kontrol gruplarını temsil eden izolatların grafikte gösterimi.	92
Şekil 4.30: <i>tri4</i> ve <i>tri5</i> genlerine özgün siRNA aktarılmış 4F, 9F ve 20F izolatların genomik DNA'larında çoğaltılan <i>GFP</i> geni. N: negatif kontrol, M: 100 bç DNA boyut markırı. ..	93
Şekil 4.31: Farklı siRNA kombinasyonlarının pEGFP75 yardımcı plazmidi ile birlikte aktarıldığı <i>F. graminearum</i> 4F izolatında (A) ve <i>F. culmorum</i> 20F ve 9F izolatlarında (B) ince tabaka kromatografisi. M: trikotesen standardı (Sigma, Almanya). Siyah ok DON mikotoksinini içeren 0.28 Rf değerindeki trikotesen karışımını göstermektedir.	95

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Bitki patojenleri ve oluşturdıkları hastalıklar.	17
Tablo 2.2: B tipi dört trikotesen örneği ve yan zincirlerindeki gruplar.	27
Tablo 2.3: <i>Fusarium</i> türlerinin genetik karakterizasyonunda kullanılan PZR temelli uygulamalar.	34
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan <i>Fusarium</i> izolatları.	39
Tablo 3.2: <i>Fusarium</i> izolatlarının üretilmesinde kullanılan besi ortamları ve içerikleri, pH 5.6.	40
Tablo 3.3: Bakteri üretiminde kullanılan besi ortamları, pH 7.0.	41
Tablo 3.4: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponların bileşenleri ve derişimleri.	44
Tablo 3.5: Gen anlatımı çalışmalarında kullanılan primer molekülleri.	45
Tablo 3.6: 38 izolatta <i>tri4</i> , <i>tri5</i> ve β - <i>tubulin</i> genlerinin çoğaltımında kullanılan primerler.	48
Tablo 3.7: Gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan primerler.	50
Tablo 3.8: RT-PZR çalışmalarında kullanılan primer molekülleri.	51
Tablo 3.9: Nukleotid dizilimi belirlenecek <i>tri4</i> ve <i>tri5</i> genlerinin çoğaltımında ve dizilenmesinde kullanılan oligonukleotidler.	52
Tablo 3.10: Plazmid izolasyonunda kullanılan çözelti.	54
Tablo 3.11: Çalışmada kullanılan siRNA molekülleri.	59
Tablo 3.12: pAN 7-1 ve pEGFP75 vektörlerinin taşıdığı direnç genlerinin koloni PZR ile çoğaltımında kullanılan primer çiftleri.	60
Tablo 3.13: Hedef gen, izolat ve siRNA kombinasyonuna göre gerçekleştirilen deney grupları.	62
Tablo 4.1: Altı farklı koşulda üretilen F15 izolatında gen anlatımı ile ilişkili değerler.	69
Tablo 4.2: 38 izolatta hedef ve endojen genlere ait gen anlatım değerleri. En yüksek gen anlatım değerleri büyük punto ile gösterilmiştir.	73
Tablo 4.3: <i>tri4</i> ve <i>tri5</i> genlerine ait dizilim bilgilerinin BLASTN analizine ait veriler.	77

Tablo 4.4: Üç <i>Fusarium</i> izolatu ile referans ırkın (Ref) trikodien sentaz; TRI5 monooksijenaz; TRI4 proteinlerine ait amino asit dizilimlerinin BLASTP analizi sonucunda elde edilen % benzerlik değerleri.....	79
Tablo 4.5: <i>tri5</i> geni için tasarlanan siRNA molekülleri.	82
Tablo 4.6: <i>tri4</i> geni için tasarlanan siRNA molekülleri.	84
Tablo 4.7: Farklı siRNA kombinasyonlarının aktarıldığı 4F, 9F ve 20F izolatlarında spektrofotometrik ölçümler. 1-18 arasındaki numaralandırmalar deney seti I, II, III ve IV'e ait örnekleri ifade etmektedir (bkz: Tablo 3.13).	90
Tablo 4.8: Özgün siRNA moleküllerinin aktarılmadığı, sadece pEFGP75 yardımcı plazmidinin transfeksiyonla aktarıldığı izolatlarını temsil ettiği pozitif kontrol grupları ve siRNA molekülleri ve yardımcı plazmid aktarılmamış protoplast kültürlerinin temsil ettiği negatif kontrollere ait spektrofotometrik değerler. *** Kontrol grubuna göre deney gruplarındaki anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p<0.0001$).	92
Tablo 4.9: Farklı kombinasyonlardaki siRNA moleküllerinin aktarıldığı izolatlarını hedef ve endojen gen anlatım değerleri.	94
Tablo 4.10: Pozitif kontrol gruplarında <i>tri4</i> ve <i>tri5</i> gen anlatımı ile ilişkili Cp ve $\Delta\Delta CT$ değerleri.	94

ÖZET

DOKTORA TEZİ

Fusarium TÜRLERİNDE TRİKOTESEN ÜRETİMİNİN DURDURULMASI

Emre YÖRÜK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Gülrüh ALBAYRAK

Bu çalışmada *Fusarium* türlerinde trikotesen biyosentezi ile ilişkili *tri4* ve *tri5* genleri siRNA aracılı mekanizma ile susturuldu. RNAi, *F. graminearum* 4F ve *F. culmorum* 9F ve 20F izolatlarında genlerin ekzonik bölgelerine özgün olarak tasarlanan altı siRNA molekülü ile tetiklendi. Bu amaçla, 38 *Fusarium* izolatında farklı *in vitro* koşulların *tri4* ve *tri5* anlatımı üzerindeki etkileri incelendi. pH 5.6 ve 25°C’de üretilen *Fusarium* kültürleri kontrol grubu olarak kullanıldı. Sıcaklığın trikotesen üretimine etkisi, miselyumun pH değeri 5.6 olan besi ortamında, 8°C ve 15°C’de kültüre edilmesi ile test edildi. pH’nın etkisi ise, *Fusarium* türlerinin pH değeri 3.0 ve 7.0 olan besi ortamlarında, 25°C’de kültüre edilmesi ile araştırıldı. Trikotesen üretimine etkisi denenen bir diğer parametre ortama H₂O₂ (0.5 mM) eklenmesidir. En yüksek *tri4* ve *tri5* anlatım düzeyleri kontrol grubunda belirlendi. Taranan 14 izolat arasında en yüksek *tri4* ve *tri5* geni anlatım düzeyi *F. graminearum* 4F’de saptandı. En yüksek *tri4* anlatımı 24 *F. culmorum* izolatı arasından 20F’te belirlenirken, maksimum *tri5* anlatımı 9F’te bulundu. Dolayısıyla, bu üç izolat RNAi mekanizmasının indüksiyonu için seçildi. Tam boydaki *tri4* ve *tri5* fragmentleri, özgün siRNA moleküllerini tasarlamak için 4F, 9F ve 20F izolatlarından çoğaltıldı, dizilendi ve CLUSTALW analizine tabi tutuldu. Dizileme sonuçları referans genoma ait *tri4/tri5* genleri ile 4F, 9F ve 20F izolatlarına ait gen dizilimleri arasında yüksek düzeyde (%94-99) benzerlik olduğunu ortaya koydu. Bu üç izolatın iki genine ait dizilim bilgileri aksesyon numaraları alınarak (KJ677970, KJ677971, KJ677972, KJ677973, KJ677974 ve KJ677975) veritabanına eklendi. Çalışmada kullanılan siRNA molekülleri bu dizilim bilgilerine göre biyoinformatik araçlarla tasarlandı. Kuramsal olarak belirlenen 60 ekzonik siRNA molekülü arasından *tri4* için dört (Tri4E1:5'-ACAATACGGGCGTGAGTCATGTCAA-3', Tri4E2:5'-GAACCCTGAGAGAAGTTGGTGATGT-3', Tri4E3:5'-ACATGCTCCTTGACTTCAAGTTCT-3', Tri4E4:5'-CATCTTGAGATCTCCAGAGAT-3'), *tri5* için ise iki siRNA (Tri5E1:5'-AAGCGACTACAGGCTCCCTCCAAA-3', Tri5E2:5'-CAGGATCTGATGACTACCCTCAATT-3') gen susturma çalışmalarında kullanılmak üzere seçildi. Bu altı çift iplikli siRNA,

protoplast kültürlerine tekli ve çoklu olmak üzere *tri4* için 30, *tri5* için de altı farklı kombinasyonda yardımcı plazmidler (pEGFP75 ve pAN7-1) ile birlikte transfekte edildi. Transfeksiyon etkinliği 36 deneme grubunda 50 ± 0.00 ile $99.33 \pm 10.06/5 \times 10^4$ arasında bulundu. Transfektantlar floresan mikroskopisi ve spektrofotometrik analizle seçildi. Hücrelerde GFP proteininin yayımlandığı floresan ışımada spektrofotometrik olarak ölçüldü. Transfektantların RFU (relatif floresan ünitesi) değerleri 1.37 ± 0.07 - 2.89 ± 0.06 arasında bulundu. Ayrıca pEGFP75 ve pAN7-1 plazmidlerinin aktarıldığı transfektantların seçiminde PZR da kullanıldı. Bu amaçla pAN7-1 plazmidindeki *hph* ve pEGFP75 plazmidindeki *GFP* genlerinin 0.7 kb'lik parçası çoğaltıldı. 30 deneme setinde *tri4* geninin %100'e yakın düzeylerde baskılandığı gerçek zamanlı PZR analizi ile gösterildi. Geriye kalan altı deneme grubunda her iki tür için *tri5* gen anlatımındaki azalma %65-95 olarak belirlendi. Aynı zamanda, *tri4* ve *tri5* susturulmuş *Fusarium* örneklerinde trikotesen biyosentezinin son ürünü olan DON mikotoksininin üretilmediği de ince tabaka kromatografisi ile de gösterildi. Sonuç olarak bu çalışmada *tri4* ve *tri5* genlerinin trikotesen biyosentez yolağının susturulmasında kullanılabileceği gösterildi. Bununla birlikte *tri4* geninin *tri5*'e göre RNAi için daha kullanışlı bir hedef olabileceği sonucuna varıldı. *Fusarium* türlerinde siRNA transfeksiyonunun sonucu olarak gözlenen *tri4* ve *tri5* gen anlatımındaki belirgin düşmenin post-transkripsiyonel düzeyde gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu çalışma *Fusarium* türlerinde siRNA aracılı gen susturma ile ilişkili ilk rapor olması yanı sıra, bitki patojeni olan türler ile mücadelede uygulanabilecek model olması bakımından da büyük önem taşımaktadır.

Haziran 2014, 123.

Anahtar kelimeler: *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, trikotesen, RNA aracılı gen susturma, siRNA

SUMMARY

Ph.D. THESIS

QUELLING of TRICHOTHECENE PRODUCTION in *Fusarium* SPECIES

Emre YÖRÜK

İstanbul University

Graduate School of Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK

In this study, *tri4* and *tri5* genes associated with trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species were quelled with siRNA mediated mechanism. RNAi was triggered by six siRNA molecules designed specific to exonic sites of the genes in *F. graminearum* 4F and *F. culmorum* 9F and 20F isolates. For this purpose, effects of different *in vitro* conditions on *tri4* and *tri5* expression were investigated in 38 *Fusarium* isolates. *Fusarium* cultures grown on pH 5.6 and at 25°C was used as control group. Effects of temperature on trichothecene production was tested by cultivating of mycelia on medium with pH value of 5.6 at 8°C and 15°C. Also, the effects of pH was investigated by cultivating the *Fusarium* species on medium with pH 3.0 and 7.0 at 25°C. Another factor effecting trichothecene production was addition of H₂O₂ (0.5 mM) to medium. Maximum *tri4* and *tri5* expression levels were determined in control groups. Maximum expression levels of *tri4* and *tri5* genes were detected in 4F among screened 14 *F. graminearum* isolates. While the highest *tri4* expression was determined in 20F among 24 *F. culmorum* isolates, maximum *tri5* expression was found in 9F. Consequently, these three isolates were selected for induction of RNAi mechanism. In order to design specific siRNA molecules, full length *tri4* and *tri5* fragments were amplified from 4F, 9F and 20F isolates, sequenced and subjected to CLUSTALW analysis. Sequencing results revealed that there was high levels of similarity (94-99%) between *tri4/tri5* genes belonging to reference genome and gene sequences that of 4F, 9F and 20F isolates. Sequence data belonging to two genes of these three isolates were deposited under database by gaining accession numbers (KJ677970, KJ677971, KJ677972, KJ677973, KJ677974 and KJ677975). siRNA molecules used in study were generated according to these sequence data via bioinformatic tools. Among hypothetically identified 60 exonic siRNA molecules, four siRNA for *tri4* (Tri4E1:5'-ACAATACGGGCGTGAGTCATGTCAA-3', Tri4E2:5'-GAACCCTGAGAGAAGTTGGTGATGT-3', Tri4E3:5'-ACATGCTCCTTGTACTTCAAGTTCT-3', Tri4E4:5'-CATCTTGGAGATCTCCCAGAGAT-3') and

two siRNA for *tri5* gene (Tri5E1:5'-AAGCGACTACAGGCTTCCCTCCAAA-3', Tri5E2:5'-CAGGATCTGATGACTACCCTCAATT-3') were selected for using in quelling. These six double stranded siRNA were co-transfected as a single or multiple together with helper plasmids (pEGFP75 and pAN7-1) into protoplast cultures with totally 30 combinations for *tri4* and six for *tri5*. Transfection efficiency was found ranged from 50 ± 0.00 to $99.33 \pm 10.06/5 \times 10^4$ in 36 experimental sets. Transfectants were selected by fluorescence microscopy and spectrofluorimetric analysis. Fluorescence emitting by GFP protein in cells was measured as spectrofluorimetrically. RFU (relative fluorescence unit) values of transfectants were found between 1.37 ± 0.07 and 2.89 ± 0.06 . Besides, PCR was used in selection of transfectants with pAN7-1 and pEGFP75. For that purpose, 0.7 kb fragments of *hph* gene in pAN7-1 plasmid and *GFP* gene in pEGFP75 plasmid were amplified. Nearly a hundred per cent *tri4* suppression in 30 experimental sets was shown by real time PCR analysis. Down regulation of *tri5* gene for both of two species was detected as 65-95% in remaining 6 experiment groups. At the same time, it was shown that DON mycotoxin, final product of trichothecene biosynthesis, was not produced in *tri4* and *tri5* silenced *Fusarium* samples by thin layer chromatography. As a result, it was demonstrated that both *tri4* and *tri5* genes could be used in quelling of trichothecene biosynthesis pathway, in this study. Moreover, it was concluded that *tri4* gene could be more useful target than *tri5* for RNAi. It was thought that significant decreases in the expressions of *tri4* and *tri5* genes observed as a result of siRNA transfection were carried out in post-transcriptional level in *Fusarium* species. This study has a great importance in terms of being not only the first report related to siRNA mediated gene silencing in *Fusarium* species but also an applicable model in struggling with phytopathogenic species.

June 2014, 123.

Keywords: *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, trichothecene, RNA mediated gene silencing, siRNA

1. GİRİŞ

Mikotoksinler mantarlar tarafından üretilen sekonder metabolit grubu bileşiklerdir. *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* ve diğer çok sayıda mantar cinsine ait türlerin sekonder metabolizması sonucunda oluşan düşük molekül ağırlıklı bu metabolitler çok çeşitli kimyasal yapıya sahiptir. Mikotoksinler sıklıkla onu üreten patojenle enfekte olan tarım ürünlerinde birikirler. Aynı zamanda toksik etkilerinden dolayı gıda güvenliği için de tehlike oluştururlar. Doğrudan ya da dolaylı yollarla bulaştığı insan ve hayvanlarda güçlü ve şiddetli toksik etkiler meydana getirirler. Mikotoksinlerin ökaryotik organizmalarda mutajenite, teratojenite, karsinojenite ve protein sentezinin inhibisyonu gibi ciddi metabolik etkileri vardır (Girgin ve diğ., 2001; Gutleb ve diğ., 2002; Desjardins ve Proctor, 2007).

Mikotoksin üretimi ve tahıllarda birikimi; mantar türü ve genetik yapısına, iklim koşulları, atmosferdeki oksijen/karbondioksit düzeyleri, nem düzeyi, sıcaklık derecesi ve coğrafik konum gibi çok çeşitli faktörlere göre değişkenlik gösterir. Aflatoksin, zearalenon, fumonisin ve trikotesen grubu endotoksinler bitkileri sıklıkla kontamine eden mikotoksin tipleridir. Bunlar arasından trikotesen grubu tahıllarda en çok biriken mikotoksin olup, sadece bitkiler üzerinde değil besin piramidi aracılığıyla bulaştığı insan ve hayvanlar üzerinde de toksik etkilidir. Günümüzde trikotesen sınıfı mikotoksinlerin 200'den fazla çeşidi bilinmektedir (Girgin ve diğ., 2001; Oruç, 2005; Kimura ve diğ., 2007).

Trikotesenler seskuiterpenoit yapıdaki mikotoksinlerdir. *Fusarium* cinsi başta olmak üzere pek çok tür tarafından üretilirler. Bu endotoksinler; A, B, C ve D sınıfı olmak üzere dört temel gruba ayrılırlar (Kimura ve diğ., 2007). Sınıflama endotoksinin taşıdığı kimyasal grup farklılıklarına göre gerçekleştirilir. B grubu trikotesenleri deoksinivaleol (DON) ve asetilenmiş türevleri (15-asetildeoksinivaleol [15-ADON], 3-

asetildeoksinivalenol [3-ADON]) ile nivalenol (NIV) ve asetilenmiş türevinden (4-asetilnivalenol [4-ANIV]) oluşmaktadır (Chandler ve diğ., 2003; Kimura ve diğ., 2003). Asetilasyon bu iki temel endotoksinin organizmalar üzerindeki toksik etkisini indirger. *Fusarium graminearum* ve *F. culmorum* türleri DON, NIV ve bu endotoksinlerin asetilenmiş türevlerini (3-ADON, 15-ADON ve 4-ANIV) üretebilmektedir.

Tahıl bitkilerinin *Fusarium* türlerinin ürettiği trikotesenler tarafından kontaminasyonunun en aza indirilmesi ya da engellenmesi, dolaylı olarak da insan ve hayvan sağlığının korunması için çeşitli önlemler alınmaktadır. Bunların başında patojene ve trikotesenlere doğal olarak dirençli bitki kültür varyetelerinin yetiştirilmesi ve/veya dirençli hatların geliştirilmesi gelmektedir. Ancak günümüzde ticari olarak yetiştirilen dirençli varyetelerin sayısı çok sınırlı olduğu ve geliştirilen hatlar agronomik ölçütler açısından tercih edilebilir nitelikte olmadığı için bu yaklaşım tek başına etkili olamamaktadır. Tarım alanlarında patojenle mücadelede en çok tercih edilen diğer bir yaklaşım fungusit kullanımıdır. Ancak türe özgün bir fungusitin bulunmaması, mantarın kullanılan fungusite karşı direnç geliştirmesi, bu yaklaşımın etkinliğini sınırlandırmaktadır (Bai ve Shaner, 2004; Kimura ve diğ., 2007). Doğada yaşayan bitki ve mantarların doğal olarak virüse karşı geliştirilmiş oldukları direnç mekanizmasının, gen susturmanın, bu alanda kullanılabilecek potansiyel bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir. Günümüzde mikotoksin genleri susturulmuş örneklerin elde edilmesi üzerine çabalar bulunmakla birlikte henüz ticarileşmiş bir ürün geliştirilmemiştir.

RNA interferans (RNAi) doğada mantarlardan insanlara kadar çok farklı organizasyon seviyesindeki canlı türünde RNA molekülleri aracılı gen susturma sürecidir. Mantarlar aleminde bu süreç “quelling” olarak ifade edilmektedir ve transpozon, virüs gibi yabancı nukleik asit moleküllerinin yıkımında ve endojen gen anlatımının düzenlenmesinde iş görmektedir. Günümüzde RNAi gen susturma çalışmalarında ve genlerin işlevlerinin araştırılmasında kullanılan güçlü bir işlevsel genomik uygulamadır (Campbell ve Choy, 2005).

Referans ırklar kullanılarak *F. graminearum* ve *F. culmorum* türlerinin genom projeleri tamamlanmış, iki türde de konak savunmasında ve endojen gen anlatımının kontrolü basamaklarında iş gören proteinler ve küçük kodlama yapmayan RNA molekülleri biyoinformatik araçlarla ortaya konmuştur (Nakayashiki ve diğ., 2005). *Fusarium graminearum* ve *F. culmorum* türlerinde trikotesen üretiminin baskılanmasına yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda hedef gen olarak *tri6* geni, susturma yaklaşımı olarak da antisens RNA teknolojisi kullanıldığında hedef gen anlatımında düşüş sağlanmakla birlikte, aşırı gen anlatımının gerçekleştiği ırklar da elde edilmiştir. Kararlı bir susturma mekanizması bu iki türde de sağlanamamıştır. Doktora tez projesi kapsamında B grubu trikotesen üretiminin baskılanmasında *tri5* gen kümesindeki *tri4* ve *tri5* genleri hedef gen olarak seçilmiştir. Susturma siRNA aracılı mekanizma ile gerçekleştirilmiş, her iki türün DON üretimi belirlenen izolatlarında hem *tri4* hem de *tri5* genlerinin anlatımının kararlı biçimde engellendiği, son ürün olan DON endotoksininin üretilmediği saptanmıştır. Bu türlerde siRNA aracılı susturma mekanizmasının antisens RNA teknolojisine göre etkin olduğu da gösterilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

Trikotesenler *Fusarium* cinsi başta olmak üzere çeşitli mantar türleri tarafından üretilen mikotoksinlerdir (Girgin ve diğ., 2001). Fitotoksin olarak da adlandırılan ve fitopatogenik türlerin bitkiyi enfekte etmesi sonucu bitkilerde biriken trikotesenler, ekinlerin miktar ve kalitesinde düşüşe neden olurlar (Bai ve Shaner, 2004; Goswami ve Kistler, 2004). Ayrıca besin zinciri aracılığıyla bulaşan mikotoksinler insan ve hayvanlar için toksik etki gösterirler. Günümüzde trikotesenlerle, dolayısı ile mantarlarla mücadele farklı yaklaşımlarla gerçekleştirilmektedir. Dirençli bitki kültür varyetelerinin geliştirilmesi ve tarımda kullanılması ilk tercih edilendir. Ancak geliştirilen varyetelerde sınırlı agronomik özellik taşınması bu yaklaşımın kullanımını kısıtlamaktadır. Fungusit kullanımı, patojenle mücadele kullanılan bir diğer uygulamadır. Trikotesen üreten patojenlere özgün kimyasalların mevcut olmaması ve mikroorganizmaların zaman içerisinde kullanılan fungusitlere direnç geliştirmesi bu yaklaşımın olumsuz yönleri arasındadır (Bernardo ve diğ., 2007; Kimura ve diğ., 2007). Bitki ve mantarlarda virüs ve diğer yabancı nükleik asit moleküllerine karşı geliştirilen direnç mekanizması olan RNA aracılı gen susturma süreci patojenle mücadelede uygulanabilecek diğer bir potansiyel yaklaşım olarak görülmektedir. Susturma sürecinde trikotesen üretimi ile ilişkili genlerin nükleotid dizilimlerine homoloji gösteren siRNA molekülleri patojene aktarılacak suretiyle toksin üretiminin durdurulması ve/veya en az düzeye indirgenmesi hedeflenmektedir.

Mantarda gen susturma süreci “quelling” olarak ifade edilmektedir. Gerçekleştirilen biyoinformatik analizleri, genom projesi tamamlanmış *F. graminearum* türünde quelling süreci ile ilişkili proteinlerin ve küçük RNA moleküllerinin varlığını göstermiştir (Nakayashiki ve diğ., 2006; Cuomo ve diğ., 2007; Nicolas ve Vazquez, 2013). *F. graminearum* ve *F. culmorum* türlerinde RNA aracılı gen susturma çalışmalarında anti-sens RNA teknolojisi ile uygulanmıştır. Her iki türle ilgili araştırmalarda *tri6* geni hedeflenmiş ve genin iki kopyasını zıt oryantasyonda taşıyan

vektörler geliştirilmiştir. Ancak trikotesen üretimi azaltılmış kararlı hatlar elde edilememiştir (McDonald ve diğ., 2005; Scherm ve diğ., 2011). Bu çalışmalar *Fusarium* türlerinde trikotesen üretiminin azaltılmasına ve/veya durdurulmasına yönelik yeni yaklaşımların uygulanma gerekliliğini ortaya koymaktadır. siRNA aracılı gen susturma sürecinde, susturulmak istenen gen dizilimlerine identik veya homoloji gösteren sentetik siRNA (ing., “small interfering RNA”) molekülleri tasarlanıp organizmaya aktarılarak genin protein ürününü inhibe eder. Farklı türlerde siRNA moleküllerinin aktarımı ile gen anlatımının transkripsiyon sonrası düzeyde baskılandığı gösterilmiştir. Günümüzde transfeksiyon ajanları kullanılarak siRNA aracılı gen susturma sıklıkla kullanılmaktadır (Campbell ve Choy, 2005). siRNA aracılı gen susturma mantarlardan *Aspergillus niger*'de gen anlatımının baskılanmasında etkili olmuştur (Barnes ve diğ., 2008). *Fusarium* türlerinde gen anlatımının transkripsiyon sonrası baskılanmasına yönelik (sentetik siRNA aracılı) çalışma bulunmamaktadır. Bu doktora tez projesi kapsamında trikotesenlerden deoksinivalenol ürettiği saptanan *Fusarium* izolatlarında, trikotesen üretiminin engellenmesinde trikotesen biyosentezinde görevli enzimleri şifreleyen *tri4* ve *tri5* genlerinin anlatımlarının transkripsiyon sonrası siRNA aracılı durdurulması amaçlanmıştır. Bu iki genin primer transkriptlerinin translasyona girmesi engellenerek biyokimyasal yolda görevli ilk iki enzimin inhibisyonu, dolayısıyla son ürün olan DON'un üretiminin engellenmesi hedeflenmiştir.

2.1. RNA İNTERFERANS (RNAi) SÜRECİ

2.1.1. Ökaryotlarda Gen Anlatımı ve Kontrolü

Gen anlatımı ya da kısaca protein sentezi DNA moleküllerinde şifre halinde bulunan genetik bilginin transkripsiyonla RNA kopyasının çıkarılması translasyonla da polipeptid biçimine çevrilmesi süreçlerini kapsamaktadır. Ökaryotik organizmalarda transkripsiyon nukleusta, translasyon ise sitosolde meydana gelmektedir. Ancak transkripsiyon sonrası primer transkriptlerin işlenmesi, translasyon sonrası meydana gelen modifikasyonlar da bu protein sentezi sürecinin önemli aşamalarıdır. Transkripsiyon sonucu sentezlenen primer transkriptlerin tümü amino asit dizilimlerine çevrilmez. Bu RNA molekülleri hücrede çok farklı ve önemli roller alarak işlevsel

birimleri temsil ederler. Birbirinden bağımsız olarak gerçekleşen transkripsiyon ve translasyon süreçleri çok sayıda protein molekülün iş gördüğü başlama, uzama ve sonlanma gibi basamaklarından oluşan kompleks aşamaları içerir. Tipik olarak ökaryotik hücrelerdeki genler kodlama yapmayan intron bölgeleri ile bölünmüş olduğundan parçalı genler halinde taşınmaktadır. Parçalı genler aynı zamanda gen anlatımının kontrolünde işlevsel olabilen transkripsiyon başlangıç ve sonlanma bölgelerini, promotor dizilimlerini, “enhancer” ve “silencer” gibi farklı kontrol bölgelerini içerirler (Konuk, 2004; Alberts ve diğ., 2007; Özcan ve Gürel, 2002).

Bir genin işlevsel ürününün ne zaman ve ne kadar üretileceği gen anlatımının kontrolü ile düzenlenmektedir. İnsanda bir hücrede herhangi bir anda, taşınan genlerin sadece %3-5’inin anlatım yapması, dişilerde X kromozomunun inaktivasyonu hücrede önemli bir kontrol süreçlerinin varlığını göstermektedir. Bu kontrolü sağlayan mekanizmaları hücrenin hayatta kalması ve varlığını sürdürmesinde büyük önem taşımaktadır. Hücrede gen anlatımının kontrolü transkripsiyon ve translasyon aşamalarında yapıldığı gibi bu süreçlerin ardından meydana gelen modifikasyonlarla da gerçekleştirilmektedir. Gen anlatımının kontrolü altı farklı aşama altında toplanabilir; (i) Transkripsiyon düzeyinde kontrol: belirli bir genin ne zaman ve ne sıklıkla transkripsiyonunun yapılacağı belirlenmesi, (ii) RNA’nın işlenmesi düzeyinde kontrol: primer RNA transkriptlerinin kırılması ve işlenmesi, (iii) RNA moleküllerinin taşınması ve yerleşiminin kontrolü: işlenen mRNA moleküllerinin ve diğer RNA’ların sitosole transferi ve yerleşiminin sağlanması, (iv) translasyon düzeyinde kontrol: sitosolde ribozomlarda polipeptid zincir sentezinin yürütülmesi, (v) mRNA yıkımının kontrolü: sitosolde bulunan RNA moleküllerinin seçici olarak yıkımları, (vi) protein aktivitesinin kontrolü: sentezlenen proteinlerin seçici olarak aktivasyonu ya da aktivitelerinin ortadan kaldırılması.

Aynı DNA dizilimini taşıyan hücre tiplerinin farklı morfoloji ve boyut, farklı transkriptomik ve proteomik profillere sahip olmaları hücrelerde gen anlatımının farklı şekillerde kontrol edildiğinin önemli göstergesidir. Gen anlatımının transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzeylerde kontrolünde iş gören mekanizmaların anlaşılması ve

detaylandırılması günümüzde farklı alanlarda bu mekanizmaların kullanımını sağlamıştır. Günümüzde gen anlatımının RNA interferans süreci aracılığıyla transkripsiyonel veya post-transkripsiyonel düzeyde düzenlenmesi hastalıklara karşı mücadele ve gen işlev araştırmaları alanlarında kullanılarak verilere ulaşılmasını sağlamıştır.

2.1.2. RNAi Tarihçesi ve Genel Mekanizması

RNAi çeşitli canlı türlerinde gen anlatımının RNA molekülleri aracılı transkripsiyon, post-transkripsiyon ve translasyon düzeylerinde baskılandığı bir süreçtir. Doğada özellikle mantar ve bitkilerin virüs ve transpozon gibi dış kaynaklı nukleotid dizilerine karşı geliştirdikleri bir savunma mekanizması olarak iş görür (Hannon, 2002; Agrawal ve diğ., 2003; Campbell ve Choy, 2005). RNAi sürecinde gen anlatımının düzenlenmesinden “micro RNA” (miRNA), “small interfering RNA” (siRNA) ve “Piwi interacting RNA” (piRNA) olmak üzere üç farklı küçük RNA molekülü sorumludur (Seto ve diğ., 2007). Ayrıca mantarlarda ex-siRNA (ing., “exonic siRNA”) ve masiRNA (ing., MSUD-associated siRNAs”) gibi daha farklı siRNA molekülleri de tanımlanmıştır. Tüm bu küçük RNA temelde homoloji gösterdikleri mRNA moleküllerine bağlanarak ya genlerin aktivitelerini değiştirirler ya da protein sentezini durdururlar. Organizmaya ve mekanizmaya göre RNAi, “quelling” ve ko-supresyon, post-trankripsiyonel gen susturma (ing., “post-transcriptional gene silencing”; PTGS) gibi farklı isimlendirilebilmektedir (Agrawal ve diğ., 2003; Campbell ve Choy, 2005). RNAi mekanizması nukleoplazma ve sitoplazmada iş gören çeşitli enzim ve enzim grupları tarafından yönlendirilmektedir. Nukleoplazmada pri-miRNA moleküllerinin pre-miRNA’ya çevriminde RNazIII tipi enzim Drosha ve dsRNA-bağlayan protein DGCR8’den oluşan mikroprosesör kompleksi iş görür. Pre-miRNA molekülünün sitosole geçişinden exportin-5 proteini iş görür. Sitosole geçen çift iplikli uzun RNA molekülleri Dicer isimli RNaz Tip III enzimi tarafından küçük çift iplikli RNA moleküllerine parçalanırlar. Çift iplikli küçük RNA “siRNA” molekülleri ya argonat, Chp1 ve Tas3 proteinlerinden oluşan RITS faktörü ile etkileşime girerek transkripsiyonel düzeyde, ya da RISC (ing., “RNA-induced transcripstional silencing complex”) kompleksi ile etkileşime girerek gen susturmayı sağlar.

RNAi ilk defa 1990'lı yılların başında petunya bitkisinde pigment üretiminde iş gören kalkon sentaz (ing., “chalcone synthase”) proteinini şifreleyen genin ekstra kopyalarının transformasyonu ile daha koyu renkli çiçekler elde etmek amacıyla yapılan çalışmalarda görüldü. Transformasyon sonucunda aşırı anlatım yerine bitki yapraklarının rengini kaybettikleri, dış kaynaklı aktarılan gen kopyalarının gen anlatımını baskıladığı saptandı (Napoli ve diğ., 1990; Campbell ve Choy, 2005). Bu veri aktarılan eksojen genlerin, hem endojen lokusların hem de transgen kopyaların anlatımını baskıladığını göstermektedir (Hannon, 2002). Napoli ve diğ. (1990) bu süreci ko-süpresyon olarak ifade etmiştir. İleriki yıllarda bu süreç farklı canlılarla gerçekleştirilen benzer çalışmalar ile doğrulanmıştır (Romano ve Macino, 1992; Fire ve diğ., 1998; McDonald ve diğ., 2005). Mekanizma, transkripsiyon sonrası ekzojen ve endojen genlerin baskılanmasını/susmasını içerdiğinden ko-süpresyon yerine post-transkripsiyonel gen susturma ismini almıştır (Agrawal ve diğ., 2003).

Mantarlarda post-transkripsiyonel gen susturma iki farklı araştırma grubu tarafından *Neurospora crassa*'da gösterilmiştir (Pandit ve Russo, 1992; Romano ve Macino, 1992). Mantarlardaki RNA aracılı gen susturma süreci için “quelling”, gen ve/veya genleri susturulmuş mantar örnekleri için “quelled” ifadeleri kullanılmıştır (Campbell ve Choy, 2005). *Neurospora crassa*'da turuncu renk pigment *all*⁺ tarafından kodlanır. *all* geninin 1.5 kb boyutundaki kopyasını taşıyan plazmid vektörleri *N. spora all*⁺ yabani tipine aktarıldığında transformantlarda turuncu yerine beyaz renkte pigment oluşumu gözlenmiştir. Beyaz renk oluşumunun dış kaynaklı ve organizmada taşınan (endojen) gen kopyaları arasındaki dizisel homolojiden kaynaklandığı görülmüştür (Agrawal ve diğ., 2003).

RNA aracılı gen susturma çalışmaları *Caenorhabditis elegans*'da da çalışılmıştır. Gen anlatımını baskılamada anlamlı RNA zincirinin karşı anlamlı zincir kadar iş gördüğü gösterilmiştir (Guo ve Kempheus, 1995). Miyofilament proteinini kodlayan *unc22* gen kopyalarının *C. elegans*'a aktarılması sonucunda çift iplikli RNA moleküllerinin, tek

zincirli anlamlı ve karşı anlamlı RNA zincirlerine kıyasla gen susturma sürecinde 10 kat daha etkili olduğu gösterilmiştir (Fire ve diğ., 1998).

2.1.3. siRNA Aracılı Transkripsiyonel Susturma

RNAi süreci ile transkripsiyon sonrası ve translasyon sırasında gen anlatımı kontrol edildiği gibi, transkripsiyonel düzeyde de gerçekleştirilmektedir. Transkripsiyonel gen susturma (ing., “transcriptional gene silencing”; TGS) çeşitli organizmalarda (bitki, mantar ve memeli) DNA metilasyonları ve histon modifikasyonlarının bir sonucu olarak meydana gelir (Morris, 2008; Sampey ve diğ., 2012). Bu süreçte siRNA molekülleri ile nukleoplazmada DNA metilaz, histonları modifiye eden enzimleri çekerek epigenetik DNA modifikasyonuna ve heterokromatin oluşumuna yol açar. Birinci mekanizma ilk olarak *A. thaliana*’da gösterilmiştir. Süreç 24-26 nukleotid çiftlik boyuta sahip siRNA molekülleri ile gerçekleşmektedir. *A. thaliana*’da, argonat (Ago1-4) protein ailesi üyesi olan Ago-4 mutantlarında histon modifikasyonunun gerçekleşmediği gösterilerek bu proteinin bu proteinin transkripsiyonel kontrol için gerekli olduğu gösterilmiştir (Morris, 2008). Asklı mantarlarda DNA molekülü kromatin organizasyonuna sahiptir ve ökromatin bölge transkripsiyonel olarak aktif olan bölgedir. Ökromatinde tipik olarak asetilenmiş histonlar ve H3mLys-4 H3 histonu (4. Lizin bakiyesinde 2 metil grubu) yer alır. Transkripsiyonel olarak inaktif olan heterokromatinde ise DNA molekülü H3mLys-9 H3 histonu ile ilişkilidir. Histon kuyruklarında meydana gelen asetilasyon kromatinde gevşemeye yol açarak histon-DNA etkileşimini bozmaktadır. Histon deasetilazların histonlarda deasetilasyona yol açmaları, histonların metillenmesi gen inaktivasyonu yani transkripsiyonun baskılanması ile sonuçlanmaktadır. Transkripsiyonel kontrolde Dicer homoloğu olan *dcr1* tarafından işlenen siRNA molekülleri Ago-1, Chip1 ve Tas1 proteinlerinden oluşan RITS (ing., “RNA-induced transcriptional silencing complex”) kompleksi ile etkileşime girer. siRNA aracılığıyla aktive olan RITS kompleksi, kromatin bağlayıcı faktörler Swi6 ve Clr4 ile etkileşime girdiğinde transkripsiyon baskılanır. Ancak süreç organizmalar arasında farklılıklar taşır. Bitkilerden insanlara kadar farklı canlı türlerinde dizisel homoloji taşıyan farklı Piwi protein ailesinin homologları (Piwi, Sign, eIF2C, RdeI ve Argonat) taşınır. *N. crassa*’da transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası gen susturma süreçlerinin her ikisinde de heterokromatin

oluşumunda H3 Lizin 9 dimetilasyonunu kullanılır. *C. elegans*'ta eşem ve somatik hücrelerde Rde-1 işlevselliği RNAi sürecinde farklıdır (Vaucheret ve Fagard, 2001; Morris, 2008; Sampey ve diğ., 2012).

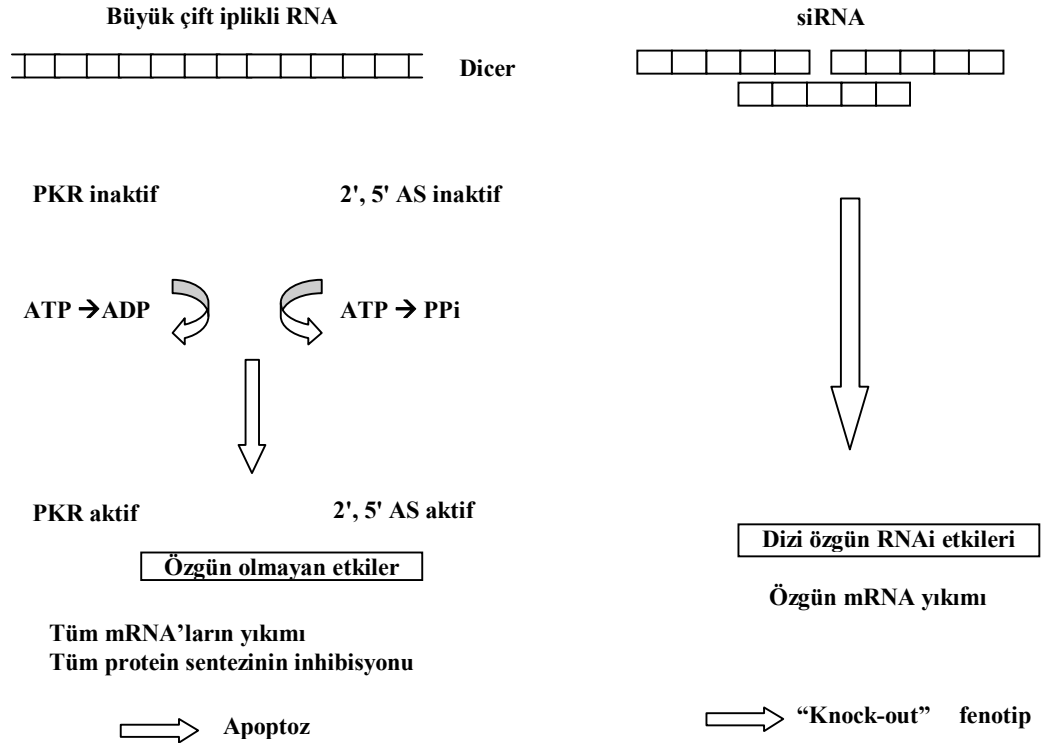
2.1.4. siRNA Aracılı Post-Transkripsiyonel Susturma

Gerçekleştirilen çalışmalar ökaryotik organizmaların çoğunda, RNAi, PTGS ve quelling mekanizmalarının işleyişinde benzer moleküllerin ve biyolojik yolların kullanıldığını ortaya koymuştur (Hannon, 2002; Campbell ve Choy, 2005). RNAi mekanizması miRNA ve siRNA olarak adlandırılan şifreleme yapmayan çift iplikli küçük RNA molekülleri tarafından yürütülür. Süreç RNaz III-benzeri enzim olan Dicer tarafından başlatılır. Dicer, uzun çift iplikli RNA moleküllerini 20-25 nukleotidlik kısa parçalara ayırır. Bu moleküller, small interfering RNA (siRNA) olarak adlandırılır. siRNA molekülleri, “RNA-induced silencing complex” (RISC) nukleaz kompleksine bağlanır. siRNA zincirlerden birisi (yolcu iplik) ATP gerektirmeyen bir reaksiyon sonucunda yıkılır, diğer RNA zinciri (rehber iplik) RISC kompleksini aktive eder. Aktive olan RISC kompleksinin taşıdığı siRNA molekülü dizi homolojisine sahip olduğu mRNA molekülü ile etkileştiğinde eşleşme tam olduğunda mRNA yıkıma uğratılırken eşleşme hatalı olduğundan translasyon tutuklanır. Translasyonun devam etmediği durumda hücrede bu moleküllerin birikimi gerçekleşir (Dawe, 2004; Campbell ve Choy, 2005). Bu mekanizma daha çok transpozon ve virüs gibi kaynaktan kazanılmış siRNA molekülleri aracılığıyla gerçekleşmektedir.

Evrimsel açıdan organizmaların dsRNA aracılı gen susturma yollarında farklılıklar vardır. RNAi etkisi canlı türüne göre kalıtsal ve sistemik olmayabilir. Bitkilerde miRNA'lar hedef mRNA molekülleri ile mükemmel veya çok yüksek düzeyde dizi homolojisi taşıdıkları için, hedef mRNA'nın doğrudan yıkımına yol açarlar. Memelilerde miRNA ve hedef mRNA molekülleri arasında dizi farklılıkları bulunduğundan daha çok translasyonel baskılanmaya neden olurlar (Pillai ve diğ., 2007). Bazı ökaryotlarda (örneğin, *Saccharomyces cerevisiae*) RNAi yolları bulunmaz. Prokaryotlarda ise RNAi'ye bazı yönleri ile benzerlik gösteren ancak farklı

RNA temelli stratejiler kullanılır. Bu RNA molekülleri miRNA analogları değildir ve “dicer” gibi protein gereksinimleri yoktur (Morita ve diğ., 2006).

Ökaryotlarda RNA aracılı gen susturma transgenlere karşı da kullanılan bir stratejidir. Kısaca RNAi mekanizması doğada istilacı nukleik asitlere karşı hücrelerin korumasından sorumludur. RNAi hücrelerde epigenetik kontrol ve gen anlatımının düzenlenmesi, hücrenin apoptoza gitmesi gibi üç önemli işleve aracılık etmektedir (Nelson ve diğ., 2003; Thakur, 2003). Büyük boyutlu (30bç) çift iplikli RNA molekülleri ve daha küçük boyutlu (21-22 bç) siRNA molekülleri farklı süreçlerin oluşumuna yol açarlar. Büyük olan siRNA’lar çift iplikli küçük RNA’lara ayrıldığında tam eşleşme gösterdikleri mRNA moleküllerinin yıkımına neden olarak fenotipte karakterle ilgili bozukluğa yol açtığı gibi dizi homolojisi taşıdığı özgün olmayan bir susturma sürecini de gerçekleştirebildiğinden tüm proteinlerin sentezini engelleme ve apoptoza neden olma potansiyelini de taşımaktadır (Şekil 2.1) (Thakur, 2003; Calin ve Croce, 2006).



Şekil 2.1: Özgün ve özgün olmayan çift iplikli RNA susturma yolları (Thakur, 2003).

RNAi mekanizmasında susturmada mRNA'ya tamamlayıcı olacak olan “Dicer”ın RNazII aktivitesi ile kesilerek oluşturulan çift iplikli RNA moleküllerinin (small interfering RNA, “siRNA”) RISC kompleksindeki argonat tarafından kesilerek atıldıktan sonra kalan tek zinciri sorumludur (Karaboz ve Çolak, 2007). Bitkilerde bu kısa parçalar 21-22 ve 24-26 nt olmak üzere iki siRNA sınıfı işlevselken, mantarlarda da son yapılan çalışmalar farklı boyutlarda (19-25 bp) siRNA moleküllerinin etkin olduğunu göstermiştir (Kadotani ve diğ., 2003; Nicolas ve Vasquez, 2013).

Hücrede genomda şifrelenen kısa çift iplikli RNA molekülleri olan miRNA'lar da sitosolde siRNA'lar ile aynı moleküler mekanizma ile etkili olur. Ökaryotik organizmada hücre içinde RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonla ilgili bölgeden sentezlenen boyutları birkaç kilobaza kadar ulaşabilen pri-miRNA molekülleri nukleusta mikroişlemci kompleks (ing., “microprocessor complex”) tarafından işleme geçirir (Sampey ve diğ., 2012). Meydana gelen pre-miRNA'lar sitosole göç ederler. Sitosolde pre-miRNA'lar, siRNA'ların geçirdiği süreci geçirerek etkili olurlar. miRNA ve siRNA molekülleri arasında endojen ve eksojen kaynaklı olmalarının dışında başka önemli farklılıklar da vardır. Olgun miRNA molekülleri siRNA'lara benzese de; olgun yapıya ulaşmak için bir post-transkripsiyonel modifikasyon süreci geçirir. miRNA'lar tipik olarak mükemmel eşleşme göstermeyen baz eşleşmeleri ile fazla sayıda mRNA'nın translasyonunu engeller. Buna karşın siRNA molekülleri çoğu zaman hedef mRNA ile tam eşleşme gösterirler ve tek özel bir özgün gene ait mRNA molekülünü yıkarlar. Ayrıca farklı canlılarda miRNA ve siRNA molekülleri farklı tipteki argonat ve dicer enzimleri tarafından da işlenebilir (Nelson ve diğ., 2003; Calin ve Croce, 2006; Sampey ve diğ., 2012).

Ayrıca hayvan hücrelerinde de “Piwi-interacting” RNA (piRNA) olarak isimlendirilen küçük, kodlama yapmayan RNA molekülleri şifrelenmektedir. siRNA'dan farklı olarak piRNA molekülleri argonat proteinlerinin bir alt familyası olan piwi proteinlerine bağlanarak kompleks oluştururlar. Bu küçük RNA molekülleri germ hücrelerinde transpozonlara karşı gen susturma mekanizması aracılığıyla müdahalede iş görürler.

Diğer küçük RNA moleküllerine göre nispeten daha büyük boyutlara sahip (26-31 nukleotid çifti) piRNA molekülleri için bir sekonder yapı saptanmamıştır (Seto ve diğ., 2007). Günümüzde veritabanlarında kayıtlı çok sayıda (binlerce) piRNA dizilimleri mevcuttur. Genom boyunca bağımsız bir dağılım gösterirler ve bazı küme(len)melerde sadece birkaç piRNA, bazılarında ise binlerce piRNA içerebilirler (www.ncbi.nlm.nih.gov)¹. piRNA moleküllerinin spermatogenezde iş gördükleri, piWi proteinleri “knockout” farelerde spermatogenezin gerçekleşmediği kanıtlanmıştır (Aravin ve diğ., 2007). Ayrıca asklı mantarlarda milRNA (ing., “miRNA-like RNA”), SISsiRNA (ing., “sex induced silencing siRNA”), ex-siRNA (ing., “exonic-siRNA”) gibi farklı isimlerle ifade edilen savunma ve gen anlatımının düzenlenmesinde iş gören küçük RNA molekülleri de tanımlanmıştır (Kang ve diğ., 2013; Lau ve diğ., 2013; Nicolas ve Vasquez, 2013). Bu moleküllerden milRNA’lar bitki ve hayvanlardaki miRNA’lara benzerlik taşırlar ve firkete yapısı taşıyan RNA öncülerinden üretilirler. Dicer tarafından işlenirler ve sitosolde endojen mRNA moleküllerine %100 olmayan bir dizi homolojisi ile bağlanırlar. Dört tipi bulunan milRNA’lar (milR-1, milR-2, milR-3 ve milR-4) gen anlatımının düzenlenmesinde iş görür. SISsiRNA molekülleri ise ardışık transgenlerin entegrasyon ile RNAi mekanizmasında iş görür. Seksüel siklus sırasında transpozon aktivitesini kısıtlar. Dicer ve argonat tarafından işlendiği ispatlanmıştır. Ex-siRNA molekülleri ise milRNA’lar gibi gen anlatımının düzenlenmesinden sorumludur. Dört sınıfı bulunan ex-siRNA moleküllerinin 200’ün üzerinde tipi saptanmıştır. Bu moleküller şifrelendikleri genin ekzonuna bağlanarak gen anlatımını baskırlar.

2.1.5. RNAi Kullanım Alanları

siRNA aracılı gen susturma süreçlerinde sentetik oligonukleotid doğrudan kullanıldığı gibi vektöre bağlanarak da hücrelere aktarılabilir. Her iki yaklaşımda da siRNA olarak kullanılacak oligonukleotid moleküllerinin tasarımı sürecin etkinliğini ve dolayısıyla da susturma başarısını artıran en önemli parametrelerdir. Tasarımda hedef cDNA’nın başlangıç kodonunun 50-100 nukleotid “downstream”inin susturma süreci için hedeflenmesi etkinliği artıran önemli bir diğer ölçüttür. Ayrıca siRNA molekülleri için firkete yapısının 5'-AA(N19)UU-3' dizilimi ile sağlanması ve GC içeriğinin en az %50

¹ www.ncbi.nlm.nih.gov [Ziyaret Tarihi: 10 Aralık 2012]

olarak tercih edilmesi diğer ölçütler arasındadır (Elbashir ve diğ., 2002). Ayrıca hücrede ilgili gen için birden fazla hedef bölge siRNA için seçilmeli, hedef bölgeler için 10 ve üzeri çoklu siRNA aktarımı ile susturma etkinliği ve kararlılığı artırılmalıdır (Judge ve diğ., 2005; Du ve diğ., 2005). siRNA transfeksiyonunun gerçekleştirileceği hedef olarak hücre seçilebileceği gibi tüm organizmaya da aktarım yapılabilmektedir. Aktarımda elektroporasyon (McRobert ve McConkey, 2002), siRNA solüsyonuna daldırma (Malhotra ve diğ., 2002), siRNA taşıyan bakteri ile besleme (Caplen ve diğ., 2001), ticari transfeksiyon ajanları (Elbashir ve diğ., 2001) aracılı aktarım gibi yaklaşımlar uygulanabilmektedir.

Günümüzde RNAi biyoteknoloji alanında, sağlık sektöründe ve temel bilimlerde yaygın uygulama alanına sahiptir. Enfeksiyon hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar ve solunum yolu hastalıklarının tedavisinde kullanılacak potansiyel yaklaşım olarak görülmektedir. Kanseri, HIV (ing., “human immunodeficiency virüs”), hepatit ve influenza virüslerine karşı RNAi mekanizması aracılı mücadele hayvan denemelerinde başarılı sonuçlar elde edilmiş, hatta gönüllü hasta denemelerine başlanmıştır (Campbell ve Choy, 2005). HIV ile mücadelede *tat*, *rev*, *nef* ve *gag* genleri susturmada hedef genler olarak seçilmiş, susturulmuş örnekleri içeren kültürlerde viral replikasyon engellenmiştir (Lee ve diğ., 2002). Kanseri araştırmalarında da onkogenler ve sinyal moleküllerini şifreleyen genler RNAi için hedeflenmiştir (Cheng ve diğ., 2003; Wu ve diğ., 2003). Temel bilim çalışmaları için de RNAi özgün gen işlevlerinin belirlenmesi ve genle ilişkili fenotip/fenotipler hakkında verilerin elde edilmesinde kullanışlı bir yaklaşım haline gelmiştir (Kamath ve diğ., 2003; Kiger ve diğ., 2003). Biyoteknoloji alanında RNAi doğal bitki toksinlerinin üretiminin engellenmesi ve mikroorganizma ve böceklerle direnç geliştirilmesinde kullanılmaktadır (Gordon ve Waterhouse, 2007). Baum ve diğ. (2007) solucan larvalarına 14 esansiyel gene özgün siRNA’yı besleme yolu ile verdiğinde siRNA’ların düşük dozajlarında gen anlatımının baskılandığını ve larvaların öldüğünü gösterdiler.

RNAi uygulamaları, pek çok tür için patojenik etkili olan asklı mantarlarda kısıtlı kalmıştır. Günümüzde 40'dan fazla mantar türünde genom projesi tamamlanmıştır. Bu türlerin 12'sini bitki patojenleri oluşturmaktadır. *Fusarium* türleri insan ve hayvanların temel besinini oluşturan tahıllarda pek çok hastalığa yol açmaktadır. Bunlar arasında *F. graminearum* genom projesi tamamlanan ve tahıllarda başak yanıklığına neden olan bir patojendir ve tüm dünya genelinde ekonomik ve agronomik kayıplara yol açmaktadır. Güncel olarak *Fusarium graminearum*'da ve *F. culmorum* türleri ile ilgili sadece birer adet quelling çalışması mevcuttur (McDonald ve diğ., 2005; Scherm ve diğ., 2011). Bu çalışmaların her ikisi de aynı sekonder metabolitin (trikotesen) üretimini baskılanmasını aynı hedef geni (*tri6*) ve aynı RNAi stratejisini (susturma vektörü) içermektedir. Trikotesen üretiminin durdurulması hedeflenen bu çalışmalarda kararlı bir susturma elde edilemediği gibi bazı transformantlarda gen anlatımının arttığı da ayrıca saptanmıştır (Scherm ve diğ., 2011). McDonald ve diğ. (2005) tarafından yapılan çalışma ise susturma sürecinin *Fusarium* cinsindeki varlığını göstermeyi amaçlamış ve transkriptomik düzeyde analizler gerçekleştirmemiştir. Susturmanın yapıldığı bitkilerde gerçekleştirilen fizyolojik testlerde başak yanıklığının kontrol gruplarına göre %34-38 değer aralığında gerçekleştiği saptandı. *Fusarium* türlerindeki quelling çalışmaları plazmid vektörler aracılığı ile gerçekleştirilmiştir (Campbell ve Choy, 2005). Şu ana kadar gerçekleştirilen mevcut çalışmalar *Fusarium* türlerinde trikotesen üretiminin durdurulması amacıyla farklı ve daha kesin yaklaşımların gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu nedenle bu doktora tez projesi kapsamında toksin üretiminde anlatımı elzem olan farklı iki gen (*tri4* ve *tri5*) farklı bir strateji ile susturulmak için hedeflendi. Vektör temelli yaklaşımlardan farklı olarak doğrudan *tri4* ve *tri5* genlerine dizisel homoloji taşıyan sentetik siRNA molekülleri kullanılarak mikotoksin üretiminin baskılanması amaçlandı. Yüzlerce sekonder metabolit üreten ve insan ve hayvan sağlığı için tehlike teşkil eden *Fusarium* cinsi ile yapılacak çalışmaların artırılması, bitki patolojisi açısından primer derecede incelenmesi gereken konular arasında yer almaktadır.

2.2. BİTKİ PATOLOJİSİ VE BİTKİ PATOJENİ ORGANİZMALAR

Bitkiler ekosistem içerisinde diğer canlılar (mantarlar, nematodlar vb.) ve çevresel faktörlerle (besin içeriği, ışık şiddeti, rüzgar vb.) sürekli etkileşim halindedir. Bu etkileşimlerin bir sonucu olarak, çeşitli organizmalar belli çevresel koşullar altında bitkilerde hastalık meydana getirirler (Dyakov ve diğ., 2007). Patojen uygun çevresel faktörlerin etkisiyle duyarlı konakta hastalık oluşturup çok şiddetli kayıplara yol açabilir (Prescott ve diğ., 1990; Kimura ve diğ., 2007). 19. yy'ın ortalarında *Phytophthora infestans*'ın İrlanda'da neden olduğu patates (parazitizm) hastalığı yaklaşık bir milyon insanın açlıktan ölmesine, 1.5 milyon insanın da göç etmesine neden olmuştur (Large, 1940). Göçlerin çoğunluğu Kuzey Amerika'ya gerçekleşmiş; göç edenlerin ¼'ü yolculuk esnasında ölmüştür. Bu büyük felaket, "Bitki Patolojisi"nin bir disiplin haline gelmesinde anahtar rol oynamıştır.

Bitki hastalıklarına neden olan organizmalar 11 ayrı grup altında incelenmektedir: Parazitik angiospermiler, mantarlar, nematodlar, algler, Oomycetes, Plasmodiophoromycetes, tripanozomatidler, bakteriler, fitoplazmalar, virüsler ve viroidler. Bunlar arasından mantarlar en büyük patojen grubunu oluşturur (Prescott ve diğ., 1990; Dangl ve Jones, 2001; Dickenson, 2003; Strange, 2003; Dyakov ve diğ., 2007). Fungal taksonomi ve tanı geleneksel olarak morfolojiye dayalı olarak gerçekleştirilir. Ancak farklı morfolojik özelliklere sahip mantarların taksonomi ve tanısında hata ve karışıklıklarla karşılaşılabilir (Strange, 2003). Hatta literatürde kayıtlı 200'den fazla toksigenik *Fusarium* ırkının morfolojik özellikler temel alınarak yanlış olarak tanımlandığı bildirilmektedir (Marasas, 1995). Mantarlar seksüel yapı olarak ve sporulasyon organlarına göre dört temel sınıfa ayrılmaktadır: Chytridiomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes ve Basidiomycetes (Tablo 2.1). "Fungi Imperfecti" olarak da bilinen Deuteromycetes, eşeyli üreme fazı olmayan bir mantar sınıfı şeklinde ayrı olarak sınıflandırılır. Oomycetes günümüzde mantar olarak sınıflandırılrsa da, bu sınıflandırmanın dışında tutulmaktadır. Benzer şekilde, Plasmodiophoromycetes "slime mold" çamur küfü olarak adlandırılan organizmalar da mantar değildir (Strange, 2003).

Tablo 2.1: Bitki patojenleri ve oluşturdukları hastalıklar.

Grup	Sınıf/Cins	Tür	Konak	Hastalık	Kaynak
Mantar	Chytridiomycetes	<i>Synchytrium endobioticum</i>	Patates	Patates siğıli	Abdullahi ve diğ., 2005
Mantar	Zygomycetes	<i>Rhizopus oryzae</i>	Pamuk	-	Hernandez-Lauzardo ve diğ., 2005
Mantar	Ascomycetes	<i>Gibberella zeae</i>	Buğday	Başak yanıklığı	Parry ve diğ., 1995
Mantar	Basidiomycetes	<i>Puccinia graminis</i>	Arpa	Pas hastalığı	Leonard ve Szabo, 2005

2.3.BİTKİ PATOJENİ OLARAK *Fusarium* TÜRLERİ

Fusarium türleri ile ilgili bilimsel araştırmalar daha çok bitkilerde oluşturdukları solgunluk ve yanıklık tipi hastalıklar ve ürettikleri toksinleri kapsamaktadır. Ancak *Fusarium* spp.'nin hayvan ve insan sağılığı üzerindeki etkileri de bilinmektedir (Özer ve Soran, 1991; Dignani ve Anaissie, 2004). İnsanlarda doğrudan enfeksiyona yol açarak bölgesel ya da invazif nekrozlara yol açabilirler (Dignani ve Anaissie, 2004; Cuomo ve diğ., 2007).

Fusarium türleri özellikle tahıllarda yıkıcı hastalıkların etmeni olarak bilinmektedir. Etkin şekilde spor ürettiklerinden sporları aracılığıyla çok miktarda inokulum sağlayarak etkili olurlar. Enfeksiyon ve spor üretimi arasındaki süre, latent faz, sadece birkaç gün alır. Sporlar yağmur damlaları ya da rüzgar gibi çeşitli faktörler ile yayılır. Bitkilerde yıkıcı etkiye sahip enzimleri ya da fitotoksik molekülleri üretirler (Strange, 2003; Dickenson, 2003).

Fusarium türlerinin konak bitki aralığı çok geniştir. Tahıl bitkilerinden süs bitkilerine kadar geniş bir yelpazede hastalık oluşturabilmektedirler. Taksonomik olarak Ascomycota bölümünden, Sordariomycetidae sınıfının, Hypocreales takımının bir üyesidir (Özer ve Soran, 1991; Goswami ve Kistler, 2004). İlk defa Link ex Gray tarafından 1821 yılında tanımlanmıştır. Nemli ve yarı nemli bölgelerde yaygın olan bu mantar, soğuk iklime sahip bölgelerde de etkili olmaktadır (Bai ve Shaner, 2004; Miedaner ve diğ., 2008; Miedaner ve diğ., 2013).

Ülkemizde yirmi sekiz farklı türü tespit edilen *Fusarium* cinsinin dünya genelinde 61 türü rapor edilmiştir (Özer ve Soran, 1991; Gutleb ve diğ., 2002). Bunlar arasında biyotrof, nekrotrof ve hemi-biyotrof yaşam biçimine sahip türler mevcuttur. Biyotroflar epidermis dokusunu delerek bitki içine girerken, nekrotroflar bitki yüzeyindeki yaralanmış bölgelerden nüfus ederler. Hemibiyotroflar yaşamlarının bir bölümünde biyotrof diğer bölümünde ise nekrotrofturlar (Dickenson, 2003; Özcan ve Gürel, 2002). İnsanlarda da hastalık oluşturabilen, çok farklı çevresel koşulları tolere edilebilen, yüksek genetik çeşitliliğe sahip, çok farklı sekonder metabolit (özellikle mikotoksin) üretme yeteneğine sahip, *Fusarium* türleri arasında genom projesi tamamlananlar referans genomlar olarak hizmet etmektedir (Özer ve Soran, 1991; Parry ve diğ., 1995; Miedaner ve diğ., 2001; Bai ve Shaner, 2004; Dignani ve Anaissie, 2004; Saharan ve diğ., 2004).

Fusarium türleri bölmeli hiflerin oluşturduğu kümelerden ibaret miselyum düzenine sahiptir ve hücre duvarı α -1, 3-glukan, β -1, 3-glukan ve glikoprotein tabakalarına ek olarak kitin içermektedir (Grün, 2003; Schoffemeer ve diğ., 1999). *Fusarium* türlerinde eşeysiz üreme konidyosporlar aracılığıyla gerçekleşirken, eşeyli üreme gametangiyogami ile sağlanır (Tutel ve Çırpıcı, 1999; Trail, 2009). Eşeyli üreme sürecinde erkek ve dişi hiflerin kaynaşmasıyla askogen hif meydana gelir. Askogen hifin olgunlaşmasını takiben askus ana hücrelerinde (erkek ve dişi) nukleuslar birleşerek zigotu meydana getirir. Zigot mayoz bölünme geçirdiğinde haploid sayıda kromozom taşıyan dört nukleus oluşur ve ardından mitoz bölünme ile nukleus sayısı sekize tamamlanır. Bölmelerle birbirinden ayrılan bu nukleuslar (askospor) olgunlaşarak serbest hale geçerek yaşam döngüsünde haploid döngüyü başlatırlar (Prescott ve diğ., 1990; Tutel ve Çırpıcı, 1999).

Fusarium türlerinin esas habitatı topraktır. Fazla oksijene gereksinim duymadıkları için 40 cm derinlikte bile yaşamlarını sürdürebilirler (Özer ve Soran, 1991; Strausbaugh ve diğ., 2005). Üremeleri için en uygun pH değer aralığı 5-7, sıcaklık ise 24-32 °C'dır. Ancak asidik pH'larda da üreme gösterdikleri gibi 8°C gibi düşük sıcaklıklarda bile mikotoksin üretebildikleri rapor edilmiştir (Doohan ve diğ., 1999; Yörük ve Albayrak, 2014). Karbon kaynakları ve temel mineral tuzları mikroorganizmanın ihtiyacı olan

temel besin maddelerini oluşturmaktadır. Diğer besleyicileri ise ksilem sıvısından, kök ve yaralı doku sızıntısından absorbe ederek sağlarlar (Beckman ve diğ., 1981).

2.3.1. *Fusarium graminearum* ve *F. culmorum* Türlerinin Genel Özellikleri ve Genom Projeleri

Fusarium graminearum türü kültüre alınmış tahıllar, *F. culmorum* ise tahıllar da dahil (ekonomik öneme sahip) çok sayıda farklı bitki türünü enfekte etmektedir. Bu mantarlar ürettikleri özellikle trikotesen B sınıfı mikotoksinleri aracılığıyla insan ve hayvan sağlığını tehdit etmektedir (Parry ve diğ., 1995; Miedaner ve diğ., 2001; Tunalı ve diğ., 2006b).

Hemi-biotrofik yaşam döngüsüne sahip *F. graminearum* (anamorf), Nectriaceae ailesinin bir üyesi olup Telemorf ismi *Gibberella zeae*'dir (Goswami ve Kistler, 2004). Konak özgüllüğü gösteren bu türe sadece arpa, buğday ve diğer bazı tahıllarda rastlanmaktadır. Başak yanıklığı, kök ve kök boğazı çürükçülü hastalıklarına neden olduğu rapor edilmiştir (Parry ve diğ., 1995; Laday ve diğ., 2004; Ji ve diğ., 2007). Dünya genelinde başak yanıklığının en başta gelen patojeni olarak bildirilmektedir (Bai ve Shaner, 2004; Leisova ve diğ., 2006). Bu patojen yeryüzünde sıcak iklim koşullarının egemen olduğu bölgelerde yayılım göstermekle birlikte ülkemizde Marmara ve Karadeniz Bölgelerinde etkilidir (Miedaner ve diğ., 2001; Tunalı ve diğ., 2006b; Bernardo ve diğ., 2007). İnfenksiyonu, tohum kitle ve kalitesinde azalmada ve bulaştığı insan ve hayvanlarda da neden olduğu toksik etkiden dolayı *Fusarium graminearum*'un kontrolü önemlidir (Cuomo ve diğ., 2007).

Çoğu mantarda olduğu gibi, yaşam siklusunun çoğu haploid evreden oluşur ve yaklaşık iki haftada tamamlanır. *F. graminearum* homotallik olduğundan (seksüel sporlar olan) askosporları üretmek için farklı bir eşem partnerine ihtiyaç duymaz ve iki nukleuslu hücrelerinde nukleuslar genetik olarak eştir. *F. graminearum* haploid genomunda Mat1-1 ve Mat1-2 olarak isimlendirilen eşleşme tip genlerinin ikisi de bulunmaktadır.

Laboratuarda türün, tüm hayat siklusu 2 haftada tamamlanabilir. (Dickenson, 2003; Trail ve diğ., 2002; Bowden ve Leslie, 1999). Bu türde seksüel gelişim hastalık oluşumunda rol oynarken konidyosporların hastalık oluşturmadaki etkinlikleri bilinmemektedir (Trail ve diğ., 2002; Desjardins, 2006; Trail, 2009).

F. graminearum genomu; plasmid, fozmid ve bakteriyel yapay kromozom vektörleri ile oluşturulan klonlar elde edilerek dizilenmiştir. Genomu 36,1 Mb olan *F. graminearum* 13939 gen taşımaktadır. *F. graminearum* genomu transkripsiyon faktörleri, hidrolitik enzimler ve transmembran taşıyıcıları gibi bazı proteinlerle ilişkili genleri *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea* ve *Aspergillus nidulans* genomlarına göre daha yüksek sayıda içermektedir (Cuomo ve diğ., 2007; Trail, 2009).

Genom duplikasyonları bakımından diğer mantarlarla karşılaştırıldığında 15 kat daha az sayıda duplikasyonlu bölge taşıdığı belirlenmiştir. Veritabanlarında duplikasyonlu sadece birkaç gen çifti ve iki küçük transpozon familyası kayıtlıdır (www.ncbi.nlm.nih.gov; www.broadinstitute.org²; Cuomo ve diğ., 2007). *F. graminearum* homotallik olması nedeniyle çoğu diğer filamentli mantar türünden ayrılır. Bu durum genom boyunca yeni tekrarlı bölgelerin varlığını sınırlamaktadır. *Fusarium graminearum*'da tekrarlı dizilerin eksikliği, tekrarlarla indüklenen nokta mutasyon isimli ["repeat-induced point mutation, (RIP)"] genom boyunca mevcut bir koruma sistemine bağlıdır. Bu mekanizma duplike dizileri tanır ve C:G çiftlerini T:A çiftlerine çeviren transisyon mutasyonlarını devreye sokar. Böylece her iki kopyada da seksüel çevrim esnasında; bu mutasyonel sapma görülür.

Genom projesi *F. graminearum* PH-1 ve GZ3639 ırklarında gerçekleştirilmiştir. İki ırk arasında 10495 tekli nukleotid polimorfizmi (ing., "single nucleotide polymorphisms"; SNP) belirlenmiştir. Normalizasyon verilerine göre SNP yoğunluğu 0-17,5 SNP/kb aralığındadır. SNP lerin %25'i genomun 1.8 Mb'lık bir kısmında, SNP'lerin %50'si ise genomun 4.7 Mb'lık bir kısmında yer almaktadır. Her kromozom yüksek SNP yoğunluğu göstermektedir. Özellikle, telomer bölgeleri yüksek yoğunlukta SNP

² www.broadinstitute.org [Ziyaret tarihi: 11 Aralık 2013]

içermektedir. *F. graminearum*'un üç kromozomunda yüksek SNP içeren daha az sayıda büyük ara bölgeler bulunmaktadır. *Fusarium graminearum*'un kromozom sayısı (n=4) diğer *Fusarium* türlerinden (*F. verticillioides*, *F. oxysporum* ve *F. solani*) azdır. Bunun nedeni olarak da gösterilmektedir (Goswami ve Kistler, 2004; Gale ve diğ., 2005; Cuomo ve diğ., 2007; Trail, 2009).

Yüksek SNP yoğunluklu bölgeler yüksek rekombinasyon frekansına sahiptir. Bu bölgeler genomun diğer bölgelerine göre daha düşük %GC oranına sahiptir. Ayrıca blast analizlerinden elde edilen verilere göre, tür 704 türe özgün gen içermektedir. Cuomo ve diğ. (2007) ayrıca *F. graminearum* genomunu *F. asiaticum*, *F. culmorum*, *F. boothii* ve *F. pseudograminearum* genomları ile mikrodarray analizine tabi tuttuklarında *F. graminearum* türüne özgün 382 gen varlığını rapor etmişlerdir. Bunlardan 382'si aynı cinse ait türlerde de bulunmamaktadır ve bu genler yüksek SNP frekansı içerirler. Salgı proteinleri, major transporter proteinler, amino asit taşıyıcıları ve sitokrom P450'ler gibi bitki enfeksiyonu esnasında anlatım yapan *F. graminearum* genlerinde de SNP oranı yüksektir. Nukleus tarafından şifrelenen mitokondriyal genler ve translasyonda iş gören proteinleri şifreleyen genler de *F. graminearum* türünde (diğer *Fusarium* türlerine göre) yüksek çeşitlilik gösteren diğer genlerdendir (Cuomo ve diğ., 2007; Trail, 2009).

Yapılan araştırmalar *F. graminearum* genomundaki genlerin şifrelediği proteinlerden sadece 1368 tanesinin işlevsel olarak tanımlandığını göstermiştir. Bunlar arasından en fazla karakterize edilmiş üç protein ailesi transkripsiyon düzenleyici proteinler (320 protein), taşıyıcı proteinler (292 protein) ve sitokrom p450'lerdir. Bunun dışında lipazlar/esterazlar, ABC taşıyıcı proteinleri, siklin benzeri F-box proteinleri, peptidazlar, amino asit taşıyıcılar ve şeker taşıyıcı proteinler yer almaktadır. Karakterize edilmiş bu proteinler arasından 408'inin arpa enfeksiyonu esnasında yüksek düzeydeki varlığı tespit edilmiştir ayrıca yakın ilişkili türlere göre bu genlerin SNP düzeylerinin fazla olduğu da kaydedilmiştir. Bununla birlikte güncel olarak 10000 EST kaydı veritabanlarında mevcuttur. Ancak bu EST'lerin hepsi tek bir gene özgü olmayıp birden fazla EST'nin tek gen ile ilişkili olduğu da görülmektedir (Cuomo ve diğ., 2007; Trail, 2009).

Fusarium culmorum taksonomik olarak Mitosporik Hypocreales ailesine ait bir mantar türüdür (Scherm ve diğ., 2013). Bu patojen organizma nekrotrofik yaşam döngüsüne sahiptir ve konak ayırmaksızın bitkilere bulaşp başak yanıklığı, solgunluk, kök ve kök boğazı çürükçülü ve külleme gibi çeşitli hastalıklara yol açmaktadır (Özer ve Soran, 1991; Waller ve diğ., 2005; Hornok ve diğ., 2007). Bu tür, dünya genelinde çoğunlukla ılıman iklim koşullarına sahip bölgelerde yaygındır. Türün varlığı ülkemizde de Marmara, İç Anadolu, Ege, Karadeniz ve Akdeniz bölgelerinde rapor edilmiştir (Parry ve diğ., 1995; Miedaner ve diğ., 2001; Tunalı ve diğ., 2006a, b; Yörük ve Albayrak, 2012; Mert-Türk ve Gencer, 2013).

Haploid kromozom sayısı $n=4$ olan *F. culmorum* genom projesi resmi olarak tamamlanmamıştır. Ancak güncel olarak 3-ADON kemotipindeki FcUK99 izolatının tüm genom dizilim bilgisine ait ilk veriler toplanmış ve bu veriler veritabanlarına yüklenmeye başlanmıştır (Baldwin ve diğ., 2010; Scherm ve diğ., 2013). Ayrıca çalışmalar sonucunda özgün bazı genlere ait veriler etkşin olarak paylaşılmaktadır (www.ncbi.nih.nlm.gov). NCBI veritabanında kayıtlı 189 gen dizilim bilgisi mevcuttur. Annotasyonu yapılmış proteinler arasında uzama faktörü 1 α , RNA polimeraz II, fosfat permeaz ve trikotesen üretimi ile ilgili enzimler ve patojenite ilişkili proteinler yer almaktadır. Ancak özellikle de patojenite ve konak-patojen ilişkisi ile ilgili yeterli bilgi mevcut değildir (Scherm ve diğ., 2013). Bununla birlikte *F. graminearum* genomunun dizilim bilgisi mevcut olarak veritabanlarında kayıtlı olması *F. culmorum* ve diğer genom projesi mevcut olmayan *Fusarium* türleriyle yapılacak işlevsel genomik çalışmaları için önemli bir ön bilgi sağlasa da, *F. culmorum* türe-özgün genler ile gerçekleştirilecek çalışmalara katkısı sınırlı olmaktadır.

Fusarium buharicum, *F. sambucinum* gibi bazı *Fusarium* türleri sadece tek bir konak organizmayı infekte ederken *F. graminearum*, *F. avenaceum* gibi türler sınırlı konak aralığına sahiptir. Ayrıca konak organizma ve bitki kısmı ayırmaksızın etkili olan *F. culmorum* ve *F. oxyporum* gibi türler de bilinmektedir. Hastalık belirtileri türe ve konak

bitki kısmına bağlı değildir ve organizmalarda farklılık gösterebilir (Özer ve Soran, 1991). *Fusarium* türleri habitatı olan toprak dışında hastalık oluşturduğu konak bitkilerden izole edilmektedir.

2.4. B SINIFI TRIKOTESENLER VE DİĞER *Fusarium graminearum* ve *F. culmorum* MİKOTOKSİNLERİ

Mikotoksinler mantarlar tarafından üretilen, bulundukları nişte diğer organizmalar ile rekabette üstünlük sağlamalarına neden olan, aynı zamanda patojenik olanlarda yol açtıkları hastalıkların yayılmasına da katkıda bulunan sekonder metabolitlerdir.

Fusarium; *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Alternaria* ile birlikte mikotoksin üreten en önemli dört mantar cinsi içerisinde yer almaktadır (Parry ve diğ., 1995; Gutleb ve diğ., 2002; Niessen, 2007). *Fusarium* türleri trikotesen, fumonisin, zearalenon, fusarin C, butenolid gibi çeşitli mikotoksin tiplerini sentezleme yeteneğine sahiptir. Mikotoksinlerin bir kısmı türe özgün sentezlenir: B sınıfı trikotesenler (DON, NIV vb.) *F. graminearum* ve *F. culmorum* türleri tarafından sentezlenirken, *F. oxysporum* A sınıfı trikotesen (T-2 toksin vb.) üretir. Ayrıca *F. oxysporum* fumonisin üretme yeteneğine sahipken, *F. graminearum* ve *F. culmorum* bu toksini sentezleyemezler (Chandler ve diğ., 2003; Foroud ve Eudes, 2007; Kimura ve diğ., 2007; Desjardins ve Proctor, 2007). Bu mikotoksinler infeksiyon sürecinin başlamasında işlevsel olmasalar da; infeksiyonun ilerlemesi ve yayılmasında etkilidirler (Bai ve diğ., 2001; Carter ve diğ., 2002; Bernardo ve diğ., 2007). *Fusarium* spp.'nin diğer bazı mikotoksinleri ürettikleri literatürde kayıtlıdır. Buna karşın, *F. graminearum* ve *F. culmorum* türlerinin ürettikleri, bitkilerde ciddi hasarlara yol açan en önemli mikotoksinler B sınıfı trikotesenler, zearalenon, fusarin C, butenolid'dir. *Fusarium* spp.'nin ürettiği, karsinojenik ya da toksik etkili oldukları bilinen diğer mikotoksinler ise fumonisinler, beauvericin ve enniatinler ve equisetin'dir (Foroud ve Eudes, 2007; Desjardins ve Proctor, 2007).

Fusarium graminearum ve *F. culmorum* türlerinin ürettiği DON ve NIV, bunları taşıyan tahılların depolanması ve işlenmesi sırasında bile, hatta yüksek sıcaklıkta, varlıklarını ve etkilerini kararlı biçimde sürdürmektedirler (Lauren ve Smith, 2001; Gutleb ve diğ., 2002). Mikotoksin infeksiyonu insan ve hayvanlarda kusma, gıda zehirlenmesi, iştahsızlık, lökosit sayısında azalma, ciltte yanma, kaşıntı, çatlama, oral nekroz, gastroenterik nekroz vb. etkiler ile sonuçlanır (Desjardins ve diğ., 1993, 1996; Rotter ve diğ., 1996; Girgin ve diğ., 2001; Gutleb ve diğ., 2002; Oruç, 2005; Foroud ve Eudes, 2009). Hastalıklı ürünlerde saptanan bir diğer *Fusarium* mikotoksini ise zearalenondur. Bu toksin östrojen benzeri anabolik bir etkiye sahiptir ve uzun süreli toksinle bulaşmanın memelilerde meme kanserine neden olduğu rapor edilmiştir (Sonal ve Oruç, 2000; Girgin ve diğ., 2001). Sonuç olarak, *Fusarium* mikotoksinleri, sadece bitkiler için değil besin piramidi aracılığıyla bulaştığı insan ve hayvanlar için de önemli bir tehdit oluşturmaktadır.

Mikotoksinler fungal patojenle enfekte bitkilerde birikmektedir. Özellikle temel gıda olarak tüketilen tahıllardaki mikotoksinlerin azaltılması hem ülke tarımı için hem de halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla gerçekleştirilecek çalışmalarda hedef mikotoksin biyosentezinin düzenlenmesi olabilir. Ancak biyokimyasal manipülasyonların gerçekleştirilmesi için bitki patojen etkileşiminin, toksin üretiminde iş gören genlerin ve toksin etki mekanizmalarının tanımlanması ve çok iyi bilinmesi gerekmektedir (Desjardins ve Proctor, 2007; Foroud ve Eudes, 2009). *Fusarium graminearum* ve *F. verticillioides* türlerinin genom projelerinin tamamlanması ve diğer bazı *Fusarium* türlerinin endotoksin üretimiyle ilişkili genlerine ait girdilerin veri tabanlarında kayıt altına alınması, *Fusarium* türlerinin ürettiği mikotoksinlerle ilişkili genlerin ve gen kümelerinin tanımlanması sürecini hızlandırmıştır.

Fusarium türleri yedi sınıf mikotoksini sentezleyen biyosentetik yolağa sahiptir ve bu yolağa görevli gen kümeleri tanımlanmıştır: poliketid sentaz gen kümeleri; equisetin, fumonisin, fusarin ve zearalenonların, terpen siklaz gen kümesi; trikotesenlerin, siklik

peptid sentetaz gen kümesi; enniatinlerin ve son olarak da sitokrom P450 kümesi; butenolid sentezinin gerçekleştirilmesinden sorumludur.

Fusarium mikotoksinlerinin ve diğer bazı sekonder metabolitlerin üretimi ile ilişkili gen dizilim bilgileri 1990-2000 yılları arasında veri tabanlarında kayıt altına alınmışlardır. Günümüzde hala devam etmektedir. Trikotesen üretiminden sorumlu terpen siklaz gen kümesi (*tri5* gen kümesi) ilk defa 1993 yılında *F. sporotrichioides*'de tanımlanmıştır. Sonraki yıllarda *F. verticillioide*s'te türünde fumonisin üretiminden sorumlu gen kümesine ilişkin detaylı bilgiler veritabanlarına kaydedilmiştir (www.ncbi.nlm.nih.gov). 2003 yılında Broad Enstitüsü tarafından *F. graminearum*, 2006 yılında da *F. verticillioide*s tüm genomu dizilimi açıklanmıştır (www.broadinstitute.org). Genom projelerinin tamamlanması ile sekonder metabolit üretimi ile ilişkili verilerin de veritabanlarında artması ile sonuçlanmıştır. Ancak mevcut biyoinformatik girdileri artmış olsa da, kurulan olası mikotoksin biyosentez yollarının deneysel olarak gösterilmesi, genlerin tam olarak etkinliklerinin belirlenmesi önemli bir gerekliliktir. *Fusarium* cinsinin temel genetik, biyokimyasal ve moleküler biyoloji teknikleri ile ilgili çalışmalara uygun bir organizma olması deneysel doğrulama süreçlerini hızlandırmış ve güncel olarak *Fusarium* cinsinde toksin ve biyolojik olarak aktif metabolitlerin sentetik ve düzenleyici genleri ile çalışmaları olası hale getirmiştir (Desjardins ve Proctor, 2007).

2.4.1. B Sınıfı Trikotesenler

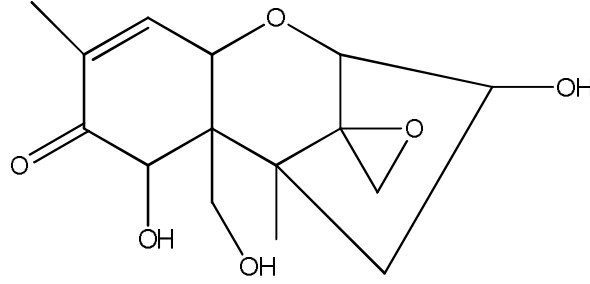
Trikotesenler *Fusarium* cinsinin dahil olduğu bazı mantar türleri tarafından üretilen bir mikotoksin tipidir. Bu toksinler *F. graminearum* ve *F. culmorum* tarafından enfekte olan tahıllarda birikir (Mishra ve diğ., 2003a, b). Hastalık taşıyan ürünlerde sıklıkla DON, NIV ve bunların asetilenmiş türevleri (3-asetildeoksinivalenol [3-ADON], 15-asetildeoksinivalenol [15-ADON] ve 4-asetilnivalenol [4-ANIV]) bulunmaktadır. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* deneylerde trikotesenlerin ribozoma bağlanarak ökaryotik protein sentezini engellediği rapor edilmiştir (Rotter ve diğ., 1996; Gutleb ve diğ., 2002). Bu toksinler tahılların depolanması ve işlenmesi sırasında, yüksek sıcaklıkta bile,

varlıklarını ve etkilerini kararlı biçimde sürdürmektedir (Lauren ve Smith, 2001; Gutleb ve diğ., 2002). Bu iki türün ürettiği mikotoksinler; sadece bitkiler için değil besin piramidi aracılığıyla bulaştığı insan ve hayvanlar için de önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Bu mikotoksinlerin önemli derecede toksik etkilere sahip oldukları ve hatta kendi aralarında da farklı toksisite gösterdikleri de bilinmektedir (Ryu ve diğ., 1988). Ayrıca trikotesenlerin insan ve hayvanlarda Alimentary Toxic Aleukia, ve Akakabi-byo gibi kronik ve ölümcül toksikoz durumlarına yol açtıkları bilinmektedir (Desjardins ve Proctor, 2007). Trikotesenler, sağlıkla ilgili olumsuz etkilerinin yanı sıra bira için maltlamada enzim sentezinin inhibisyonu aracılığıyla, fermentasyonda maya üremesinin inhibisyonu ile ve hatta yüksek kalitede ekmek üretiminde de benzer mekanizmalar aracılı teknik problemler de meydana getirmektedir (Champail ve diğ., 2004).

Trikotesenler birleşmiş sikloheksan/tetrahidrofan halkalarının merkezi bir çekirdeğinden oluşan seskuiterpenoid yapıdadır. Bu moleküller A, B, C ve D olmak üzere dört farklı sınıfa ayrılır. Sadece A, B tiplerinin 100'ü aşkın alt tipi bilinmektedir (Girgin ve diğ., 2001; Sudakin, 2003). En sık rastlanan ve izole edilen trikotesenler A ve B sınıfına dahildir. B tipi toksinlerin A tipinden farkı α - β bağına sahip olmalarıdır. Trikotesenler işlevsel açıdan farklılık gösteren beş pozisyon taşırlar ve pozisyonlarda genelde hidroksil ya da asetil grubu yer alır (Tablo 2.2). A tipi için major toksin H-2 iken, B tipi için DON'dur. T-2 toksininin doğada DON'a göre daha az bulunduğu rapor edilse de (Girgin ve diğ., 2001), DON'a (Şekil 2.2) göre 10 kat daha toksik etkili olduğu bilinmektedir (Foroud ve Eudes, 2009). C ve D tipindekiler sırasıyla, ikincil bir epoksit ya da bir ester bağlı makrohalka ile karakterize edilirler (Sudakin, 2003; Foroud ve Eudes, 2009). Her trikotesen tipinin üretim sürecindeki birincil substrat farnesil pirofosfattır. Bu moleköl, trikotesen üretimi ile ilişkilendirilmiş proteinleri kodlayan genleri taşıyan gen kümesine ismini veren *tri5* geninin şifrelediği Trikodien sentaz tarafından halkasal yapıdaki trikodiene çevrilir (Hammond-Kosack ve diğ., 2004; Kimura ve diğ., 2007).

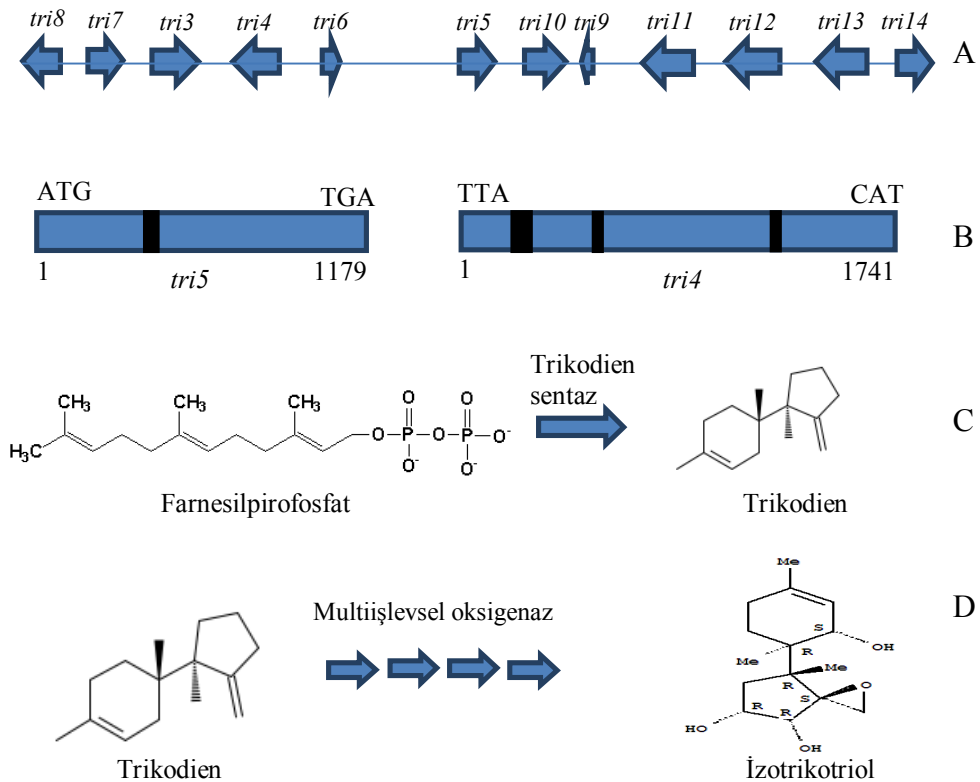
Tablo 2.2: B tipi dört trikotesen örneği ve yan zincirlerindeki gruplar.

B-Tipi Trikotesen	Karbon atom pozisyonu				
	C-3	C-4	C-15	C-7	C-8
DON	-OH	-H	-OH	-OH	=O
3-ADON	-OA	-H	-OH	-OH	=O
15-ADON	-OH	-H	-OA	-OH	=O
NIV	-OH	-OH	-OH	-OH	=O

**Şekil 2.2:** Deoksinivalenol molekülünün genel formülü.

B tipi trikotesenler fitotoksin olarak da bilinir. *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* ve *F. avenaceum* gibi önemli bitki patojenleri ile ilişkilendirilmiştir (Jennings ve diğ., 2004a, b; Nicholson ve diğ., 2004; Haratian ve diğ., 2008; Yörük ve diğ., 2014[basılmamış]). Bunlar arasından *F. graminearum* ve *F. culmorum* teoride DON ve NIV'in farklı tiplerini üretebilme yeteneğine sahiptir (Lee ve diğ., 2002; Brown ve diğ., 2004). Ancak yapılan çalışmalar bu iki türün üç trikotesen kemotipi arasından sadece birine sahip olduklarını göstermektedir. *Fusarium graminearum* izolatları için 3-ADON, 15-ADON ve NIV kemotiplerinden baskın olan 15-ADON kemotipidir. Buna karşın *F. culmorum* türünde ise sıklıkla 3-ADON kemotipi baskındır (Jennings ve diğ., 2004a, b; Ji ve diğ., 2007; Haratian ve diğ., 2008; Yörük ve Albayrak, 2012; Scherm ve diğ., 2013). Günümüzde coğrafik bölge ve kemotip arasında bir ilişkinin varlığı kurulamamıştır. Buna karşın farklı kemotiplerin toksisiteleri açısından farklılık taşıdıkları gösterilmiştir. NIV miktoksininin DON'a, DON'un 3-ADON'a kıyasla daha toksik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Jennings ve diğ., 2004a, b). Ayrıca moleküler genetik çalışmalar ile DON'un (daha az toksisitedeki) 3-ADON'a çevrimi gerçekleştirilmiştir (Khatibi ve diğ., 2011). Farklı arpa varyetelerine ait tohumlardan izole edilen trikotesen analizleri sonucunda DON yerine 3-ADON'un biriktiği ve hücre içi toksisitenin azaldığı saptanmıştır.

Trikotesen üretiminden sorumlu *tri5* gen kümesi üzerinde detaylı çalışılmalar gerçekleştirilmiş, sorumlu enzimler belirlenmiştir. Kurulan olası biyosentez yolağı fungal sekonder metabolizma araştırmaları için model niteliği taşımaktadır (Li ve Ding., 2001; Lee ve diğ., 2002; Chandler ve diğ., 2003; Kimura ve diğ., 2003). Gen kümesindeki boyut farklılıklarına neden olan mekanizmalar tanımlanmış, bulgular transkriptomik, proteomik ve metabolomik düzey gerçekleştirilen çalışmalarla desteklenmeye çalışılmıştır. Trikotesen biyosentezinde iş gören ilk enzim olan trikodien sentazı (TRI5) kodlayan *tri5*'in izolasyonundan sonra, *tri5* gen kümesinde 2 düzenleyici, 7 yolak geni ve 1 transporter geni olmak üzere 10 biyosentetik gen, işlevsel olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.3. A). Ayrıca *tri5* gen kümesi dışında yer alan *tri101* (ayrı bağımsız lokasyonda) ile *tri1* ve *tri16* genlerinin de trikotesen üretimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Chandler ve diğ., 2003; Kimura ve diğ., 2003).



Şekil 2.3: (A) *Fusarium graminearum* 88-1 ırkında *tri5* gen kümesinde yer alan genler, (B) *tri4* ve *tri5* genlerinin ekzon (mavi) ve intron (siyah) bölgelerinin gösterimi, (C) TRI5, (D) TRI4 proteinlerinin sürdürdüğü enzimatik reaksiyonlar.

tri5 gen kümesinin ürünü olan ara metabolit ve son ürünler arasında da çeşitlilik vardır (Kimura ve diğ., 2007). Gen kümesinde yer alan genler ve tüm gen kümesi, boyut açısından farklı olabilmektedir. *Fusarium graminearum*'a ait, DON kemotipindeki H-11 referans ırkında (Aksesyon no: AF336366.2) *tri5* gen kümesi 27022 bç boyutuna sahip iken, NIV kemotipindeki 88-1 ırkında (AF336365.2) ise total boyut 30159 bç'dir (www.ncbi.nih.nlm.gov). Diğer bir ırk olan GZ3639'da (AF359361.3) total boyut 57840 bç olarak kaydedilmiştir. Farklı izolatlarda *tri5* gen kümesindeki delesyon ve/veya insersiyonlar, tamamen silinme ve pseudogen (yalancı gen) organizasyonu bu farklılığı oluşturan mekanizmalardır (Brown ve diğ., 2004; Chandler ve diğ., 2003).

Biyosentetik süreçte ilk basamakta yer alan trikodien sentazı kodlayan *tri5* geni, ilk defa *F. sporotrichioides*'de, ardında da *F. graminearum*'da tanımlanmıştır. Dört farklı trikotesen sınıfına (3-ADON, 15-ADON, NIV ve H-2) ait tüm izolatlarda, bu genin önemi gösterilmiştir (Kimura ve diğ., 2003; Hammond-Kosack ve diğ., 2004). Tek intron taşıyan genin (Şekil 2.3.B) DON kemotipindeki 88-1 ırkında genin 1179 bç boyutuna sahip olduğu bildirilmiştir (www.ncbi.nih.nlm.gov). *tri5* geninin kodladığı trikodien sentaz farnesilpirofosfattan trikodien oluşumunu katalizler (Şekil 2.3.C). Bu genin anlatımı trikotesen mikotoksininin üretimi için gereklidir (Hammond-Kosack ve diğ., 2004; Chandler ve diğ., 2003; Kimura ve diğ., 2003).

Üç intron taşıyan 1741 bç boyutundaki *tri4* geni çok işlevli monooksijenazı kodlar (Şekil 2.3.B). Monooksijenaz trikodienin isotrikotriole çevriminden sorumludur (Şekil 2.3.D). Trikotesen üretimi için bu genin anlatımının da gerekli olduğu bildirilmektedir. Amino asit dizilimi sitokrom P450 üyelerine benzemekle birlikte genel olarak farklı bir aileye, CYP58, olarak ifade edilmiştir. *tri4* gen delesyonlu mutantlarda gözlenen trikodien birikimi çok işlevli monooksijenazın ilk C-2 hidroksilasyon basamağını kataliz ettiğini göstermektedir. Trikodiyenden izotrikodiyolün oluşumu dört ayrı reaksiyonla kataliz edilir [Reaksiyon 1: trikodiyenden 2- α -hidroksitrikodiyen oluşumu; Reaksiyon 2: 2- α -hidroksitrikodiyen'den 12,13-epoksi-9,10-trikoten-2- α -ol oluşumu; Reaksiyon 3: 12,13-epoksi-9,10-trikoten-2- α -ol'den isotrikodiyol oluşumu; Reaksiyon 4:

isotrikodiol'den isotrikotriol oluşumu). Bu oksijenasyon kademeleri trikotesen iskeletini oluşturmak için elzemdir (Hammond-Kosack ve diğ., 2004; Kimura ve diğ., 2007).

tri6 geni çinko parmak motifini taşıyan transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. İntron taşımayan genin *F. graminearum* H-11 ırkında 656 bp'lik boyuta sahip olduğu bilinmektedir. Genin anlatımı diğer genlerin anlatımını pozitif yönde etkilemekle birlikte, gen delesyonlu izolatlarda trikotesen üretiminin baskılandığı rapor edilmiştir (Kimura ve diğ., 2007). Gen kümesindeki *tri4*, *tri5* ve *tri3* genlerinin transkripsiyonel düzenlenmesinden sorumludur.

İlk defa *F. sporotrichioides*'den izole edilen *tri3* geni, 3-asetiltrikotesen 15-O-asetiltransferazı kodlar. Gen delesyonlu mutantlarda asetillenmiş ürünler oluşumu yerine ara metabolitler birikmektedir (Kimura ve diğ., 2007). Delesyonlu mutantlarda (T-2 toksin ve) 15-ADON mikotoksinleri oluşmaz. Genin anlatımı her kemotipte görülse de *tri3* gen anlatımının sadece 15-ADON kemotipi için gerekli olduğu rapor edilmiştir (Alexander ve diğ., 2011). Gende taşınan kısmi delesyon alt kemotip ayırımını sağlamaktadır (Jennings ve diğ., 2004a; Yörük ve Albayrak, 2012).

tri11 geni izotrikodermin C-15 hidroksilazı şifreler. Gen dört intron içerir ve yeni bir CYP familyası (CYP65A1) üyesidir. Delesyonlu örneklerde mikotoksin üretimi engellenmekte ve ara metabolitler birikmektedir (Kimura ve diğ., 2007).

tri12 geni, "efflux pump" isimli membran proteinini kodlar ve üretilen protein membran boyunca uzanan segment içerir. Bu protein transporter proteinlere yüksek düzeyde dizi homolojisi göstermektedir. *tri12* geni üç introna sahiptir ve mikotoksini hücre dışına pompalayan bir transmembran proteini kodlar (Kimura ve diğ., 2007).

tri7 geni 3-asetiltrikotesen 4-O-asetiltransferazı kodlar. 15-ADON kemotipindeki *F. graminearum* izolatlarında *tri7*, pseudogen olarak bulunur. 3-ADON kemotipindekilerde ise tamamen silinmiştir (Brown ve diğ., 2004; Chandler ve diğ., 2003). *tri7* delesyonlu mutantlarda, ya ara metabolit birikir ya da 3-ADON kemotipi oluşur. Genin insersiyon içeren işlevsel olmayan kopyalarını taşıyan izolatlar DON, işlevsel kopyasını taşıyanlar ise NIV kemotipindedir (Lee ve diğ., 2002; Chandler ve diğ., 2003).

tri10 geni, *tri4*, *tri5* ve *tri6* genlerinde olduğu gibi mikotoksin üretimi için gerekli olan 420 amino asitliklik bir proteini şifreler. Ancak bu protein veritabanlarına kayıtlı (işlevi bilinen) proteinler ile dizi benzerliği taşımaz (Kimura ve diğ., 2007; www.ncbi.nih.nlm.gov). *tri13* geni 3-asetiltrikotesen C-4 hidroksilazı kodlar. Amino asit dizilimi sitokrom P450'yle yüksek benzerlik gösterir. DON kemotipindeki izolatlarda gende üç delesyon taşınır ve delesyonlu *tri13* kopyası işlevsel değildir (Chandler ve diğ., 2003; Kimura ve diğ., 2003). *tri5* gen kümesindeki genler arasından, DON ve NIV kemotiplerinin ayırt edilmesinde en güvenilir hedef genidir. *tri8* geni trikotesen C-3 deasetilaz proteinini şifreler. *tri6* gibi intronsuz bir genidir ve lipazlara benzerlik gösterir.

tri7 ve *tri13* genleri kemotip belirlemede kullanılan markır genlerdir. *tri5* gen kümesi dışında yer alan ve mikotoksin sentez yolağında işlevsel olduğu belirlenmiş genler *tri101*, *tri1* ve *tri16* genleridir. Bu yolak genlerine ilaveten *tri15* geninin anlatımının *tri10* tarafından düzenlendiği de bilinmektedir. *tri15* geni çinko parmak motifi taşıyan bir transkripsiyon faktörünü kodlar ancak *F. graminearum* türünde trikotesen B üretimi için anlatımının gerekli olmadığı gösterilmiştir. *tri101* geni trikotesen 3-O-asetiltransferaz proteinini kodlar. *tri101* delesyonu ara metabolit birikimi ile sonuçlanmakla birlikte yapısal olarak *tri6* ve *tri10*'un kontrolü altındadır (Kimura ve diğ., 2007). *tri1* geni 3-asetil trikotesen C-8 hidroksilaz proteinini kodlar. *tri1* gen delesyonlu mutantlarda trikotesen üretiminin gerçekleşmediği bilinmektedir (Hammond-Kosack ve diğ., 2004; Kimura ve diğ., 2007). *tri16* geni ester yan grup

oluşumunu sağlayan açıltransferazı kodlar. *tri10* geninin kontrolü altındadır. *F. graminearum* türünde pseudogen olarak bulunmaktadır. (Chandler ve diğ., 2003; Kimura ve diğ., 2007)

2.5. *Fusarium graminearum* ve *F. culmorum*; GENETİK YAKLAŞIMLAR

Türler arası ve tür içi çeşitliliği yüksek düzeyde barındıran *Fusarium* cinsinde tanı ve tanımlama çalışmaları 1990'lardan günümüze giderek artmaktadır. Önemli bir bitki patojeni grubunu barındıran, aynı zamanda insan patojeni türleri de bilinen *Fusarium*'da ilk çalışmalar mutantların eldesi ile gerçekleştirilmiştir. Günümüzde genotiplendirme ve kemotiplendirme çalışmaları, sekonder metabolit eldesi ve üretiminin durdurulmasına yönelik pek çok araştırmalar yürütülmektedir

Fusarium graminearum ve *F. culmorum* türlerine ilişkin moleküler çalışmalar özellikle geçtiğimiz 20 yılda artmıştır. Bu çalışmalar patojen organizmanın çeşitli markır yöntemleri ile tanımlanmasından sekonder metabolit üretiminin durdurulmasına kadar farklı alanlarda sürdürülmektedir.

2.5.1. Mutantlarla Yapılan Çalışmalar

Sekonder metabolitlerin üretimi ile ilişkili gen kümelerinin aydınlatılması temel bilimler ve biyoteknoloji açısından önem taşımaktadır. Özellikle mikotoksin üretimi ile ilişkili genlerin ortaya konması toksisitenin ortadan kaldırılması veya en aza indirilmesi amacıyla gerçekleştirilecek çalışmalar için bir gerekliliktir. Gen delesyonlu mutantların eldesi bu kapsamda öncü bilgileri sağlamaktadır. Delesyon mutantlarının eldesi ile *F. graminearum* ve *F. culmorum* türlerinde çeşitli sekonder metabolitlerin üretimine ilişkin metabolik yollar aydınlatılmıştır. Trikotesen mikotoksininin üretiminden sorumlu *tri5* gen kümesi ve aurofusarin pigmentinin üretiminden sorumlu *PKS12* gen kümesi günümüzde delesyon mutantları elde edilerek detaylı bir şekilde araştırılmış ve olası biyokimyasal yollar bu çalışmalar üzerine kurgulanmıştır. Delesyonlu geni taşıyan izolatta kaydedilen fenotip izlenerek genin işlevleri ile ilgili özgün verilere ulaşılmıştır.

tri5 gen kümesi ile ilişkili çalışmalarda 12 biyokimyasal yolak geni 12 farklı delesyon mutanlığı elde edilerek ortaya konmuştur (Chandler ve diğ., 2003; Brown ve diğ., 2004). Farklı ırklarda toksin üretimi için kesin gerekli olan genlerin varlığı gösterilmiştir. Benzer şekilde aurofusarin üretiminden sorumlu 30 kb boyutundaki *PKS12* gen kümesinde yer alan her bir genlerin işlevleri ve olası yolak da 11 delesyon mutanlığı oluşturularak aydınlatılmıştır (Frandsen ve diğ., 2006; Kim ve diğ., 2008). Benzer çalışmalar zearalenon (*PKS*), fusarin (*FUSA/FUS1*) ve butenolid (FG08079.1) mikotoksinlerinin üretimi ile ilişkili gen ve gen kümeleri için de gerçekleştirilmiştir (Desjardins ve Proctor, 2007).

2.5.2. Moleküler Markır Aracılı Genetik Karakterizasyon

Fusarium türleri alem, cins, grup ve tür düzeyinde moleküler yaklaşımlar kullanılarak tanımlanabilmektedir (Tablo 2.3). Bu amaçla genomda varlığı belirlenmiş olan SCAR (ing., “sequence characterized amplified region”) markırları, 18S-5.8S-28S rDNA (ribozomal DNA), ITS (ing., “internal transcribed spacer”) ve IGS (ing., “intergenic spacer”) bölgeleri PZR’nda çoğaltılarak hedef olarak seçilebilmektedir (Schilling ve diğ., 1996; Wu ve diğ., 2002; Sumida ve diğ., 2004; Paetkau ve diğ., 2004). Alem düzeyindeki tanı çalışmalarında 28S rDNA bölgesi, cins düzeyinde 5.8S-28S rDNA bölgelerinin analizi gerçekleştirilmekte, toksigenik türlerin tanısında *tri5* geni ve tür düzeyindeki tanı ise SCAR markırları hedef bölge olarak kullanılmaktadır (Schilling ve diğ., 1996; Nicholson ve diğ., 1998; Niessen ve Vogel, 1998; Hue ve diğ., 1999; Nicholson ve diğ., 2004; Haynes ve diğ., 1995).

Tablo 2.3: *Fusarium* türlerinin genetik karakterizasyonunda kullanılan PZR temelli uygulamalar.

Markır yöntemi	Genom Bölgesi	Amaç	Araştırmacı
PZR	28S rDNA	Mantar tanısı	Haynes ve diğ. (1995)
PZR	5.8S-28S rDNA	<i>Fusarium</i> spp. tanısı	Hue ve diğ. (1999)
PZR	<i>tri5</i>	Toksigenik <i>Fusarium</i> sp. tanısı	Niessen ve Vogel (1998)
SCAR	RAPD markırı	<i>F. graminearum</i> tanısı	Schilling ve diğ. (1996)
SCAR	RAPD markırı	<i>F. culmorum</i> tanısı	Nicholson ve diğ. (1998)
Mikrosatellit-PZR	Mikrosatellit markırı	<i>F. culmorum</i> genetik çeşitlilik	Miedaner ve diğ. (2013)
RAPD-PZR	Rasgele Genom	<i>F. graminearum</i> genetik çeşitlilik	Yörük ve Albayrak (2013)
ISSR-PZR	Rasgele Genom	<i>F. culmorum</i> genetik çeşitlilik	Mishra ve diğ. (2004)
PZR-RFLP	IGS-rDNA	<i>F. culmorum</i> genetik çeşitlilik	Llorens ve diğ. (2006)
RFLP	Mitokondriyal DNA	<i>F. graminearum</i> genetik çeşitlilik	Laday ve diğ. (2004)
AFLP	Kesim Bölgeleri	<i>F. graminearum</i> genetik çeşitlilik	Monds ve diğ., 2005

Moleküler markır yöntemleri genomdaki farklılıkları belirlemede güçlü yaklaşımlar olarak görülmektedir. Yüksek düzeyde tür içi çeşitliliğine sahip olan *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatları arasındaki farklılıkları belirlenmesi ileride markır aracılı seleksiyon yapma imkanı sağlama potansiyelini barındırmaktadır. Bu nedenle öncelikle genom RAPD ve ISSR (ing., “inter simple sequence repeat”) gibi yöntemlerle çeşitlilik bakımından taranmış (Carter ve diğ., 2000; Dinolfo ve diğ., 2010; Yörük ve diğ., 2011), enzim kesimi sürecini içeren AFLP (ing., “amplified fragment length polymorphism”) ve RFLP (ing., “restriction fragment length polymorphisms”) yaklaşımları (Tablo 2.3) ile genomda daha sınırlı bölgeler tanımlanmıştır (Monds ve diğ., 2005; Llorens ve diğ., 2006). Genomda özgün bölge ve gen polimorfizmi de mikrosatellit DNA bölgelerinin, ITS ve IGS bölgelerinin ve β -tubulin gibi bazı özgün genlerin analizi ile belirlenmiştir (Gagkaeva ve Mattila, 2004; Mishra ve diğ., 2006; Yörük ve diğ., 2012a, b). Ancak mitokondri genomu ile sınırlı sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir (Laday ve diğ., 2004; Gilmore ve diğ., 2009). Genetik varyasyon çalışmaları eşeyli üreme görülen *F. graminearum* populasyonlarında yüksek düzeyde benzerlik olduğunu ortaya koymuş, yüksek veya orta düzeylerde seyreden genetik çeşitlilik yüzdeleri de saptanmıştır (Miedaner ve diğ., 2001; Yörük ve Albayrak, 2013). *Fusarium culmorum*’un yüksek tür içi genetik çeşitliliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Miedaner ve diğ., 2001; Miedaner ve diğ., 2008).

Son yıllarda *F. graminearum* ve *F. culmorum* ile ilgili yapılan çalışmalar mikotoksinlerin moleküler düzeyde belirlenmesi ve analizi üzerine yoğunlaşmıştır. Patojenin ürettiği ve üretme yeteneğinde olduğu mikotoksinler belirlenmekte (kemotiplendirme), mikotoksin sentezi ile ilgili genlerin genomdaki lokasyonları ve anlatım profilleri ortaya konmaktadır (Doohan ve diğ., 1999; McDonald ve diğ., 2005; Haratian ve diğ., 2008; Yörük ve Albayrak, 2012). *Fusarium* izolatlarında kemotiplendirmede; sentezlenen mikotoksinler HPLC (ing., “high pressure liquid chromatography”) ve benzeri yöntemler aracılığıyla saptanmakta veya mikotoksin biyosentez yolağında görevli enzimleri şifreleyen genlerin PZR aracılı çoğaltılarak mikotoksin sentezi dolaylı olarak etkin ve güvenilir bir şekilde gösterilmektedir (Chandler ve diğ., 2003; Kimura ve diğ., 2003). HPLC temelli uygulamalarda 214-254 nm dalga boylarında yapılan taramalarla kemotip saptanmaktadır (Jennings ve diğ., 2004a,; Monds ve diğ., 2005). Günümüzde trikotesenler *tri5* gen kümesindeki genlerin anlatımı sonucu sentezlendiklerinden bu genlerin varlığının gösterilmesi bu patojenin mikotoksin üretme potansiyelini ortaya koymaktadır (Desjardins ve Proctor, 2007). Bu amaçla trikotesen biyosentez yolağından sorumlu, 11 genden oluşan, *tri5* gen kümesinin analizine dayalı olarak gerçekleştirilen çalışmalarla *Fusarium* izolatlarında (1) DON ve 3-asetillenmiş deoksinivalenol (3-ADON), (2) DON ve 15-asetillenmiş deoksinivalenol (15-ADON) ve (3) NIV ve 4-asetillenmiş nivalenol (4-ANIV) olmak üzere üç farklı kemotip saptanmıştır (Hammond-Kosack ve diğ., 2004). *Fusarium* izolatlarının kemotipleri *tri7*, *tri13* ve *tri3* genlerinin PZR analizi ile belirlenmektedir (Jennings ve diğ., 2004a, b; Ji ve diğ., 2007; Yörük ve diğ., 2011). Benzer şekilde yine *tri5* gen kümesinde yer alan genlerin anlatım örnekleri ters transkriptaz-PZR ve gerçek zamanlı PZR gibi yöntemlerle de ortaya konmaktadır (Doohan ve diğ., 1999; Marin ve diğ., 2010; Seong ve diğ., 2009). Benzer çalışmalar *F. graminearum* ve *F. culmorum* başta olmak üzere *Fusarium* türlerinin ürettiği diğer mikotoksinlerden zearalenon, fusarinC ve fumonisin ile ilişkili genlerin analizi ile de gerçekleştirilmektedir (Desjardins ve Proctor, 2007).

2.5.3.Gen Susturma Çalışmaları

Askı mantarlardan *F. culmorum*, *Neurospora crassa* ve *Magnaporthe oryzae*'de RNAi sürecinin kullanıldığı gösterilmiştir (Kadotani ve diğ., 2003; McDonald ve diğ., 2005). Mantarlarda da gen anlatımının transkripsiyon sonrası baskılandığı ve primer transkript olan işlenmiş mRNA moleküllerinin çift iplikli RNA molekülleri aracılığıyla translasyona girişinin engellendiği süreçte diğer ökaryotik organizmaların sahip olduğu moleküllere ve yolaklara yapısal ve işlevsel olarak benzeyen mekanizmalar kullanılmaktadır (Napoli ve diğ., 1990; Romano ve Macino, 1992; Fire ve diğ., 1998; Kadotani ve diğ., 2003). Ayrıca *F. graminearum* genomunda argonat, dicer ve RNA bağımlı RNA polimeraz enzimlerinin varlığı gösterilmiş, askı ve bazidli mantarlardaki proteinler ile evrimsel olarak yakın ilişkili olduğu saptanmıştır (Nakayashiki, 2005; Nakayashiki ve diğ., 2006). RNA aracılı gen susturma mekanizmasında hücre başına sadece birkaç çift iplikli RNA molekülünün etkili "interferans" için yeterli olduğu, susturmanın farklı gelişim aşamalarında gerçekleşebildiği gösterilmiştir (Thakur, 2003). Mantarlarda yabancı nukleik asit moleküllerine karşı kullanılan post-transkripsiyonel gen susturma mekanizması "quelling" olarak bilinmektedir. Quelling süreci *N. crassa*'da karakteristik turuncu renkten sorumlu karatenoid pigmentlerinin üretiminden sorumlu üç gendeki mutasyonun araştırıldığı çalışma sırasında keşfedilmiştir (Romano ve Macino, 1992). Susturma süreci eksojen nukleik asit moleküllerinin dizi homolojisi ile transkripsiyon sonrası protein sentezini durdurması ile sonuçlanmıştır (Maheshwari, 2005).

Fusarium türlerinde quelling çalışmaları çok az sayıda ve çok sınırlı hedef seçilerek gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda trikotesen üretimi baskılanarak patojenin virülens yeteneğinin indirgenmesi, bu şekilde bitkilerde mikotoksin kontaminasyonunun en aza indirilmesi ve meydana gelebilecek ürün zararlarının engellenmesi amaçlanmıştır. *F. graminearum*'da trikotesen üretiminden sorumlu *tri5* gen kümesi tanımlandığı için RNAi ile gen anlatımının susturulmasında kullanılabilecek hedef bölgeler bilinmektedir. *Fusarium culmorum*'da trikotesen üretiminde diğer genlerin pozitif regülatörü olan çinko parmak motifli transkripsiyon faktörünü kodlayan *tri6* geninin susturulması amaçlanmıştır. Bu çalışmada susturulacak gen anlamlı, karşı anlamlı ve her ikisi de bir

bağlayıcı ile susturma vektörlerine klonlandıktan sonra polietilen glikol aracılı transformasyon ile protoplast kültürlerine aktararak (Scherin ve diğ., 2011) IRT (ing., “inverted repeat transgenes”) transformantları oluşturulmuştur. Scherin ve diğ. (2011) tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada transkriptomik düzeyde analizler gerçekleştirilmiş hatta transformantların bitkideki virülens düzeyleri de incelenmiştir. Ancak elde edilen veriler quelling uygulanmış bazı mantarlarda *tri6* gen anlatımının ve mantarın bitki üzerindeki virülens etkisinin arttığını göstermiştir. Bir diğer çalışmada *F. graminearum*'da *tri6* geninin kararlı olarak susturulması hedeflenmiş ve quelling, *F. culmorum*'da gerçekleştirilen stratejinin aynısı kullanılarak yapılmıştır. Ancak susturulmuş örneklerde gen anlatımının kontrolü yapılmamış, sadece patojenin bitkide hastalık oluşturma etkisi belirlenerek susturmanın olduğu kabul edilmiştir (McDonald ve diğ., 2005). *Fusarium* türlerinde kısıtlı sayıdaki susturma çalışmaları protoplast kültürlerine IRT vektörleri ve yardımcı plazmidlerin polietilenglikol aracılı birlikte-transformasyon metodu ile gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde *Fusarium* türlerinde susturulmak istenen genin kopyasını taşıyan plazmid vektörlerin ve markır geni taşıyan yardımcı vektörlerin elektroporasyon ve biyolistik gibi doğrudan yöntemler ile aktarımı teoride mümkündür. *Fusarium* türlerinde *Aspergillus niger*'de başarıldığı gibi siRNA aracılı quelling çalışmalarına rastlanmamıştır (Barnes ve diğ., 2008). *Fusarium*'da gerçekleştirilen quelling çalışmalarında transformantların hedef gen anlatımı ya araştırılmamış ve kantitatif olarak analiz edilmemiş, ya da gen anlatımının çalışılan bütün mantarlarda düştüğü kararlı sonuçlar elde edilememiştir. Oysa ki trikotesen oluşumundaki ilk kademeleri katalizleyen enzimleri şifreleyen genlerin susturulması, ileriki basamaklarda görevli genlerin anlatımlarının azalmasına yol açabileceğinden susturma ile dolaylı olarak etkilenen genlerin anlatımlarını ya da son ürünün varlığı ve/veya yokluğunu da belirlemek önemlidir (Constantin ve diğ., 2004).

Bu doktora tez projesinde bitki patolojisinde önemli bir yere sahip olan *Fusarium* türlerinin ürettikleri, insan ve hayvanlar için ciddi sağlık sorunlarına yol açan trikotesen üretiminin durdurulması amaçlanmıştır. Çalışmalarda iki farklı *Fusarium* türü ve trikotesen biyosentez yolağındaki çok işlevli monooksijenaz enzimini kodlayan *tri4* ve trikodien sentaz enzimini şifreleyen *tri5* geni susturmada hedef genler olarak seçilmiştir.

Bu genlerin anlatımları mevcut bütün mantar izolatlarında kalitatif ve kantitatif olarak incelenmiş, maksimum gen anlatım profiline sahip olanları belirlenmiştir. Seçilen izolatlarda, *Fusarium* türlerinde ve çok sayıda mantar türünde daha önceden uygulanmamış farklı bir strateji kullanılarak, *tri4* ve *tri5* genlerine identik dizilere sahip sentetik siRNA molekülleri bir transfeksiyon ajanı ile protoplast kültürlerine aktarılmıştır. Transfektantlar farklı uygulamalar ile analiz edilmiş, bu şekilde bitkilerden insanlara kadar çok çeşitli canlılarda zararlı etkileri bulunan mikotoksin sentezinin azaltıldığı ve hatta üretimin tamamen baskılandığı gösterilmiştir. Elde edilen bulgular siRNA aracılı susturma ile mantarların neden olduğu mikotoksin kontaminasyonunun en aza indirilebilmesi, dolayısı ile besin zinciri aracılığıyla insanlara bulaşmasının engellenmesi mümkün hale gelebilecek çalışmalarda kullanılacak yeni yaklaşımların geliştirilmesine öncü olacaktır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN *Fusarium* İZOLATLARI

Çalışmada Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan sağlanan, Türkiye’de farklı coğrafik bölgelere ait hastalıklı arpa, buğday ve mısır bitkilerinden elde edilen tek spor izolatları kullanıldı (Tablo 3.1). Tunalı ve diğ. (2006a, b) tarafından standart morfolojik yöntemlere (Booth, 1977; Gerlach ve Nirenberg, 1982), Yörük ve Albayrak (2012) tarafından da türe özgün moleküler markır yöntemlerine (Schilling ve diğ., 1996; Nicholson ve diğ., 1998) göre tanımlanmış 14 *Fusarium graminearum* ve 24 *F. culmorum* izolatı İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonunda saklama altına alındı.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan *Fusarium* izolatları.

İzolat	Tür	Konak	Coğrafik Bölge	İzolat	Tür	Konak	Coğrafik Bölge
F5	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Sakarya	F2	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Marmara
F6	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Sakarya	F3	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Konya
F7	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Sakarya	F4	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Marmara
F8	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Sakarya	F10	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Bilecik
F9	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Balıkesir	F12	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Balıkesir
1F	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Bolu	F14	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Bilecik
2F	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Çankırı	F15	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Sinop
3F	<i>F. graminearum</i>	Mısır	Samsun	F16	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Konya
4F	<i>F. graminearum</i>	Arpa	Bolu	F17	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Konya
5F	<i>F. graminearum</i>	Mısır	Samsun	F19	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Konya
6F	<i>F. graminearum</i>	Mısır	Samsun	F20	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Bilecik
7F	<i>F. graminearum</i>	Mısır	Samsun	F21	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Uşak
14F	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Kastamonu	F24	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Konya
15F	<i>F. graminearum</i>	Buğday	Sakarya	8F	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Ankara
17F	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Ankara	9F	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Isparta
18F	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Eskişehir	10F	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Samsun
19F	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Eskişehir	11F	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Çorum
20F	<i>F. culmorum</i>	Arpa	Dinar	12F	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Amasya
F1	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Marmara	13F	<i>F. culmorum</i>	Buğday	Konya

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN MİKROORGANİZMALARIN ÜRETİMİ

Fusarium graminearum ve *F. culmorum* türlerine ait 38 izolatın saf kültürlerinin devamlılığı farklı besi ortamları kullanılarak sağlandı. İzolatlar -80°C’de uzun süreli

saklamaya alındı. siRNA transfeksiyonunda kullanılan yardımcı vektörler *Escherichia coli* DH5 α suşunda çoğaltıldı.

3.2.1. *Fusarium* İzolatlarının Kültür Koşulları ve Saklaması

Fusarium izolatları üç farklı besi ortamı kullanılarak kültürlendi (Tablo 3.2); sentetik nutrient agar (SNA) (Nirenberg, 1976), patates dekstroaz agar (PDA), patates dekstroaz özütü (PDB). SNA sadece izolatların uzun süreli saklanmalarında, PDA kültürlerin devamlılığının sağlanmasında kullanıldı. PDB besi ortamı ise miselyumların üretiminde, antibiyotik direncinin belirlenmesinde, elde edilen protoplastların kültürlenmesinde ve transfeksiyon çalışmaları için kültürlerin devamlılığının sağlanmasında kullanıldı. Besi ortamları 121°C’de, 1.2 atmosfer basınç altında 15 dakika steril edildikten sonra kültür kaplarına döküldü.

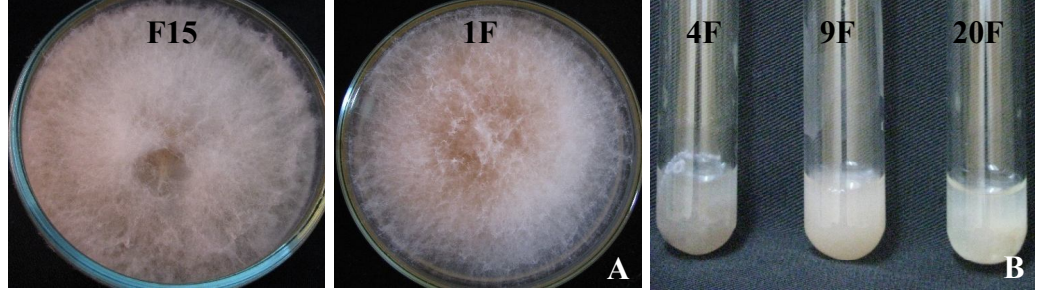
Tablo 3.2: *Fusarium* izolatlarının üretilmesinde kullanılan besi ortamları ve içerikleri, pH 5.6.

Besi ortamı	Bileşenler	Derişim
Sentetik nutrient agar (SNA)	KH ₂ PO ₄	1 g/l
	KCl	0.5 g/l
	KNO ₃	1 g/l
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g/l
	Glukoz	0.2 g/l
	Sukroz	0.2 g/l
	Agar	20 g/l
Patates dekstroaz agar (PDA)	Patates dekstroaz özütü	15 g/l
	Agar	20 g/l
Patates dekstroaz özütü (PDB)	Patates dekstroaz özütü	15 g/l
	Higromisin B*	25-100 μ g/ml

* Sadece *Fusarium* izolatlarının antibiyotik direncinin belirlenmesi için eklendi

Fusarium izolatlarına ait PDA besi ortamındaki kültürler miselyum parçasının besi ortamının ortasına konması ile başlatıldı. İzolatlar ısı, ışık ve nem kontrollü kabinde; %50 nem, 25°C’de gece/gündüz koşulları sağlanarak yedi gün inkübe edilmek suretiyle üretildi (Şekil 3.1.A). Sıvı mantar kültürlerinin üretilmesinde; PDA besi ortamındaki miselyum parçası PDB sıvı besi ortamına aktarıldı, 80 rpm hızda ve 25°C’de yedi gün çalkalamalı inkübatörde bekletildi (Şekil 3.1.B).

SNA besi ortamında üretilen yedi günlük kültürlerden steril fırça yardımıyla süpürülen miselyum, içerisinde gliserol (% 15; v/v) bulunan propilen tüpe alındı. Örnekler bir gece -20°C’de bekletildikten sonra -80°C’de uzun süreli saklaya bırakıldı.



Şekil 3.1: (A) F15 ve 1F izolatlarının katı PDA’da üretilen, (B) 4F, 9F ve 20F izolatlarının sıvı PDB besi ortamında üretilen yedi günlük kültürleri.

3.2.2. *Escherichia coli* DH5α Üretimi

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonunda bulunan *Escherichia coli* DH5α suşu Luria Bertani (LB) besi ortamında (Tablo 3.3) 37°C’de 180 rpm hızda 16 saat inkübe edilerek üretildi. LB besiyeri transformasyona yeterli hücre üretiminde, transformantların seçiminde ve bakteri stoklarının hazırlanmasında da kullanıldı. Ayrıca transformasyonda ısı şoku uygulamasının ardından bakteri kültürlerinin üretilmesinde SOC (Tablo 1mmn) besi ortamı da kullanıldı.

Tablo 3.3: Bakteri üretiminde kullanılan besi ortamları, pH 7.0.

Besi ortamı	Bileşenler	Derişim
Luria Bertani Agar (LBA)	Bakto-tripton	10 g/l
	Maya özütü	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	Agar	15 g/l
Luria Bertani (LB)	Bakto-tripton	10 g/l
	Maya özütü	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	Bakto-tripton	%2
SOC	Maya özütü	%0.5
	NaCl	10 mM
	KCl	2.5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	Glikoz	20 mM

3.3. DENENEN ORTAM KOŞULLARI

In vitro kültürlerde en yoğun miselyum üremesi elde edilen ve RT-PZR (ters transkriptaz PZR) analizi ile kararlı 3-ADON mikotoksininin ürettiği bildirilmiş *F. culmorum* F15 izolatu ortam koşullarının trikotesen üretimine etkisinin belirlenmesinde kullanılmak üzere seçildi (Albayrak ve Yörük, 2012; Yörük ve Albayrak, 2012). Farklı ortam koşullarında kültürlenen F15 izolatının *tri4* gen anlatım düzeyi gerçek zamanlı PZR yöntemi ile araştırıldı, RT-PZR yöntemi ile doğrulandı.

3.3.1. Farklı Koşullarda F15 İzolatının *in vitro* Kültürlerinin Kurulması

Kontrol materyali olarak PDA besi ortamında (pH 5.6) 25°C’de 7 gün kültürlenen *F. culmorum* F15 izolatu kullanıldı. Ortam koşulları olarak farklı pH ve sıcaklık değerleri ile hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulaması seçildi. Sıcaklığın test edildiği deneme grubunda besi ortamı pH değeri 5.6’da sabit tutulmak üzere F15 izolatu 8°C ve 15°C’de yedi gün üretildi. Besi ortamı pH’sının test edildiği deney grubunda ise inkübasyon sıcaklığı 25°C’de sabit tutulup asidik pH (pH 3.0) ve nötral pH (pH 7.0)’nın toksin sentezine etkisi araştırıldı. Son deney setinde 0.5 mM H₂O₂ içeren PDA’da optimum koşullarda kültürlenen F15 izolatında trikotesen üretimi incelendi.

3.3.2. Total RNA İzolasyonu

Farklı koşullara maruz bırakılan yedi günlük fungal kültürlerden total RNA molekülleri Tripure (Roche, İsviçre) kullanılarak izole edildi. Total RNA izolasyonunda 50-100 mg yaş ağırlıktaki miselyum kullanıldı. Fungal materyal sıvı azot ile havanda homojenize edildi. 1 ml trizol ile homojenizasyona devam edildi. Homojenat 1.5 ml’lik mikrotüplere aktarıldı. 25°C’de nukleoprotein kompleksinin ayrışması için 5 dakika beklendikten sonra 0.2 ml kloroform eklenen tüpler 15 saniye boyunca ters-yüz edilmek suretiyle karıştırıldı. Tüpler 25°C’de 3 dakika inkübasyonun ardından 10000 *xg*’de 4°C’de 15 dakika santrifüj yapıldı. RNA’nın olduğu en üst faz (250 µl) yeni bir mikrotüpe aktarıldı. Tüplere 0.5 ml izopropanol eklendi ve 25°C’de 10 dakika inkübasyon yapıldı. 10000 *xg*’de 4°C’de 10 dakika santrifüj sonrasında süzüntü

uzaklaştırıldı. Çökelti %75 etanolde çözündükten sonra, 6000 xg'de 4°C'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Üst sıvı atıldıktan sonra RNA molekülleri toplam 50µl hacim içerisinde destile su ile çözdürüldü.

3.3.3. RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi

Fungal örneklerden izole edilen total RNA moleküllerinin miktar ve saflık kontrolleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlendi. Bu amaçla RNA moleküllerinin 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçüldü. Tek iplikli RNA molekülü için 1 optik densite (OD) değeri 40 µg/ml'ye karşılık geldiği için RNA miktarları; "RNA (µg/ml)= $A_{260} \times \text{sulandırım katsayısı} \times 40$ " formülüne göre hesaplandı. Saflık kontrolünde 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerlerinin oranı (A_{260}/A_{280}) kullanıldı. Bu oran 1.9-2.1 arasında olduğu zaman ise RNA'nın saf olduğu kabul edilir (Maniatis ve diğ., 1982).

3.3.4. Total RNA Moleküllerinin Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen total RNA molekülleri %1'lik agaroz jel kullanılarak elektroforezle analiz edildi. Jelin derişimine göre tartılan agaroz, tris-asetat (TAE) tamponunda eritildi ve final konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür (10mg/ml) eklenerek jel kasetine döküldü (Tablo 3.4). RNA molekülleri katılan jele yükleme tamponu ile karıştırılarak uygulandı (Tablo 3.4). Örneklerin karşılaştırılabilmesi için boyutu bilinen 100 bç/1 kb standart DNA örnekleri (Thermo, Amerika) kullanıldı. Elektroforez 65 V sabit güç altında 1 saat 30 dakikada gerçekleştirildi. Elektroforez sonrası RNA molekülleri jel görüntüleme cihazı kullanılarak görüntülendi ve fotoğraflandı (Avegene, X-lite 200).

Tablo 3.4: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponların bileşenleri ve derişimleri.

Tampon	Bileşenler	Derişim
Tris-Asetat (TAE) Tamponu	Tris bazı	2 M
	Glisiyal asetik asit	1M
	EDTA (pH 8.0)	0,05 M
Elektroforez yükleme tamponu (6X)	Tris-HCl (pH 7.6)	10mM
	Bromofenol mavisi	% 0.03
	Xylene siyanol FF	% 0.03
	Gliserol	% 60
	EDTA	60 mM

3.3.5. cDNA Çevrimi

RT-PZR ve gerçek zamanlı PZR uygulamasında kullanılmak üzere hazırlanacak cDNA molekülleri total RNA moleküllerinden iki aşamada sentez edildi. Birinci aşamada tek iplikli cDNA sentezi için 5 µl RNA (200 ng/µl), 2 µl rasgele hekzamer karışımı (10mM) 11.4 µl hacim içerisinde bir araya getirilip bileşenler 65°C’de 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda karışım üzerine 2x revers transkripsiyon tamponu, 0.2 U/µl RNaz protektör inhibitörü, 1mM dNTP karışımı, 1x DTT ve 1 U/µl revers transkriptaz enzimi eklendi ve tüpler önce 55°C’de 30 dakika ardından 85°C’de 5 dakika inkübasyona bırakılmak suretiyle çift iplikli DNA sentezi ve mRNA moleküllerinin yıkımı tamamlandı.

3.3.6. F15 İzolatında *tri4* Anlatımının Gerçek Zamanlı PZR ile Belirlenmesi

F15 izolatında *tri4* gen anlatımı Sybr Green I temelli gerçek zamanlı PZR analizi ile kantitatif olarak belirlendi. PZR’nda kullanılacak primer çiftleri Primer3 yazılımı ile tasarlandı (www.frodo.wi.mit.edu³). Primerlerin self- veya hetero-dimer ve firkete yapı oluşturma olasılıkları “Olygoanalyser” yazılımı ile kontrol edildi (www.idtdna.com⁴). Gerçek zamanlı PZR için prob olarak Sybr Green I (Thermo, Amerika) kullanıldı. Bileşenler 1x PZR Sybr Green I karışımı, 10 pmol primerler, 1µg RNA’ya denk gelen miktarda cDNA olacak şekilde toplam 20 µl hacimde plaka içerisinde bir araya getirildi. Plaka Roche Light Cycler cihazına yerleştirildi. PZR koşulları 95°C’de 15 dakikalık bir ön denatürasyonunu takiben, 40 tekrardan oluşan 95°C’de 20 saniye, 58°C’de 30

³ www.frodo.wi.mit.edu [Ziyaret tarihi: 10 Nisan 2012]

⁴ www.idtdna.com [Ziyaret tarihi: 11 Nisan 2012]

saniye, 72 °C’de 10 saniye basamakları ile sağlandı. Erime eğrisi analizinde ise 95°C’de 5 saniye ve 65°C’de 1 dakikalık süreler uygulandı. Erime eğrisi analizleri ile özgün olmayan ürün ve primer dimerleri araştırıldı. Çalışmada “housekeeping” gen olarak β -*tubulin* geni endojen gen olarak seçildi. *tri4* ve β -*tubulin* genleri Tri4 ve FusTb1 primer çifti ile çoğaltıldı (Tablo 3.5). Hem hedef hem de referans gen için 1:1/1:4/1:16/1:64 oranlarında dört kat sulandırım serileri hazırlanarak standart grafikleri çizildi. İki gen için Cp (ing., “crossing point”) değerleri tüm deney setlerinde kaydedildi. $\Delta\Delta CT$ ve Log2 değerleri tüm örnekler için Livak ve Schmittgen (2001)’e göre hesaplandı. Kontrol grubu pozitif kalibratör olarak seçildi ve gen anlatımındaki oransal değişim değerleri saptandı. Denemeler en az üç tekrar halinde gerçekleştirildi.

Tablo 3.5: Gen anlatımı çalışmalarında kullanılan primer molekülleri.

Primer Seti	Primer Dizisi (5'-3')	Band Boyutu (bp)	PZR Tipi
Tri4/ileri	ATGGATGAAAGGCTCGAGGT	139	RT-PZR
Tri4/geri	ACTGTCGGTGCTTTTGACG		
FusTb1/ileri	GAAGCCATTGATGTTGTTTCGT	465	RT-PZR
FusTb1/geri	TCCGACCATGAAGAAGTGAAG		
Tri4/ileri	GCGAGAGGATACTGGTCGTC	63	Gerçek zamanlı PZR
Tri4/geri	AAGAAGCTCCGAGAGGAGTTG		
Tb1/ileri	GGTTTCCAAATCACCCACTC	61	Gerçek zamanlı PZR
Tb1/geri	TCAACAGGGTACCCATACCG		

3.3.7. F15 İzolatında *tri4* Gen Anlatımının RT-PZR ile Doğrulanması

Kantitatif gen anlatımı bulgularının doğrulanması amacıyla altı örneğin cDNA’sı kullanılarak RT-PZR uygulaması gerçekleştirildi. *tri4* ve β -*tubulin* genleri Tri4 ve FusTb1 primer çifti ile çoğaltıldı (bkz. Tablo 3.5). Genlerin çoğaltılmasında PZR bileşenleri final konsantrasyonları 1 µg total RNA molekülüne denk gelen cDNA, 1x PZR tamponu, 2.5 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTP karışımı, 10 pmol ileri ve geri primerler, 1 U *Taq* DNA polimeraz (Promega, Amerika Birleşik Devletleri) olacak şekilde 25 µl toplam hacimde bir araya getirildi. PZR koşulları 94°C’de 5 dakikalık bir ön denatürasyon, 35 tekrardan oluşan 94°C’de 45 saniye, 58°C’de 45 saniye, 72°C’de 45 saniyelik bir kademe ve 72°C’de 5 dakikalık bir final uzama olacak şekilde ayarlandı. RT-PZR çoğaltım ürünleri % 1.5’lik jelde kontrol edildi. Deneyler en az üç kere tekrarlandı.

3.3.8. Verilerin Analizi

3.3.1. alt başlığında belirtildiği şekilde oluşturulan deneme gruplarında *tri4* gen anlatımı değerleri kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldı. En yüksek gen anlatımı saptanan koşul gen anlatımının susturulması için uygun koşul olarak seçildi.

3.4. SUSTURMA ÇALIŞMALARINDA KULLANILACAK *F. graminearum* ve *F. culmorum* İZOLATLARININ SEÇİMİ

Fusarium graminearum ve *F. culmorum* türlerine ait 38 izolatin *tri4* ve *tri5* gen anlatım profilleri Taq-Man prob temelli gerçek zamanlı PZR ile araştırıldı. İzolatlarda *tri4* ve *tri5* genlerinin varlığı PZR ile gösterildi. Daha sonra tüm izolatlardan total RNA izolasyonu ve cDNA çevrimi yapıldı. Tasarlanan özgün primer ve prob molekülleri ile gen anlatımı incelendi ve iki tür için en yüksek düzeyde gen anlatımı yapan izolatlar seçildi.

3.4.1. *tri4*, *tri5* ve β -*tubulin* Genlerinin 38 İzolatin Genomunda PZR ile Çoğaltımı

Trikotesen üretimi ile ilişkili *tri4*, *tri5* genleri ile endojen gen olan β -*tubulin* geninin varlığı 38 izolatta PZR ile gösterildi.

3.4.1.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu optimum şartlarda üretilen yedi günlük fungal kültürlerin miselyumlarından CTAB (“Cetyl trimethylammonium bromide”) temelli klasik yöntemle gerçekleştirildi (Doyle ve Doyle, 1987). Bu amaçla 50 mg taze ağırlığa sahip miselyum sıvı azot ile toz hale getirildi ve 500 µl 2x CTAB tamponu (100 mM Tris, 20 mM EDTA [pH 8.0], 1.4 M NaCl, %2 CTAB, %1 PVP) eklenerek parçalama işlemine devam edildi. Sıvı homojenat 1.5 ml’lik mikrotüplere aktarıldı. 350 µl LiCl (8M) eklenen tüpler birkaç kez karıştırıldı. Karışıma 10 ng/µl olacak şekilde RNazA (10

mg/ml) eklenerek 37°C’de 1 saat inkübasyon yapıldı. Daha sonra tüplere 700 µl kloroform:izoamilalkol (24:1) eklendi ve karıştırıldı. 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra üst sıvı yeni mikrotüpe aktarıldı. Tüplere eşit hacimde kloroform:izoamilalkol (24:1) ilave edildi. 13000 rpm’de 1 dakika olarak gerçekleştirilen santrifüjün ardından üst sıvı yeni mikrotüpe aktarıldı. Üst faza 1/10 hacimde NaOAC (3M) ve 2 hacim soğuk etanol eklendi. Yavaşça karıştırılan tüpler -70°C’de 30 dakika bekletildi. Süre sonunda 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra üst sıvı döküldü. Tüpler 2 kere %70 etanolle yıkandı ve kurutma işlemi sonrasında DNA 50 µl destile suda çözündürüldü.

3.4.1.2. Genomik DNA’nın Nicel ve Nitel Analizi

Genomik DNA miktarı ve saflığının belirlenmesinde spektrofotometrik yöntemden faydalanıldı (bkz. 3.3.4). Çift iplikli DNA molekülü için 1 OD değeri 50µg/ml’ye karşılık geldiği için DNA miktarı [miktar= $A_{260} \times 50 \times \text{sulandırım faktörü}$] formülüne göre hesaplandı. Genomik DNA molekülleri derişimi 10 ng/µl olacak şekilde ayarlandı. Genomik DNA molekülleri %1’lik agaroz jel elektroforezi ile 3.3.4.’te belirtildiği gibi analiz edildi.

3.4.1.3. Genomik DNA’nın PZR ile Çoğaltımı ve Analizi

tri4, *tri5* ve *β-tubulin* genleri PZR ile tüm izolatlarını genomik DNA’larında çoğaltıldı. Bu amaçla PZR bileşenleri final konsantrasyonları 50 ng genomik DNA, 1x PZR tamponu, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM dört çeşit dNTP, 5 pmol ileri ve geri primerler (Tablo 3.6), 1 U *Taq* DNA polimeraz (Promega) olacak şekilde 25 µl toplam hacimde bir araya getirildi. PZR koşulları 94°C’de 5 dakikalık bir ön denatürasyon, 30 tekrardan oluşan 94°C’de 45 saniye, 58°C’de 45 saniye, 72°C’de 45 saniyelik bir kademe ve 72°C’de 5 dakikalık bir final uzama olacak şekilde ayarlandı. Amplikonlar %1.5’lik agaroz jelde görüntülendi (bkz. 3.3.4.). PZR analizleri en az üç kez gerçekleştirildi.

Tablo 3.6: 38 izolatta *tri4*, *tri5* ve β -*tubulin* genlerinin çoğaltımında kullanılan primerler.

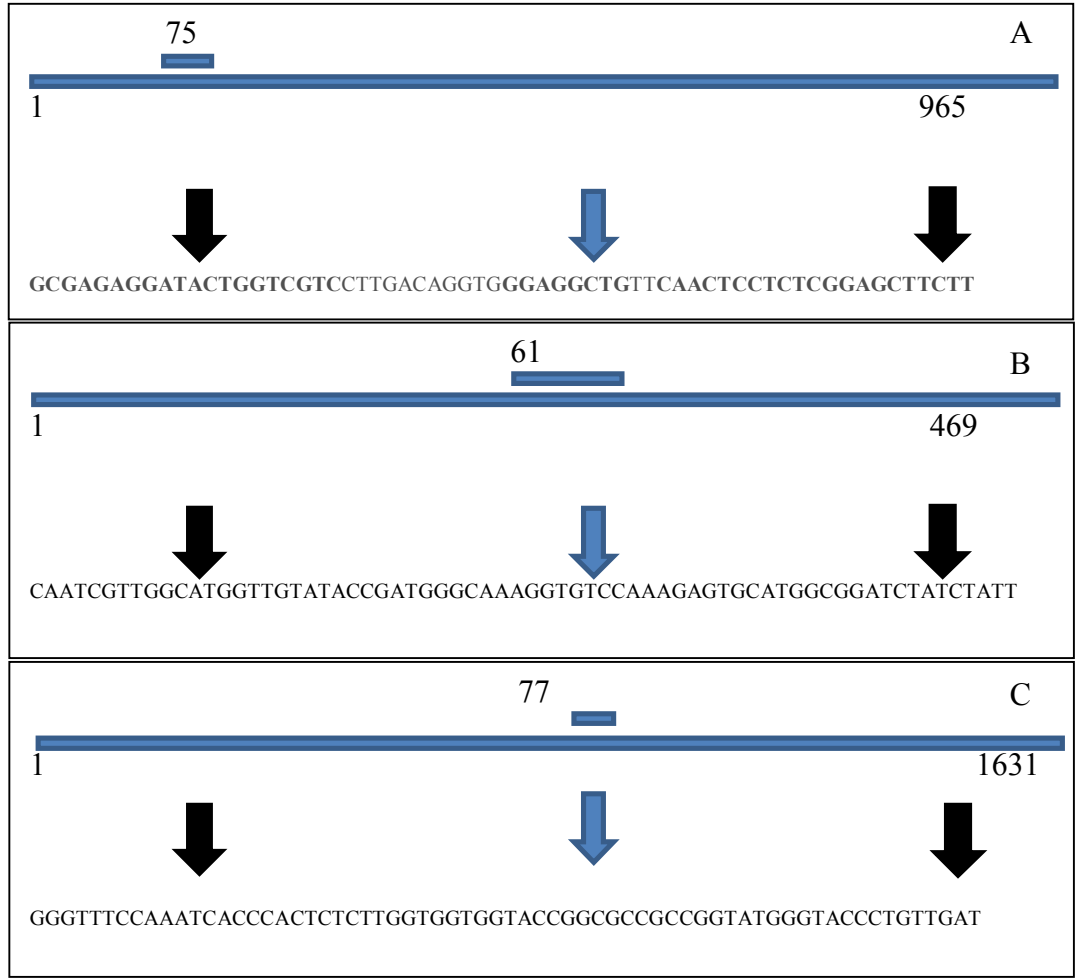
Primer	Primer Dizisi (5'-3')	Band Boyutu (bp)
Tri4ileri	ATGGATGAAAGGCTCGAGGT	139
Tri4geri	ACTGTCGGTGCTTTTGACG	
Tox51	GCTGCTCATCACTTTGCTCAG	658
Tox52	CTGATCTGGTCACGCTCATC	
FusTbileri	GAAGCCATTGATGTTGTTTCGT	465
FusTbigeri	TCCGACCATGAAGAAGTGAAG	

3.4.2. En Yüksek *tri4* ve *tri5* Gen Anlatımı Yapan İzolatların Belirlenmesi

3.4.2.1. Primer ve TaqMan Prob Tasarımı

tri4 ve *tri5* genlerinin gerçek zamanlı PZR ile anlatım miktarlarının belirlenmesi ve RT-PZR'la kontrolünde kullanılacak primer ve TaqMan probları “Roche Probe Library “ sayfası üzerinden tasarlandı (www.roche-applied-science.com)⁵). Bu amaçla National Center for Biotechnology Information (NCBI) veritabanında kayıtlı *F. graminearum* türüne ait AY102584.1 aksesyon numaralı dizilim bilgisi her iki gen için de kullanıldı. Gen anlatım profillerinin normalizasyonunda kullanılmak üzere seçilen endojen kontrol β -*tubulin* geni için de FJ536863.1 aksesyon numaralı dizilim bilgisi seçildi. Tasarım için “Roche Prob Library” çevrimiçi biyoinformatik aracından yararlanıldı. Primer molekülleri için iki ölçüt; Tm derecesi 60°C, PZR ürün boyutu 60-70 bp, temel alındı (Şekil 3.2).

⁵ www.roche-applied-science.com [Ziyaret tarihi: 25 Nisan 2012]



Şekil 3.2: *tri4* (A), *tri5* (B) ve β -*tubulin* geni (C) için tasarlanan primer ve prob molekülleri. Mavi oklar probları, siyah oklar primer çiftlerini göstermektedir.

tri4, *tri5* ve β -*tubulin* gen anlatım profillerinin doğrulanması için gerçekleştirilecek RT-PZR uygulamalarında kullanılacak olan primer moleküllerinin tasarımı ve kontrolü 3.3.6.'da belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Tablo 3.7 gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan primer setleri ve prob moleküllerini göstermektedir.

Tablo 3.7: Gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan primerler.

Primer/Prob	Primer Dizisi (5'-3')	Prob (5'FAM-3'BHQ1) Dizisi	Band Boyutu (bp)
Tri4F	GCGAGAGGATACTGGTCGTC	-	63
Tri4R	AAGAAGCTCCGAGAGGAGTTG	-	
Prob4	-	GGAGGCTG	
Tri5F	CAATCGTTGGCATGGTTGTA	-	62
Tri5R	ATAGATCCGCCATGCACTCT	-	
Prob5	-	CTGGGCAA	
Tblileri	GGTTTCCAAATCACCCACTC	-	61
Tblgeri	TCAACAGGGTACCCATACCG	-	
ProbT	-	GGTGGTGG	

3.4.2.2. RNA İzolasyonu ve cDNA Kitaplıklarının Kurulması

Fusarium graminearum türüne ait 14, *F. culmorum*'a ait 24 izolat 7 gün süre ile PDA besi ortamında *in vitro* üretildi. İzolatlardan total RNA molekülleri 3.3.2.'de belirtildiği gibi izole edildi. Nicel ve nitel analizleri (bkz. 3.3.3. ve 3.3.4.) yapılan total RNA moleküllerinin cDNA çevrimi 3.3.5'te verilen protokole göre gerçekleştirildi.

3.4.2.3. *Fusarium* İzolatlarında *tri4*, *tri5* ve β -tubulin Genlerinin Gerçek Zamanlı PZR Analizi

Toplam 38 *Fusarium* izolatında *tri4*, *tri5* gen anlatımı endojen genin (β -tubulin) anlatımı ile birlikte gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak analiz edildi. Gerçek zamanlı PZR uygulamasında prob olarak tasarlanan tek boya işaretli TaqMan UPL probları (Roche, İsviçre) kullanıldı. Bileşenler 1µg RNA molekülüne denk gelen miktarda cDNA, 1x prob karışımı, 5 pmol ileri ve geri primerler, 5 pmol prob olacak şekilde toplam 20 µl hacimde plaka içerisinde bir araya getirildi. Plaka 1500 xg'de 2 dakika santirfüj yapıldıktan sonra Roche Light Cycler cihazına yerleştirildi. Cihazda belirleme formatı olarak tek renkli hidroliz prob seçeneği işaretlendi. PZR koşulları 95°C'de 10 dakika süre ile gerçekleştirilen ilk denatürasyonu takiben 45 tekrardan oluşan 95°C'de 10 saniye, 58°C'de 10 saniye, 72°C'de 10 saniye bekleme süresinden ve son olarak da 40°C'de 30 saniyelik soğutma aşamasından oluşmaktadır. Örnekler için isim ve niteliklerin (referans, standart ve hedef) atanmasının ardından hem referans hem de hedef gen anlatımları için ayrı ayrı 1:1/1:4/1:16/1:64 sulandırım oranlarında standart örnekler oluşturuldu. Reaksiyon tamamlandıktan sonra Cp değerleri belirlendi ve standart grafikler çizildi. Hedef ve referans Cp değerleri karşılaştırılarak $\Delta\Delta CT$ değerleri elde edildi ve en yüksek gen anlatımı yapan izolatlar seçildi. Gen anlatımı

çalışmaları en az üç kere tekrarlandı.

3.4.2.4. *tri4*, *tri5* ve β -tubulin Gen Anlatımının RT-PZR ile Kontrolü

tri4 ve *tri5* anlatımının doğrulanmasında RT-PZR yöntemi kullanıldı. Bileşenler konsantrasyonları 1x PZR tamponu, 0.25 mM dNTP karışımı, 10 pmol ileri ve geri primerler (Tablo 3.8), 2.5 mM MgCl₂, 1 µg RNA'ya denk gelen cDNA ve 1 U Taq polimeraz enzimi (Promega, Amerika Birleşik Devletleri) olacak şekilde toplam 25 µl hacimde bir araya getirildi. Çoğaltım, 94°C'de 5 dakikalık ön denatürasyonu takiben 35 tekrardan oluşan 94°C'de 30 saniye, 58°C'de 30 saniye ve 72°C'de 1 dakika basamakları ile tamamlandı. Süreç 72°C'de 5 dakikalık final uzama basamağı ile tamamlandı. Çoğaltım ürünleri %1.5'lik agaroz jel kullanılarak 3.3.4'te belirtilen şekilde elektroforezle analiz edildi. RT-PZR ile çoğaltım üç kere gerçekleştirildi.

Tablo 3.8: RT-PZR çalışmalarında kullanılan primer molekülleri.

Primer	Primer Dizisi (5'-3')	Band Boyutu (bp)
Tri4ileri	ATGGATGAAAGGCTCGAGGT	139
Tri4geri	ACTGTCGGTGCTTTTGACG	
Tox51	GCTGCTCATCACTTTGCTCAG	658
Tox52	CTGATCTGGTCACGCTCATC	
FusTbileri	GAAGCCATTGATGTTGTTTCGT	465
FusTbigeri	TCCGACCATGAAGAAGTGAAG	

3.5. *tri4* ve *tri5* GENLERİNİN NUKLEOTİD DİZİLİMLERİNİN *F. graminearum* 4F, *F. culmorum* 9F VE 20F İZOLATLARINDA BELİRLENMESİ

Gen susturma çalışmalarında kullanılmak üzere en yüksek düzeyde trikotesen gen anlatımının belirlendiği üç izolatın (*F. graminearum* 4F, *F. culmorum* 9F ve 20F) *tri4* ve *tri5* genlerinin nukleotid dizilim bilgileri belirlendi. Bu amaçla öncelikle izolatlardan tam boydaki *tri4* ve *tri5* gen ürünleri PZR ile çoğaltıldı. Ardından çoğaltım ürünleri ticari vektör (pGEM-T Easy, Promega) aracılığıyla klonlanarak dizilendi.

3.5.1. Tam Boydaki *tri4* ve *tri5* Genlerinin PZR ile Çoğaltımı

Tam boydaki *tri4* ve *tri5* genlerinin çoğaltımında kullanılacak primer moleküllerinin tasarımı altı ırka ait dizi bilgilerinin (AY102584.1; AY102605.1; AY102603.1; AY102602.1; AY102571.1) CLUSTALW analizinden sonra herhangi bir program kullanılmaksızın (3.4.2.1'e göre) gerçekleştirildi (Tablo 3.9). 4F, 9F ve 20F izolatlarına ait genomik DNA molekülleri 3.4.2.'de belirtildiği şekilde izole edildi. Tam boydaki *tri4* geninin çoğaltılmasında Tri4FULLF/R, *tri5* geninin çoğaltılmasında ise Tri5FULLF/R primer çiftleri kullanıldı. Ayrıca *tri4* gen boyutu 1.5 kb'nin üzerinde olduğundan; tam boyda dizilim verilerine ulaşmak için Tri4FULLF/R primer çiftinin yanı sıra M13pUCF/R klonlama primer çifti ve gen içi ek primerler (Tri4geri, Tri4ClaIF) de çalışmaya dahil edildi. Toplam 25 µl hacimde gerçekleştirilen PZR'unda bileşenler final konsantrasyonları: 50 ng DNA, 1x PZR tamponu, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM dört çeşit dNTP, 10 pmol ileri primer, 10 pmol geri primer, 1 U *Taq* DNA polimeraz olacak şekilde bir araya getirildi. İki genin çoğaltımında PZR koşulları; 94°C'de 5 dakikalık bir ön denatürasyon sonrası, 30 tekrardan oluşan 94°C'de 45 saniye, 53°C'de 45 saniye, 72°C'de 2 dakikalık uygulamaları ve 72°C'de 20 dakikalık bir final uzama aşamasını kapsamaktadır. Denemeler en az üç kez tekrarlandı.

Tablo 3.9: Nukleotid dizilimi belirlenecek *tri4* ve *tri5* genlerinin çoğaltımında ve dizilenmesinde kullanılan oligonukleotidler.

Primer	Primer Dizi (5'-3')	Hedef Gen	Band boyutu (bp)
Tri4FULLF	TTACAAAGCCTTGAGAACCCTTGACT	<i>tri4</i>	1741
Tri4FULLR	ATGATTGACCAAGATTGGATC		
Tri5FULLF	ATGGAGAACTTTCCACCGAGTATT	<i>tri5</i>	1187
Tri5FULLR	TTACTCCACTAGCTCAATTGA		
M13pUCF	CAGGAAACAGCTATGAC	M13	200-3000
M13pUCR	GTTTTCCCAGTCACGAC		
Tri4geri	ACTGTCGGTGCTTTTGACG	<i>tri4</i>	139
Tri4ClaIF	AGCATCGATTGGGACCAAAAGCAA	<i>tri4</i>	540

3.5.2. Çoğaltım Ürünlerinin *E. coli* DH5α Suşuna Transformasyonu

Üç izolata ait *tri4* ve *tri5* genleri *E. coli* DH5α ırkına pGEM-T Easy vektörü aracılığıyla klonlandı. Öncelikle transformasyona yeterli *E. coli* hücreleri elde edildi. *tri4* ve *tri5* genleri pGEM-T Easy vektörüne bağlandıktan sonra transformasyon gerçekleştirildi. Seçilen transformantlardan izole edilen plazmidler dizilemeye gönderildi.

3.5.2.1. Transformasyona Yeterli Hücre Eldesi

tri4 ve *tri5* genlerinin transformasyonunda kullanılacak *E. coli* DH5 α ırkına ait bakteri hücreleri CaCl₂ yöntemi ile (Cohen ve diğ., 1972) yeterli (kompetan) hale getirildi. Bu amaçla 37°C’de inkübasyona bırakılmış bir gecelik taze *E. coli* kültürünün 0.5 ml’si 50 ml LB besi ortamına ekildi ve 37°C’de 16 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hücre yoğunluğunu belirlemek amacıyla yarım satte bir 600 nm dalga boyundaki absorpsiyon değeri ölçüldü. OD₆₀₀ değeri 0.3-0.4 aralığına ulaştığında işlem tamamlandı. Kültürün tamamı 50 ml’lik tüpe alındı ve tüp 10 dakika buzda bekletildi. 4°C’de 7000 rpm hızda 3 dakika yapılan santrifüj sonrası pellet üzerine 10 ml CaCl₂ (0.1 M) eklendi. Çözelti 30 dakika buzda bekletildi. Santrifüj işleminden (4°C’de 7000 rpm’de 3 dakika) sonra pellet 2 ml 0.1 M CaCl₂’de çözülüp +4°C’de 18 saate kadar saklandı.

3.5.2.2. Çoğaltım Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu

Transformasyonda ticari klonlama vektörü olan doğrusal pGEM-T Easy (Promega) vektörü kullanıldı. Ligasyon işleminde bileşenler final konsantrasyonları; 50 ng doğrusal vektör (1 μ l), 1x ligasyon tamponu (5 μ l), 150 ng PZR ürünü (1 μ l), 10U T4 DNA Ligaz (1 μ l) olacak şekilde toplam 10 μ l hacimde bir araya getirildi. Ligasyon karışımı 1 saat 22°C’de inkübe edildi.

3.5.2.3. Transformasyon

Transformasyona yeterli 200 μ l hücre süspansiyonu üzerine 10 μ l ligasyon karışımı eklendi ve örnekler 30 dakika buzda bekletildi. 42°C’de 90 saniye inkübasyon sonrasında örnekler tekrar 2 dakika buza alındı. 37°C’ye ısıtılmış SOC besi ortamının 800 μ l’si karışıma eklendi ve 37°C’de 30-90 dakika çalkalamalı etüvde inkübasyon yapıldı.

3.5.2.4. Transformantların Seçimi

Transformasyon sonrası elde edilen kültürün 100-200 µl'si ampisilin (50µg/ml), X-Gal (40µg/ml) ve IPTG (0.1 mM) içeren LBA besi ortamına ekilerek 37°C'de bir gece üremeye bırakıldı. Süre sonunda katı besi ortamında üreyen beyaz kolonilerden kürdan yardımıyla alınan bakteri hücreleri ampisilin (50µg/ml) içeren seçici LB besi ortamında 37°C'de, 180 rpm hızdaki çalkalamalı inkübatörde bir gece bırakıldı. Bir gecelik sıvı kültürler plazmid izolasyonunda kullanıldı.

3.5.2.5. Plazmid İzolasyonu

Ampisilin, X-Gal ve IPTG içeren LBA besi ortamında üreyen transformasyonun gerçekleştiği düşünülen beyaz kolonilerden plazmid molekülleri alkali SDS yaklaşımına göre (Bimboim ve Doly, 1979) izole edildi. Bu amaçla beyaz koloniler ampisilin içeren LB besi ortamında bir gece üremeye bırakıldı. Taze bakteri kültürü mikrosantrifüjde 7000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edildi. Toplanan *E. coli* hücreleri 100 µl soğuk lizis tamponu (Tablo 3.10) içinde süspansiyon haline getirildi. Karışımın üzerine 20 µl (10mg/ml) RNazA eklendi. 65°C'de 20 dakika bekledikten sonra 200 µl alkali SDS solüsyonu ilave edildi. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek hücrelerin parçalanması ve kromozomal DNA'nın denatürasyonu sağlandı. Parçalanmış hücrelerden oluşan lizat üzerine 4°C'de soğutulmuş 150 µl 5M potasyum asetat eklendi ve tüpler 30 dakika bekletilmek üzere buza alındı. Süre sonunda 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı ve üst sıvı temiz tüpe alındı. Üzerine 1 ml saf etanol eklenen tüpler 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 13000 rpm hızda 20 dakika oda sıcaklığında santrifüj yapılarak plazmid DNA'sı çöktürüldü. Üst sıvı atıldı, plazmid DNA'sı 50 µl distile suda çözüldü. İzole edilen plazmidler 3.3.3. ve 3.3.4.'te belirtildiği gibi nicel ve nitel olarak analiz edildi.

Tablo 3.10: Plazmid izolasyonunda kullanılan çözeltiler.

Çözelti	Bileşenler	Final Konsantrasyon
Lizis tamponu	Glikoz	50 mM
	Tris-Cl	25 mM
	EDTA	10 mM
SDS tamponu	NaOH	0.2 N
	SDS	%0.1
Potasyum asetat	Potasyum asetat	%29.4
	Glisiyal asetat	%5.75

3.5.2.6. Plazmidin Taşıdığı *tri4* ve *tri5* Genlerinin PZR ile Çoğaltımı ve Analizi

Tam boydaki *tri4* ve *tri5* genlerinin aktarıldığı bakterilerden izole edilen plazmidlerde genlerin varlığı PZR ile belirlendi. Toplam 25 µl hacimde gerçekleştirilen PZR’unda bileşenler final konsantrasyonları: 50 ng DNA, 1x PZR tamponu, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM dört çeşit dNTP, 10 pmol ileri ve geri primerler, 1 U *Taq* DNA polimeraz olacak şekilde bir araya getirildi. İki genin çoğaltımında PZR koşulları; 94°C’de 5 dakikalık bir ön denatürasyon sonrası, 30 tekrardan oluşan 94°C’de 45 saniye, 53°C’de 45 saniye, 72°C’de 2 dakikalık uygulamaları ve 72°C’de 20 dakikalık bir final uzama aşamasını kapsamaktadır.

3.5.2.7. Dizileme

Transformasyon sonrası M13pUCF/R primer çifti ile çoğaltılan PZR ürünleri ve/veya izole edilen plazmid molekülleri “Bigdye cycle sequencing” (Applied biosystems, Amerika Birleşik Devletleri) kiti kullanılarak Sanger yöntemine göre “ABI PRISM 3100 Genetic Analyser” cihazında hizmet alımı şeklinde dizilendi. Dizileme sırasında Tablo 1N’de belirtilen primerler kullanıldı. Tam boydaki *tri4* geni 1.7 kb boyutunda olduğu için dizileme sırasında gen içi bölgelere özgün bir primer çifti (Tri4geri ve Tri4ClaIF) de kullanıldı. Dizileme verileri elde edilen örnekler, NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanı kullanılarak BLASTN analizine tabi tutuldu. Her bir PZR ürününün nukleotid dizisi bilgisayar ortamında “Chromas Pro” yazılım programı kullanılarak analiz edildi. Bu yazılım programı ile PZR ürünlerinin nukleotid dizileri, her bir nukleotidin bir sinyal piki ile ifade edildiği grafikler halinde görüntülendi. Veritabanında, ilgili dizinin ardışık şekilde (n’li sayıda; 4’lü ve 6’lı) bölünerek belli bir eşik değerinin üstünde olan kısımlarından sadece özgün şekilde yüksek benzerlik gösteren eşleşmeleri Smith-Waterman algoritma skor matrisine göre BLAST algoritmasında hesaplandı. Dizi analizinde en yüksek piki veren nukleotid dizi kısımları ilgili dizi ve ait olduğu organizma belirtilecek şekilde (FASTA formatında) BLAST yardımıyla veritabanında arandı. BLAST’la elde edilen hizalamalara göre homoloji gösteren bölgelerin rastgele olup olmadığı istatistiksel açıdan da BLAST tarafından değerlendirildi. Evrimsel düzeyde meydana gelen değişimlerden insersiyon

ve delesyonların bulunduğu bölgelerin değerlendirmeye alınmaması için, nukleotidlerin görülme olasılıklarının maksimum değeri alınarak “Gumble Extreme Value Distribution” (EVD) formülüne göre benzerlik değeri (S) ile üssel ilişkili olan, beklenen değeri (e) hesaplandı (Pertsemlidis ve Fondon, 2001; Villareal ve diğ., 2005). Her bir PZR ürünü için dizilerin tam boyda taşındığı parçalarda, benzerliğin kararlı olduğunu ifade eden e değerleri taranarak 0,05’ten küçük olanlar seçildi. Bir önceki çevrimde meydana gelen hataların en aza indirilebilmesi için S değerinin logaritmaları alınarak Bit değerleri belirlendi (Altschul ve diğ., 1997). Bu şekilde çoğaltılan PZR ürünleri ile homoloji gösteren, evrimsel ölçekte çeşitli organizmalarda en fazla korunmuş olan bölgeler seçilmiş oldu. Ayrıca dizileme hizmeti çift yönlü gerçekleştirildiğinden, bir program kullanmaksızın birleştirme işlemi yapılarak tam boyda gen dizileri araştırıldı. Dizilim bilgileri elde edildikten sonra, çalışmada kullanılacak siRNA moleküllerinin dizilimleri ile ikili nukleotid benzerlikleri karşılaştırıldı. Elde edilen dizilim bilgilerine aksesyon numarası alınması için NCBI’ya başvuru gerçekleştirildi. Bu amaçla Sequin programı kullanıldı. Programda *tri4* ve *tri5* genlerine ait veriler açık okuma çerçevesi, ekzon/intron ve mikrosatellit bölge analizleri yapıldıktan sonra veritabanına yükleme yapıldı.

3.6. PROTOPLAST KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI

Gen susturma çalışmalarında siRNA moleküllerinin transfeksiyonu *Fusarium* türlerinden izole edilen protoplastlarda gerçekleştirildi. Protoplast üretiminde *tri4* ve *tri5* gen anlatımına göre seçilen *F. graminearum* 4F, *F. culmorum* 9F ve 20F izolatları kullanıldı. β -1,3 glukan ve kitince zengin glikoproteinden oluşan hücre duvarı yapısı Kadotani ve diğ. (2003) tarafından geliştirilen enzimatik yöntemle yıkılarak protoplastlar elde edildi.

3.6.1. Parçalama

Protoplast üretiminde litik enzim (EC: 1278/2008, Sigma, Almanya) kullanıldı. Toz haldeki litik enzim parçalama tamponunda (10 mM Na₂HPO₄, 1.2 MgSO₄, pH 5.8)

3.7.1. İzolatlarda Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi

siRNA transfeksiyonunda kullanılacak yardımcı plazmid *hph* direnç geni taşıdığı için higromisin B antibiyotiğine dirençli olmadığı bilinen üç *Fusarium* izolatının üremesini baskılayan en düşük antibiyotik konsantrasyonu araştırıldı. Bu amaçla 4F, 9F ve 20F izolatları farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 75, 100 µg/ml) Higromisin B içeren PDB besi ortamında 7 gün boyunca kültürlendi. Hücre yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda görünür ışık absorbanısı ölçülerek belirlendi. Kontrole göre OD₆₀₀ değerleri karşılaştırılarak her bir izolat için üremeyi engelleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu saptanarak antibiyotik direnci hakkında bilgi edinildi.

3.7.2. siRNA Molekül Tasarımı

Trikotesen üretimi ile ilişkili *tri5* gen kümesinde yer alan *tri4* ve *tri5* genlerinin susturulmasında kullanılacak sentetik siRNA molekülleri tasarımı Barnes ve diğ. (2008) tarafından izlenen metodoloji modifiye edilerek gerçekleştirildi. Bu amaçla susturulacak genlerin nukleotid dizilimleri NCBI veritabanında araştırıldı. *Fusarium graminearum* ve *F. culmorum* türlerine ait üçer referans ırkın (AY102584.1; AY102605.1; AY102603.1; AY102602.1; AY102571.1) *tri4* ve *tri5* gen dizilimleri ve 3.5'te verilen protokolle belirlenen 4F, 9F ve 20F izolatlarının *tri4* ve *tri5* gen dizilim bilgileri siRNA tasarımında kullanıldı. Referans ırklara ve çalışmada kullanılan üç izolata ait dizilimler ClustalW analizine tabi tutuldu. Genlerin ekzon bölgelerindeki identik dizilimler belirlenerek siRNA moleküllerinin tasarımında hedef bölge olarak seçildi. Invitrogen firmasına ait "BlockIt RNAi designer" biyoinformatik aracı (www.rnadesigner.invitrogen.com/rnaiexpress⁶) kullanılarak *tri4* geni için dört ekzona ait, *tri5* geni için ise iki ekzona ait nukleotid dizilimleri veritabanındaki "siRNA tasarım" kutularına yüklendi. Potansiyel siRNA moleküllerinin başlangıç ve bitim noktaları ele alınarak bu moleküllere ait dizilimlerin, ClustalW analizlerindeki identik bölgelere karşılık gelenleri seçildi. Toplamda her ekzon için birer tane olmak üzere 6 adet çift iplikli siRNA molekülü tasarlandı (Tablo 3.11).

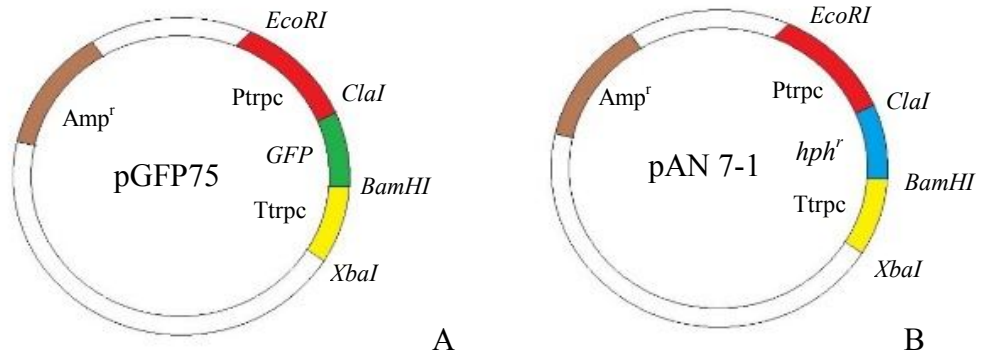
⁶ www.rnadesigner.invitrogen.com/rnaiexpress [Ziyaret tarihi: 12 Ocak 2013]

Tablo 3.11: Çalışmada kullanılan siRNA molekülleri.

siRNA	Hedef Gen	Ekzon	Hedef Dizi (5'-3')	siRNA Boyutu (bç)
Tri4E1	<i>tri4</i>	1	ACAATACGGGCGTGAGTCATGTCAA	25
Tri4E2	<i>tri4</i>	2	GAACCCTGAGAGAAGTTGGTGATGT	25
Tri4E3	<i>tri4</i>	3	ACATGCTCCTTGTACTTCAAGTTCT	25
Tri4E4	<i>tri4</i>	4	CATCTTGGAGATCTCCCAGAGAT	23
Tri5E1	<i>tri5</i>	1	AAGCGACTACAGGCTTCCCTCCAAA	25
Tri5E2	<i>tri5</i>	2	CAGGATCTGATGACTACCCTCAATT	25

3.7.3. Transfeksiyonda Kullanılan Yardımcı Plazmidler

Gen susturma çalışmalarında çift iplikli siRNA molekülleri ticari transfeksiyon ürünü (X-treme GENE siRNA Transfection Reagent; Roche, İsviçre) aracılığıyla protoplastlara aktarıldı. Transfeksiyonun gerçekleştiği hücrelerin seçiminin antibiyotik direnç geni (higromisin B fosfotransferaz geni; *hph*) aracılı, transformasyon frekansının “green” floresan protein geni *GFP* aracılı gerçekleştirilebilmesi için pAN 7-1 ve pEGFP75 plazmidleri yardımcı plazmidler olarak kullanıldı. *Hph* içeren pAN 7-1 plazmid, Prof. Dr. Peter J. Punt’tan (Leiden Üniversitesi, Moleküler Mikrobiyoloji ve Biyoteknoloji Bölümü) temin edildi. *GFP* geni içeren pEGFP75 plazmid ise Dr. Hitoshi Nakayashiki’den (Kobe Üniversitesi, Bitki Patolojisi ve Mikrobiyoloji Bölümü) sağlandı. Plazmid haritaları Şekil 3.3’te sunulmaktadır. Bu plazmid molekülleri transfeksiyon işleminden önce *E. coli* DH5α suşunda üretildi.

**Şekil 3.3:** (A) pEGFP75 ve (B) pAN 7-1 yardımcı plazmidlerinin haritaları.

3.7.3.1. Yeterli Hücre Eldesi ve Transformasyon

pAN 7-1 ve pEGFP75 plazmidlerinin çoğaltılacağı ampisiline duyarlı *E. coli* DH5 α hücreleri 3.5.2.1.'de belirtildiği gibi transformasyona yeterli hale getirildi. Yardımcı plazmidlerin 1 μ g'ı 3.5.2.2 'de verilen protokolle bakteri hücrelerine aktarıldı.

3.7.3.2. Transformantların Seçimi

Transformantların seçiminde antibiyotiğe duyarlı DH5 α hücreleri transformasyondan sonra ampisilin antibiyotiği (50 μ g/ml) içeren LBA besi ortamına ekilerek 37°C'de 1 gece üremeye bırakıldı. Direnç geni taşıyan pAN 7-1 ve pEGFP75 plazmidlerini alan kolonileri üremesi izlenerek ön seçim tamamlandı.

Kültürden rastgele seçilen 5'er kolonide transformasyon, pAN 7-1 plazmidini alanlarda *hph* geni, pEGFP75'i alan hücrelerde *GFP* geni PZR ile çoğaltılarak doğrulandı. Koloni PZR'nda pAN 7-1 vektörüne özgün HYGF/R primerleri ve pEGFP75 vektörüne özgün GFPP/R primer çifti kullanıldı (Tablo 3.12). Primer molekülleri genin bütününe çoğaltacak şekilde manuel olarak tasarlandı. Bileşenler 2 μ l bakteri hücresi, 1x PZR tamponu, 0.1 mM dört çeşit dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 5 pmol ileri ve geri primerler, 1 U *Taq* DNA polimeraz olmak üzere toplam 20 μ l hacimde bir araya getirildiler. PZR 94°C'de 45 saniye, 53°C'de 45 saniye, 72°C'de 45 saniye uygulamalarının 25 kez tekrarlanması ile gerçekleştirildi. Çoğaltım ürünleri %1.5'lik agaroz jelde kontrol edildi (bkz. 3.3.7).

Tablo 3.12: pAN 7-1 ve pEGFP75 vektörlerinin taşıdığı direnç genlerinin koloni PZR ile çoğaltımında kullanılan primer çiftleri.

Primer Seti	İleri Primer Dizi (5'-3')	Geri Primer Dizi (5'-3')	Hedef Gen	Band Boyutu (bp)
HYGBF/R	ATTCGGAAGTGCTTGACAT	ATTTGTGTACGCCCGACAGT	<i>hygB</i>	707
GFPPF/R	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	TTACTTGTACAGCTCGTCCA	<i>GFP</i>	720

3.7.3.3. Plazmid İzolasyonu ve Plazmidlerin Doğrulanması

hph ve *GFP* genleri çoğaltılan bakteri klonlarından 3.5.2.3'te belirtildiği gibi izole edilen plazmidler kalitatif ve kantitatif olarak analiz edildi (bkz. 3.3.3 ve 3.3.4). Elde edilen plazmidler restriksiyon endonukleazı kesimi ve PZR ile çoğaltım olmak üzere iki farklı yaklaşımla doğrulandı. pAN 7-1 plazmidi için tek noktada kesim yapan *EcoRI* restriksiyon endonukleazı, pEGFP75 plazmidi için de *XbaI* endonukleazı kullanıldı. Kesim işlemi, 1x kesim tamponu, 1 µg plazmid DNA'sı, 10 U restriksiyon endonukleaz olacak şekilde toplam 20 µl hacimde 37°C'de 2 saatte gerçekleştirildi. Reaksiyonun durdurulması için örnekler 65°C'de 10 dakika bekletildi. Kesim ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (bz. 3.3.4). pAN 7-1 plazmidinde taşınan *hph* geni ve pEGFP75'te taşınan *GFP* geninin çoğaltıldığı PZR'nda Tablo NM'de verilen primer molekülleri kullanıldı. Genlerin çoğaltılmasında bileşenler final konsantrasyonları 50 ng plazmid DNA, 1x PZR tamponu, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTP karışımı, 5 pmol ileri ve geri primerler, 1 U *Taq* DNA polimeraz olacak şekilde 25 µl toplam hacimde bir araya getirildi. PZR koşulları 3.7.3.2'den farklı olarak ön denatürasyon (94 °C'de 3 dakika) ve son uzama (72 °C'de 5 dakika) aşamalarını içermektedir. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (3.3.7).

3.7.4. Plazmid Moleküllerinin Birlikte Aktarıldığı siRNA Transfeksiyonu

Doktora tez projesi kapsamında *F. graminearum* 4F, *F. culmorum* 9F ve 20F izolatlarında *tri4* ve *tri5* genlerinin siRNA aracılı transfeksiyonla susturulmasında pAN 7-1 ve pEGFP75 yardımcı vektörleri olarak kullanıldı. pAN 7-1 gen susturulmuş örneklerde gen anlatımı analizinin gerçekleştirilebilmesi için seçilirken pEGFP75 transfeksiyon işlemlerinin izlenmesi ve doğrulanması amacıyla tercih edilmiştir.

siRNA moleküllerinin transfeksiyon ajanı (X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent) ile protoplast kültürlerine aktarıldığı çalışmada öncelikle 3.2.3'te belirtildiği yöntemle 4F, 9F ve 20F izolatlarının 1 haftalık protoplast kültürleri kuruldu. Transformasyon 5x10⁴ sayıda protoplast içeren 800µl'lik STC kültürü ile başlatıldı (bkz. 3.6.3). Transfeksiyon plazmid moleküllerinin birlikte aktarımı ile gerçekleştirildi. Bu amaçla 150 pmol siRNA molekülü (15 µl) 1 µg plazmid (5 µl) ile 1x transfeksiyon ajanında (100 µl) bir araya getirildi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Süre

sonunda 120 µl hacimdeki karışım 5×10^4 sayıda protoplast içeren solüsyon ile iyice karıştırıldıktan sonra pAN 7-1 plazmidi için 25 µg/ml higromisin B içeren, pEGFP75 için standart PDB besi ortamına aktarıldı. Örnekler bir hafta süre ile oda sıcaklığında 160 rpm hızda çalkalamalı inkübatörde üremeye bırakıldı. Transfeksiyon; izolat, susturulacak gen ve siRNA kombinasyonu kriterlerine göre dört ayrı deney grubu halinde tasarlandı. Negatif kontrol olarak transfeksiyona uğramamış protoplast kültürü kullanılırken pozitif kontrol sadece yardımcı plazmidlerin aktarıldığı protoplast kültürü ile oluşturuldu. Deney gruplarının oluşturulmasında susturulacak gen temel alındı. Bu nedenle ilk iki deney grubunda *tri4* geninin, diğer iki grupta ise *tri5* geninin susturulması hedeflendi (Tablo 3.13). *Fusarium graminearum* türü için 18, *F. culmorum* türü için de 18 olmak üzere toplamda 36 deney seti oluşturuldu. Ko-transformasyon işlemlerinde pAN 7-1 ve pEGFP75 vektörleri ayrı ayrı aktarıldılar.

Tablo 3.13: Hedef gen, izolat ve siRNA kombinasyonuna göre gerçekleştirilen deney grupları.

Örnek Kodu	siRNA Kombinasyonu	Hedef Gen	Hedef İzolat	Deney Grubu
1	siRNA4E1	<i>tri4</i>	4F ve 20F	I ve II
2	siRNA4E2	<i>tri4</i>	4F ve 20F	I ve II
3	siRNA4E3	<i>tri4</i>	4F ve 20F	I ve II
4	siRNA4E4	<i>tri4</i>	4F ve 20F	I ve II
5	siRNA4E1 + siRNA4E2	<i>tri4</i>	4F ve 20F	I ve II
6	siRNA4E1 + siRNA4E3	<i>tri4</i>	4F ve 20F	I ve II
7	siRNA4E1 + siRNA4E3	<i>tri4</i>	4F ve 20F	I ve II
8	siRNA4E2 + siRNA4E3	<i>tri4</i>	4F ve 20F	I ve II
9	siRNA4E2 + siRNA4E3	<i>tri4</i>	4F ve 20F	I ve II
10	siRNA4E3 + siRNA4E4	<i>tri4</i>	4F ve 20F	I ve II
11	siRNA4E1 + siRNA4E2 + siRNA4E3	<i>tri4</i>	4F ve 20F	I ve II
12	siRNA4E1 + siRNA4E2 + siRNA4E4	<i>tri4</i>	4F ve 20F	I ve II
13	siRNA4E1 + siRNA4E3 + siRNA4E4	<i>tri4</i>	4F ve 20F	I ve II
14	siRNA4E2 + siRNA4E3 + siRNA4E4	<i>tri4</i>	4F ve 20F	I ve II
15	siRNA4E1 + siRNA4E2 + siRNA4E3 + siRNA4E4	<i>tri4</i>	4F ve 20F	I ve II
16	siRNA5E1	<i>tri5</i>	4F ve 9F	III ve IV
17	siRNA5E2	<i>tri5</i>	4F ve 9F	III ve IV
18	siRNA5E1 + siRNA5E2	<i>tri5</i>	4F ve 9F	III ve IV

3.7.4.1. Deney Grubu I ve II'nin Oluşturulması

En yüksek *tri4* gen anlatımı *F. graminearum* 4F ve *F. culmorum* 20F izolatında belirlendi. *tri4* genine ait 4 ekzon bölgesine özgün 4 çift iplikli siRNA tasarımı gerçekleştirildi (bkz. 3.7.2). *tri4* genine özgün 4 siRNA molekülü tekli, ikili, üçlü ve dördü gruplar halinde toplamda 15'er farklı kombinasyonlarda 4F ve 20F izolatlarına

aktarıldılar (Tablo 3.13). 4F izolatu deney grubu I'i, 20F izolatu ise deney grubu II'yi oluşturmaktadır.

3.7.4.2. Deney Grubu III ve IV'ün Oluşturulması

En yüksek *tri5* gen anlatımı *F. graminearum* 4F ve *F. culmorum* 9F izolatında belirlendi. *tri5* genine ait 2 ekzon bölgesine özgün 2 çift iplikli siRNA tasarımı gerçekleştirildi. *tri5* genine özgün 2 siRNA molekülü tekli ve ikili gruplar halinde toplamda üçer farklı kombinasyonlarda 4F ve 9F izolatlarına aktarıldılar (Tablo 3.13). 4F izolatu deney grubu III'ü, 20F izolatu ise deney grubu IV'ü oluşturmaktadır.

3.7.5. siRNA Aktarımının Doğrulanması

Toplam 36 kombinasyonla üç *Fusarium* izolatına yardımcı vektörlerle birlikte aktarılan siRNA moleküllerinin protoplastlara giriş etkinliğinin belirlenmesi ve doğrulanması *GFP* genini taşıyan pEGFP75 ve pAN 7-1 vektörünün aktarıldığı deney setlerinde gerçekleştirildi.

3.7.5.1 Floresan Mikroskobu İncelemesi

siRNA aktarımından sonra PDB besi ortamında kültürlenen protoplastlardan yedi (7) gün içerisinde miselyum gelişimi sağlandı. Lam-lamel arası preparatı hazırlanan hifler floresan mikroskobunda (MX100, Leica, Almanya) GFP filtre ayarında 10X ve 40X büyütmede incelendi. pEGFP75 plazmidinden sitosole kalan ya da nuklear genomu aktarılan *GFP* geninin anlatım ürününün (GFP) neden olduğu ışımaya görüntülendi.

3.7.5.2 Transformasyon Frekansının Belirlenmesi

tri4 geninin susturulması amacıyla tasarlanan siRNA setlerinin aktarıldığı 4F ve 20F izolatlarında ve *tri5* geni için tasarlanan siRNA setlerinin aktarıldığı 4F ve 9F izolatlarında transformasyon frekansı hesaplandı. Bu amaçla pEGFP75 vektörü aktarılmış örneklerin yedi günlük kültürlerinden elde edilen protoplast kültüründe sayım

yapıldı (bkz. 3.6.3). Frekans başlangıçta kullanılan protoplast sayısı/elde edilen protoplast sayısı oranına göre hesaplandı. Bu oran 20-100 protoplast/ 5×10^4 değer aralığında olduğunda aktarımın başarılı olduğu kabul edildi (Kadotani ve diğ., 2003).

3.7.5.3 Spektrofluorometrik Analiz

Protoplastlara pEGFP75 vektörünün birlikte transformasyonu ile siRNA transfeksiyonu spektrofotometrik ölçüm alınarak doğrulandı. Bu amaçla transfeksiyon işlemlerini takip eden yedinci (7) günde PDB besi ortamında gelişen miselyumdan 3.6'ya göre elde edilen protoplast kültürünün 200 μ l'si spektrofotometre (Biotek, Mikroquant, Almanya) cihazına yüklendi. *GFP* geninin ürünü olan GFP proteinini taşıyan hücrelerin 485/535 nm dalga boyundaki eksitasyon/emisyon değerleri ölçüldü. siRNA ve vektör aktarılmamış protoplast kültürünün değerlerine göre yapılan normalizasyon sonucu RFU (ing., "relative fluorescence unit") değerleri hesaplandı.

Çalışmada spektrofotometrik analiz sonucunda elde edilen deneme grupları, pozitif ve negatif kontrol gruplarına ait ham absorbans değerleri ve RFU değerleri en az üç tekrarlı olarak kaydedildi. Absorbans ve RFU değerlerinin ortalama değerleri, standart sapmaları ile birlikte hesaplandı. Elde edilen veriler ek yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak (Graphpad 5.0 Prism) test edildi. Gruplar içerisindeki farklılıklar Tukey'e göre belirlendi.

3.7.5.4 PZR ile Doğrulama

pAN 7-1 ve pEGFP75 vektörlerinin birlikte transformasyonu ile gerçekleştirilen siRNA transfeksiyonu ardından protoplastlar PDB besi ortamında kültürlendi. Yedi günlük kültürlerde gelişen miselyumlardan genomik DNA molekülleri 3.4.1'e göre izole edildi. Vektörlerin taşıdığı *hph* ve *GFP* genlerine özgün olarak tasarlanan primer setleri kullanılarak (bkz. Tablo NM) 3.7.3.3'te verilen protokole göre PZR gerçekleştirildi. Çoğaltım ürünleri 3.7.3.3 alt başlığında ayrıntılandırıldığı gibi elde edilerek 3.3.7'ye göre analiz edildi.

3.8. siRNA AKTARILMIŞ İZOLATLARDA TRANSKRİPTOMİK VE METABOLOMİK ANALİZLER

tri4 ve *tri5* gen ürünü olan, sırasıyla multiişlevsel oksijenaz ve trikodien sentazın sentezinin siRNA aracılı azalması ve/veya durdurulması siRNA transfeksiyonu sonucu üretilen kültürlerde transkriptomik ve metabolomik analizlerle üç kez kontrol edildi. Transkriptomik düzeyinde 4F, 9F ve 20F izolatlarında *tri4* ve *tri5* gen anlatım düzeyindeki değişim gerçek zamanlı PZR analizi ile gösterilirken metabolomik düzeyinde son ürün olan DON mikotoksinindeki değişim ince tabaka kromatografisi (ing., “thin layer chromatography”; TLC) analizi ile ortaya kondu.

3.8.1. Gerçek Zamanlı PZR ile Transkriptom Düzeyinde Gösterim

Transfeksiyondan yedi gün sonra PDB’de gelişen kültürlerde ve kontrol izolatlarında *tri4* ve *tri5* gen anlatım düzeyleri gerçek zamanlı PZR analizi ile araştırıldı. Son ürün olan B grubu trikotesenlerden DON üretimindeki değişim dolaylı olarak *tri4* ve *tri5* primer transkriptlerindeki değişimle gösterildi.

3.8.1.1. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Transformasyon ajanı aracılı transformasyonun uygulandığı ve siRNA setlerinin aktarıldığı 4F, 9F ve 20F izolatlarına ait bir haftalık kültürlerden total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. RNA izolasyonunda parçalama aşamasına transfeksiyon yapılan 3 ml hacimdeki sıvı kültürlerdeki miselyumların çöktürülmesi (10000xg’de 10 dakika) ile başlandı. Hücreler üst sıvı atıldıktan sonra 1 ml trizol eklenerek süspanse edildi. Daha sonra total RNA izolasyonu işlemine 3.3.2.’de belirtildiği gibi devam edildi. RNA’nın nicel ve nitel analizinden (bkz. 3.3.3 ve 3.3.4) sonra, cDNA sentezi 3.2.5.’te belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA molekülleri gerçek zamanlı PZR’nda kullanıldı.

3.8.1.2. Gerçek Zamanlı PZR ile *tri4* ve *tri5* Gen Anlatımının Analizi

Gerçek zamanlı PZR uygulamalarında siRNA setlerinin aktarıldığı izolatlara ait cDNA moleküllerinin yanı sıra kontrol amaçlı olarak aynı izolatlara ait siRNA aktarımı yapılmamış izolatların ve sadece yardımcı plazmidlerin aktarıldığı izolatların cDNA molekülleri sırasıyla negatif kontrol ve pozitif kontrol olarak kullanıldı. Gerçek zamanlı PZR uygulaması Taq-Man prob molekülleri kullanılarak 3.4.5.'teki protokole göre üç tekrarlı olacak şekilde her üç gen (*tri4*, *tri5* ve β -*tubulin*) için de gerçekleştirildi. *tri4* ve *tri5* genlerinin anlatımları endojen kontrol olarak β -*tubulin* genine ait değerler kullanılarak değerlendirildi. Ayrıca her izolat için hedef/referans oranları ($\Delta\Delta CT$) kontrol grupları ile 3.4.2.3'e göre karşılaştırıldı. Oransal gen anlatımı değişimleri pozitif kalibratör kontrol gruplarına göre incelendi.

3.8.1.3. RT-PZR ile Gen Anlatımının Doğrulanması

siRNA aktarılmış, aktarılmamış ve sadece yardımcı plazmid aktarılmış izolatlarda *tri4* ve *tri5* gen anlatımının doğrulanması RT-PZR ile yapıldı. RT-PZR analizi 3.4.2.4'te belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

3.8.2. İnce Tabaka Kromatografisi

Çalışmada 4F, 9F ve 20F izolatlarına ait siRNA aktarılmış ve aktarılmamış kontrol gruplarına ait 7 günlük sıvı kültürlerden mikotoksin izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla 5 ml hacimdeki kültürler, 160 rpm hızda yedi gün süre ile PDB besi ortamında üretildi. Kültürler 2 kat gazlı bez ile süzüldü. Süzüntüye 1/5 hacim etil asetat eklenerek parçalama işlemi gerçekleştirildi. 5 dakika +4°C'de 5000xg'de santrifüj yapıldıktan sonra etil asetat uzaklaştırıldı. Kuruyan örnekler asetonytril ile çözdürüldü. İnce tabaka analizinde adsorbant, sabit faz olarak silika jel 60 F254 (Merck, Almanya), solvent (hareketli faz) olarak etil asetat:toluen (1:1), reaktif madde olarak da etanol:aliminyum klorür (99:1) kullanıldı. Örnekler standart B-trikotesen markırı (Sigma, Almanya) ile beraber en az 10µl hacimde cam pipet uçları ile yüklendi. Örneklerin yüklendiği plaka hızlıca tanka yerleştirildi ve örnekler 45-60 dakika yürütüldü. Ardından plaka kurumaya bırakıldı. Kuruyan plakalara etanol:aliminyum klorür (99:1) karışımı spreyle

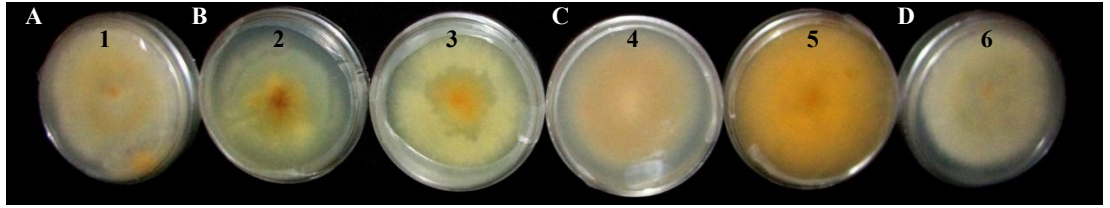
uygulandıktan sonra kurutuldu. Plakalar 365 nm dalga boyundaki UV ışık altında incelendi. Markır ve örneklerin R_f (ing., “retention factor”) değerleri “ $R_f = l_{\text{örnek}} / l_{\text{solvent}}$ ” formülüne göre hesaplandı. R_f değeri örneğin yürüdüğü mesafenin eluentinin (etil asetat:toluen) yürüdüğü mesafeye oranı ile hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. ORTAM KOŞULLARININ TRİKOTESEN ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

4.1.1. Trikotesen Üretimini Etkileyen Ortam Koşulunun Belirlenmesi

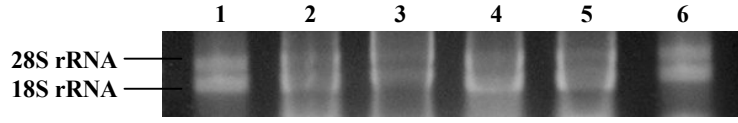
Kontrol materyali olarak PDA besi ortamında (pH 5.6) 25°C’de üretilen kültürler kullanıldı (Şekil 4.1.A). PDA besi ortamında pH’nın 5.6’da sabit tutulduğu 8°C ve 15°C olmak üzere farklı sıcaklık derecelerinin uygulandığı (Şekil 4.1.B), sıcaklığın 25°C’de sabit tutulup pH’nın 3.0 ve 7.0 olarak değiştiği (Şekil 4.1.C) ve son olarak da H₂O₂ (0.5 mM) uygulamasının yapıldığı (Şekil 4.1.D) tüm deney gruplarında yedi günün sonunda etkin miselyum üremesi gözlemlendi.



Şekil 4.1: Altı farklı besi ortamında üretilen F15 izolatının bir haftalık kültürleri. (1) pH 5.6/25°C PDA kontrol, (2) pH3/25°C PDA, (3) pH7/25°C PDA, (4) pH 5.6/8°C PDA, (5) pH 5.6/15°C PDA ve (6) pH5.6/25°C/0.5 mM H₂O₂ PDA besi ortamları.

4.1.2. Total RNA ve cDNA Analiz Sonuçları

Altı farklı koşulda üretilen F15 izolatına ait kültürlerden total RNA molekülleri izole edildi. İzole edilen RNA molekülleri öncelikli olarak agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 4.2). DNazI uygulanmaksızın “tripure” kullanılarak izole edilen total RNA moleküllerinin yüksek saflık (1.9-2.0) ve miktarda (2-3 µg/µl) olduğu belirlendi. RNA molekülleri final konsantrasyonları 200 ng/µl olacak şekilde cDNA çevriminde kullanıldı. cDNA molekülleri iki kademeli reaksiyon ile sentezlendi. cDNA molekülleri gerçek zamanlı PZR ve RT-PZR analizlerinde kullanılabilecek kadar -20°C’de saklandılar.



Şekil 4.2: Altı farklı koşulda üretilen F15 kültürlerine ait total RNA molekülleri. (1) pH 5.6/25°C PDA kontrol, (2) pH3/25°C PDA, (3) pH7/25°C PDA, (4) pH 5.6/8°C PDA, (5) pH 5.6/15°C PDA ve (6) pH5.6/25°C/0.5 mM H₂O₂ PDA besi ortamları.

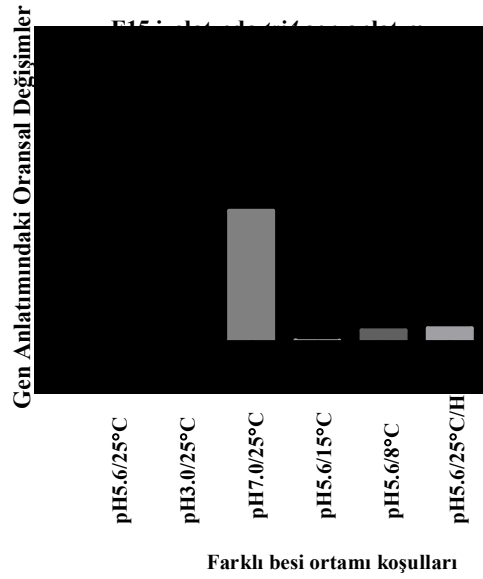
4.1.3. Gerçek Zamanlı PZR ile *tri4* Gen Anlatımı Analiz Sonuçları

Sıcaklığın sabit tutulduğu pH3, pH7 ve H₂O₂ (0.5 mM) değişkenlerini içeren deney grupları ile pH'nın sabit tutulduğu 8°C ve 15°C'de kültürlenenden deney gruplarının gerçek zamanlı PZR'de *tri4* gen anlatımı değerleri kontrol grubu (pH 5.6 ve 25°C) ile karşılaştırıldı. Çalışmada endojen gen olarak *β-tubulin* geni kullanıldı. Öncelikli olarak tüm deney gruplarının Cp değerleri eşik şiddetinin aşıldığı sinyal pikleri olarak kaydedildi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Altı farklı koşulda üretilen F15 izolatında gen anlatımı ile ilişkili değerler.

Örnek	<i>tri4</i> Cp	<i>β-tubulin</i> Cp	ΔΔCT	Oransal Değişim
Kontrol	22.55±0.9	23.58±0.18	2.044	1
15 °C	26.84±4.79	22.33±0.23	4.39E-02	1.62E-03
pH 3.0	0.0±0.0	31.09±0.05	0	0
8 °C	23.25±0.32	20.79±0.25	0.1823	6.04E-02
H ₂ O ₂	22.39±0.1	21.08±1.45	0.4036	7.15E-02
pH 7.0	22.26±1.14	22.51±0.03	1.194	0.7088

En yüksek gen anlatımı değerine (1.00) kontrol grubunda ulaşıldı (Şekil 4.3). Trikotesen üretiminde önemli role sahip *tri4* geninin anlatımının farklı ortam koşulları ile kontrole göre baskılandığı belirlendi.



Şekil 4.3: Altı koşulda üretilen F15 izolatının *tri4* gen anlatımındaki oransal değişimler.

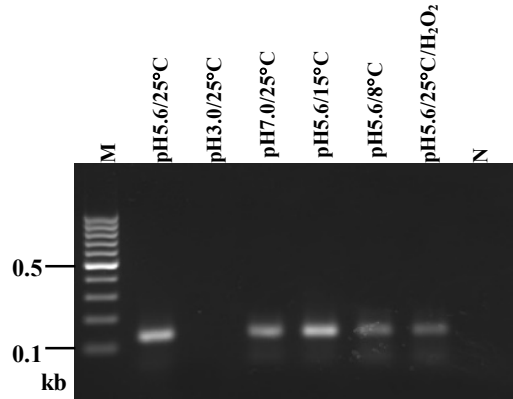
Kontrol grubunun dahil olduğu altı örnekte hem *tri4* hem de *β -tubulin* genleri için Cp değerleri hesaplandı. *tri4* geni için Cp değer aralığı 0.0 ± 0.0 - 26.84 ± 4.79 olarak belirlenirken *β -tubulin* için 20.79 ± 0.25 - 31.09 ± 0.05 olduğu görülmüştür. *tri4* geni için hedef/referans oranından hesaplanan $\Delta\Delta CT$ değerlerinin $1.17E-01$ ile $9.8E-01$ arasında olduğu saptandı (bkz. Tablo 4.1). Asit ortamda kültürlen F15 izolatında *tri4* geninin anlatım yapmadığı yani asit ortamın gen anlatımını inhibe ettiği gösterildi. Asidik ortamda kültürlen izolatın “housekeeping” gen anlatımında düşüş olduğu belirlendi. Bu düşüşün 2^{10} kat olabildiği gözlemlendi.

Deney setlerinde analizin doğruluğu eğim değerleri ve erime eğrisi ile izlenmektedir. Bu amaçla hedef ve referans genler için hazırlanan sulandırım serilerine göre standart grafikler oluşturuldu. Grafik üzerinden *tri4* ve *β -tubulin* genleri için eğim (ing., “slope”) değerlerinin -3.63 ve -3.4 olduğu saptandı. Eğim değerinin -3.3’e yakın olduğu verilerin değerlendirilebilir nitelikte olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak tüm deneme gruplarında ham verilerin gen anlatımı profili oluşturmaya uygun olduğu belirlendi. Kısa süreli yüksek sıcaklık taramasında özgün olmayan ürünlerin eldesi ile oluşturulan erime eğrisi analizlerine göre tüm deney gruplarında hedef gen için özgün primerlerin

tasarlandığı gösterildi. Her iki gen için de erime eğrisi skorlarının 0.83 ila 1.00 arasında olduğu saptandı.

4.1.4. RT-PZR ile *tri4* Gen Anlatımının Doğrulanması

Sıcaklığın sabit tutulduğu pH3, pH7 ile pH 5.6'da H₂O₂ (0.5 mM) uygulanan deney gruplarında, pH'nın sabit tutulduğu 8°C ve 15°C deney gruplarında *tri4* gen anlatımı RT-PZR yöntemi kullanılarak kontrol grubu (pH 5.6 ve 25 °C) ile karşılaştırıldı. Asidik ortamda (pH 3.0) kültürlen F15 izolatında *tri4* geninin anlatım yapmadığı diğer deneme gruplarının hepsinde ise gen anlatımının varlığı çoğaltılan 139 bç boyutundaki PZR ürünleri ile gösterildi (Şekil 4.4). Elde edilen bulgular gerçek zamanlı PZR ile elde edilen bulgularla uyumludur.



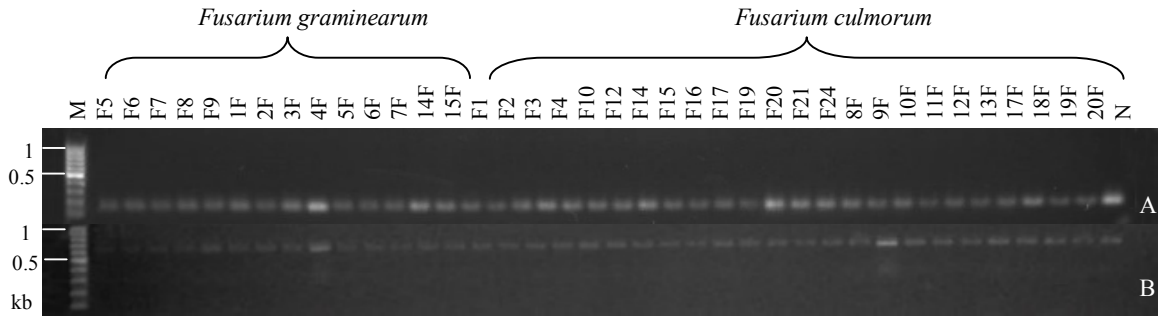
Şekil 4.4: Altı farklı koşulda üretilen F15 izolatında *tri4* gen anlatımı profili. N: Negatif kontrol, M: 100 bç DNA markırı.

4.2. SUSTURMA ÇALIŞMALARINDA KULLANILACAK *F. graminearum* ve *F. culmorum* İZOLATLARININ MOLEKÜLER ANALİZİ

Toplam 38 *Fusarium* izolatı PDA besi ortamında (pH 5.6) 25°C'de koşullarında üretildi. Bütün örneklerdeki *tri4* ve *tri5* genlerinin anlatım düzeyi belirlendi. En yüksek *tri4* ve *tri5* gen anlatımı yapan izolatlar gen susturma çalışmalarında kullanılmak üzere seçildi. Ancak bu amaçla öncelikle 38 izolatın genomik DNA'sında *tri4*, *tri5* ve β -*tubulin* genlerinin varlığı gösterildi. Ardından, *tri4* ve *tri5* gen anlatımı özgün primer ve prob molekülleri tasarlanarak gerçek zamanlı PZR ve RT-PZR ile analiz edildi.

4.2.1. Genomik DNA’da *tri4*, *tri5* ve β -*tubulin* Genlerinin PZR ile Analizi

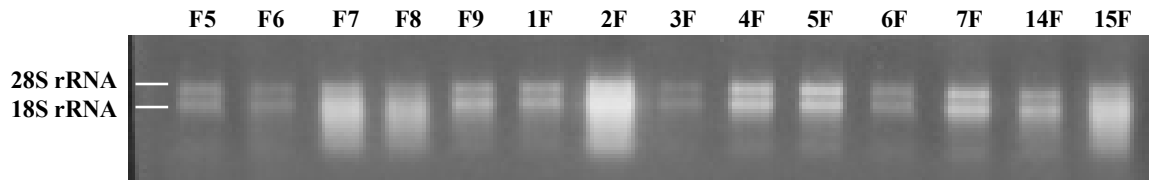
Fusarium graminearum’a ait 14, *F. culmorum*’a ait 24 izolattan yüksek saflıkta (1.7-1.9) ve miktarda (0.1-2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) genomik DNA molekülleri izole edildi. 50 ng genomik DNA *tri4* ve *tri5* genleri ile referans gen olan β -*tubulin*’in çoğaltımında kullanıldı. Tüm izolatlarda özgün Tri4 primer çift 139 bp boyutundaki *tri4* gen parçasını (Şekil 4.5.A), özgün Tox5 primer çifti de 658 bp’lik *tri5* gen bölgesini (Şekil 4.5.B) çoğalttı. Benzer şekilde endojen gene özgün tasarlanan FusTb1 primer çifti ile bütün izolatların genomik DNA’larında 465 bp’lik ürünler elde edildi. Sonuç olarak endojen gen ile *tri4* ve *tri5* genlerinin 38 izolatin tümünün genomik DNA’sında var olduğu gösterildi.



Şekil 4.5: (A) Tri4 ileri/right primer çifti ile elde edilen 139 bp’lik ve (B) Tox5-1/2 primer çifti ile elde edilen 658 bp’lik çoğaltım ürünleri. N: Negatif kontrol, M: 100 bp DNA boyut markırı.

4.2.2. Gerçek Zamanlı PZR ile *tri4*, *tri5* ve β -*tubulin* Gen Anlatımının Analizi

Fusarium türlerine ait 38 izolattan yüksek miktar (1-2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ve saflıkta (1.9-2.0) elde edilen total RNA moleküllerinden (Şekil 4.6) aynı gün içerisinde çift iplikli cDNA molekülleri sentezlendi.



Şekil 4.6: “Tripure” kullanılarak 14 *F. graminearum* izolatından izole edilen total RNA molekülleri.

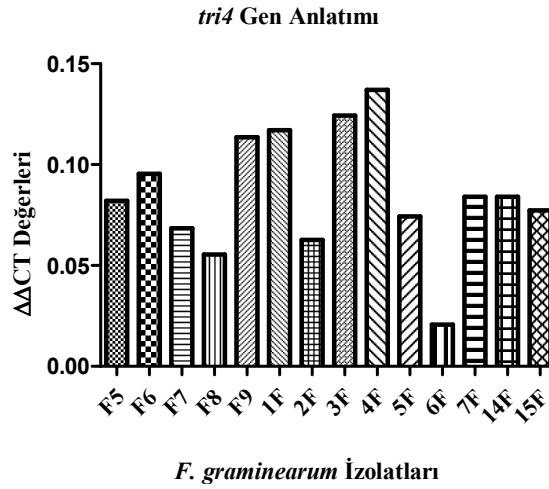
Toplam 38 *Fusarium* izolatında hem *tri4* hem de *tri5* gen anlatımı endojen gen anlatımı ile birlikte değerlendirildi. Bu amaçla ΔC_p ve $\Delta\Delta CT$ değerleri hesaplandı (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: 38 izolatta hedef ve endojen genlere ait gen anlatım değerleri. En yüksek gen anlatım değerleri büyük punto ile gösterilmiştir.

İzolat	ΔC_p			$\Delta\Delta CT$	
	<i>tri4</i>	<i>tri5</i>	β -tubulin	<i>tri4</i>	<i>tri5</i>
F5	25.82±0.2	25.14±0.08	22.21±0.06	8.20E-02	0.131
F6	25.67±0.17	24.94±0.03	22.28±0.38	9.54E-02	0.161
F7	25.83±0.06	24.86±0.04	21.96±0.14	6.84E-02	0.133
F8	26.17±0.29	25.88±0.1	22.07±0.48	5.54E-02	0.169
F9	25.94±0.03	25.19±0.21	22.8±0.23	0.1135	0.195
1F	25.85±0.17	25.13±0.05	22.76±0.16	0.117	0.194
2F	25.85±0.07	23.84±0.29	21.86±0.71	6.27E-02	0.295
3F	28.15±0.23	27.38±0.22	25.14±0.03	0.1243	0.214
4F	26.25±0.61	25.54±0.24	23.3±0.22	0.1371	0.865
5F	25.59±0.57	24.69±0.13	21.84±0.0	7.43E-02	0.138
6F	27.49±2.54	38.82±1.66	21.89±0.14	2.07E-02	1.14E-02
7F	26.36±0.24	24.96±0.03	22.79±0.19	8.41E-02	0.226
14F	25.95±0.95	27.6±4.26	22.48±0.00	8.41E-02	1.78E-03
15F	25.44±0.41	25.13±0.2	24.8±0.00	7.73E-02	8.10E-02
F1	24.4±0.59	22.12±0.04	20.81±0.15	8.25E-02	0.339
F2	21.14±1.46	22.03±0.0	17.52±0.43	8.11E-02	0.329
F3	23.56±0.0	22.05±0.0	20.89±0.13	0.1568	0.3222
F4	23.91±0.12	21.79±0.25	21.06±0.17	0.1387	0.3479
F10	23.58±0.67	22.14±0.07	20.54±0.2	0.1219	0.3076
F12	23.76±0.19	22.41±0.1	20.61±0.16	0.1122	0.2916
F14	24.17±0.15	22.26±0.15	20.88±0.2	0.1025	0.2621
F15	23.42±0.06	22.42±0.2	20.71±0.0	0.1527	0.2941
F16	23.69±0.08	22.3±0.36	20.76±0.08	0.1312	0.2657
F17	23.36±0.33	22.17±0.17	20.68±0.09	0.1561	0.2924
F19	23.92±0.2	22.29±0.19	20.5±0.04	9.37E-02	0.2853
F20	23.32±0.29	22.24±0.06	20.37±0.08	0.1289	0.3105
F21	23.99±0.41	22.75±0.28	20.99±0.44	0.1251	0.336
F24	23.69±0.13	22.32±0.08	20.74±0.0	0.1297	0.3449
8F	35.87±0.52	33.03±0.28	24.49±0.16	3.74E-04	2.38E-03
9F	28.1±0.11	18.48±0.45	22.49±0.11	2.05E-02	0.3761
10F	19.32±0.28	27.05±0.17	17.08±0.0	0.212	2.59E-04
11F	33.67±0.45	32.11±0.19	22.7±0.0	4.99E-04	1.89E-03
12F	33.09±0.68	31.28±0.95	23.59±0.02	1.38E-03	1.04E-02
13F	32.16±0.28	28.0±0.38	22.14±0.03	9.63E-04	1.92E-02
17F	31.06±0.07	29.99±0.36	23.11±0.17	4.04E-03	8.77E-03
18F	31.06±0.11	29.65±0.04	23.55±0.22	5.49E-03	1.98E-02
19F	31.44±0.3	30.45±0.55	23.14±0.09	3.16E-03	2.09E-02
20F	23.19±0.06	18.98±0.15	21.0±0.38	0.2196	0.287

tri4 ve *tri5* genleri için ΔC_p değerlerinin 19.32±0.28-35.87±0.52 ile 18.48±0.45-38.82±1.66 aralığında olduğu saptandı. Endojen gen için ise bu değer aralığı 17.08±0.0-25.14±0.03 olarak kaydedildi. Normalizasyon sonucu elde edilen $\Delta\Delta CT$ değerleri ise iki hedef gen için ayrı ayrı kaydedildi. Normalizasyon değerlerinin *tri4* geni için

1.7E-03-2.5E-01, *tri5* geni için ise 2.2E-04-1.1E-01 aralığında olduğu saptandı. *Fusarium graminearum* türünde her iki gen için de en yüksek gen anlatımı değerine 4F izolatında ulaşıldı ($\Delta\Delta CT_{tri4}$: 0.1371 ve $\Delta\Delta CT_{tri5}$: 0.865). *Fusarium culmorum* türünde ise en yüksek *tri4* gen anlatım değeri ($\Delta\Delta CT_{tri4}$: 0.2196) 20F, en yüksek *tri5* gen anlatımı değeri ise ($\Delta\Delta CT_{tri5}$: 0.3761) 9F izolatında saptandı. Oransal olarak hem tür içi hem de türler arası gen anlatım düzeylerinde 10 kat ve üzeri farklılıklar saptandı (Şekil 4.7).



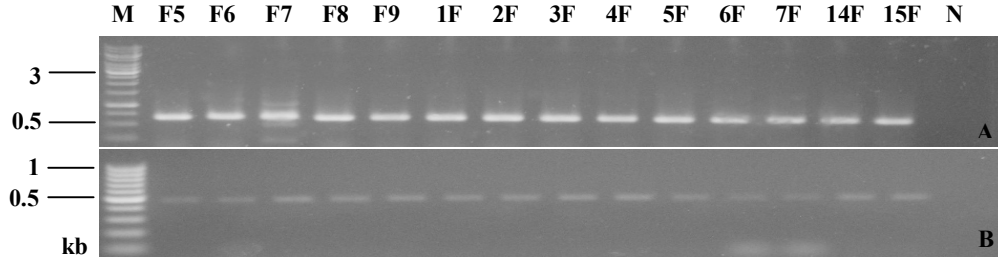
Şekil 4.7: *tri4* gen anlatımına ilişkin $\Delta\Delta CT$ değerlerine göre *F. graminearum* izolatlarının grafikte gösterimi.

Gen anlatımının doğrulanması amacıyla her üç gen için de standart grafikleri aracılığıyla eğim değerleri elde edildi. *tri4*, *tri5* ve β -*tubulin* geni için eğim değerlerinin sırasıyla -3.63, -3.4 ve -3.4 oldukları saptandı. Bütün izolatların trikotesen üretme yetenekleri transkriptom düzeyinde gösterilmekle kalmadı aynı zamanda en yüksek *tri4* gen anlatımı yapan *F. graminearum* 4F, *F. culmorum* 20F ve en yüksek *tri5* gen anlatımı yapan *F. graminearum* 4F ve *F. culmorum* 9F izolatları gen susturma çalışmalarında kullanılmak üzere seçildi.

4.2.3. RT-PZR ile Gen Anlatımının Kontrolü

Gerçek zamanlı PZR analizi ile 38 izolatda kantitasyonu yapılan *tri4* ve *tri5* genlerinin anlatımı RT-PZR ile de doğrulandı. Tüm izolatlatda *tri4* geni için 139 bç, *tri5* geni için

658 bç ve β -*tubulin* geni için 465 bç boyutuna sahip çoğaltım ürünleri elde edildi. Şekil 4.8.A *tri5* ve Şekil 4.8.B β -*tubulin* primer transkriptlerinden elde edilen RT-PZR ürünlerini göstermektedir.

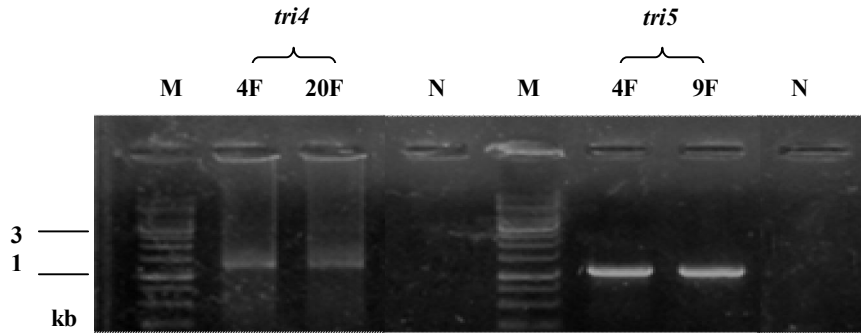


Şekil 4.8: (A) 658 bç boyutundaki *tri5* ve (B) 465 bç boyutundaki endojen gen ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. N: negatif kontrol, M: 1kb/100 bç DNA boyut markırı.

4.3. 4F, 9F VE 20F İZOLATLARINDA *tri4* ve *tri5* GEN DİZİLİMLERİNİN BELİRLENMESİ

4.3.1. Tam Boyda *tri4* ve *tri5* Genlerinin PZR ile Analiz Sonuçları ve pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanma Bulguları

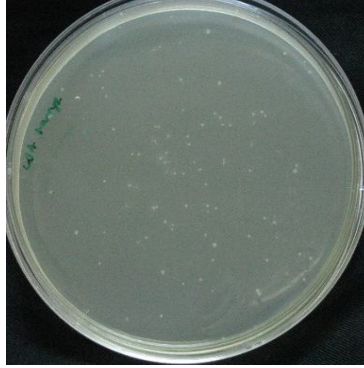
4F, 9F ve 20F izolatlarından izole edilen genomik DNA molekülünün 50 ng'ı kullanılarak tam boyda *tri4* (1.7 kb) ve *tri5* (1.2 kb) genleri çoğaltıldı (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: 4F ve 20F izolatlarında 1.7 kb boyutundaki *tri4* geninin, 4F ve 9F izolatlarında 1.2 kb boyutundaki *tri5* geninin çoğaltım ürünleri. N: negatif kontrol, M: 1 kb DNA boyut markırı.

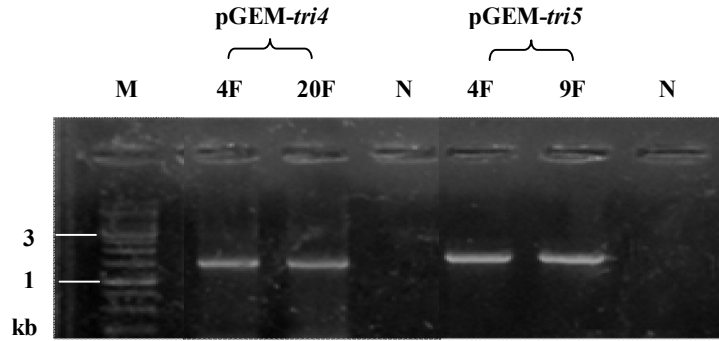
tri4 ve *tri5* genleri kısım 3.5.2'de verilen protokole göre pGEM-T Easy vektörüne bağlanarak *E. coli* DH5 α hücrelerinde çoğaltıldı. *lacZ* geninin içine *tri4* ve *tri5* geni bağlanan vektörü taşıyan beyaz bakteri hücrelerine ait beşer koloni seçildi (Şekil 4.10).

Transformant kolonilerden yüksek miktar (0.1-1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ve saflıkta (1.6-1.8) plazmid molekülleri izole edildi.



Şekil 4.10: Antibiyotikli besi ortamında üretilen transformant koloniler.

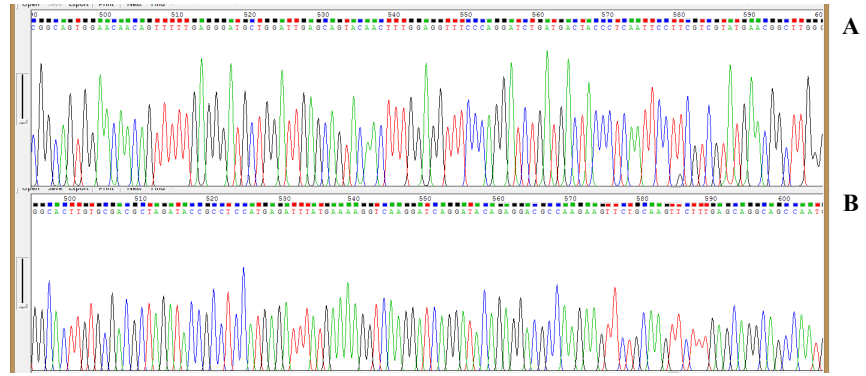
Hedef genler *lacZ* geninin 200 bç'lik parçası ile birlikte evrensel M13pUCF/R primer çifti kullanılarak çoğaltıldı. *tri4* veya *tri5* genlerini alan plazmid moleküllerinde 200 bç'lik fragmentle birlikte 1.4 kb boyutundaki *tri4* geninin ve 1.9 kb boyutundaki *tri5* geninin varlığı gösterilerek transformantlar doğrulandı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Transformant kolonilerden elde edilen pGEM-*tri4* ve pGEM-*tri5* vektörlerinden çoğaltılan 4F, 9F ve 20F izolatlarına ait *tri4* ve *tri5* gen ürünleri. N: negatif kontrol, M: 1 kb DNA boyut markırı.

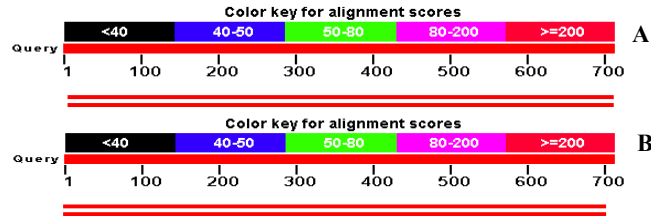
4.3.2. Dizilim Bilgilerinin Analizi

Tam boydaki *tri4* (1.7 kb) ve *tri5* (1.2 kb) genlerini taşıyan plazmid moleküllerinin dizilim bilgileri yüksek kalitede sinyal pikleri içeren kromatogramlar halinde elde edildi (Şekil 4.12) ve primerler için ayrı ayrı gerçekleştirilen en az 600 nukleotidlik ham okumalar kaydedildi.



Şekil 4.12: 20 izolatının genomik DNA'sından çoğaltılan *tri5* genine ait ileri yönlü (A) ve geri yönlü (B) primerler ile elde edilen 500-600. nukleotidlere ait dizilim bilgilerine ait kromatogramlar.

Her bir örneğin FASTA formatında kopyalanan dizilim bilgileri BLASTN ile analiz edildiğinde (Şekil 4.13) 4F, 9F ve 20F izolatlarına ait *tri4* ve *tri5* gen dizilim bilgilerinin; NCBI veritabanına kayıtlı *F. graminearum* ve *F. culmorum* türlerine ait ırkların dizilim bilgileri ile çok yüksek düzeyde (Maksimum benzerlik (%): 94-99; E değeri: 0.0) benzer oldukları saptandı (Tablo 4.3).

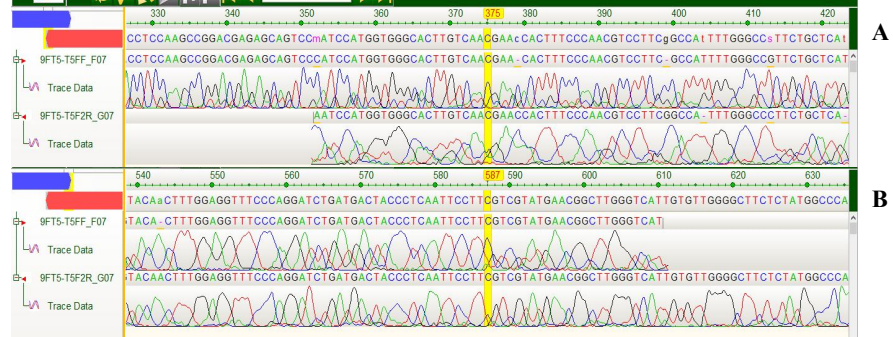


Şekil 4.13: 20F izolatına ait *tri4* gen dizilim bilgisinin ileri (A) ve geri (B) yönlü dizilim bilgilerinin veritabanında BLASTN analizi sonucu çıkan benzerliklerin şematik gösterimi.

Tablo 4.3: *tri4* ve *tri5* genlerine ait dizilim bilgilerinin BLASTN analizine ait veriler.

İzolat	Gen	Primer	İlgili Organizma	Aksesyon no	E değeri	Bit Skoru	Benzerlik (%)
9F	<i>tri4</i>	Tri4FullF	<i>F. culmorum</i>	HM131844.1	0.0	1234	99
9F	<i>tri4</i>	Tri4FullR	<i>F. culmorum</i>	HM131844.1	0.0	1269	99
9F	<i>tri5</i>	Tri5FullF	<i>F. culmorum</i>	HM131844.1	0.0	1040	98
9F	<i>tri5</i>	Tri5FullR	<i>F. culmorum</i>	HM131844.1	0.0	1040	98
20F	<i>tri4</i>	Tri4FullF	<i>F. culmorum</i>	AY102602.1	0.0	1267	99
20F	<i>tri4</i>	Tri4FullR	<i>F. culmorum</i>	AY102602.1	0.0	791	99
20F	<i>tri5</i>	Tri5FullF	<i>F. graminearum</i>	EF661664.1	0.0	1262	99
20F	<i>tri5</i>	Tri5FullR	<i>F. graminearum</i>	EF661664.1	0.0	1206	99
4F	<i>tri4</i>	Tri4FullF	<i>F. graminearum</i>	AF359361.3	0.0	1104	99
4F	<i>tri4</i>	Tri4FullR	<i>F. graminearum</i>	AF359361.3	0.0	1104	99
4F	<i>tri5</i>	Tri5FullF	<i>F. graminearum</i>	AF359361.3	0.0	1079	94
4F	<i>tri5</i>	Tri5FullR	<i>F. graminearum</i>	AF359361.3	0.0	1079	94

Çift yönlü okumalar “DNA Dragon” programı ile karşılaştırıldı (Şekil 4.14). Okumanın kesin olmadığı zayıf sinyal piklerini içeren bölgeler ileri analizlere dahil edilmedi.



Şekil 4.14: 9F izolatının genomuna ait *tri5* dizilim bilgisinin ileri (A) ve geri (B) yönlü karşılaştırma analizi.

Dizileme işlemi sırasında meydana gelen kayıplardan dolayı *tri5* geni için ~1.1 kb boyutundaki, *tri4* geni için ise ~1.6 kb boyutundaki birleşik dizilim bilgileri değerlendirmeye alındı. Üç izolata ait *tri4* ve *tri5* genlerine ait dizilim bilgilerinde sırasıyla üç ve bir adet intronun varlığı BLASTN analizleri ile doğrulandı. Her bir gene ait amino asit çevrimi gerçekleştirildiğinde *tri5* geni için 321 amino asitlik, *tri4* geni için de 500 amino asitlik identik bölgeler elde edildi. *Fusarium graminearum* NRRL 28336 referans ırkla BLASTP analizi sonucunda *tri5* geni için 16 amino asitlik bir değişimin varlığı saptandı (Şekil 4.15).

9F	YTREERIENTLHYAYNKAHHFAQPRQQMLKVDPKRLQASLQTIIVGMVVYSWAKVSKECM
20F	YTREERIENTLHYAYNKAHHFAQPRQQMLKVDPKRLQASLQTIIVGMVVYSWAKVSKECM
Referans	YTREERIENTLHYAYNKAHHFAQPRQQMLKVDPKRLQASLQTIIVGMVVYSWAKVSKECM
4F	YTREERIENTLHYAYNKAHHFAQPRQQMLKVDPKRLQASLQTIIVGMVVYSWAKVSKECM
9F	ADLSIHYYTYTLVLDSSDDPHFAMLNIFDDLQAGREQSHFWALVNEHFPNVLRFHGPFC
20F	ADLSIHYYTYTLVLDSSDDPHFAMLNIFDDLQAGREQSHFWALVNEHFPNVLRFHGPFC
Referans	ADLSIHYYTYTLVLDSSDDPHFAMLNIFDDLQAGREQSHFWALVNEHFPNVLRFHGPFC
4F	ADLSIHYYTYTLVLDSSDDPHFAMLNIFDDLQAGREQSHFWALVNEHFPNVLRFHGPFC
9F	SLNLRSTMDFFEGCWIEQYNFGGFPSSDDYPQFLRRMNLGHCVGASLWPKDLFDERKN
20F	SLNLRSTMDFFEGCWIEQYNFGGFPSSDDYPQFLRRMNLGHCVGASLWPKDLFDERKN
Referans	SLNLRSTMDFFEGCWIEQYNFGGFPSSDDYPQFLRRMNLGHCVGASLWPKDLFDERKN
4F	SLNLRSTMDFFEGRWMEQYHLGSPGSDYPQFLPPKNLGHCVGASLWPKDLFDERKH
9F	FLEITTAVAQMENWMVWVNDLMSFYKEFDDERDQISLVKNFVTCHEITLDEALEKLTQET
20F	FLEITTAVAQMENWMVWVNDLMSFYKEFDDERDQISLVKNFVTCHEITLDEALEKLTQET
Referans	FLEITTAVAQMENWMVWVNDLMSFYKEFDDERDQISLVKNFVTCHEITLDEALEKLTQET
4F	FLEITSAVAQMENWMVWVNDLMSFYKEFDDERDQISLVKNFVTCHEITLDEALEKLTQET
9F	LHSSKQMVAVFADKDPQVMDTIECFMHGYVTWHLCDARYRLHEIYEKVKDQDTEDAKKFC
20F	LHSSKQMVAVFADKDPQVMDTIECFMHGYVTWHLCDARYRLHEIYEKVKDQDTEDAKKFC
Referans	LHSSKQMVAVFADKDPQVMDTIECFMHGYVTWHLCDARYRLHEIYEKVKDQDTEDAKKFC
4F	LHSSKQMVAVFSDKDPQVMDTIECFMHGYVTWHLCDARYRLHEIYEKVKDQDTEDAKKFC

Şekil 4.15: Üç *Fusarium* izolatı ile referans ırkın trikodiin sentaz proteinine ait amino asit dizilimlerinin BLASTP analizi.

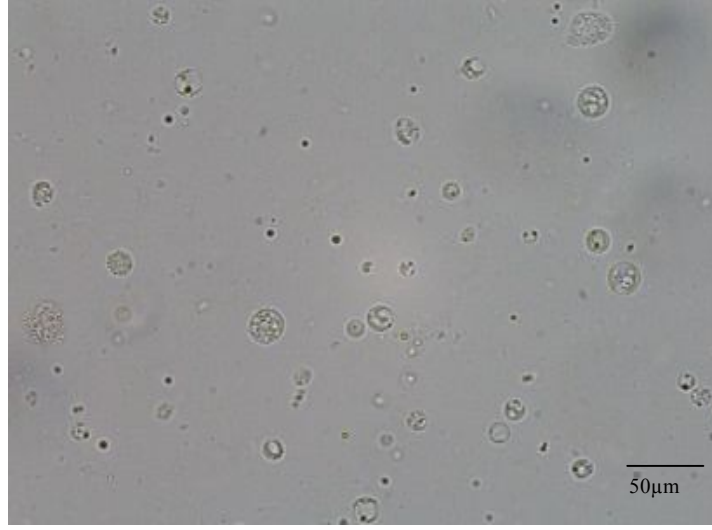
İzolatların birbirleri ve referans ırkla olan % benzerlik değerlerinin %95-100 (4F ve 20F ile 9F ve 20F) arasında olduğu belirlendi (Tablo 4.4). Benzer şekilde *tri4* geni için 500 amino asitlik identik bölge 4F, 9F, 20F izolatları ve referans ırkta BLASTP analizi ile karşılaştırıldı. Bu gen için 25 amino asitlik bir değişimin olduğu saptandı. İzolatların birbirleri ve referans ırkla olan % benzerlik değerlerinin %94-100 (4F ve 20F ile 9F ve 20F) arasında olduğu belirlendi. 4F, 9F ve 20F izolatlarının genomik DNA'larından çoğaltılan *tri4* genlerine ait dizilim bilgileri sırasıyla KJ677970, KJ677971 ve KJ677972 aksesyon numaraları ile NCBI veritabanında kayıt altına alınmıştır. Benzer şekilde 20F, 4F ve 9F izolatlarına ait *tri5* genleri de sırasıyla KJ677973, KJ677974 ve KJ677975 aksesyon numaraları ile NCBI'a kaydedilmiştir.

Tablo 4.4: Üç *Fusarium* izolatu ile referans ırkın (Ref) trikodien sentaz; TRI5 monooksijenaz; TRI4 proteinlerine ait amino asit dizilimlerinin BLASTP analizi sonucunda elde edilen % benzerlik değerleri.

TRI5	Ref.	4F	9F	20F	TRI4	Ref.	4F	9F	20F
Ref.	100				Ref.	100			
4F	95	100			4F	94	100		
9F	99	95	100		9F	94	94	100	
20F	99	95	100	100	20F	94	94	100	100

4.4. PROTOPLAST KÜLTÜRLERİNİN ELDESİ

Fusarium türlerine ait 4F, 9F ve 20F izolatlarının protoplast kültürleri 20mg/ml litik enzimin kullanıldığı PDB besi ortamından elde edildi. Transfeksiyona yeterli sayıda hücrenin temsil edildiği 1×10^5 protoplast/ml sayısına 5 saatlik enzim uygulamasında ulaşıldı. Ancak transfeksiyon işlemleri 6 saat enzim muamelesine maruz bırakılan protoplast kültürlerinden elde edilen 5×10^6 hücre/ml sayısındaki süspansiyonla gerçekleştirildi. Şekil 4.16'de 6 saatlik litik enzim uygulaması sonucu elde edilen protoplastların 40X büyütmedeki görüntüsü gösterilmektedir.

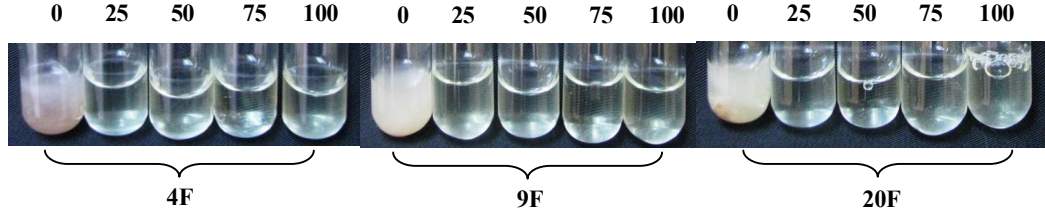


Şekil 4.16: 6 saatlik litik enzim uygulaması ile elde edilen protoplastların 40X ışık mikroskobu görüntüleri.

4.5. *Fusarium* İZOLATLARINDA siRNA TRANSFEKSİYONU

4.5.1. Üremeyi Engelleyen Minimum Antibiyotik Konsantrasyonu

Transfeksiyonda kullanılacak üç izolatin antibiyotik direnci siRNA aktarımından sonra transfektantların ön seçiminin gerçekleştirilmesinde kullanılmak üzere belirlendi. *Fusarium graminearum* 4F izolatu ile *F. culmorum* 9F ve 20F izolatları bir hafta süre sonunda 25, 50, 75 ve 100 µg/ml higromisin B antibiyotiği içeren PDB besi ortamlarında yedi gün süre ile kültürlendi. Tüm izolatların 25-100 µg/ml değer aralığında üreme göstermediği saptandı (Şekil 4.17). Üremenin takibi amacıyla hücre kültürlerinin spektrofotometrede OD₆₀₀ değerleri alındı. Kontrol gruplarını temsil eden 4F, 9F ve 20F izolatlarının absorbans değerleri sırasıyla 0.524.7±0.57, 0.938.7±2.3 ve 0.229.3±1.15 olarak kaydedildi. Antibiyotik ortamında inkübe edilen örneklerde ise absorbans değerinin en fazla 0.003 olduğu, oransal üreme değerlerinin %1'in altında olduğu saptandı. Üremeyi engelleyen minimum antibiyotik konsantrasyonu 25 µg/µl olarak belirlendi. Üç izolatin da higromisin B'nin düşük konsantrasyonlarına yüksek düzeyde duyarlı olduğu, normal üremeyi inhibe ettiği saptandı.



Şekil 4.17: Higromisin B içeren PDB besi ortamındaki 4F, 9F ve 20F izolatlarına ait yedi günlük kültürler. Tüpler üzerindeki değerler ml'deki μg cinsinden antibiyotik konsantrasyonunu göstermektedir.

4.5.2. Tasarlanan siRNA'lar

Özgün siRNA moleküllerinin tasarımı için *tri5* ve *tri4* genlerine ait nukleotid dizi bilgisi AY102584.1, AY102605.1, AY102603.1 aksesyon numaralı *F. graminearum* izolatları ve HM131844.1, AY102602.1 ve AY102571.1 aksesyon numaralı *F. culmorum* izolatları ile ClustalW analizinde karşılaştırıldığında yüksek düzeyde identik bölgenin varlığı saptandı. Benzerlik *tri5* geninin iki ekzonunda birbirinden bağımsız olarak tarandı (Şekil 4.18.A ve B).

readseq-18380_tmp_1	AAGCGACTACAGGCTTCCCTCCAAACAATGTTGGCATGGTCGTATACAGTTGGGCAAAG	A
readseq-9064_tmp_1	AAGCGACTACAGGCTTCCCTCCAAACAATGTTGGCATGGTTGTATACAGCTGGGCAAAG	
readseq-52907_tmp_1	AAGCGACTACAGGCTTCCCTCCAAACAATGTTGGCATGGTTGTATACAGCTGGGCAAAG	
readseq-31536_tmp_1	AAGCGACTACAGGCTTCCCTCCAAACAATGTTGGCATGGTCGTATACAGTTGGGCAAAG	
readseq-21288_tmp_1	AAGCGACTACAGGCTTCCCTCCAAACAATGTTGGCATGGTCGTATACAGTTGGGCAAAG	
readseq-13009_tmp_1	AAGCGACTACAGGCTTCCCTCCAAACAATGTTGGCATGGTCGTATACAGTTGGGCAAAG	

readseq-18380_tmp_1	GTCTCCAAAGAGTGCATGGCGGATCTGTCTATTCACTACACCTACACTCTCGTTTGGAT	
readseq-9064_tmp_1	GTGTCCAAAGAGTGCATGGCGGATCTATCTATTCACTACACCTATACTCTCGTTTGGAT	
readseq-52907_tmp_1	GTGTCCAAAGAGTGCATGGCGGATCTATCTATTCACTACACCTATACTCTCGTTTGGAT	
readseq-31536_tmp_1	GTCTCCAAAGAGTGCATGGCGGATCTGTCTATTCACTACACATACTCTTGTTTGGAT	
readseq-21288_tmp_1	GTCTCCAAAGAGTGCATGGCGGATCTGTCTATTCACTACACATACTCTTGTTTGGAT	
readseq-13009_tmp_1	GTCTCCAAAGAGTGCATGGCGGATCTGTCTATTCACTACACATACTCTTGTTTGGAT	
	** *****	
readseq-49832_tmp_1	TTTTTGAGGGATGCTGGATTGAGCAGTACAACCTTTGGAGGTTTCCAGGATCTGATGACT	B
readseq-37727_tmp_1	TTTTTGAGGGATGTTGGATTGAGCAGTACAACCTTTGGAGGATTTCCAGGATCTGATGACT	
readseq-53775_tmp_1	TTTTTGAGGGATGTTGGATTGAGCAGTACAACCTTTGGAGGATTTCCAGGATCTGATGACT	
readseq-15584_tmp_1	TTTTTGAGGGATGCTGGATTGAGCAGTACAACCTTTGGAGGTTTCCAGGATCTGATGACT	
readseq-47935_tmp_1	TTTTTGAGGGATGCTGGATTGAGCAGTACAACCTTTGGAGGTTTCCAGGATCTGATGACT	
readseq-14665_tmp_1	TTTTTGAGGGATGCTGGATTGAGCAGTACAACCTTTGGAGGTTTCCAGGATCTGATGACT	

readseq-49832_tmp_1	ACCCCTCAATTCCTTCGTCGTATGAACGGTTTGGGTCATTGTGTTGGGGCTTCTCTATGGC	
readseq-37727_tmp_1	ACCCCTCAATTCCTTCGTCGTATGAATGGTTTGGGTCATTGTGTTGGGGCTTCTCTATGGC	
readseq-53775_tmp_1	ACCCCTCAATTCCTTCGTCGTATGAATGGTTTGGGTCATTGTGTTGGGGCTTCTCTATGGC	
readseq-15584_tmp_1	ACCCCTCAATTCCTTCGTCGTATGAACGGTTTGGGTCATTGTGTTGGGGCTTCTCTATGGC	
readseq-47935_tmp_1	ACCCCTCAATTCCTTCGTCGTATGAACGGTTTGGGTCATTGTGTTGGGGCTTCTCTATGGC	
readseq-14665_tmp_1	ACCCCTCAATTCCTTCGTCGTATGAACGGTTTGGGTCATTGTGTTGGGGCTTCTCTATGGC	

Şekil 4.18: Veritabanına kayıtlı altı farklı ırka ait *tri5* geninin ClustalW analizi sonucu elde edilen 1. (A) ve 2. (B) ekzonuna ait kısmi dizilimleri. Üzeri karartılmış dizilimler siRNA tasarımı için seçilen bölgeyi, * tüm ırklarda identik olan nukleotidleri göstermektedir.

Altı referans ırkta *tri5* geninin 1. ekzonunun %96.37-100 değer aralığında benzer olduğu, 2. ekzonunun ise benzerlik oranının %96.20-100 arasında olduğu saptandı. Her bir ekzon için biyoinformatik aracı ile 10'ar adet potansiyel siRNA molekülü tasarlandı. Altı referans ırkta identik olduğu belirlenen Tri5E1 ve Tri5E2 siRNA molekülleri susturmada kullanılmak üzere seçildi (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: *tri5* geni için tasarlanan siRNA molekülleri.

<i>tri5</i> ekzon 1			<i>tri5</i> ekzon 2		
Başlangıç nukleotidi	Hedef DNA Dizisi	% GC	Başlangıç nukleotidi	Hedef DNA Dizisi	% GC
86	GAGAGGAGCGCATTGAGAATTGCA	48	46	CAGGATCTGATGACTACCCCTCAATT*	44
91	GAGCGCATTGAGAATTGCACTATG	44	80	TATGAACGGTTTGGGTCATTGTGTT	40
93	GCGCATTGAGAATTGCACTATGCT	44	135	GACGAGCGAAAGAAGTCTCCTCGAAA	48
95	GCATTGAGAATTGCACTATGCTTA	36	174	GCCCAGATGGAGAACTGGATGGITT	52
181	AAGCGACTACAGGCTTCCCTCCAAA*	52	207	GATCTCATGTCGTTCTACAAGGAAT	40
184	CGACTACAGGCTTCCCTCCAAACAA	52	249	CAAATCAGTCTGGTCAAGAACTTG	40
202	CAAACAATTGTTGGCATGGTCGTAT	40	275	CACCTGTCATGAGATCACTCTGGAT	48
262	GATCTGTCTATTTCACTACACCTACA	40	492	GACGCCAAGAAGTTCTGCAAGTTCT	48
317	CCCATCCTGCTATGTTGAACCTATT	40	509	CAAGTCTTTTGAGCAGGCAAGCAAT	48
428	GGCCCTTCTGCTCGTTGAACCTTAT	52	601	AGGACGATATGAAGGAGGCTCAGAA	48

* Tüm ırklarda identik nukleotidleri taşıyan siRNA dizilimini ifade etmektedir

tasarlandı. Tümüyle identik dizileri taşıyan dört siRNA (Tri4E1-4) susturmada kullanılmak üzere seçildi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: *tri4* geni için tasarlanan siRNA molekülleri.

<i>tri4</i> ekzon 1			<i>tri4</i> ekzon 4		
Başlangıç nukleotidi	Hedef DNA Dizisi	%GC	Başlangıç nukleotidi	Hedef DNA Dizisi	%GC
26	CGAATTCGCCAAGGTGTTCTTCT	52	12	TGCATCTTGGAGATCTCCAGAGAT	48
36	CAAGGTGTTCTTCTTGCCTGGAAT	48	14	CATCTTGGAGATCTCCAGAGATAT*	44
37	AAGGTGTTCTTCTTGCCTGGAATT	44	42	CCATCCGGATGACTTCATGGTAGA	52
74	CCAACAATACGGGCGTGAGTCATGT	52	48	CGGATGACTTCATGGTAGAACTCAA	44
77	ACAATACGGGCGTGAGTCATGTCAA*	48	53	GACTTCATGGTAGAACTCAAGGTAG	44
78	CAATACGGGCGTGAGTCATGTCAAT	48	65	GAACTCAAGGTAGGGTCCAATGGCA	52
99	CAATGTCGGCCTTGGTGGTGTCATA	52	116	CAGTGGGTGCAAGTACAGGTTGTAA	48
100	AATGTCGGCCTTGGTGGTGTCATAA	48	117	AGTGGGTGCAAGTACAGGTTGTAAA	44
104	TCGGCCTTGGTGGTGTCATAAAGCT	52	141	AAGCAGGAAGAGAGGAAGTAGATAA	40
106	GGCCTTGGTGGTGTCATAAAGCTCA	52	149	AGAGAGGAAGTAGATAACAGTCGAT	40
<i>tri4</i> ekzon 2			<i>tri4</i> ekzon 3		
Başlangıç nukleotidi	Hedef DNA Dizisi	%GC	Başlangıç nukleotidi	Hedef DNA Dizisi	%GC
6	TCCGATGCACTGTCTAGAACCCTGA	52	107	CCGTTCAAGGTAAAGGAGATTCTCTA	48
59	GGATACCCCTTCTGTTGTCCTCGAT	52	112	CAGGTAAGGGAGATTCTCTAGGGTA	48
60	GATACCCCTTCTGTTGTCCTCGATC	52	121	GAGATTCTCTAGGGTAGCGAGAGAA	48
63	ACCCTTCTGTTGTCCTCGATCCAT	52	139	GAGAGAATACTGGTCGTCCTTGACA	48
79	TCGATCCATCGCTCAGGCTTGAAC	52	241	CAGTGTCTTGAAGTAGTCTCAGTA	44
115	GGGAAATCTTGGGATCGGTGTGCA	52	358	GATGGATGACTTGGCCTCATGAGAT	48
116	GGAAATCTTGGGATCGGTGTGCAT	48	473	CAAGAGTAAGGGAGGCGCTTCAGAA	52
117	GAAATCTTGGGATCGGTGTGCATG	48	521	CGTGCAAGATGGTAGATCTTGGTAA	44
128	GATCGGTGTGCATGAAATAGGTGGA	48	594	GATAGTCGTTGTGCTTGCCATAGAA	44
131	CGGTGTGCATGAAATAGGTGGACTG	52	687	CCAGATGCTGTTGGAATCGAGTCAA	48
22	GAACCCCTGAGAGAAGTTGGTGATGT *	49	14	ACATGCTCCTTGTACTTCAAGTTCT*	49

* Tüm ırklarda identik nukleotidleri taşıyan siRNA dizilimini ifade etmektedir

Hedef siRNA molekülleri ile çalışmada kullanılan 4F, 9F ve 20F izolatlarının *tri4* ve *tri5* gen dizilim bilgileri arasındaki benzerlik de araştırıldı. *tri4* genine özgün 4 ve *tri5* geni için tasarlanan 2 siRNA molekülünün dizilerinin 4F, 9F ve 20F izolatlarına ait *tri4* ve *tri5* gen dizi bilgisi ile %100 benzerlik taşıdığı saptandı (Şekil 4.20). Bu şekilde hem 6 referans dizilim bilgisi kaydına hem de 4F, 9F ve 20F izolatlarının dizilim bilgilerine göre identik dizilere sahip olan 6 çift iplikli siRNA molekülü sentetik olarak hizmet alımı ile sağlandı.

20F	TTGCTCAGCCTCGCCAAACAGCAGATGCTCAAGGTAGACCCTAAGCGACTACAGGCTTCCC
9F	TTGCTCAGCCTCGCCAAACAGCAGATGCTCAAGGTAGACCCTAAGCGACTACAGGCTTCCC
siRNA51	-----AAGCGACTACAGGCTTCCC
4F	TTGCTCAGCCTCGCCAGCAGAAGATGCTCAAGGTAGACCCTAAGCGACTACAGGCTTCCC *****
20F	TCCAAACAATCGTTGGCATGGTCGTATACAGTTGGGCAAAGGTCTCCAAAGAGTGCATGG
9F	TCCAAACAATCGTTGGCATGGTCGTATACAGTTGGGCAAAGGTCTCCAAAGAGTGCATGG
siRNA51	TCCAAA-----
4F	TCCAAACAATCGTTGGCATGGTTGTATACAGCTGGGCAAAGGTCTCCAAAGAGTGCATGG *****
20F	GTGGAACAACAGTTTGGAGGATGCTGGATTGAGCAGTACAACCTTGGAGGTTTCCCAGG
9F	GTGGAACAACAGTTTGGAGGATGCTGGATTGAGCAGTACAACCTTGGAGGTTTCCCAGG
siRNA52	-----CAGG
4F	GTGGAACAACAGTTTGGAGGATGCTGGATTGAGCAGTACAACCTTGGAGGTTTCCCAGG ****
20F	ATCTGATGACTACCCCTCAATTCCTTCGTCGTATGAACGGCTTGGGTCATTGTGTTGGGGC
9F	ATCTGATGACTACCCCTCAATTCCTTCGTCGTATGAACGGCTTGGGTCATTGTGTTGGGGC
siRNA52	ATCTGATGACTACCCCTCAATT-----
4F	ATCTGATGACTACCCCTCAATTCCTTCGTCGTATGAACGGCTTGGGTCATTGTGTTGGGGC *****
9F	-GCGGGAGCTTTCGCCCAGAATGGTTC--GGTCTAAGCCTGGAATTGCCTT-GGGGTAGC
20F	---GGGGCCTCCCCCAAATGGTTTCGGGTCTTGGCCTGGAATTGCCTT-GGGGTAGC
siRNA41	-----GGGTAGC
4F	CCGGGGCCCCCTCCTTAGGTTCTCTCTATCTTGCTTAGGAATTGCCTTAGGGGTATC
9F	CAACAATACGGGCGTGAGTCATGTCAATGTGCGGCTTGGTGGTGTCATAAAGCTCAACTT
20F	CA-CAATACGGGCGTGAGTCATGTCAATGTGCGGCTTGGTGGTGTCATAAAGCTCAACTT
siRNA41	---CAATACGGGCGTGAGTCATGTCAA-----
4F	CCCCAATACGGGCGTGAGTCATGTCAATGTGCGGCTTGGTGGTGTCATAAAGCTCAACTT *****
20F	TGTTAGCAAGTGATCTCCCCCAATCGGAGAGTGCCGATAGGTAATAAAGGGAATCGACTT
siRNA42	-----
9F	TGTTAGCAAGTGATCTCCCCCAATCGGAGAGTGCCGATAGGTAATAAAGGGAATCGACTT
4F	TGTTAGCAAGTGATCTCCCCCAATCGGAGAGTGCCGATAGGTAATAAAGGGAATCGACTT
20F	ACGTGTATCCGATGCACTGTCTAGAACCCCTGAGAGAAGTTGGTGATGTACTTCTTGAGAA
siRNA42	-----GAACCCCTGAGAGAAGTTGGTGATGT-----
9F	ACGTGTATCCGATGCACTGTCTAGAACCCCTGAGAGAAGTTGGTGATGTACTTCTTGAGAA
4F	ACGTGTATCCGATGCACTGTCTAGAACCCCTGAGAGAAGTTGGTGATGTACTTCTTGAGAA- *****
9F	TAGCATGTATAGATATAGAGAGATAGAAAATGAACCTACTCCGGTAGGGATGACATGCTC
20F	TAGCATGTATAGATATAGAGAGATAGAAAATGAACCTACTCCGGTAGGGATGACATGCTC
siRNA43	-----ACATGCTC
4F	TAGCATGTATAGATATAGAGAGATAGAAAATGAACCTACTCCGGTAGGGATGACATGCTC *****
9F	CTTGTACTTCAAGTTCTCCTGAGTAGCCACACGTCCCAGCGAGAAATTGGACCGAAAGC
20F	CTTGTACTTCAAGTTCTCCTGAGTAGCCACACGTCCCAGCGAGAAATTGGACCGAAAGC
siRNA43	CTTGTACTTCAAGTTCT-----
4F	CTTGTACTTCAAGTTCTCCTGAGTAGCCACACGTCCCAGCGAGAAATTGGACCGAAAGC *****
4F	TGTTGTACAAGGTGGATCTCTGCACATCTTACCATATTTATCGTGATCTTGGAGATCTC
siRNA44	-----CATCTTGGAGATCTC
9F	TGTTGTACAAGGTGGATCTCTGCACATCTTACCATATTTATCGTGATCTTGGAGATCTC
20F	TGTTGTACAAGGTGGATCTCTGCACATCTTACCATATTTATCGTGATCTTGGAGATCTC *****
4F	CCAGAGATATTGGCCATCCCGGATGACTTCATGTAGAACTCAAGGTAGGGTCCAATGGC
siRNA44	CCAGAGAT-----
9F	CCAGAGATATTGGCCATCCCGGATGACTTCATGGTAGAACTCAAGGTAGGGTCCAATGGC
20F	CCAGAGATATTGGCCATCCCGGATGACTTCATGGTAGAACTCAAGGTAGGGTCCAATGGC *****

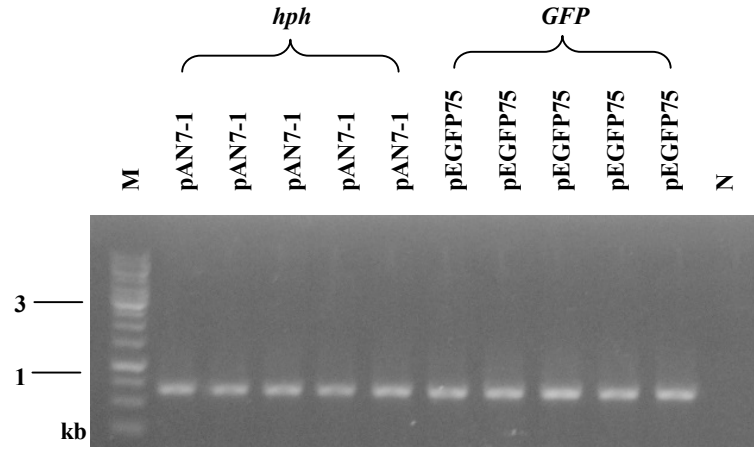
Şekil 4.20: 6 siRNA molekülünün *tri4* ve *tri5* gen dizilim bilgileri ile homoloji karşılaştırması.
*İzolatlardaki özgün siRNA bölgelerini göstermektedir.

4.5.3. Transfeksiyon İçin Yardımcı Plazmid Eldesi

Transfeksiyonda kullanılan yardımcı plazmidlerden *hph* genini taşıyan pAN 7-1 ve *GFP* genini taşıyan pEGFP75 antibiyotik (50 µg/ml ampicilin) içeren besi ortamında üretilen beyaz kolonilerden yüksek miktar (1-3 µg/µl) ve saflıkta (1.7-1.9) elde edildi.

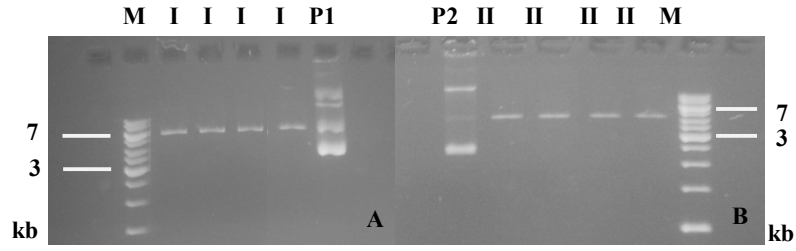
Yardımcı plazmidlerin *E. coli* hücrelerinde transformasyon frekansı 1×10^7 olarak hesaplandı.

Olası transformantlar üç yaklaşımla doğrulandı. Yardımcı vektörleri (pAN 7-1 ve pEGFP75) aldığı düşünülen *E. coli*'ye ait beşer koloni PZR ile tarandığında 0.7 kb boyutundaki pAN7-1 vektöründe yer alan *hph* geninin ve 0.7 kb boyutundaki *GFP* geninin çoğaltım ürünleri elde edildi (Şekil 4.21). Bu şekilde transformantlarda ön seçim gerçekleştirildi.



Şekil 4.21: pAN 7-1 ve pEGFP75 plazmidlerini taşıyan beyaz kolonilerden, koloni PZR sonucu elde edilen 0.7 kb'lık *hph* ve *GFP* gen ürünleri. N: negatif kontrol, M: 1 kb DNA boyut markırı.

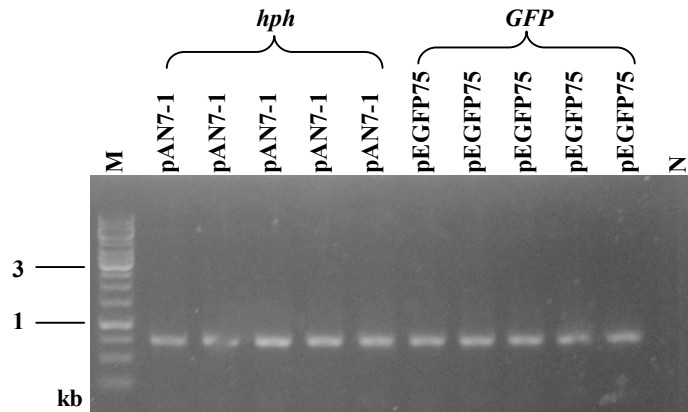
Yardımcı plazmidler olası transformantlardan yüksek miktar ($1-3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) ve saflıkta ($A_{260/280}:1.7-1.9$) izole edildi (Şekil 4.22.A, B).



Şekil 4.22: Çalışmada kullanılan pAN 7-1 (A) ve pEGFP75 (B) yardımcı plazmidlerin *XhoI* restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesimi sonucu elde edilen kesim profilleri. M: 1 kb DNA boyut markırı, P1: kesime uğratılmamış pAN 7-1, P2: kesime uğratılmamış pEGFP75, I: kesime uğratılmış pAN 7-1, II: kesime uğratılmış pEGFP75 plazmidleri.

Tek noktada kesim yapan restriksiyon endonukleazlarından *EcoRI* ile pAN7-1 plazmidini kesime uğratıldığında 6.7 kb boyutundaki doğrusal vektör elde edildi. Benzer şekilde pEGFP75 plazmidini *XhoI* ile kesildiğinde 5.7 kb boyutundaki doğrusal vektör agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 4.22.A, B). Bu bulgular aynı zamanda transformasyonun doğrulanmasını sağladı.

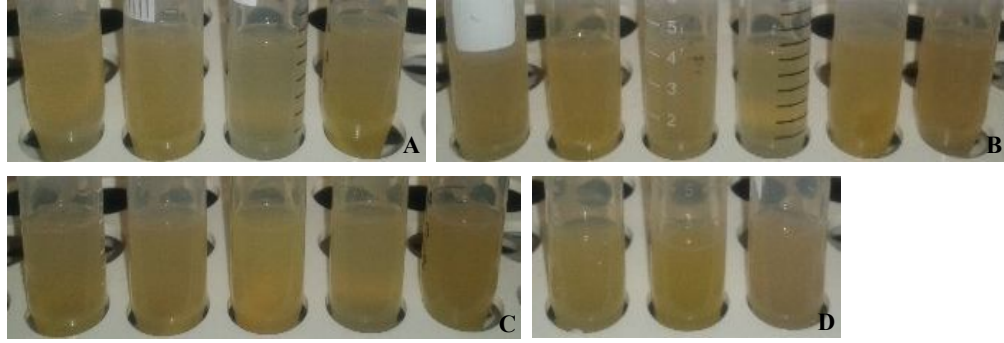
Plazmid moleküllerinin kontrolü taşıyan markır genlerin PZR ile çoğaltılarak gösterilmesiyle de gerçekleştirildi. Seçilen bakteri hatlarından izole edilen yardımcı plazmidlerden 0.7 kb boyuttaki *hph* ve 0.7 kb boyutundaki *GFP* gen ürünleri çoğaltılarak transformasyonun başarılı olarak gerçekleştiği teyit edildi (Şekil 4.23).



Şekil 4.23: pAN 7-1 ve pEGFP75 plazmidlerinden PZR sonucu elde edilen 0.7 kb'lık *hph* ve *GFP* gen ürünleri. N: negatif kontrol, M: 1 kb DNA boyut markırı.

4.5.4. Plazmid Moleküllerinin Birlikte Aktarıldığı siRNA Transfeksiyonun Analizi

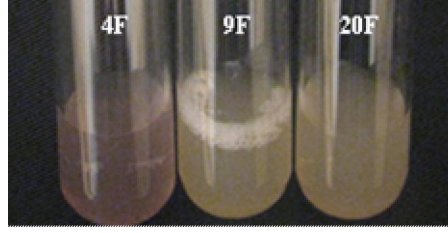
Yardımcı plazmidler eşliğinde transfeksiyon ajanı ile tekli, ikili, üçlü ve dörtlü kombinasyonlarda atımları içeren 36 deneme grubunda siRNA aktarımı yapılan 4F, 9F ve 20F izolatlarına ait higromisin B antibiyotiklerine duyarlı protoplast kültürlerinin PDB+25µg/ml antibiyotik içeren besi ortamında yedi günlük süre sonunda vegetatif üreme gösterdiği belirlendi (Şekil 4.24). Bu şekilde protoplast kültürlerinin transformasyon aracılığıyla antibiyotik direnci kazandıkları belirlenirken, transfeksiyonunun da başarılı biçimde gerçekleştirildiği kabul edildi.



Şekil 4.24: (A) Tekli, (B) ikili, (C) üçlü ve (D) dörtlü siRNA aktarımı yapılmış 4F izolatlarının PDB+25µg/ml besi ortamındaki yedi günlük kültürleri.

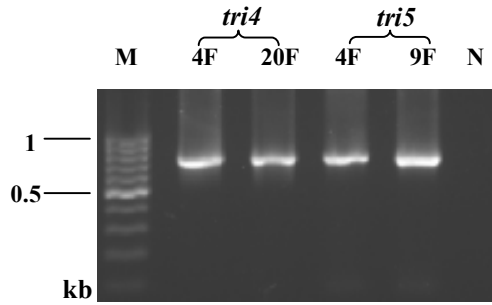
4.5.4.1. *pAN 7-1* Yardımcı Plazmidli siRNA Aktarımının Doğrulanma Bulguları

Yalnızca yardımcı plazmidlerin higromisin B duyarlı protoplastlara aktarıldığı pozitif kontrol gruplarında *hph* geni taşıyan pAN 7-1 vektörünü alan 4F, 9F ve 20F izolatları antibiyotikli (PDB+25µg/ml higromisin B) besi ortamında üredi. Bu şekilde pAN7-1 vektörü eşliğinde siRNA aktarılmış transfektantlarda ön seçim tamamlandı (Şekil 4.25).



Şekil 4.25: pAN 7-1 vektörlerinin aktarıldığı 4F, 9F ve 20F örneklerinin antibiyotikli PDB besi ortamında üreyen yedi günlük kültürleri.

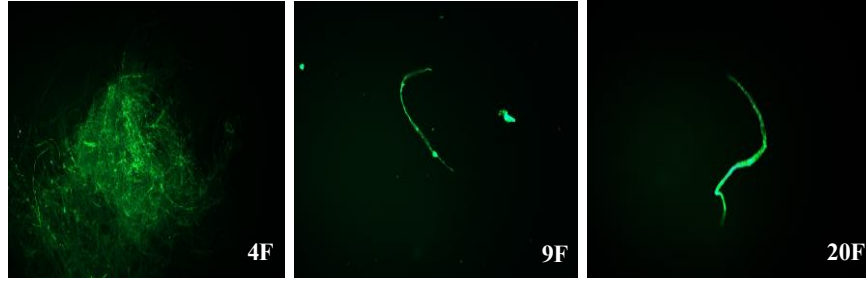
tri4 ve *tri5* özgün siRNA molekülleri ile birlikte aktarılan pAN 7-1 plazmidindeki *hph* geni 4F, 9F ve 20F izolatlarının genomik DNA'larında çoğaltıldı. Bu genin 0.7 kb'lık PZR ürünleri transformasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini gösterdi (Şekil 4.26). Bu bulgu plazmid transformasyonu ile eş zamanlı yapılan siRNA transfeksiyonunun da başarılı bir göstergesi olarak kabul edildi.



Şekil 4.26: *tri4* ve *tri5* genlerine özgün siRNA aktarılmış 4F, 9F ve 20F izolatların genomik DNA'larında *hph* geninin çoğaltımı. N: negatif kontrol, M: 100 bp DNA boyut markırı.

4.5.4.2. pEGFP75 Yardımcı Plazmidli siRNA Aktarımının Doğrulama Bulguları

tri4 ve *tri5* genlerine özgün olarak tasarlanan siRNA molekülleri pEGFP75 yardımcı plazmidi ile birlikte aktarıldıktan sonra transfeksiyon işlemi yedi günlük protoplast kültürlerinde doğrulandı. Transfeksiyondan yedi gün sonra yapılan floresan mikroskobu incelemesinde yardımcı plazmidi alan hücrelerde *GFP* geninin protein ürününün neden olduğu floresan ışımaya 4F, 9F ve 20F izolatlarına ait miselyumlarda gözlemlendi (Şekil 4.27). Bu sonuç her üç izolatın yardımcı plazmid ile birlikte siRNA moleküllerini de aldığı bir göstergesi olarak değerlendirildi.



Şekil 4.27: pEGFP75 vektörünü alan *Fusarium* izolatlarında ışımaya yapan 4F ve 9F (20X) izolatları ile 20F (40X) izolatına ait miselyum/miselyumların floresan mikroskobu görüntüleri.

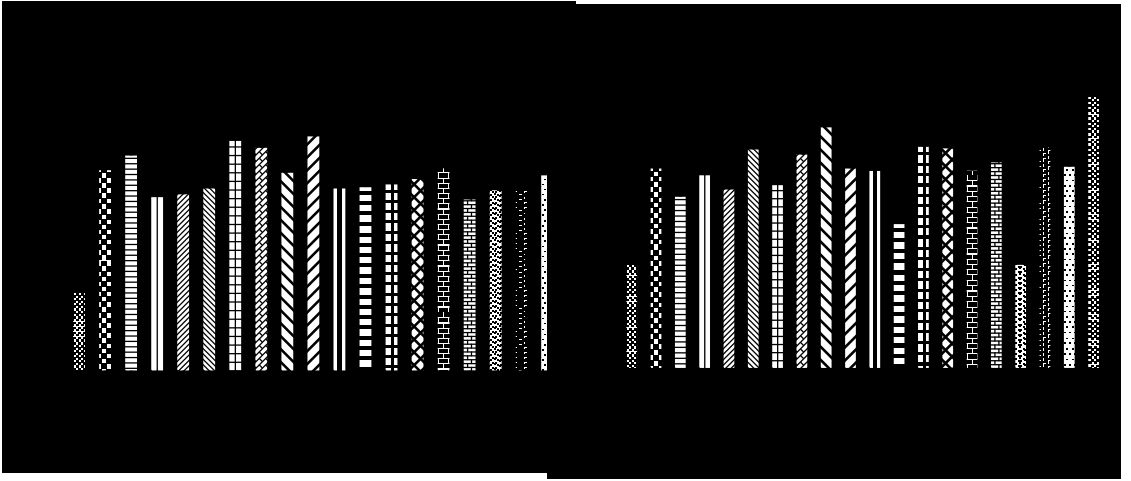
Transfeksiyon etkinliği pEGFP75 vektörünün aktarıldığı 4F, 9F ve 20F izolatlarına ait 7 günlük protoplast kültürlerinde transformasyon frekansı hesaplanarak belirlendi. Bu amaçla öncelikle floresan görüntüleme sisteminde her bir deneme grubuna ait kültürlerde protoplast sayımı gerçekleştirildi. Protoplast sayısı 4F izolatı için 50 ± 0.0 hücre/ml, 9F için 99.33 ± 10.06 hücre/ml ve 20F izolatı için ise 50.66 ± 4.04 hücre/ml olarak kaydedildi. Transformasyon frekansı $50 \pm 0.0/5 \times 10^4$ - $99.33 \pm 10.06/5 \times 10^4$ olarak hesaplandı.

Transfeksiyon spektrofotometrik analizle de doğrulandı. pEGFP75 plazmid vektörünü alan, GFP proteinini taşıyan protoplast kültürlerinde kontrol gruplarına göre 210 ± 9.53 - 415.3 ± 5.85 arasında yüksek absorbans değerleri elde edildi (Tablo 4.7). Tukey'e göre farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.005$).

Tablo 4.7: Farklı siRNA kombinasyonlarının aktarıldığı 4F, 9F ve 20F izolatlarında spektrofotometrik ölçümler. 1-18 arasındaki numaralandırmalar deney seti I, II, III ve IV'e ait örnekleri ifade etmektedir (bkz: Tablo 3.13).

	4F Kontrol	4F1	4F2	4F3	4F4	4F5	4F6	4F7	4F8	4F9
$\Delta 485/\Delta 535 \pm SS$	143.7 $\pm$ 3.21	355.0 $\pm$ 5.0	382.3 $\pm$ 4.93	310.3 $\pm$ 10.02	315.0 $\pm$ 6.08	326.0 $\pm$ 6.08	407.7 $\pm$ 6.65	395.3 $\pm$ 5.5	352.3 $\pm$ 2.51	415.3 $\pm$ 5.85
RFU $\pm$ SS	1.0 $\pm$ 0.0	2.48 $\pm$ 0.11	2.65 $\pm$ 0.05	2.15 $\pm$ 0.08	2.19 $\pm$ 0.09	2.26 $\pm$ 0.09	2.83 $\pm$ 0.09	2.75 $\pm$ 0.09	2.45 $\pm$ 0.06	2.89 $\pm$ 0.06
	4F10	4F11	4F12	4F13	4F14	4F15	4F16	4F17	4F18	
$\Delta 485/\Delta 535 \pm SS$	325.3 $\pm$ 6.65	326.3 $\pm$ 2.3	332.7 $\pm$ 2.51	341.7 $\pm$ 2.08	360.3 $\pm$ 8.38	306.7 $\pm$ 7.63	321.7 $\pm$ 1.52	324.3 $\pm$ 4.5	346.7 $\pm$ 2.88	
RFU $\pm$ SS	2.26 $\pm$ 0.09	2.27 $\pm$ 0.06	2.31 $\pm$ 0.03	2.37 $\pm$ 0.06	2.5 $\pm$ 0.11	2.12 $\pm$ 0.05	2.24 $\pm$ 0.03	2.25 $\pm$ 0.08	2.41 $\pm$ 0.07	
	20F Kontrol	20F1	20F2	20F3	20F4	20F5	20F6	20F7	20F8	20F9
$\Delta 485/\Delta 535 \pm SS$	145.7 $\pm$ 0.88	288.7 $\pm$ 1.15	249.0 $\pm$ 7.93	279.0 $\pm$ 1.73	259.0 $\pm$ 4.0	315.3 $\pm$ 0.57	265.0 $\pm$ 8.66	308.3 $\pm$ 7.23	346.3 $\pm$ 3.21	288.3 $\pm$ 10.5
RFU $\pm$ SS	1.0 $\pm$ 0.0	1.89 $\pm$ 0.03	1.63 $\pm$ 0.06	1.82 $\pm$ 0.02	1.69 $\pm$ 0.04	2.06 $\pm$ 0.03	1.73 $\pm$ 0.03	2.02 $\pm$ 0.07	2.27 $\pm$ 0.05	1.89 $\pm$ 0.1
	20F10	20F11	20F12	20F13	20F14	20F15				
$\Delta 485/\Delta 535 \pm SS$	285.3 $\pm$ 4.61	210.0 $\pm$ 9.53	319.0 $\pm$ 3.6	317.3 $\pm$ 2.3	285.7 $\pm$ 4.93	297.0 $\pm$ 7.0				
RFU $\pm$ SS	1.86 $\pm$ 0.02	1.37 $\pm$ 0.07	2.09 $\pm$ 0.04	2.07 $\pm$ 0.04	1.87 $\pm$ 0.06	1.94 $\pm$ 0.07				
	9F Kontrol	9F16	9F17	9F18						
$\Delta 485/\Delta 535 \pm SS$	136.7 $\pm$ 0.57	285.0 $\pm$ 4.35	260.7 $\pm$ 12.86	350.3 $\pm$ 5.508						
RFU $\pm$ SS	1.0 $\pm$ 0.0	2.08 $\pm$ 0.03	1.9 $\pm$ 0.1	2.55 $\pm$ 0.03						

Gen susturulmuş örnekler ile kontrol grupları karşılaştırıldığında elde edilen RFU değerleri 36 deneme grubunda “1”’in üzerinde hesaplandı (Şekil 4.28). En düşük RFU değeri 1.37 ± 0.07 olarak *tri4* geninin susturulduğu 20F izolatına üçlü siRNA atımı (siRNA4E1+siRNA4E2+siRNA4E3) sonucu elde edilirken, en yüksek RFU değerine (2.89 ± 0.06) yine *tri4* geninin susturulduğu 4F izolatının ikili siRNA atımı (siRNA4E2+siRNA4E3) sonucu ulaşıldı. 36 deneme grubunda da RFU değerleri arasındaki farklılığın Tukey’e göre anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.005$).



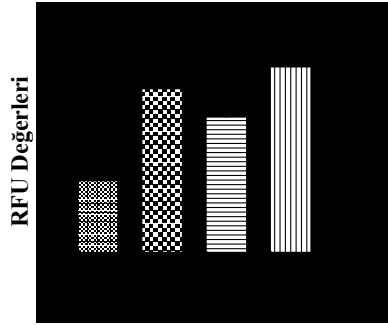
Şekil 4.28: Farklı siRNA kombinasyonlarının pEGFP75 yardımcı plazmidi ile birlikte aktarımı sonucu spektrofotometrik analiz ile elde edilen RFU değerlerinin (A) *F. graminearum* 4F, (B) *F. culmorum* 20F ve 9F izolatlarında grafikte gösterimi.

tri4 ve *tri5* genlerine özgün siRNA moleküllerinin aktarılmadığı, sadece pEGFP75 yardımcı plazmidinin transfeksiyonla aktarıldığı üç izolatlıktan oluşan pozitif kontrol gruplarında da spektrofotometrik analizler yapıldı. Pozitif kontrol grupları negatif kontroller (siRNA molekülleri ve yardımcı plazmid aktarılmamış protoplast kültürleri) ile karşılaştırıldığında RFU değerleri arasındaki farkın anlamlı olduğu ($p < 0.0001$) saptandı (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: Özgün siRNA moleküllerinin aktarılmadığı, sadece pEGFP75 yardımcı plazmidinin transfeksiyonla aktarıldığı izolatlarını temsil ettiği pozitif kontrol grupları ve siRNA molekülleri ve yardımcı plazmid aktarılmamış protoplast kültürlerinin temsil ettiği negatif kontrollere ait spektrofotometrik değerler. *** Kontrol grubuna göre deney gruplarındaki anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p < 0.0001$).

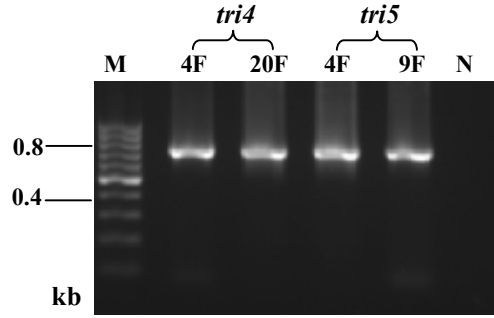
	pEGFP75 Transformasyon Grupları			Kontrol Grupları		
	4F	20F	9F	4F	20F	9F
RFU Ortalama$\pm$SS	2.26 $\pm$ 0.08	1.87 $\pm$ 0.04	2.55 $\pm$ 0.06	1 $\pm$ 0.0	1 $\pm$ 0.0	1 $\pm$ 0.0
Δ485/Δ535$\pm$SS	143.7 $\pm$ 3.21***	152.3 $\pm$ 2.51***	136.3 $\pm$ 0.57***	325.0 $\pm$ 5.0	285.7 $\pm$ 4.9	349.0 $\pm$ 10.15

Her üç örneğin pozitif kontrol gruplarında deney gruplarında olduğu gibi GFP ışması spektrofotometrik analiz ile doğrulanmış oldu. Tablo 4.8 kontrol gruplarının spektrofotometrik analizi ile elde edilen RFU değerleri arasındaki ilişkiyi gösterirken Şekil 4.29’da RFU değerlerine göre bu grupları temsil eden izolatlar verilmektedir.



Şekil 4.29: RFU değerlerine göre pozitif ve negatif kontrol gruplarını temsil eden izolatların grafikte gösterimi.

tri4 ve *tri5* özgün siRNA molekülleri ile birlikte pEGFP75 plazmidinin aktarıldığı 4F, 9F ve 20F izolatlarının genomik DNA’larından *GFP* genine ait 0.7 kb’lık PZR ürünleri çoğaltılarak (Şekil 4.30) transformasyonun gerçekleştiği gösterilirken transfeksiyonun da başarılı bir şekilde gerçekleştiği kabul edildi.



Şekil 4.30: *tri4* ve *tri5* genlerine özgün siRNA aktarılmış 4F, 9F ve 20F izolatların genomik DNA'larında çoğaltılan *GFP* geni. N: negatif kontrol, M: 100 bp DNA boyut markırı.

4.6. siRNA AKTARILAN İZOLATLARDA TRANSKRİPTOMİK VE METABOLOMİK ANALİZ BULGULARI

4.6.1. siRNA Aktarılmış İzolatlarda Gerçek Zamanlı PZR ile Transkriptomik Analiz

tri4 geninde; tekli, ikili, üçlü ve dördü siRNA kombinasyonları ile pAN 7-1 yardımcı plazmidi eşliğinde *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarında gerçekleştirilen susturma; 30 deneme grubunda pozitif ve negatif kontrol, ve endojen gen ile birlikte gerçek zamanlı PZR analizi ile test edildi. Kontroller ve endojen gen hariç transfeksiyonun yapıldığı tüm deneme gruplarında *tri4* gen anlatımı saptanmadı ($\Delta\Delta CT$: 0.00 ± 0.00). Sonuç olarak gerçekleştirilen çalışmada bu genin tamamen susturulduğu görüldü. Bu örnekler için endojen gen ΔCp değerleri 30.00 ± 0.02 - 33.00 ± 0.12 aralığında bulunmuştur.

tri5 geni için tekli ve ikili siRNA kombinasyonlarından oluşan (siRNA51; siRNA52; siRNA51+siRNA52), pAN 7-1 yardımcı plazmidi ile *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarında gerçekleştirilen transfeksiyon işlemi sonrası gen anlatımı toplam 6 deneme grubunda benzer şekilde test edildi. İki *Fusarium* türüne ait tüm deneme gruplarında *tri5* gen anlatımının gerçekleştiği ancak negatif kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı derecede azalmanın olduğu saptandı. ΔCp değerlerinin sırasıyla *tri5* ve endojen gen için 33.27 ± 0.07 - 37.47 ± 0.9 ile 29.94 ± 0.08 - 33.02 ± 0.13 aralığında olduğu, $\Delta\Delta CT$ değerlerinin ise 0.02 - 0.26 aralığında olduğu saptandı (Tablo 4.9). Gen anlatımındaki değişim

değerleri hesaplandığında gen anlatımında %65-95 oranında azalma gözlemlendi. siRNA'nın tekli ve ikili atımları ile gen anlatımı inhibisyonu arasında bir korelasyon gözlenmemiştir. Sonuç olarak *tri4* ve *tri5* genlerinin siRNA aracılı susturma sürecinden farklı düzeylerde etkilendikleri, siRNA aracılı *tri4* geninin %100 susturulmasına karşın *tri5* geninde gen anlatımında azalmanın olduğu ortaya kondu.

Tablo 4.9: Farklı kombinasyonlardaki siRNA moleküllerinin aktarıldığı izolatlarını hedef ve endojen gen anlatım değerleri.

İzolat	siRNA Kombinasyonu	Hedef Gen	Cp		$\Delta\Delta CT$	Azalma (%)
			<i>tri5</i>	β -tubulin	<i>tri5</i>	
4F	sRNAi51	<i>tri5</i>	35.7±0.92	33.02±0.13	0.13	85
4F	siRNA52	<i>tri5</i>	37.47±0.9	32.58±0.05	0.26	70
4F	siRNA51+52	<i>tri5</i>	36.93±0.75	31.7±0.6	0.22	75
9F	sRNAi51	<i>tri5</i>	36.26±0.69	30.62±0.12	0.02	95
9F	siRNA52	<i>tri5</i>	37.9±0.07	32.08±0.15	0.1	73
9F	siRNA51+52	<i>tri5</i>	33.27±0.07	29.94±0.08	0.13	65

siRNA ve vektör aktarımı yapılmamış protoplastlar (negatif kontrol) ve sadece yardımcı vektörün transformasyonla aktarıldığı (pozitif kontrol) örnekler de endojen genle birlikte gerçek zamanlı PZR ile üç izolatta analiz edildi. İki *Fusarium* türüne ait toplam 3 pozitif kontrol grubunda *tri4* ve *tri5* gen anlatımları saptandı (Tablo 4.10) ve herhangi bir vektör aktarılmamış 4F, 9F ve 20F kontrol grupları ile karşılaştırmalar yapılarak oransal gen anlatım değişimi ("Fold changes in gene expression", FCGE) değerlerinin 0.29-4.3 arasında olduğu belirlendi. Bu veriler yardımcı plazmid molekülleri aracılığıyla eksojen kaynaklı bir gen anlatımı düşüşünün olmadığını göstermektedir.

Tablo 4.10: Pozitif kontrol gruplarında *tri4* ve *tri5* gen anlatımı ile ilişkili Cp ve $\Delta\Delta CT$ değerleri.

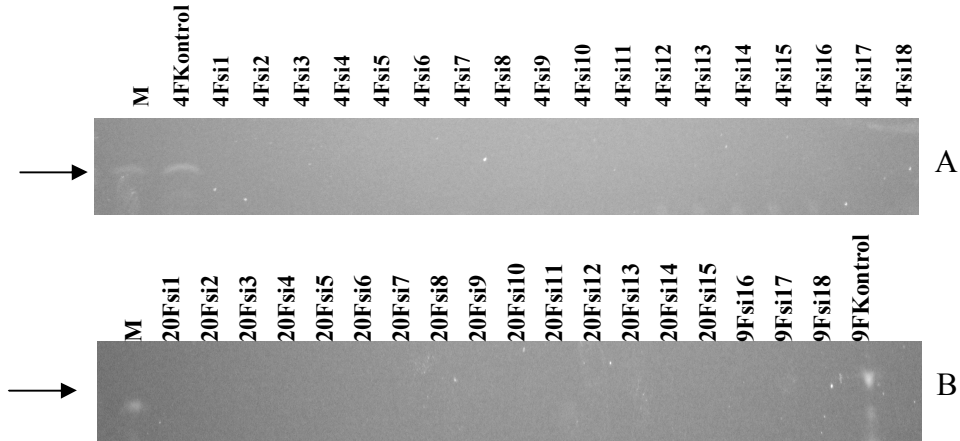
Örnek	Hedef Gen	Cp			$\Delta\Delta CT$		Katsal Değişim
		<i>tri4</i>	<i>tri5</i>	β -tubulin	<i>tri4</i>	<i>tri5</i>	
4F	<i>tri4</i>	26.77±0.37	-	25.52±0.05	0.33	-	2.53
4F	<i>tri5</i>	-	26.23±0.19	25.52±0.05	-	0.25	0.29
20F	<i>tri4</i>	25.32±1.02	24.85±0.26	24.81±0.06	0.92	0.97	4.3
9F	<i>tri5</i>	26.34±0.64	23.39±0.16	25.21±0.03	0.12	0.93	2.51

4.6.2. RT- PZR Analizi

siRNA transfeksiyonu uygulanmış deney gruplarında gerçekleştirilen RT-PZR ile *tri4* ve *tri5* genine ait PZR ürünleri çoğaltılamadı. Bu şekilde gerçek zamanlı PZR işlemi ile elde edilen bulgular doğrulanmış oldu.

4.6.3. Kromatografik Analizler

siRNA aktarımının gerçekleştirildiği toplamda 36 örnekte ve pozitif kontrol gruplarında mikotoksin izolasyonu gerçekleştirildi. Markır, pozitif kontrol ve deney gruplarının bir arada yürütüldüğü ince tabaka kromatografisinde markır ile benzer profilde spot sadece pozitif kontrolden elde edildi (Şekil 4.31). Buna karşın siRNA aktarımının gerçekleştirildiği 36 örnekte de mikotoksine özgün spot gözlenmedi. Rf değerleri markır ve pozitif kontrol grupları için 0.28 olarak hesaplandı. Böylece hem *tri4* hem de *tri5* genlerinin siRNA aracılı susturulduğu örneklerde mikotoksin üretiminin olmadığı gösterildi.



Şekil 4.31: Farklı siRNA kombinasyonlarının pEGFP75 yardımcı plazmidi ile birlikte aktarıldığı *F. graminearum* 4F izolatında (A) ve *F. culmorum* 20F ve 9F izolatlarında (B) ince tabaka kromatografisi. M: trikotesen standardı (Sigma, Almanya). Siyah ok DON mikotoksinini içeren 0.28 Rf değerindeki trikotesen karışımını göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez projesi kapsamında ülkemizde ve dünya genelinde buğday başta olmak üzere arpa ve mısırdaki başak yanıklığı ile kök kürükçülü hastalıklarına neden olan iki *Fusarium* türünde trikotesen mikotoksininin üretiminin durdurulması amaçlanmıştır. Bu kapsamda öncelikle farklı *in vitro* koşulların trikotesen üretimi üzerine etkisi araştırılmış, en yüksek düzeyde gen anlatımı yapan izolatlar seçilerek toksin üretiminden sorumlu *tri4* ve *tri5* gen dizilim bilgileri belirlenmiştir. Quelling protoplast kültürlerinde siRNA aracılı transfeksiyonla gerçekleştirilmiş, transfektantlar *tri4* ve *tri5* gen anlatımı düzeyleri ve nihai toksin üretimi bakımından transkriptomik ve metabolomik düzeyde analiz edilmiştir.

Fitopatojenler agronomik öneme sahip bitkileri enfekte ederek onlara zarar verdikleri gibi ekonomik kayıplara da yol açarlar. Doğrudan meydana getirdikleri bu zararların yanı sıra ayrıca ürettikleri toksik molekülleri ile insan sağlığını da etkilerler. Doğada fungal patojenlerin ürettiği mikotoksinler sıklıkla mantarla enfekte olmuş bitkilerde saptanmaktadır (Parry ve diğ., 1995; Goswami ve Kistler, 2004; Bernardo ve diğ., 2007).

Hastalık etmeni olan ve mikotoksin üreten *F. graminearum* ve *F. culmorum* fitopatojenleri Doğu ve Güney Doğu Anadolu hariç yurdumuzda her bölgede etkili olmaktadır (Tunalı ve diğ., 2006a, b, Altıparmak ve Tunalı, 2009). Dünya genelinde *Fusarium* türlerinde üretilen mikotoksinler kapsamındaki çalışmalar daha çok B sınıfı trikotesenler üzerinde yoğunlaşmıştır. Trikotesenler seskuiterpen yapıdaki sekonder metabolitlerdir ve 100'ün üzerinde farklı çeşidi bulunmaktadır. *Fusarium graminearum* ve *F. culmorum* türleri, dört sınıfı bulunan trikotesenlerden sadece B sınıfını üretmektedir (Sudakin, 2003; Kimura ve diğ., 2007; Obanor ve diğ., 2010). B sınıfı trikotesenlerin üç farklı kemotipe ayrıldığı bilinmekle birlikte, kemotiplerin coğrafik

bölgeye ve konağa göre özelleştiği ve/veya farklılık gösterdiği bilinmektedir (Chandler ve diğ., 2003; Brown ve diğ., 2004; Jennings ve diğ., 2004a, b; Ji ve diğ., 2007; Haratian ve diğ., 2008; Yörük ve Albayrak, 2012). Bu çeşitlilik toksinin üretimiyle ilişkili *tri5* gen kümesindeki varyasyonun bir sonucudur. *tri5* gen kümesi hem toplam boyut bakımından hem de özgün genlerin taşıdığı SNP, delesyon ve insersiyonlar açısından yüksek düzeyde çeşitlilik göstermekte ve belli kemotipte olanlarda pseudogen de taşınmaktadır.

Bir coğrafik bölgede baskın kemotipin belirlenmesi ve mikotoksin dağılımının çıkarılması patojenin enfeksiyon derecesinin ortaya konması bakımından büyük önem taşımaktadır. Tunalı ve diğ. (2006a, 2012) yaptıkları HPLC ve ELISA temelli çalışmada *Fusarium* türlerinin yurdumuzda daha çok trikotesenlerden DON ürettiklerini belirleyerek 1997-2012 yılları arası hastalık oluşturan bu türlerin kemotiplerini ortaya koymuşlardır. Yörük ve Albayrak gerçekleştirdikleri çalışmalar ile *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarının kemotiplerini çıkarmışlar, trikotesen üretiminden sorumlu *tri3*, *tri7* ve *tri13* genlerindeki çeşitliliği belirleyerek izolatları karakterize etmişlerdir (Yörük ve Albayrak, 2012; Yörük ve diğ., 2014-basılmamış). Bir izolat hariç diğer tüm *Fusarium* izolatlarının DON ürettiğini belirlemişler, yurdumuzda NIV kemotipindeki izolatların da bulunduğunu ilk defa rapor etmişlerdir. Mert-Türk ve Gencer (2013) de PZR temelli uygulamalarla Marmara Bölgesinde etkili olan bu iki türe ait izolatların trikotesen B profillerini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmalarla Türkiye’de hastalıklı bitkilerde NIV, 3-ADON ve 15-ADON kontaminasyonunun varlığı da gösterilmiştir. Transkriptomik düzeyinde gerçekleştirdikleri ön çalışmada Albayrak ve Yörük (2012) iki türe ait üçer izolatın trikotesen üretme yeteneklerini *tri3* ve *tri5* genlerinin anlatım düzeylerini belirleyerek ortaya koymuşlar, iki türün de 3-ADON ve 15-ADON üretme yeteneğine sahip olduklarını göstermişlerdir. Ancak transkriptomik düzeydeki en detaylı çalışma bu doktora tez çalışması sırasında gerçekleştirilmiş, çalışmada 38 izolatın trikotesen üretme potansiyeli ortaya konarak gerçek zamanlı PZR aracılığıyla kültür koşullarında üretilen mikotoksin miktarları biyokimyasal yolla görevli enzimleri sentezleyen genlerin (*tri4* ve *tri5*) anlatımının belirlenmesi ile dolaylı olarak gösterilmiştir (Yörük ve Albayrak, 2014).

Farklı *in vitro* koşulların toksin üretimi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda (Cvetnic ve diğ., 2005; Haratian ve diğ., 2008) trikotesen üretiminin, gerçekleştirilecek manipölasyonlar (sıcaklık, pH vb.) ile baskılanabildiği gösterilmiştir. Mg^{+2} uygulaması, ferulik asit eklenmesi ve asidik pH gibi faktörlerin DON üretimini indirgediği saptanmıştır (Sudakin ve diğ., 2003; Pinson-Gadais ve diğ., 2008; Boutigny ve diğ., 2009; Merhej ve diğ., 2010). Bu tez çalışmasında trikotesen üretimi için anlatımı gerekli olan *tri4* ve *tri5* genlerinin susturulması hedeflenmiştir. Bu amaçla öncelikle en yüksek gen anlatımını teşvik eden ortam koşulları araştırılmıştır. Kontrol grubu olarak 25°C ve pH 5.6 koşulları seçilmiştir. Deney grupları ya besi ortamının pH'sının değiştirilmesi, ya da farklı sıcaklık ve H_2O_2 uygulaması ile oluşturulmuştur. Asidik pH'nın, bütün trikotesen tiplerinin sentezi için anlatımı mutlak gerekli olan *tri4* gen anlatımını inhibe ettiği gösterilmiştir. Merhej ve diğ. (2010) de asidik pH ve Mg^{+2} uygulamasının trikotesen üretimi için anlatımı gerekli genlerden *tri5*, *tri6* ve *tri12* genlerinin anlatımını baskıladığını göstermişlerdir. Bu çalışma ile *tri4* gen anlatımının da asidik pH'dan etkilendiği ortaya konmuştur. Buna karşın nötral pH'da gen anlatımının baskılandığı (%30) saptanmış, en yüksek gen anlatımının dolayısıyla da toksin üretiminin gerçekleştiği optimum pH değerinin 5.6 olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde düşük sıcaklık uygulamasının trikotesen üretimi ile ilişkili gen anlatımını baskıladığı (10^2 kat) da belirlenmiştir. Girgin ve diğ. (2001) trikotesen üretiminin nispeten düşük sıcaklıklarda gerçekleşebileceğini ancak optimum değer 25°C olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da toksin üretimi ile ilişkili en yüksek gen anlatımına oda sıcaklığında ulaşılmıştır. Ponts ve diğ. (2009) DON kemotipindeki izolatlarda H_2O_2 uygulamasının toksin üretimini 50 kata kadar artırabildiğini rapor etmişlerdir. Farklı olarak bu çalışmada H_2O_2 uygulaması 3-ADON kemotipindeki *F. culmorum* izolatında gen anlatımını yüksek düzeyde (%90) baskılamıştır. Çalışmadan elde edilen veriler optimum koşulların (25°C, pH 5.6) trikotesen biyosentez yolağında görevli olan ve mikotoksin sentezi için gerekli üç genin en yüksek düzeyde anlatımını teşvik ettiğini göstermektedir. Aynı zamanda patojen-bitki etkileşimi olmaksızın *in vitro* kültürlerinde DON mikotoksininin sentezlendiği de gösterilmiştir. Ancak mikotoksini saflaştırma çalışmalarında patojen-bitki etkileşiminin sağlanması bir gerekliliktir. Bu gibi

çalışmalarda *in vitro* mantar kùltürleri pirinç ve mısır özütleri ile birlikte kùltüre alınarak toksin üretimi arttırılmalıdır (Jennings ve diğ., 2004a; Adejumo ve diğ., 2007).

Tez çalışmaları sırasında quelling ile susturulacak izolatların seçimi gerçek zamanlı PZR ile gerçekleştirildi. Bu amaçla *F. graminearum* ve *F. culmorum* türlerine ait toplam 38 izolatın *in vitro* kùltürlerinde trikotesen üretimi ile ilişkili *tri4* ve *tri5* gen anlatım miktarları karşılaştırıldı. İzolatların gen anlatım değerleri endojen kontrol olan β -*tubulin* geninin anlatımına göre relatif kantitasyon ile hesaplandı. Bu iki genin en yüksek anlatım yaptığı *F. graminearum* izolatının 4F olduğu saptandı. *F. culmorum*'da ise en yüksek *tri4* gen anlatımının 20F izolatında, *tri5* gen anlatımının ise 9F izolatında olduğu belirlendi. Bu şekilde en yüksek gen anlatımı profiline sahip üç izolat (4F, 9F ve 20F) susturma işlemlerinde kullanılmak üzere seçildi. *Fusarium* türlerinde trikotesen analizleri iki farklı yaklaşımla; PZR'a dayalı kemotiplendirme uygulamaları ve kromatografik yöntemler ile gerçekleştirilmektedir (Ji ve diğ., 2007; Haratian ve diğ., 2008; Bocarov-Stancic ve diğ., 2009; Mert-Türk ve Gencer, 2013). PZR temelli kemotiplendirme çalışmaları izolatların ürettiği farklı mikotoksin profillerinin kısa sürede dolaylı olarak, güvenilir biçimde belirlenmesini sağlayabilmektedir. Ancak veriler doğrudan üretilen toksinin kesin miktarının saptanması prensibine dayanmaz. Buna karşın kromatografik uygulamalar ile kalitatif ve semi-kantitatif (ince tabaka kromatografisi ile) ya da kantitatif olarak (gaz kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile) trikotesen miktarları belirlenebilmektedir. Kromatografi uygulamalarının büyük bir kısmı yüksek miktarda toksinin varlığında etkin belirleme olanağı sağlamakta, nispeten yüksek maliyet ve yoğun laboratuvar çalışmalarını gerektirmektedir. PZR temelli transkriptomik analizler ise kısa sürede çok düşük miktardaki mikotoksinin güvenilir biçimde belirlenmesini ve kantitasyonunu olası hale getirmiştir (Waalwijk ve diğ., 2004; Yörük ve Albayrak, 2014). Bu şekilde yüksek sayıda örnekle aynı anda analizler yapılabilmekte, farklı ortam koşullarının toksin üretimi üzerindeki etkisi test edilebilmektedir (Pinson-Gadais ve diğ., 2008; Boutigny ve diğ., 2009; Merhej ve diğ., 2010). Prob temelli PZR uygulamaları ile 384 örnek aynı anda analiz edilebilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001; Herrmann ve diğ., 2007). Mikrodizilim çiplerinin kullanıldığı çalışmalarda ise tek denemede çok yüksek sayıdaki

örnekte birden fazla genin analizi gerçekleştirilebilmektedir (Kallioniemi ve diğ., 2001; Güldener ve diğ., 2006). Ancak günümüzde her alanda kullanılmak üzere geliştirilmiş mikrodizilim çipleri bulunmamaktadır. Ticari olarak satışı yapılanlar sadece belli çalışma konularını kapsayacak şekilde tasarlanmıştır (Guo ve diğ., 2000; Lorio ve diğ., 2005).

siRNA molekülleri iki mekanizma ile gen susturma sürecini tetiklemektedir. Transkripsiyonel baskılamada bu küçük RNA molekülleri nukleusta enzimleri çekerek ya transkripsiyon oranını etkileyip ya da heterokromatin oluşumunu ve yayılımını sağlayıp etkili olurken, transkripsiyon sonrasında ya mRNA molekülleri ile %100 eşleşerek primer transkripti yıkıma taşır ya da kısmi eşleşme ile translasyonu engeller. Quelling çalışmalarında hücreye dışarıdan verilen çift iplikli küçük RNA molekülleri ile daha çok primer transkriptlerin yıkımının sağlanması hedeflenmektedir. Bu nedenle susturulacak genin o organizmadaki nukleotid dizilimi, tasarlanacak siRNA'lar için hedef bölgelerin seçimi büyük önem taşımaktadır. Gerçekleştirilen doktora projesi kapsamında iki genin üç izolatta da çoğaltılarak nukleotid dizilim bilgileri elde edilmiştir. Bu amaçla biyoinformatik araçlar yoğun biçimde kullanılmış, özgün primer molekülleri ile genler tam boyda çoğaltılmış ve ticari vektöre klonlanarak dizilime işlemi gerçekleştirilmiştir. Çift yönlü okumalar sonucunda *tri5* geni için elde edilen 1.2 kb boyutundaki parça, *tri4* geni için elde edilen 1.7 kb'lik parça tam boydaki gen dizilimlerini temsil etmektedir. BLASTN analizleri ile elde edilen nukleotid sıraları referans dizilim bilgileri ile karşılaştırıldığında *tri4* için %94, *tri5* için ise %99 oranında benzerlik saptanmış, "0.0" E değerlerine ulaşılarak çalışmada kullanılan izolatların referans genoma yüksek düzeyde dizi benzerliği taşıdığı ortaya konmuştur. BLASTP analizlerinden elde edilen veriler de yüksek benzerliğin varlığını (%94-100 benzerlik) göstermektedir ve BLASTN analizlerini doğrular niteliktedir. Üç izolat için ikişer gene ait dizilim bilgileri Sequin programı kullanılarak düzenlenmiş ve çeşitli veritabanlarında (NCBI, EMBL [European Molecular Biology Laboratory] ve JDBD [Japanese Database of DNA]) kayıt altına (Aksesyon numaraları: KJ677970, KJ677971, KJ677972, KJ677973, KJ677974 ve KJ677975) alınmıştır. Günümüzde kullanılan veritabanlarında trikotesen üretimi ile ilişkili *tri5* gen kümesine ait çok sayıda total ve

kısmi kayıt yer almaktadır. Ayrıca gen kümesinde bulunan diğer genlerde olduğu gibi *tri4* ve *tri5* için de çok sayıda tüm ya da kısmi dizilim bilgileri bulunmaktadır. Biyoinformatik araçlarla yapılan karşılaştırmalar trikotesen üretimi ile ilişkili genlerde tür içi ve/veya türler arasında yüksek düzeyde çeşitlilik olduğunu göstermektedir. Bu veriler göz önünde bulundurulmalı ve susturma çalışmalarında referans genom yerine organizmanın gen dizilim bilgisi kullanılmalıdır. 4F, 9F ve 20F izolatlarının *tri4* ve *tri5* genleri referans genomla yüksek düzeyde benzerlik taşısa da *tri4* geni için belirlenen 25, *tri5* geni için belirlenen 16 amino asitlik fark susturmanın etkinliğini önemli ölçüde sınırlayacak bir kriterdir. 1700 bp boyutundaki *tri4* ve 1200 bp boyutundaki *tri5* genleri için sırasıyla 75 ve 48 nukleotide denk gelen bu çeşitlilik gen düzeyinde %4'lük varyasyonu ifade ettiğinden siRNA tasarımı için hedef olarak identik bölgelerin kullanımı tercih edilmiştir. Bu nedenle üç izolatta identik bölgeler CLUSTALW analizi ile taranmış ve kullanılacak potansiyel siRNA hedef bölgeleri olarak saptanmıştır. Bu identik bölgelerden intronda yer alanlar değerlendirme dışı bırakılmış, sadece ekzon bölgelerinde olanlar değerlendirmeye alınarak, her ekzon için birer adet siRNA molekülü tasarlanmıştır. *tri4* geni dört (4) adet, *tri5* geni de iki (2) ekzon taşıdığından transfeksiyon işlemlerinde *tri4* için 4, *tri5* için de 2 olmak üzere her gen için birden fazla sayıda siRNA molekülünün kullanılması sağlanmıştır. Bu yaklaşımla siRNA moleküllerinin gen susturma etkinliğinin artırılması hedeflenmiş, gen anlatımının mRNA'nın kırılma aşamasından sonra sitoplazmada post-transkripsiyonel kontrolle inhibe edilmesi amaçlanmıştır.

Fusarium graminearum ve *F. culmorum*, küf mantarları grubunun üyesi olup vejetatif üreme evresinde miselyum yapısına sahiptir. Miselyum oluşturan bölmeli hifler sağlam bir hücre duvarı taşımaktadır (Tutel ve Çırpıcı, 1999; Grün, 2003). *Fusarium* türlerinde manipulasyonlar için hücre duvarı sınırlama yaratırken mekanik ve kimyasal uygulamaları ile elde edilen protoplastlar hem manipulasyonlar için çok daha uygun hedefler olarak kullanılır hem de manipulasyonun başarı şansını arttırırlar. Literatürde *Fusarium* cinsinin de dahil olduğu çok sayıda asklı mantarda, enzim muamelesi ile elde edilen protoplastlarla birlikte sporlar da transformasyonda hedef dokular olarak kullanılırken elektroporasyon, polietilen glikol uygulaması, lityum asetat uygulaması,

biyolistik ve *Agrobacterium* aracılı transformasyon da uygulanan transformasyon metodları arasında yer almaktadır (Diez, 2002). Hedef doku ve manipülasyon metodunun seçiminde maliyet, iş gücü gereksinimi ve yöntemin etkinlik değeri göz önünde bulundurulması gereken ölçütlerdir. *Fusarium* türlerinde gerçekleştirilen transformasyon çalışmalarında sıklıkla protoplastlar hedef doku olarak, polietilen glikol kullanımı da transformasyon mekanizması olarak tercih edilmektedir. (Nakayashiki ve diğ., 1999; Fernandez-Martin ve diğ., 2000; McDonald ve diğ., 2005; Nakayashiki ve diğ., 2005; Scherm ve diğ., 2011). Bu çalışmada protoplast kültürleri litik enzim muamalesi ile elde edilmiştir. Wiebe ve diğ. (1997) litik enzim ile beraber novozim, glukaneks, driselaz gibi farklı enzimleri hem ayrı ayrı hem de farklı kombinasyonlarda denemişler, 1 gr yaş ağırlığa sahip miselyumdan β -glukoronidaz ve driserilaz ile sırasıyla 5×10^7 ve 4×10^9 sayıda protoplast elde etmeyi başarmışlardır. Novozim ile litik enzime göre 10 kat daha fazla protoplast elde etmeyi başarmışlardır. Ancak bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen ön denemelerde litik enzimin novozime göre daha etkin olduğu saptanmış, protoplast eldesinde novozim yerine litik enzimin kullanılması tercih edilmiştir. Litik enzim uygulaması ile 5×10^7 protoplast elde edilerek bu protoplastlardan yardımcı plazmidler eşliğinde transfeksiyon kiti kullanılarak transfektantlar elde edilmiştir.

siRNA molekülleri yardımcı plazmidler ile birlikte protoplastlara aktarılmışlardır. Yardımcı plazmid olarak antibiyotik direnç geni ve yeşil fluoro proteinini kodlayan geni taşıyan plazmid vektörleri kullanılmıştır. Antibiyotik direnç geni taşıyan plazmidin aktarıldığı transfektantların seçilmesi için antibiyotik direnci hakkında yeterli bilgi bulunmayan 4F, 9F ve 20F izolatlarının antibiyotik duyarlılık testleri yapılmıştır. 25-100 µg/ml konsantrasyon aralığında antibiyotik içeren besi ortamlarında kültürlenen üç izolatın da higromisin B'nin çok düşük konsantrasyonlarına bile duyarlı olduğu ortaya konmuştur. 25 µg/ml antibiyotik konsantrasyonunun minimum üremeyi engelleyici değer olduğu belirlenmiştir. Mantarlar doğada kendiliğinden antibiyotik direnci kazanabildiğinden yapılan araştırmalarda antibiyotik konsantrasyon aralığı oldukça yüksek (12.5-200 µg/ml) tutulabilmektedir (Wiebe ve diğ., 1997; Sakaguchi ve diğ., 1998). Ancak bu çalışmada denenen konsantrasyon aralığı antibiyotik duyarlılığını

belirlemeye olanak sağlamıştır. Mevcut çalışmalarda transfeksiyon işleminin doğrulanması amacıyla daha çok *GFP* geninin anlatımını asklı mantarlarda sağlayabilecek uygun promotor ve terminatör bölgesini taşıyan anlatım vektörlerinin kullanıldığı görülmektedir (Kadotani ve diğ., 2003; Nakayashiki, 2005; Nakayashiki ve diğ., 2005). Bu nedenle siRNA atımlarında Kadotani ve diğ. (2003) tarafından geliştirilen pEGFP75 vektörünün kullanımı da tercih edilmiştir. Çalışmada *F. graminearum* 4F izolatına ait protoplastlar için 18, *F. culmorum* 20F için 15, 9F için de 3 olmak üzere toplamda 36 transfeksiyon denemesi transfeksiyon ajanı içeren kit kullanılarak plazmid vektörleri ile birlikte aktarılmış, memeli kültürlerine atım için geliştirilmiş olan transfeksiyon kitinin mantar protoplastlarında da etkin çalıştığı gösterilmiştir. Bir haftalık *Fusarium* kültürlerinden sağlanan transfektantlardan elde edilen, pEGFP75 vektörünün taşıdığı *GFP* geninin anlatımı sonucu üretilen GFP proteinini taşıyan ve ışımaya veren protoplast sayısının $50 \pm 0.0 - 99.33 \pm 10.06$ aralığında olduğu belirlenmiş, spektrofotometrik analizle ışımaya miktarı ölçülmüştür. Elde edilen RFU değerlerine göre vektör aktarılmamış 4F, 9F ve 20F izolatlarına ait kontrol gruplarına kıyasla vektör aktarılanlarda 3 kata kadar artış olduğu belirlenmiştir. Kadotani ve diğ. (2003) bu vektörle 20-120 arasında floresan ışımaya veren transfektantları elde etmişlerdir. Literatürde yer alan çalışmalarda da aynı yaklaşım kullanılmış 20 kata kadar RFU değerleri elde edilmiştir. GFP, hücrede izlenmesi bakımından rekombinant uygulamalarda oldukça elverişli bir seleksiyon aracıdır. Ancak siRNA molekülleri vektörden bağımsız hücrelere aktarılmaktadır. Bu nedenle elde edilen ışımaya miktarı siRNA aktarım etkinliği hakkında elverişli veri olarak değerlendirmeye alınamasa da transfeksiyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermesi bakımından büyük önem taşımaktadır. Vektör transformasyonunun etkinliği vektörlerde taşınan *hph* ve *GFP* genlerinin PZR aracılı doğrulanmasıyla, siRNA transfeksiyonunun etkinliği de hedeflenen genlerin aktarımlarındaki azalma ve/veya inhibisyonun gerçek zamanlı PZR aracılı gösterilmesiyle doğru ve hassas biçimde belirlenebilir. Transfeksiyonda birlikte aktarılan vektörlerdeki bu genlerin PZR ile çoğaltılarak doğrulanması vektörle eş zamanlı hücrelere aktarılan siRNA moleküllerinin hücre içine girişinin de dolaylı olarak doğrulanmasını, transfeksiyonun da başarılı şekilde gerçekleştiğinin kabul edilmesini sağlamıştır. Yardımcı vektörler kullanılmaksızın da siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilebilmektedir. *Aspergillus niger*'de hedefe özgün siRNA molekülleri bir

yardımcı vektör kullanılmaksızın protoplast kültürlerine aktarmıştır (Barnes ve diğ., 2008). Ancak siRNA transfeksiyonunun doğrulanmadığı bu çalışmada siRNA moleküllerinin hücrede meydana getirdiği değişiklik gen anlatımı analizi ile izlenmiştir. Farklı olarak bu tez projesi kapsamında siRNA moleküllerinin hücreye girişi dolaylı olarak izlenmiş, ön seleksiyonu gerçekleştirilen olası transfektantlarda siRNA molekülleri ile hedef mRNA etkileşimi sonucu meydana gelen değişim moleküler düzeyde gösterilmiştir.

Susturma çalışmaları *Fusarium* türleri arasında sadece *F. graminearum* ve *F. culmorum* türlerinde vektörler aracılığıyla, seçilen, intron taşımayan en küçük gende, *tri6* geninde yapılmıştır. Bunlardan ilki *F. graminearum*'da gerçekleştirilmiş olup, transkriptomik düzeyde *tri6* gen anlatımında baskılamının gösterildiği bir doğrulama basamağını içermemektedir (McDonald ve diğ., 2005). Bu çalışmada elde edilen transformantlar ile bitkilerde enfeksiyon sağlanmış, hastalık oluşturma etkinliğinde meydana gelen azalma *tri6* geninin RNAi mekanizması ile baskılandığı şeklinde yorumlanmıştır. Scherm ve diğ. (2011) ise *F. culmorum*'da bu geni susturmayı amaçlamışlardır. Bazı izolatlarda %80'e kadar susturma elde etmişler, bu izolatların hastalık oluşturma oranlarında da azalma belirlemişlerdir. Ancak bazı izolatların gen anlatımı (gerçek zamanlı PZR ile) ve hastalık oluşturma insidansında bir artış olduğunu da göstermişlerdir. Bu durum transformasyonun aynı zamanda *tri6* geninin aşırı anlatımına yol açtığı şeklinde yorumlanabilir. Literatürde bu iki çalışma dışında *tri5* gen kümesindeki diğer genlerin RNAi aracılı susturulduğu başka örnek bulunmamaktadır. Bu nedenle doktora tezi kapsamında *tri4* ve *tri5* genlerinin siRNA aracılı susturulduğu çalışmanın özgünlüğü yüksektir. siRNA moleküllerinin tekli ve farklı kombinasyonlarda *tri4* genini susturmak üzere aktarıldığı iki türü kapsayan 30 deneme grubunda tüm izolatlarda da gen anlatımının tamamen baskılandığı (%100), *tri5* genine ait siRNA'ların aktarıldığı toplam 6 deneme grubunda da tüm izolatlarda gen anlatımının %65-95 arasında azaldığı saptanmıştır. *tri5* genine özgün olarak tasarlanan siRNA moleküllerinin çoklu atımlarının tekli atıma göre daha fazla gen anlatımını baskılaması gerekirken bu iki stratejinin kullanıldığı denemelerde RNAi etkinliği bakımından anlamlı bir inhibisyon korelasyonunun olmadığı gözlenmiştir. *tri4* geninin anlatımı %100 baskılandığı için

dört farklı ekzona göre tasarlanan siRNA'ların tekli ve farklı kombinasyonlar halinde atımlarının RNAi etkinlikleri karşılaştırılamamıştır. Veriler gen susturma süreçlerinde kullanılacak küçük RNA moleküllerinin nukleotid dizilimlerinin önemini, hedef mRNA molekülü ile %100 identik olması durumunda baskılamayı gerçekleştirebildiğini göstermektedir. *Fusarium* türlerinin *tri5* gen kümesindeki alternatif kırılma süreçleri hakkında bilgi eksikliği bulunmaktadır. siRNA transfeksiyonu ile intron bölgelerinin susturmadaki etkinliği belirlenerek bu genlerdeki alternatif kırılma süreçlerinin varlığı da araştırılabilir.

Bir hücrede bulunan ve RNAi sürecini tetikleyen küçük RNA moleküllerinin hedef mRNA dizilimleri olduğu gibi “mismatch” ya da kısmi eşleşme ile etkilediği diğer genlerin primer transkriptleri de bulunabilir. Sonuç olarak tek bir çift iplikli küçük RNA molekülü hücrede birden fazla transkripti RNAi mekanizması ile baskılayabilir. Hatta gen anlatımını transkripsiyonel kontrol mekanizması ile düzenleyebilir. Tasarlanan toplam 6 siRNA molekülü ile hedeflenen *tri4* ve *tri5* genlerinin baskılandığı çalışmada elde edilen transfektantların optimum üreme kapasitesinde bir değişime yol açmadığı gözlemlenmiştir. Ancak, kültürün 5. gününde normalde spor oluşumu gerçekleşen *F. culmorum* 9F ve 20F izolatlarında spor formasyonunun meydana gelmediği belirlenmiştir. Bu nedenle mantarın üreme ve sporulasyonundan sorumlu *VeA* (Aksesyon no: JN635273.1) ve *FcStuA* (Aksesyon no: FGSG_10129.3) genlerinin PH-1 referans genomundaki dizilim bilgilerine ulaşılmış, biyoinformatik araçlar kullanılarak 6 siRNA molekülünün bu genlere dizi homolojisi araştırılmıştır. Yapılan tarama sonucunda tasarlanan siRNA molekülleri için bu genlerin hedef alınmadığı, spor oluşumunun post-transkripsiyonel kontrolle RNAi aracılığıyla engellenemeyeceği de gösterilmiştir. Ancak, bu küçük RNA moleküllerinin transkripsiyonel aşamadaki kontrol etkinliği hakkında bir yoruma gidilebilmesi olası görülmemektedir. Ayrıca, genetik manipülasyonun yapıldığı hücrelerde dış kaynaklı DNA moleküllerinin aktarımı sonucu RNAi, rekombinasyon gibi mekanizmalar tetiklenmese de hücrelerde bazı süreçlerin etkilenebilme olasılığı da bulunmaktadır. Transfeksiyon sırasında kullanılan yardımcı plazmidlerin pozitif kontrollerde böyle bir değişimi tetiklemediği göz önüne alındığında bu durumu transfeksiyonun bir sonucu olarak değerlendirmek doğru bir

yaklaşım değildir. *Fusarium*'da *tri6* geninin hedeflendiği diğer çalışmalarda da manipölasyonların hastalık oluşturma insidansını etkilediği belirlenmiş, benzer şekilde manipölasyon ile hücrede farklı süreçlerin de etkilenebildiği rapor edilmiştir.

Doktora tez projesi kapsamında üç *Fusarium* izolatında B sınıfı trikotesenlerinden DON'un sentezlendiği biyokimyasal yolaktaki *tri4* ve *tri5* genleri siRNA aracılı RNAi mekanizması ile baskılanmıştır. Aynı zamanda son ürün olan DON mikotoksininin de üretilmediği belirlenmiş, bu şekilde *tri5* gen kümesinde bulunan bu genlerin quelling için doğru hedefler olarak seçildiği gösterilmiştir. Kimura ve diğ. (2007) *tri4* genini trikotesen üretiminin baskılanmasında önemli bir aday inhibitör olarak göstermişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen veriler de Kimura ve diğ. (2007)'nin bu öngörüsünü doğrular niteliktedir. siRNA aracılı transfeksiyon süreçleri farklı hücre tiplerinde başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Ancak günümüzde *Fusarium* türlerine bu sistem kullanılarak başarılı bir susturma henüz gerçekleştirilememiştir. Bu tez çalışması ile birlikte hem bu genusa ait türlerde siRNA aracılı gen susturma süreci etkinliği ilk defa gösterilmiş hem de daha önceden trikotesen üretiminin durdurulmasında kullanılmamış iki gen hedeflenerek toksin üretimi inhibe edilebilmiştir. Elde edilen veriler *Fusarium* türlerinde mikotoksin kontaminasyonunun en aza indirilmesi için siRNA yaklaşımının uygulanabilirliğini ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

- Adejumo, T.O., Hettwer, U., Karlovsky, P., 2007, Survey of maize from south-western Nigeria for zearalenone, a- and b-zearalenols, fumonisin B1 and enniatins produced by *Fusarium* species, *Food additives and contaminants*, 24 (9), 993-1000.
- Abdullahi, I., Koerbler, M., Stachewicz, H., Winter, S., 2005, The 18S rDNA sequence of *Synchytrium endobioticum* and its utility in microarrays for the simultaneous detection of fungal and viral pathogens of potato, *Applied microbiology and biotechnology*, 68, 368–375.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P.V.N., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R..K., Mukherjee, S.K., 2003, RNA interference: biology, mechanism, and applications, *Microbiology and molecular biology reviews*, 67 (4), 657-685.
- Albayrak, G. ve Yörük, E., 2012, *Fusarium graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarında trikotesen üretimiyle ilişkili *tri5* ve *tri3* genlerinin ve transkriptlerinin analizi, *Elektronik mikrobiyoloji dergisi TR*, 10 (1), 11-21.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewi, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2007, *Molecular biology of the cell*, Garland Science, New-York, 0815341059.
- Alexander, N.J., McCormick, S.P., Waalwijk, C., Lee, T.V.D., Proctor, R.H., 2011, The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*, *Fungal genetics and biology*, 48, 485-95.
- Altıparmak, G. And Tunalı, B., 2009, Indicende of *Fusarium* species and levels of fumonisin B1 in corn in the Samsun province of Turkey, *Phytoprotection*, 90 (3), 97-106.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs, *Nucleic acid research*, 17 (25), 3389-3402.
- Aravin, A.A., Hannon, G.J., Brennecke, J., 2007, The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race, *Science*, 318 (2), 761-764.
- Bai, G., Desjardins, A.E., Plattner, R.D., 2001, Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes, *Mycopathologia*, 153, 91-98
- Bai, G. and Shaner, G., 2004, Management and resistance in wheat and barley to fusarium head blight, *Annual review of phytopathology*, 42, 135-161.

- Baldwin, T.K., Urban, M., Brown, N. and Hammond-Kosack, K.E., 2010, A role for topoisomerase I in *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* pathogenesis and sporulation, *Molecular plant-microbe interactions*, 23, 566-577.
- Barnes, S.E., Alcocer, M.J.C., Archer, D.B., 2008, siRNA as a molecular tool for use in *Aspergillus niger*, *Biotechnological letters*, 30, 885-890.
- Baum, J.A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G.R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T., Roberts, J., 2007, Control of coleopteran insect pests through RNA interference, *Nature biotechnology*, 25, 1322-1326.
- Beckman, C.H., Bell, A.A., Marshall, M.E., 1981, *Fungal wilt diseases of plant*, Academic press, New York.
- Bernardo, A., Bai, G., Guo, P., Xiao, K., Guenzi, A.C., Ayoubi, P., 2007, *Fusarium graminearum*-induced changes in gene expression between *Fusarium* head blight-resistant and susceptible wheat cultivar, *Functional and integrative genomics*, 7, 69-77.
- Bimboim, H.C. and Doly, J., 1979, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic acids research*, 7 (6), 1513-1523.
- Bocarov-Stancic, A.S., Levic, J.T., Stankovic, S.Z., Stanisic, M. M., Bilek, S. O., 2009, dynamics of deoxynivalenol and zearalenone production by *Fusarium graminearum* under laboratory conditions, *Matica srpska novi sad*, 116, 15-24.
- Booth, C., 1977, *Fusarium laboratory guide to the identification of the major species*. Commonwealth Mycological Institute, London.
- Bowden, R.L. and Leslie, J.F., 1999, Sexual recombination in *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 89, 182-188.
- Boutigny, A.L., Barreau, C., Vessela Atanasova-Penichon, Marie-Noelle Verdal-Bonnin, Laetitia Pinson-Gadais, Florence Richard-Forget, 2009, Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures, *Mycological research*, 113, 746-753.
- Brown, D.W., Dyer, R.B., McCormick, S.P., Kendra, D.F., Plattner, R.D., 2004, Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster, *Fungal genetics and biology*, 41, 454-462.
- Calin, G.A. and Croce, C.M., 2006, MicroRNA signatures in human cancers, *Nature reviews*, 6, 857-866.
- Campbell, T.N. and Choy, F.Y.M., 2005, RNA interference: past, present and future, *Current issues in molecular biology*, 7, 1-6.

- Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., and Morgan, R.A., 2001, Specific inhibition of gene expression by small double stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proceedings of the national sciences USA*, 98, 9742-9747.
- Carter, J.P., Rezanoor, H.N., Desjardins, A.E., Nicholson, P., 2000, Variation in *Fusarium graminearum* isolates from Nepal associated with their host of origin, *Plant pathology*, 49, 452-460.
- Carter, J.P., Rezanoor, H.N., Holden, D., Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Nicholson, P., 2002, Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*, *European journal of plant pathology*, 108, 573-583.
- Champail, A., Dore, T., Fourbet, J.F., 2004, Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains, *Plant science*, 166, 1389-1415.
- Chandler, E.A., Simpson, D.R., Thomsett, M.A., Nicholson, P., 2003, Development of PCR assays to *tri7* and *tri13* trichothecene biosynthetic and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*, *Physiological and molecular plant pathology*, 62, 355-367.
- Cheng, J.C., Moore, T.B., Sakamoto, K.M., 2003, RNA interference and human disease, *Molecular genetics and metabolism*, 80, 121-128.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L., 1972, Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of escherichia coli by r-factor DNA, *Proceedings of the national sciences*, 69 (8), 2110-2114.
- Constantin G., D., Krath, B.N., Macfarlane, S.A., Nicolaisen, M., Johansen, I. E., Lund, O. S., 2004, Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species, *The plant journal*, 40, 622-631.
- Cuomo, C.A., Guldener, U., Xu, J.R., Trail, F., Turgeon, B.G., Pietro, A.D., Walton, J.D., Ma, L.J., Baker, S.E., Rep, M., Adam, G., Antoniw, J., Baldwin, T., Calvo, S., Chang, Y.L., Decaprio, D., Gale, L.R., Gnerre, S., Goswami, R.S., Koscak, K.H., Harris, L.J., Hilbrun, K., Kennell, J.C., Kroken, S., Magnuson, J.K., Mannhaupt, G., Mauceli, E., Mewes, H.W., Mitterbauer, R., Muehlbauer, G., Mensterkotter, M., Nelson, D., O'Donnell, K., Quellet, T., Qi, W., Quesneville, H., Roncero, M.I.G., Seong, K.Y., Tetko, I.V., Urban, M., Waalwijk, C., Ward, T.J., Yao, J., Birren, B.W., Kistler, H.C., 2007, The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization, *Science*, 317, 1400-1402.
- Cvetnic, Z., Pepeljnjak, S., Šegvi, M., 2005, Toxigenic potential of *Fusarium* species isolated from non-harvested maize, *Archives of Industrial Hygiene Toxicology*, 56, 275-280.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D.G., 2001, Plant pathogens and integrated defence responses to infection, *Nature*, 411, 826-833.

- Dawe, R.K., 2004, RNA interference on chromosomes, *Nature genetics*, 36 (11), 1141-1142.
- Desjardins, A.E., Hohn, T.M., McCormick, S.P., 1993, Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics and significance, *Microbiological reviews*, 57 (3), 595-604.
- Desjardins, A.E., Proctor, R.H., Bai, G., McCormick, S.P., Shaner, G., Beuchley, G., Hohn, T.M., 1996, Reduced virulence of trichothecene nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat Weld tests, *Molecular plant-microbe interactions*, 9, 775-781.
- Desjardins, A.E., 2006, *Fusarium mycotoxins: Chemistry, genetics and biology*, APS Press, Minnesota.
- Desjardins, A.E. and Proctor, R., H., 2007, Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins, *International journal of foodmicrobiology*, 119, 47-50.
- Dickenson, M., 2003, *Molecular plant pathology*, Advanced Text, Nottingham, 1 85996 044 8
- Diez, B.R., 2002, Strategies for the transformation of filamentous fungi, *Journal of applied microbiology*, 92, 189-195.
- Dinolfo, M.I., Stenglein, S.A., Moreno, M.V., Nicholson, P., Jennings, P., Salerno, G.L., 2010, ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England, *European journal of plant pathology*, 127, 483-491.
- Doohan, F.M., Weston, G., Rezanoor, H.N., Parry D.W., Nicholson, P., 1999, Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of *tri5* by *Fusarium* species *in vitro* and in planta, *Applied and environmental microbiology*, 65 (9), 3850-3854.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, 19, 11-15.
- Dignani, M.C. and Anaissie, E., 2004, Human fusariosis, *Clinical microbiology and infection*, 10, 67-75.
- Du, Q., Thonberg, H., Wang, J., Wahlestedt, C., Liang, Z., 2005, A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites, *Nucleic acids research*, 33 (5), 1671-1677.
- Dyakov, T.Y., Dzhavakhly, V.G., Korpela, T., 2007, *Comprehensive and molecular phytopathology*, Elsevier, Amsterdam, 978-0-444-52132-3.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001, Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate, *EMBO J.*, 20, 6877-6888.

- Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K., Tuschl, T., 2002, Analysis of gene functions in somatic mammalian cells with small interfering RNAs, *Methods*, 26, 199–213.
- Fernandez-Martin, R., Cerda-Olmeda, E., Avalos, J., 2000, Homologous recombination and allele replacement in transformants of *Fusarium fujikuroi*, *Molecular genetics and genomics*, 263, 838-845.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998, Potent and specific genetic interference by doublestranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 391, 806-811.
- Foroud, N.A. and Eudes, F., 2009, Trichothecenes in cereal grains, *International journal of molecular sciences.*, 10, 147-173.
- Frandsen, R.J., Nielsen, N.J., Maolanon, N., Sørensen, J.C., Olsson, S., Nielsen, J., Giese, H., 2006, The biosynthetic pathway for aurofusarin in *Fusarium graminearum* reveals a close link between the naphthoquinones and naphthopyrones, *Molecular microbiology*, 61, 1069-1080.
- Gagkaeva, T.Y. and Mattila, T.Y., 2004, Genetic diversity of *Fusarium graminearum* in Europa and Asia, *European journal of plant pathology*, 110, 551-562.
- Gale, L.R., Bryant, J.D., Calvo, S., Giese, H., Katan, T., O'Donnel, K., Suga, H., Taga, M., Usgaard, T.R., Ward, T.J., Kistler, H.C., 2005, Chromosome complement of the fungal plant pathogen *Fusarium graminearum* based on genetic and phsical mapping and csytological observations,, *Genetics society of America*, 171, 985-1001.
- Gerlach W. and Nirenberg H., 1982, *The genus Fusarium, A pictorial atlas*, Kommissionsverlag Paul Parey, Hamburg.
- Gilmore, S.R., Gräfenhan, T., Louis-Seize, G., Seifert, K.A., 2009, Multiple copies of cytochrome oxidase 1 in species of the fungal genus *Fusarium*, *Molecular ecology resources*, 9 (1), 90-98.
- Girgin, G., Başaran, N., Şahin, G., 2001, Dünya’da ve Türkiye’de insan sağlığını tehdit eden mikotoksinler, *Türk hijyen ve deneyisel biyoloji dergisi*, 58 (3), 97-118.
- Gordon, K.H.J. and Waterhouse, P.M., 2007, RNAi for insect-proof plants, *Nature biotechnology*, 25, 1231-1232.
- Goswami, R.S. and Kistler, H.C., 2004, Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crop, *Molecular plant pathology*, 5 (6), 515-525.
- Grün, C.H., 2003, *Structure and biosynthesis of fungal α -glucans*, Utrecht University, Netherlands, 90-393-3300-9.
- Guo, S. and Kemphues, K.J., 1995, *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed, *Cell*, 81, 611-620.

- Guo, Q.M., Malek, R.L., Kim, S., Chiao, C., He, M., Ruffy, M., Sanka, K., Lee, N.H., Dang, C.V., Liu, E.T., 2000, Identification of c-Myc Responsive Genes Using Rat cDNA Microarray, *Cancer research*, 60, 5922-5928.
- Gutleb, A.C., Morrison, E., Murk, A.J., 2002, Cytotoxicity assay for mycotoxins produced by *Fusarium* strains, *Environmental toxicology and pharmacology*, 11, 309-320.
- Güldener, U., Seong, K.Y., Boddu, J., Cho, S., Trail, F., Xu, J.R., Adam, G., Mewes, H.W., Muehlbauer, G.J., Kistler, H.C., 2006, Development of a *Fusarium graminearum* AVymetrix GeneChip for proWling fungal gene expression in vitro and in planta, *Fungal genetics and biology*, 43, 316-325.
- Hammond-Kosack, K., Urban, M., Baldwin, T., Daudi, A., Rudd, J., Keon, J., Lucas, J., Maguire, K., Korniyukhin, D., Jing, H.C., Bass, C., Antoniw, J., 2004, Plant pathogens: how can molecular genetic information on plant pathogens assist in breeding disease resistant crops, *New directions for a diverse planet*, 44, 1-18.
- Hannon, G.J., 2002, RNA interference, *Nature*, 418, 244-251.
- Haratian, M., Sharifnabi, B., Alizadeh, A., Safaie, N., 2008, PCR analysis of the tri13 gene to determine the genetic potential of *Fusarium graminearum* isolates from Iran to produce nivalenol and deoxynivalenol, *Mycopathologia*, 166, 109-116.
- Haynes, K.A., Westerneng, T.J., Fell, J.W., Moens, W., 1995, Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA, *Journal of medical and veterinary mycology*, 33, 319-325.
- Hernández-Lauzardo, A.N., Bautista-Baños, S., Valle, M.G.V., Trejo-Espino, J.L., 2005, Identification of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., Causal agent of rhizopus rot disease of fruits and vegetables, *Revista Mexicana de fitopatología*, 66 (24), 65-69.
- Herrmann, M.G., Durtschi, J.D., Wittwer, C.T., Voelkerding, K.V., 2007, Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping, *Clinical chemistry*, 53 (8), 1544-1548.
- Hornok, L., Waalwijk, C., Leslie, J.L., 2007, Genetic factors affecting sexual reproduction in toxigenic *Fusarium* species, *International journal of food microbiology*, 119, 54-58.
- Hue, F.X., Huerre, M., Rouffault, M.A., Bievre, C.D., 1999, Specific detection of *Fusarium* species in blood and tissues by a PCR technique, *Journal of clinical microbiology*, 37, 2434.
- Jennings, P., Coates, M.E., Walsh, K., Turner, J.A., Nicholson, P., 2004a, Determination of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales, *Plant pathology*, 53, 643-652.

- Jennings, P., Coates, M.E., Turner, J.A., Chandler, E.A., Nicholson, P., 2004b, Determination of deoxinivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay, *Plant pathology*, 53, 182-190.
- Ji, L., Cao, K., Hu, T., Wang, S., 2007, Determination of deoxinivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium graminearum* isolates from China by PCR assay, *Journal of phytopathology*, 155, 505-512.
- Judge, A.D., Bola, G., Lee, A.C.H., MacLachlan, I., 2005, Design of noninflammatory synthetic sirna mediating potent gene silencing *in vivo*, *Molecular therapy*, 13 (3), 494-505.
- Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y., Mayama, S., 2003, RNA Silencing in the Phytopathogenic Fungus *Magnaporthe oryzae*, *MPMI*, 16 (9), 769-776.
- Kallioniemi, O.P., Wagner, U., Kononen, J., Sauter, G., 2001, Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer, *Human molecular genetics*, 10 (7), 657-662.
- Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D.P., Zipperlen, P., Ahringer, J., 2003, Systematic functional analysis of *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi, *Nature*, 421, 231-237.
- Kang, K., Zhong, J., Jiang, L., Liu, G., Gou, C.Y., Wu, Q., Wang, Y., Luo, Y., Gou, D., 2013, Identification of microRNA-Like RNAs in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* by solexa sequencing, *Plos one*, 8, 1-7.
- Karaboz, İ. ve Çolak, C., 2007, Antisens teknolojisi, *Elektronik Mikrobiyoloji dergisi TR*, 5 (2), 14-37.
- Khatibi, P.A., Montanti, J., Nghiem, N., Hicks, K.B., Berger, G., Brooks, W.S., Griffey, C.A., Schmale, D.G., 2011, Conversion of deoxynivalenol to 3-acetyldeoxynivalenol in barley-derived fuel ethanol co-products with yeast expressing trichothecene 3-O-acetyltransferases, *Biotechnology for biofuels*, 4 (26), 1-13.
- Kiger, A., Baum, B., Jones, S., Jones, M., Coulson, A., Echeverri, C., Perrimon, N., 2003, A functional genomic analysis of cell morphology using RNA interference, *Journal of biology*, 2 (4), 27.1-15.
- Kim, J.E., Jin, J., Kim, H., Kim, J.C., Yun, S.H., Lee, Y.W., 2008, Functional characterization of genes located at the aurofusarin biosynthesis gene cluster in *Gibberella zeae*, *Plant pathology journal*, 24, 8-16.
- Kimura, M., Tokai, T., O'Donnell, K., Ward, T.J., Fujimura, M., Hamamoto, H., Shibata, T., Yamaguchi, I., 2003, The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes, *FEBS letters*, 539, 105-110.

- Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., Fujimura, M., 2007, and genetic studies of *Fusarium trichothecen* pathways gene and evolution, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71, 2105-2123.
- Konuk, M., 2004, *Moleküler Biyoloji*, Nobel Yayınevi, Ankara, 9755915966.
- Laday, M., Juhasz, A., Mule, G., Moretti, A., Szecsi, A., Logrieco, A., 2004, Mitochondrial DNA diversity and lineage determination of European isolates of *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*), *European journal of plant pathology*, 110, 545-550.
- Large, E.C., 1940, *The advances of the fungi*, Jonathon Cape, London, 19410500188.
- Lau, S.K.P., Chow, W.N., Wong, A.Y.P., Yeung, J.M.Y., Bao, J., Zhang, N., Lok, S., Woo, P.C.Y., Yuen, K.Y., 2013, Identification of MicroRNA-Like RNAs in mycelial and yeast phases of the thermal dimorphic Fungus *Penicillium marneffei*, *Plos neglected tropical diseases*, 7(8): 1-14
- Lauren, D.R. and Smith, W.A., 2001, Stability of *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearelenone in ground maize under typical cooking conditions, *Food additives and contaminants*, 18, 1011-1016.
- Leisova, L., Kucera, L., Chrpova, J., Sykorova, S., Sip, V., Ovesna, J., 2006, Quantification of *Fusarium culmorum* in wheat and barley tissues using Real-Time PCR in comparison with DON content, *Journal of phytopathology*, 154, 603-611.
- Leonard, K.J. and Szabo, L.J., 2005, Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*, *Molecular plant pathology*, 6, 99-111.
- Llorens, A., Hinojo, M.J., Mateo, R., Medina, A., Valle-Algarre, F.M., Gonzalez-Jaen, M.T., Jimenez, M., 2006, Variability and characterization of mycotoxin producing *Fusarium spp.* isolates by PCR-RFLP analysis of the IGS-rDNA region, *Antonie van Leeuwenhoek*, 89, 465-478.
- Li, W.X., and Ding, S.W., 2001, Viral suppressors of RNA silencing. *Current opinion in biotechnology*, 12, 150-154.
- Livak, J.K. and Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, *Methods*, 25, 402-408.
- Lee, T., Han, Y.H., Kim, K.H., Yun, S.H., Lee, Y.W., 2002, *Tri13* and *Tri7* determine deoxynivalenol- and nivalenol- producing chemotypes of *Gibberella zeae*, *Applied and environmental microbiology*, 68, 2148-2154.
- Lorio, M.V., Ferracin, M., Liu, C.G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Me'nard, S., Palazzo, J.P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G.A., Querzoli, P., Negrini, M., Croce, C.M., 2005, MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer, *Cancer research*, 65, 7065-7070.

- Maheswari, R., 2005, *Fungi, experimental methods in biology*, Taylor and Francis, New Orleans, 1-57444-468-9.
- Malhotra, P., Dasaradhi, P.V.N., Kumar, A., Mohmmmed, A., Agrawal, N., Bhatnagar, R.K., Chauhan, V.S., 2002, Double-stranded RNA-mediated gene silencing of cysteine proteases (falcipain -1 and -2) of *Plasmodium falciparum*, *Molecular microbiology*, 45, 1245-1254.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold spring harbor laboratory press, New-York.
- Marasas, W.F.O., 1995, Fumonisin: their implications for human and animal health, *Natural toxins*, 3, 193-198.
- Marín, P., Jurado, M., Magan, N., Vázquez, C., Jaén, M. T. G., 2010, Effect of solute stress and temperature on growth rate and *tri5* gene expression using real time RT-PCR in *Fusarium graminearum* from Spanish wheat, *International journal of food microbiology*, 140 (2-3), 169-174.
- McDonald, T., Brown, D., Keller, N.P., Hammond, T.M., 2005, RNA silencing of mycotoxin production in *Aspergillus* and *Fusarium* species, *Molecular plant-microbe interactions*, 18 (6), 539-545.
- McRobert, L. and McConkey, G.A., 2002, RNA interference (RNAi) inhibits growth of *Plasmodium falciparum*, *Molecular and biochemical parasitology*, 199, 273-278.
- Merhej, J., Boutigny, A.L., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Barreau, C., 2010, Acidic pH as a determinant of TRI gene expression and trichothecene B biosynthesis in *Fusarium graminearum*, *Food additives and contaminants*, 27 (5), 710-717.
- Mert-Türk, F. and Gencer, G., 2013, Distribution of the 3-AcDON, 15-AcDON, and NIV chemotypes of *Fusarium culmorum* in the North-West of Turkey, *Plant protection science*, 49 (2), 57-64.
- Miedaner, T., Schilling, A.G., Geiger, H.H., 2001, Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries, *Journal of phytopathology*, 149, 641-648.
- Miedaner, T., Cumagun, C.J.R., Chakraborty, S., 2008, Population genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*, *Journal of phytopathology*, 156, 129-139.
- Miedaner, T., Caixeta, F., Talas, F., 2013, Head-blighting populations of *Fusarium culmorum* from Germany, Russia and Syria analyzed by microsatellite markers show a recombining structure, *European journal of plant pathology*, 137, 743-752.

- Mishra, P.K., Fox, R.T.V., Culham, A., 2003a, Inter simple sequence repeat and aggressiveness analysis revealed high genetic diversity, recombination and long-range dispersal in *Fusarium culmorum*, *Annals of applied biology*, 143, 291-301.
- Mishra, P.K., Fox, R.T.V., Culham, A., 2003b, Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria, *FEMS microbiology letters*, 218, 329-332.
- Mishra, P.K., Tewari, J.P., Clear, R.M., Turkington, T.K., 2004, Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*, *Annals of applied biology*, 145, 299-307.
- Mishra, P.K., Tewari, J.P., Clear, R.M., Turkington, T.K., 2006, Genetic diversity and recombination within populations of *Fusarium pseudograminearum* from western Canada, *International microbiology*, 9, 65-68.
- Monds, R.D., Crome, M.G., Denis, R., Lauren, M.M., Marshall, J., 2005, *Fusarium graminearum*, *F. cortaderiae* and *F. pseudograminearum* in New Zealand: molecular phylogenetic analysis, mycotoxin chemotypes and co-existence of species, *Mycological research*, 109 (4), 410-420.
- Morita, T., Mochizuki, Y., Aiba, H., 2006, Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction, *Proceedings of the national sciences*, 103 (13), 4858-4863.
- Morris, K.V., 2008, *RNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells*, RNA Interference. Current Topics in Microbiology and Immunology, In: Paddison P.J. and Vogt P.K. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, 320.
- Nakayashiki, H., Kiyotomi, K., Tosa, Y., Mayama, S., 1999, Transposition of the retrotransposon MAGGY in heterologous species of filamentous fungi, *Genetics*, 153, 693-703.
- Nakayashiki, H., 2005, RNA silencing in fungi: Mechanisms and applications, *FEBS letters*, 579, 5950-5957.
- Nakayashiki, H., Hanada, S., Quoc, N. B., Kadotani, N., Tosa, Y., Mayama, S., 2005, RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi, *Fungal genetics and biology*, 42, 275-283.
- Nakayashiki, H., Kadotani, N., Mayama, S., 2006, Evolution and diversification of RNA silencing proteins in fungi, *Journal of molecular evolution*, 63, 127-135.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R., 1990, Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans, *Plant cell*, 2, 279-289.
- Nelson, P., Kiriakidou, M., Sharma, A., Maniatakis, E., Mourelatos, Z., 2003, The microRNA world: small is mighty, *Trends in biochemical sciences*, 28 (10), 534-540.

- Nicholson, P., Simpson, D.R., Weston, G., Rezanoor, H.N., Lees, A.K., 1998, Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays, *Physiological and molecular plant pathology*, 53, 17-37.
- Nicholson, P., Simpson, D.R., Wilson, A.H., Chandler, E., Thomsett, M., 2004, Detection and differentiation of trichothecene and enniatin-producing *Fusarium* species on small-grain cereals, *European journal of plant pathology*, 110, 503-514.
- Nicolas, F.E. and Vazquez, R.M.R., 2013, Functional Diversity of RNAi-Associated sRNAs in Fungi, *International journal of molecular sciences*, 14, 15348-15360.
- Niessen, M.L. and Vogel, R.F., 1998, Group specific PCR-detection of potential trichothecene-producing *Fusarium* species in pure cultures and cereal samples, *Systematic and applied microbiology*, 21, 618-631.
- Niessen L., 2007, PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi, *International journal of food microbiology*, 119, 38-46.
- Nirenberg, H., 1976, Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*., *Mitteilungen der biologischen bundesanstalt für land- und forstwirtschaft*, 169, 1-117.
- Obanor, F., Erginbas-Orakci, G., Tunali, B., Nicol, J.M., Chakraborty, S., 2010, *Fusarium culmorum* is a single phylogenetic species based on multilocus sequence analysis, *Fungal biology*, 114, 753-765.
- Oruç, H.H., 2005, Mikotoksinler ve tanı yöntemleri, *Uludağ university journal of veterinary and medicine*, 24 (1-2-3-4), 105-110.
- Özcan, S. ve Gürel, E., 2002, *Bitki Biyoteknolojisi: Genetik Mügendisliği ve Uygulamaları*, Sel-ün Yayınları, Konya.
- Özer, N. ve Soran, H., 1991, *Fusarium* species of Turkey, *Hacettepe üniversitesi eğitim fakültesi dergisi*, 6, 259-271.
- Paetkau, D., Slade, R., Burden, M., Estoup, A., 2004, Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power, *Molecular ecology notes*, 13, 55-65.
- Pandit, N.N. and Russo, V.E.A., 1992, Reversible inactivation of a foreign gene, hph, during the asexual cycle in *Neurospora crassa* transformants. *Molecular genetics and genomics*. 234, 412-422.
- Parry, D.W., Jenkinson, P., McLeod, L., 1995, *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-a review, *Plant pathology*, 44, 207-238.
- Pertsemlidis, A. and Fondon, J.W., 2001, Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy), *Genome biology*, 2 (10), 1-10.

- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Filipowicz, W., 2007, Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms, *Trends in cell biology*, 17(3), 118-126.
- Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Frasse, P., Barreau, C., Cahagnier, B., Richard-Molard, D., Bakan, B., 2008, Magnesium represses trichothecene biosynthesis and modulates *Tri5*, *Tri6*, and *Tri12* genes expression in *Fusarium graminearum*, *Mycopathologia*, 165, 51-59.
- Ponts, N., Couedelo, L., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, M.N., Barreau, C., Richard-Forget, F., 2009, *Fusarium* response to oxidative stress by H₂O₂ is trichothecene chemotype-dependent, *FEMS microbiology letters*, 293, 255-262.
- Prescott, L., M., Harley, J., P., Klein, D., A., 1990, *Microbiology*, Brown Publishers, Dubuque, 0-697-00246-2.
- Romano, N. and Macino, G, 1992, Quelling: Transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences, *Molecular microbiology*, 6, 3343-3353.
- Rotter, B., Prelusky, D.B., Pestka, J.J., 1996, Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin), *Journal of toxicology and environmental health*, 48, 1-34.
- Ryu, J. C., Ohtsubo, K., Izumiyama, N., Nakamura, K., Tanaka, T., Yamamura, H., Ueno, Y., 1988, The acute and chronic toxicities of nivalenol in mice, *Fundamental applied toxicology*, 11, 38-47.
- Saharan, M.S., Kumar, J., Nagarajan, S., 2004, *Fusarium* head blight (FHB) or head scab of wheat- a review, *Proceedings of the. Indian national science academy*, 3, 255-268.
- Sakaguchi, T., Amari, S., Nagashio, N., Murakami, Y., Yokoyama, K., Tamiya, E., 1998, Genetic transformation of *Trichosporon cutaneum* with a plasmid, pAN 7-1, from filamentous fungi, *Biotechnology letters*, 20 (9), 851-855.
- Sampey, G.C., Guendel, I., Das, R., Jaworski, E., Klase, Z., Narayanan, A., Hall, K.K., Kashanchi, F., 2012, Transcriptional gene silencing (tgs) via the RNAi machinery in HIV-1 infections, *Biology*, 1, 339-369.
- Scherm, B., Orru, M., Balmas, V., Spanu, F., Azara, E., Delogu, G., Hammond, T., M., Keller, N., P., Migheli, Q., 2011, Altered trichothecene biosynthesis in *TRI6*-silenced transformants of *Fusarium culmorum* influences the severity of crown and foot rot on durum wheat seedlings, *Molecular plant pathology*, 12 (8), 759-771.
- Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, G., Migheli Q., 2013, *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular plant pathology*, 14 (4), 323-341.

- Schilling, A.G., Möller, E.M., Geiger, H.H., 1996, Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum*, *Molecular plant pathology*, 86 (5), 515-522.
- Schoffemeer, E.A.M., Klisa, F.M., Sietsma, J.H., Cornelissen B. J.C., 1999, The cell wall of *Fusarium oxysporum*, *Fungal genetics and biology*, 27, 275-282.
- Seong, K.Y., Pasquali, M., Zhou, X., Song, J., Hilburn, K., McCormick, S., Dong, Y., Xu, J. R., Kistler, H. C., 2009, Global gene regulation by *Fusarium* transcription factors *tri6* and *tri10* reveals adaptations for toxin biosynthesis, *Molecular microbiology*, 72 (2), 354-367.
- Seto, A.G., Kingston, R.E., Lau, N.C., 2007, The coming of age for piwi proteins, *Molecular cell*, 26, 603-609.
- Sonal, S. ve Oruç, H.H., 2000, Bursa bölgesindeki tavuk çiftliklerinden sağlanan yemlerde mikotoksin düzeyleri, *Yüzüncü yıl üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 11 (2), 1-6.
- Strange, R.N., 2003, *Introduction to plant pathology*, Wiley, West Sussex, 047084972X.
- Strausbaugh, C.A., Overturf, K., Koehn, A.C., 2005, Pathogenity and real-time PCR detection of *Fusarium spp.* in wheat and barley roots, *Canadian journal of plant pathology*, 27, 430-438.
- Sudakin, D.L., 2003, Trichothecenes in the environment: relevance to human health, *Toxicology letters*, 143, 97-107.
- Sumida, M., Kato, Y., Kurabayashi, A., 2004, Sequencing and analysis of the internal transcribed spacers (ITSs) and coding regions in the EcoRI fragment of the ribosomal DNA of the Japanese pond frog *Rana nigromaculata*, *Genes and genetic systems*, 79 (2), 105-118.
- Thakur, A., 2003, RNA interference revolution, *Electronic journal of biotechnology*, 6 (1), 39-49.
- Trail, F., Xu, H., Loranger, R., Gadoury, D., 2002, Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae*, *Mycologia*, 94, 181-189.
- Trail, F., 2009, For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era, *Plant physiology*, 149, 103-110.
- Tunali, B., Nicol, J., Erol, F.Y., Altıparmak, G., 2006a, Pathogenicity of Turkish crown and head scab isolates on stem bases on winter wheat under greenhouse conditions, *Plant pathology journal*, 5 (2), 143-149.
- Tunali, B., Özseven, İ., Büyük, O., Erdurmuş, D., Demirci, A., 2006b, *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation of wheat in Marmara region and reactions

- of wheat cultivars and lines to *F. graminearum* and *Fusarium culmorum*, *Plant pathology journal*, 5(2), 150-156.
- Tunali, B., Obanor, F., Erginbaş, G., Wesrecott, R.A., Nicol, J., Chakraborty, S., 2012, Fitness of three *Fusarium* pathogens of wheat, *FEMS microbiology ecology*, 81, 596-609.
- Tutel, B. ve Çırpıcı, A., 1999, *Sporlu bitkiler sistematigi laboratuvar kılavuzu*, Çantay Kitabevi, İstanbul, 975-404-295-0.
- Vaucheret, H. and Fagard M., 2001, Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends in genetics*, 17, 29–35.
- Villareal, D., Nirde, P., Hide, M., Barnabe, C., Tibayrenc, M., 2005, Differential gene expression in benznidazole-resistanat *Trypanosoma cruzi* parasites, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49 (7), 2701-2709.
- Waalwijk, C., van der Heide, R., de Vries, I., van der Lee, T., Schoen, C., Corainville, G.C., Hauser-Hahn, I., Kastelein, P., Kohl, J., Lonnet, P., Demarquet, T., Kema, G.H.J., 2004, Quantitative detection of *Fusarium* species in wheat using TaqMan, *European journal of plant pathology*, 110, 481-494.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, C., Wettstein, D.V., Franken, P., Kogel, K.H., 2005, The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield, *Proceedings of the national sciences*, 102, 13386-13391.
- Wiebe, M.G., Novakova, M., Miller, L., Blakebrough, M.L., Robson, G.D., Punt, P.J., Trinci, A.P.J., 1997, Protoplast production and transformation of morphological mutants of the Quorn2 myco-protein fungus, *Fusarium graminearum* A3/5, using the hygromycin B resistance plasmid pAN7-1, *Mycological research*, 101 (7), 871-877.
- Wu, Z., Wang, X.R., Blomquist, G., 2002, Evaluation of PCR primers PCR conditions for specific detection of common airborne fungi, *The royal society of chemistry*, 4, 377-382.
- Wu, H., Hait, W.N., Yang, J.M., 2003, Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer research*, 63, 1515-1519.
- Yörük, E., Albayrak G., Sharifnabi B., Candar B., 2011, Molecular haracterization of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates of wheat, barley and maize using ISSR markers, *Europen biotechnology Congress 2011*, 28 September-1 October 2011 İstanbul, Turkey, Current opinion in biotechnology, 132.
- Yörük, E. and Albayrak, G., 2012, Chemotyping of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by PCR assay, *Mycopathologia*, 173, 53-61.

- Yörük, E., Gazdağı, A., Albayrak, G., 2012a, Genotyping of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates by microsatellite markers, *Eurobiotech 2012 Agriculture Symposium*, 12-14 April 2012 Kayseri, Turkey, *Journal of Biotechnology*, 16.
- Yörük, E., Gazdağı, A., Albayrak, G., 2012b, Geliştirilen Yeni Genik Mikrosatellit Markırlarının *Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum* İzolatlarında Analizi, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 3-7 Eylül 2012, İzmir, Türkiye, 314-315.
- Yörük, E. ve Albayrak, G., 2013, Genetic characterization of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by using random-amplified polymorphic DNA, *Genetics and molecular research*, 12 (2), 1360-72.
- Yörük, E. and Albayrak, G., 2014, *Tri4* and *tri5* gene expression analysis in *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates by qPCR, *Plant pathology journal*, 13 (2), 133-138.
- Yörük, E., Gazdağı, A., Albayrak, A., 2014. Class B trichothecene chemotyping in *Fusarium* species by PCR assay. *Genetika-Belgrade*, Hakem Aşaması

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Emre YÖRÜK
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	1983, İstanbul
Telefon	0212 455 57 00 / 15110
E-mail	eyoruk@istanbul.edu.tr
Web adres	-

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Doktora	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı / Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı	2014
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı / Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı	2009
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi / Biyoloji Bölümü	2006
Lise	İstanbul Nişantaşı Nuri Akın Lisesi	2002

Makaleler / Bildiriler

Makaleler:

Yörük E. and Albayrak G., 2012, Chemotyping of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by PCR assay, *Mycopathologia*, 173, 53-61.

Albayrak, G. ve Yörük, E., 2012, *Fusarium graminearum* ve *F. culmorum* İzolatlarında Trikotesen Üretimiyle İlişkili *tri5* ve *tri3* Genlerinin ve Transkriptlerinin Analizi,

Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 10 (1), 11-21.

Yörük, E. and Albayrak G., 2013, Genetic characterization of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by using random amplified polymorphic DNA (RAPD), *Genetics and Molecular Research*, 12 (2), 1360-1372.

Albayrak, G. ve Yörük, E., 2013, Biyoinformatik Araçların *Fusarium graminearum* Genomunda Kullanımı, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 11 (1), 1-18.

Albayrak, G., Ünal-Şengör, G.F., Yörük, E., 2014, Characterization of GnRH, ILGFRI and AR Genes in Sturgeon's Genomics, *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 66, 1-10.

Yörük E. and Albayrak, G., 2014, *Tri4* and *tri5* gene expression analysis in *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates by qPCR, *Plant Pathology Journal*, 13 (2), 133-138.

Bildiriler:

Yörük E., G. Albayrak, 2009, “*Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum* izolatlarının RAPD markırlarına dayalı genetik tiplendirmesi”, *XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, 12-14 Aralık, Antalya, S 110-113

Yörük E., E. Çepni, Ö. Çakır, G. Albayrak, Ş. Arı, F. Gürel, 2009, “Arpa (*Hordeum vulgare* L.)’nın farklı çeşit ve eksplantlarında *in vitro* rejenerasyon kapasitesi”, *XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, 12-14 Aralık, Antalya, S 106-109

Yörük, E., G. Albayrak, B. Sharifnabi, B. Candar, 2011, “Molecular characterization of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates of wheat, barley and maize using ISSR markers”, *European Biotechnology Congress 2011*, 28th September- 1th October, İstanbul, Current Opinion in Biotechnology, 22(1), S132

Yörük, E., Tufan, F., Uçarlı, C., Gürel, F., 2011, “Physiological responses of elite barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars to salt stress at germination stage”, *European Biotechnology Congress 2011*, İstanbul, 28th September- 1th October, Current Opinion in Biotechnology, 22(1), S136

Yörük, E., Gazdağlı, A., Albayrak, G., 2012, Genotyping of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates by microsatellite markers, *Eurobiotech 2012 Agriculture Symposium*, 12-14 April, Kayseri, Turkey, Journal of Biotechnology, S 16

Albayrak, G., Yörük, E., Diken, Ö., 2012, Quantitative Gene Expression Analysis of WRKY38 and DREB2 Transcription Factors Responsible for Drought and Salt Tolerance in Barley (*Hordeum vulgare* L.), *15 th. European Congress on Biotechnology*, 23-26 September, İstanbul, Turkey, New Biotechnology, S 22

Yörük, E., Gazdağlı, A., Albayrak, G., 2012, Geliştirilen Yeni Genik Mikrosatellit Markırlarının *Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum* İzolatlarında Analizi, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 3-7 Eylül, İzmir, S 314-315

Yörük, E., Gazdagli, A., Karlik, E., Kayış, M., Kaya, F., Albayrak, G., 2013, “Mycotoxin profiling of *Fusarium* spp. From Turkey” *Second International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey 2013*, 22-23th November, İstanbul, Turkey, Abstract Book, pt-78