

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI AGRO-EKOLOJİLERDEKİ BAZI BİTKİLERDEN İZOLE EDİLEN  
*Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. İZOLATLARININ MOLEKÜLER  
FARKLILIKLARININ BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ferhat KILINÇ

Bitki Koruma Anabilim Dalı

EYLÜL 2014  
SAMSUN





T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**FARKLI AGRO-EKOLOJİLERDEKİ BAZI BİTKİLERDEN İZOLE EDİLEN  
*Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. İZOLATLARININ MOLEKÜLER  
FARKLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ferhat KILINÇ  
(11210256)**

**Tezin Savuma Tarihi : 01.09.2014**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Berna TUNALI**



**Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Bitki Koruma Anabilim Dalında**

**Ferhat KILINÇ Tarafından Hazırlanan**

**FARKLI AGRO-EKOLOJİLERDEKİ BAZI BİTKİLERDEN İZOLE  
EDİLEN *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. İZOLATLARININ  
MOLEKÜLER FARKLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

**başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 01/09/2014 tarihinde yapılan sınav ile  
YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.**

**Başkan : Prof. Dr. Berna TUNALI**  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi



**Jüri Üyeleri : Doç. Dr. İsmail ERPER**  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi



**Yrd. Doç. Dr. Musa KAVAS**  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi



..../..../2014

**Prof. Dr. Hüseyin DEMİR**

Enstitü Müdürü



## ÖNSÖZ

Bu tezin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen sayın danışmanım Prof. Dr. Berna TUNALI'ya, bana her konuda destek olan Bitki Koruma Bölümü Hocalarıma, Arş. Gör. Bayram KANSU'ya, Öğr. Gör. Beytullah DÖNMEZ'e, Arş. Gör. Şeyma TOKSÖZ'e, kardeşim S. Fatih KILINÇ'a, nişanlım Kader DEMİRTAŞ'a, Yük. Lis. Öğr. Hüseyin UZUNBACAK'a, Viroloji Laboratuvarı çalışanlarına ve maddi manevi desteğini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

EYLÜL 2014

Ferhat KILINÇ  
Ziraat Mühendisi



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
KISALTMALAR .....	xiii
FARKLI AGRO-EKOLOJİLERDEKİ BAZI BİTKİLERDEN İZOLE EDİLEN <i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc. İZOLATLARININ MOLEKÜLER FARKLILIKLARININ BELİRLENMESİ.....	xv
ÖZET.....	xv
DETERMINATION OF MOLECULAR DIFFERENCES OF <i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc. ISOLATES AT DIFFERENT AGRO-ECOLOGIES FROM SEVERAL PLANTS.....	xvii
ABSTRACT .....	xvii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Moleküler Yöntemlerle Yapılan Çalışmalar .....	7
2.2. Endofit Funguslarla Yapılan Çalışmalar .....	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	19
3.1 Materyal .....	19
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Fungal Materyal.....	19
3.1.2 Çalışmada Kullanılacak Laboratuvar Ekipman ve Materyalleri .....	23
3.2 Yöntem .....	23
3.2.1 İzolatların Tek Spor İzolasyonu .....	23
3.2.2 İzolatların Morfolojik Karakterizasyonu.....	23
3.2.3 <i>Fusarium equiseti</i> İzolatlarının Türe Özgü Primerle Moleküler Teşhislerinin Yapılması .....	23
3.2.3.1 DNA ekstraksiyonu.....	23
3.2.3.2 Moleküler düzeyde türe özgü primer ile <i>Fusarium equiseti</i> izolatlarının teşhisi .....	24
3.2.3.3 Moleküler teşhisleri yapılan izolatların trikotesen üretiminden sorumlu <i>Tri</i> geni bulundurma durumunun belirlenmesi .....	25
3.2.3.4. <i>F. equiseti</i> izolatlarının ITS-RFLP yöntemi ile genetik polimorfizminin belirlenmesi.....	25
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	27
4.1 Bulgular .....	27
4.1.1 İzolatların Morfolojik Teşhisi .....	27
4.1.1.1 <i>Fusarium equiseti</i> 'nin morfolojik özellikleri .....	27
4.1.2 İzolatların moleküler teşhisi .....	29
4.1.3 Moleküler teşhisleri yapılan izolatların trikotesen üretiminden sorumlu <i>Tri</i> geni bulundurma durumunun belirlenmesi.....	31

4.1.4 <i>Fusarium equiseti</i> izolatlarının ITS-RFLP yöntemi ile genetik polimorfizminin belirlenmesi.....	33
4.1.4.1 İzolatların ITS 1-4 primeri ile PCR’da çoğaltılması .....	33
4.1.4.2 PCR’ da çoğaltılan ITS 1-4 bölgesine enzim uygulanması	34
4.1.4.2.1 <i>EcoRI</i> enziminin uygulanması .....	34
4.1.4.2.2 <i>HaeIII</i> enziminin uygulanması.....	36
4.1.4.2.3 <i>Sau3AI</i> enziminin uygulanması.....	39
4.1.4.2.4 <i>CfoI</i> enziminin uygulanması .....	40
4.1.4.2.5 <i>DdeI</i> enziminin uygulanması .....	42
4.1.4.2.6 <i>HincII</i> enziminin uygulanması .....	45
4.1.4.2.7 <i>SphI</i> enziminin uygulanması .....	47
4.2 Tartışma.....	55
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>63</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>67</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>75</b>

## ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. <i>Fusarium equiseti</i> izolatlarına ait bilgiler.....	20
Çizelge 4.1. Enzim uygulaması sonucu elde edilen bant profilleri.....	50



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 3.1. Türkiye agro-ekolojik bölgeler ve örnek alınan iller (URL-3).....	19
Şekil 3.2. Çalkalayıcı üzerinde PDB’da gelişen <i>Fusarium equiseti</i> izolatları.....	24
Şekil 4.1. <i>Fusarium equiseti</i> ’nin PDA ortamında gelişimi.....	28
Şekil 4.2. <i>Fusarium equiseti</i> ’nin PDA ortamında gelişimi.....	28
Şekil 4.3. <i>Fusarium equiseti</i> ’nin makrokonidi ve klamidosporları .....	29
Şekil 4.4. <i>Fusarium equiseti</i> ’nin makrokonidileri .....	29
Şekil 4.5. FEF/ FER Primeri PCR sonucu .....	30
Şekil 4.6. FEF/ FER Primeri PCR sonucu .....	30
Şekil 4.7. FEF/ FER Primeri PCR sonucu .....	31
Şekil 4.8. Tox 5/2 Primeri PCR Sonucu .....	32
Şekil 4.9. Tox 5/2 Primeri PCR Sonucu .....	32
Şekil 4.10. ITS 1-4 Primeri PCR sonucu .....	33
Şekil 4.11. ITS 1-4 Primeri PCR sonucu .....	34
Şekil 4.12. ITS- <i>EcoRI</i> RFLP Sonucu .....	35
Şekil 4.13. ITS- <i>EcoRI</i> RFLP Sonucu .....	35
Şekil 4.14. ITS- <i>EcoRI</i> RFLP Sonucu .....	36
Şekil 4.15. ITS- <i>EcoRI</i> RFLP Sonucu .....	36
Şekil 4.16. ITS- <i>HaeIII</i> RFLP Sonucu.....	37
Şekil 4.17. ITS- <i>HaeIII</i> RFLP Sonucu.....	37
Şekil 4.18. ITS- <i>HaeIII</i> RFLP Sonucu.....	38
Şekil 4.19. ITS- <i>HaeIII</i> RFLP Sonucu.....	38
Şekil 4.20. ITS- <i>Sau3AI</i> RFLP Sonucu.....	39
Şekil 4.21. ITS- <i>Sau3AI</i> RFLP Sonucu.....	39
Şekil 4.22. ITS- <i>Sau3AI</i> RFLP Sonucu.....	40
Şekil 4.23. ITS- <i>Sau3AI</i> RFLP Sonucu.....	40
Şekil 4.24. ITS- <i>CfoI</i> RFLP Sonucu .....	41
Şekil 4.25. ITS- <i>CfoI</i> RFLP Sonucu .....	41
Şekil 4.26. ITS- <i>CfoI</i> RFLP Sonucu .....	42
Şekil 4.27. ITS- <i>CfoI</i> RFLP Sonucu .....	42
Şekil 4.28. ITS- <i>DdeI</i> RFLP Sonucu .....	43
Şekil 4.29. ITS- <i>DdeI</i> RFLP Sonucu .....	43
Şekil 4.30. ITS- <i>DdeI</i> RFLP Sonucu .....	44
Şekil 4.31. ITS- <i>DdeI</i> RFLP Sonucu .....	44
Şekil 4.32. ITS- <i>HincII</i> RFLP Sonucu .....	45
Şekil 4.33. ITS- <i>HincII</i> RFLP Sonucu .....	46
Şekil 4.34. ITS- <i>HincII</i> RFLP Sonucu .....	46
Şekil 4.35. ITS- <i>HincII</i> RFLP Sonucu .....	47
Şekil 4.36. ITS- <i>SphI</i> RFLP Sonucu. ....	48
Şekil 4.37. ITS- <i>SphI</i> RFLP Sonucu. ....	48
Şekil 4.38. ITS- <i>SphI</i> RFLP Sonucu .....	49
Şekil 4.39. ITS- <i>SphI</i> RFLP Sonucu .....	49

<b>Şekil 4.40.</b> Yüzde (%) Benzerlik Dendogramı. ....	54
---	----

## KISALTMALAR

- µl:** Mikrolitre  
**bp:** Baz çifti  
**DAS:** Diacetoxyscirpenol  
**dk:** Dakika  
**FB<sub>1</sub>:** Fumonisin B<sub>1</sub>  
**FB<sub>2</sub>:** Fumonisin B<sub>2</sub>  
**HPLS:** Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi  
**IGS:** Internal Genomik Spacer  
**ITS:** Intergenic Transcribe Spacer  
**mM:** Milimolar  
**NIV:** Nivalenol  
**PCR:** Polimeraz zincir reaksiyonu  
**PDA:** Patates deksroz agar  
**PDB:** Patates dekstroz broth  
**RAPD:** Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA  
**RFLP:** Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi  
**rpm:** Revolution per minute (Dakikadaki devir sayısı)  
**SNA:** Sentetik nutrient agar  
**ZEA:** Zearalenon



**FARKLI AGRO-EKOLOJİLERDEKİ BAZI BİTKİLERDEN İZOLE EDİLEN  
*Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. İZOLATLARININ MOLEKÜLER  
FARKLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

**ÖZET**

Bu tez çalışmasında, dünya üzerinde çok yaygın bir konukçu dağılımına sahip olan *Fusarium* cinsine ait türlerden birisi olan ve tahıl grubuna ait bitkilerin kök ve kök-boğazından sıklıkla izole edilen *F. equiseti*'nin, Türkiye'nin farklı agro-ekolojik bölgelerinden, farklı bitki konukçularından farklı patojenik (patojenik-endofit) özellik gösteren izolatlarda ITS (Intergenic Transcribe Spacer) bölgesi temelinde genetik polimorfizm belirlenmiştir. *F. equiseti* izolatlarının morfolojik teşhis yöntemleri dışında, ulusal düzeyde ilk defa bu tür için moleküler teşhis araçları (PCR) kullanılmıştır. Ayrıca hem moleküler tür teşhisleri, hem de ITS temelinde elde edilen PCR çoğaltım ürünlerinin, 7 farklı endonükleaz enzim (*EcoRI*, *HaeIII*, *Sau3AI*, *DdeI*, *CfoI*, *HincII*, *SphI*) ile kesilerek, ITS-RFLP bant profilleri elde edilmiştir. Hasta ve sağlıklı bitkilerden elde edilen *F. equiseti* izolatlarının genelinde ITS temelinde %95 oranında benzerlik tespit edilmiş olup iki izolatta ise bu benzerlik oranının %65 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu özelliklere sahip izolatlarda, sıcakkanlılar ve insanlar açısından ciddi sağlık problemlerine yol açan mikotoksinlerin (trikotesenler) üretiminden sorumlu *Tri* genlerinin izolatlardaki bulunma oranı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Fusarium equiseti*, PCR, ITS-RFLP, Trikotesen, Endofit



**DETERMINATION OF MOLECULAR DIFFERENCES OF *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. ISOLATES AT DIFFERENT AGRO-ECOLOGIES FROM SEVERAL PLANTS.**

**ABSTRACT**

In this research, *F. equiseti* which is one of the species of *Fusarium* having a widespread host variance in the world and which is frequently isolated from the roots and root collars of the grain plants was examined. The findings of the study yielded that genetical polymorphism was determined on the basis of ITS area at the *F. equiseti* isolates showing different pathogenic (non-pathogenic endophytes) features from the different agro-ecological regions in Turkey as well as different host plants. The study is significant in terms of making use of the molecular diagnostic technique (PCR) nationwide for the first time apart from the morphological diagnostic techniques of *F. equiseti* isolates. Furthermore, ITS-RFLP band profiles were produced by cutting PCR multiplication outputs obtained both by the help of molecular species diagnosis techniques and at ITS basis with 7 different endonuclease enzymes (*EcoRI*, *HaeIII*, *Sau3AI*, *DdeI*, *CfoI*, *HincII*, *SphI*). The *F. equiseti* isolates from diseased and healthy plants were determined at 95% similarity and only two isolates were shown at 65%. In addition, *Tri* gene cluster which response to producing mycotoxins that harmful effect on human and livestock were obtained from some of these isolates.

**Key Words:** *Fusarium equiseti*, PCR, ITS-RFLP, Trichothecenes, Endophyte



## 1. GİRİŞ

Temel besin maddesi olan buğday (*Triticum spp.*) üretimi dünyada çeltik ve mısırdan sonra üçüncü sırada olup Türkiye’de ise en fazla yetiştirilen kültür bitkisidir. Ekim alanlarını daha fazla genişletmenin mümkün olmadığı günümüzde, artan nüfusun besin ihtiyacını karşılamamanın en etkili yolu, birim alan verimini artırmaktır. Buğdayda verimdeki artış ancak hastalık ve zararlılarla etkin bir mücadele ile olabilmektedir.

Dünyada hububat ekim alanlarının (703 milyon ha) yaklaşık %30’ nu buğday ekim alanları (215 milyon ha) oluşturmaktadır (URL-1).

Buğday ülkemiz için özel bir öneme sahiptir. Zira dünyada buğdayın gen merkezi ve anavatanı olarak bilinmektedir. Türkiye buğday üretiminde Çin, Hindistan, Amerika, Fransa, Rusya gibi ülkelerden sonra yaklaşık 21 Milyon ton üretimle dünyada 10. sırada yer almaktadır. Türkiye’ de buğday üretimi diğer tarımsal ürünler arasında yaklaşık 7,7 Milyon ha ekilen alan ve 21 milyon ton üretimle ilk sırada yer almaktadır (URL-1; URL-2). Sırasıyla Konya, Ankara, Sivas, Yozgat ve Diyarbakır buğday ekiliş alanları açısından ilk beş ilimizdir (URL-2). Buğday tarımını olumsuz yönde etkileyen ve önemli ürün kayıplarına neden olan birçok faktör vardır. Buğday yetiştiriciliğinde bitki hastalıkları ile mücadele üzerinde dikkatle durulması gereken konulardan biridir. Her yıl üretim sezonu sonunda kullanılacak ürünün yaklaşık %20’ sinin buğday hastalıkları nedeniyle kaybolduğu düşünülmektedir (Wiese, 1987).

Buğdayda görülen fungal hastalıklar üç guruba ayrılabilir; bunlardan ilki kök ve kök boğazı hastalıkları, ikincisi sap ve yaprak hastalıkları, üçüncüsü ise başak hastalıklarıdır. Kök ve kök boğazı fungal hastalıkları buğdayda verimi sınırlayan faktörlerin başında gelmektedir (Akgül, 2008).

Buğday üretilen bölgelerin ekolojisi ve toprak koşullarına bağlı olarak *Bipolaris*, *Fusarium*, *Gaeumannomyces*, *Pseudocercospora*, *Pythium* ve *Rhizoctonia* cinslerine bağlı çeşitli fungus türleri; buğday bitkilerinin kök, kök

boğazı ve sap kısmında yanıklık veya çürüklük benzeri hastalıklara neden olan önemli fungal etmenler olarak bilinmektedirler (Wiese, 1987).

*Fusarium* cinsi funguslar tür sayılarının fazla, enfekte ettiği konukçu dizilerinin geniş ve dünya üzerindeki farklı ekolojik ortamlarda varlıklarına rastlanabilir olmaları nedeniyle büyük öneme sahiptirler. Nitekim *Fusarium* spp. Almanya'da tarımsal ürünlerde %60-80 oranında zarar yapmakta, Kanada ve Amerika gibi ülkelerde kök ve kök boğazı hastalıklarından dolayı oluşan kayıplar ise %17'ye ulaşmaktadır. Ülkemizde bu hastalığı oluşturan funguslar arasında yer alan *Fusarium* spp, bitkinin kalitesini azaltmakta, verim kayıplarına neden olmaktadır (Aktaş, 2001; Demirci, 2003; Araz ve diğ.,2010).

Bu cins içerisinde yer alan *Fusarium culmorum*, *F. pseudograminearum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. acuminatum*, *F. crookwellense*, *F. poae*, ve *Microdochium nivale* (*F. nivale*) türlerinin buğdayda kök, kök boğazı ve sap çürüklüğünden sorumlu esas türler oldukları *F. equiseti* gibi türlerin ise zayıf patojen türler olduğu bildirilmiştir (Wiese, 1987).

Avrupa'da *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum*, *F. poae* ağırlıklı olarak izole edilirken *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti*, *F. langsethiae* ve *F. culmorum* düşük yoğunlukta izole edilmektedir (Marin ve diğ., 2012).

Bu türler, konukçusunun olmadığı dönemleri hasat artıkları içerisinde özellikle miselyum olarak, bazıları toprak veya bitki artıklarında klamidospor bazıları ise konukçu doku üzerinde ürettikleri peritesyumlar halinde ya da Poaceae familyasına ait yabancı otların köklerinde parazit halde geçirmektedirler (Cook, 1986).

Buğday tohumlarının çimlendiği dönemden başak çıkışının başladığı zamana kadar geçen tüm zamanlarda, konidiler veya klamidosporların çimlenmesiyle bitki enfeksiyonları gerçekleşebilmektedir. Bu enfeksiyonlar, çoğunlukla toprağa yakın kök boğazı bölgesi veya kök boğazının hemen alt kısmındaki boğum aralarından başlamaktadır. Fide döneminde başlayan düşük seviyedeki enfeksiyonlar bitkileri fazla etkilememekte ve bitkiler normal gelişimine devam edebilmektedirler. Ancak ileriki dönemde hastalık şiddetinin artmasıyla hızlı bir belirti gelişimi olmaktadır. Hastalığa yakalanan bitkilerin kök, kök boğazı ve sap kısmında şeritler halinde uzayan ya da tüm sap kısmını tamamen sarmış kahverengi lekeler görülür. Bu lekeler daha çok sözü edilen bölgelerde ortaya çıkmalarına rağmen enfeksiyonun yoğunluğu

ve hastalığın seyrine göre bazen yaprak kınları ve gövdede 4. ve hatta 5. boğuma kadar ilerleyebilir. Bazı durumlarda çiçeklenme döneminde yaşanan su stresi ile birlikte bitkilerde beyaz başak oluşumu ve erken ölümler gözlenebilir. Bu belirtileri gösteren bitkilerde, başta su akışının normal bir şekilde sağlanamaması ve buna bağlı olarak fizyolojik bozuklukların ortaya çıkmasıyla bitkiler normal yaşam süresinden daha kısa bir sürede ömrünü tamamlamakta ve ürün veriminde önemli düzeyde azalmalar meydana gelmektedir. Hastalığın şiddetli olduğu bölgelerde ürün azalışının zaman zaman %50-70 düzeylerine ulaştığı kaydedilmiştir (Akgül, 2008).

Buğday kök, kök boğazı ve sap çürüklüğü hastalığı ülkemiz dahil dünyada buğday üretiminin yapıldığı hemen her bölgede yaygın olarak görülen bir hastalıktır. Özellikle monokültür hububat tarımının yapıldığı alanlarda topraktaki inokulum yoğunluğu zamanla artış göstermektedir. Hastalık yoğunluğunun fazla olduğu yerlerde hasadın ardından inokulumun yarısı toprakta kalmakta ve bu inokulum 2 yıl süreyle topraktaki varlığını sürdürebilmektedir. İklim, toprak koşulları, üretim yapılan bölgenin ekolojik ve coğrafi özellikleri hastalık yaygınlığını, hastalık şiddeti ve verim seviyelerini etkileyen en önemli unsurlardır. Bunların yanı sıra o bölgedeki ürün deseni, ekimi yapılan hububat çeşitlerinin hastalığa gösterdikleri tolerans düzeyleri, gübreleme, toprak işleme ve fungusit kullanımı gibi faktörler de sözü edilen olumsuzlukların seyrinde önemli rol oynamaktadırlar. Patojenle bulaşık olan bir alanda, bitkilerin enfeksiyona yakalanma olasılıkları çok yüksek olmakla birlikte hastalığın seyri toprak ve bitkideki su potansiyeli ile yakından ilişkilidir. Kök ve kök boğazındaki dokulardan ya da yeni kök taslaklarının çıkış yaptığı sırada oluşan küçük yırtıklardan başlayan enfeksiyonlar, hava sıcaklığı veya yağışlara göre hastalık şiddetinin hangi düzeyde olacağını belirler. Özellikle başak çıkışı ve çiçeklenme aşamasında hava sıcaklığı yüksek ve topraktaki su içeriğinin düşük olduğu durumlarda bitkinin hastalık etmenlerine direncinin azalacağından dolayı hastalığın şiddetli olabileceği bildirilmiştir (Cook, 1986; Akgül, 2008).

Uygun koşullar bulunduğu takdirde *Fusarium* türleri tarımsal ürünlerde, tarladan veya bahçeden başlayarak işlenip tüketiciye gelinceye kadarki aşamalarda gelişerek, gıdalarda bozulmalara neden olmakta ve bazıları mikotoksin denilen toksik maddeleri üretmektedirler.

Mikotoksinler, yem ve gıda maddelerinde fungus türleri tarafından sentezlenen metabolizma ürünleri olup, bunlarla beslenen hayvan ve insanlarda latent, akut veya

kronik hastalıklara neden olan toksik maddelerdir. Bu mikotoksinler kanserojendir ve bağımsızlık sistemine zarar verir.

1960 yılında aflatoksinin keşfinden sonra mikotoksinler yoğun araştırılan bir konu olmuştur. Günümüzde 350 fungus türünün 400'den fazla mikotoksin ürettiği bilinmektedir. Mikotoksin üreten küf funguslarının çoğunluğu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizopus* ve *Cladosporium* cinsleri içinde yer almaktadır (Tiryaki ve diğ., 2011).

Ayrıca *Fusarium* türlerinin neden olduğu hastalıklar son zamanlarda tarımsal üretimde büyük problem olmuştur. Bu nedenle bu fungusların neden olduğu hastalıkların kontrolünde hızlı teşhis ve kontrol metotlarına ihtiyaç vardır (McMullen ve diğ., 1997; Clear ve diğ., 2000).

*Fusarium* türlerinin tanı ve teşhisinde geleneksel teşhis metotları makro ve mikro morfolojik karakterler kullanılarak yapılmaktadır. Bu teşhiste spor morfolojisi kullanılmaktadır. Bu metot benzer morfolojik karakterdeki türler için teşhisi zorlaştırmaktadır. Örneğin *F. graminearum* ve *F. pseudograminearum* türlerinin ayırt edilmesinde spor morfolojisi bakımından teşhisi zor olmaktadır (Aoki ve O'Donnell 1999). Son yıllarda morfolojik teşhis sisteminin problemleri moleküler teşhis metotları kullanılarak çözülmeye çalışılmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) *Fusarium* türlerinin teşhisinde hassas ve hızlı bir metottur. Bu teknikte türe özgü primerler kullanılmaktadır (O'Donnell ve diğ., 1998).

Ayrıca *Fusarium* cinsi içerisindeki türler doğada patojen, zayıf patojen, saprofit ve endofit özellikte bulunabilmektedirler. Endofitler, canlı bitki dokularında barınan, tıbbi, zirai ve endüstriyel açıdan potansiyel yeni doğal ürün kaynağı ve göreceli olarak çalışılmamış bir mikroorganizma grubudur. Endofitler bitki dokularının içinde herhangi bir önemli simptome neden olmadan yaşayan organizmalardır (fungus, bakteri, maya). Bu organizmalar, ksilem ve floem de dahil olmak üzere bitkinin bütün kısımlarında bulunabilirler. Endofitlerin büyük çoğunluğu başlangıçta ağaçlardan izole edilmiş ancak; çalı veya otsu bitkilerin bazıları da endofit varlığı bakımından daha sonra incelenmiştir. Endofitik funguslar giderek yararlı biyolojik aktivitelere sahip, yeni sekonder metabolitlerin kaynağı olabilecek ekolojik bir mikroorganizma topluluğu olarak tanımlanmaya başlanmıştır (Tejesvi ve diğ., 2007).

Bugüne kadar bütün bitki türlerinde bulunan fungal endofitlerin kimyasal çeşitlilikleri çalışılmış, bu organizmaların bu kadar ilgi toplamasına neden olan biyolojik çeşitlilikleri çalışılmamıştır. Dünya üzerindeki 300 bin'e yakın bitkiden her birinin, bir ya da daha fazla endofit için konukçu oluşturması dikkate değerdir. Bu bitkilerden çok azı endofit biyolojileri ile ilgili bütünüyle çalışılmıştır. Bu nedenle farklı koşul ve ekosistemde yaşayan sayısız bitkiden yeni ve farklı endofitik mikroorganizmalar bulmak önem arz etmektedir (Strobel ve Daisy., 2003).

Bir çok araştırmacı endofitler için geniş ve kabul gören bir tanımlama yapmıştır; (Bacon ve White, 2000) endofitik fungusları “bitkilerin canlı iç dokularında kolonize olan ve herhangi bir olumsuz etki göstermeyen organizmalar” olarak tanımlamışlardır. Sağlıklı bitkilerin bünyesinde doğal olarak bulunan bu fungusların gerek bitkilerin soğuk, sıcak ve kurak gibi abiyotik faktörlere dayanıklılık oluşturmalarına katkıda bulunmaları, bitkinin gelişimini artırmaları ve gerekse hastalıklara dayanıklı yetiştirilmeleri bu konuda yapılan çalışmaların dünyada artarak devam etmesine neden olmuştur. Bitki boyu, kardeş sayısı ve bitki ağırlığını artırarak verimi artırıcı yöndeki etkileri de bazı araştırmacılarca ortaya konulmuştur (Tunalı ve Kansu., 2012).

Bitki dokularında endofitlerin bulunmasının herhangi bir yan etkisinin olmaması bitki ile fungus arasında simbiyotik ya da mutualistik bir ilişkiye odaklanılmasına yol açmıştır. Ayrıca endofitlerin biyoçeşitliliği ile ilgili gözlemler endofitlerin etkin saprofitler ya da fırsatçı patojenler olabildiğini de göstermiştir. Bakteri ve funguslar en yaygın olarak bulunan endofitik mikroorganizmalardır. Bitkilerde endofit olarak bulunan diğer mikrobiyal formlar *Mycoplasma*, *Rickettsia* ve *Archae* olarak görülmektedir ancak bunlarla ilgili henüz yeterli bilgi bulunmamaktadır. En çok izole edilen endofitler, funguslardır. Ancak başlangıç olarak bitkilerin büyük çoğunluğunun endofit ile etkileşimler yönünden henüz çalışılmamış olması önemlidir. Dolayısıyla yeni cinsler, biyotipler ve türler içeren yeni fungal formların elde edilmesi için çalışılmamış çok büyük sayıda bitki türleri olması dolayısıyla bu konunun büyük bir potansiyel olduğu düşünülmektedir.

Hawksworth ve Rossman, (1987)'nin bildirdiğine göre, 1.5 milyon fungal türden şu ana kadar sadece 100 bini tanımlanabilmiştir. Yeni kanıtlar elde edildikçe tahmin edilen sayılar gittikçe artmaktadır. Örneğin Dreyfuss ve Chapela, 1994 sadece endofit fungus türlerini en az 1 milyon olarak tahmin etmişlerdir. Öyle

görünüyor ki, endofitler genetik çeşitliliğin zengin ve güvenilir kaynağı olmakla beraber daha önce tanımlanmamış birçok tür içermektedir.

Endofitler, tıp, tarım ve endüstri alanında geniş potansiyeli olan, biyoaktif ve kimyasal madde olarak bol ve güvenilir bir kaynak sunan az araştırılmış bir mikroorganizma grubudur. Bu sınırsız kaynak sunan az anlaşılmış mikroorganizmalarla ilgili çalışmalar oldukça yeni başlamış olmasına rağmen, bu alanda keşfedilecek organizma, ve onların yararlı ürünlerinin umut verici büyük potansiyeli olduğu anlaşılmaktadır (Tejesvi ve diğ., 2007).

Buraya kadar bahsedilen bilgiler doğrultusunda bu yüksek lisans tez çalışması ile *F. equiseti* türüne ait farklı agro-ekolojik bölgelerden çoğunluğu hububat olmak üzere farklı bitki konukçularından virulenslik özellikleri farklı (sağlıklı ve hasta bitkilerden elde edilen) izolatlar bir araya getirilmiştir. Çalışmada gerek farklı konukçulardan gerekse farklı virulenslik özellikleri olan *F. equiseti* izolatlarının, elde edilecek sonuçların değerini artıracak ve literatürde ihtiyaç duyulan bilgi gereksinimini karşılayacağı düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Moleküler Yöntemlerle Yapılan Çalışmalar

Mishra ve diğ. (2002)'nin yapmış oldukları çalışmada *Fusarium* spp.'nin morfolojik düzeyde tür teşhislerinin zor olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle yaptıkları çalışmada beş toksigenik ve patojenik *Fusarium* spp.'nin (*Fusarium avenaceum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* ve *F. sambucinum*) hızlı ve güvenilir tür teşhisine imkân sağlayan floresan temelli PCR geliştirmişlerdir. Bu metot floresan oligonükleotit primerleri kullanarak türe özgü DNA parçalarının PCR çoğaltımına dayanmaktadır. Bu metot ayrıca bu *Fusarium* türlerinin kesin, güvenilir ve hızlı teşhisini sağlamakla birlikte diğer bir avantajı ise etidyum bromür gibi kanserojen kimyasallar yerine floresan boyaların kullanımı ile bu kimyasallara maruz kalma potansiyelini azaltmaktadır.

Kosiak ve diğ. (2005)'nin yapmış oldukları çalışmada ribozomal DNA'nın IGS bölgesindeki varyasyon RFLP (Restriction fragment length polymorphisms) profillerinin birleştirilmesiyle, *F. equiseti*'nin *Fusarium* cinsi içerisinde tür içi fenotipik temelli taksonomisini belirlemeye çalışmışlardır. Bu çalışmada 25 izolat Norveç'ten 2 izolatta Danimarka'dan temin edilerek toplamda 27 adet *F. equiseti* izolatu kullanılmıştır. Tüm izolatların trichothecene analizi yapılmış ve IGS rDNA çoğaltımı CNL12 ve CNS1 primeri kullanılarak sağlanmıştır. IGS rDNA 4 tane enzim ile kesilmiştir. (*AvaII*, *CfoI*, *EcoRI* ve *Sau3AI*) RFLP bilgilerine dayanılarak dört haplotip tespit edilmiştir.

Chehri ve diğ. (2011), İran'ın Kermanshah bölgesinden farklı lokasyonlardan hastalıklı kabakgil bitkilerinden toplam yüz adet *Fusarium* izolatu elde etmişlerdir. Yapılan morfolojik teşhis sonucu bu izolatlar *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. equiseti*, *F. semitectum* ve *F. solani* olarak belirlenmiş ve bu izolatlar ile sağlıklı kabakgil bitkileri üzerinde yapılan patojenite testi sonucu tüm izolatların hastalık oluşturduğunu belirlemişlerdir. Ribozomal DNA (rDNA)'nın ITS bölgesi ve RFLP analizine dayanılarak beş *Fusarium* türü iki önemli gruba ayrılmıştır. Bu çalışma

sonucunda ITS+5.8S PCR-RFLP analizi kullanılarak *Fusarium* türlerinin varyasyonu analiz edilmiştir.

ITS bölgesi fungus DNA'sının çok geniş dizilim bölgesidir. Funguslarda rDNA-ITS ve rDNA-IGS bölgeleri rDNA'nın diğer tekrar bölgelerine göre yüksek derecede farklılık göstermektedir (O'Donnel ve Gray, 1995; Depriest ve Been, 1992; O'Donnel, 2000; Brasileiro ve diğ., 2004).

Young-Mi ve diğ. (2000)'nin yapmış oldukları çalışmada *Fusarium* cinsine ait 12 türün genetik akrabalıkları rDNA'nın ITS bölgesi ITS1 ve ITS4 primeri kullanılarak incelenmiştir. ITS1/4 primeri ile çoğaltılan PCR ürünleri yedi enzime uygulanmıştır. RFLP bant profilleri belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır. RFLP analizine dayanılarak bu 12 tür 5 grup içerisinde toplanmıştır.

*F. equiseti* içerisinde 3 farklı morfolojik tipin olduğunu (Nelson ve diğ. 1983) tarafından belirtilmiş ve bunlar; birinci tipi kısa apikal hücreli *F. equiseti* var. *bullatum* Wollenw. olarak, ikinci tipi uzun apikal hücreli şekli ile *F. scirpi* var. *filliferum* olarak isimlendirilmiş ve daha sonraları polifialid üzerindeki mikrokonidilerinin belirlenmesi ile *F. scirpi* olarak isimlendirilmiştir (Burgess ve diğ., 1985). Üçüncü tip ise *F. equiseti* ile çok benzer olan *F. scirpi* var. *compactum*'dur. Ancak daha sağlam ve güçlü konidilere sahip olması ve izolasyon yapılan taze kültürlerde kırmızı renkli pigment oluşturması nedeniyle *F. compactum* (Wollenw.) Rallio. olarak tanımlanmıştır (Gerlach ve diğ., 1982).

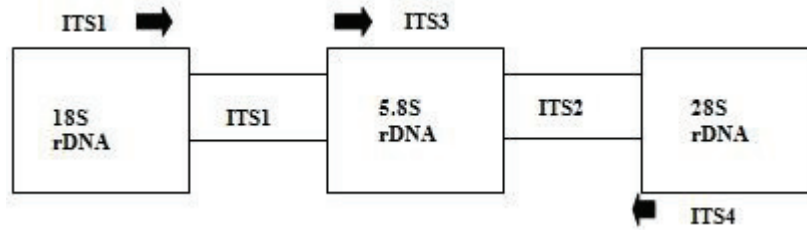
Çekirdek ribozomal DNA tekrarı hem yüksek düzeyde korunmuş genleri, hem de çok daha değişken boşluk (spacer) bölgelerini içermektedir. Büyük ve küçük alt birim (large and small subunit) genlerinde bulunan korunmuş dizilimler birbiri ile uzak akraba funguslardaki ilişkileri belirlemeye yönelik çalışmalarda çoğunlukla kullanılmaktadır (Gaudet ve diğ., 1989; Bowman ve diğ., 1992a; b; Bruns ve diğ., 1992). Bununla birlikte, çok hızlı bir şekilde evrimleşen boşluk bölgeler (spacer regions) ise özellikle birbiri ile daha yakın akraba olan taksonlar arasındaki filogeniyi ortaya koymada kullanışlı araçlar olmuşlardır ki hem ITS (Internal Transcribed Spacer) (Nazar ve diğ., 1991; Baura ve diğ., 1992; Lee ve Taylor, 1992; O'Donnell, 1992), hem de IGS (Internal Genomik Spacer) bölgeleri, funguslar ile ilgili taksonomik ve evrim çalışmalarında bu amaçlar için kullanılmıştır.

Lee ve Taylor (1992), kakao (*Theobroma cacao*) ağaçlarındaki kara kapsül hastalığına neden olan ve morfolojik olarak birbirine çok benzeyen *Phytophthora palmivora*, *P. megakarya* ve *P. capsici* türlerini içeren *P. palmivora* complex şeklinde isimlendirilen türler ile grup dışı olarak *P. citrophthora* ve *P. cinnamomi* olmak üzere 5 tür arasındaki genetik farklılaşmayı ITS I ve ITS II bölgelerindeki değişikliklere göre belirlemeye çalışmışlardır. ITS1 ve ITS4 üniversal primer çiftleri kullanılarak çoğaltılan ITS bölgeleri, *RsaI* endonükleaz enzimi ile kesildiğinde, 5 tür açısından tür içinde herhangi bir ITS farklılaşması görülmezken, türler arasında farklı RFLP profilleri elde edildiği bildirilmiştir. Benzer sonucun ITS dizi analizleri sonucunda da elde edildiği belirlenmiştir. Özellikle *P. citrophthora* türünün kakao ağaçlarından elde edilen izolatları ile turunçgil ağaçlarından elde edilen izolatlarının farklı ITS dizileri elde edilerek birbirinden ayırt edilebildiği ve bu sonucun mtDNA-RFLP profilleri ile de belirlenebildiği bildirilmiştir.

*Fusarium oxysporum* kompleks ve *Gibberella fujikuroi* kompleks grupları içerisine giren *Fusarium* spp.'de, 1.2kb'lık ITS bölgesini içeren rDNA parçasının ITS2 bölgesinde iki farklı ortolog olmayan homoplastik parçanın olduğu bildirilmiştir (O'Donnell ve Cigelnik, 1997). Buna göre bu iki parçaya tip I ve tip II ITS2 olarak isim verilmiştir ve ikisi arasındaki farklılığın dizileme analizine göre %16,5 olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar, ITS2 bölgesinde ortaya çıkan bu iki farklı tipin fungusların evrimleştiği eski dönemlerde türler arası hibridizasyon (Xenolog kaynaklı) veya gen katlanması (duplikasyon, paralog kaynaklı) yollarının takip edilmesi ile ortaya çıkabilmiş olabileceğini bildirmişlerdir.

Bazı ökaryot organizmaların 28S rRNA ve ITS bölgelerinin benzer karakteristik dizilim gösterdiği ve değişken bölgeler içerisinde küçük basit DNA tekrar motiflerini ihtiva ettikleri bildirilmiştir (Gonzalez ve diğ., 1990).

Fungusların fenotipik ve morfolojik özellikleri teşhislerini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle *Fusarium* teşhisinde moleküler biyolojik metotların kullanımı son zamanlarda yaygınlaşmaktadır. Ribozomal DNA (rDNA)'nın tekrar üniteleri gen bölgeleri veya gen dışı bölgeleri içerir. Her tekrar üniteleri 18S-5.8S ve 28S rDNA, ITS ve IGS bölgelerinden oluşur (Şekil 2.1.) (O'Donnell, 1992).



**Şekil 2.1. Ribozomal DNA gen bölgeleri**

Bir çok araştırmacı yapılan çalışmalarda ITS bölgesinin nükleotit dizilimi *Fusarium* türlerinin teşhisinde son derece kullanışlı olduğunu bildirmişlerdir (Kim ve diğ., 1992; Mes ve diğ., 1994; Min 1995).

Nakamura ve diğ. (1998) DNA'daki polimorfizmi ortaya çıkarmada PCR-RFLP analizi sekans analizi ile birlikte en kullanışlı metot olduğunu belirtmişlerdir.

Hemalatha ve Banu (2010), tarafından RFLP parmak izi tekniği ırk karakterizasyonu için en hassas metot olarak kabul edilmektedir.

Kim ve diğ. (1993)'nin bildirdiğine göre IGS bölgesinin PCR-RFLP analiz metodu tür içindeki ırkların kategorizasyonunda uygun bir metot olarak ortaya çıkmaktadır.

IGS RFLP analizi *Fusarium* türlerinin ayrımı için bir çok araştırmacı tarafından tercih edilmekte ve bu araştırmacılar bu metodu karakterizasyon ve filogenetik çalışmalar için kullanışlı bir moleküler yöntem olduğunu bildirmektedirler (Appel ve Gordon 1996; Baayen ve diğ., 1997).

Edel ve diğ. (1997)'nin yapmış oldukları çalışma ile 87 izolattan 18 *Fusarium* cinsine ait izolat ribozomal DNA'nın RFLP analizi ile tanımlanmıştır. PCR, ITS parçaları ve 28S rDNA'nın değişen alanları çoğaltımı için kullanılmıştır. 8 kesici enzimle yapılan RFLP analizi sonucu 23 rDNA haplotipi tanımlanmıştır. Birkaç *Fusarium* türünde polimorfizm tespit edilmiştir.

Demeke ve diğ. (2005)'nin yapmış oldukları çalışmada buğday, arpa, yulaf, mısır ve çavdardan elde edilen *Fusarium* cinsi içerisinde toplam 148 izolatin (9 *Fusarium avenaceum*, 12 *F.acuminatum*, 7 *F.crookwellense*, 12 *F.culmorum*, 11 *F.equiseti*, 77 *F.graminearum*, 10 *F.poa*, 10 *F.sporotrichoides*) türe özgü primerler kullanılarak moleküler teşhisi yapılmıştır. Ayrıca bu izolatlarla trichothecene analizi tox5-1/2 primeri kullanılarak yapılmış ve bu analiz sonucunda çok önemli trihothecene üreten türler olarak *F.culmorum*, *F.graminearum* ve *F.sporotrichoides*

tespit edilmiştir. Tox5-1/2 primeri kullanılarak Kanada’ da yapılan bu çalışmada 11 *F. equiseti* izolatından sadece ikisinde bu genin bulunduğu bildirilmiştir.

Hestbjerg ve diğ. (2002), kuzey Avrupa ülkelerinden Norveç, Almanya, Danimarka ve Avusturya’dan elde edilen *Fusarium culmorum* (102) ve *F. equiseti* (57) izolatlarının ürettikleri trikotesen çeşitleri ve miktarlarının hakkında detaylı bilgiler vermişlerdir. Buna göre 57 *F. equiseti* izolatından sadece 8 tanesinin trikotesen ürettiği bildirilirken, trikotesenlerden ise NIV, DAS, FX ve MAS üretimi gözlenmiştir.

Nissen ve Vogel (1998), trichothecene sentez geninin (*tri5*) DNA diziliminden geliştirilen primer ile *Fusarium* türlerinin trichothecene üretim potansiyelleri analiz edilmiştir. Primer çifti 64 *Fusarium* türü ve bunun yanı sıra fungus ve bakterilerden elde edilen DNA’ lar kullanılarak test edilmiştir. Elde edilen gen dizilimleri (*tri5*)’ nin yüksek derecede benzerlik gösterdiği belirlenmiş ve ilgili türlerin trichothecene üretim yetenekleri literatür bilgileri ile bağdaştırılarak PCR geliştirilmiştir. *Fusarium* türlerinin kontamine olmuş tahıllarda trichothecene üretimi TOX-5 primeri kullanılarak belirlenmiştir. 3 dakika denaturasyon, 95 °C’de ve sonra 38 döngü 30s 95 °C’de, 20 s 62 °C’de, ve 45s 72 °C’de, son uzama (final extension) ise 5 dakika 72 °C PCR koşullarında *F. equiseti* olarak tür teşhisi doğrulanan izolatlarda, trikotesen mikotoksinlerinin üretiminden sorumlu ve toksin oluşumunun birincil basamağı olan *Tri* gen lokusu temelinde geliştirilen Tox5/1; 5’ GCTGCTCATCACTTTGCTCAG 3’ ve Tox5/2 5’ CTGATCTGGTCACGCTCATC 3’ primer dizilimi kullanılmıştır.

Marin ve diğ. (2012)’nin yapmış oldukları çalışmada çeşitli iklim bölgelerindeki hububatlarda toksigenik tür olan *F. equiseti* ve *F. acuminatum* kullanılmıştır. Bu çalışmada İspanya ve diğer ülkelerdeki buğday ve arpadan izole edilen *F. equiseti* ve *F. acuminatumun*’ un (EF-1 $\alpha$ ) gen dizilemesi kullanılarak filogenetik analiz yapılmıştır. Buna göre elde edilen filogenilerde *F. equiseti* izolatlarının tip I ve tip II olmak üzere iki gruba ayrıldığı, *F. scirpi* ise ayrı bir grup olduğu bildirilmiştir. Tip I ve tip II grupları içerisindeki *F. equiseti* izolatlarının türdeş (homogeneous) oldukları ve tür içi farklılaşmanın çok düşük düzeyde olduğu bildirilirken, *F. scirpi* grubu içerisindeki izolatlarda değişkenliğin yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca oluşan gruplarda konukçu etkisinin olmadığı ve Kuzey ve Güney Avrupa *F. equiseti* izolatlarının iki filogenetik grup içerisinde dağılım

gösterdiği tespit edilerek coğrafik dağılımın da filogeni üzerinde etkisinin olmadığı bildirilmiştir. İspanya izolatlarında, Tip A ve Tip B trichothecenenin üretimi multitoksin analiz metodu kullanılarak deoxynivalenol, nivalenol ve diğer trichothecenes belirlenmiş ve Güney Avrupa için toksin kontaminasyonu önemli risk olarak değerlendirilmiştir

Liorens ve diğ. (2006)'nin yapmış oldukları çalışmada toplam 75 *Fusarium* cinsine ait izolat (35 *Gibberella fujikuroi*, 26 *F. oxysporum*, 7 *F. graminearum*, 5 *F. culmorum*, 1 *F. cerealis* ve 1 *F. poae*) farklı konukçulardan morfolojik, fizyolojik ve genetik olarak karakterize edilmiştir. Morfolojik karakterizasyon makroskobik ve mikroskobik görünüme göre yapılmış olup fiziksel karakterizasyon ise izolatların fumonisin B1 (FB<sub>1</sub>) fumonisin B2 (FB<sub>2</sub>) zearalenone (ZEA) ve tip B trichothecenes (deoxynivalenol, nivalenol ve 3-acetyldeoxynivalenol) üretebilme durumlarına göre yapılmıştır. İzolatların moleküler karakterizasyonu ise rDNA'nın IGS bölgesinin PCR-RFLP metodu ile yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda *G. fujikuroi* izolatlarının düşük ve yüksek fumonisin üreticileri olmak üzere ayrılacağı bildirilmiş ayrıca *G. fujikuroi* izolatlarının farklı konukçu ve fumonisin üretim kapasitelerine göre haplotipleri *HhaI*, *EcoRI*, *AluI*, *PstI* ve *XhoI* enzimleri kullanılarak gruplandırılmıştır. Fakat enzim uygulamasından sonraki sonuçlara göre IGS bölgesinde izolatların coğrafik orijinleri ile herhangi bir ilişki görülmemiştir. *F. graminearum*, *F. culmorum* ve *F. cerealis* izolatları yüksek ZEA ve tip B trichothecenes üreticisi iken *F. oxysporum* ve *G. fujikuroi* izolatlarında bu üretimin görülmediği bildirilmiştir.

Jurado ve diğ. (2005)'nin yapmış oldukları çalışmada, *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* ve *F. equiseti* ile bulaşık hububat tohumlarında önemli derecede trichothecenes, zearalenone ve diğer mikotoksinler için kaynak oluşturduğu ve bu mikotoksinlerin insan ve hayvanlarda önemli hastalıklara neden olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca bu türlerin *Fusarium* başak yanıklığı hastalığına neden olduğu ve bu hastalığın da hububat alanlarında önemli kayıplara yol açtığı ve bu türlerin erken teşhisi ile gıdalara toksin bulaşmasının engellenebileceğini bildirmişlerdir. Bu nedenle bu türlerin teşhisi için

## **2.2. Endofit Funguslarla Yapılan Çalışmalar**

Endofitik mikroorganizmalarla ilgili çalışmalar Dünya'da da 1990'lı yıllarda başlatılmıştır. Başlangıçta yalnızca *Poaceae* familyasına bağlı yabani graminelerde

*Clavicipitaceae* familyasında bulunan *Neotyphodium* ve *Acremonium* cinslerine ait funguslar üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Ancak daha sonraki yıllarda tek yıllık kültür bitkileri ile odunsu bitkilerde de çalışmalar yapılmıştır. Bu konuda yapılan çalışmalar dünyada da oldukça yenidir. Buğday bitkisinde ancak bir iki çalışma yapılmış olup çalışmalar endofitlerin saptanmasından öteye gidememiştir. Diğer yandan, Amerika Birleşik Devletlerinde 2003 yılından beri kültür bitkilerinden elde edilen (TipII) endofitlerin kültür bitkilerinde hastalık ve zararlılara karşı oluşturduğu dayanıklılık üzerine yapılan çalışmalar artış göstermektedir. Bu artışta ilacli mücadelenin olumsuz etkileri önemli rol oynamıştır.

Değişik bitkilerde endofitik funguslarla yapılan çalışmalarda, bitkilerin besin alımında ve performansındaki gelişmelerde endofitik fungusların fitohormonlar, siderofor ve fosfor bağlama ile ilişkili enzimlerin üretimini yoğun bir şekilde sağladığı ve bununla kuvvetli ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (Gassoni ve diğ., 1997; Barthoni ve diğ., 2001; Khan ve diğ., 2001; Obledo ve diğ., 2003).

Yine bazı araştırmacılar konukçuda endofitlerin bir antagonistik denge oluşturduklarını ve koşullara bağlı olarak mutualistik etkileri olduğunu bildirmektedir (Schulz ve Boyle, 2005; Donoso ve diğ., 2008).

Brezilya’da yapılan bir çalışmada araştırmacılar orkide bitkilerinde bir *Alternaria* sp. ile bir *F. oxysporum* izolatının kuvvetli antibakteriyel aktivite gösterdiğini yine *Fusarium* spp.’ninde aralarında bulunduğu bazı endofitik fungusların patojenik mayalara karşı antimikrobial aktiviteleriyle hastalığın önlenmesinde rol oynadığını saptamışlardır (Vaz ve diğ., 2009).

Tunalı ve Kansu (2010), buğdayda endofitik *Fusarium* türlerini incelemiş, sağlıklı bitkilerden *F. oxysporum*’un en fazla izole edildiğini bunu *F. equiseti*’nin izlediğini saptamıştır. Yaptıkları patojenite testlerinde ise *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. solani* gibi türlere ait izolatların kontrolle aynı grupta yer aldığını bitkide hiç hastalık oluşturmadığını, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* ve *F. solani*’nin bazı izolatlarının ise düşük düzeyde hastalık oluşturduğunu, pozitif kontroldeki patojen *Fusarium* spp.’nin ise tamamen ayrı bir grupta yer aldığını tespit etmişlerdir.

ABD de 2003 yılında Amerikan Fitopatoloji Derneğinin Biyolojik Mücadele Komitesi bir teklif yaparak her yıl endofitlerle ilgili bir sempozyum organize

edilmesine karar vermiş ve 2005 yılında “Biyolojik Mücadele İçin Acil Bir Araç”: Endofitler başlığı altında Austin, Teksas’ta sempozyum yapılmıştır. Sempozyumdan daha sonra aynı isimle yapılan bir yayında (Backman ve Sikora, 2008) faydalı mikroorganizmaların bitkide bulunduğu bu endofit ile bitkideki dayanıklılık mekanizmaları arasındaki ilişkinin çalışılması gerektiği vurgulanmıştır. Yine aynı yayında endofitlerin bitki bünyesinde bulunması ile bitkinin bu fungal kitlenin varlığından dolayı enerji kaybettiğini ancak mikroorganizmanında bu zararı önlemek için bitki sağlığını geliştirmesinin karşılıklı bir mutualistik ilişki olduğunu ifade etmişlerdir. Sonuçta her bir hektar arazide endofit inokulumun çoğaltılıp bitkiye verilmesi geleneksel pestisitlere alternatif olduğunda biyoteknoloji endüstrisi cazip konuma geçebilecektir.

Ancak endofitik funguslarla ilgili çalışmalar başlangıçta daha çok yabancı buğdaygillerde (*Poaceae* familyası bitkileri) bulunan *Clavicipitaceae* familyasına bağlı bazı fungus türlerinde yoğunlaşmıştı. Bazı kaynaklar bu endofitleri Tip I Endofit olarak isimlendirmiştir. Kültür bitkilerinde endofitik olarak bulunan funguslarla ilgili çalışmalar oldukça yeni sayılabilir. Bu endofitler ise Tip II olarak isimlendirilmiştir. Bu çerçevede buğdayda kök ve kök boğazı hastalıklarına endofitlik *Fusarium* spp.’nin etkileri konusunda dünyada bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan bir çalışmada buğday saplarında *F. culmorum* ve *F. graminearum*’un sporulasyonunu buğdaygillerden izole edilen saprofitik organizmalardan *Clonostachys roseae*’in izolatlarının sırasıyla %85–99 ile %100 oranında azalttığı, *F. equiseti*’nin birkaç izolatu ile *Chaetomium globosum* ve *Epicoccum nigrum*’un birer izolatında spor sayısında yüksek oranda düşüşe neden olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar tarlada yaptıkları denemelerde ise mısır bitkisinde tarlada *F. verticillioides*, *F. proliferatum* ve *F. graminearum*’un kolonizasyonunu en iyi *C. roseae*’nin azalttığını ve mısır koçanlarında *F. graminearum*’un kolonizasyonunu da *Clonostachys rosea*, *Cladosporium. cladosporoides* ve *F. equiseti*’nin azalttığını ortaya koymuşlardır (Luongo ve diğ., 2005).

Yapılan bir araştırmada, yabancı buğdaygillerde endofitik olarak bulunan *Neotyphodium* spp. ve *Acremonium* spp.’nin in vitro şartlarda kök ve kök boğazı patojenleri, *Bipolaris sorokiniana*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *Rhizoctonia cerealis* ve *Gaumnomyces graminis tritici* etmenlerinin petrideki gelişimini

kontrole oranla %10.8 ila %97.8 oranında geriletmediği belirtilmiştir (Tunalı ve Marshall, 2000).

Çeltik bitkilerinde fungal saprofitler ve endofitik olarak gelişen potansiyel patojenlerin ortaya konulması amacıyla yapılan bir çalışmada saprofit olarak *Alternaria alternata*, *Epicoccum purpureascens*'in bitki yapraklarında kolonize olduğu *F. equiseti*, *F. oxysporum* ve *Phoma sorghina*'nın ise hiçbir hastalık belirtisi oluşturmadan bitki bünyesinde bulunduğu saptanmıştır. Kurak şartlarda kolonize olan endofitlerin nemli şartlara oranla farklılıklar gösterdiği de bu çalışmada ortaya konulmuştur (Fisher ve Petrini, 1992).

Bazı endofitik fungusların, bir hastalık belirtisi oluşturmadan latent olarak bitkide bulunabildiği ve daha sonra bitki dokularında bir zayıflama olduğunda hastalık oluşturduğu fakat pek çok endofitin tamamıyla bitkiye zararsız olup hastalık oluşturmadığı aksine bitki ile karşılıklı bir fayda oluşturduğu belirtilmiştir (Lodge ve diğ., 1996).

Bir çalışmada, Klein Centaura, Klein Dragon ve Buck Ombu buğday çeşitlerinde bulunan endofitik fungusların analizi yapılmış, bunun için 450 buğday yaprak örneği kullanılmıştır. Bu çalışmada epifitik fungusları elemine etmek için %100 lük NaOCl de 1.5 dakika süreyle yapraklar tutulup sonra iki kere steril saf suda çalkalanıp %2'lik PDA bulunan petrilere yerleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda *Fusarium spp.*'nin de dâhil olduğu 19 endofitik fungus türü saptandığı bildirilmiştir (Larran ve diğ., 2002).

Guyana ormanlarında, endofitik *Colletotrichum* izolatları ile yapılan bir çalışmada konukçuya özelleşme meydana gelmediği ve izolatlar arasında da önemli bir genetik farklılık bulunmadığı belirtilmiştir (Lu ve diğ., 2004).

Endofitik fungusların metabolit üretimleri ve genotipik farklılıkları üzerine yapılan bir çalışmada *Cylindrocarpon destructans* ve *Heliscus lugdunensis* türlerine ait 49 izolatin RAPD PCR ile analizi ile rDNA-ITS sekansları yapılmış ve doğal metabolit ürünlerle izolatların genetik dağılımları arasında pozitif bir ilişki olduğu saptanmıştır (Seymour ve diğ., 2004).

Nohut bitkilerinde endofitik *Fusarium spp.*'lerin patojenik karakterizasyonu ve tanılanması konusunda Rodrigues ve Menezes (2006), yaptıkları çalışmada, endofitik olarak *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. anthophilum*, *F.*

*sporotrichoides*, *F. moniliforme* ve *Fusarium* spp.'yi saptamışlar, patojenite çalışmalarında bu türlerin hiç birisinin patojen olmadığını içlerinde *Fusarium* spp. bulunsa da bu tohumların sağlıklı kabul edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

Sağlıklı çavdar bitkilerinin rizosferlerinden elde edilen iki *F. culmorum* izolatu, bitkilerin kök bölgelerine inokule edilip, 2 gün sonra patojen uygulandığında kontrole nazaran hastalığın %86'dan %7.45 ve %7.62'ye gerilediği ortaya konulmuştur. Ayrıca, *F. culmorum*'un aynı izolatının 42 gün sonunda bitkinin yaş ağırlığında %30 artış sağladığı da saptanmıştır. Ancak bu izolatın kitini hidrolize edemediği ve demir için patojenle rekabete giremediği de ortaya konulmuştur (Jaroszuk-Scisel ve diğ., 2008).

Lee ve diğ., (2009) endofit *F. verticillioides* mısır rastığı etmeni *Ustilago maydis* ile nasıl etkileşime girdiğini ve sonuçlarını incelemiştir. Bu çalışmada eş zamanlı olarak mısır fidelerine endofit *F. verticillioides* ve patojen *U. maydis* inokule edilmiştir ve hastalık şiddeti ve bitki gelişimi değerlendirilmiştir. Endofit *F. verticillioides* ve patojen *U. maydis* birlikte inokule edildiğinde hastalık şiddetinde önemli düzeyde azalma ve bitki gelişiminde hastalıklı olanlara oranla artış gözlenmiştir. Kontrolde ise sadece endofit *F. verticillioides* kullanılmış ve bitki gelişimine ölçülebilir bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Rodrigues ve Menezes., (2006) yaptıkları çalışmada ilk olarak böğrülce (*Vigna unguiculata*) tohumlarından blotter yöntemiyle elde ettikleri *Fusarium* örneklerinin morfolojik teşhisini yapmışlardır. Teşhis sonucunda *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. anthophilum*, *F. sporotrichioides*, *F. verticillioides* ve *Fusarium* sp. türlerinin içerisinde en yaygın olarak *F. semitectum* izole etmişlerdir. Hiçbir tür hassas börülce çeşidinde (BR 17-Gurgueia) patojenik olmazken sadece kontrol olarak kullanılan *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* aynı çeşitte aynı çevre şartlarında sararma, vasküler solgunluk ve ölüm belirtileri göstermiştir.

Tunalı ve Kansu., (2012) yaptıkları çalışmada sağlıklı buğday örneklerinden *F. oxysporum*, *F. acuminatum*, *F. solani*, *F. subglutinans*, *F. dimerum*, *F. equiseti*, *F. poa* türlerini izole etmişlerdir. Bu endofit türler arasında en yaygın olan iki türün sırasıyla *F. oxysporum*, *F. acuminatum* olduklarını bildirmişlerdir. Diğer taraftan hasta bitkilerden *F. equiseti*, *F. solani*, *F. avenaceum*, *F. poa*, *F. dimerum*, *F. graminarum* izole etmişlerdir. Bu türler arasından en yaygın olanlarını ise sırasıyla *F.*

*equiseti* ve *F. dimerum* olarak bildirmişlerdir. Endofit *Fusarium* türleri ile yaptıkları patojenite testlerinde ise hiçbir endofit türün patojen olmadığını ve bazı izolatların ise bitki boy ve ağırlığını arttırdığını kontrolde patojen olarak kullanılan *F. pseudograminearum*'un ise şiddetli hastalık oluşturduğunu belirlemişlerdir.





Çizelge 3.1. *Fusarium equiseti* izolatlarına ait bilgiler

Sıra No	İzolat No	DNA No	Fungus Türü	Örnek Alınan Yer	Örnek Alınan Agr-Ek. Bölğ.	Konukçu	Koleksiyon/ Yılı
<b>Hasta Bitkilerden Elde Edilen İzolatlar</b>							
1	H09W127-1K2	E25	<i>F. equiseti</i>	Ankara/Kalecik	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
2	H09W103-5K2	E28	<i>F. equiseti</i>	Ankara/Beypazarı	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
3	H09B84-1K1	E43	<i>F. equiseti</i>	Ankara/Gölbaşı	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Hordeum vulgare</i>	ZFML, 2009
4	H09B107-1K2	E45	<i>F. equiseti</i>	Ankara/Nallıhan	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Hordeum vulgare</i>	ZFML, 2009
5	H09W31-Kök	E11	<i>F. equiseti</i>	Kastamonu/Merkez	Karadeniz Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
6	H09W39-1B3	E53	<i>F. equiseti</i>	Kastamonu/Taşköprü	Karadeniz Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
7	H09W39-3K1	225	<i>F. equiseti</i>	Kastamonu/Taşköprü	Karadeniz Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
8	H09W10-4K1	E23	<i>F. equiseti</i>	Kastamonu/Tosya	Karadeniz Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
9	H09W18-2K1	E58	<i>F. equiseti</i>	Karabük/Yenice	Karadeniz Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
10	51b	E38	<i>F. equiseti</i>	Konya/Merkez	Güney Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2007
11	37b	E57	<i>F. equiseti</i>	Konya/Merkez	Güney Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2007
12	H012W12-1B3	E20	<i>F. equiseti</i>	Konya/Sarayönü	Güney Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2012
13	42e	E19	<i>F. equiseti</i>	Konya/Merkez	Güney Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2007
14	H012W26-1K1	346	<i>F. equiseti</i>	Konya/Ereğli	Güney Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2012
15	H09W70-3K2	E51	<i>F. equiseti</i>	Kırıkkale/Delice	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009

**Çizelge 3.1. (devam). *Fusarium equiseti* izolatlarına ait bilgiler**

16	H09W77-1K1	E56	<i>F. equiseti</i>	Kırıkkale/Cabatobaşı	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Secale cereale</i>	ZFML, 2009
17	H010R29-1B1	209	<i>F. equiseti</i>	Kırıkkale/Balışeyh	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Secale cereale</i>	ZFML, 2010
18	H09W7-2B1	E7	<i>F. equiseti</i>	Amasya/Merkez	Doğu Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
19	H09W5-3K	265	<i>F. equiseti</i>	Amasya/Merzifon	Doğu Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
20	H09W145-5K2	E68	<i>F. equiseti</i>	Çorum-Mecitözü	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
21	H010A30-3B2	307	<i>F. equiseti</i>	Çorum/Sungurlu	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Aegilops sp.</i>	ZFML, 2010
22	H09W8-2K1	255	<i>F. equiseti</i>	Çorum/Osmancık	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
23	H09W143-3K2	E18	<i>F. equiseti</i>	Çorum/Merkez	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
24	H09W62-4K2	E21	<i>F. equiseti</i>	Çorum/Merkez	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
25	H09W47-4K1	E6	<i>F. equiseti</i>	Sinop/Kabalı	Karadeniz Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
26	H09W108-3K1	E4	<i>F. equiseti</i>	Eskişehir/Sarıyer	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
27	2008 Sörvey 2-3	E46	<i>F. equiseti</i>	Eskişehir/Sivrihisar	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Hordeum vulgare</i>	ZFML, 2008
28	H010W64-3K1	143	<i>F. equiseti</i>	Samsun/O. Mayıs	Karadeniz Bölğ.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2010
29	H09W53-1K1	E15	<i>F. equiseti</i>	Samsun/Bafra	Karadeniz Bölğ.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
30	T-3-1	E81	<i>F. equiseti</i>	Samsun/Terme	Karadeniz Bölğ.	<i>Phaseolus vulgaris</i>	ZFML, 2012
31	Ç-17-1	E82	<i>F. equiseti</i>	Samsun/Çarşamba	Karadeniz Bölğ.	<i>Phaseolus vulgaris</i>	ZFML, 2012
32	H09W130-4K1	E72	<i>F. equiseti</i>	Çankırı-Kızılırmak	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
33	H09W14-5B3	E73	<i>F. equiseti</i>	Çankırı/Ilgaz	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009

**Çizelge 3.1. (devam). *Fusarium equiseti* izolatlarına ait bilgiler**

34	H09W132-1K1	E66	<i>F. equiseti</i>	Çankırı/Kızılırmak	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
35	H010W37-2K1	258	<i>F. equiseti</i>	Tokat/Zile	Doğu Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2010
36	H012W20-3K1	E44	<i>F. equiseti</i>	Aksaray/Merkez	Güney Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2012
37	H012W22-2K2	306	<i>F. equiseti</i>	Aksaray/Merkez	Güney Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2012
38	H012W35-1K	237	<i>F. equiseti</i>	Kayseri/Merkez	Güney Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2012
39	09-20	E83	<i>F. equiseti</i>	Amasya/Gökova	Doğu Anadolu Böl.	<i>Vicia sativa</i>	ZFML, 2009
<b>Sağlıklı Bitkilerden Elde Edilen İzolatlar</b>							
40	En63-1	151	<i>F. equiseti</i>	Kastamonu/Taşköprü	Karadeniz Böl.	<i>Lolium sp.</i>	ZFML, 2009
41	S012W7-1B1	E39	<i>F. equiseti</i>	Konya/Cihanbeyli	Güney Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2007
42	S010B28-3K1	180	<i>F. equiseti</i>	Kırıkkale/Merkez	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Hordeum vulgare</i>	ZFML, 2010
43	S09W78-5K1	83	<i>F. equiseti</i>	Kırıkkale/Çelebi	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
44	En 88-1	155	<i>F. equiseti</i>	Sakarya/Merkez	Marmara Böl.	<i>Lolium sp.</i>	ZFML, 2009
45	S09W129-1K2	E59	<i>F. equiseti</i>	Çankırı/Merkez	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
46	S09W13-Y2	94	<i>F. equiseti</i>	Çankırı/İlgaz	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2009
47	S012W20-2K1	205	<i>F. equiseti</i>	Aksaray /Merkez	Güney Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2012
48	S012W21-5K1	160	<i>F. equiseti</i>	Aksaray/Sultanhanı	Güney Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2012
49	S012W47-4K1	310	<i>F. equiseti</i>	Yozgat/Sorgun	Kuzey Anadolu Böl.	<i>Triticum aestivum</i>	ZFML, 2012

ZFML: Ziraat Fakültesi Mikoloji Laboratuvarı

### **3.1.2 Çalışmada Kullanılacak Laboratuvar Ekipman ve Materyalleri**

Tez çalışmasının fungal materyalleri dışında kalan tüm laboratuvar araç, gereç ve ekipmanları diğer çalışma materyallerini oluşturmaktadır. Başta fungal izolatlarla ait daimi kültür koleksiyonunun yer aldığı -86 °C derin dondurucu ve geçici kültürlerin muhafaza edildiği +4 ve -20 °C buzdolapları, fungal kültürlerin geliştirilmesi için kullanılan soğutmalı ve ışıklı inkübatör, morfolojik karakterizasyonda kullanılan ışık mikroskopları, DNA ekstraksiyonu ve PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) uygulamaları için kullanılan santrifüjler, liyofilizatör, thermal cycluser ve elektroforez üniteleri ile tüm el gereçleri ve sarf malzemeleri (mikropipetler, bistüri, öze, şişe, erlenmayer vb.) çalışmanın diğer materyalleridir.

## **3.2 Yöntem**

### **3.2.1 İzolatların Tek Spor İzolasyonu**

Derin dondurucuda -86 °C'de %15 gliserol ve eğik agar içerisinde +4 °C'de bulunan fungal izolatlardan küçük agar parçaları içerisinde patates dekstrozu agar (PDA) bulunan petrilere aşılanmıştır. Burada gelişen izolatlardan küçük bir parça alınarak steril ependorf içerisine aktarılmıştır. Daha sonra ependorf içerisine steril su ilave edildi ve vorteks işlemi yapıldı. Bu işlemden sonra ependorf içerisinden yaklaşık 40-50 µl alınarak su agar ortamına (WA) aktarıldı. Su agrada 24 saatte çimlenen fungal sporelerden bir tanesi ışıklı mikroskop altında alındı ve içerisinde sentetik nutrient agar (SNA) bulunan petride gelişmeye bırakılmıştır.

### **3.2.2 İzolatların Morfolojik Karakterizasyonu**

Sentetik nutrient agar (SNA) ortamında geliştirilen izolatların ışık mikroskopu kullanılarak konidi morfolojisi ve petrideki pigmentasyonu göz önünde bulundurularak morfolojik karakterizasyonu yapılmıştır.

### **3.2.3 Fusarium equiseti İzolatlarının Türe Özgü Primerle Moleküler Teşhislerinin Yapılması**

#### **3.2.3.1 DNA ekstraksiyonu**

DNA izolasyonları, tek spor kültürleri hazırlanıp koleksiyona alınan kültürlerden yapılmıştır. Fungus DNA'sı izolasyonu için misellerin çoğaltılmasında PDA (Potato

Dextrose Agar) ve PDB (Potato Dextrose Broth) ortamları kullanılmıştır. Tek spor izolatları PDA veya PDB'da 23°C'de 12 saat ışık 12 saat karanlık periyot koşullarında tutularak misel üretimleri yapılmıştır. Çoğaltılan miseller önce süzülerek 2 ml'lik viallere konulmuş, daha sonra liyofilizatöre konulup, 24 saat liyofilize edildikten sonra vialler içinde kuruyan misel kitlesi steril çubuk ile ezilip toz haline getirilmiştir. Daha sonra 1.5 ml'lik ependorf tüpler içindeki 700 µl DNA ekstraksiyon solüsyonu I (Solüsyon I: 200mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA) içine aktararak solüsyonun misel tozunun her yerine işlemesi için karıştırılmış ve 2000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra üstte toplanan 90 µl sıvı, 10 µl ekstraksiyon solüsyonu II'yi (Solüsyon II: %5 SDS) içeren temiz bir tüpe aktarılmıştır. Solüsyon II içinde tüpler 65 °C' de bir saat inkübe edildikten sonra 3500 rpm' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte toplanan sıvıdan 40 µl alınarak, 100 µl etanol içeren temiz bir tüpe aktarılıp yavaşça karıştırılarak, daha sonra 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip etanol boşaltılarak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan DNA ultra saf su (miliQ) içinde çözdürülmüş ve nano-drop (Implant) ile DNA konsantrasyonları belirlendikten sonra PCR çoğaltımı için hazır hale getirilmiştir (Obanor ve diğ., 2010).



Şekil 3.2. Çalkalayıcı üzerinde PDB'da gelişen *Fusarium equiseti* izolatları

### 3.2.3.2 Moleküler düzeyde türe özgü primer ile *Fusarium equiseti* izolatlarının teşhisi

*Fusarium equiseti* izolatları PCR kullanılarak moleküler düzeyde türe özgü primerle tanımlanmıştır. PCR, 96-kuyulu platelerde toplam 25 µL hacimde PCR reaksiyon karışımı hazırlandı. PCR karışımında kullanılan kimyasalların içerikleri; *Taq* DNA polimeraz; 5 ünite/µl içerisinde 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT , 10X buffer; 100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, MgCl<sub>2</sub> 25

mM. Buna göre her izolat için bir ependorf tüpüne 12,1 µl distile su, 2,5 µl 10X buffer, 0,5 µl dNTP, 2,5 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl forward oligonucleotide primer, FEF1 5'-CATACCTATACGTTGCCTCG – 3', 1 µl reverse oligonucleotide primer FER1 5' – TTACCAGTAACGAGGTGTATG – 3' ve 0,4 µl *Taq* DNA polimeraz kullanılarak karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım PCR tüplerine eşit şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra izolatlara ait 5 µl DNA ilave edilmiştir. DNA amplifikasyonu (Therma Elevtron Chorporation PX2) Thermal Cycler kullanılarak İlk denatürasyon 95 °C'de 1 dk ve sonra 25 döngü olmak üzere denatürasyon 94 °C'de 1 dk, bağlanma (Annealing) 58 °C'de 30 saniye, uzama 72 °C'de 1 dk, son uzama (final extension) 72 °C'de 7 dk ve bekleme + 4 °C olarak gerçekleştirilmiştir (Mishra ve diğ., 2003).

### **3.2.3.3 Moleküler teşhisleri yapılan izolatların trikotesen üretiminden sorumlu *Tri* geni bulundurma durumunun belirlenmesi**

*Fusarium equiseti* olarak tür teşhisi doğrulanan izolatlarda, trikotesen mikotoksinlerinin üretiminden sorumlu ve toksin oluşumunun birincil basamağı olan *Tri* gen lokusu temelinde geliştirilen Tox5/1; 5' GCTGCTCATCACTTTGCTCAG 3' ve Tox5/2 5' CTGATCTGGTCACGCTCATC 3' primer dizilimi kullanılmıştır. Toplam 25 µl hacimde PCR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Buna göre her bir izolat için bir ependorf tüpe 12,8 µl distile su, 2,5 µl 10X buffer, 0,5 µl dNTP, 2,5 µl MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µl forward oligonucleotide primer, 1,5 µl reverse oligonucleotide primer ve 0,7 µl *Taq* DNA polimeraz kullanılarak karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım PCR tüplerine eşit şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra izolatlara ait 3 µl DNA ilave edilmiştir. PCR koşulları, ilk denatürasyon 95 °C'de 3 dk, ve sonra 38 döngü olmak üzere denatürasyon 95 °C'de 30 saniye, bağlanma (Annealing) 62 °C'de 20 saniye, uzama 72°C'de 45 saniye, son uzama (final extension) 72 °C'de 5 dk ve bekleme + 4 °C olarak gerçekleştirilmiştir (Demeke ve diğ., 2005).

### **3.2.3.4. *F. equiseti* izolatlarının ITS-RFLP yöntemi ile genetik polimorfizminin belirlenmesi**

Türe özgü PCR uygulaması ile tür teşhisleri doğrulanan toplam 49 izolatın, genetik polimorfizminin belirlenebilmesi için yaklaşık 570 bp uzunluğundaki bölgesi ITS1 5' - TCCGTTGGTGAACCAGCGG - 3' ve ITS4 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC -3' primer çifti kullanılarak çoğaltılmıştır. Toplam 25 µl hacimde PCR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Buna göre her bir izolat için bir ependorf tüpe 12,5 µl distile

su, 2,5 µl 10X buffer, 0,5 µl dNTP, 4 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl forward oligonucleotide primer, 1 µl reverse oligonucleotide primer ve 0,5 µl *Taq* DNA polimeraz kullanılarak karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım PCR tüplerine eşit şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra izolatlara ait 3 µl DNA ilave edilmiştir. PCR koşulları, ilk denatürasyon 94 °C'de 5 dk, ve sonra 35 döngü olmak üzere denatürasyon 94 °C'de 1 dk, bağlanma (Annealing) 56 °C'de 1 dk, uzama 72°C'de 1 dk, son uzama (final extension) 72 °C'de 7 dk ve bekleme + 4 °C olarak gerçekleştirilmiştir (Chehri ve diğ., 2011).

*Fusarium equiseti* izolatlarında çoğaltılan ITS bölgesi, *EcoRI*, *SphI*, *HaeIII*, *Sau3AI*, *DdeI*, *HincII* ve *CfoI* endonükleaz enzimleri ile üretici firma tarafından verilen koşullar kullanılarak kesilmiş ve elde edilen bant profilleri 100 bp'lik DNA ladder yardımı ile ölçülerek kaydedilmiştir.

Her bir bant profili (1) ve (0) şeklinde skorlanarak, veri matrisi elde edilerek benzerlik matrisi çıkartılmıştır. Daha sonra elde edilen veriler UPGMA (unweighted pair group method with arithmetical mean) cluster analizine tabi tutularak (Romesburg, 1994), *F. equiseti* izolatları arasındaki ilişki analiz edilmiştir.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1 Bulgular

#### 4.1.1 İzolatların Morfolojik Teşhisi

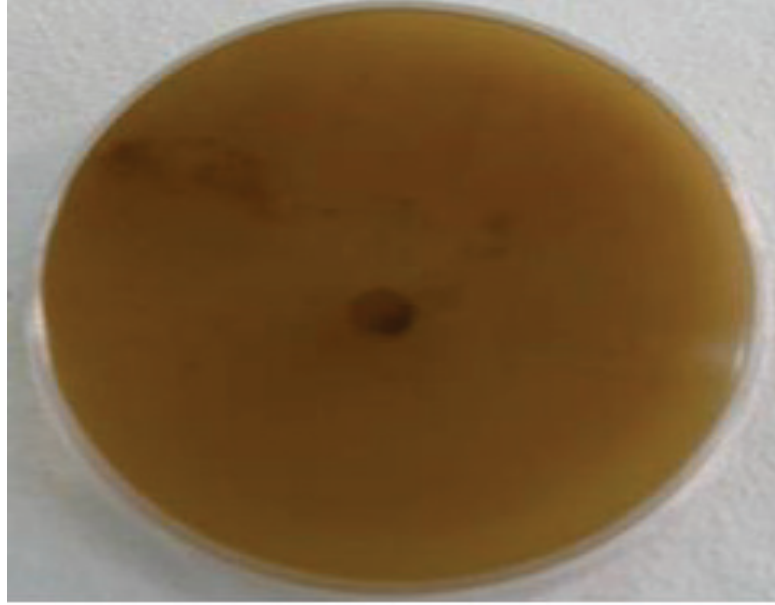
Daha önceki yıllarda izole edilip koleksiyonda eğik tüpte +4 °C’de ve cryo viyal içerisinde -86 °C’de derin dondurucuda bulunan tüm *F. equiseti* izolatları SNA (Synthetic Nutrient Agar) ortamında geliştirilmiştir. Besi ortamında gelişen tüm izolatların konidi morfolojisine göre tek spor izolasyonları yapılmıştır. Besi ortamında geliştirilen 120 izolattan 85 izolat konidi morfolojisine göre yapılan mikroskobik teşhis sonucu *F. equiseti* olarak belirlenmiştir.

##### 4.1.1.1 *Fusarium equiseti*’nin morfolojik özellikleri

PDA besi ortamında hızlı gelişen, kahverengi, yoğun ve aynı zamanda sert dokulu bir miselyum ve petrinin tersinden bakıldığında turuncu veya daha koyu renkte sporodochiumlar meydana getirmektedir. Fungusun 24 °C’de 10 günlük inkübasyonu ile koloni çapı 70 mm’yi aşabilmektedir. Önceleri beyaz renkte gelişmeye başlayan miselyum sonraları kahverengine dönüşmektedir (Şekil 4.1). SNA’da gelişen kültürlerde uzun ve eğik makrokonidilerde apikal hücre, kendinden önce gelen hücreden (penultimate cell) oldukça uzun ve kıvrıktır. Makrokonidilerin diğer ucunda yer alan ayak hücreleri bariz bir şekilde ayırt edilebilmektedir. (Şekil 4.3-4.4) Ortalama makrokonidi boyutları 42-48 µm olarak ölçülmüştür. Klamidosporlar kahverengi, kalın duvarlı ve zincir formundadır (Şekil 4.3) (Booth, 1977)



Şekil 4.1. *Fusarium equiseti*'nin PDA ortamında gelişimi



Şekil 4.2. *Fusarium equiseti*'nin PDA ortamında gelişimi



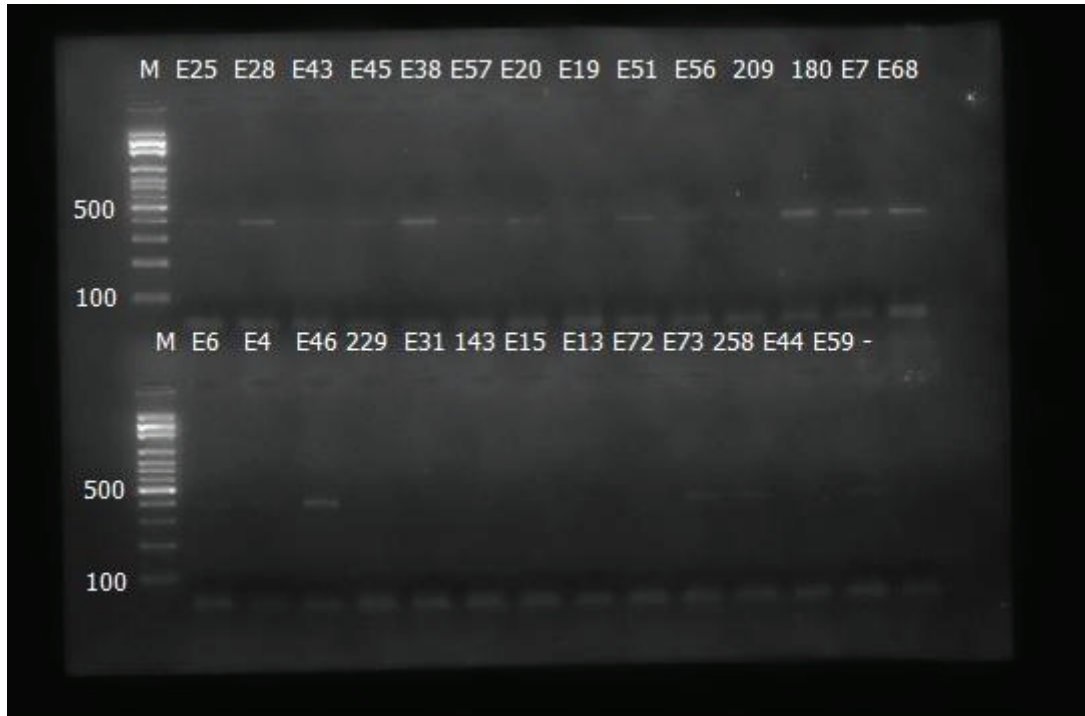
Şekil 4.3. *Fusarium equiseti*'nin makrokonidi ve klamidosporları



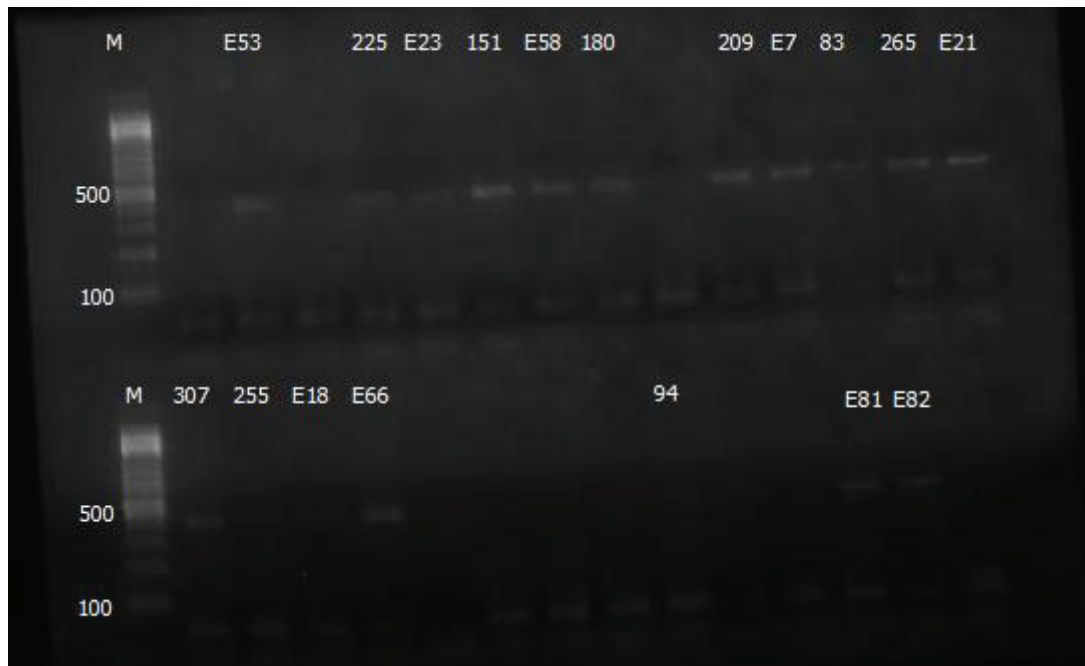
Şekil 4.4. *Fusarium equiseti*'nin makrokonidileri

#### 4.1.2 İzolatların moleküler teşhisi

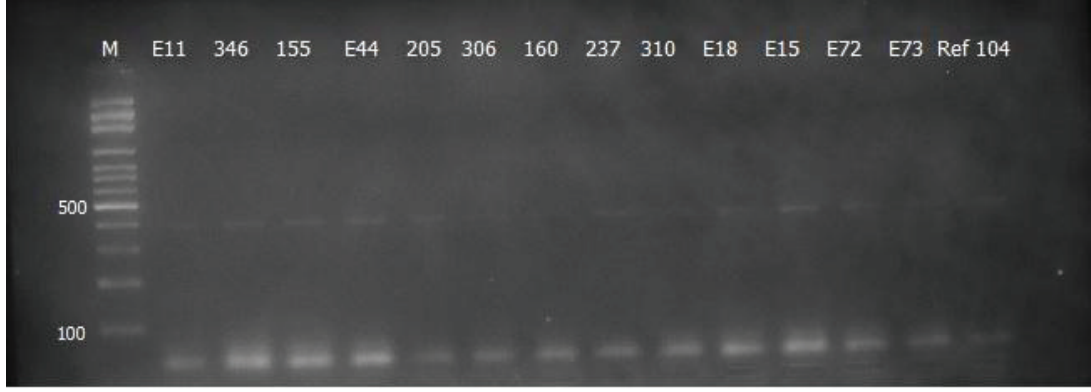
Konidi morfolojisine göre mikroskopik morfolojik teşhisi yapılan 85 adet *F.equiseti* izolatu türe özgü primer kullanılarak PCR metoduyla moleküler teşhisi yapılmış ve 60 izolat *F.equiseti* olarak belirlenmiştir. Mishra ve diğ. (2002)'nin yapmış oldukları çalışmada olduğu gibi jel görüntülemesi sonucunda yaklaşık 390 bp'da bant görülmüştür. Moleküler teşhisleri yapılan bu izolatlar arasından örnekleme yapılan illerde ki özellikle buğday ekiliş alanı, konukçu türü ve izolatların patojenik özelliklerine göre 49 adet izolat farklı agro-ekolojik bölgelerden seçilmiştir. Seçilen bu izolatlar tezin fungal materyalini oluşturmaktadır (Çizelge 3.1).



Şekil 4.5. FEF/ FER Primeri PCR sonucu



Şekil 4.6. FEF/ FER Primeri PCR sonucu

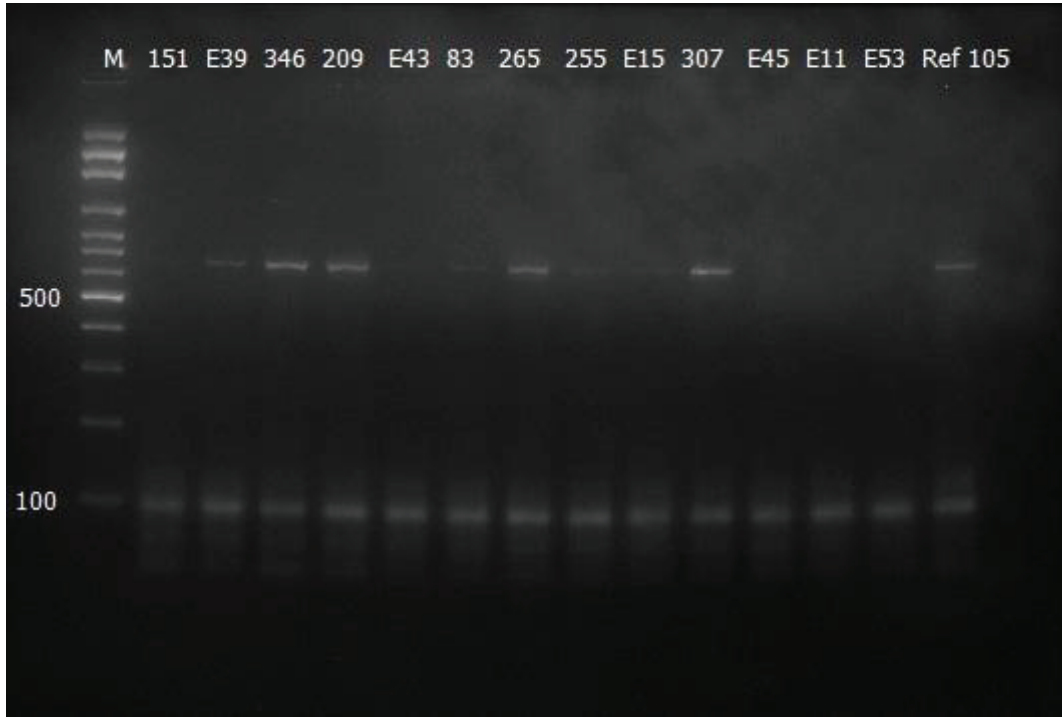


Şekil 4.7. FEF/ FER Primeri PCR sonucu

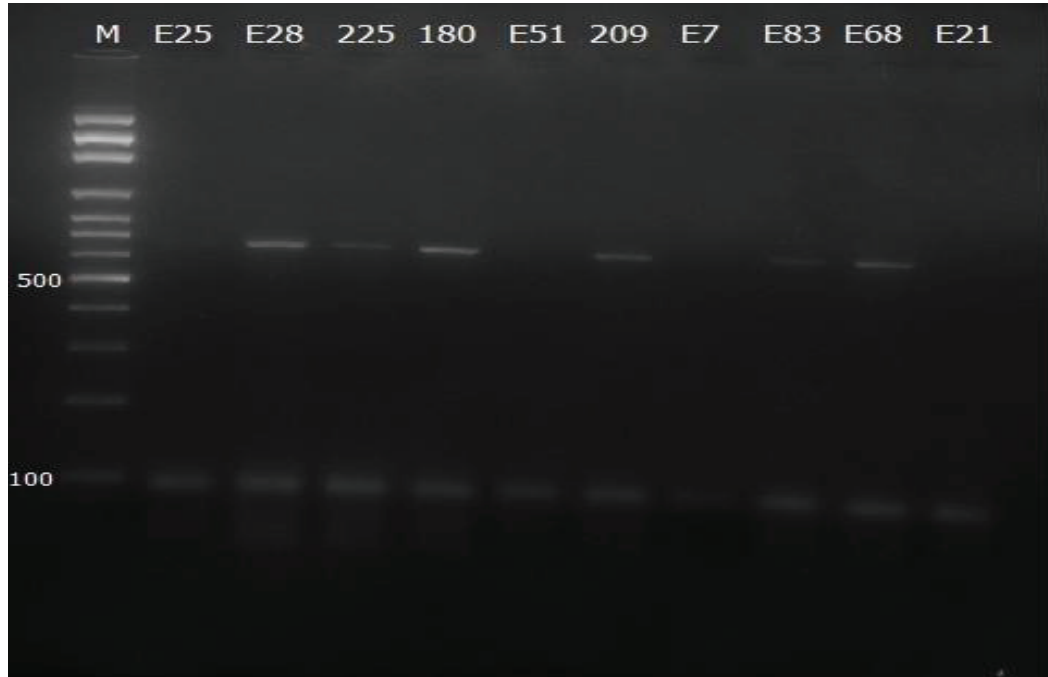
#### 4.1.3 Moleküler teşhisleri yapılan izolatların trikotesen üretiminden sorumlu *Tri* geni bulundurma durumunun belirlenmesi

*Fusarium equiseti* olarak tür teşhisi doğrulanan izolatlarda, trikotesen mikotoksinlerinin üretiminden sorumlu ve toksin oluşumunun birincil basamağı olan *Tri* gen lokusu temelinde geliştirilen Tox5/1; 5' GCTGCTCATCACTTTGCTCAG 3' ve Tox5/2 5' CTGATCTGGTCACGCTCATC 3' primer dizilimi kullanılmıştır. PCR uygulamasının sonucunda toplam 49 adet izolattan 20 tanesinde trikotesen üretiminden sorumlu *Tri* genlerinin bulunduğu belirlenmiştir. Demeke ve diğ. (2005)'nin buğday, arpa, yulaf, mısır ve çavdardan elde edilen *Fusarium* cinsi içerisinde toplam 148 izolatla yapmış oldukları çalışmada 11 adet *F. equiseti* izolatından sadece 2 tanesinde bu genin var olduğunu bildirmişlerdir. *Tri* gen lokusu bulunan izolatlarda, izolatın patojenik karakteri ve konukçu türünün etkili olmadığı kanısına varılmıştır. Trikotesen üretim potansiyeli bulunan izolatlar; H09W127-1K2, H09W103-5K2, H09W39-3K1, En63-1, S012W7-1B1, H012W26-1K1, S010B28-3K1, H010R29-1B1, S09W78-5K1, 09-20, H09W5-3K1, H09W145-5K2, H010A30-3B2, H09W8-2K1, H09W53-1K1, H09W14-5B3, S09W13-Y2, H010W37-2K1, S012W20-2K1, H012W22-2K2. İzolatlara bakıldığında farklı konukçulardan izole edildiği ve farklı patojenik karakterde (endofit, patojen) oldukları görülmektedir. Trikotesen üretiminden sorumlu genin, izolasyon yapılan farklı konukçularda ki izolatlarda bulunması konukçuya göre farklılık göstermediği kanısına varılmasına neden olmuştur. Ayrıca sağlıklı bitkilerden izole edilen izolatlarda da bu genin bulunması izolatın patojenik karakteri ile bu genin bulunmasında herhangi bir ilişki olmadığı kanısına varılmasına neden olmuştur. Örnekleme yapılan agro-ekolojik bölgelere bakıldığında trikotesen üretiminden sorumlu genin her agro ekolojik bölgelerden izole edilen izolatlarda bulunduğu belirlenmiştir. Bu bulgudan yola

ıkararak izolatların hangi ekolojik bölgeden izole edildiği bu genin bulunmasında etkili bir faktör olmadığı kanısına varılmıştır. Tüm bu bilgilerden yola çıkararak *F. equiseti* izolatlarında trikotesen üretiminden sorumlu genin bir kısım izolatlarda mevcut olduğu bir kısmında ise bulunmadığı belirlenmiştir.



şekil 4.8. Tox 5/2 Primeri PCR Sonucu



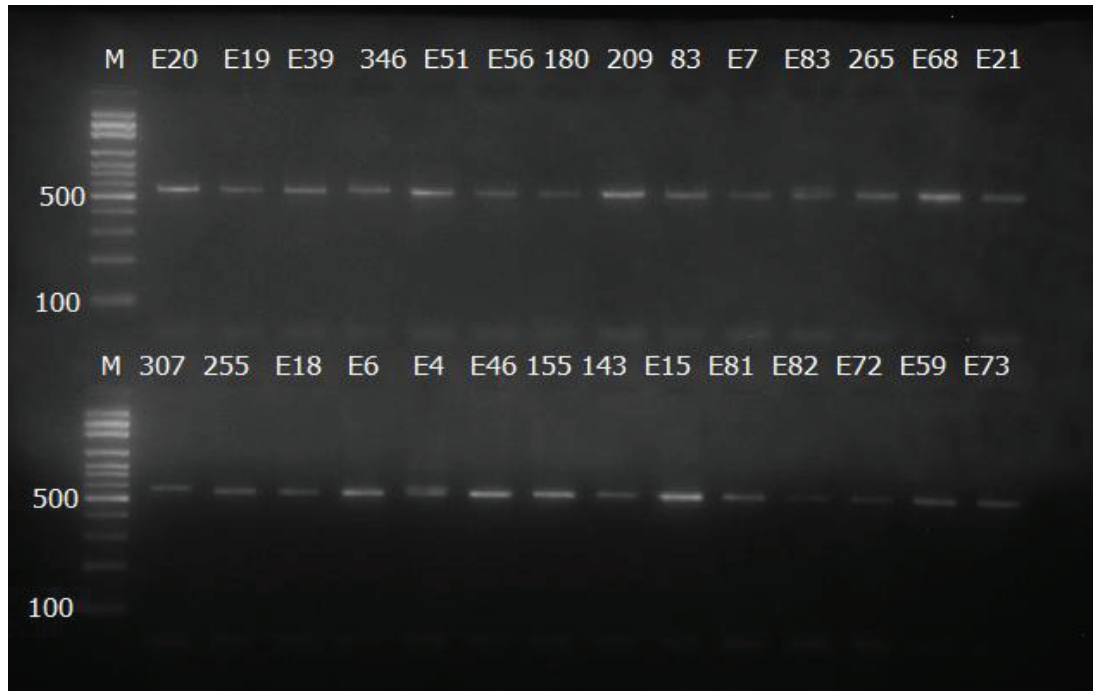
şekil 4.9. Tox 5/2 Primeri PCR Sonucu

#### 4.1.4 *Fusarium equiseti* izolatlarının ITS-RFLP yöntemi ile genetik polimorfizminin belirlenmesi

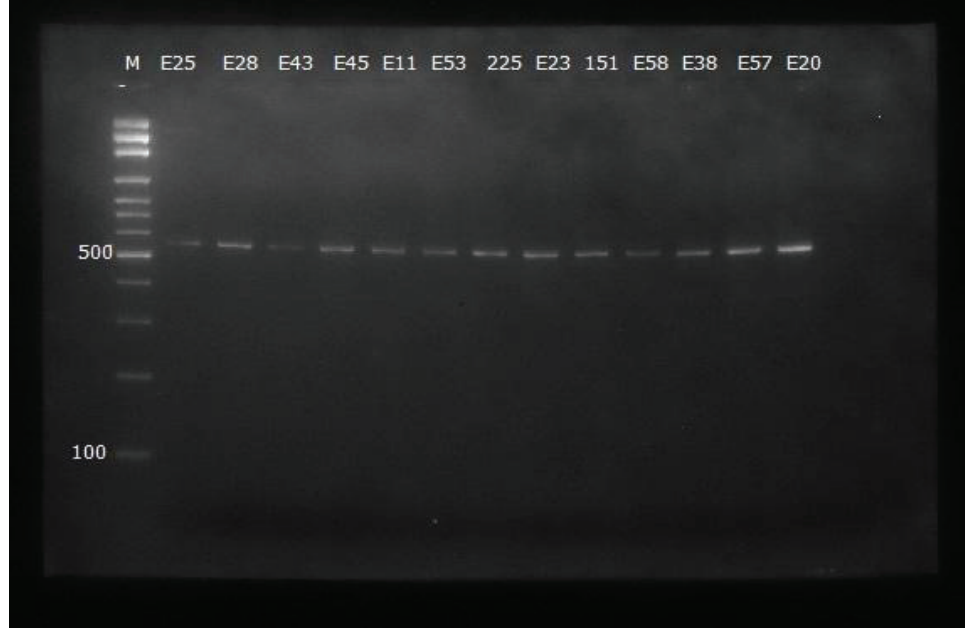
##### 4.1.4.1 İzolatların ITS 1-4 primeri ile PCR'da çoğaltılması

Sağlıklı ve hasta bitkilerden elde edilen izolatlarda ITS bölgesi temelinde herhangi bir genetik polimorfizmin bulunma durumunun belirlenmesi amacıyla ITS 1-4 primerleri kullanılarak bu bölge PCR'da çoğaltılmıştır. Yapılan çalışmalarda ITS bölgesinin nükleotit diziliminin *Fusarium* türlerinin teşhisinde son derece kullanışlı olduğu bildirilmiştir (Kim ve diğ., 1992; Mes ve diğ., 1994; Min, 1995).

Moleküler teşhisleri yapılan izolatların genetik polimorfizminin belirlenebilmesi için yaklaşık 550 bp uzunluğundaki bölgesi ITS1 5' - TCCGTTGGTGAACCAGCGG - 3' ve ITS4 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3' primer çifti kullanılarak çoğaltılmıştır. Çoğaltılan PCR ürünleri 7 enzime (*EcoRI*, *HaeIII*, *Sau3AI*, *DdeI*, *CfoI*, *SphI*, *HincII*) uygulanmış ve RFLP bant profilleri karşılaştırılmıştır. Çoğaltılan tüm izolatların jel görüntülemesi sonucu yaklaşık 570 bp'da bantlaşmalar görüntülenmiştir. Young-Mi ve diğ. (200)'nin yapmış oldukları çalışmada *Fusarium* cinsine ait 12 türün genetik akrabalıkları rDNA'nın ITS bölgesi ITS1 ve ITS4 primeri kullanılarak incelenmiştir. ITS1/4 primeri ile çoğaltılan PCR ürünleri 7 enzime uygulanmıştır.



Şekil 4.10. ITS 1-4 Primeri PCR sonucu



**Şekil 4.11.** ITS 1-4 Primeri PCR sonucu

#### 4.1.4.2 PCR' da çoğaltılan ITS 1-4 bölgesine enzim uygulanması

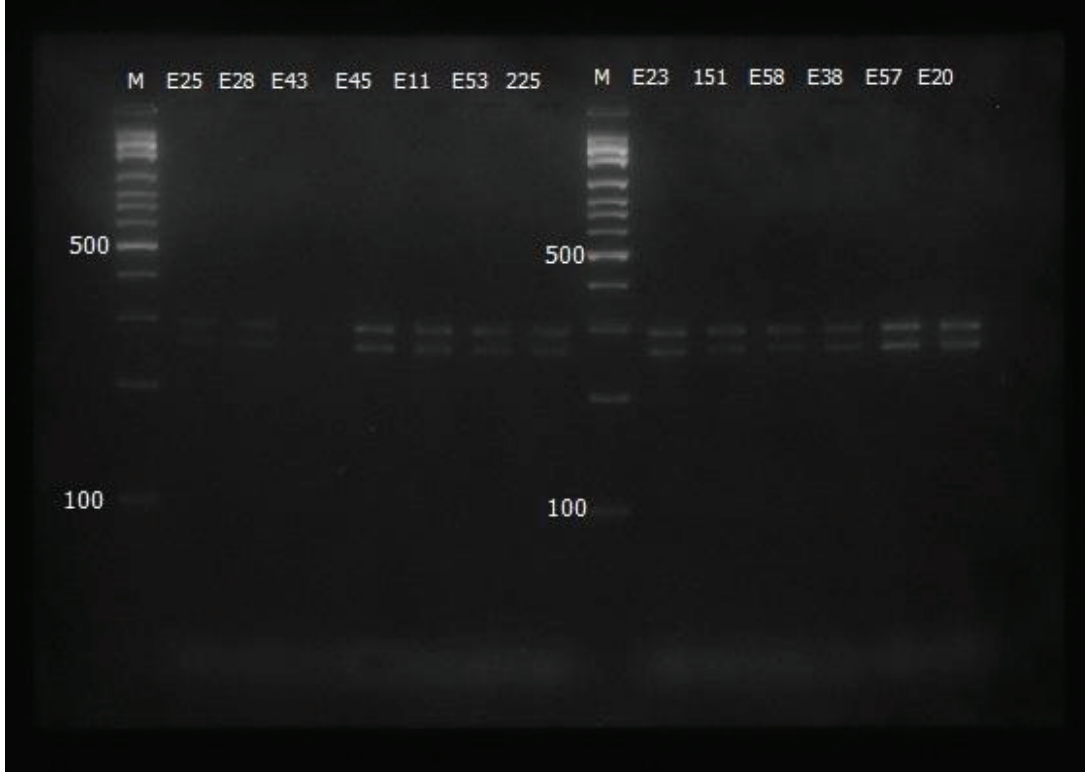
Çoğaltılan ITS bölgelerine rDNA'nın belirli bölgelerini kesici enzimler uygulanarak elde edilen bant profilleri kayıt edilmiştir. Kim ve diğ. (1993)'nin yapmış oldukları çalışma sonucunda IGS bölgesinin PCR-RFLP analiz metodu tür içi farklılıkların kategorizasyonunda uygun metot olarak ortaya çıktığını bildirmişler ayrıca Hemalatha ve Banu (2010) RFLP tekniğini ırk karakterizasyonu için en hassas metot olarak kabul etmişlerdir.

Her izolatan çoğaltılan ITS PCR ürününe enzimin temin edildiği firmanın (Thermo Scientific) belirlemiş olduğu koşullar doğrultusunda enzim uygulaması yapılmıştır. Her enzim için 18 µl distile su, 2 µl 10X buffer (10 mM Tris-HCl, 100mM KCl, 1 mM DTT 1 mM EDTA, 0,2 mg/mL BSA) ve 1,25 µl enzim ile hazırlanan karışıma 10 µl PCR ürünü eklenmiş ve 14 – 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Uygulama sonucunda jel görüntülemesinden elde edilen bantlar kayıt altına alınmış ve referans izolat ile karşılaştırılmıştır.

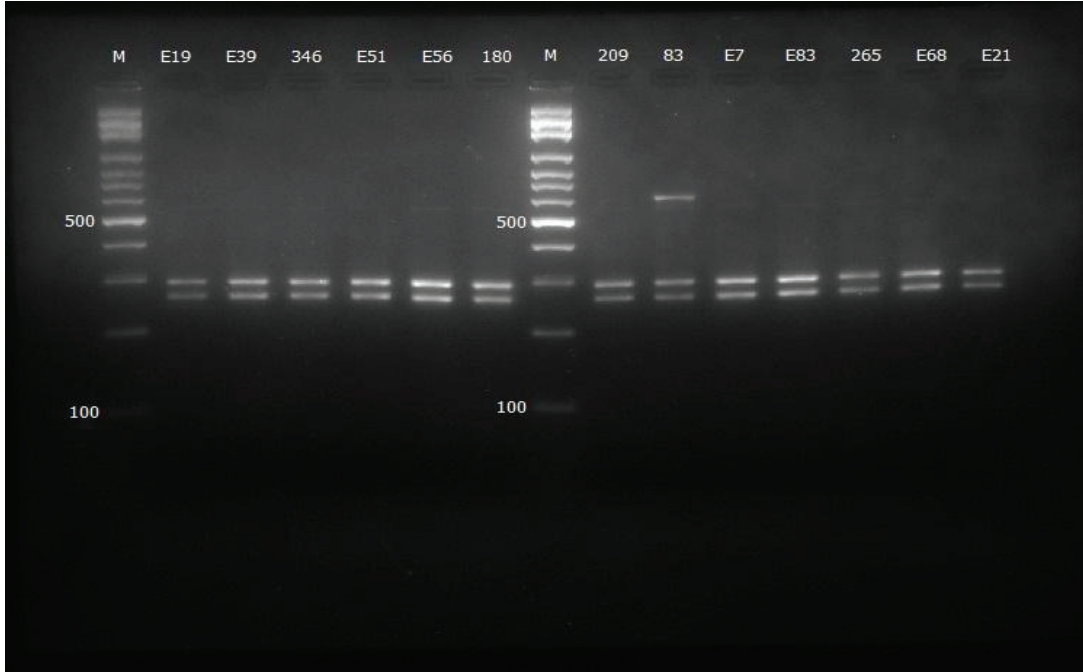
##### 4.1.4.2.1 *EcoRI* enziminin uygulanması

*EcoRI* enziminin izolatlarla uygulanması sonucunda; izolatlardan elde edilen bant profilleri NCBI (National Center for Biotechnology Information)'dan elde edilen *F. equiseti* NRRL 26419 (type material) DNA sekans diziliminin BioEdit programından elde edilen bant profili ile karşılaştırıldığında tüm izolatlarda farklı bant profilleri

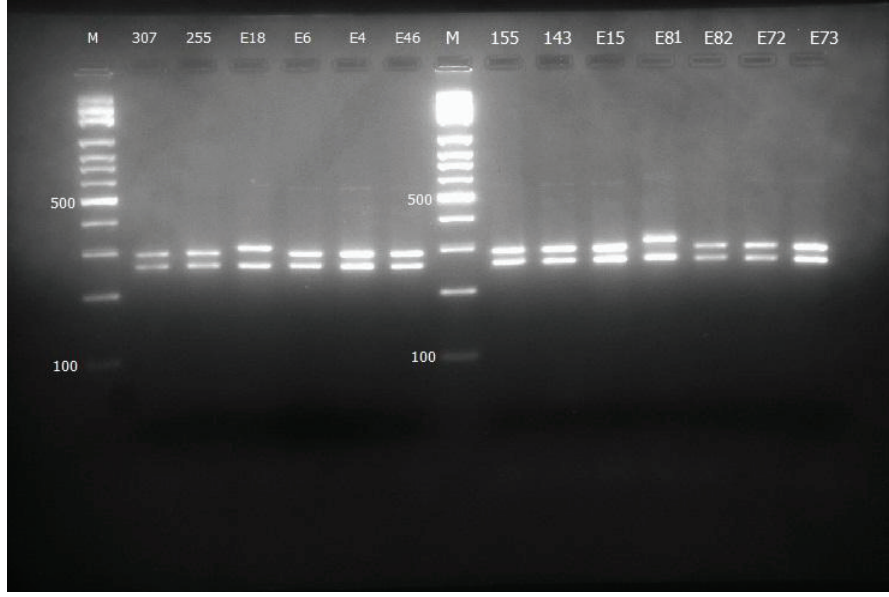
elde edilmiştir (Çizelge 4.1). 49 adet *F. equiseti* izolatından 37 izolatında 270 bp ve 290 bp'da bant elde edilmiş diğer izolatlarda ise daha farklı bant sonuçları elde edilmiştir (Şekil 4.12., Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.15).



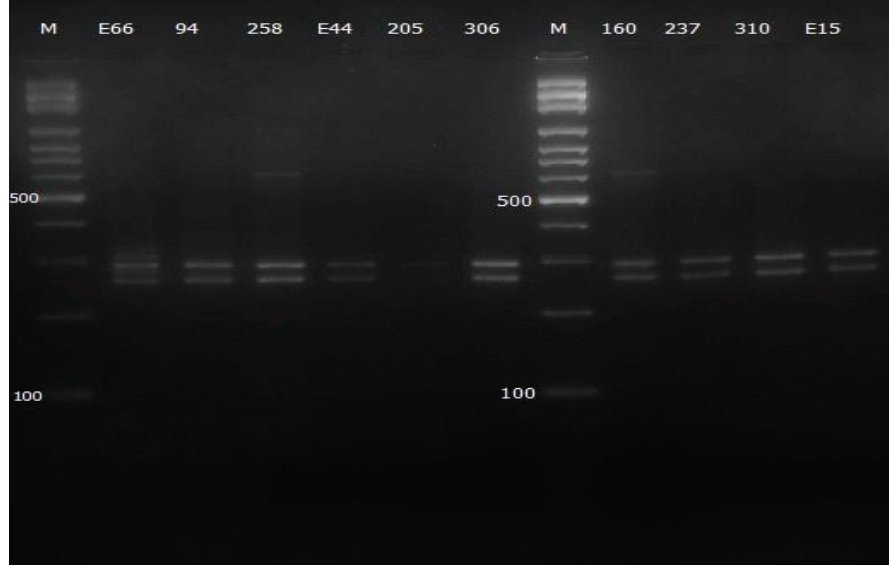
Şekil 4.12. ITS-*EcoRI* RFLP Sonucu



Şekil 4.13. ITS-*EcoRI* RFLP Sonucu



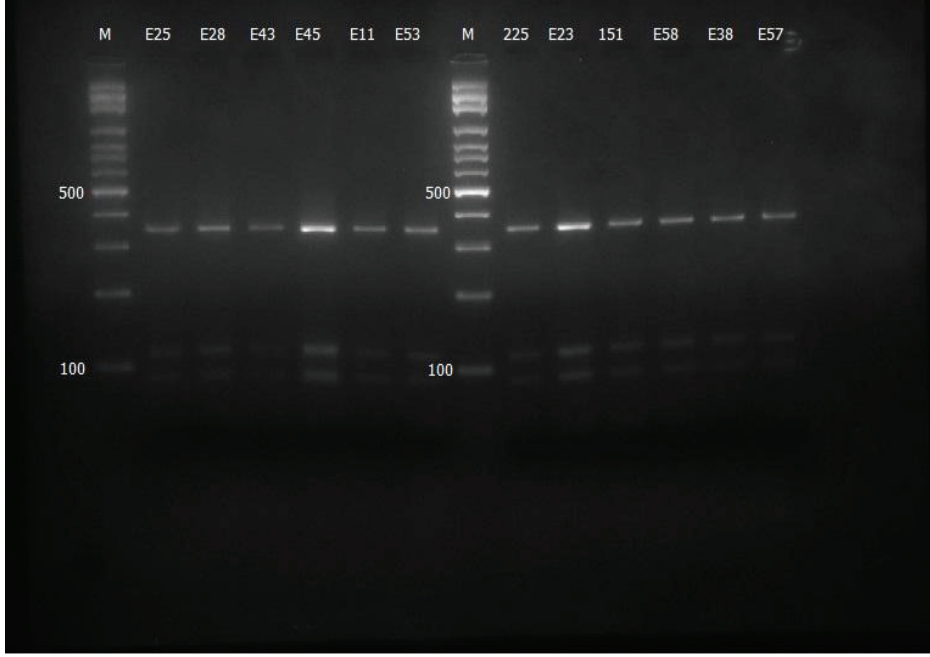
**Şekil 4.14.** ITS-*EcoRI* RFLP Sonucu



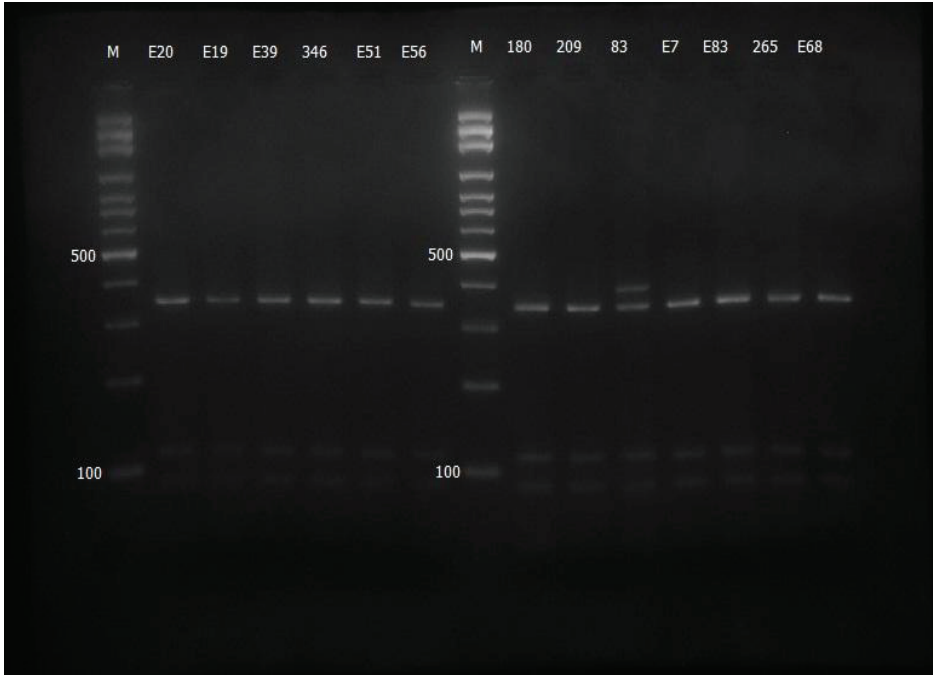
**Şekil 4.15.** ITS-*EcoRI* RFLP Sonucu

#### 4.1.4.2.2 *HaeIII* enziminin uygulanması

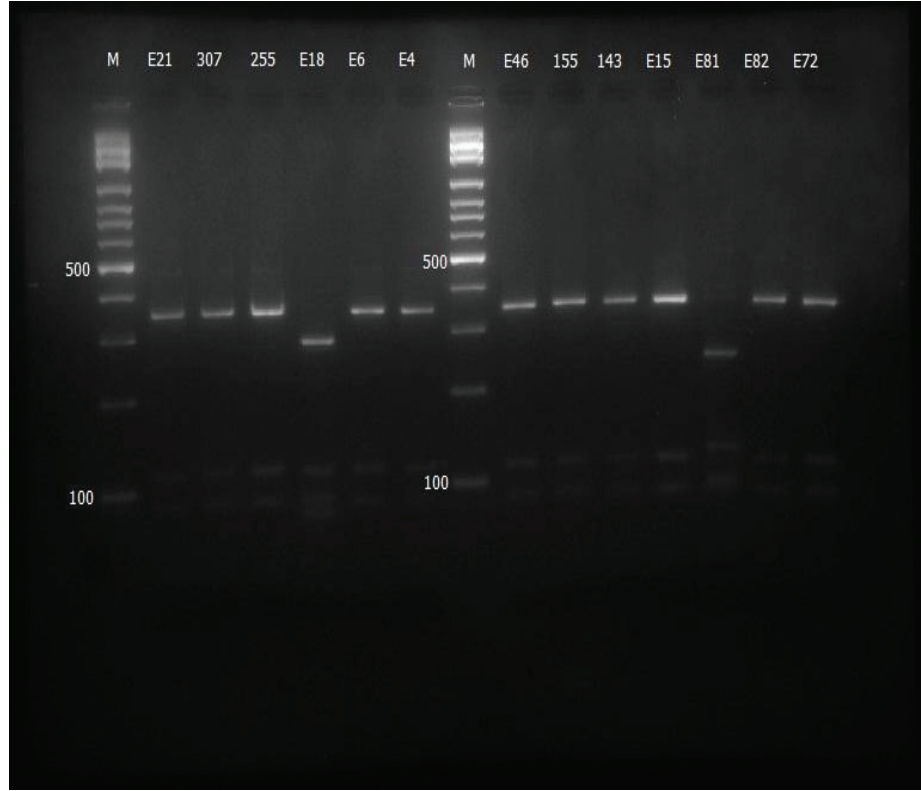
*HaeIII* enziminin izolatlara uygulanması sonucunda; izolatlardan elde edilen bant profilleri NCBI (National Center for Biotechnology Information)'dan elde edilen *F. equiseti* NRRL 26419 (type material) DNA sekans diziliminin BioEdit programından elde edilen bant profili ile karşılaştırıldığında tüm izolatlarda farklı bant profilleri elde edilmiştir (Çizelge 4.1). *HaeIII* enziminin izolatlara uygulanması sonucunda 45 adet izolatta 80 bp, 130 bp ve 360 bp'da bant elde edilmiş olup diğer 4 izolatta ise daha farklı bant sonuçları alınmıştır (Şekil 4.16., Şekil 4.17., Şekil 4.18., Şekil 4.19).



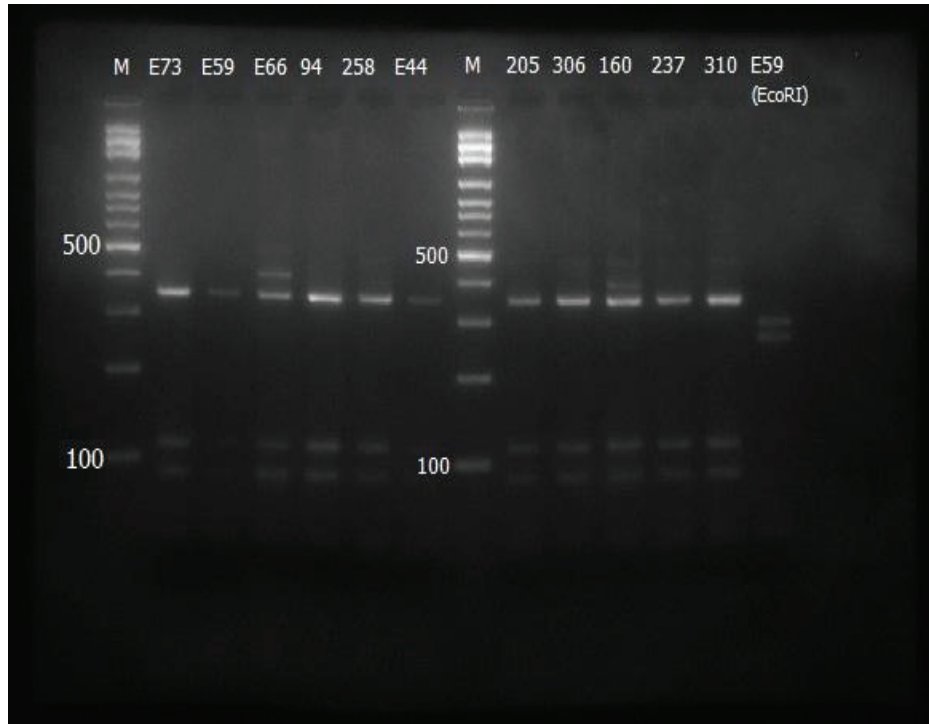
Şekil 4.16. ITS-*HaeIII* RFLP Sonucu



Şekil 4.17. ITS-*HaeIII* RFLP Sonucu



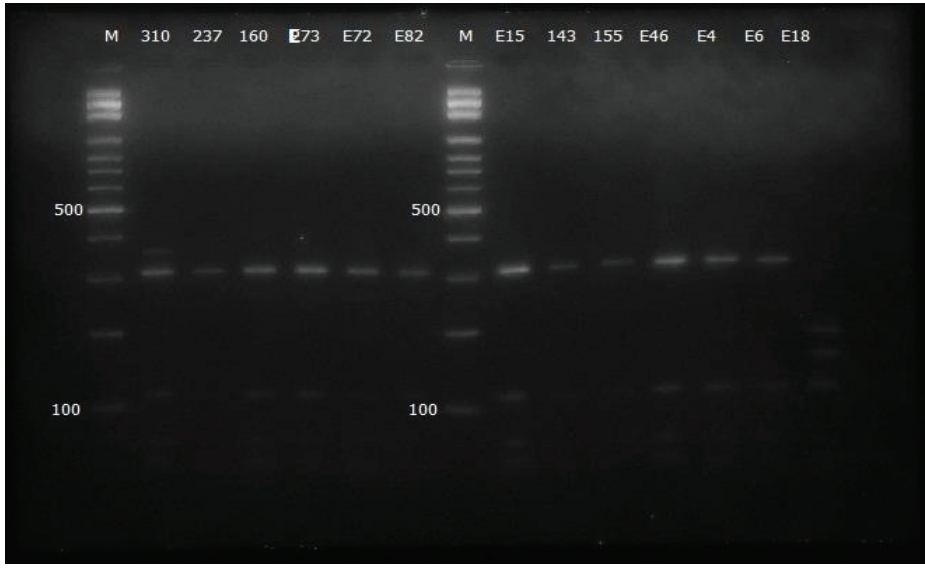
Şekil 4.18. ITS-*HaeIII* RFLP Sonucu



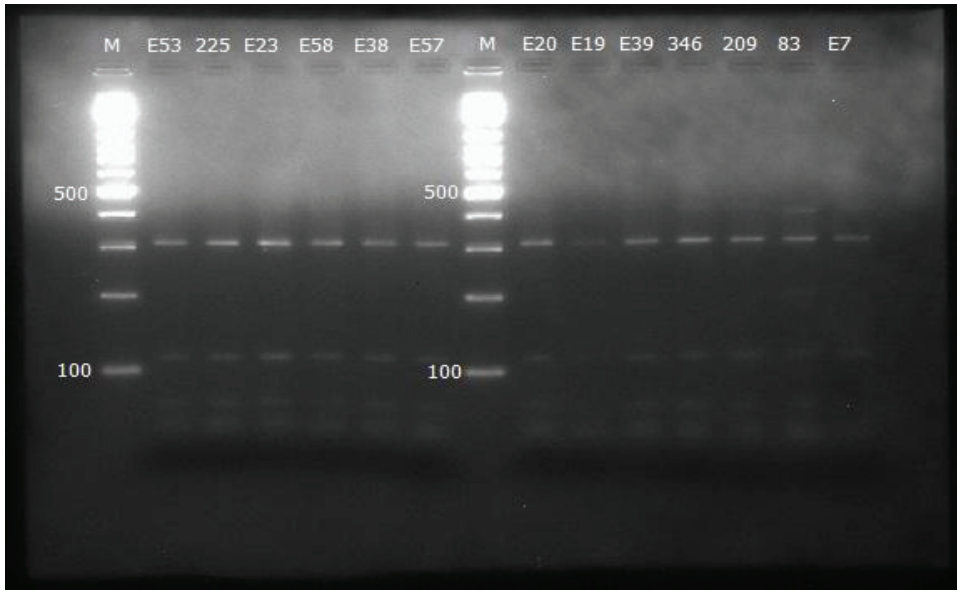
Şekil 4.19. ITS-*HaeIII* RFLP Sonucu

#### 4.1.4.2.3 *Sau3AI* enziminin uygulanması

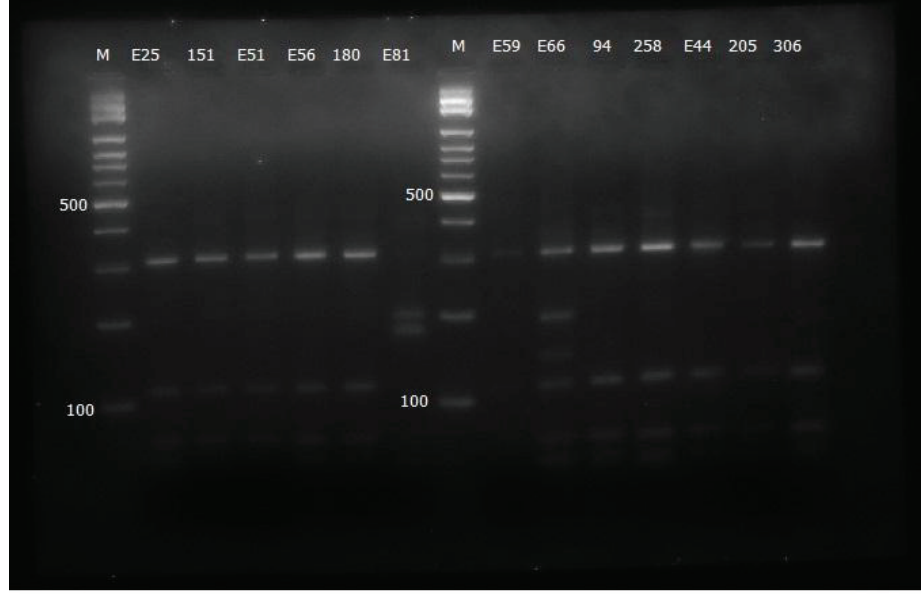
*Sau3AI* enziminin izolatlara uygulanması sonucunda; izolatlardan elde edilen bant profilleri NCBI (National Center for Biotechnology Information)'dan elde edilen *F. equiseti* NRRL 26419 (type material) DNA sekans diziliminin BioEdit programından elde edilen bant profili ile karşılaştırıldığında tüm izolatlarda farklı bant profilleri elde edilmiştir (Çizelge 4.1). Enzimin izolatlara uygulanması sonucunda 43 adet *F. equiseti* izolatında 40 bp, 120 bp ve 310 bp'da bant sonuçları elde edilmiş olup diğer 6 izolatta ise daha farklı bant profilleri elde edilmiştir (Şekil 4.20., Şekil 4.21., Şekil 4.22., Şekil 4.23)



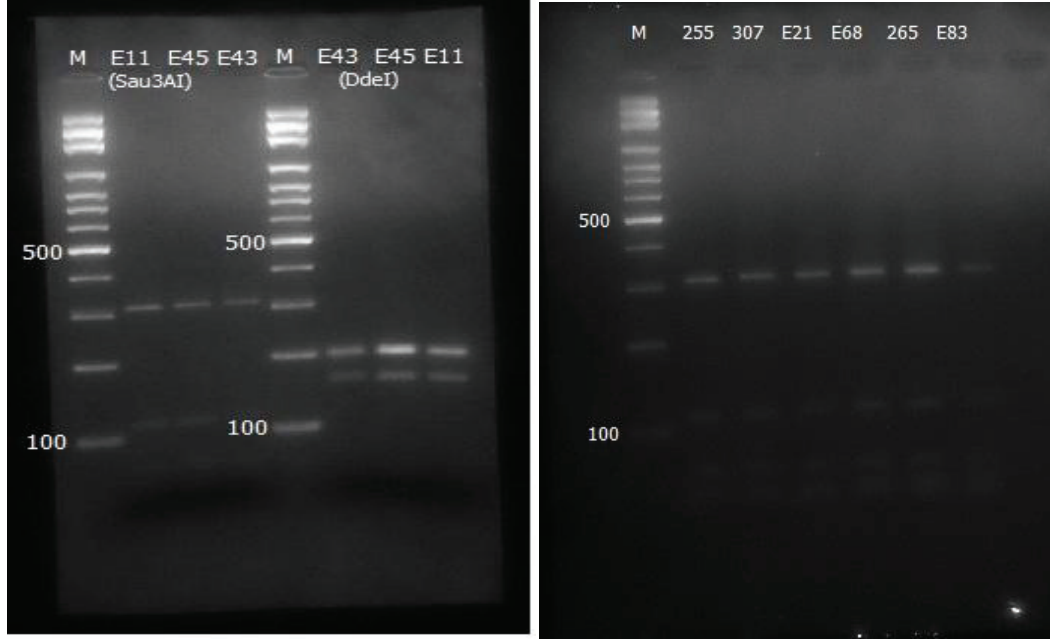
Şekil 4.20. ITS-*Sau3AI* RFLP Sonucu



Şekil 4.21. ITS-*Sau3AI* RFLP Sonucu



Şekil 4.22. ITS-*Sau3AI* RFLP Sonucu

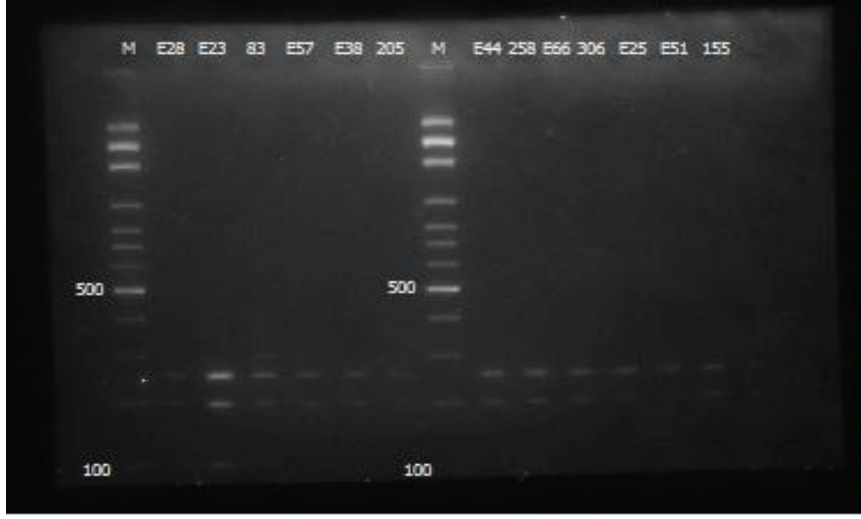


Şekil 4.23. ITS-*Sau3AI* RFLP Sonucu

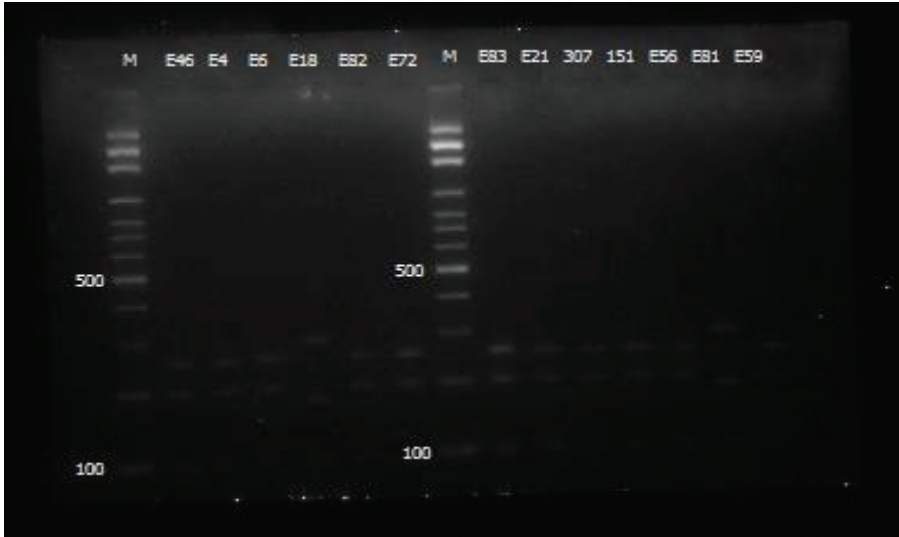
#### 4.1.4.2.4 *CfoI* enziminin uygulanması

*CfoI* enziminin izolatlarla uygulanması sonucunda; izolatlardan elde edilen bant profilleri NCBI (National Center for Biotechnology Information)' dan elde edilen *F. equiseti* NRRL 26419 (type material) DNA sekans diziliminin BioEdit programından elde edilen bant profili ile karşılaştırıldığında tüm izolatlarda farklı bant profilleri elde edilmiştir (Çizelge 4.1). *CfoI* enziminin izolatlarla uygulanması sonucunda 23 adet izolatta 110 bp, 200 bp ve 270 bp' da 22 adet izolatta ise 100 bp, 200 bp ve 280

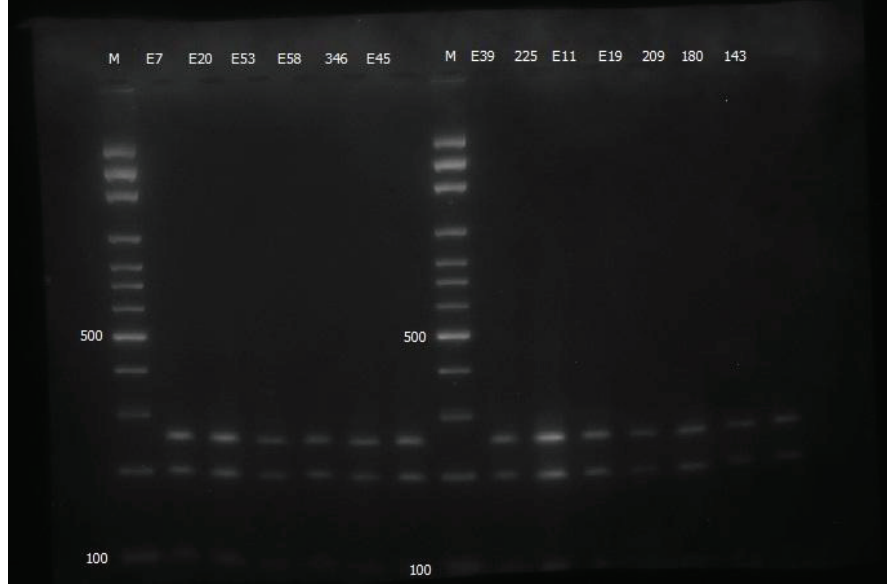
bp'da bant profilleri elde edilmiş olup diğer izolatlarda ise daha farklı bant profilleri elde edilmiştir (Şekil 4.24., Şekil 4.25., Şekil 4.26., Şekil 4.27).



Şekil 4.24. ITS-*CfoI* RFLP Sonucu



Şekil 4.25. ITS-*CfoI* RFLP Sonucu



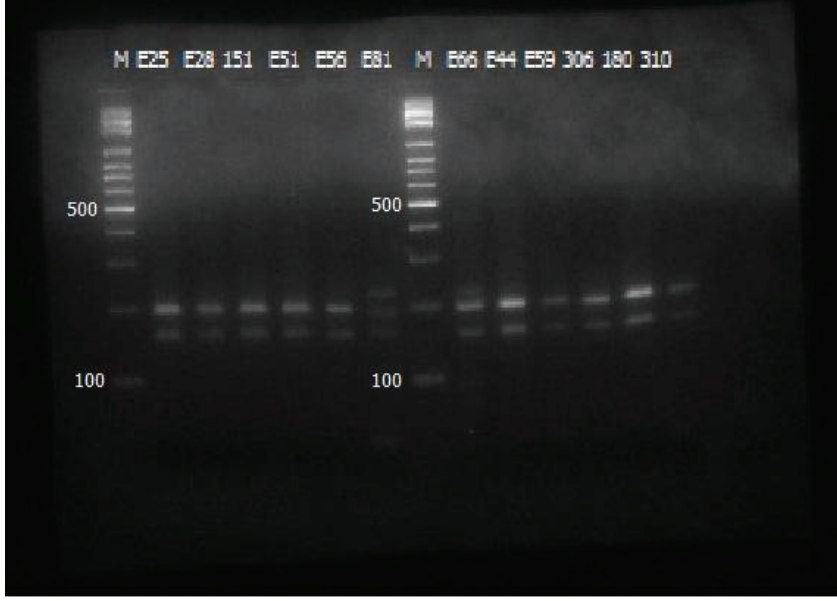
Şekil 4.26. ITS-*CfoI* RFLP Sonucu



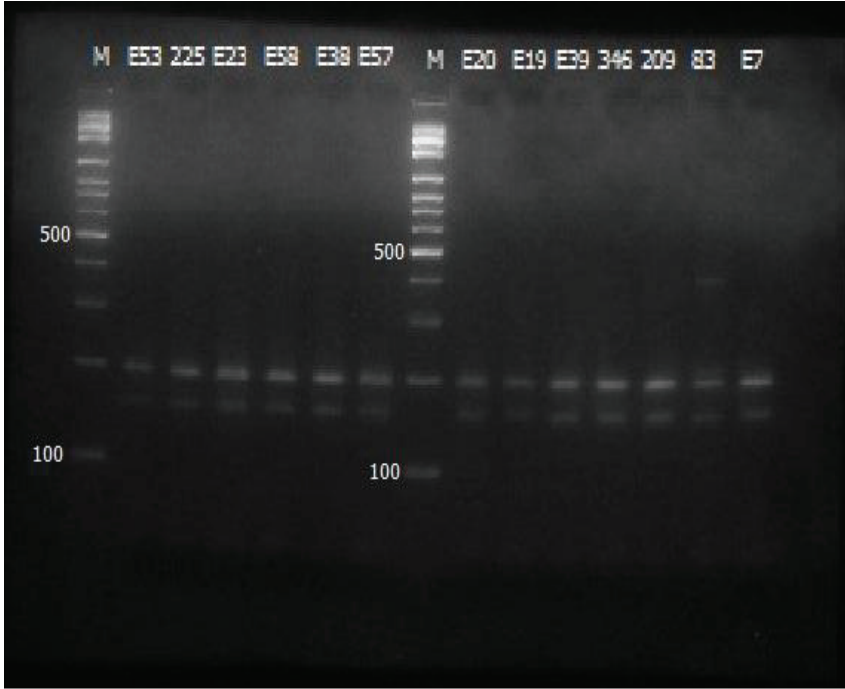
Şekil 4.27. ITS-*CfoI* RFLP Sonucu

#### 4.1.4.2.5 *DdeI* enziminin uygulanması

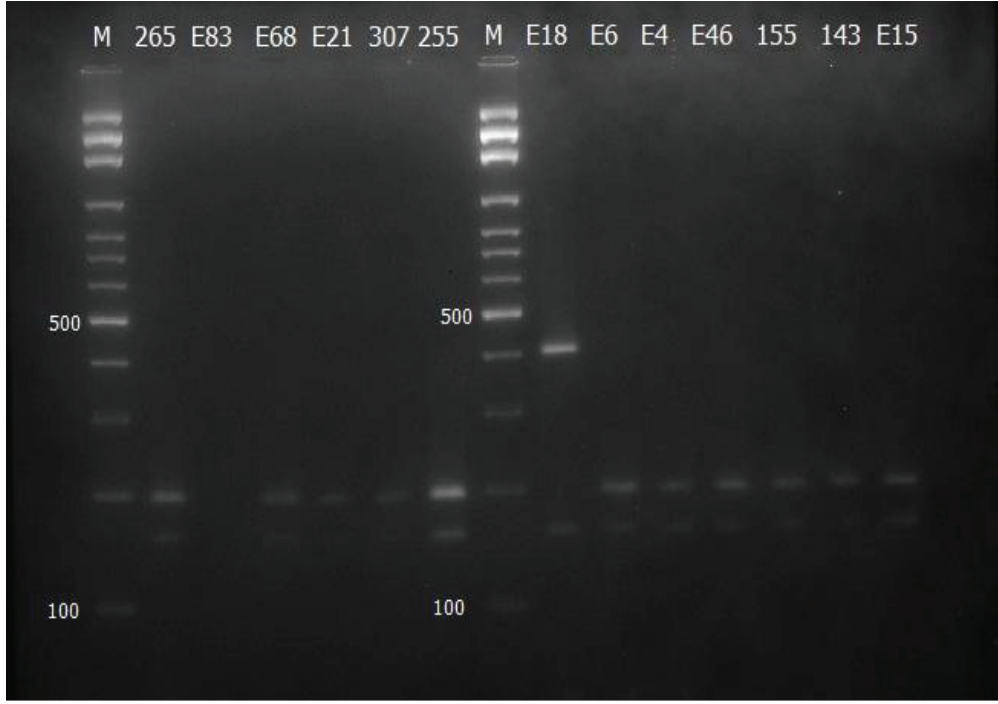
*DdeI* enziminin izolatlarla uygulanması sonucunda; izolatlardan elde edilen bant profilleri NCBI (National Center for Biotechnology Information)' dan elde edilen *F. equiseti* NRRL 26419 (type material) DNA sekans diziliminin BioEdit programından elde edilen bant profili ile karşılaştırıldığında tüm izolatlarda farklı bant profilleri elde edilmiştir (Çizelge 4.1). *DdeI* enziminin izolatlarla uygulanması sonucunda 46 adet izolatta 170 bp ve 210 bp' da bant profili elde edilmiş kalan 3 izolatta ise daha farklı bant profilleri elde edilmiştir (Şekil 4.28., Şekil 4.29., Şekil 4.30., Şekil 4.31).



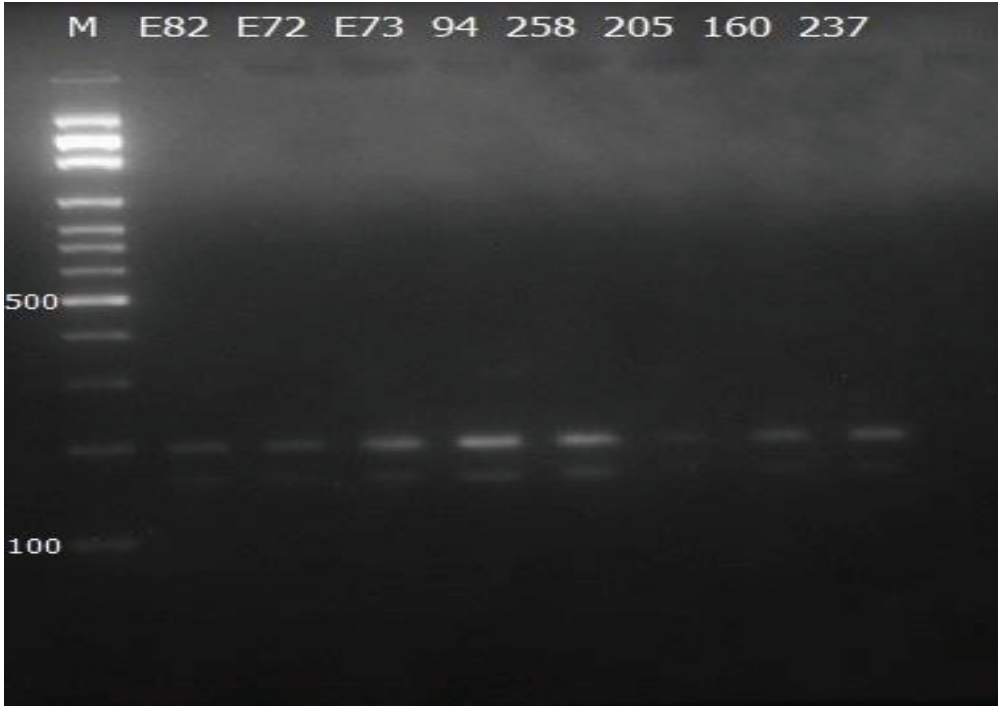
Şekil 4.28. ITS-*DdeI* RFLP Sonucu



Şekil 4.29. ITS-*DdeI* RFLP Sonucu



Şekil 4.30. ITS-*DdeI* RFLP Sonucu



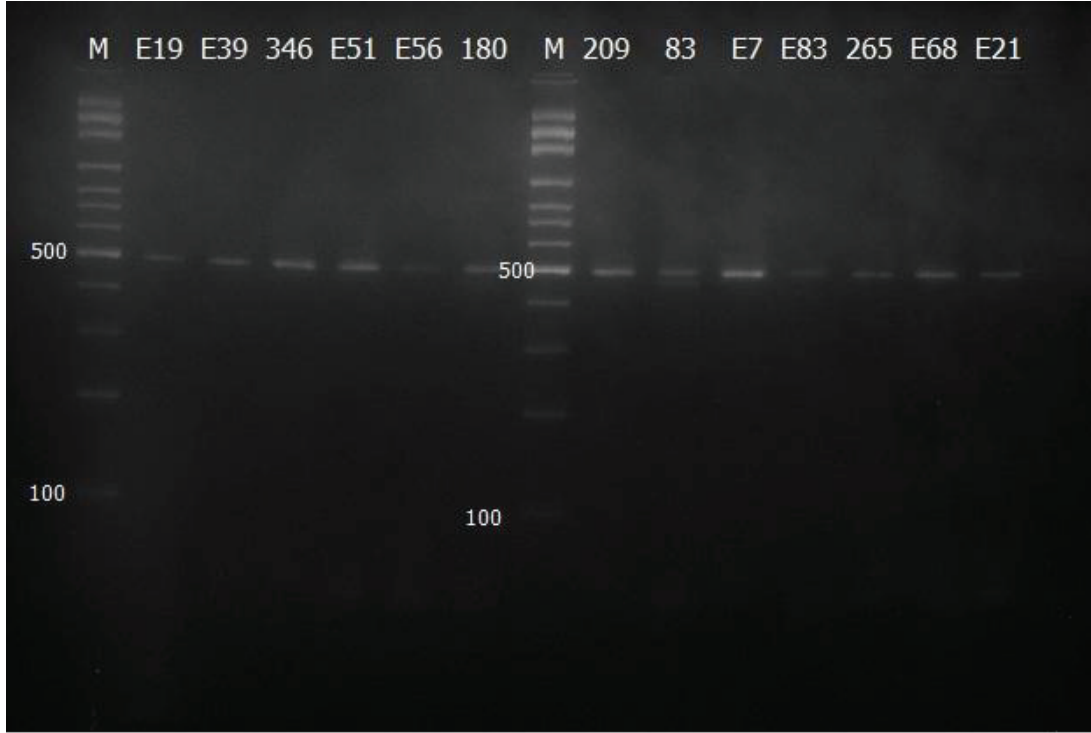
Şekil 4.31. ITS-*DdeI* RFLP Sonucu

#### 4.1.4.2.6 *HincII* enziminin uygulanması

*HincII* enziminin izolatlarla uygulanması sonucunda; izolatlardan elde edilen bant profilleri NCBI (National Center for Biotechnology Information)' dan elde edilen *F. equiseti* NRRL 26419 (type material) DNA sekans diziliminin BioEdit programından elde edilen bant profili ile karşılaştırıldığında sadece 83 ve E66 DNA numaralı izolatlarda farklı bant profilleri elde edilmiş diğer izolatlarda ise farklı bant profilleri görülmemiştir (Çizelge 4.1., Şekil 4.32., Şekil 4.33., Şekil 4.34., Şekil 4.35).



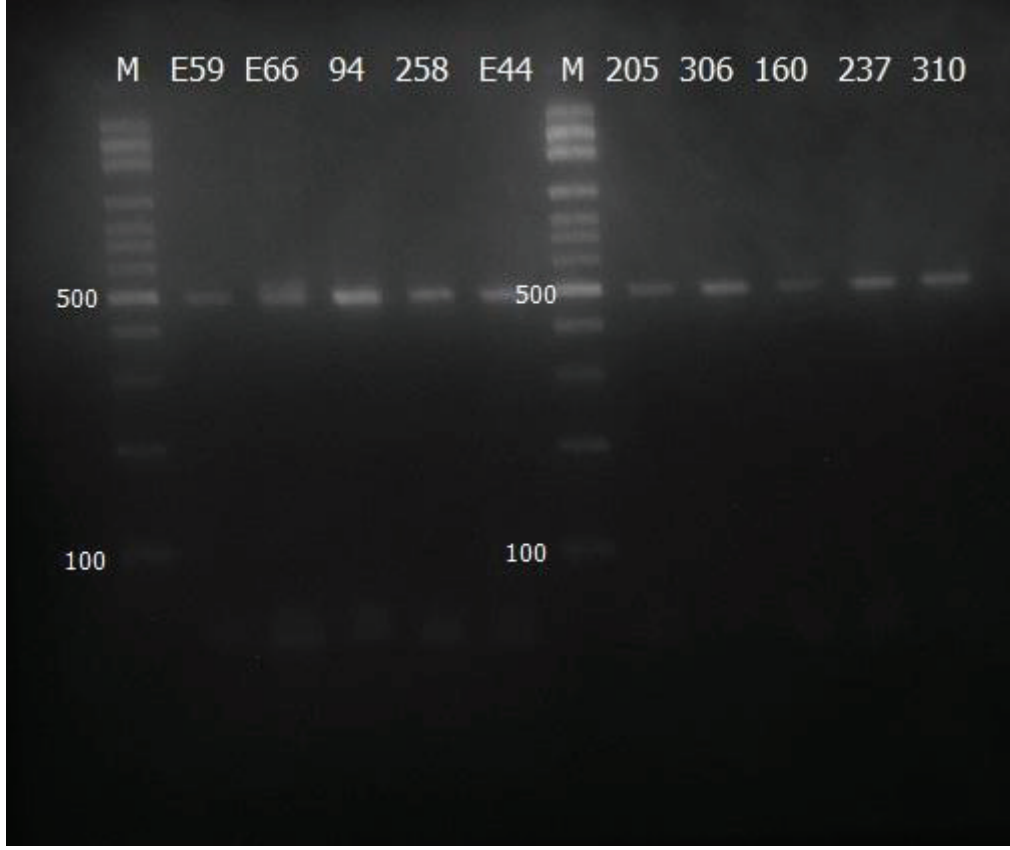
Şekil 4.32. ITS-*HincII* RFLP Sonucu



Şekil 4.33. ITS-*HincII* RFLP Sonucu



Şekil 4.34. ITS-*HincII* RFLP Sonucu



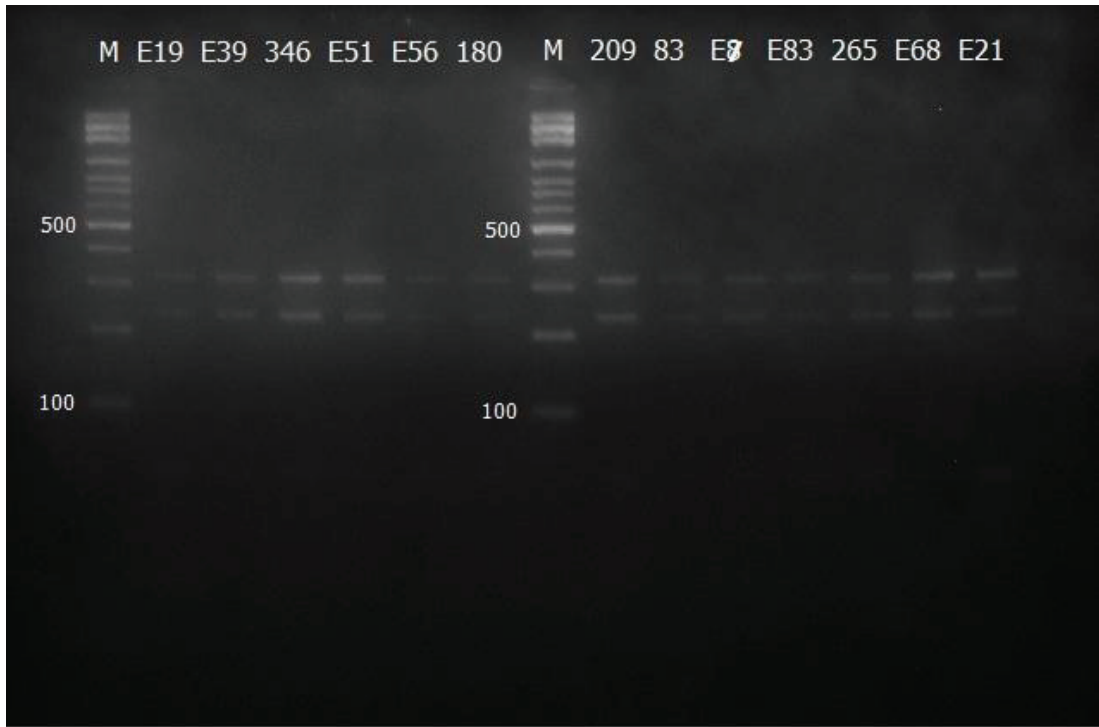
Şekil 4.35. ITS-*HincII* RFLP Sonucu

#### 4.1.4.2.7 *SphI* enziminin uygulanması

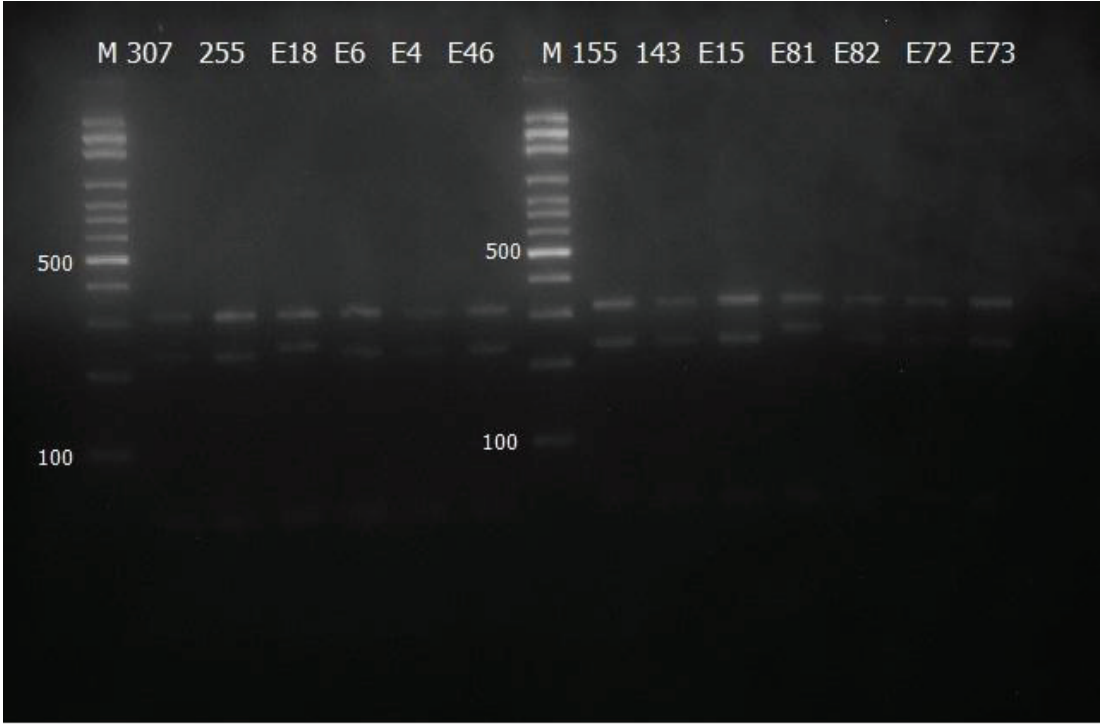
*SphI* enziminin izolatlarla uygulanması sonucunda; izolatlardan elde edilen bant profilleri NCBI (National Center for Biotechnology Information)'dan elde edilen *F. equiseti* NRRL 26419 (type material) DNA sekans diziliminin BioEdit programından elde edilen bant profili ile karşılaştırıldığında tüm izolatlarda farklı bant profilleri elde edilmiştir (Çizelge 4.1). *SphI* enziminin izolatlarla uygulanması sonucunda 2 adet izolatta 265 bp ve 330 bp' da bant profili elde edilirken diğer izolatlarda ise 240 bp ve 330 bp'da bant profili elde edilmiştir (Şekil 4.36., Şekil 4.37., Şekil 4.38., Şekil 4.39).



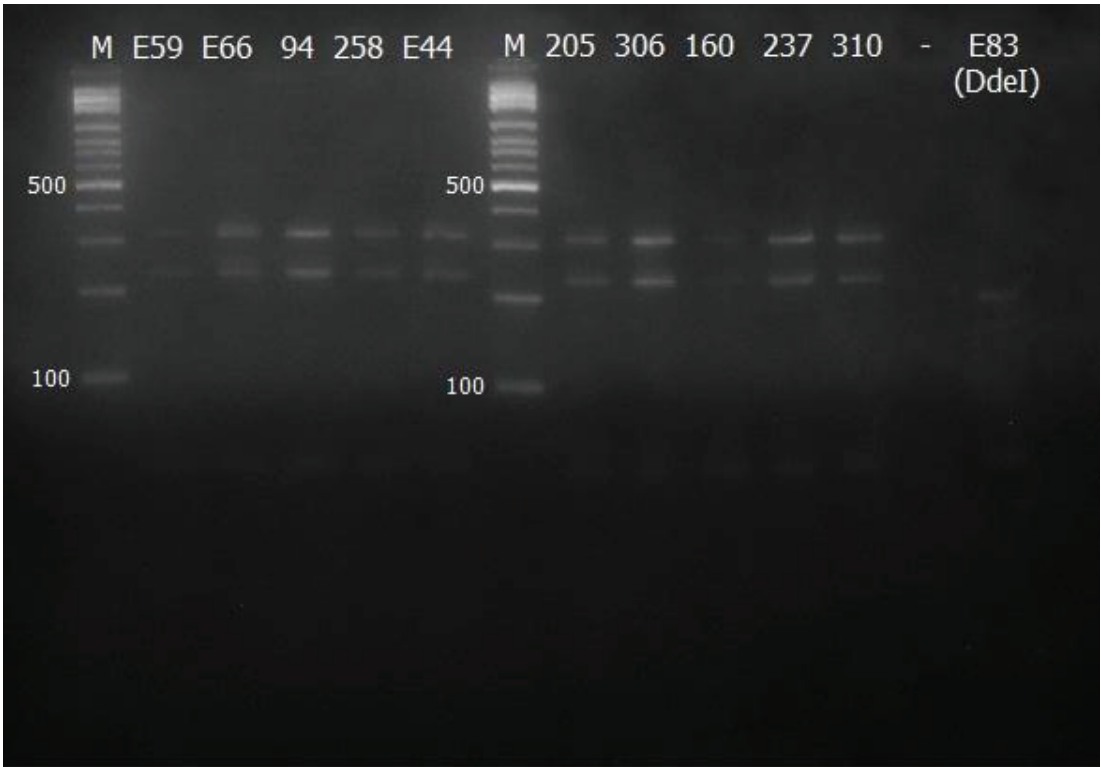
Şekil 4.36. ITS-*SphI* RFLP Sonucu.



Şekil 4.37. ITS-*SphI* RFLP Sonucu.



Şekil 4.38. ITS-*SphI* RFLP Sonucu



Şekil 4.39. ITS-*SphI* RFLP Sonucu

**Çizelge 4.1.** Enzim uygulaması sonucu elde edilen bant profilleri

<b>ENZİMLER</b>							
<b>İZOLATLAR</b>	<b>CfoI</b>	<b>DdeI</b>	<b>EcoRI</b>	<b>HaeIII</b>	<b>HincII</b>	<b>Sau3AI</b>	<b>SphI</b>
<b>F. equiseti NRR1</b>	<b>110 ; 310</b>	<b>170 ; 360</b>	<b>270</b>	<b>130 ; 470</b>	<b>500</b>	<b>40 ; 100 ; 210 ; 510</b>	<b>330</b>
<i>F. equiseti</i> E25	110 ; 200 ; 270	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E28	110 ; 200 ; 270	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E43	110 ; 200 ; 280	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E45	110 ; 200 ; 280	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E11	110 ; 200 ; 280	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E53	110 ; 200 ; 280	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E25	110 ; 200 ; 280	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E23	110 ; 200 ; 270	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E151	110 ; 200 ; 270	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E58	110 ; 200 ; 280	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E38	110 ; 200 ; 270	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E57	110 ; 200 ; 270	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E20	110 ; 200 ; 280	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E19	110 ; 200 ; 280	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E39	110 ; 200 ; 280	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E346	110 ; 200 ; 280	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E51	110 ; 200 ; 270	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E56	110 ; 200 ; 270	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E180	110 ; 200 ; 280	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E209	110 ; 200 ; 280	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> E83	110 ; 200 ; 280 ; 310	170 ; 210 ; 420	270 ; 290 ; 570	80 ; 130 ; 360 ; 400	470 ; 500	40 ; 120 ; 310 ; 410	240 ; 330

**Çizelge 4.1. (devam). Enzim uygulaması sonucu elde edilen bant profilleri**

<i>F. equiseti</i> E7	110; 200; 280	170; 210	270; 290	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> E83	110; 200; 270	170; 210	270; 290	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> 265	110; 200; 280	170; 210	270; 290	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> E68	110; 200; 280	170; 210	270; 290	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> E21	110; 200; 270	170; 210	270; 290	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> 307	110; 200; 270	170; 210	270; 290	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> 255	110; 200; 280	170; 210	270; 290	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> E18	110; 190; 310	170; 420	270; 310	60; 80; 130; 300	520	40; 120; 150; 210	265; 330
<i>F. equiseti</i> E6	110; 200; 270	170; 210	270; 290; 570	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> E4	110; 200; 270	170; 210	270; 290; 570	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> E46	110; 200; 270	170; 210	270; 290	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> 155	110; 200; 270	170; 210	270; 290	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> 143	110; 200; 280	170; 210	270; 290; 570	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> E15	110; 200; 280	170; 210	270; 290; 570	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> E81	110; 190; 310	170; 200; 240	270; 310	90; 140; 280	520	180; 210	265; 330
<i>F. equiseti</i> E82	110; 200; 270	170; 210	270; 290; 570	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> E72	110; 200; 270	170; 210	270; 290; 570	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> E73	110; 200; 280	170; 210	270; 290; 570	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> E59	110; 200; 270	170; 210	270; 290	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> E66	110; 200; 270	170; 210; 240	270; 280; 290; 310	80; 130; 360; 400	500; 520	40; 120; 150; 210; 320	240; 330
<i>F. equiseti</i> 94	110; 200; 280	170; 210	270; 290	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> 258	110; 200; 270	170; 210	270; 290; 570	80; 130; 360	500	40; 120; 310; 410	240; 330
<i>F. equiseti</i> E44	110; 200; 270	170; 210	270; 290	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> 205	110; 200; 270	170; 210	270; 290	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330
<i>F. equiseti</i> 306	110; 200; 270	170; 210	270; 290	80; 130; 360	500	40; 120; 310	240; 330

**Çizelge 4.1. (devam).** Enzim uygulaması sonucu elde edilen bant profilleri

<i>F. equiseti</i> 160	110 ; 200 ; 280	170 ; 210	270 ; 290 ; 570	80 ; 130 ; 360 ; 390	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> 237	110 ; 200 ; 280	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310	240 ; 330
<i>F. equiseti</i> 310	110 ; 200 ; 280	170 ; 210	270 ; 290	80 ; 130 ; 360	500	40 ; 120 ; 310 ; 380	240 ; 330

Tüm enzim uygulamalarının sonucu elde edilen bant profilleri (1) ve (0) şeklinde skorlanarak, elde edilen veriler ile benzerlik matrisi çıkarılmıştır. Daha sonra elde edilen veriler UPGMA (unweighted pair group method with arithmetical mean) cluster analizine tabi tutularak *F. equiseti* izolatları arasındaki benzerlik dendogramı elde edilmiştir (Şekil 4.40).

Dendogramda görüldüğü üzere; E81 ve E18 DNA numaralı izolatlarda %65 oranında diğer izolatlar ile benzerlik gösterdiği, bunların dışındaki tüm izolatlarda yaklaşık %95 oranında benzerlik olduğu belirlenmiştir. E81 DNA numaralı izolata bakıldığında izolatın fasülye bitkisinden (*P. vulgaris*) E18 DNA numaralı izolatın ise buğday bitkisinden (*T. aestivum*) izole edildiği görülmektedir. Her iki izolatta da toksin üretiminden sorumlu geninin bulunmadığı belirlenmiştir. İzolatların elde edildiği bitkilerin ekolojik bölgelerine bakıldığında ise E81 numaralı izolatın Samsun Terme ilçesi, E18 numaralı izolatın ise Çorum Merkez'den örnekleme yapıldığı görülmektedir. İzolatların patojenik özelliklerine bakıldığında ise her iki izolatta hasta bitkilerden izole edildiği görülmektedir.

Diğer izolatlara bakıldığında ise yaklaşık %95 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiş olup bu izolatlar arasında hasta ve sağlıklı bitkilerden elde edilen izolatların arasında herhangi bir farklılık belirlenmemiştir. Ayrıca izolatların farklı konukçulardan elde edildiği göz önüne alındığında izolatlarda konukçuya özelleşme olmadığı kanısına varılmıştır.



## 4.2 Tartışma

Türkiye'nin farklı agro-ekolojilerinden, ağırlıklı olarak buğdaygil famiyasına ait ve hastalık sipmtomu gözlenen ve gözlenmeyen (sağlıklı) özellikteki konukçulardan izole edilmiş toplam 49 *Fusarium equiseti* izolatu ile moleküler düzeyde genetik farklılıkların belirlenmesi hedeflenerek bu tez çalışması yürütülmüştür. Geniş bir konukçu, coğrafya ve yaşam formu (patojenik, saprofitik, endofitik) dağılımı gösterdiği bilinen *Fusarium* cinsi içerisindeki pek çok türde olduğu gibi (Gerlach ve Nirenberg, 1982; Leslie, 1995; Parry ve diğ., 1995; O'Donnell ve diğ., 2004; Larran ve diğ., 2007) *F. equiseti* türünün de bu farklılıklara göre genetik düzeyde farklılaşma gösterebileceği öngörülerek tez çalışması kurgulanmıştır.

Tarımsal anlamda öneme sahip birçok bitkide farklı özellikteki fungusların tanı ve teşhisi, uygulanacak mücadele programlarının oluşturulabilmesi açısından önemlilik arz etmektedir. Ancak *Fusarium* gibi çok geniş tür dağılımı olan ve aynı zamanda morfolojik ve biyolojik karakterler yönünden birbirine çok benzeyen taksonomik gruplarda yapılacak olan tanı ve teşhis çalışmalarının doğruluk ve güvenilirliği, teşhisi yapanın tecrübesi ile sınırlı kalmaktadır. Yine klasik yöntemler kullanılarak yapılan teşhis çalışmaları hem uzun zaman, hem de yoğun iş gücü gerektirmekte ve bu da bazı durumlarda çalışmaların uygulanabilirliğini kısıtlamaktadır. Günümüzde taksonominin temelini oluşturan klasik yöntemlerle birlikte, gelişen genetik tabanlı moleküler teşhis yöntemleri, güvenilirlik, uygulama kolaylığı ve uzun vadede değerlendirildiğinde maliyet gibi kavramlar yönünden cazip hale gelmiş ve bu gibi çalışmaların yürütüldüğü pek çok laboratuarda kullanılır hale gelmiştir.

*Fusarium equiseti*, canlı ya da ölü bitki dokuları yanında yaygın olarak her zaman bulunabilen bir toprak saprofiti olmakla birlikte tarımsal ürünlerin birçoğunda da patojen özellikte bulunabilmektedir (Booth, 1971). Bu türün patojenik ya da saprofitik özellikte olması, dünyada olduğu gibi ülkemizde de arazi surveylerinin birçoğunda sıklıkla izole edilmesine ve elde edilen *Fusarium* spp.'nin içerisinde en yaygın olarak bulunan türlerden birisi olmasına yol açmaktadır (Aktaş ve diğ., 2000; Demirci ve Dane, 2003; Tunalı ve diğ., 2006; Kansu, 2009). Bu düzeyde yaygınlık ve dağılım gösteren bir türün kesin tanı ve teşhisinin yapılması, özellikle tarımsal ürünlerdeki yaygınlığı açısından önem arz etmektedir. (Booth, 1977) tarafından

morfolojik özellikleri tanımlanan *F. equiseti* türü, makrokonidilerindeki özellikle apikal hücre kıvrılması ile birçok *Fusarium* spp.'den ayrılmaktadır. Ancak, bu türün morfolojileri üzerinde sonradan yapılan çalışmalarda 3 farklı morfolojik tipinin olduğu (Nelson ve diğ., 1983) ve özellikle apikal hücre kıvrılmasındaki farklılaşmaya göre *F. scirpi* (Burgess ve diğ., 1985) ile *F. compactum* (Gerlach ve diğ., 1982) türleri ile karışıklık gösterdiği bildirilmiştir. Morfolojide karşılaşılan bu karmaşıklık, bu konuda uzmanlığı ve tecrübesi olmayanlar tarafından türün teşhisinde yanlışlık oluşabileceğini ortaya koymaktadır. Bu sebepten yukarıda bahsedilen moleküler teşhis yöntemlerinin doğrulayıcı olarak kullanılması ve bu türün teşhisini kolaylaştırması açısından önemli görülmektedir. Tez çalışmasında *F. equiseti* için Mishra ve diğ., (2002) tarafından ribozomal DNA ITS bölgesi temelinde geliştirilen türe özgü primer seti kullanılarak teşhisler yapılmış ve çalışmada belirtilen diğer 4 *Fusarium* spp.'nden farklı olarak yaklaşık 390bp büyüklüğünde çoğaltım ürününe sahip olanlar *F. equiseti* olarak teşhis edilmiştir.

Tez çalışmasında tür teşhisi morfolojik ve moleküler yöntemlerle *F. equiseti* olarak belirlenen toplam 49 izolatin farklı özelliklerde olduğu görülmektedir. Çalışmada kullanılan izolatlar konukçu yönüyle değerlendirildiğinde; 37 buğday (*Triticum aestivum*), 4 arpa (*Hordeum vulgare*), 2 çavdar (*Secale cereale*), 2 çim (*Lolium* spp.), 1 yabancı buğday (*Aegilops* sp.), 1 fiğ (*Vicia sativa*) ve 2 fasülye (*Phaseolus vulgaris*) bitkilerinden elde edilen izolatlar olduğu görülmekte ve tüm izolatların Türkiye'nin 5 farklı agro-ekolojik bölgesinden elde edildiği belirtilmiştir. Ayrıca 41 izolat, izolatların toplanması aşamasında tarlada şiddetli kök-boğazı çürüklüğü veya başak yanıklığı belirtisi görülen bitkilerden seçilirken, 8 tanesinin sağlıklı bitkilerden seçiminin yapıldığı ve bunların endofitik karakterde oldukları bilinen seçilmiş ve çalışmaya dâhil edilmiş oldukları belirtilmiştir. İzolatların belirtilen bu özellikleri göz önüne alınarak, genetik farklılık analizi yapılmaya çalışılmış ve bu amaçla ökaryotik organizmalarda değişik koşullar sebebiyle (konukçu, dağılım, üreme özelliği vs.) kolaylıkla değişime uğrayabildiği bildirilen ITS bölgesi seçilmiştir (Nazar ve diğ., 1991; Baura ve diğ., 1992; Lee ve Taylor, 1992; O'Donnell, 1992; 1997). İçerisinde 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 ve kısmen 28S rDNA bölgelerini içeren yaklaşık 570bp uzunluğundaki bölge, 7 farklı endonükleaz (kesici) enzim kullanılarak toplamda 40 farklı bant profili meydana

getiren noktandan kesilmiştir. Buna göre elde edilen filogeniler verilen dendogram (Şekil 4.40) ile açıklanmaya çalışılmıştır.

Elde edilen filogenetik soy ağacındaki % benzerlik oranı göz önüne alındığında, izolatlardan %86 (43 izolat) gibi büyük bir çoğunluğunun, %95 ve üzeri oranda birbiri ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Kosiak ve diğ., (2005), IGS kısmi gen dizilimi ve RFLP temelinde yürüttükleri benzer çalışmada 27 *F. equiseti* izolatında IGS kısmi gen dizilimine göre benzerliğin %94 ve üzeri olduğu, bunu elde edilen RFLP verilerinin de doğruladığını bildirmişlerdir. Chehri ve diğ., (2011), ITS-RFLP ile hıyar bitkilerinden elde edilen içerisinde 3 farklı *F. equiseti* izolatının da bulunduğu 5 farklı türde moleküler karakterizasyon çalışması yürütmüştür. *F. equiseti* izolatları arasında benzerlik oranının % 94 olduğu görülürken, diğer 2 farklı türe göre (*F. oxysporum* ve *F. semitectum*) bu oran %85'e düşerken, en az benzerliğin %41 ile *F. proliferatum* ve *F. solani* türleri olduğu bildirilmiştir. Kosiak ve diğ., (2005) çalışmasında kullanılan 4 enzimden 2'sinin ve Chehri ve diğ., 2011, çalışmasındaki 7 enzimden 4 tanesinin, çalışmamızda kullanılan enzimlerle aynı olması, elde ettiğimiz sonuçların benzerliğini de artırmış ve paralele yakın sonuçların elde edildiği gözlenmiştir. Özellikle ilk çalışmada kullanılan 27 *F. equiseti* izolatının büyük bir çoğunluğunun bizdeki gibi çoğunlukla hububat konukçularından elde edilen izolatlar olması, bu türün konukçuya göre ITS veya IGS bölgesindeki polimorfizime etki oranının düşük olabileceğini göstermektedir.

Filogenik soy ağacında, NCBI veri tabanından elde edilen ve çalışmamızda kullanılan primerler ve kullanılan toplam rDNA uzunluğu bakımından benzer olan *F. equiseti* NRRL 29419 nolu (Accses. No. NR\_121457) izolatına ait sekans verileri kullanılmış ve çalışmada kullanılan tüm enzimler kullanılarak, kesim haritalaması yapılarak RFLP profilleri elde edilmiştir. Bu profiller, filogeniye dahil edilerek aynı zamanda bir tip materyali olarak kullanılan bu izolat ile karşılaştırma yapabilmek imkanı sağlanmıştır. Sonuç olarak bu izolatın, tez çalışmasında kullanılan 2 izolat haricinde (E81 ve E18), diğer tüm izolatlar ile %83 oranında benzer olduğu gözlenmiştir. O'Donnell ve diğ., (2009) tarafından ortaya konulan çalışmada Almanya'da topraktan izole edildiği bildirilen *F. equiseti* NRRL 26419 izolatının Türkiye'den elde edilen aynı türün izolatları ile farklılık göstermesindeki en büyük sebebin kıtasal çaptaki coğrafik farklılık ile açıklanabileceği düşünülmektedir. O'Donnell ve diğ. (2000), tarafından yapılan bir diğer çalışmada, *Gibberella fujikuroi*

kompleks içerisinde yer alan türlerin coğrafik köken yönüyle farklı kıtalardan elde edilmelerinin, bu grup içerisindeki farklı gen filogenileri ile açıklanabildiği belirtilmiştir.

*Fusarium equiseti* izolatlarının ITS-RFLP profilleri ile oluşturulan filogenetik ağaç üzerinde elde edilen dikkat çekici sonuçlardan biri ise benzerlik oranının nispeten diğer 47 izolata göre daha düşük olarak belirlendiği E81 ve E18 izolatlarının konumlarıdır (% benzerlik; sırasıyla %65 ve %67). Bu izolatlardan E81; Karadeniz agro-ekolojik bölgesinden olup, konukçu bitkisi fasulye iken, E18; Kuzey Anadolu agro-ekolojik bölgesine ait ve buğday konukçusundan elde edilen izolattır. Her iki izolat, konukçuları üzerinde kök-boğazı çürüklüğü etmeni belirtisi gösterdiği bilinerek izole edilmiştir. Buna göre oluşan filogenilerde, bu iki türün *F. equiseti* izolatlarına ait filogenilerden uzaklaşarak, dış grup olarak kullanılan *Alternaria alternata* (Accs. HE579252) ve *Fusarium graminearum* (Accs. KC577196) türleri ile yakın benzerlik göstermesi, analiz edilen rDNA bölgesinde meydana gelmiş bir karmaşıklık ile açıklanabilir. Özellikle fasülyeden elde edilen E81 izolatının, buğdaydan elde edilen E18 göre nispeten farklı bir klade (kol) oluşturması konukçu farklılaşması ile açıklanabilse de, *F. equiseti* izolatları içerisinde yer alan E82 izolatının filogenideki yerinin, E81'e göre çok farklı yerde olması bu hipotezi çürütmektedir. Ayrıca coğrafik dağılım ve diğer özellikleri yönüyle benzerlik gösteren birçok buğday izolatının filogenide var olmasına rağmen, E18'e göre farklı konumda olmaları da, E18 izolatının konumunun konukçu farklılığı veya benzerliği ile açıklanamayacağına işaret etmektedir. Bu ihtimaller dışında, rDNA bölgesindeki karmaşıklığa sebep olabilecek faktörlerden en güçlüsünün, genomik DNA içerisinde farklı bir organizma DNA'sı ile bulaşıklık olma ihtimalidir.

Çalışmada kullanılan izolatların elde edildiği konukçular incelendiğinde, konukçu dağılımının filogenetik ağaç üzerinde tam anlamıyla ifade edildiği söylenememektedir. Buğdaydan elde edilen izolatların hemen hemen tüm kladelere üzerinde dağılım gösterdiği gözlenirken, sadece 3 klade içerisinde tek izolat olarak arpa, fiğ ve fasülyeden elde edilen izolatların ifade edildiği belirlenmektedir. Konukçu dağılımındaki farklılığın en fazla olduğu kladelere ise filogenide en kalabalık olan izolat gruplarıdır. Liorens ve diğ., (2006), 6 farklı *Fusarium spp.*'e ait IGS-RFLP profilleri içerisinde sadece *HhaI* enzimi ile elde edilen profillerin muz, mısır ve ananas konukçularından elde edilen tür ve izolatlar hakkında bilgi verdiğini,

diğer enzimlerden elde edilen profillerin ise konukçu dağılımı ile herhangi bir ilişkisinin bulunmadığını ifade etmektedir. Marín ve diğ., (2012) tarafından EF-1 $\alpha$  kısmi gen sekansı temelinde yapılan filogenetik analizlerde *F. equiseti* ve *F. acuminatum* için elde edilen sonuçlarda konukçu farklılığının herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Kosiak ve diğ.,(2005) ise farklı buğdaygil konukçularının, *F. equiseti*'den elde edilen IGS-RFLP profillerinde toksin üretimi ile herhangi bir ilişkisinin olmadığını ortaya koymuştur. Çalışmamızda elde edilen bulgular, bahsedilen kaynaklar ile karşılaştırıldığında, *F. equiseti*'nin ITS-RFLP profilleri ile de konukçu özelleşmesinin filogenetik analiz sonuçlarına yansımadağı belirlenmiştir. Ancak literatürde konukçu farklılığının *F. equiseti* ve bazı *Fusarium* spp. için genetik farklılığın belirlenmesinde veya filogenetik analizlerde tam anlamıyla ifade edilmediğinin bildirildiği bu çalışmaların dışında, *F. oxysporum* gibi karmaşık bir tür içeriği olan gruplarda konukçu ve coğrafik dağılımın etkisinin belirlenebildiği kaynaklar da mevcuttur (Appel ve Gordon, 1995; Baayen ve diğ., 2000).

Üzerinde durulması gereken bir diğer konu ise filogenetik ağaç üzerinde izolatlar a ait agro-ekolojik dağılımın ifade edilip edilmediğidir. Çalışmada kullanılan izolatların Türkiye'nin 5 farklı agro-ekolojik bölgesini temsil etmesi yönünden seçildiği belirtilmiştir. Ancak elde edilen filogenilerde, izolatların bu temsiliyeti ortaya koymadığı görülmektedir. Ancak Jurado ve diğ., (2006) ve Marín ve diğ., (2012), EF-1 $\alpha$  kısmi gen sekansı temelinde elde ettikleri sonuçlarda *F. equiseti* izolatlarında genetik bir farklılığın olduğu ve tip I ve tip II olmak üzere iki farklı gen kümesi oluştuğunu bildirmişlerdir. Ayrıca tip I gen kümesi içerisine çoğunlukla Kuzey, tip II içerisine ise Güney Avrupa izolatlarının girdiği belirlenmiştir. Çalışmamızdaki farklı agro-ekolojileri temsil eden izolatların böyle bir farklılık oluşturmaması, rDNA bölgesinde coğrafik farklılıklardan dolayı herhangi bir polimorfizm meydana gelmediğini göstermektedir. Ayrıca temsil edilen bölgelerin nispeten Kuzey ve Güney Avrupa'ya göre daha dar bir alan olmasının, sonucu etkilediği düşünülmektedir.

Son olarak, 10 endofitik karakterdeki ve 39 hastalık oluşturma özelliğine sahip olduğu düşünülen izolatın filogenetik analiz sonucunda dendogramda özel olarak ifade edilmediği görülmektedir. Özellikle literatürde endofitik veya patojenik şekilde karakterize edilmiş funguslarda, genetik farklılığın tespitine yönelik ayrıntılı kaynak olmaması tartışma yaratacak bir hipotez oluşturulmasını güçleştirmektedir. Ancak bu

konunun özellikle endofit dışındaki 39 izolatta patojen olup olmadıklarının tam anlamıyla ortaya konularak tartışılmasının ve buna göre seçilecek özel gen aileleri veya kümelerinden farklılıkların tespitine gidilmesinin ilerleyen süreçte faydalı olacağı düşünülmektedir.

Dendogram üzerinde dikkate değer sonuçlardan bir diğeri ise 32 *F. equiseti* izolatının eşit sayıda ikiye ayrılması ile oluşan iki klade yapısıdır. Bu iki grup içerisinde yer alan izolatların konukçu özelleşmesi, coğrafik dağılım veya endofitik karakter yönünden farklılıkları ortaya çıkartan bir durumun söz konusu olmadığı görülmektedir. Bu farklılık kaynakları sebebiyle kolay bir şekilde değişikliğe uğrayabildiği bildirilen rDNA'nın ITS bölgesinin, elde edilen bu spesifik sonuç ile açıklanamayacağı görülmektedir. (O'Donnell ve Cigelnik, 1997) rDNA'nın ITS2 bölgesinde iki farklı ortolog olmayan homoplastik parçanın olduğunu ve bunların ITS2 tip I ve tip II olarak isimlendirildiğini bildirmiştir. Araştırmacılar, bu durumun sebebinin fungusların evrimleştiği eski dönemlerde türler arası hibridizasyon (Xenolog kaynaklı) veya gen katlanması (duplikasyon, paralog kaynaklı) yollarının takip edilmesi ile ortaya çıkabilmiş olabileceğini belirtmişlerdir. Bu sonuç, filogenetik analizdeki birbirine çok benzeyen ama iki farklı klade olarak konumlanan *F. equiseti* izolatlarının, ITS2 bölgesindeki bu tip I ve tip II ayrışması ile açıklanabilmektedir. ITS2 bölgesinde meydana gelen bu farklılaşmanın fonksiyonel olarak fungusun eşeyli ya da eşeysiz üreme mekanizmalarında da farklılaşmaya yol açabileceği düşünülmektedir. Bu durumun özellikle *F. equiseti* gibi yaygın bir fungusun popülasyon dinamikleri açısından önemli sonuçlara yol açabileceği de düşünülmektedir.

*Fusarium* cinsi özellikle tarımsal anlamda öneme sahip olan türler açısından değerlendirildiğinde, üründe meydana getirdiği fiziksel zarar ve verim kaybı yanında, üründe meydana getirdikleri, düşük moleküler ağırlığa sahip ikincil metabolitler (mikotoksinler) sebebiyle de ürün kalitesinde önemli sorunlar oluşturabilmektedir. *F. equiseti* türü de bu mikotoksinlerden yaygın olanlarından; Diacetoxyscirpenol (DAS), Fusarochromanone (FC), equisetin (EQ), zearalenone (ZEA) ve tip A ve B trikotesenlerini (NIV ve DON ile onların türevleri) ürettiği bildirilmektedir (Bottalico ve Perrone, 2002; Hestbjerg ve diğ., 2002). Özellikle trikotesen oluşumundan sorumlu gen ailesi incelendiğinde, *Tri5* geninin fonksiyonunu önemli olduğu ve buna göre PCR ile yapılacak çoğaltımlarda 685bp'lik bir çoğaltım ürününün varlığının

trikotesen oluşumunun genetik tabanının potansiyelini ortaya koyduğu bildirilmektedir (Demeke ve diğ., 2005; Alexander ve diğ., 2009). Tez çalışmasında kullanılan 49 *F. equiseti* izolatu, *tri5* geni yönüyle incelenmiş ve bunlardan 20 tanesinin bu gen lokusunu içerdiği tespit edilirken, diğer izolatlarda böyle bir yapının olmadığı belirlenmiştir. (Niessen ve Vogel, 1998), arpadan elde ettikleri 2 farklı *F. equiseti* izolatında bu genin varlığını incelemiş ve sadece bir tanesinin pozitif sonuç verdiğini bildirmiştir. Aynı şekilde Abramson ve diğ. (1993) 3 *F. equiseti* izolatu ile yürüttükleri mikotoksin analizi çalışmalarında 3 Manitobo izolatının hepsinde düşük oranda tip A ve tip B trikotesenlerini ürettiği bildirmiştir. Bununla birlikte (Hestbjerg ve diğ., 2002), Kuzey Avrupa'da topraktan elde edilen 57 *F. equiseti* izolatından, sadece 8 tanesinden kromotografik yöntemlerle tip A ve B trikotesenlerinin üretildiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak incelenen çalışmalarda da görüldüğü üzere çok az izolatta *tri5* geni varlığı ve mikotoksin üretiminin belirlendiği gözlenmektedir. Çalışmamızdaki 20 izolatın pozitif sonuç vermesi, *F. equiseti* izolatlarının trikotesen üretimi hakkında daha detaylı bilgilere ulaşılması gerekliliğini göstermektedir. Ayrıca *F. equiseti* izolatlarındaki sadece trikotesen üretiminin değil, diğer mikotoksinlerin de üretim seviyeleri ve potansiyelleri hakkında daha fazla bilgi edinilmesi gerekmektedir. Böylece elde edilecek mikotoksin profilleri ile genetik farklılık ve karakterizasyon çalışmalarına farklı boyutlar kazandırılmış olacak ve bu da elde edilen farklı filogenetik sonuçların daha kolay ve bilgi verici düzeyde yorumlanmasını sağlayacaktır. Çünkü *Fusarium* cinsi için mikotoksin oluşumu önemli bir parametre olup, *F. equiseti*'nin epidemiyolojisi açısından önemlidir.



## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

*Fusarium equiseti* izolatlarının morfolojik teşhis yöntemleri dışında, ulusal düzeyde ilk defa bu tür için moleküler teşhis araçları kullanılarak (PCR gibi) teşhisinin yapılması, çalışmanın literatüre vereceği katkıyı artırmakta ve ilerleyen süreçte bu yöntem ve tekniklerin standart laboratuvar yöntemleri haline gelmesine büyük katkı sunmaktadır. Ayrıca hem moleküler tür teşhisleri, hem de ITS temelinde elde edilecek PCR çoğaltım ürünlerinin, 7 farklı endonükleaz enzim ile kesilerek, ITS-RFLP bant profillerinin elde edilmesi, bu yöntemlerin klasik moleküler biyoloji veya mikrobiyoloji dışındaki, tarım bilimi uygulamalarında da kullanılabilmesini mümkün kılacaktır.

Çalışmanın bir diğer katkısının ise özellikle günümüzde artan gıda güvenliği ve sağlıklı besin elde etmeye yönelik olarak, tarımsal ürünlerdeki mikotoksin riskini daha hızlı ve güvenilir sonuçlarla belirlenmeye dönük olacağı düşünülmektedir. Ökaryotik organizmalarda, etkili bir protein sentezi inhibitörü olan trikotesen mikotoksinlerini (deksinivalenol, nivalenol vb.) üreten *F. equiseti*'nin, bu toksinleri üretme durumlarının genetik (*Tri* genleri) temelinde dayandırılarak yine moleküler yöntemlerle tespit edilmesi, mikotoksin riskinin belirlenmesinde önemli bir ön aşama olacaktır. Özellikle günümüzde kullanılan pahalı ve zaman gerektiren analitik ölçüm (HPLC, GC, LC-MS vb.) yöntemlerine başlamadan önce tarımsal ürünlerdeki fungus tür/türleri üzerinden mevcut toksin üretim potansiyelin belirlenmesine yönelik yürütülecek bu ve bunun gibi ön çalışmaların analiz maliyetlerini düşüreceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın bir diğer önemli katkısının ise hasta ve sağlıklı bitkilerden izole edilen farklı karakterdeki *F. equiseti* izolatları arasında ITS-RFLP veya *Tri* genleri temelinde elde edilecek sonuçların, özellikle sağlıklı bitkilerden elde edilen izolatlar açısından farklı olması, endofit kavramı içerisinde bu izolatların biyolojik mekanizmasının açıklanabilmesi açısından önemli bilgiler verecektir. Doğada pek çok endofitik fungus veya bakterinin konukçusuna sağladığı avantajlar (su alımı, besin maddesi alımı, hastalıklara karşı direnç vb.) bilinmektedir. Karakterize edilecek endofit *F. equiseti* izolatları üzerinde de, ilerleyen süreçte geliştirilecek

farklı çalışmalar ile patojenik karakterli olan türlere karşı bir biyolojik mücadele ajanı adayı olabilmesi veya bitki gelişiminin teşvik edilmesine yönelik bir mekanizmanın geliştirilmesi konuları, bu çalışmanın sunacağı en büyük katkılardan birisi olacaktır.

Bu çalışmamın sonucunda 2009-2012 yılları arasında gerçekleştirilen arazi sörveylerinde hastalıklı ve sağlıklı buğday bitkilerinden yoğun bir şekilde izole edilen *F. equiseti* izolatları ulusal anlamda ilk defa moleküler teşhis metotları kullanılarak teşhis edilmiş ve mikoloji laboratuvarındaki -86 C°'de derin dondurucudaki koleksiyona dahil edilmiştir.

Bu çalışmada ayrıca izolatların trikotesen üretim potansiyeli *Tri* gen lokusu temelinde geliştirilen Tox5/1-2 primerleri kullanılarak belirlenmiştir. PCR uygulamasının sonucunda toplam 49 adet izolattan 20 tanesinde trikotesen üretim potansiyelinin var olduğu belirlenmiştir. Bu da yaklaşık %40 oranda bu genin izolatlarda bulunduğu anlamına gelmektedir. Yurt dışında yapılan çalışmalara bakıldığında bu oranın çok daha düşük olduğu görülmektedir. Trikotesen üretim potansiyeli olan izolatlara bakıldığında hem endofitik hemde patojenik özellik gösteren izolatlarda bu genin varlığı belirlenmiştir. Bu teşhisten yola çıkarak endofit karakterde olan izolatların da patojen izolatlar gibi trikotesen üretim potansiyelinin olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca izolatların konukçu dağılımının ise çok çeşitli olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların elde edildiği agro-ekolojik bölgelere bakıldığında bu tez çalışmasında bulunan her bölgeden izolatta bu gen belirlenmiştir. Bu bilgiden yola çıkarak mikotoksin üretim potansiyelinin belirli bir bölgede değil tüm bölgelerde risk oluşturduğu kanısına varılmıştır. Ülkesel olarak mikotoksin üretim potansiyelini belirlemeye yönelik daha ileri teknikler kullanılarak yapılacak çalışmaların faydalı olacağı kanısına varılmıştır.

Ayrıca daha sonra hasta bitkilerden elde edilen izolatlar ile sağlıklı bitkilerden elde edilen (endofit olduğu düşünülen) izolatların *Fusarium* spp.'ye hassas buğday çeşitlerinde patojenite çalışması yapılarak bu izolatların patojenik durumu incelenmelidir.

ITS temelinde yapılan RFLP sonucunda iki izolat haricindeki izolatlarda %95 oranında benzerlik olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Sağlıklı ve hasta bitkilerden elde edilen izolatlar arasında ITS bölgesi temelinde herhangi bir farklılık

belirlenememiştir. Bu çalışmanın izolatların farklı gen bölgeleri temelinde daha sonraki çalışmalarda tekrarlanabileceği önerilmektedir.



## KAYNAKLAR

- Akgül, D., 2008. Çukurova bölgesi buğday ekim alanlarında kök, kökboğazı ve sap çürüklüğü hastalığının durumu, bazı buğday çeşitlerinin hastalığa karşı reaksiyonları, farklı gübreleme pratikleri ve fungusit uygulamalarının hastalık gelişimine etkileri. Doktora tezi (Yayınlanmış), Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Aktaş, A., Bolat, N., Keser, M., İnce, T., 2000. Eskişehir İli Hububat Ekim Alanlarında Hububat Kök Boğazı Çürüklüğü Hastalık Etmenlerinin Saptanması, Buğday ve Arpada *Dreschlera sorokiniana* (Sacc.) Subram. And Jain'ya Karşı Genitör Çeşit ve Hatların Belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 40 (1-2): 71-83.
- Aktaş, H., 2001. Önemli Hububat Hastalıkları ve Survey Yöntemleri. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü yayını, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı.
- Alexander, N. J., Proctor, R. H., McCormick, S. P., (2009). "Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*." Toxin Reviews 28(2-3): 198-215.
- Aoki, T., O'Donnell, K., 1999. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* formerly recognized as the Group 1 population of *Fusarium graminearum*. Mycologia 91: 597-609.
- Appel, D.J., Gordon, T.R., 1996. Local and regional variation in populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of intergenic spacer region of the ribosomal DNA. Mol Plant Microbe Interact 9: 125-138.
- Araz, A., Uğuz, N., Güler, P., 2010. *Fusarium* Türlerinin İzolasyonu ve Patojenitelerinin Belirlenmesi. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi 3(1): 1-5
- Baayen, R. P., O'Donnell, K., Bonants, P. J. M., Cigelnik, E., Kroon, L. P. N. M., Roebroek, E. J. A., Waalwijk, C., (2000). "Gene Genealogies and AFLP Analyses in the *Fusarium oxysporum* Complex Identify Monophyletic and Nonmonophyletic Formae Speciales Causing Wilt and Rot Disease." Phytopathology 90: 891-900.
- Baayen, R.P., van Dreven, F., Krijger, M.C., Waalwijk, C., 1997. Genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and *Fusarium redolens* f. sp. *dianthi*. Eur J Plant Pathol 103: 395-408.
- Backman P.A. and Sikora RA., 2008. Endophytes: An emerging tool for biological control. Biological Control: 46: 1-3.

- Bacon C.W., and White J.F., 2000. *Microbial Endophytes*, Marcel Dekker, New York.
- Bartholdi B.A., Berreck M., Haselwandter K., 2001. Hydroxamate siderophore synthesis by *Phialocephala fortinii*, a typical dark septate fungal root endophyte. *Biometals* 14: 33-42.
- Baura, G., Szaro, T. M., Bruns, T. D., 1992. "*Gastrosuillus laricinus* Is a Recent Derivative of *Suillus grevillei*: Molecular Evidence." *Mycologia* 84(4): 592-597.
- Booth, C., 1971. The genus *Fusarium*. Kew Surrey, England, Commonwealth Mycological Institute.
- Booth, C., 1977. *Fusarium* laboratory guide to the identification of the major species. Kew, Surrey, England, Commonwealth Mycological Institute.
- Bottalico, A., Perrone, G., (2002). "Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe." *European J. Plant Pathology* 108: 611-624.
- Bowman, B. H., Taylor, J. W., Brownlee, A. G., Lee, J., Lu, S., White, T. J., 1992. "Molecular Evolution of the Fungi: Relationship of the Basidiomycetes, Ascomycetes, and Chytridiomycetes." *Mic. Biol. Evol.* 9(2): 285-296.
- Bowman, B. H., Taylor, J. W., White, T. J., 1992. "Molecular Evolution of the Fungi: Human Pathogens." *Mic. Biol. Evol.* 9(5): 893-904.
- Brasileiro, T.R.V.B., Coimbra, M.R.M., de Moraes, A., de Oliveria, T.N., 2004. Genetic variability within *Fusarium solani* species as revealed by PCR-fingerprinting based on PCR markers. *Braz. J. Microbiol.* 35: 205-210.
- Bruns, T. D., White, T. J., Taylor, J. W., 1992. "Fungal Molecular Systematics." *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 525-564.
- Burgess, L. W., Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W. F. O., 1985. "*Fusarium scirpi*: Emended Description and Notes on Geographic Distribution." *Mycologia* 77(2): 212-218.
- Chehri, K., Salleh, B., Yli-Mattila, T., Reddy, K.R.N., Abbasi, S., 2011. Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18, 341-351.
- Clear, R.M., Partick, S.K., Gaba, D., 2000. Prevalence of fungi and fusariotoxins on barley seed from western Canada, 1995 to 1997. *Can. J. Plant Pathol.* 22: 44-50.
- Cook, R.J., (1986). *Wheat Management Systems in the Pacific Northwest*. *Plant Disease*, 70: 894-898.
- Demeke, T., Clear, R.M., Patrick, S.K., Gaba, D., 2005. Species-specific PCR-based assay for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole

- seed agar plate method and trichothecene analysis. *International Journal of Food Microbiology* 103, 271-284.
- Demirci, E., Dane, E., 2003. Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. from stem bases of winter wheat in Erzurum, Turkey. *Phytoparasitica*, 31(2): 170–173.
- Demirci, F., 2003. Bazı Buğday çeşitlerinin Önemli Kök ve Kök Boğazı Hastalık Etmenleri (*Fusarium* spp., *Bipolaris sorokiniana*)'ne Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi. *Tarım Bilimleri Dergisi* 9(4): 460-466.
- Depriest, P.T., Been, M.D., 1992. Numerous group introns with variable distributions in the ribosomal DNA of a lichen fungus. *J. Mol. Biol.* 228: 315-321.
- Donoso EP., Bustamante RO., Caru M., Niemeyer HM. 2008. Water deficit as a driver of the mutualistic relationship between the fungus *Trichoderma harzianum* and two wheat genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:1412-1417.
- Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N., Alabouvette, C., 1997. Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. *Mycological Research* 101/02, 179-187.
- Fisher P.J and Petrini O., 1992. Fungal Saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytol.* 120: 137–143.
- Gasoni, L., Stegman, D., Gurfinkel., 1997. The endophyte *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton roots: phosphorus uptake and host growth. *Mycol. Res.* 101:867–870.
- Gaudet, J., Julien, J., Lafay, J. F., Brygoo, Y., 1989. "Phylogeny of Some *Fusarium* Species, as Determined by Large-Subunit rRNA Sequence Comparison." *Mic. Biol. Evol.* 6(3): 227-242.
- Gerlach, W., H, Nirenberg., 1982. The genus *Fusarium* — a pictorial atlas. Forstwirtschaft, Berlin – Dahlem, Hrsg. Vond. Biolog. Bundesanst. Für Landu.
- Gonzalez, I. L., Chambers, C., Gorski, J. L., Stambolian, D., Schmickel, R. D., Sylvester, J. E., 1990. "Sequence and structure correlation of human ribosomal transcribed spacers " *J. Molecular Biology* 212(1): 27-35.
- Hawksworth D.C., and Rossman A.Y., 1987. Where are the undescribed fungi? *Phytopathology* 87, 888–891.
- Hekimhan, H., Bağcı, S.A., Aktaş, H., Nicol, J., Aydoğdu, M., ve Akbudak, A., 2007. Bazı Fungistlerin Selçuklu-97 ve Seri-82 Buğdaylarının Verimleri ile Kök ve Kök boğazı Çürüklüğü Hastalık Şiddeti Üzerine Etkisi. *Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri*, sayfa: 321. 27-29 Ağustos 2007 ISPARTA.
- Hemalatha, S., Banu, N., 2010. DNA fingerprinting of *Bacillus cereus* from diverse sources by restriction fragment length polymorphism analysis. *Avd Biosci Biotechnol* 1:136-144.

- Hestbjerg, H., Nielsen, K. F., Thrane, U., Elmholt, S., (2002). "Production of Trichothecenes and Other Secondary Metabolites by *Fusarium culmorum* and *Fusarium equiseti* on Common Laboratory Media and a Soil Organic Matter Agar: An
- Jaroszuk-Scisel J., Kurek E., Winiarczyk K., Baturó A and Lukanowski A., 2008. Colonization of root tissues and protection against *Fusarium* wilt of rye (*secale cerealis*) by nonpathogenic rhizosphere strains of *Fusarium culmorum*. *Biological Control*. 45: 297-307.
- Jurado, M., Vazquez, C., Patino, B., Gonzalez-Jean, M.T., 2005. PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology* 28 (2005) 562–568.
- Khan, N.I., Schisler, D.A., Boehm, M.J., Slininger, P.J and Bothast, R.J., 2001. Selection and evaluation of microorganisms for biological control of *Fusarium* head blight of wheat incited by *Gibberella zeae*. *Plant Dis.* 85: 1253–1258.
- Kim, D.H., Martyn, R.D., Magill, C.W., 1992. Restriction fragment length polymorphism groups and physical map of mitochondrial DNA from *Fusarium oxysporum f. sp. niveum*. *Phytopathol.* 82: 346-353.
- Kim, D.H., Martyn, R.D., Magill, C.W., 1993. Chromosomal polymorphism in *Fusarium oxysporum f. sp. niveum*. *J Phytopathol* 83: 1209-1216.
- Kosiak, E.B., Holst-Jensen, A., Rundberget, T., Jean, M.T.G., Torp, M., 2005. Morphological, chemical and molecular differentiation of *Fusarium equiseti* isolated from Norwegian cereals. *International Journal of Food Microbiology* 99, 195-206.
- Larran S., Parello A., Simon M Moreno., 2002. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *World J. Of Microbiology and Biotechnology*.18: 683–686.
- Larran, S., Perello, A., Simon, M. R., Moreno, V., 2007. "The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.)." *World J Microbiol Biotechnol* 23: 565-572.
- Lee K., Pan J.J., May G., 2009. Endophytic *Fusarium verticillioides* reduces disease severity caused By *Ustilago maydis* on maize. *FEMS Microbiol Lett* 299 (2009) 31–37.
- Lee, S. B., Taylor, J. W., 1992. "Phylogeny of Five Fungus-like Protoctistan *Phytophthora* Species, Inferred from the Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA." *Molecular Biology and Evolution* 9(4): 636-653.
- Leslie, J. F., 1995. "*Gibberella fujikuroi* Available populations and variable traits." *Can. J. Botany* 73(S1): 282-291.
- Liorens, A., Hinojo, M.J., Mateo, R., Medina, A., Valle-Algarra, F.M., Gonzalez-Jaen, M.T., Jimenez, M., 2006. Variability and characterization of mycotoxin-

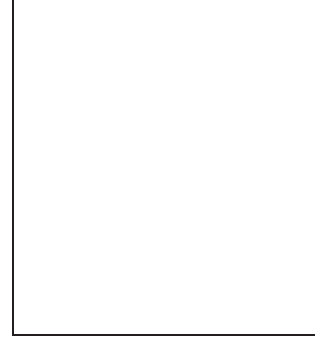
- producing *Fusarium* spp isolates by PCR-RFLP analysis of the IGS-rDNA region. *Antonie van Leeuwenhoek* 89:465-478.
- Lodge DJ., Fisher P. J. and Sutton BC., 1996. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico, *Mycologia*. 88: 733–738.
- Lu G., Cannon PF., Reid A., and Simmons CM. 2004. Diversity and molecular relationship of endophytic *Colletotrichum* isolates from Iwokrama forest reverse, Guyana. *Mycol. Res.* 108:53-63.
- Luongo L., Gali M., Corazza L., Meeke L., Lombaers C., Der Plas V and Köhl J., 2005. Potential of fungal antagonists for biocontrol of *Fusarium* spp. in wheat and maize through competition in crop debris. *Biocontrol Science and Technology*, 15(3): 229–242.
- Marin, P., Moretti, A., Ritieni, A., Jurado, M., Vazquez, C., Gonzalez-Jaen, M.T., 2012. Phylogenetic analyses and toxigenic profiles of *Fusarium equiseti* and *Fusarium acuminatum* isolated from cereals from Southern Europe. *Food Microbiology* 1-9.
- Marin, P., Moretti, A., Ritieni, A., Jurado, M., Vazquez, C., Gonzalez-Jaen, M.T., 2012. Phylogenetic analyses and toxigenic profiles of *Fusarium equiseti* and *Fusarium acuminatum* isolated from cereals from Southern Europe. *Food Microbiology* 1-9.
- McMullen, M., Jones, R., Gallenberg, D., 1997. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis.* 81: 1340-1348.
- Min, B.R. 1995. Comparison of electrophoretic karyotypes in *Fusarium*. *Kor. J. Microbiol* 33: 334-338.
- Mishra, P. K., Fox, R.T.V., Culham, A., 2003. "Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*." *FEMS Microbiology Letters* 218: 329-332.
- Nakamura H., S. Kaneko, Y. Yamaoka, and M. Kakishima., 1998. Differentiation of *Melampsora* rust species on willows in Japan using PCR-RFLP analysis of ITS regions of ribosomal DNA. *Mycoscience* 39,105-113.
- Nazar, R. N. H., X., Schmidt, J., Culham, D., Robb, J., 1991. "Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39(1): 1-11.
- Nelson, P. E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O., 1983. *Fusarium* Species- An Illustrated Manual for Identification. USA, The Pennsylvania State University Press.
- Niessen, M.L., 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.

- O'Donnell, K., 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92: 919-938.
- O'Donnell, K., Gray, L.E., 1995. Phylogenetic relationships of the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. *Mol. Plant Microbe Interact* 8: 709-716.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., (1997). "Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7(1): 103-116.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Casper, H.H., 1998. Molecular phylogenetic, morphological and mycotoxin data support re-identification of the quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum*. *Fungal Genet. Biol.* 23: 57-67.
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Gueidan, C., Crous, P. W., Geiser, D. M., (2009). "Novel Multilocus Sequence Typing Scheme Reveals High Genetic Diversity of Human Pathogenic Members of the *Fusarium incarnatum-F. equiseti* and *F. chlamydosporum* Species Complexes within the United States." *Journal of Clinical Microbiology* 47(12): 3851-3861.
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Geiser, D. M., Kistler, H. C., Aokid, T., 2004. "Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade." *Fungal Genetics and Biology* 41: 600-623.
- O'Donnell, K., 1992. "Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*)" *Current Genetics* 22(3): 213-224.
- Obanor, F., Erginbaş-Orakçı, G., Tunalı, B., Nicol, J., Chakraborty, S., 2010. "*Fusarium culmorum* is a single phylogenetic species based on multilocus sequence analysis." *Fungal Biology* 114: 753-765.
- Obledo EN., Baragan-Baragan LB., Gutierrez-Gonzales P., Ramirez-Hernandez BC., Ramirez JJ., Rodriguez-Garay B., 2003. Increased photosynthetic efficiency generated by fungal symbiosis in *Agave Victoria-reginae*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 74: 237-241.
- Parry, D. W., Jenkinson, P., McLeod, L., 1995. "*Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review." *Plant Pathology* 44: 207-238.
- Rodrigues A. A. C., Menezes M., 2006. Identification and Pathogenic Characterization of Endophytic *Fusarium* species from Cowpea Seeds. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, Recife, vol. 3, p.203-215.
- Romberg, H.C., 1994. *Cluster Analysis for Researchers*. Lifetime Learning Publications Belmont, California.
- Schultz B and Boyle C., 2005. The endophytic continuum. *Mycol. Res.* 109:661-686.

- Seymour FA., Cresswell JE., Fisher PJ., Lappin-Scott., Haag HM and Talbota NJ. 2004. The influence of genotypic variation on metabolite diversity in population of two endophytic fungal species. *Fungal Genetics and Biology*. 41: 721–734.
- Strobel G. A., and Daisy B., 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 491–502.
- Tejesvi M.V., Nalini M.S., Mahesh, B., Prakash, H.S., Kini, K.R., Shetty, H.S. and Subbiah, V., 2007, New hopes from endophytic fungal secondary metabolites, *Boletín de la Sociedad Química de México* 1(1):19–26.
- Tiryaki, O., Seçer, E., Temur, C., 2011. Yemlerde Mikotoksin Oluşumu, Toksikitepleri ve Mikotoksin Kalıntı Analizleri. *Anadolu, J. of AARI* 21 (1) 2011, 44 – 58.
- Tunalı B., Kansu B., 2012. Endophytic *Fusarium* species in wheat plants, *COST Action FA1103: Endophytes in biotechnology and agriculture*, Fondazione Edmund Mach, Italy, 14-16 November, 56-57.
- Tunalı, B., Nicol, J., Erol, F.Y., Altıparmak, G., 2006. Pathogenicity of Turkish crown and head scab isolates on stem bases on winter wheat under greenhouse conditions. *J. Plant Path.* 5 (2): 143–149.
- Tunali B and Kansu B., 2010. Pathogenicity study on endophytic *Fusarium* spp. from cultivated wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. 11<sup>th</sup> European *Fusarium* Seminar "Fusarium-Mycotoxins, Taxonomy and Host Resistance. 20-23 Sept. Radzikov, Poland. Plant Breeding and Acclimatization Institute. p. 335.
- Tunali B and Marshall D., 2000. Antagonistic effect of endophytic fungi against several root- rot pathogens of wheat. Seminar on Durum wheat Improvement in the Mediterranean Region: New challenges. *Options méditerranéennes: Serie A Numéro 40*: 381-386.
- URL-1:<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>, (Ziyaret tarihi: 20 Haziran 2014)
- URL-2:<http://www.tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=temelist>, (Ziyaret tarihi: 20 Haziran 2014).
- URL-3:<http://www.fao.org/ag/agp/AGPC/doc/Counprof/PDF%20files/Turkey.pdf> (Ziyaret tarihi: 10 Nisan 2014).
- Vaz B.M., Rubens C.M., Maria-Rosa B., Vieira M., Zani L.C., Rosa C., Rosa L., 2009. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with Orchidaceae in Brazil. *Can. J. Microbiol.* 55:1381-1391.
- Wiese, M.V., 1987. *Compendium of Wheat Disease*. 2nd ed. American Phytopathological Society, St. Paul MN. 53-55 pp.
- Young-Mi, L., Choi, Y., Min, B., 2000. PCR-RFLP and Sequence Analysis of the rDNA ITS Region in the *Fusarium* spp. *The Journal of Microbiology* 66-73.



## ÖZGEÇMİŞ



**Ad Soyad:** Ferhat KILINÇ

**Doğum Yeri ve Tarihi:** Tosya– 07.09.1987

**Adres:** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü

**E-Posta:** frht\_klnc@hotmail.com

**Lisans:** Ondokuz Mayıs Üniversitesi (2007-2011)

**Yüksek Lisans:** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (2011-...)