



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ



ANTEPFISTIĞI TÜRLERİNDE ALTERNARIA
YANIKLIK ETMENİ *Alternaria* spp.'NİN
POPÜLASYON GENETİK ANALİZLERİ
Ünal SEVİNÇ
Biyomühendislik Ve Malzeme Mühendisliği
Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ANTEPFISTIĞI TÜRLERİNDE ALTERNARIA
YANIKLIK ETMENİ *Alternaria* spp.'NİN
POPÜLASYON GENETİK ANALİZLERİ**

Ünal SEVİNÇ

Biyomühendislik Ve Malzeme Mühendisliği

Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 08/06/2016

Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. Hilal ÖZKILINÇ

ÇANAKKALE

Ünal SEVİNÇ tarafından Yrd. Doç. Dr. Hilal ÖZKILINÇ yönetiminde hazırlanan ve **08/06/2016** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Antepfıstığı Türlerinde Alternaria Yanıklık Etmeni *Alternaria spp.*'nin Popülasyon Genetik Analizleri**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Yrd. Doç. Dr. Hilal ÖZKILINÇ

Başkan

Doç. Dr. Hacer Handan ALTINOK

Üye

Yrd. Doç. Dr. Ergün ŞAKALAR

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu tez çalışması TÜBİTAK-TOVAG 1120554 numaralı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Ünal SEVİNÇ

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında, akademik bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren, motive edici yaklaşımı ve fikirleriyle bana destek veren değerli danışman hocam Sn. Yrd. Doç. Dr. Hilal ÖZKILINÇ'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam için seçilen izolatların teşhislerinin kontrollerinde ve verdiği fikirler doğrultusunda büyük bir katkı sağlayan ve de A.B.D. orijinli *Alternaria* spp. izolatları sağlayan Washington State University'den öğretim üyesi Assoc. Prof. Dr. Tobin L. PEEVER'a,

Derslerinde, sahip oldukları bilgi ve birikimlerini biz öğrencileriyle paylaşan Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ile Biyomühendislik Bölümü'ndeki saygıdeğer hocalarıma,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca, maddi anlamda desteğini gördüğüm ve maddi kaygı yaşamadan çalışmalarımı sürdürmeme olanak sağlayan TÜBİTAK kurumuna,

Tez çalışmam boyunca manevi desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Melike Kuluroğlu'na ve hayatımın her aşamasında bana güvenen, maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan kıymetli aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ünal SEVİNÇ
Çanakkale, Haziran 2016

SİMGELER VE KISALTMALAR

Alt_a_1	Alternaria major allergen a1
ark.	Arkadaşları
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDC	Conditionally Dispensable Chromosome
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribonukleotit trifosfat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EndoPG	Endopolygalacturonase
G	Geç dönem
gDNA	Genomik DNA
gdp	Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz)
H-3	Histon-3 bölgesi
HCl	Hidrojen klorür
Ht	Haplotip
MAT	Mating type (Eşey/eşleşme tipi)
MgCl ₂	Magnezyum klorür
mtLSU	Mitokondriyal large subunit (Mitokondriyal büyük alt-ünite)
mtSSU	Mitokondriyal small subunit (Mitokondriyal küçük alt-ünite)
NAOH	Sodyum hidroksit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCA	Potato-Carrot Agar (Patates Havuç Agar)
PCR	Polimerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PDA	Potato Dextrose Agar (Patates Dekstroz Agar)
PDB	Potato Dextrose Broth (Patates Dekstroz sıvı besiyeri)
pH	Power of Hydrogen (Hidrojenin gücü)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)
rDNA	Ribozomal DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Sınırlayıcı enzim parça uzunluk çeşitliliği)

SCAR	Sequence Characterized Amplified Region (Sekansı karakterize edilmiş çoğaltılmış bölgeler)
spp.	Species (türler)
TBE	Tris- Borik asit- EDTA
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
U.S.D.A	United State Department of Agriculture
vb.	Ve benzeri
Weak-PDA	Zayıflatılmış Patates Dekstroz Agar
dH ₂ O	Distile su
°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mM	Milimolar
bç	Baz çifti
dk	Dakika
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
ng	Nanogram
sn	Saniye
V	Volt
%	Yüzde

ÖZET

ANTEPFISTIĞI TÜRLERİNDE ALTERNARIA YANIKLIK ETMENİ *Alternaria* spp.'NİN POPÜLASYON GENETİK ANALİZLERİ

Ünal SEVİNÇ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hilal Özkılınç

08/06/2016, 62

Alternaria alternata ve *A. tenuissima*, *Alternaria* cinsi içerisinde alternata-tür grubunda yer alan ve geniş bir konukçu aralığına sahip fungal patojenlerdir. Bu patojenler, Antepfistiği ve yabani akrabalarını içeren *Pistacia* türlerinde “*Alternaria* yanıklık” hastalığına yol açmaktadır. Patojen popülasyonların genetik yapılarının bilinmesi, bitki hastalıklarıyla mücadele için oldukça önemlidir. Bu açıdan ülkemizde Antepfistiği ve yabani akrabalarında *Alternaria* yanıklık etmeni *Alternaria* spp. patojenlerinin Güneydoğu Anadolu ve Ege/Marmara Bölgeleri’ndeki popülasyonlarının genetik çeşitliliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda 4 farklı konukçuya (*Pistacia vera*, *P. terebinthus*, *P. lentiscus*, *P. atlantica*) ait 50 izolat seçilmiş, *OPA1.3* anonim DNA bölgesi ve protein kodlayan *Alternaria major allergen a1* (*Alt_a_1*), *endopolygalacturonase* (*EndoPG*), *histon-3* genlerine ait sekans verileri elde edilmiştir ve bu veriler üzerinden Neighbour-Joining ve Maksimum Parsimony ağaçları çıkarılmıştır. Yaygın klonal yapı ile beraber çeşitli dallanmalar görülmüş, ancak filogenetik açıdan kuvvetle ayrılan hatlar bulunmamıştır. Ayrıca aseksüel üreme yapısına rağmen *MAT1* lokusunda farklı eşey tiplerini temsil eden *Mat1.1* ve *Mat1.2* genlerinin 1:1 oranındaki dağılımı da bu popülasyonlardaki genetik çeşitliliğe işaret eden diğer bir kanıt olmuştur. Mevcut genetik çeşitlilik ile coğrafik lokasyon veya konukçu gibi patojen orijin kaynakları arasında ilişki görülmemiştir. Ayrıca, *EndoPG* üzerinde TaqI restriksiyon kesim bölgelerine göre *A. alternata/A. tenuissima* ve *Alternaria* Yanıklık hastalığıyla ilgili diğer bir yakın tür olan *A. arborescens*’in ayrılabilirdiği tespit edilmiştir. Bu çalışma, TÜBİTAK-TOVAG 112O554 projesi desteği ile gerçekleştirilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Alternaria*, Genetik varyasyon, Sekans analizi, Eşey tipi

ABSTRACT

POPULATION GENETIC ANALYSIS OF *Alternaria* spp. CAUSING ALTERNARIA BLIGHT IN *PISTACIA* SPECIES

Ünal SEVİNÇ

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Bioengineering and Materials Engineering Science

Advisor : Assist. Prof. Dr. Hilal ÖZKILINÇ

08/06/2016, 62

Alternaria alternata and *A. tenuissima*, within alternata-species group of *Alternaria* genus, are fungal pathogens showing a broad host-range. These pathogens cause “Alternaria blight” disease on *Pistacia* species including pistachio and its wild relatives. It is important to know about population genetic structures of pathogens to manage plant diseases. Thus, it is aimed to investigate population genetic variations of *Alternaria* spp. from pistachio and its wild relatives from Southeastern and Aegean/Marmara Regions of Turkey. Fifty isolates from four host species (*Pistacia vera*, *P. terebinthus*, *P. lentiscus*, *P. atlantica*) were sequenced for *OPA1.3* (an anonymous DNA region) and three protein-coding genes, *Alternaria major allergen a 1 (Alt_a_1)*, *endopolygalacturanase (EndoPG)*, *histon-3*, and Neighbour-Joining and Maksimum Parsimony trees were obtained based on sequence data. Besides dominantly clonal structure, some genetic clusters were visualized, but none of these branches were supported as a divergent phylogenetic lineage. In addition to that, even though asexuality, 1:1 ratio of *Mat1.1* and *Mat1.2* genes, which indicate different mating types at *Mat1* locus, is another evidence for genetic variability within populations. There was no relation about these genetic variabilities and pathogen origin sources such as geographic region or host species. Furthermore, it is found that *A. alternata/A. tenuissima* and *A. arborescens* which is another closely related species causing Alternaria blight could be distinguished based on a TaqI restriction site in the *EndoPG* region. This study was supported by TUBITAK-TOVAG 112O554 project.

Keywords: *Alternaria*, Genetic variation, Sequence analysis, Mating type

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1. Alternaria Yanıklığı.....	2
1.2. Antepfıstığı'nın Ekonomik Önemi.....	6
1.3. Popülasyon Genetik Analizlerinde Biyoinformatik Yaklaşımlar.....	8
1.4. Popülasyon Genetik Çalışmalarının Önemi	11
1.5. Çalışmanın Amacı	12
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	13
2.1. Antepfıstığı (<i>Pistacia vera</i>) ve Yabani Türlerinin Orijini, Yetiştiriciliği ve Ekonomik Önemi	13
2.2. Fungal Bitki Patojeni <i>Alternaria</i> spp.	14
2.2.1. Klasik Taksonomi.....	14
2.2.2. Moleküler Taksonomi ve Varyasyon	14
2.2.3. Genetik Çeşitlilik ve Üreme	17
2.3. Antepfıstığı'nda <i>Alternaria</i> Yanıklığı	18
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE METOT	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. <i>Alternaria</i> spp. İzolatları	19
3.1.2. Fungal Kültürlerin Gelişiminde Kullanılan Besi Ortamları	21
3.1.3. Moleküler Analizlerde Kullanılan Kimyasallar	21
3.1.4. İzolatların Gelişmesi ve Moleküler Analizlerde Kullanılan Cihazlar	22
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Fungal İzolatlar.....	23

3.2.1.1. İzolatların Saklanması.....	23
3.2.1.2. Besi ortamlarının Hazırlanması	23
3.2.1.3. DNA İzolasyonu İçin Kültürlerin Hazırlanması	23
3.2.1.4. Genomik DNA İzolasyonu	24
3.2.2. PCR Tabanlı Moleküler Tanı, Eşey Tipi Belirlenmesi ve Genetik/Filogenetik Çeşitlilik	25
3.2.2.1. <i>Alt_a_1</i> Gen Bölgesi	27
3.2.2.2. <i>EndoPG</i> Gen Bölgesi.....	27
3.2.2.3. <i>OPA1.3</i> Anonim DNA Bölgesi.....	28
3.2.2.4. <i>Histon-3 (H-3)</i> Gen Bölgesi.....	28
3.2.2.5. Eşey Tipi Belirlenmesi.....	29
3.2.3. Genetik/Filogenetik İlişkilerin Analizi.....	29
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	32
4.1. Araştırma Bulguları.....	32
4.1.1. Besi Ortamına Bağlı Fungal Gelişimin Gözlenmesi	32
4.1.2. Moleküler Verilerin Analizleri	34
4.1.2.1. <i>Alt_a_1</i> Bölgesi Varyasyonları.....	34
4.1.2.1.1. <i>Alt_a_1</i> Bölgesi İçin Maksimum Parsimony Analizi	34
4.1.2.2. <i>EndoPG</i> Bölgesi Varyasyonları.....	36
4.1.2.2.1. <i>EndoPG</i> Bölgesi İçin Maksimum Parsimony Analizi	37
4.1.2.3. <i>Histon-3</i> Bölgesi Varyasyonları.....	39
4.1.2.3.1. <i>Histon-3</i> Bölgesi İçin Maksimum Parsimony Analizi.....	39
4.1.2.4. <i>OPA1.3</i> Anonim DNA Bölgesi Varyasyonları	41
4.1.2.4.1. <i>OPA1.3</i> Anonim DNA Bölgesi ve Maksimum Parsimony Analizi.....	42
4.1.2.5. Sekanslanan Bölgelerin Multilokus Dizisi ve Neighbour-Joining Analizi.....	44
4.1.3. Eşey Tipi Analizleri.....	46
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	52
EKLERİ	I
Ek Çizelge 1. İzolatların temsil ettiği haplotip grupları ve <i>MAT1</i> lokusu skorları	II
Ek 2. <i>Alt_a_1</i> bölgesi haplotiplerin temsil ettiği gruplara ait sekans verileri	IV
Ek 3. <i>EndoPG</i> bölgesi haplotiplerin temsil ettiği gruplara ait sekans verileri	V
Ek 4. <i>Histon-3</i> bölgesi haplotiplerin temsil ettiği gruplara ait sekans verileri.....	VII
Ek 5. <i>OPA1.3</i> anonim DNA bölgesi haplotiplerin temsil ettiği gruplara ait sekans verileri	IX

Ek Çizelge 6. Elektroforez tampon çözeltisi 5X TBE (1lt) pH: 8.00	XIII
Ek Çizelge 7. Na-EDTA solüsyonu (1lt-0,5M)	XIII
Ek Çizelge 8. Manuel DNA izolasyonunda kullanılan liziz tampon çözeltisi içeriği.....	XIII
ÖZGEÇMİŞ	XIV



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. PDA besi ortamında Antepfıstığı'ndan izole edilmiş <i>Alternaria</i> spp. izolatlarına ait genel morfolojik yapı ve spor görüntüleri.....	3
Şekil 1.2. Antepfıstığı yaprak ve meyvelerinde <i>Alternaria</i> Yanıklığı semptomları.....	6
Şekil 1.3. Antepfıstığı üretimi Türkiye dağılımı.....	8
Şekil.1.4. Temsili filogeni ağaç çizimi ve kısımları.....	9
Şekil 3.1. Antepfıstığı'nda <i>Alternaria</i> yanıklık etmeni <i>Alternaria</i> spp. izolatlarının PDA ortamındaki kültür görüntüleri	24
Şekil 3.2. <i>Alt_a_1</i> bölgesinin PCR sonucu elde edilen ürünlerin elektroforez sonucu	27
Şekil 3.3. <i>EndoPG</i> bölgesinin PCR sonucu elde edilen ürünlerin elektroforez sonucu	27
Şekil 3.4. <i>OPAI.3</i> anonim DNA bölgesinin PCR sonucu elde edilen ürünlerin elektroforez sonucu.....	28
Şekil 3.5. <i>Histon-3</i> bölgesinin PCR sonucu elde edilen ürünlerin elektroforez sonucu.....	29
Şekil 3.6. Eşey tipi bölgelerinin PCR sonucu elde edilen ürünlerin elektroforez sonucu ...	29
Şekil 4.1. <i>A. alternata</i> zayıflatılmış (weak)-PDA kültür morfolojisi	32
Şekil 4.2. <i>A. alternata</i> PCA besi ortamında kültür morfolojisi ve ışık mikroskobu ile çekilmiş spor görüntüleri.....	33
Şekil 4.3. <i>Alt_a_1</i> gen bölgesi için Maksimum Parsimony analizi sonucu elde edilen filogram	35
Şekil 4.4. <i>EndoPG</i> bölgesinin TaqI enzimi ile kesim yapılarak görüntülenen elektroforez jel görüntüsü.....	37
Şekil 4.5. <i>EndoPG</i> gen bölgesi için Maksimum Parsimony analizi sonucu elde edilen filogram	38
Şekil 4.6. <i>Histon-3</i> gen bölgesi için Maksimum Parsimony analizi sonucu elde edilen filogram	40
Şekil 4.7. <i>OPAI.3</i> anonim DNA bölgesinin ApaI enzimi ile kesim yapılarak görüntülenen elektroforez jel görüntüsü.....	41
Şekil 4.8. <i>OPAI.3</i> anonim DNA bölgesi için Maksimum Parsimony analizi sonucu elde edilen filogram	43
Şekil 4.9. Multilokus verileri ile Neighbour-Joining analizi sonucu elde edilen dendogram	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1. <i>P. vera</i> L. de Alternaria Yanıklığı'na neden olan türler.....	2
Çizelge 1.2. Antepfıstığı yıllara göre Dünya geneli üretim miktarları	7
Çizelge 3.1. TÜBİTAK-TOVAG 112O554 numaralı proje kapsamında örneklenmiş koleksiyondan tez çalışması için seçilen izolatlara ait bilgiler.....	19
Çizelge 3.1. (Devamı) TÜBİTAK-TOVAG 112O554 numaralı proje kapsamında örneklenmiş, tez çalışması için seçilen izolatlara ait bilgiler	20
Çizelge 3.2. Tez çalışması için seçilen A.B.D orjinli izolatlara ait bilgiler.....	21
Çizelge 3.3. Antepfıstığı (<i>Pistacia vera</i> L.) ve yabancı türlerinde Alternaria yanıklık etmeni <i>Alternaria</i> spp. türünün moleküler varyasyonlarını saptamak için kullanılan filogenetik bölgeler ve primer setleri	26
Çizelge 4.1. Antepfıstığı (<i>Pistacia vera</i> L.) ve yabancı türlerinde Alternaria yanıklık etmeni <i>Alternaria</i> spp. türüne ait izolatların tür, bölge ve konukçu bazında gösterilen eşey tipi dağılımları	46
Çizelge 4.2. Yurt dışından gelen izolatlara ait eşey tipi sonuçları.....	47

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Alternaria cinsi içerisinde küçük sporlu *alternata* tür grubunun en yaygın temsilcileri *A. alternata*, *A. tenuissima* ve *A. arborescens*'tir. Özellikle *A. alternata* pek çok çevresel ortamda ve havada yaygın olarak bulunabilen (Hjelmroos, 1993; Armitage ve Andrew, 2013) saprofit, endofit ve patojen olarak görülebilen bir türdür (Rotem, 1994). Hemen hemen her ortamdan izole edilebilen ve hatta atmosferden toplanan toz örneklerinde sıklıkla rastlanan *Alternaria* spp. sporları, bu fungal grubun yaygınlığını göstermektedir (Armitage ve Andrew, 2013).

A. alternata ve *A. tenuissima*, taksonomik açıdan *Ascomycetes* sınıfı içerisindeki *Alternaria* cins grubunda yer almaktadır. Kirk ve ark. (2008) tarafından Dictionary of Fungi kitabının 10. baskısında taksonomik sınıflandırılması yapılmıştır. Cins içerisindeki gruplandırmaların sistematiği ise özellikle moleküler verilerin ışığı altında sürekli güncellenmektedir (Lawrence, 2016).

“Dictionary of Fungi” kitabından alınan sınıflandırmaya göre *A. alternata* patojenin sınıflandırılması şu şekildedir:

Alem (Kingdom)	: <i>Fungi</i>
Alt alem (Subkingdom)	: <i>Dikarya</i>
Şube (Division)	: <i>Ascomycota</i>
Alt şube (Subdv)	: <i>Pezizomycotina</i>
Sınıf (Class)	: <i>Dothideomycetes</i>
Altsınıf (Subclass)	: <i>Pleosporomycetidae</i>
Takım (Order)	: <i>Pleosporales</i> - Luttrell ex M.E. Barr, 1987
Aile (Family)	: <i>Pleosporaceae</i> - Nitschke, 1869
Cins (Genus)	: <i>Alternaria</i> - Nees Von Esenb. Ex Fries
Tür (Species)	: <i>Alternaria alternata</i> - (Fries) Keissler

Alternaria cinsi, aseksüel üreyen türleri içermekte olup seksüel formları *Lewia* cinsi içinde yer almaktadır. *A. alternata* gibi aseksüel olduğu bilinen türlerin de seksüel üreme için gerekli olan *MAT1* lokusunu taşıdığı bilinmektedir (Arie ve ark., 2000). *Alternaria* spp., bu lokusta *MAT1.1* veya *MAT1.2* idiomorf dizilimlerinden birini barındırdığı ve eşeyli

üreme için bu iki farklı eşey tipine ihtiyaç duyduğu için heterotallik funguslar arasına girmektedir (Turgeon ve Yoder, 2000).

Pek çok ürün bitkisi için ciddi patojen olan küçük sporlu alternata-tür grubunda yer alan yaygın *Alternaria* spp. türleri ve en bilinen konukçuları Çizelge 1.1.'de sıralanmıştır.

Çizelge 1.1. *P. vera* L.' de *Alternaria* Yanıklığı'na neden olan türler

Tür	Konukçu Tür Sayısı*	Bazı Konukçulara ait Familya grupları
<i>A. alternata</i> (Fr.: Fr.) Keissler	1009	<i>Anacardiaceae</i> (Sakızağacıgiller)
		<i>Alliaceae</i> (Soğangiller)
		<i>Citreae</i> (Turunçgiller)
		<i>Compositae</i> (Papatyagiller)
<i>A. tenuissima</i> (Nee & T. Ness: Fr.) Wiltshire	14	<i>Cruciferae</i> (Turpgiller)
		<i>Cucubitateae</i> (Kabakgiller)
		<i>Fabaceae</i> (Baklagiller)
<i>A. arborescens</i> Simmons	14	<i>Roseaceae</i> (Gülgiller)
		<i>Solanaceae</i> (Patlıcangiller)

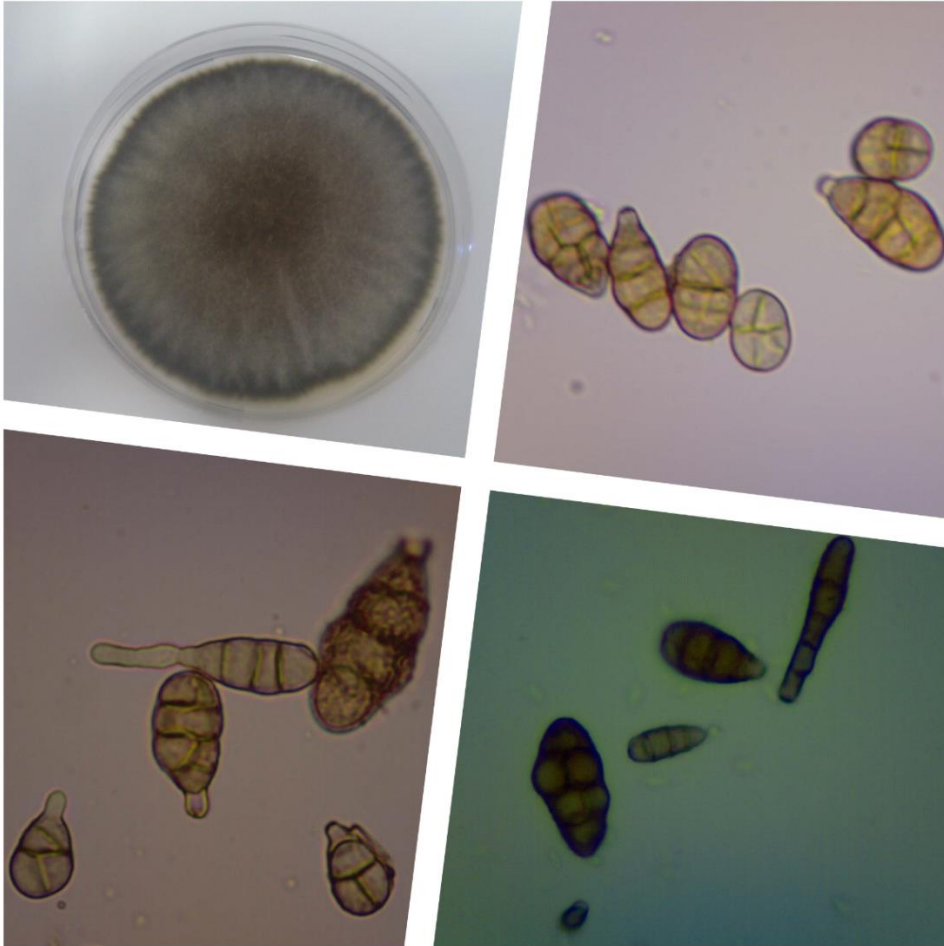
* Bitki patojeni olarak rol oynayan *Alternaria* spp. türlerinin, Amerika Birleşik Devletleri Tarım Departmanı'nın verilerine göre dünya çapında konukçu dağılımı bilgisini içermektedir (U.S.D.A. Agricultural Research Servise, Mayıs 2016).

Patojenin konukçu aralığı meyve, sebze ve süs bitkilerini de içerdiğinden, ekonomik açıdan önemli kayıplara yol açmaktadır. Ticaret, bitkilerle birlikte patojenlerin de taşınması, yanlış tarım uygulamaları gibi insan kaynaklı faktörler ya da çevresel değişimler yeni bitki hastalıklarının ortaya çıkmasına ve türlerin farklı konukçularda lokalize olmasına neden olabilmektedir (Anderson ve ark., 2004).

1.1. *Alternaria* Yanıklığı

Antepfıstığı olarak bilinen *Pistacia vera* L.' de fungal bir hastalık olan *Alternaria* Yanıklığı'nın, ciddi zararlara yol açtığı, üretim ve kaliteyi etkileyen önemli bir sorun olduğu

bilinmektedir (Aradhya ve ark., 2001; Pryor ve Michailidies, 2002). Bu hastalığa, A.B.D.'den toplanan örneklerde *A. alternata*, *A. tenuissima* ve *A. arborescens* türlerinin (Şekil 1.1.) neden olduğu gösterilmiştir (Pryor ve Michailidies, 2002; Michailidies ve ark., 2005). Ülkemizde bu fungal hastalık, bir sorun olarak yakın zamanda tespit edilmiştir (Konukoğlu ve ark., 2012; Özkılınç ve ark., TÜBİTAK-TOVAG 112O554 numaralı proje). Bu fungal bitki patojeni, Antepfıstığı ağaçlarında meyve, meyve salkımları ve yapraklarda kahverengi zararlanmalara yol açmaktadır (Pryor ve Michailides, 2002). Hastalık, Türkiye'de ağırlıklı olarak meyvelerde görülmektedir (Özkılınç ve ark., TÜBİTAK-TOVAG 112O554 numaralı proje). Meyvelerde perikarp (kırmızı kabuk) ve sert kabuğun enfeksiyonu, ürünün işlenmesinde kaliteyi düşürmektedir. *Alternaria* fungal etmeninin ilk inokulum kaynaklarının, bir önceki dönemden kalan sürgün kabuklarının, kurumuş meyve ve yapraklarının olduğu düşünülmektedir (Michailides, 2003). Meyvelerde gelişen enfeksiyonların şiddetine bağlı olarak meyve kalitesi olumsuz yönde etkilenmektedir.



Şekil 1.1. PDA besi ortamında Antepfıstığı'ndan izole edilmiş *Alternaria* spp. izolatlarına ait genel morfolojik yapı ve spor görüntüleri

Antepfıstığı ağaçlarında fungal patojenlerin neden olduğu hastalıkların artmasıyla Türkiye Cumhuriyeti Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından düzenlenen değerlendirme toplantılarında, hastalıkla ilgili fitopatolojik nedenler tartışılmış ve proje raporlarında hastalık etmeninin fungal bitki patojeni *Alternaria* cinsine ait türlerin neden olduğu ön sonuç olarak ortaya çıkmıştır (Konukoğlu ve ark., 2012). Fungal etmenlerin tespiti için yapılan patojenisite çalışmalarının sonucunda Antepfıstığı ağaçlarında hastalığa neden olan türün, *Alternaria* spp. olduğu tespit edilmiştir. Küçük sporlu *Alternaria* spp.'ye ait morfolojik tür teşhisleri, spor yapılarının değişen çevresel faktörlerden ve besi ortamlarından etkilenmesi, tür içinde çakışan morfolojik karakterler nedeniyle zor olmaktadır (Pryor ve Michailides, 2002; Tymon ve ark., 2015; Lawrence ve ark., 2016). Moleküler tür teşhisleri, morfolojik olarak ayrılmaları zor olan bu *Alternaria* türlerinin saptanmasında daha güvenilir sonuçlar sağlamaktadır. *Alternaria* cinsi içerisinde alternata-tür grubu için geliştirilmiş birçok DNA gen bölgelerini kodlayan markırlar, bu amaçla kullanılmaktadır (Pryor ve ark., 2010-2013, NSF-DEB 0918668 projesi; Lawrence ve ark., 2013; Tymon ve ark., 2015). 2013-2016 yıllarında yürütülmüş olan TÜBİTAK projesi kapsamında ise bu etmenlerin yaygın olarak *A. alternata* ve *A. tenuissima* olduğu, *A. arborescens*'in de aynı hastalık etmeni olduğu fakat çok daha az rastlandığı tespit edilmiştir (Özkılınç ve ark., TÜBİTAK-TOVAG 112O554 numaralı proje).

Antepfıstığı'nda *Alternaria* Yanıklık hastalığı etmeni *A. alternata* ve *A. tenuissima* patojenleri iki farklı morfolojik tür olarak tanımlanmıştır (Simmons ve ark., 1997). Fakat bu iki patojen morfolojik açıdan oldukça benzer olup genetik ve filogenetik açıdan tek bir türü temsil ettikleri tespit edilmiştir (Özkılınç ve ark., TÜBİTAK-TOVAG 112O554 numaralı proje).

Alternaria Yanıklığı, bu önemli ürün bitkisi için ciddi fungal problemlerden biridir. Hastalığın ortaya çıkış şekli, fungal bitki patojenine ait spor ya da miselyum gelişimiyle birlikte meyve ve yapraklarda ortaya çıkan siyah lekelenmeler olarak görülmektedir (Michailides, 1994; Michailides, 2002). Bu siyah ya da kahverengi lekeler etrafında oluşan klorotik halkalar ile çevrili nekrotik lezyonlar, Antepfıstığı *Alternaria* Yanıklığı için karakterizedir (Michailides, 1994; Michailides, 2002). Küçük klorotik halka ile çevrili lezyonlar, birleşerek tüm yaprak ve meyveyi kaplamaktadır (Michailides, 1994; Michailides, 2002). Yapraklarda gözlenen bu durum, Antepfıstığı ağaçlarının yaprak dökmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu durum, daha ziyade A.B.D.'den rapor edilmektedir (Michailides, 1994; Michailides, 2002). Meyvelerde lezyonlar, kırmızı bir halka ile çevrilmektedir (Michailides, 1994; Michailides, 2002). Hastalık ilerledikçe bu nekroz yapıları birleşip

genişleyerek, meyve kabuğuna penetre halinde kabuğun boyanmasına yol açmaktadır (Michailides, 2005). Meyve endokarpının etkilenmesi, erken ıtlamaya da yol açarak çekirdeğin enfekte olmasına neden olmaktadır (Michailides, 2005). Antepfıstığı ekirdeğinin enfekte olması, meyve kalitesinin azalmasına sebep olmaktadır (Michailides, 2005; Doster ve Michailides, 1999). Patojenin meyve ve yaprakta oluşturduğu semptomlar, Şekil 1.2.'de gösterilmiştir. Fırsatçı bitki patojeni *Alternaria* spp. türlerinin, böcekler ya da mekanik yaralanmalar ile oluşan açıklıklardan bitki içerisine girerek enfeksiyonlara yol açtıkları bildirilmiştir (Hong ve Pryor, 2004; Ferguson ve ark., 2005). Kuvvetli rüzgarların da genç ağaçlara zarar verdiği ve bu Şekilde fırsatçı patojenlerin girişini kolaylaştırdığı bilinmektedir (Hong ve Pryor, 2004; Ferguson ve ark., 2005). Yağış, nem ve sıcaklık gibi çevresel faktörler, fungal patojenin kolonizasyonunu etkilemektedir (Ferguson ve ark., 2005). Örneğin; yeterli yaz sıcaklarının yaşanmadığı 800 m'nin üstündeki yüksekliklerde bitkilerin, yaprak ve meyve enfeksiyonlarına karşı hassas olduğu bildirilmiştir (Ferguson ve ark., 2005). *A. alternata*'nın bazı konukçularında spesifik toksin ürettiği ve bu Şekilde zararlanmalara yol açtığı bilinmektedir (Scott, 2001). Patojenisite ve toksin retimiyile ilgili genlerin çoğunlukla CDC (conditionally dispensable chromosome) kromozomları üzerinde yer aldığı bilinmektedir (Akamatsu, 1999; Johnson ve ark., 2001) ve bu kromozomların veya ilgili genlerin türler ya da yakın popülasyonlar arasında horizontal olarak transfer edilebildiği kanıtlanmıştır (Akamatsu ve ark., 2001; Hatta ve ark., 2002; Akamatsu, 1999). Böylelikle izolatlar/türler arasında yeni patojenik özelliklerin kazanılabildiği ortaya çıkmıştır. CDC kümelerinde bir çok konukçu spesifik toksinlere ait gen kümeleri lokalize haldedir. Bu konukçu spesifik toksin genlerinin, bitki patojeni funguslarda ekspresyonu sonucunda mikotoksin biyosentezinin gerçekleştiği, yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Akamatsu, 2001). Ancak, henüz Antepfıstığı patojeni *Alternaria* spp. için patojenisitenin genetik temeli veya toksin üretimi hakkında mevcut bilgi bulunmamaktadır.



Şekil 1.2. Antepfıstığı yaprak ve meyvelerinde Alternaria Yanıklığı semptomları

1.2. Antepfıstığı'nın Ekonomik Önemi

Antepfıstığı, Türkiye ve Dünya'da kültürü ve yetiştiriciliği yapılmakta olan ticari değere sahip bir bitki türüdür. Antepfıstığı üretimi verilerine göre ülkemiz, İran ve Amerika Birleşik Devletleri'nden sonra üçüncü sırada bulunmaktadır (FAOSTAT, 2014). Antepfıstığı üretiminin %83'ü, İran başta olmak üzere, Amerika ve Türkiye'de yapılmaktadır. Bu ülkeleri Çin ve Suriye takip etmektedir (FAOSTAT, 2014). Antepfıstığı'nın yıllara göre üretim verileri, Çizelge 1.2.'de gösterilmiştir.

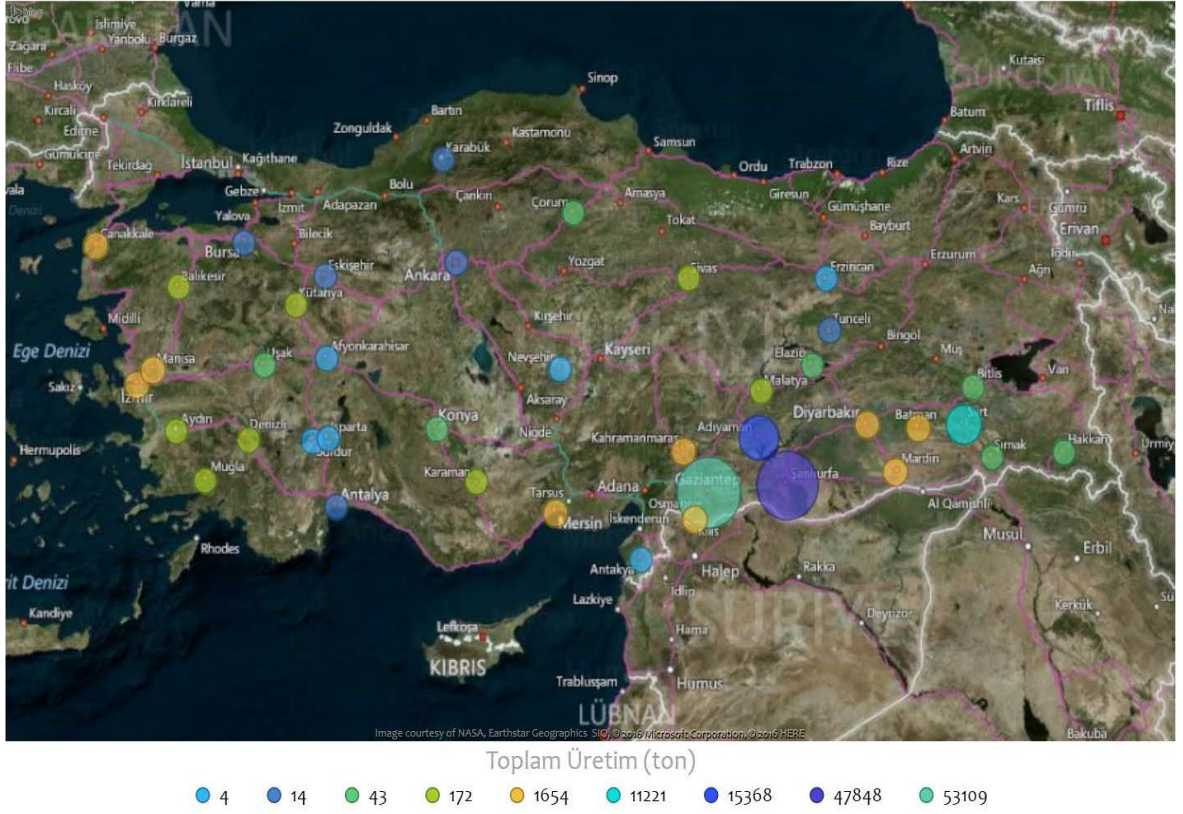
Çizelge 1.2. Antepfıstığı yıllara göre Dünya geneli üretim miktarları

ÜLKE	2011 yılı Antepfıstığı Üretim Miktarı (1000ton)	2012 yılı Antepfıstığı Üretim Miktarı (1000ton)	2013 yılı Antepfıstığı Üretim Miktarı (1000ton)
İran	472,097	472,097	478,6
Amerika	201,395	249,93	196,93
Türkiye	112	150	88,6
Çin	74	72	74
Suriye	55,61	57,195	54,516
Diğer ülkeler	22,415	22,927	27,275
Toplam	937,517	1024,15	916,921

Türkiye dünya Antepfıstığı üretiminde, 2011 yılında 112 bin ton ile %12; 2012 yılında, 150 bin ton ile %14,6'ya kadar yükselmiştir. 2013 yılında, üretimde büyük ölçüde düşüş yaşanarak üretim payı 88,6 ton ile %9,6'a gerilemiştir (FAOSTAT, 2014).

Antepfıstığı, ülkemizde ihracat ürünü olarak işlem görmektedir. Yıllara göre ihracat oranlarına bakıldığında, dalgalanmalar görülmekle birlikte, ihracat oranımızın oldukça düşük olduğu gözlemlenmektedir. İhracat miktarları, 2011 yılında 1.160 ton; 2012 yılında, 2.328 ton; 2013 yılında 3.948 ton olarak belirtilmiştir (FAOSTAT, 2014).

Ülkemizde Antepfıstığı üretimi ağırlıklı olarak Güneydoğu Anadolu Bölgesi olmak üzere birçok bölgede yapılmaktadır. Gaziantep ve Şanlıurfa illeri başta olmak üzere Adıyaman ve Siirt illeriyle birlikte bu bölge, Türkiye Antepfıstığı üretiminin %88,5'ini karşılamaktadır (TUİK, 2015). Şehirlere göre üretim miktarları Şekil 1.3.'de gösterilmektedir. Güneydoğu Anadolu Bölgesinde uzun yıllardır Antepfıstığı üretimi yapılmakta olup, üretiminin ana merkezidir. Ege ve Marmara Bölgeleri de yabancı türlerin bolluğu açısından önemlidir. Ülkemizde bu bölgede *Pistacia* spp. türüne ait yabancı türler *P. terebinthus* (menengiç), *P. lentiscus* (sakız ağacı), *P. atlantica* (Atlantik sakızı) türleri doğal yayılım göstermektedir.

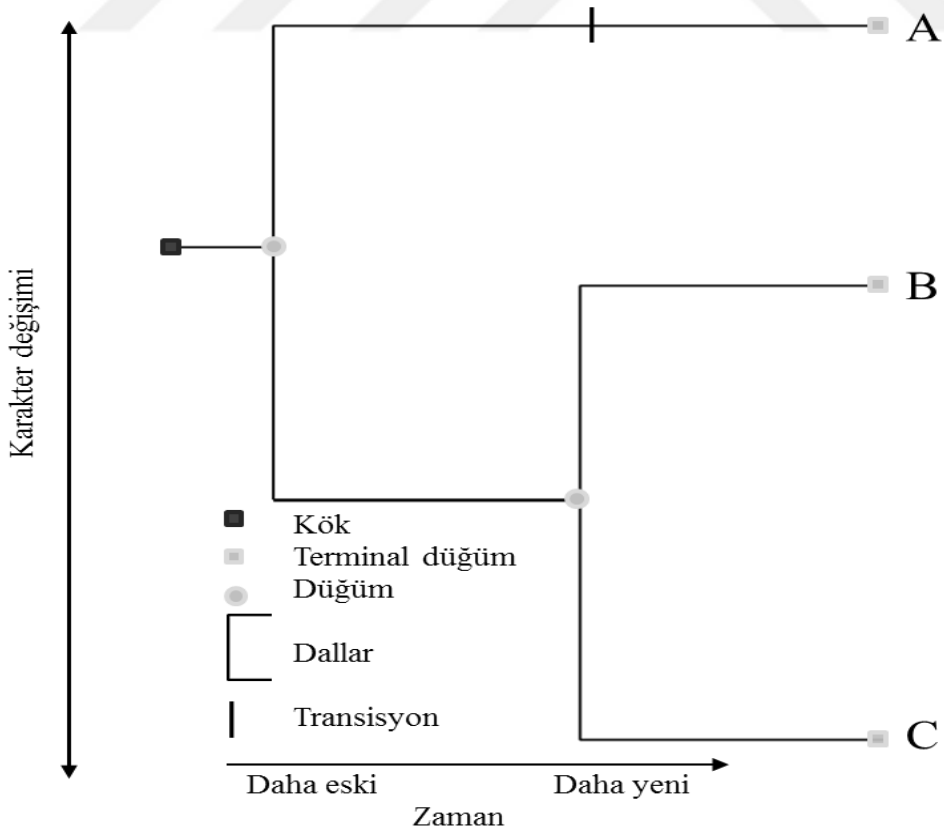


Şekil 1.3. Antepfıstığı üretimi Türkiye dağılımı (TUİK 2015) (Daire büyüklükleri oransal olarak ortalamalara göre alınmıştır.)

1.3. Popülasyon Genetik Analizlerinde Biyoinformatik Yaklaşımlar

Biyoinformatik kavramının konusu, mevcut biyolojik makromoleküllere ait verilerin bilgisayarlı uygulamalar kullanarak hesaplanmasını ve gözden geçirilmesini kapsamaktadır (Luscombe ve ark., 2001). Moleküler filogeni çalışmalarında ise, popülasyonlarda tür içi ve türler arası evrimsel geçmiş ve bu veriler ışığında filogenetik ilişkiler çeşitli biyoinformatik analizler ile ortaya çıkarılmaktadır. Bu yöntemler filogenetik ağaç gruplarını oluşturarak organizmaların oluşturduğu taksonların evrimsel ilişkilerini göstermektedir. Geçmişte filogenetik gruplar, organizmaların morfolojik yapıları kullanılarak oluşturulurken, günümüzde organizmalara ait moleküler verilerin biyoinformatik yöntemler kullanılarak değerlendirilmesi ile filogenetik ilişkiler ortaya çıkarılmaktadır. Evrimsel ağaçlar, diğer adıyla filogenetik ağaçlar, bir atasal soydan gelen farklılık ve evrimsel değişimin hikayesini gösteren bir şemadır (Herron ve Freeman, 2014). Ağaçları oluşturan ana veriler, nükleotid ya da amino asit dizileridir. Dizelerdeki farklılıklar ağaçlarda farklı dallar ya da kümeler oluşturmaktadır. Bu olay, ağaçlarda dallanma tiplerini ve ağaç türüne bağlı olarak zamanını tanımlamaktadır. Filogenetik ağaçlar belli başlı kısımlardan oluşturmaktadır (Şekil 1.4.).

Bazı ağaçlarda ortak bir atayı temsil eden kök (root) bulunurken, bazılarında kök bulunmamaktadır. Köklendirme işlemleri yapılırken çoğunlukla bir dış-grup (outgroup) kullanılmaktadır. Dış-grup analizi, ortak bir ataya sahip olan iç-grupların (ingroup) bu uzak ataya göre durumlarını belirtmek için alınmaktadır (Maddison ve ark., 1984). Dış-gruplar sadece köksüz bir ağaca kök eklemek için değil, iç grupların çözülmesi için de kullanılmaktadır (Maddison ve ark., 1984). Bu ağaçlarda türler arası ilişkiler gösterilmektedir. Ağaçlar üzerinde düğümler (nodes) ve dallar (branch) bulunmaktadır. Düğümler, popülasyonların ya da türlerin ayrılma noktasını göstermektedir. Ağaçlardaki dallar atasal popülasyonların zaman içindeki durumlarını işaret etmektedir. Her düğüm, evrimsel süreçte ayrılan taksonomik bir grubu göstermektedir. Ağaçlar oluşturulurken transisyon ya da transversiyon değişimleri de göz önüne alınmaktadır. Transisyon, pirimidin bazının diğer pirimidine ya da pürin bazının diğer pürin bazına dönüşmesine neden olan gen mutasyonuna verilen isimdir. Transversiyon ise pirimidin bazının pürin bazına ya da tam tersinin gerçekleştiği mutasyon tipidir. Yakın taksonomik türler ağaçlarda birbirine yakın dallanmalarda yer alarak bir kümelenme) topoloji sergilemektedir (Herron ve Freeman, 2014).



Şekil.1.4. Temsili filogeni ağaç çizimi ve kısımları

Filogeni ağaçları oluşturulurken çeşitli metodlar kullanılmıştır. Yöntemdeki farklılık ağaç topolojilerini de değiştirebilmektedir. Bu yöntemlerden bir tanesi, yakınlık-uzaklık temelli Neighbour-Joining analizidir. En büyük avantajı hızlı olması ve büyük veri setlerini analiz edebilmesidir. Dizi hizalaması ile elde edilen verilere ait evrimsel farklılıkların hesaplanmasına dayanmaktadır. Bu hesaplama farklı olan karakterin bir uzaklık değerine dönüştürülmesiyle yapılmaktadır (Swofford ve ark., 1996). Mesafe matris yöntemi içerisinde yer alan Neighbour-Joining analizinde uzaklık-yakınlığa dayalı bir matris tablosu oluşturulur. Bu tablo, ağaç programlarında işlenerek ağaç topolojisini ortaya çıkarmaktadır (Saitou ve Nei 1987). Diziler arasında genetik farklılığı en az olanlar birbirine yakın kalarak komşu olmaktadır. Neighbour-Joining analizi sonucunda tek bir ağaç oluşmaktadır. Diğer bir yöntem, karakter temelli Maksimum Parsimony analizidir. Karakter temelli yöntemler, dizilerdeki mutasyonlara bağlı olarak evrimsel çıkarım yapmaya dayanmaktadır (Herron ve Freeman, 2014). Tutumluluk anlamına gelen parsimony, dizilerdeki en az karakter değişimi ile benzerliği ortaya çıkarmaktadır (Herron ve Freeman, 2014). Maksimum Parsimony ağaçları takson ya da seçilen gruptaki en az evrimsel değişikliği karşılaştırmaktadır. Dizilerdeki tüm karakterler için en az karakter değişimini sunmaktadır (Herron ve Freeman, 2014).

Filogenetik ağaçlarda oluşan kümelerin güvenilirlikleri, bootstrap değerleri ile ölçülmektedir. Bu ölçme işlemi orijinal veriler üzerinden bootstrap replikatları çıkartılarak gerçekleştirilmektedir (Herron ve Freeman, 2014). Kümelenmelerin bu replikatlarda ne kadar desteklendiği hesaplanarak ana ağaç üzerinde bootstrap değeri gösterilmektedir. Kümelerin ortaya çıkma olasılığı “%” ifadesi ile gösterilmektedir (Herron ve Freeman, 2014). Bootstrap analizinde bir dal ne kadar çok açığa çıkarsa güvenirliliği o derecede artmaktadır. Bir kümenin ortaya çıkma ihtimali ne kadar yüksekse yüzde değeri de o kadar yüksek olmaktadır. Bootstrap değeri ne kadar düşükse kümenin güvenirliliği o kadar az demektir. Ana ağaçta ayrı dal ile ifade edilen kümelerin bootstrap değerleri düşük olursa o dallar tek bir küme olarak düşünülmemektedir (Freeman ve Herron, 1999).

Filogenetik ağaçlar, çeşitli biyolojik türler arasındaki evrimsel ilişkinin iki boyutlu temsilidir. Türler ya da gruplara ait dizeler, bu kümelerin orijinlerine ait görsel bir araç sağlamaktadır. Filogenetik dallanma diyagramları dendrogram, filogram ve kladogram olmak üzere üç şekilde gösterilmektedir. Dendrogram, filogenetik ağacın herhangi bir gösterimi için geniş bir terimdir. Kladogram kladistik yani atasal geçmişe dayandırılarak oluşturulmuş, organizmalar arasındaki ilişkileri dallanmalarla gösteren bir ağaçtır.

Filogenetik ağaçlar ise dal uzunlukları hesaplanarak oluşturulan karakter değişim miktarlarını gösteren ağaçlardır (Roy ve ark., 2014).

1.4. Popülasyon Genetik Çalışmalarının Önemi

Popülasyon genetik çalışmalarının odağı, evrimsel sürecin nasıl şekillendiğini ve genetik varyasyonların korunmasını anlamaya çalışmaktır (Milgroom ve Peever, 2003). Popülasyonun genotip ya da allel frekansındaki değişimler, evrimsel değişimleri ortaya çıkarmaktadır. Buna rağmen popülasyon genetiği hakkındaki tanımlamalar, gizli bir evrimin hızlı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Buna bağlı olarak farklı direnç düzeylerine sahip konukçu bitki çeşitlerinde direnç kırılmasına neden olan virulent patojen grupların gelişimini veya fungusit uygulamalarına karşı fungusit direncinin artması, bitki patolojisinde popülasyon genetik sorunlarına örnektir. Evrimsel süreçte doğal veya yapay seleksiyon, patojen popülasyonlarda farklı ırklar ya da fungusit dirençli fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Bu gibi durumlarda, konukçu-patojen arasındaki ilişkilerin seyri değişmekte ve fungal hastalıklarla mücadele yöntemini değiştirmeyi gerektirmektedir (Milgroom ve Peever, 2003). Patojen popülasyon yapılarının bilinmesi, mevcut mutasyonların ortaya çıkarılması ve anlamlandırılması; popülasyon genetik yapılarındaki farklılıkların ve değişimlerin konukçusu ile ilişkilerini nasıl etkilediğinin değerlendirilmesi, başarılı kontrol stratejileri için önemlidir. Diğer taraftan doğrudan bir patojenik karakteri etkilemese de patojen popülasyonlar içinde farklı genetik/filogenetik hatları ortaya çıkaran mutasyonlar, zaman içinde patojen popülasyonlar içindeki çeşitlenmenin habercisi olup bu çeşitlenme, farklı biyolojik senaryoları değerlendirmek açısından (örneğin yeni bir tür veya patojen göçlerinin takibi gibi) önemlidir.

1.5. Çalışmanın Amacı

Ülkemizde hem Antepfıstığı (*P. vera* L.) hem de yabani akrabalarında (*Pistacia* spp.) *Alternaria* yanıklık etmeni *Alternaria* spp. popülasyonlarında aseksüel üreme yapısından dolayı patojenin klonal bir yapı sergilemesi muhtemeldir. Bununla beraber pek çok diğer ürün bitkisinde patojen *A. alternata* türleri için genetik varyasyonların bulunduğu gösterilmiştir (Andrew ve ark., 2009; Rotondo ve ark., 2012; Start ve ark., 2014). Böylece *Pistacia* türlerinde yanıklık etmeni patojenin ülkemizin güneydoğu ve batı kesimlerindeki farklı konukçulardan örneklemiş popülasyonlarındaki genetik varyasyonların, 4 genomik bölgenin sekans verisi ve eşey tipi genlerinin dağılımını dikkate alarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. *Alternaria* patojenine karşı uygun kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde patojen popülasyon yapısının bilinmesi, genetik ve patojenik varyasyonun ortaya çıkarılması, diğer fungal patosistemlerde olduğu gibi son derece önemli ve gereklidir (Milgroom ve Peever, 2002). Bu bağlamda, çalışma kapsamında sunulan verilerin faydalı olacağı umulmaktadır.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Antepfıstığı (*Pistacia vera*) ve Yabani Türlerinin Orijini, Yetiştiriciliği ve Ekonomik Önemi

Antepfıstığı'nın orijini, Güneybatı Asya ve Ortadoğu olarak bilinmektedir (Parfitt ve Badanes, 1997). Arkeolojik çalışmalarda bulunan Antepfıstığı meyveleri, bu bitkinin çok uzun zamanlardan bu yana insanlar tarafından kullanıldığını göstermektedir (Hormaza ve Wunsch, 2007). İran ve Afganistan'da M.Ö. 6 yılında yetiştiriciliğinin yapıldığını gösteren kabuk kalıntılarına ulaşılmıştır (Hormaza ve Wunsch, 2007). Ülkemizde Antepfıstığı yetiştiriciliği uzun yıllardır yapılmaktadır ve ülkemizin de bu türün orijin bölgelerinden birisi olduğu bilinmektedir (Parfitt ve Badanes, 1997).

Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) diploid ($2n=30$ kromozom), ikievrekli (dioik) ve rüzgarla tozlaşan *Anacardiaceae* familyası üyesi bitki türüdür (Zohary, 1952; İla ve ark., 2003; Hormaza ve Wunsch, 2007). Maksimum 6-9 m uzunluğa erişebilen bu ağaç türü, tek ya da bir kaç gövde şeklinde olabilir. Meyvelerin dış kabuk kısmı ekzokarp, mezokarp ve sert bir tabaka olan endokarp şeklinde olup meyvenin kullanılan çekirdeği, endokarp tabakasının içerisindeki tohumdan meydana gelmektedir (Crane ve Iwakiri, 1981; Hormaza ve Wunsch, 2007).

Antepfıstığı yetiştiriciliğinde, bitki meyvelerinden fidanlar elde edilebildiği gibi *P. atlantica*, *P. mutica*, *P. khinjuk* yabani türlerinden de çelikleme yoluyla üretilmektedir (Zohary ve Hopf, 1988). Kültür yetiştiriciliğinde kullanılan Antepfıstığı çeşitleri, İran'da; Ohadi, Kaleh ghochi, Ahmad, Aghai, Badami Zarand, Rzaii, ve Pust piazi (Esmail-Pour, 2001), Türkiye'de; Uzun, Kırmızı, Halebi, Siirt, Beyazben, Sultani, Değirmi ve Ketan Gömleği (Ak ve Açar, 2001), ABD Kaliforniya'da; Kerman (dişi) ve Peters (erkek) şeklinde literatüre geçmiştir (Kallsen ve ark., 2009).

Dünya genelinde İran başta olmak üzere ABD ve Türkiye dahil birçok ülkede üretimi yapıldığı bilinmektedir (FAOSTAT 2014). Dünya Antepfıstığı üretim verilerine göre İran ve A.B.D.'den sonra Türkiye, üçüncü sırada yer almaktadır (FAOSTAT 2014). Türkiye'deki üretim şekli kuru şartlarda sürdürüldüğü için meyveler daha küçük olmasına karşın, hoş koku ve aroma olarak daha zengindir (Ak ve ark., 2012).

Antepfıstığı bitkisel protein, yağ, karbonhidrat bakımından oldukça zengin olmakla birlikte, bünyesinde çeşitli mineraller (fosfor, potasyum kalsiyum, demir), Vitamin E,C,B1 ihtiva etmektedir (Favier ve ark., 1995).

2.2. Fungal Bitki Patojeni *Alternaria* spp.

2.2.1. Klasik Taksonomi

Alternaria Yanıklığı hastalığının yaygın etmeni *Alternaria* spp., Christian Gottfried Daniel Nees Von Esenbeck tarafından 1816 yılında, *A. tenuis* adı altında tek tür olarak isimlendirilmiş ve *Alternaria* cins grubu kurulmuştur. Nees *A. tenuis* türünü, koyu renkli enine ve boyuna septalardan oluşan spor (phaeodicyospores) zincirleriyle tanımlamaktadır (Nees von Esenbeck, 1816). Karl von Keißler (1912), *A. tenuis* ve *Torula alternata*'nın (Fries 1832) sinonim olduğunu belirterek türü *A. alternata* olarak adlandırmıştır. Yine aynı araştırma kapsamında "Keissle." fungus ismine eklenmiştir. Simmons (2007) çalışmaları sonucunda, morfolojik karakterlere dayalı *Alternaria* spp. taksonomisi için 275 *Alternaria* türünün kabul edildiği klasik metotlar vasıtasıyla tanımlama kılavuzunu oluşturmuştur (Simmons, 2007).

Alternaria tenuissima (Nees: Fr.) Wiltshire tarafından (Wiltshire, 1933) ve *Alternaria arborescens* Simmons (Simmons, 1997) tarafından tanımlanarak isimlendirilmiştir (Mycobank).

Simmons ve Robert (1993), *Alternaria* cins grubunun ideal üreme ve spor desenlerini tasvir etmişlerdir. Tür tanımlamaya yönelik üç boyutlu sporulasyon desenini, genç konidium şekillerini ve septa genişliklerini tanımlamada yeni yöntemler olarak kullanmışlardır. Farklı morfolojik tanımlamalar ile *Alternaria* cins grubunu tanımlayarak türler için tipik birer temsilci örneklemişlerdir (Simmons ve Robert, 1993; Lawrence, 2016).

Simmons (1993), küçük sporlu *Alternaria* spp. türlerini 6 morfolojik gruba ayırmıştır. Birinci grup, düzgün bir şekle sahip olmayan sporlar üretir ve 5-10 konidiofor zincirinden oluşur. *Alternaria gaisen*'in dahil olduğu ikinci grup, büyük sporları ve 5-10 zincirinden oluşan konidiumları ile karakterizedir. Üçüncü grupta, kısa (50-70 µm), uzun (100-150 µm) konidiumlar ve bol sporulasyon gözlenir. *A. alternata* ile temsil edilen dördüncü grup, kısa konidioforlar ve ikincil sporulasyon kümeleriyle ifade edilmiştir. Beşinci grup üyelerinde, çok uzun konidia zincirleri ve nadir ikincil dallanma ile temsil edilmiştir. *A. infectoria*'nın dahil olduğu 6. grupta, ikincil ve üçüncül dallanmalar saptanmış, üç boyutlu olarak gösterilmiştir (Simmons, 1993; Lawrence, 2016).

2.2.2. Moleküler Taksonomi ve Varyasyon

Pryor ve Gilbertson (2000), çoğu *Alternaria* spp. türünü morfolojik yöntemler ve moleküler veriler vasıtasıyla tanımlayarak *Alternaria* cins grubunu düzenlemişlerdir. Internal transcribed spacer (ITS) ve 18S mitokondriyal küçük alt ünite (mtSSU) moleküler

markırlarını kullanarak *Alternaria* soy ağacında moleküler verilerin farklı gruplar ortaya çıkardığını göstermişlerdir (Pryor ve Gilbertson, 2000).

Moleküler taksonomik araştırmaların devamında, *Alternaria* tür gruplarını tanımlamak ve aralarındaki filogenetik ilişkileri göstermek için *ITS*, ribozomal DNA (*nuclear rDNA*), *mtSSU* ve protein kodlayan bölgeler [*Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (gpd)* *Alternaria major allerjen a1*, (*Alt_a_1*), *Endo-polygalacturonase (EndoPG)*, *Beta-tubulin*, *Translation elongation factor 1-alpha (TEF1- α)*, ikincil büyük altünite *RNA Polimeraz 2 (RPB2)*, *Calmaduline*, Plasma membrane *ATPase*, *Actin*] kullanılmıştır. Çoğu çalışmada, bu bölgelerin morfolojik tür gruplarının farklı filogenetik grupları işaret ettiği ancak tür grupları içindeki ayrımların çok güçlü sağlanmadığı görülmüştür (Pryor ve Gilbertson 2000; Pryor ve ark., 2009; Peever ve ark., 2004; Lawrence ve ark., 2012).

Kaliforniya eyaletinde örneklenen *Alternaria* yanıklık etmeni, *alternata*-tür grubu izolatları Antepfıstığı'nda anlamlı patojenik farklılıklar göstermemektedir. Moleküler teknikler kullanılarak varyasyon ve moleküler karakterizasyona yönelik RAPD analizleri, *rDNA* bölgesi için PCR-RFLP analizi ve *ITS* bölgelerinin sekans analizleri yapılmıştır. RAPD ve PCR-RFLP analizleri verileri, üç farklı grup ortaya çıkartırken (*infectoria* grubu *arborescens* grubu ve *alternata/tenuissima* grubu), *ITS* sekans verileri, yalnızca *infectoria* grubunu filogenetik olarak diğer gruplardan ayrı göstermiştir. Ancak bu moleküler yaklaşımlar, *A. alternata*, *A. tenuissima* ve *A. arborescens* tür grubu izolatları için yeterli filogenetik ayrımı göstermekte yetersiz kalmıştır (Pryor ve Michailides, 2002).

Peever ve ark. (2004), turunçgillerde kahverengi leke hastalığına neden olan küçük sporlu *Alternaria* türlerinde *MtLSU*, *Beta-tubulin*, *EndoPG* ve *SCAR* markırları kullanmışlardır. *EndoPG* ve *SCAR* markırları kombini ile *Beta-tubuline* göre küçük sporlu *Alternaria* türlerinde, daha çok varyasyon yakalanmıştır. Turunçgillere ait küçük sporlu izolatlar incelenerek farklı ekolojik nişlerden (yaprak lekeleri, meyve çürüklükleri vb.) örnekleme yapılmış ve konukçu özgüllüğü ve virülensliğin farklı olduğu gösterilmiştir. Ancak bu ekolojik farklılıklar için *EndoPG* ve *SCAR* markırları kompleksi ile oluşan filogenetik gruplar arasında bir ilişki bulunamamıştır. *A. alternata* ve *A. tenuissima* arasında bir ayrım gösterilememiştir. Morfolojik ve filogenetik hatlar arasında farklılık gözlenmesi ve genomik bölgelerin dataları arasındaki uyumsuzluklardan dolayı gen ağaçlarının, tür ağaçlarını yansıtmadığı belirtilmiştir (Peever ve ark., 2004).

Andrew ve ark. (2009), protein kodlayan *EndoPG* geni ve 2 adet *SCAR* markırını kullanarak farklı konukçu ve lokasyonlardan (Turunçgiller-Florida, Antepfıstığı-

Kaliforniya, öl bitkileri-Arizona, Ceviz-Fransa/İtalya ve Elma-Güney Afrika) izole edilmiş 150 adet küçük sporlu *Alternaria* izolatında filogenetik hatlar, konukçu lokasyon ilişkisi, morfolojik sınıflandırma arasındaki ilişkiyi değerlendirmiştir. Bu doğrultuda, lokasyon ya da konukçu orijini ile filogenetik gruplar arasında bir bağlantı bulunamamıştır. Benzer sonuçlar, morfoloji ve filogenetik gruplar arasında da gözlenerek *A. alternata* ve *A. tenuissima* arasında kuvvetli bir ayırım olmadığı gösterilmiştir. *A. arborescens* türünün ise *A. alternata* ve *A. tenuissima* türlerinden ayrı olduğu tespit edilmiştir. Oluşan genetik gruplar içerisinde, *A. alternata/arborescens* ve *A. alternata/tenuissima* ara tür grupları da gösterilmiştir (Andrew ve ark., 2009).

Tymon ve ark. (2015), 210 *Alternaria* izolatını kullanarak *OPA1.3* anonim DNA bölgesi üzerinde ApaI enzimi ile kesim yapmıştır. İzolatların kesim sonucu, bant desenlerine ve morfolojilerine bakarak 65 izolat *A. alternata* ve 145 izolat *A. arborescens* türü olarak tanımlanmıştır.

Ülkemizdeki *Pistacia* konukçularında *Alternaria* yanıklık etmeni olan geniş bir patojen koleksiyonundaki *A. alternata* ve *A. tenuissima*'nın genetik/filogenetik açıdan tek bir türü temsil ettiği de yakın zamanda gösterilmiştir (Özkılınç ve ark., TÜBİTAK-TOVAG 112O554 numaralı proje).

Steenkamp ve ark. (1999), *Histon-3* bölgesini kullanarak farklı konukçulardan izole edilmiş *Fusarium subgulitinans* türlerinin moleküler tanımlanmasına yönelik çalışmalar yapmışlardır. Çoğaltılan *Histon-3* bölgesinde bulunan intron bölgelerinin farklı konukçularda baz büyüklüklerinde değişiklik sergilediği görülmüştür. Ancak bu bölgenin *Alternaria* patojenleri için kullanılabilirliğine rastlanmamıştır. Hong ve ark. (2006), ISSR ve AFLP markırları ve *Histon-4* bölgesini kullanarak fındık ve cevizlerde meyve hastalıklarına neden olan *Alternaria* türlerinin moleküler ayırımına bakmışlardır. *Histon-4* bölgesi *A. alternata*, *A. tenuissima* ve *A. arborescens* gruplarının ayırımını sağlayamamıştır.

Hong ve Pryor (2005) tarafından *Alternaria* major allergen genine ait *Alt_a_1* bölgesi filogenetik çalışmalarda kullanılmıştır. Toplam 52 izolattan oluşan *Alternaria* ve bu türle ilişkili grubun sekans verileri kullanılmış, ekzon ve intron bölgeleri belirlenmiştir. Çalışmada, *Alt_a_1* bölgesinin sekans verilerini diğer bir bölge olan *glyceraldehde-3-phosphate dehydrogenase (gpd)* bölgesi ile karşılaştırmışlar ve *Alt_a_1* bölgesinin 3,8 kat daha hızlı evrimleştiğini ve ekzon kısımlarının 3,5 kat daha parsimony bilgilendirici olduğunu tespit etmişlerdir. *Alt_a_1* bölgesinin ekzon verileri ile yapılan analizlerde, “*alternata*” tür grubunu diğer tür gruplarından ayrıldığını göstermişlerdir.

2.2.3. Genetik Çeşitlilik ve Üreme

Ascomycetes sınıfı üyelerin seksüel üremelerinin, tek bir lokus tarafından kontrol edildiği bilinmektedir (Coppin ve ark., 1997; Turgeon, 1998). Seksüel üremede eşey tipini kontrol eden ‘mating type’ lokusunun moleküler analizleri yapılarak DNA-binding motifleri çıkartılmış ve birbirinden farklı olan iki gen yüksek değişkenliğe sahip (high mobility group) “HMG-box” ve “ α -box” olarak adlandırılmıştır. Seksüel aktiviteyi kontrol eden *MAT1* lokusu, *MAT1.1* veya *MAT1.2* idiomorfunu içermektedir (Turgeon Yoder 2000; Arie, 1997; Metzenberg ve Glass 1990; Billiard, 2012). İki farklı eşey tipini temsil eden bu dizileri, düşük genetik benzerlik ve farklı genleri içermesinden dolayı idiomorf olarak ifade edilir. Bu idiomorf genlerin, aseksüel türler tarafından taşındığı gösterilmiştir. Sadece *MAT1.1* ya da *MAT1.2* idiomorfunu taşıyan türler heterotallik; her iki eşey tipini taşıyan türler ise homotallik olarak nitelendirilir (Billiard ve ark., 2012; Turgeon ve Yoder, 2000).

Aseksüel olduğu bilinen ama heterotallik olarak adlandırılan farklı eşey tipi dizilerini taşıyan *Cerospora zae-maydis* (Groenewald ve ark., 2006), *A. alternata* (Arie ve ark., 2000), *Fusarium oxysporum* (Arie ve ark., 2000), *Aspergillus flavus* (Ramirez-Prado ve ark., 2008), *Aspergillus fumigatus* (Poggeler, 2002), *A. brassiciola* (Berbee ve ark., 2003), *A. tenuissima* (Berbee ve ark., 2003) türlerinde *MAT1* lokusuna ait *MAT1.1* ve *MAT1.2* idiomorfları ortaya çıkarılmış ve PCR ile çoğaltılarak eşey tipleri belirlenmiştir.

Arie ve ark. (1999), *Loculascomycetes* ve *Pyrenomycetes* üyelerinde *MAT* gen motiflerinin ortaya çıkartılması için hızlı ve kolay kullanılabilir PCR metotları geliştirmiştir (Arie, 1997; Arie ve ark., 1999). *MAT1.2* geninin idiomorfu olan *MAT1.2.1* genini tanımlamıştır (Arie, 1997). Heterotallik olduğu bilinen ve *Gibberella/Fusarium* kompleksi içerisinde yer alan *Gibberella fujikoroii* (anamorf *Fusarium moniliforme*) türü için farklı *MAT* genlerinin tanımlanması amacıyla çalışmalar da yapılmıştır (Arie ve ark., 1999). Çok sayıda bitki patojenini içeren bu tür kompleksinin evrimsel geçmişi ve patojen türlerin gelişimini *MAT* genleri ile açıklanmaya çalışılmıştır (Arie ark., 1999).

MAT tipi farklılığın, tür içinde genetik varyasyona etkisini değerlendirmek amacıyla Berbee ve ark. (2003), her bir mating tipini belirledikleri *Alternaria* izolatlarının ribozomal ITS bölgelerinin sekans verileri ile filogenetik analizlerini yapmıştır. *ITS* bölgesi, eşeyli üreme yapısı bilinen *Alternaria* (telemorf-*Lewia*) türleri ile eşeyli üreme tipleri henüz görülmeyen aseksüel *Alternaria* türlerini, filogenetik olarak ayırmıştır. Farklı *MAT* lokusuna sahip (*MAT1.1.1* ve *MAT1.2.1*) türlerin aynı kümeler içerisinde yer aldığı görülmüştür (Berbee ve ark., 2003).

A. alternata türünün *MAT* tiplerinin keşfedilmesi ve işlevsel olduklarının teyit edilmesiyle bu grup içerisinde kriptik bir üreme şekli olabileceği düşünülmektedir (Arie, 2000). Stewart ve ark. (2013) son çalışmalarında, Kuzey Amerika bölgesindeki narenciye çeşitlerinde, *A. alternata* popülasyonlarının *MAT* tiplerini ve çeşitli DNA bölgelerinde rekombinasyon işaretlerini araştırmışlardır. Bu çalışmaların sonucunda, *A. alternata* türünün kriptik üreme geçiriyor olabileceği ya da yakın bir zamana kadar eşeyli üreme yeteneğine sahip olduğu öne sürülmüştür (Start ve ark., 2011; Start ve ark., 2013).

Meng ve ark. (2015), Çin'de patates üretim alanlarından örneklenen 700 *A. alternata* izolatının *MAT* tiplerini belirlemişlerdir. Patojenin eşey tiplerinin eşit oranda dağıldığını göstermişlerdir. Meng ve ark. (2015), aseksüel olarak kabul gören bu grubun kriptik bir üreme yapısına sahip olabileceğini önermişlerdir.

2.3. Antepfıstığı'nda Alternaria Yanıklığı

Alternaria Yanıklığı, Antepfıstığı ağaçlarında gözlenen önemli bir fungal bitki hastalığıdır. A.B.D.'de Antepfıstığı'nda sıklıkla rastlanan bu hastalığa *Alternaria* cinsine ait *A. alternata*, *A. tenuissima* ve *A. arborescens* türlerinin neden olduğu rapor edilmiştir (Pryor ve Michailides, 2002). Bitkinin hem meyve hem de yapraklarını etkilediği rapor edilen hastalığın belirtileri, yapraklarda görülen siyah-kahverengi nekrotik lezyonlar ve bu lezyonların etrafında klorotik yapının bozulmasıyla dairesel şekilde renk açılmalarıdır (Michailides ve ark., 1994; Michailides, 1997). Antepfıstığı meyvelerinde gözlenen semptomlar, meyvelerde küçük siyah lekeler ve etrafını saran kırmızı renkte bir dairesel halka şeklinde görülmektedir (Pryor ve Michailides, 2002). Fıstık geliştikçe bu siyah lekeler, birleşerek büyük bir lezyon haline gelebilir. İç kabuğa geçerek fıstığın gelişmesini engellemekte ve kalitesinde düşüşe neden olmaktadır (Pryor ve Michailides, 2002).

Alternaria Yanıklığı, Antepfıstığı'nda ilk olarak 1974 yılında Mısır'da ve 1985 yılında California'da rapor edilmiştir (Ash ve Lanoiselet, 2001; Michailides ve ark., 1995; Wasfy ve ark., 1974). Ülkemizde, Antepfıstığı'nda *Alternaria* yanıklık etmenleri yakın zamanda tespit ve karakterize edilmiştir (Özkılınç ve ark yayınlanmamış veri, TÜBİTAK-TOVAG 1120554 numaralı proje).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. *Alternaria* spp. İzolatları

Güneydoğu Anadolu Bölgesi (Gaziantep ve Şanlıurfa), Marmara ve Ege Bölgeleri (Çanakkale, Balıkesir, İzmir ve Manisa) konukçu lokasyonu olarak seçilmiştir. TÜBİTAK-TOVAG 1120554 numaralı proje kapsamında 2013 yılında *Alternaria* spp. patojenleri izole edilmiştir. Bu izolatların patojenik karakterizasyonları doğrulanmış, morfolojik ve filogenetik tür değerlendirmeleri yapılmıştır (Özkılınç ve ark yayınlanmamış veri, TÜBİTAK-TOVAG 1120554 numaralı proje). *Alternaria* Yanıklığı görülen *Pistacia* spp. (*P. vera*-Antepfıstığı, *P. terebinthus*-Menengiç, *P. atlantica*-Atlantik sakızı, *P. lentiscus*-Sakız ağacı) konukçularından elde edilen, tür ve patojenik karakterizasyonu yapılarak tek spor izolasyonu gerçekleştirilen *Alternaria* spp. izolatları (Çizelge 3.1.), tekrar alt kültüre alınarak tez çalışmasında kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. TÜBİTAK-TOVAG 1120554 numaralı proje kapsamında örneklenmiş koleksiyondan tez çalışması için seçilen izolatlara ait bilgiler

Şehir	İzolat Kodu	Konukçu	Morfolojik Tür	Filogenetik Tür
	27 - 02/1	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	<i>Alternaria alternata/tenuissima</i>
	27 - 11/1	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	27 - 16/1	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	27 - 16/3	<i>P. vera</i>	<i>A. tenuissima</i>	
	27- 46/3	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
GAZİANTEP	27 - 02 /1 - G	<i>P. terebinthus</i>	<i>A. tenuissima</i>	
	27 - 10 /2 - G	<i>P. vera</i>	<i>A. tenuissima</i>	
	27 - 16 - G	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	27 - 31 /1 - G	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	27 - 34 - G	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	27 - 10 /2 - GY	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	63 - 02 /4	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	63 - 04 /4	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
ŞANLIURFA	63 - 09	<i>P. vera</i>	<i>A. tenuissima</i>	
	63 - 12 /1	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	63 - 13 /4	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	

Çizelge 3.1. (Devamı) TÜBİTAK-TOVAG 112O554 numaralı proje kapsamında örneklenmiş, tez çalışması için seçilen izolatlara ait bilgiler

Şehir	İzolat Kodu	Konukçu	Morfolojik Tür	Filogenetik Tür
ŞANLIURFA	63 - 22 /1	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	<i>Alternaria alternata/tenuissima</i>
	63 - 23 /2	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	63 - 37	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	63 - 21 /2 - G	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	63 - 23 - G	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	63 - 35 - G	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	63 - 48 - G	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	63 - 04 - GY	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	63 - 13 - GY	<i>P. vera</i>	<i>A. tenuissima</i>	
	35-15	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
İZMİR	35-16 /1	<i>P. atlantica</i>	<i>A. alternata</i>	
	35-16 /2	<i>P. atlantica</i>	<i>A. alternata</i>	
	35-18	<i>P. atlantica</i>	<i>A. alternata</i>	
	35-20 /1	<i>P. atlantica</i>	<i>A. alternata</i>	
	35-22/2 meyve	<i>P. lentiscus</i>	<i>A. tenuissima</i>	
	35-35	<i>P. lentiscus</i>	<i>A. alternata</i>	
	35-37	<i>P. terebinthus</i>	<i>A. alternata</i>	
	35-37 Y1	<i>P. terebinthus</i>	<i>A. tenuissima</i>	
	35-41	<i>P. terebinthus</i>	<i>A. alternata</i>	
	35-43	<i>P. terebinthus</i>	<i>A. alternata</i>	
MANİSA	45 - 16	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	45 - 26 /1	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	45 - 29	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	45 - 43	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	45 - 57	<i>P. atlantica</i>	<i>A. alternata</i>	
	45 - 58	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	17 - 12	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
ÇANAKKALE	17 - 15	<i>P. terebinthus</i>	<i>A. tenuissima</i>	
	17 - 17	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	17 - 05 - G	<i>P. terebinthus</i>	<i>A. tenuissima</i>	
	17 - 07 - G	<i>P. terebinthus</i>	<i>A. alternata</i>	
	17 - 11 - GY	<i>P. terebinthus</i>	<i>A. tenuissima</i>	
BALIKESİR	10-14	<i>P. terebinthus</i>	<i>A. alternata</i>	
	10-15	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	

İzolatların isimlendirilme şekilleri; ilk rakam il plaka kodu, ikinci rakam lokasyon numarası, üçüncü rakam var ise örnekleme yapılan ağaç ve toplandığı döneme göre yaz sonu ise “G” kodu kullanılmıştır.

Projesi kapsamında, örneklenmiş izolatlardan seçilenlere ek olarak Dr. Tobin L. Peever tarafından A.B.D.’deki Antepfıstığı’ndan elde edilmiş ve morfolojik teşhisleri Dr. B.M. Pryor tarafından yapılmış izolatlar da tez çalışmasında kullanılmıştır (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Tez çalışması için seçilen A.B.D orjinli izolatlara ait bilgiler

Ülke	İzolat Kodu	Konukçu	Morfolojik Tür	Filogenetik Tür
A.B.D	BMP - 0653	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	<i>Alternaria alternata/tenuissima</i>
	BMP - 0591	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	BMP - 0612	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	BMP - 0561	<i>P. vera</i>	<i>A. alternata</i>	
	BMP - 0517	<i>P. vera</i>	<i>A. tenuissima</i>	
	BMP - 0480	<i>P. vera</i>	<i>A. tenuissima</i>	
	BMP - 0610	<i>P. vera</i>	<i>A. tenuissima</i>	
	BMP - 0660	<i>P. vera</i>	<i>A. tenuissima</i>	

3.1.2. Fungal Kültürlerin Gelişiminde Kullanılan Besi Ortamları

Katı besiy ortamı; PDA (Potato Dextrose Agar 1.10130.0500, Merck), zayıflatılmış-weak-PDA (Agar, 05039 Sigma-Aldrich), PCA (Potato Carrot Agar; Agar, 05039 Sigma-Aldrich) ve miselyum gelişimi için sıvı besiy ortamı PDB (Potato Dextrose Broth 7585A Acumedia®) ortamları kullanılmıştır.

3.1.3. Moleküler Analizlerde Kullanılan Kimyasallar

Genomik DNA izolasyonu: gDNA izolasyonunda manuel yöntem ve bazı izolatlar için DNA ekstraksiyon kiti kullanılmıştır. Manuel yöntemde; likit fenol (Tekkim), kloroform (24216-2 Sigma-aldrich), etanol (32221-2 Sigma-Aldrich) ve SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS001.100 BioShop®) kimyasalları kullanılmıştır.

Manuel yöntemle ile yapılan ekstraksiyonda sorun yaşanan bazı örnekler i-genomic Plant DNA Extration Mini kit (İntron) ile izole edilmiştir.

PCR işlemi: PCR amplifikasyonu 100 µl Taq DNA Polymerase, 5U/µl (Invitrogen®), 2.5 ml 10X PCR buffer, 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl (Invitrogen®), 1 ml MgCl₂, 50 mM (Invitrogen®) dNTPs G128, 500 µl, 10 mM (ABM®), ile gerçekleştirilmiştir.

TaqI enzim kesimi: *EndoPG* bölgesinin kesimi için TaqI FastDigest® enzyme (FD0674-Thermo Scientific), 10x FastDigest Buffer/FastDigest Green Buffer (Thermo Scientific) kullanılmıştır.

ApaI enzim kesimi: *OPA1.3* anonim DNA bölgesinde kesim yapmak amacıyla ApaI FastDigest® enzyme (FD1414-Thermo Scientific), 10x FastDigest Buffer/FastDigest Green Buffer (Thermo Scientific) kullanılmıştır.

Elektroforez ve Jel Görüntüleme: Elektroforez için hazırlanan TBE tampon çözeltisi (buffer), Tris (TRS001, BioShop®), EDTA (EDT001.500 BioShop®), Borik Asit (BOR001.500 BioShop®)'den oluşmaktadır. pH değerini 8.00 a dengelemek için HCl ve sodyum hidroksit (NaOH; 106462, E Merck), pH dengeleyici olarak kullanılmıştır. Agaroz jel (N605 Amresco) hazırlanarak, yükleme sırasında 6X Loading Dye (Invitrogen®), RedSafe™ Nükleik asit boyama solüsyonu (İntron), DNA marker, 250bp (Amresco) kullanılmıştır.

3.1.4. İzolatların Gelişmesi ve Moleküler Analizlerde Kullanılan Cihazlar

Fungal patojen kültürlerinin hazırlanmasında ve gelişmesinde, steril kabin (The Esco Airstream® Class II), otoklav (Nüve), hassas terazi (Shimadzu), ısıtıcılı karıştırıcı (Wisd), orbital çalkalayıcı (SSL1 Stuart), inkübatör (JSR), iklimlendirme kabini (Nüve), buzdolabı (Bosch), -20 derin dondurucu (Bosch), kameralı ışık mikroskobu (Euromex), kameralı stereo mikroskop (MS 1107 Micros), mikrodalga (Bosch), sıvı azot tankı (LN₂);

DNA izolasyonu ve PCR çalışmalarında, vakumlu pompa (Rocker), liyofilizatör (Christ), -20°C derin dondurucu (Bosch), -80°C derin dondurucu (Operon), mini santrifüj (CF-5 Wisd), mikropipet (Eppendorf), soğutmalı santrifüj (Hettich), vakumlu santrifüj (Labconco), vorteks (Dragonlab), pH metre (Hanna Instruments HI 2211) çeker ocak (Setra), PCR cihazı (Bio-Rad), yatay elektroforez ve güç kaynağı (Thermo), Quantum ST5 bilgisayarlı jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat), Quantum ST5 Elektroforez jel görüntüleme sistemi software (Vilber Lourmat), kuru blok ısıtıcı (BSH1002 Benchmark), NanoQuant DNA konsantrasyon ölçücü (Tecan Infinite® M200 PRO), i-control™ mikroplaka okuyucu software (Tecan Infinite® M200 PRO), buz makinası (İzmaç) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Fungal İzolatlar

TÜBİTAK-TOVAG 112O554 numaralı proje kapsamında, 2013 yılı Mayıs ve Eylül ayları arasında iki dönem olmak üzere izolatlar toplanarak isimlendirilmiştir. Bu kültür koleksiyonuna ait izolatlar, tekrar kültüre alınarak kullanılmıştır. Tez kapsamında bu izolatlardan yararlanılmıştır.

3.2.1.1. İzolatların Saklanması

Projeye ait izolatlar, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarında -20°C’de kağıt üzerinde zarflarda ve -80°C’de gliserol stok solüsyonu içerisinde muhafaza edilmiştir.

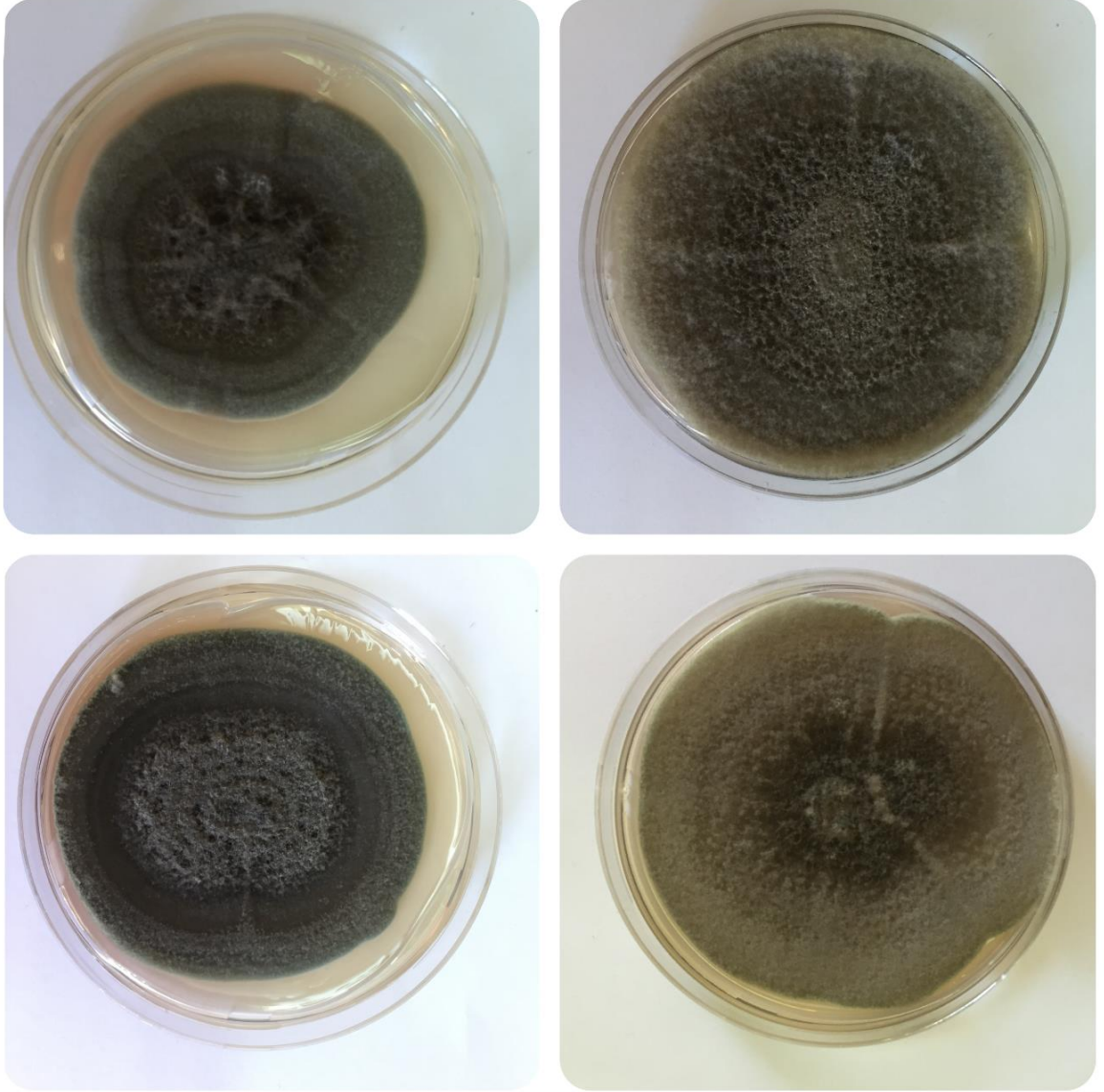
3.2.1.2. Besi ortamlarının Hazırlanması

Alternaria spp. izolatlarının çimlendirilmesi işlemi, PDA ortamında yapılmıştır. Patates-dekstroz-agar hazır karışımından 39g/l olarak hazırlanan besi yeri otoklavda steril hale getirilmiştir.

Morfolojik tanımlamalar için izolatların zayıflatılmış (weak)-PDA ve PCA ortamlarında gelişimleri izlenmiştir. Zayıflatılmış (weak)-PDA ortamı 12 g PDA ve 16 g Agar ile 1 lt saf suda hazırlanmıştır. PCA ortamı için 20 g patates ve 20 g havuç ile 100 ml saf su içerisinde 30 dk otoklavlanmıştır. Bu karışım, 2 mm porlu elekten geçirilip 20 gr agar eklenerek 1 lt saf su ilavesinden sonra 15 dk tekrar otoklavlanmıştır. Böylelikle 1 lt PCA besiyeri hazırlanmıştır.

3.2.1.3. DNA İzolasyonu İçin Kültürlerin Hazırlanması

Alternaria spp. izolatları, önceden hazırlanmış PDA besi ortamında 3-5 gün boyunca, 12 saat karanlık/ 12 saat aydınlık döngüsü sağlanarak 24°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Petrilerde, izolat bilgisi ve ekim tarihleri yazılmıştır. Fungal kolonilerin büyümeleri takip edilmiş, hif yapıları sıvı ortama aktarılabilir düzeyde geliştiği anda sıvı ortama aktarılmıştır (Şekil 3.1.). Patates-dekstroz sıvı besi ortamında (Potato dextrose broth, PDB) oda sıcaklığında 150 rpm’e ayarlı çalkalayıcı inkübatörde 5-7 gün boyunca geliştirilmiştir. Yeterli miselyum gelişimi gözlemlendiğinde sıvı ortamlar vakumlu pompa yardımıyla süzülmüş, miselyumlar 2,0 ml’lik ependorf tüplerine alınarak liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Liyofilize örnekler kullanılıncaya kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Antepfıstığı'nda *Alternaria* yanıklık etmeni *Alternaria* spp. izolatlarının PDA ortamındaki kültür görüntüleri

3.2.1.4. Genomik DNA İzolasyonu

Liyofilize dokular, metal çubuk vb. kullanılarak mekanik kuvvetle toz haline getirilerek DNA izolasyonuna hazırlanmıştır. İzolatların DNA izolasyonunun bir kısmı manuel (Dobinson ve ark., 1995), bir kısmı da DNA izolasyon kiti (Intron i-genomic Plant DNA Extraction Kit) ile gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyon kiti ile yapılan ekstraksiyon için kite ait prosedür izlenmiştir. Manuel yöntem için liyofilize dokunun bulunduğu ependorf tüpleri, 400 ml lizis tampon çözeltisi ile süspansiyon edilmiştir. Tüpler, 3 dk boyunca hızlıca vorteks ile homojenize hale getirilmiştir. 450 uL 1:1 oranında hazırlanmış fenol/kloroform örnekler eklenmiş ve 30 sn boyunca yavaşça çalkalanmıştır. Faz ayrımını sağlamak amacıyla 5 dk

boyunca 13000 rpm de santrifüj yapılmıştır. Fenol/kloroform ile ayrılan sulu faz ependorf tüpüne aktarılmıştır. Temiz bir pellet görülene kadar bu işlem uygulanmıştır. Son sıvı faz %95'lik etanol ile süspanse edilerek 5 dk buzda bekletilmiş ve sonrasında 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Nükleik asit pelteleri %70 etanol ile 13000 rpm' de santrifüj edilerek yıkanmıştır. Tüpler vakumlu santrifüje alınarak 40 dk boyunca kurutulmuştur. gDNA'ların bulunduğu tüplere 100 uL TE (Tris-EDTA) tampon çözeltisi eklenerek çözülmüştür ve 1 uL RNAase ilave edilerek 37°C de 3 saat boyunca inkübe edilerek gDNA izolasyonu tamamlanmıştır. NanoQuant cihazında A260/A280 dalga boyunda ölçümleri yapılmış, gDNA'nın kalitesi ve miktarı kontrol edilerek moleküler çalışmalarda kullanıma hazır hale getirilmiştir. İzolatların gDNA'ları stoktan ayrı olarak PCR'da kullanılmak üzere 20 ng konsantrasyona dilue edilmiştir.

3.2.2. PCR Tabanlı Moleküler Tanı, Eşey Tipi Belirlenmesi ve Genetik/Filogenetik Çeşitlilik

Moleküler tanı amacıyla *Alternaria* spp. genomunda protein kodlayan 3 bölge: *Major Allergen a1 (Alt_a_1)*, *Endopolygalacturanase (EndoPG)*, *Histon-3 (H-3)* ve bir de SCAR markırı olarak geliştirilmiş bir anonim DNA bölgesi (OPA1.3) kullanılmıştır. Bu lokusların daha önceki çalışmalarda da *Alternaria* türleri için filogenetik açıdan bilgilendirici olduğu bilinmektedir. Primer seçimleri, önceki çalışmalardan yararlanılarak yapılmıştır (Çizelge 3.3.).

PCR reaksiyonlarında, ~20 ng kalıp (template) gDNA, 1X Taq Polimeraz tampon çözeltisi (buffer) (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 2 mM dNTP karışımı, 0.4 mM ileri ve geri primerler, 1 ünite Taq Polimeraz enzimi olacak şekilde 25 µL reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon koşulları; ilk denatürasyon 95°C-5 dk takiben 35 döngü 95°C-20 sn, 59-61 °C-30 sn (bağlanma sıcaklıklar her bir bölge için optimize edilmiştir) ve 72°C-30 sn ve son uzatma evresi tek döngü 72°C-10 dk olarak yapılmıştır. PCR ürünlerinin elektroforez işlemi, 0,5 µg nükleik asit floresan işaretleyici boya (Safe view) içeren %1,5'lik agaroz jelde, 30 dk/100 V' da gerçekleştirilmiştir.

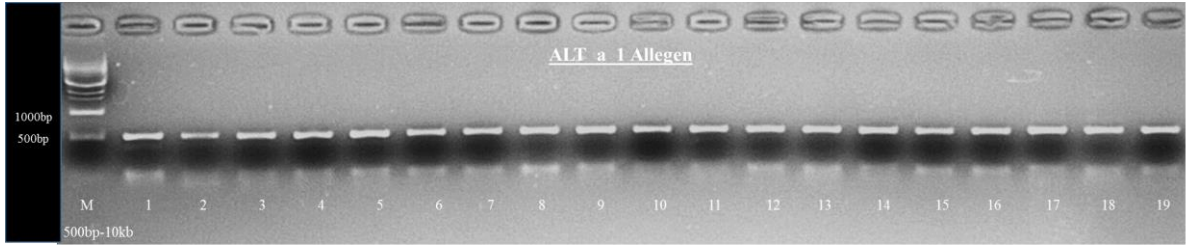
Çizelge 3.3. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) ve yabancı türlerinde *Alternaria* yanıklık etmeni *Alternaria* spp. türünün moleküler varyasyonlarını saptamak için kullanılan filogenetik bölgeler ve primer setleri

Filogenetik Bölge	Primer Kodu	Primer F (ileri) / Primer R (geri) (5'- -3')	Uzunluk (bç) *	Referans
<i>Alt_a_1</i> gen bölgesi	Alt-F ve Alt-R	ATGCAGTTCACCACCATCGC / ACGAGGGTGATGTAGGCGTC	368	Pryor ve ark., NSF-DEB 0918668 projesi
<i>EndoPG</i> gen bölgesi	PG3-F ve PG2-R	TACCATGGTTCTTTCCGA / RCARTCRTCYTGRIT	419	Peever ve ark., 2004
<i>Histon – 3</i> gen bölgesi	H3-1a ve H3-1b	ATGCAGTTCACCACCATCGC / ACGAGGGTGATGTAGGCGTC	386 / 334	Glass ve Donaldson, 1995
<i>OPA1.3</i> anonim DNA bölgesi	OPA1.3-F ve OPA1.3-R	CAGGCCCTTCCAATCCAT / AGGCCCTTCAAGCTCTCTTC	819	Peever ve ark., 2004
<i>MAT1.1</i> gen bölgesi	AL-MAT-L / AA- MAT1867	ATGCAGTTCACCACCATCGC / ACGAGGGTGATGTAGGCGTC	568	Start ve ark., 2011
<i>MAT1.2</i> gen bölgesi	AL-MAT-L / AA- MAT1867	ATGCAGTTCACCACCATCGC / ACGAGGGTGATGTAGGCGTC	748	Start ve ark., 2011

* Sekans verilerinin düzenlenmiş haldeki uzunlukları göstermektedir.

3.2.2.1. *Alt_a_1* Gen Bölgesi

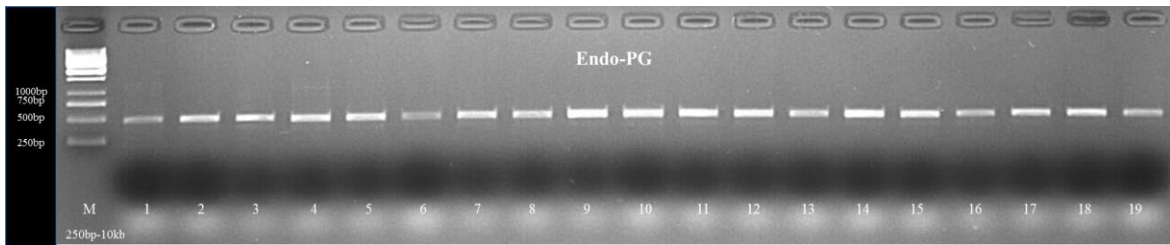
Alt_a_1 gen bölgesi için seçilen 59 izolat çalışılmıştır. Pryor ve ark., (2004) tarafından dizayn edilen *Alt-F* ve *Alt-R* primerler, çalışma için seçilmiştir (Çizelge 3.3.). Bölge için seçilen primerlerin bağlanma sıcaklığı 59°C'dir. PCR ürünlerinin jel üzerindeki bantları bilgisayarlı jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. *Alt_a_1* bölgesi PCR sonucu elde edilen ürünlerin elektroforez sonucu (Amplikon uzunluğu ~500 bp olarak tespit edilmiştir.)

3.2.2.2. *EndoPG* Gen Bölgesi

EndoPG gen bölgesi için seçilen 59 izolat çalışılmıştır. Daha önceki çalışmalarda dizayn edilmiş *PG3-F* ve *PG2-R* primerlerinden yararlanılarak (Çizelge 3.3.) PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. *EndoPG* bölgesi için seçilen primerlerin bağlanma sıcaklığı 59°C olarak ayarlanmıştır. PCR ürünlerinin jel üzerindeki bantları, bilgisayarlı jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir (Şekil 3.3.).



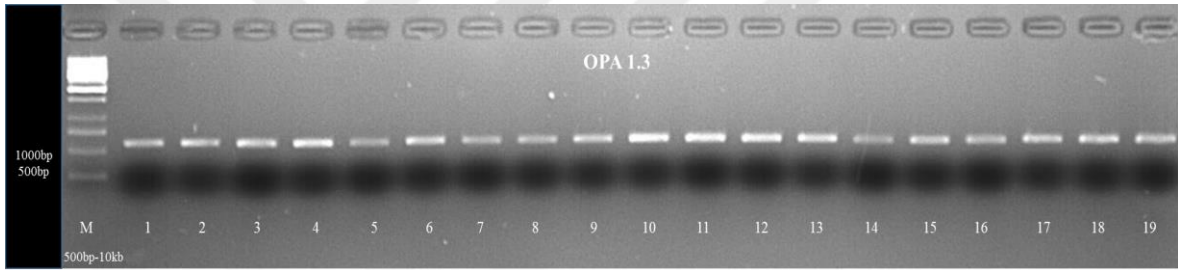
Şekil 3.3. *EndoPG* bölgesinin PCR sonucu elde edilen ürünlerin elektroforez sonucu (Amplikon uzunluğu ~500 bp olarak saptanmıştır.)

EndoPG bölgesi üzerinde TaqI enzimi kullanılarak kesim yapılmıştır. Bu enzim kesimine bağlı olarak *A. alternata*/*A. tenuissima* ve *A. arborescens* ayrımının yapılabildiği ilk kez bu çalışma kapsamında tespit edilmiştir. Enzim kesim bölgesi “ 5'---T↓CGA---3' - 3'---AGC↓T---5' ” dizisidir (Sato, 1978). Enzim kesim reaksiyonlarında, 17 µl nükleaz

içermeyen (nuclease-free) H₂O, 2 µl 10X FastDigest Green tampon çözeltisi (buffer), 10 µl PCR ürünü, 1 µl Fast Digest enzimi kullanılmıştır. Enzim kesim reaksiyonu 65 °C de 5dk olarak uygulanmıştır. Bu reaksiyonlarda *A. arborescens* izolatları da kullanılmıştır (EGS-39-128, Simmons, 1999; 02-28, 02-29-1 ve 31-09, Özkılınç ve ark., TÜBİTAK-TOVAG 112O554 numaralı proje).

3.2.2.3. *OPA1.3* Anonim DNA Bölgesi

OPA1.3 anonim DNA bölgesi için seçilen 58 izolattan 57'si çalışılmış, 1 izolattan (BMP 0660 kodlu izolat) PCR işleminde ürün alınamamıştır. Daha önceki çalışmalarda dizayn edilmiş *OPA1.3-F* ve *OPA1.3-R* primerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.3.). Çoğaltılan bölgenin bağlanma sıcaklığı, 61°C olarak ayarlanmıştır. PCR ürünlerinin jel üzerindeki bantları, bilgisayarlı jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir (Şekil 3.4.).



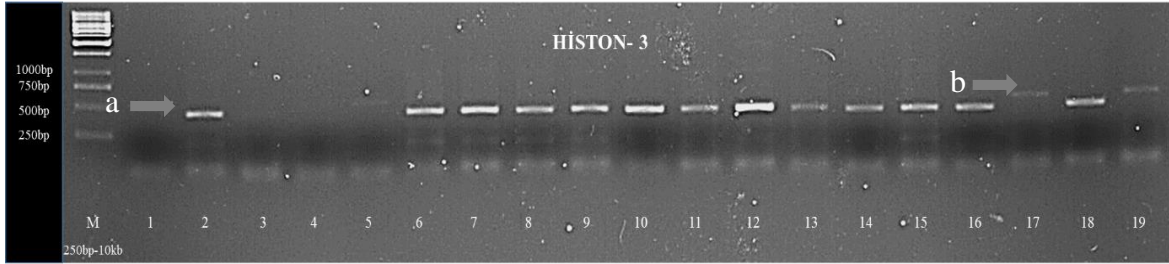
Şekil 3.4. *OPA1.3* anonim DNA bölgesi PCR sonucu elde edilen ürünlerin elektroforez sonucu (Amplikon uzunluğu ~900 bp olarak tespit edilmiştir.)

OPA1.3 bölgesi üzerinde moleküler tür teşhisine işaret eden *ApaI* enzim kesimi doğrulanmıştır (Tymon ve ark., 2015). Kıyaslama amaçlı *A. arborescens* izolatları da kullanılmıştır. Enzim kesim bölgesi “5' GGGCC↓C 3' - 3' C↑CCGGG 5' ” dizisidir (Sato, 1978). Enzim kesimi için hazırlanan reaksiyonlarda, 17 µl nükleaz içermeyen (nuclease-free) H₂O, 2 µl 10X FastDigest Green tampon çözeltisi (buffer), 10 µl PCR ürünü, 1 µl Fast Digest enzimi kullanılmıştır. Enzim kesim reaksiyonu 37 °C de 20 dk olarak uygulanmıştır.

3.2.2.4. *Histon-3 (H-3)* Gen Bölgesi

Histon – 3 gen bölgesi için seçilen 58 izolattan BMP – 0480 ve izolatının PCR sonucu alınamadığından 57 izolat çalışılmıştır. PCR ürünlerinin jel üzerindeki bantları bilgisayarlı jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir. *Histon-3* bölgesine ait primerlerin bağlanma sıcaklığı 59°C olarak ayarlanmıştır (Çizelge 3.3.). Bant büyüklükleri, çoğaltılan bölge içinde

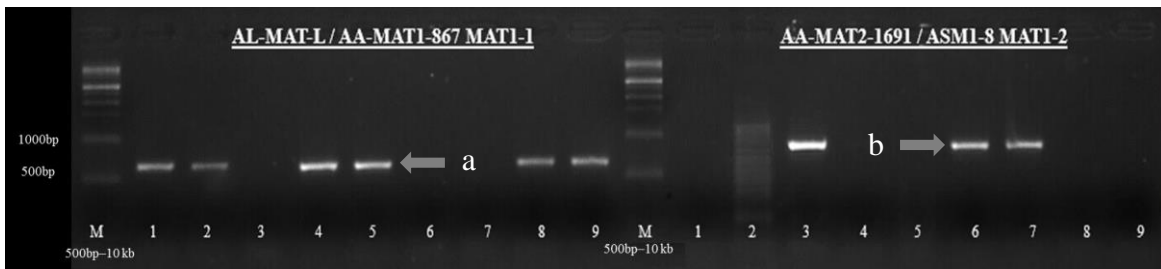
bir intronun varlığı veya yokluğuna göre bazı izolatlar için ~500 bç, bazı izolatlar için ise ~550 bç büyüklüğünde olmuştur (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. *Histon-3* bölgesinin PCR sonucu elde edilen ürünlerin elektroforez sonucu (Amplikon uzunlukları ~500 (a) bç ~550 bç (b) olarak tespit edilmiştir.).

3.2.2.5. Eşey Tipi Belirlenmesi

Seçilen 59 izolat için eşey tipinden sorumlu *MAT1* lokusu üzerindeki *Mat1.1* ve ya *Mat1.2* idiomorflarından hangisini taşıdığı moleküler yöntemlerle belirlenmiştir. *MAT1.1* idiomorfu için dizayn edilmiş AL-MAT-L / AA-MAT1867 primerleri, *MAT1.2* bölgesi için AA-MAT2-1691 / ASM1-8 primerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.3.). Eşey tiplerini belirlemede kullanılan primerlerin bağlanma sıcaklığı, 59°C olarak ayarlanmıştır. PCR ürünlerinin jel üzerindeki bantları, bilgisayarlı jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir. (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Eşey tipi lokusu PCR sonucu elde edilen ürünlerin elektroforez sonucu (*MAT1* lokusuna ait idiomorflarına ait amplikon uzunluğu *MAT1.1* için ~640 bç (a), *MAT1.2* için ~880 bç (b) olarak tespit edilmiştir.)

3.2.3. Genetik/Filogenetik İlişkilerin Analizi

Tez çalışması kapsamında, 59 izolat için 4 bölge değerlendirilmiştir. *Alt_a_1*, *EndoPG*, *Histon-3* protein kodlayan bölgeler ve *OPA1.3* anonim DNA bölgesinin sekans analizleri yapılmak üzere hizmet alımı gerçekleştirilmiştir. Sekans ürünleri, ilk önce rAPid

Alkaline Phosphatase ve Exonuclease I ile pürifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra sekans işlemi, 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Sekans işlemi, PCR ürünleri için hem ileri hem geri yönlü olarak yaptırılmıştır. İleri ve geri yönlü okumalar arasında bir uyumsuzluk görülmemiştir. Sekans işlemi sonucunda her bir pik ifadesi olan nükleotidler değerlendirilmiştir. Bazı PCR ürünlerinin bozuk gelen sonuçları tekrar PCR yapılarak sekans analizleri yapılmıştır. Alınan sekans sonuçlarının baş ve son kısımlarındaki okumadan kaynaklanan bozuk okumalar, Bioedit v7.0.53 (Hall, 1999) programı ile kesilmiştir. Her bir sekans sonucu bu şekilde değerlendirilmiş, düzenlenmesi ve sıralanması (alignment) amacıyla alt alta dizilmiştir. İzolatlar çoklu (multiple) alignment yapılarak polimorfik bölgelerdeki okumalar polimorfizmlerin doğru olup olmadığının anlaşılması açısından tekrar gözden geçirilmiştir. Tüm düzenlemeler bitince NCBI/BLAST-n ile blast işlemi gerçekleştirilerek NCBI gen bankasında diğer *Alternaria* spp. izolatlarının aynı bölgelerin sonuçları kıyaslanmış ve dizilerin doğruluğundan emin olunmuştur. Alignment işlemi MEGA v6. (Tamura ve ark., 2013) programında ClustalW ile yapılmıştır. Sıralı şekilde hazırlanan diziler, okuma farklılığından kaynaklanan kısa ya da uzun kısımları, en fazla uyumun yakalandığı noktadan kesilerek kısa zincirlerde kalan boşluklar eksik (missing) veri olarak değerlendirilmiştir. Sekans verilerine ait popülasyon içi moleküler istatistikler (toplam mutasyon, tekli varyasyonlar, parsimony bilgilendirici varyasyonlar, haplotip sayısı, haplotip çeşitliliği, nükleotid çeşitliliği) DNAsp v5.1 programı ile analiz edilmiştir.

Genetik uzaklık-yakınlık ilişkisini ortaya koyan Neighbour-Joining ağacı için 4 bölgeden elde edilen tüm veri seti üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Bunun için çoklu lokus (multilocus) seti Geneious v9.1 (Kearse ve ark., 2012) programı ile oluşturulmuştur. Geneious v9.1 programında bulunan muscle yöntemi ile çoklu-düzenleme (multiple alignment) yapılmış ve diziler tekrar kontrol edilmiştir. Maksimum Parsimony ağaçları her bölge için ayrı ayrı çizilmiş ve bir dış grup (out-group) kullanılarak köklendirilmiştir. *OPA1.3* anonim DNA bölgesi ve *Alt_a_1*, *EndoPG* bölgelerinin ağaç çizimlerinde dış grup olarak *A. brassicicola* türü için baz dizilimleri NCBI'da kayıtlı ACIW00000000.1 erişim (accession) numaralı genom dizisinden çıkarılan baz dizilimleri kullanılmıştır. *Histon-3* bölgesi için dış grup olarak JX213318.1 kayıt numaralı *A. brassicicola* türüne ait baz dizilimleri kullanılmıştır.

Neighbour-Joining ve Maksimum Parsimony ağaçlarının çizimleri, PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003) programı ile yapılmıştır. Neighbour-Joining analizinde dendrogram 1000

bootstrap istatistikleri üzerinden alınmış ve %60'ın üzerinde desteklenen dallanmalar değerlendirilmiştir. Çizilen ağaçların görüntülenme işlemi için Treeview v1.6.6 ve Archaeopteryx programları kullanılmıştır.



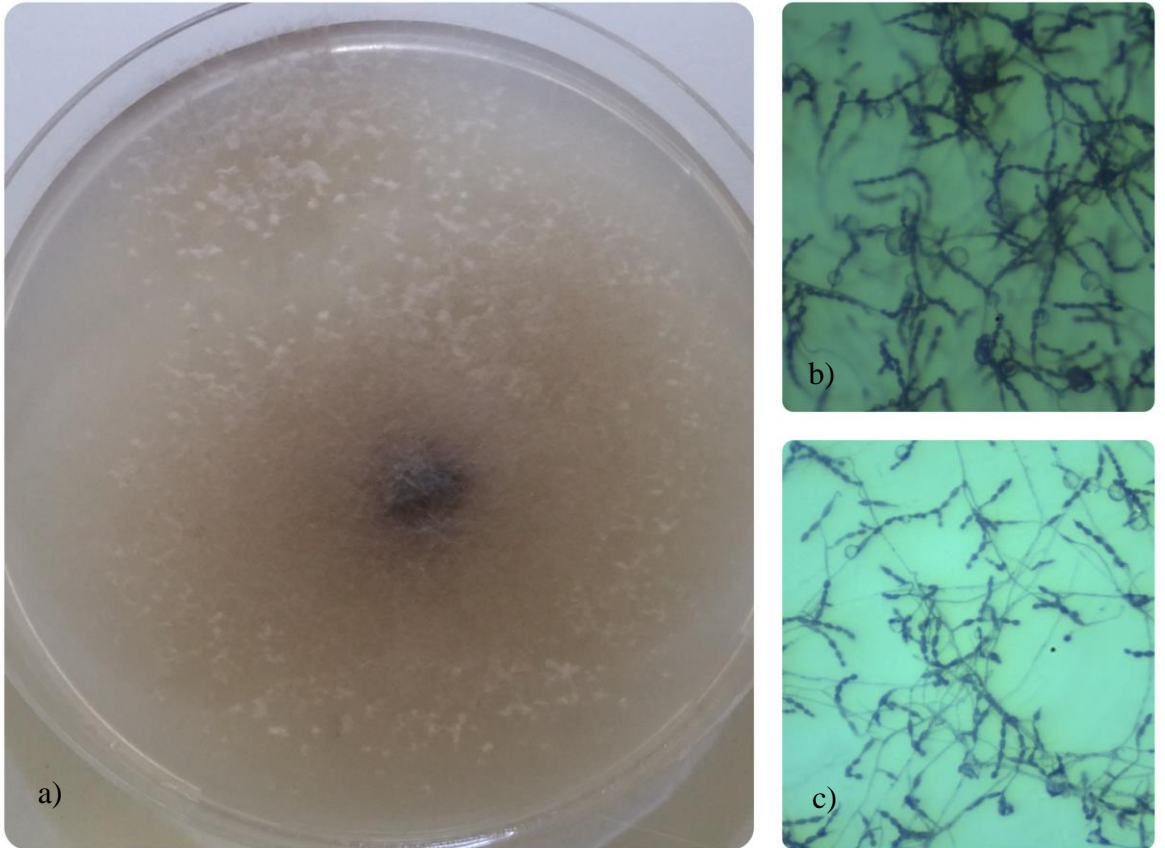
BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Araştırma Bulguları

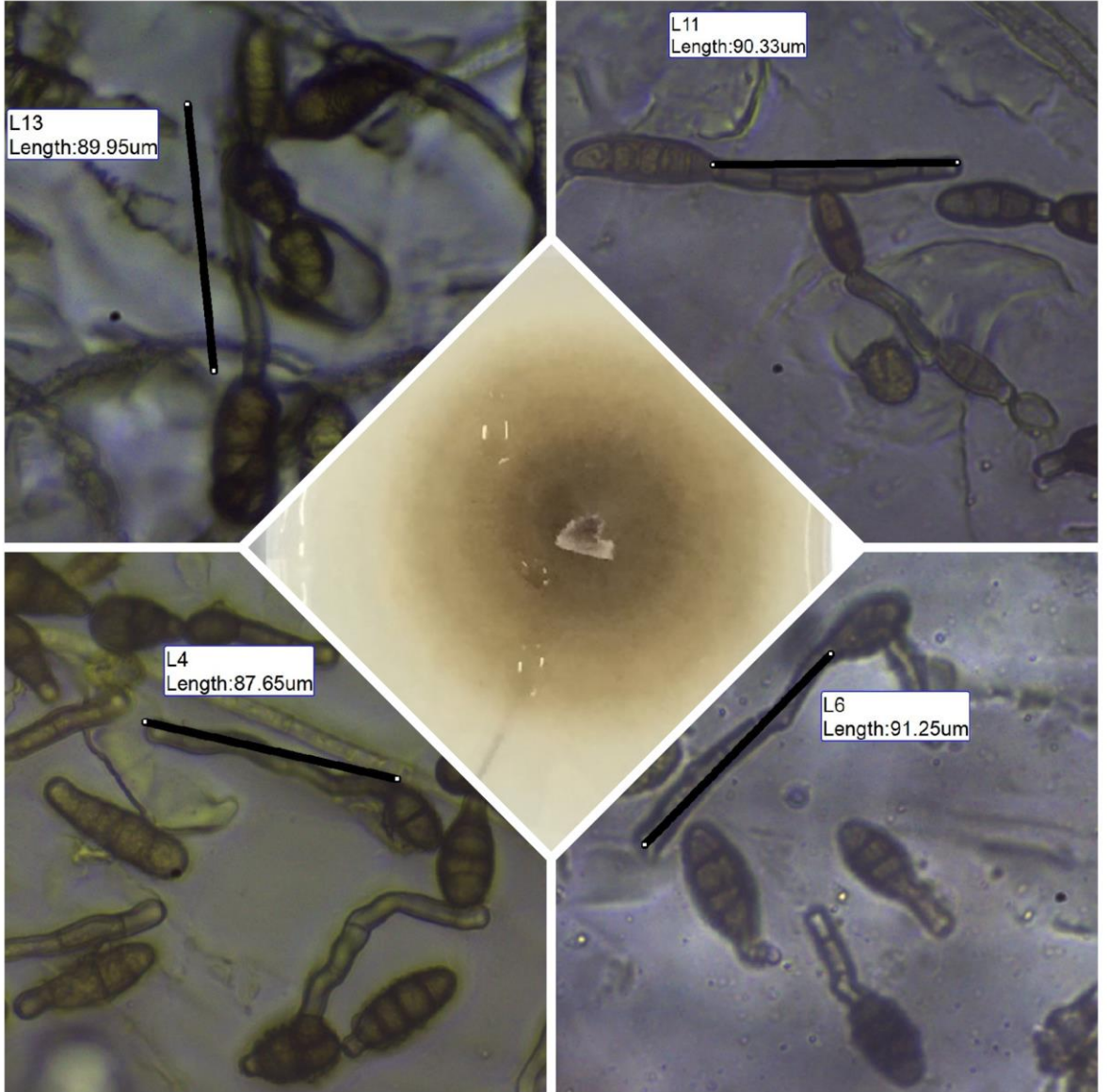
4.1.1. Besi Ortamına Bağlı Fungal Gelişimin Gözlenmesi

Alternaria spp. kültür morfolojileri, zayıflatılmış (weak)-PDA ve patates-havuç agar (PCA) ortamlarında, stereo mikroskop altında ölçümler alınarak konidiofor yapıları ve gelişimleri tez çalışması kapsamında yine değerlendirilmiştir. Zayıflatılmış PDA ortamında yurt dışından gelen izolatlarda göz önüne alınarak, konidiofor yapıları uzun zincirler şeklinde görülmüş ve bu zincirlerde ikincil dallanmalar tespit edilmiştir. Tespit edilen dallanma şekilleri, tez çalışması için seçilen koleksiyondaki bütün izolatların morfolojik olarak *Alternaria alternata* veya ikincil dallanmalar pek göstermeyen *A. tenuissima* olduğunu göstermiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. *A. alternata* zayıflatılmış (weak)-PDA kültür morfolojisi (a), stereo mikroskop görüntüsü (b ve c)

PCA ortamında ise 100 μ M'nin altında konidiofor büyüklükleri alınmıştır (Şekil 4.2.). Küçük sporlu türlerin teşhisinde kullanılan bu iki yöntem, morfolojik yapıların daha belirgin hal gelmesini ve konidiofor uzunluklarının izlenebilmesini sağlamaktadır.



Şekil 4.2. *A. alternata* PCA besi ortamında kültür morfolojisi ve ışık mikroskobu ile çekilmiş spor görüntüleri

4.1.2. Moleküler Verilerin Analizleri

4.1.2.1. *Alt_a_1* Bölgesi Varyasyonları

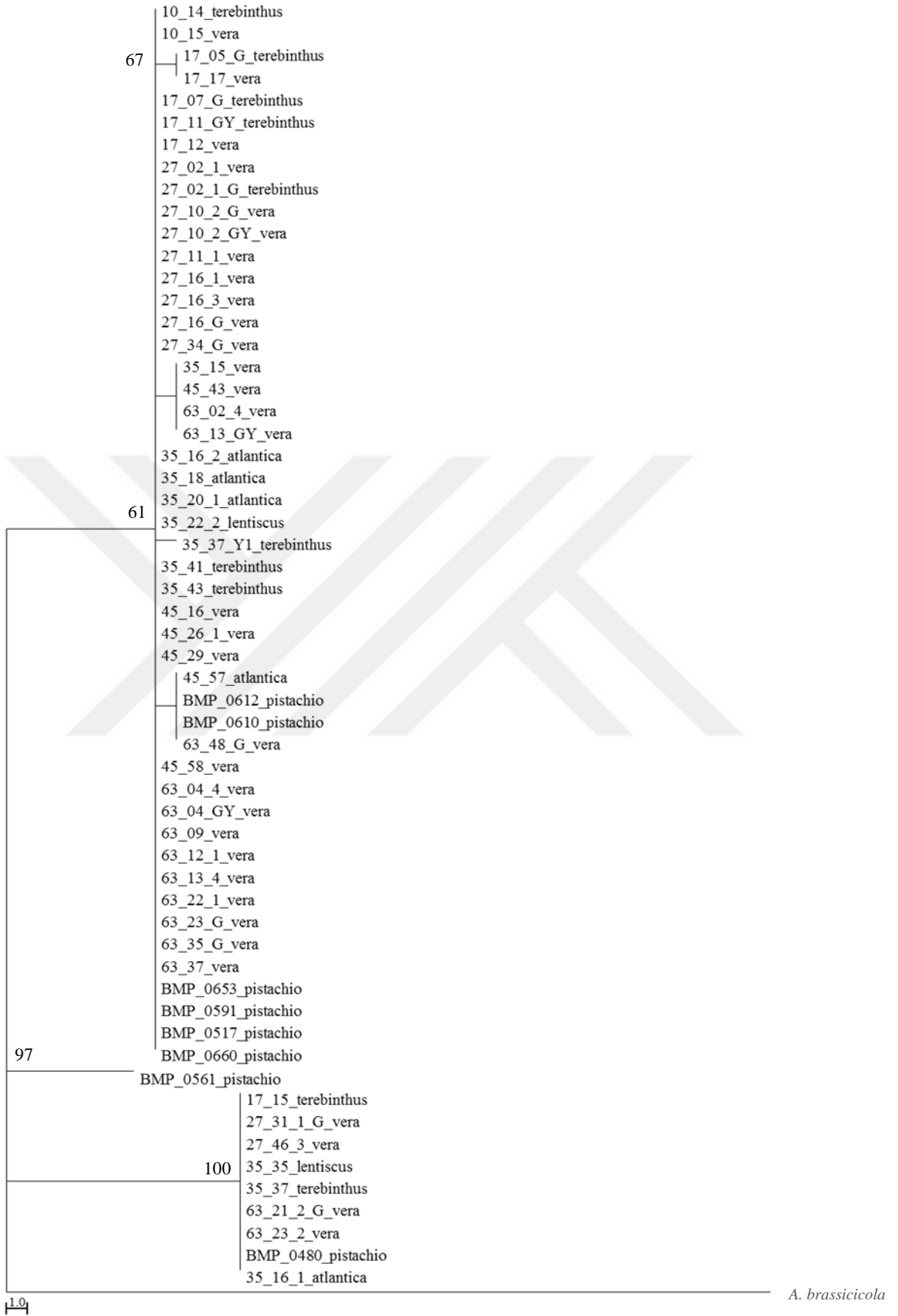
Alt_a_1 bölgesine ait sekans verisi, 368 bç uzunluğunda elde edilmiştir. Tez kapsamında çalışılan 50 *Alternaria* spp. izolatlarının sekans verileri, DNAsp v5.1 programında değerlendirilmiştir. Bu bölgeye ait baz dizilim verilerinde, 13 mutasyona rastlanmış ve 12 adet parsimony bilgilendirici varyasyon bulunmuştur. Nükleotid çeşitliliği (Pi) 0,008 olarak hesaplanmıştır.

A.B.D'de Antepfıstığı ağaçlarında tespit edilmiş, BMP kodlu 8 *Alternaria* spp. örneğinin sekans verileri de çıkarılarak ağaç çizimlerinde kullanılmıştır. Bu grup ile beraber 58 izolat *Alt_a_1* bölgesi için 5 haplotip sunmuştur. Her bir haplotip için izolat grupları Ht 1 için 35 izolat, Ht 2 için 4 izolat, Ht 3 için 8 izolat Ht 4 için 1 izolat ve Ht 5 için 2 şekilde oluşmuştur. Haplotip dağılımları ve her bir haplotip için alınan baz dizilim sonuçları, Ek1 ve Ek2' sunulmuştur.

Alt_a_1 bölgesi sekans verisi incelenerek intron kısımları belirlenmiştir. Çoğaltılan kısmın 1 adet intron ve 2 ekzon bölgesi içerdiği tespit edilmiştir. Bölgeye ait intron kısmı büyüklüğü, 59 bç olarak bulunmuştur.

4.1.2.1.1. *Alt_a_1* Bölgesi İçin Maksimum Parsimony Analizi

Maksimum Parsimony analizine ait filogram çizimi, bootstrap istatistikleri alınarak yapılmıştır. Parsimony temelli analizlerde elde edilen verilere göre alınan ortak (majority rule-consensus) ağacı çıkarılmıştır. Bootstrap istatistikleri sonucunda ağaç dallanmalarını %60'in üzerinde destekleyen değerler, ağaç üzerinde gösterilmiştir. Bölgeye ait çizilen ağaçta 3 ana kümelene ve 1 de alt kümelene ile 4 farklı grup olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3.).



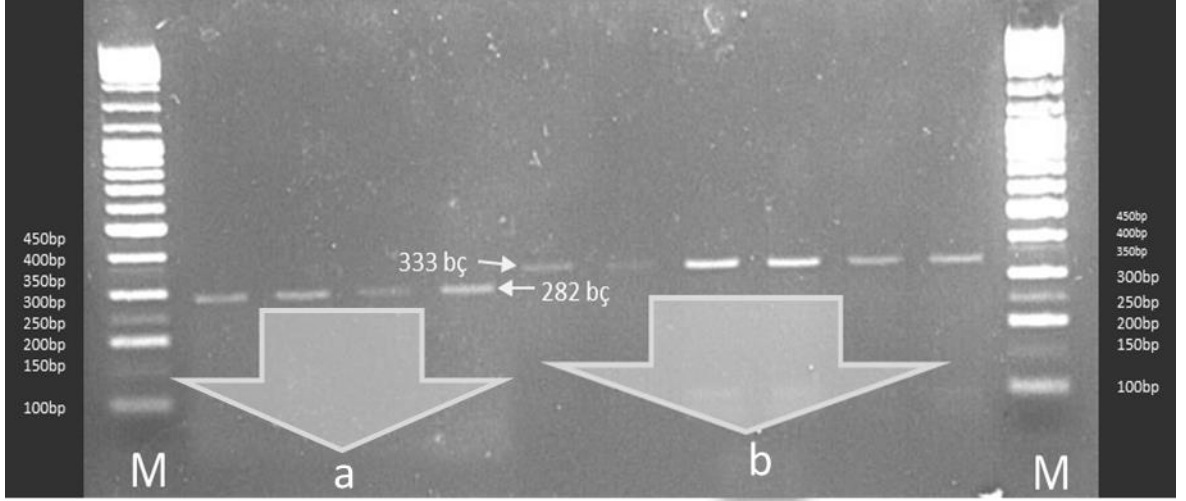
Şekil 4.3. *Alt_a_1* bölgesi için Maksimum Parsimony analizi sonucu elde edilen filogram (Bootstrap değerleri bağlantı noktaları %60 üzerinde olan gruplar gösterilmiştir.)

4.1.2.2. *EndoPG* Bölgesi Varyasyonları

EndoPG bölgesine ait sekans verisi, 419 bç uzunluğunda olmuştur. Tez kapsamında çalışılan 50 *Alternaria* spp. izolatlarının sekans verileri, DNAsp v5.1 programında değerlendirilmiştir. Lokusa ait verilerde 5 tekli mutasyon görülmüştür. Nükleotid çeşitliliği (Pi) 0,069 bulunmuştur. *EndoPG* bölgesi sekans verisi incelenmiş ve herhangi bir intron kısmını içermediği tek bir ekzon bölgesinin çoğaltıldığı tespit edilmiştir.

Ağaç çizimlerinde A.B.D'de Antepfıstığı ağaçlarında tespit edilmiş, BMP kodlu 8 *Alternaria* spp. örneğinin sekans verileri çıkarılarak ağaç çizimlerinde kullanılmıştır. Bu grup ile beraber 58 izolat *EndoPG* bölgesi için 5 haplotip sunmuştur. Her bir haplotip için izolat grupları Ht 1 için 41 izolat, Ht 2 için 1 izolat, Ht 3 için 1 izolat, Ht 4 için 4 ve Ht 5-6-7 için 1'er izolat şeklinde oluşmuştur. Haplotip dağılımları ve her bir haplotip için alınan baz dizilim sonuçları, Ek1 ve Ek3'de sunulmuştur.

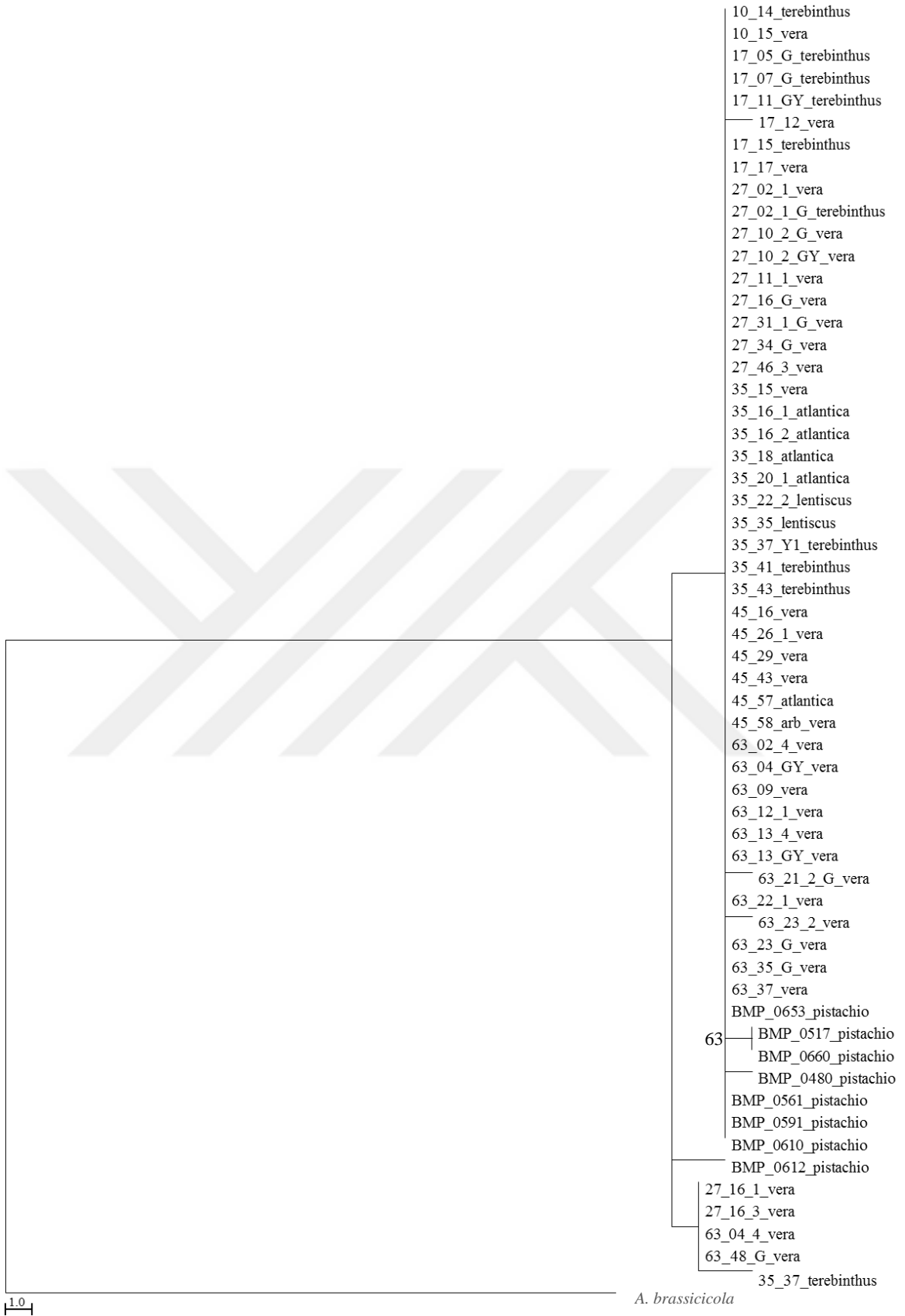
EndoPG bölgesinin düzenlenmiş sekans verisi üzerinden TaqI enziminin kesim bölgelerine bakılmıştır. Ülkemizde çeşitli bölgelerden izole edilmiş *Alternaria* spp.'ye ait 50 izolatta 2 kesim bölgesi olduğu görülmüştür. TaqI enzimi bölge üzerinde kesim noktaları 31 – 32 numaralı bazların ve 364 – 365 numaralı bazların arası olarak tespit edilmiştir. *A. arborescens* için ise 31 – 32 numaralı bazların, 313-314 numaralı bazların ve 364 – 365 numaralı bazların arası olarak 3 kesim noktası içermektedir (Şekil 4.4). *A. alternata/A. tenuissima* grubuna ait *EndoPG* bölgesi sekans verisi üzerinde TaqI enzime ait kesim noktalarına bakıldığında 31bç, 333bç ve 55bç uzunluğunda 3 banda ayırmaktadır. Aynı enzim ile *A. arborescens* türüne ait *EndoPG* sekans verisinin kesim noktalarına bakıldığında 31bç 282 bç 51bç ve 55 bç uzunluklarında bantlara ayırmaktadır. Elde edilen bu bantlar içerisinde en büyük parça olan *A. alternata/A. tenuissima* grubu için 333 bç ve *A. arborescens* için 282 bç %1'lik agaroz jel elektroforezinde görülebilmektedir (Şekil 4.4.). Bant büyüklüğü farkına dayalı olarak tür ayrımı yapılabilmektedir.



Şekil 4.4. *EndoPG* bölgesinin TaqI enzimi ile kesim yapılarak görüntülenen elektroforez jel görüntüsü, sırasıyla 4 izolat *A. arborescens* (a), ve 6 izolat *A. alternata/A. tenuissima* (b)

4.1.2.2.1. *EndoPG* Bölgesi İçin Maksimum Parsimony Analizi

Maksimum Parsimony analizine ait filogram çizimi, bootstrap istatistikleri alınarak yapılmıştır. Parsimony temelli analizlerde elde edilen verilere göre alınan ortak (majority rule-consensus) ağacı çıkarılmıştır. Bootstrap istatistikleri sonucunda %60'in üzerinde alınan değerler, ağaç üzerinde gösterilmiştir. Bölgeye ait Maksimum Parsimony ağacın da A.B.D'den temin edilen 2 izolattan oluşan grup dışında başka bir ayrım görülmemiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. *EndoPG* bölgesi için Maksimum Parsimony analizi sonucu elde edilen filogram (Bootstrap değerleri bağlantı noktaları %60 üzerinde olan gruplar gösterilmiştir.)

4.1.2.3. *Histon-3* Bölgesi Varyasyonları

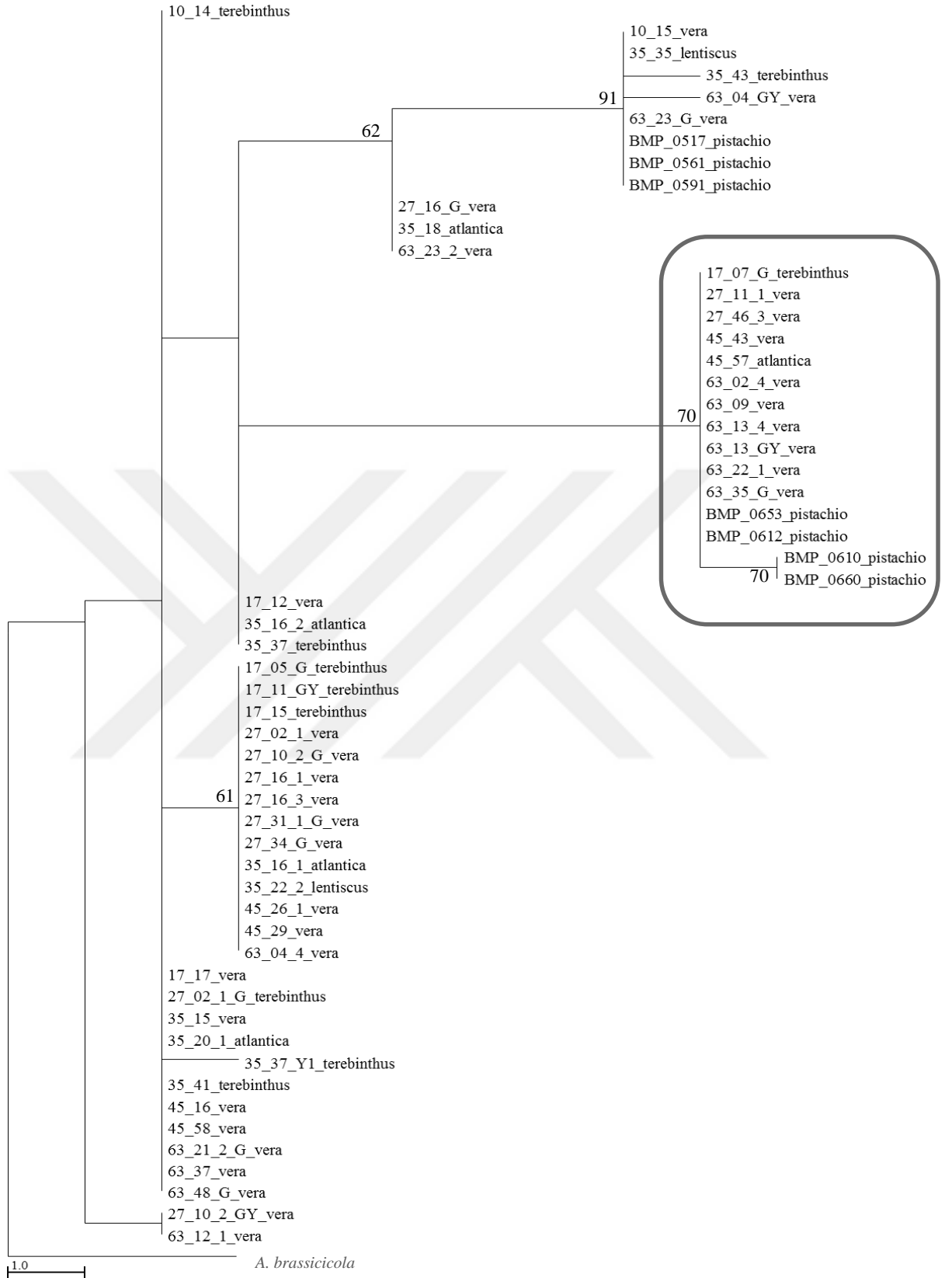
Histon-3 lokusuna ait sekans verisi, 386 bç ve 334 bç uzunluğundadır. Tez kapsamında çalışılan 50 *Alternaria* spp. izolatının sekans verileri, DNAsp v5.1 programında değerlendirilmiştir. Bölgeye ait verilerde, 15 mutasyona rastlanmış, 2 tekli mutasyon görülmüş ve 13 adet parsimony bilgilendirici varyasyon bulunmuştur. Nükleotid çeşitliliği, (Pi) 0,013 olarak hesaplanmıştır.

A.B.D’de Antepfıstığı ağaçlarında tespit edilmiş, BMP kodlu 7 *Alternaria* spp. örneğinin sekans verileri çıkarılarak ağaç çizimlerinde kullanılmıştır. Bu grup ile beraber 57 izolat *Histon-3* bölgesi verilerine göre 10 haplotip sunmuştur. Her bir haplotip için izolat grupları Ht 1 için 10 izolat, Ht 2 için 14 izolat, Ht 3 için 12 izolat Ht 4 için 1 izolat, Ht 5 için 2 izolat, Ht 6 için 3 izolat, Ht 7 için 1 izolat, Ht 8 için 1 izolat, Ht 9 için 3 izolat ve Ht 10 için 3 izolat şeklinde oluşmuştur. Haplotip dağılımları ve her bir haplotip için alınan baz dizilim sonuçları, Ek1 ve Ek4’de sunulmuştur.

Histon-3 bölgesi sekans verisi incelendiğinde, 2 ekzon ve 2 intron bölgesi olduğu görülmüştür. İtron bölgelerinden biri çoğaltılan DNA bölgesinin 5’ başlangıç kısmında yer almakta, diğeri ise tüm izolatlarda görülmemektedir. Bu nedenle bölgeye ait bir intron giriş çıkışı olduğu tespit edilmiştir.

4.1.2.3.1. *Histon-3* Bölgesi İçin Maksimum Parsimony Analizi

Maksimum Parsimony analizine ait filogram çizimi, bootstrap istatistikleri alınarak yapılmıştır. Parsimony temelli analizlerde elde edilen verilere göre alınan ortak (majority rule-consensus) ağacı çizilmiştir. Bootstrap istatistikleri sonucunda, %60’in üzerinde alınan değerler, ağaç üzerinde gösterilmiştir. *Histon-3* bölgesi için çizilen Maksimum Parsimony ağacında %60’ın üzerinde desteklenen 5 adet alt kümelenme tespit edilmiştir (Şekil 4.6.). Bu bölgenin sekans verileri ile çizilen Parsimony ağacında, %70 ile desteklenen intron girişinin görüldüğü 15 izolat tespit edilmiş ve Şekil 4.6.’de kutu içerisinde gösterilmiştir. Bu izolatlar %70’lik bootstrap değeri ile ayrı bir grup olarak görülmüştür. Bu 15 izolatın 11 tanesi, proje kapsamında izole edilmiş izolatlardan seçilen grup içerisinde, 4 tanesi ise A.B.D. orijinli izolatlar seçilen gruptan oluşmaktadır.



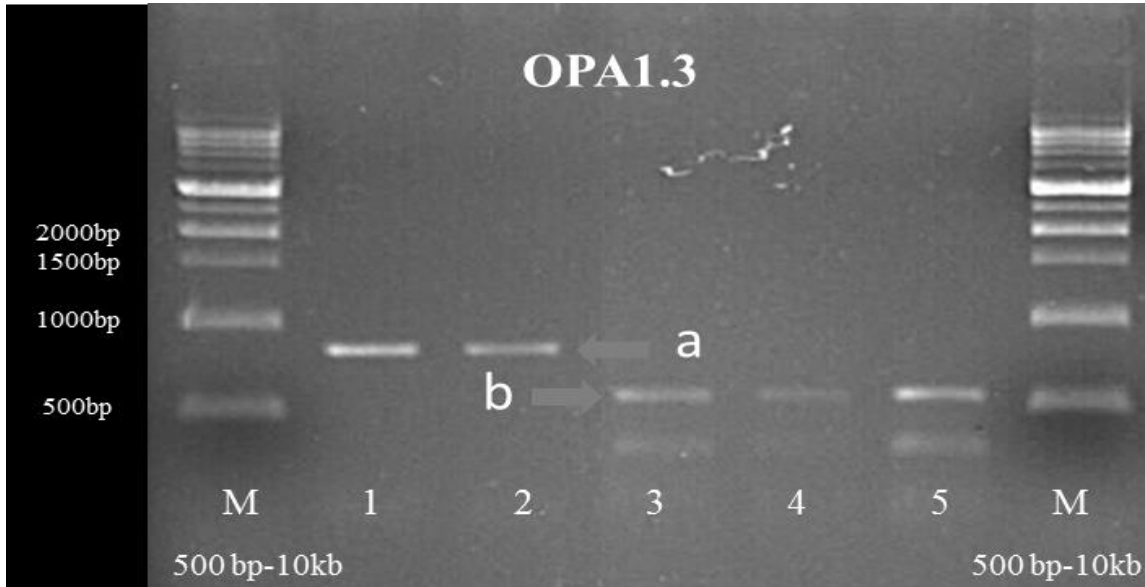
Şekil 4.6. *Histon-3* bölgesi için Maksimum Parsimony analizi sonucu elde edilen filogram (Bootstrap değerleri bağlantı noktaları %60 üzerinde olan gruplar gösterilmiştir. Kutu içine alınan kısımda intron girişinin gözlemlendiği 15 izolat gösterilmiştir.)

4.1.2.4. *OPA1.3* Anonim DNA Bölgesi Varyasyonları

OPA1.3 bölgesine ait sekans verisi, 819 bç uzunluğundadır. Tez kapsamında çalışılan 50 *Alternaria* spp. izolatlarının sekans verileri, DNAsp v5.1 programında değerlendirilmiştir. Lokusa ait verilerde 49 mutasyona rastlanmış, 4 tekli mutasyon görülmüş ve 44 adet parsimony bilgilendirici varyasyon bulunmuştur. Nükleotid çeşitliliği (Pi) 0,017 bulunmuştur.

A.B.D’de Antepfıstığı ağaçlarında tespit edilmiş, BMP kodlu 8 *Alternaria* spp. örneğinin sekans verileri çıkarılarak ağaç çizimlerinde kullanılmıştır. Bu grup ile beraber 58 izolat *OPA1.3* bölgesinden alınan verilere göre 12 haplotip sunmuştur. Her bir haplotip için izolat grupları Ht 1 için 3 izolat, Ht 2 için 20 izolat, Ht 3 için 1 izolat Ht 4 için 7 izolat, Ht 5 için 3 izolat, Ht 6 için 1 izolat, Ht 7 için 2 izolat, Ht 8 için 1 izolat, Ht 9 için 1 izolat, Ht 10 için 2 izolat, Ht 11 için 3 izolat ve Ht 12 için 6 izolat şeklinde oluşmuştur. Haplotip dağılımları ve her bir haplotip için alınan baz dizilim sonuçları Ek1 ve Ek5’de sunulmuştur.

OPA1.3 bölgesi üzerinde *ApaI* enzimi ile kesim yapılmıştır. Ülkemizde çeşitli bölgelerden izole edilmiş 50 *A. alternata/A. tenuissima* grubu izolatlarında 2 kesim bölgesi olduğu görülmüştür. Kesim noktaları, *OPA1.3* bölgesi üzerinde 55-56 numaralı bazlar ve 349-350 numaralı bazların arasında tespit edilmiştir. Kesim bölgesine ait görüntü Şekil 4.7. de gösterilmiştir.

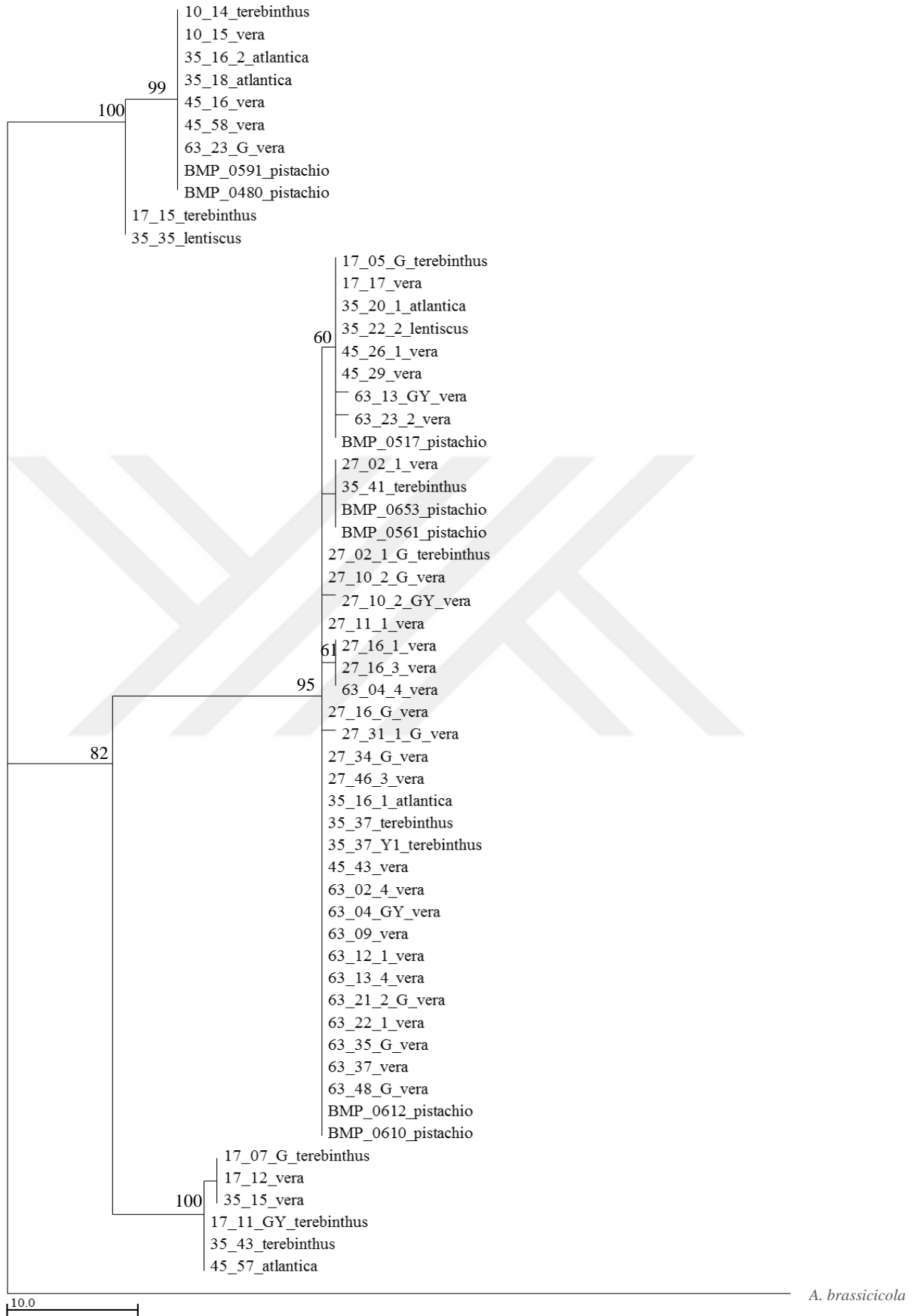


Şekil 4.7. *OPA1.3* anonim DNA bölgesinin *ApaI* enzimi ile kesim yapılarak görüntülenen elektroforez jel görüntüsü, 1 ve 2 numaralı izolatlar *A. arborescens* (a), 3, 4 ve 5 *A. alternata* (b)

4.1.2.4.1. *OPA1.3* Anonim DNA Bölgesi ve Maksimum Parsimony Analizi

Maksimum Parsimony analizine ait filogram çizimi, bootstrap istatistikleri alınarak yapılmıştır. Parsimony temelli analizlerde elde edilen verilere göre alınan ortak (majority rule-consensus) ağacı çizilmiştir. Bootstrap istatistikleri sonucunda %60'ın üzerinde alınan değerler, ağaç üzerinde gösterilmiştir. Bölgeye ait Maksimum Parsimony ağacında, 2 adet ana kümelenme ve 5 adet alt kümelenme tespit edilmiştir (Şekil 4.8.).





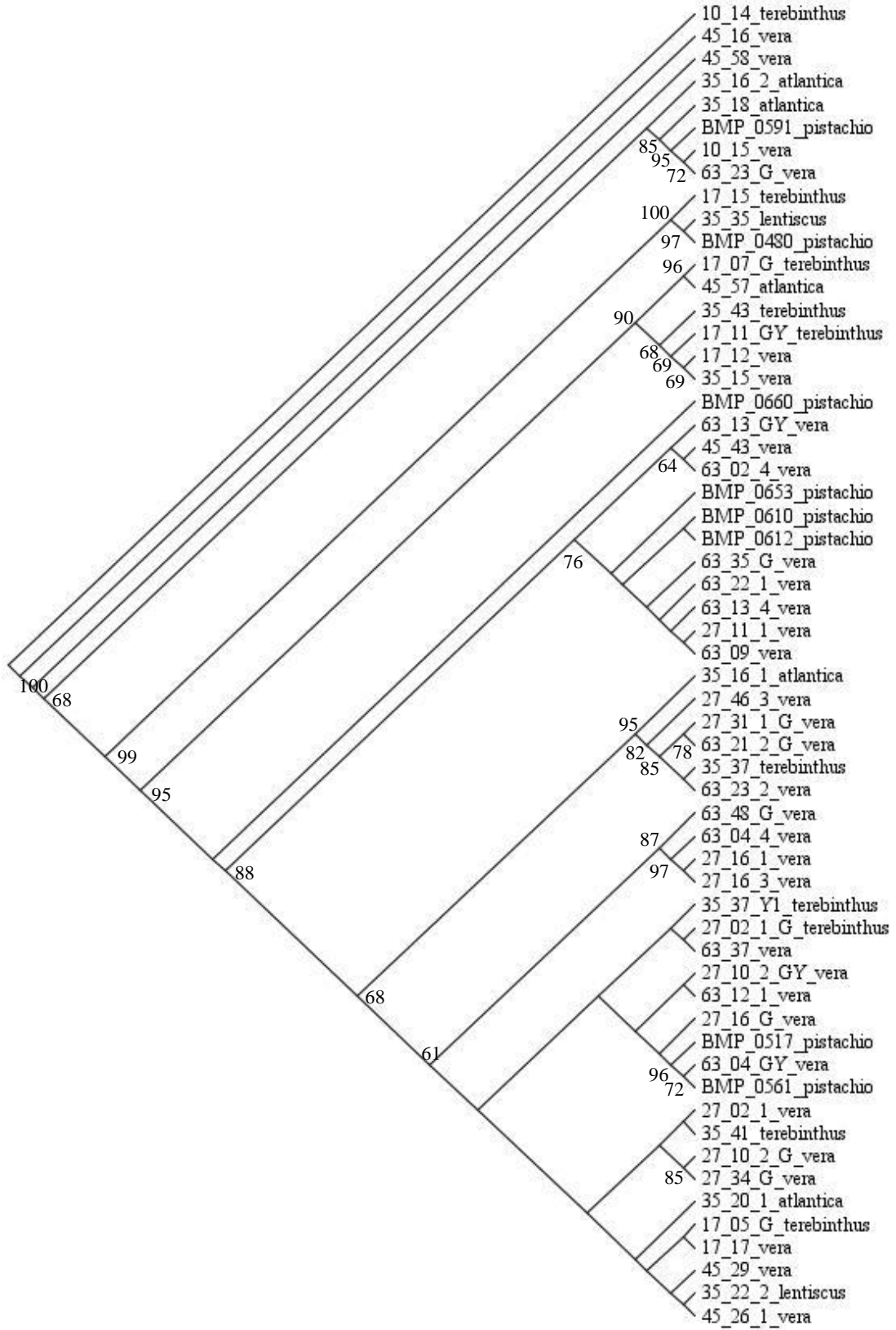
Şekil 4.8. *OPA1.3* anonim DNA bölgesi için Maksimum Parsimony analizi ile elde edilen filogram (Bootstrap değerleri bağlantı noktaları %60 üzerinde olan gruplar gösterilmiştir.)

4.1.2.5. Sekanslanan Bölgelerin Multilokus Dizisi ve Neighbour-Joining Analizi

Uzaklık yakınlık temelli Neighbour-Joining analizi ile dendogram çizimi yapılmıştır. Ağaç gruplarının 1000 bootstrap istatistikleri analiz edilmiş ve %60'in üzerinde alınan değerler, ağaç üzerinde gösterilmiştir.

Sekans verisi alınan her bir bölge için Neighbour-Joining analizleri yapılarak dendogramlarına bakılmıştır. Dört genomik DNA bölgesinden alınan veriler üzerinden çizilen Neighbour-Joining ağacı üzerinde çok sayıda dallanmalar görülmüştür (Şekil 4.9.). Ancak bu dallanmalar bölge, konukçu veya örnekleme dönemi gibi izolat orijinlerine bağlı bir gruplandırma yapmamıştır. Bu gruplar, çok kuvvetli desteklenen gruplanmalar olmamıştır. Genel olarak varyasyonların bulunduğu bir popülasyon yapısına işaret etmiştir.

Multilokus verisinin Neighbour-Joining analizi ile oluşturulan dendogramda 27 alt grup oluştuğu görülmüştür. *Histon-3* bölgesinde intron girişi olan 15 izolattan oluşan gruba ait 12 izolatin burada da ayrıldığı görülmüştür.



Şekil 4.9. Multilokus verileri ile Neighbour-Joining analizi sonucu elde edilen dendrogram (Bootstrap değerleri bağlantı noktaları %60 üzerinde olan gruplar gösterilmiştir.)

4.1.3. Eşey Tipi Analizleri

Tez çalışmasında kullanılan bütün izolatların *MAT1.1* ve *MAT1.2* eşey tipi (mating type) skorları, bölge konukçu ve tür bazında çıkarılmıştır. *Alternaria* spp. izolatları için yapılan bu çalışmada, her iki idiomorf lokus gözlenmiş ve tür içindeki heterotallik ayırım doğrulanmıştır. PCR analizi ile elde edilen sonuçlarda, *MAT1.1* eşey tipini kanıtlayan 20 izolat ve *MAT1.2* eşey tipi varlığını kanıtlayan 30 izolat tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) ve yabancı türlerinde *Alternaria* yanıklık etmeni *Alternaria* spp. türüne ait izolatların tür, bölge ve konukçu bazında gösterilen eşey tipi dağılımları

Tür	<i>MAT1.1</i>:<i>MAT1.2</i>	Chi-Square	<i>P</i> değeri
<i>A. alternata</i> / <i>A. tenuissima</i> grubu	20:30	2	0,15

Bölge	<i>MAT1.1</i>:<i>MAT1.2</i>	Chi-Square	<i>P</i> değeri
Güneydoğu Anadolu Bölgesi	10:15	1	0,31
Ege / Marmara Bölgesi	10:15	1	0,31

Konukçu	<i>MAT1.1</i>:<i>MAT1.2</i>	Chi-Square	<i>P</i> değeri
<i>P. vera</i>	14:19	0,75	0,38
<i>P. terebinthus</i> / <i>P. atlantica</i> / <i>P. lentiscus</i> (Yabancı türler)	6:11	1,47	0,22

Eşey tipi izolatların bölgesel dağılımı, konukçu orijini ve toplam izolat sayısı göz önüne alındığında 1:1 oranında olduğu belirlenmiştir. Bölgesel dağılım sonuçları, Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Ege / Marmara Bölgesi olarak iki grupta sunulmuştur (Çizelge 4.1.).

Konukçu türü bazında eşeysel dağılım, *P. vera* ve yabancı türler (*P. terebinthus* /*P. atlantica* /*P. lentiscus*) olarak ayrılmıştır (Çizelge 4.1.). Yine bu faktöre göre eşey dağılımı 1:1 oranında tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Yurt dışından gelen izolatlara ait eşey tipi sonuçları

Tür	MAT1.1:MAT1.2	Chi-Square	P değeri
A. alternata/A. tenuissima grubu	4:4	0	1

A.B.D.'den temin edilen izolatların da eşey tipi için PCR'ları yapılarak eşey tipi sonuçları çıkarılmış ve çalışılan BMP kodlu bu 8 izolat için de eşey tipi oranı 1:1 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2.).

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında, kültürü yapılan Antepfıstığı ve doğal yayılım gösteren yabancı Antepfıstığı türlerinde hastalığa neden olan *Alternaria* spp.'nin, Antepfıstığı'nın ağırlıklı olarak üretildiği Güneydoğu Anadolu Bölgesi ile, özellikle yabancı *Pistacia* türlerinin doğal yayılım gösterdiği Marmara/Ege Bölgelerinden seçilen iki popülasyonunda genetik varyasyonlar araştırılmıştır. Ayrıca A.B.D.'den örneklenmiş Antepfıstığı'nda *Alternaria* yanıklık etmeni *A. alternata* ve *A. tenuissima* izolatları da değerlendirilmiştir. Bu amaçla çeşitli genomik DNA bölgelerinin sekans verileri analiz edilmiştir. Ayrıca bu türün eşeysiz olmasına rağmen farklı eşey tiplerini temsil eden ve eşeyli üremede fonksiyonel olan *MAT* genleri, PCR ile çoğaltılarak *Alternaria* spp. eşey tiplerinin dağılımı incelenmiştir.

Seçilen koleksiyon, *alternata*-tür grubuna ait olmuştur. Morfolojik olarak *A. alternata* ve *A. tenuissima* türlerini içermekle beraber, bu iki morfo-türün moleküler çalışmalarda *A. alternata* ile birlikte tek bir genetik/filogenetik türü temsil ettiği görülmüştür (Özkılınç ve ark., TÜBİTAK-TOVAG 112O554 numaralı proje). Seçilen izolatların morfolojik karakterleri, yine tez çalışması kapsamında tekrar gözden geçirilmiştir. Koloni morfolojileri oldukça çeşitlilik göstermiştir. Sporulasyon paterni ve konidiofor uzunluklarının değerlendirilmesinin ise bu grubun tanımlanmasında daha başarılı olduğu görülmüştür. Ancak yine de özellikle plastik karakterde ve oldukça benzer morfolojik kriterler sergileyen bu türlerin ayırımında, moleküler yaklaşımlar daha uygun görülmektedir. *Alternaria* cinsi ve özellikle *alternata*-tür grubu için de yakın dönem literatürü ve Türkiye'deki *Alternaria* yanıklık etmen/etmenlerinin araştırılmasına olanak sağlayan TÜBİTAK-TOVAG 112O554 numaralı proje sonuçları, tür ayırımlarını moleküler yaklaşımlarla daha başarılı ve güvenilir bir şekilde ortaya koymuştur (Özkılınç ve ark., TÜBİTAK-TOVAG 112O554 numaralı proje). Ayrıca küçük sporlu *alternata*-tür grubu için tür teşhisinin daha hızlı ve yüksek başarı oranı ile doğru bir şekilde yapılabildiği moleküler markırlar da yakın dönemde önerilmiştir.

Tymon ve ark. (2005) tarafından *OPA1.3* bölgesinin *ApaI* restriksiyon enzimi ile kesimi, *A. alternata*/*A. tenuissima* grubu ve *A. arborescens* tür ayırımına olanak veren bant profilleri sunmuştur. *A. alternata* morfo-tür grubunun 2 kesim bölgesi, *A. arborescens* morfo-tür grubunun ise 1 kesim bölgesi bulunduğu bildirilmiştir. Böylece restriksiyon enzimleri tabanlı tür teşhisi yapılmıştır. *OPA1.3* bölgesi üzerindeki enzim kesim değerlendirmesinin, genellikle morfolojik tür teşhisini desteklediği, birkaç izolat için bu uyumun görülmediği bildirilmiştir (Tymon ve ark., 2015). Tez çalışması kapsamında,

sekanslanan *EndoPG* bölgesi içerisinde TaqI restriksiyon enzimine ait kesim bölgesinin *A. alternata/A. tenuissima* morfo-tür grubu için 2 kesim bölgesi, *A. arborescens* morfo-tür grubunun ise 3 kesim bölgesi bulunduğu tespit edilmiş ve tür ayrımını sağladığı görülmüştür. Tez kapsamında çalışılan *A. alternata/A. tenuissima* izolatlarında 2 kesim bölgesi olduğu görülmüştür. Restriksiyon enzim kesiminden sonra agaroz jel elektoroforezinde de oluşan büyük bantlardan *A. alternata/A. tenuissima* grubu için 333 bç ve *A. arborescens* için 282 bç büyüklüğünde bantların gözlenmesi ile de tür ayrımı hızlı bir şekilde yapılabilmektedir. Ayrıca bu enzim kesimi, morfolojide ara tip karakterleri sergileyen ancak moleküler/filogenetik tür ayrımında *A. arborescens* olarak işaretlenmiş olan (Özkılınç ve ark., TÜBİTAK-TOVAG 112O554 numaralı proje) ara tip izolatları *A. arborescens* olarak ayırabilmiştir. *OPA1.3* bölgesi üzerinden ApaI enzim kesim bölgelerine göre bu ara tiplerin ayrımı yapılamamıştır. TaqI enzimi *A. arborescens* ve *A. alternata/A. tenuissima* ayrımı için kullanılabilir bir markır olarak önerilebilir.

Farklı konukçu ve bölgelerden örneklenmiş popülasyonların çalışılan 4 DNA bölgesine (*Alt_a_1*, *EndoPG*, *Histon-3* ve *OPA1.3*) ait sekans verilerine göre çoğunlukla izolatların tek bir haplotip grubunda toplandığı, diğer haplotip gruplarının izolat sayılarının az olduğu görülmüştür. Böylece coğrafik bölge veya konukçu orijininin *Alternaria* spp. patojen popülasyon genetik yapıları üzerinde önemli bir seçim faktörü olmadığı anlaşılmıştır. Hatta A.B.D. ve Türkiye orijinli izolatların çeşitli varyasyonlar olsa da farklı gruplar olarak görülmemesi, bu patojen için coğrafik ayrımın ülkeler bazında da etkili bir faktör olmadığı görülmüştür. Yaygın klonal yapı tek bir haplotipin baskınlığı ile görülmüştür. Bununla beraber yine de varyasyonlar mevcuttur ve az sayıda da olsa farklı haplotipler bulunmuştur. Bu sonuç, bir çeşitlenmenin başladığına veya sürdüğüne işaretler. Aseksüel bir tür olan *Alternaria* spp. popülasyonlarında görülen bu çeşitliliğinin, herhangi bir karakter açısından ne derece önemli olduğu bilinmemektedir. Eşeyli üreme yapıları henüz görülmeyen bu tür için var olan çeşitliliğin, aktarabilir olup olmadığı bilinmemektedir.

Alt_a_1 bölgesi verilerine göre çizilen Maksimum Parsimony analizine ait filogram 3 farklı ana grup ve 1 alt grup ortaya çıkarmıştır. Bölge için oluşturulan filogramda bir grubun %100'lük bir değerle ayrıldığı görülmüştür. Yurt dışından gelen BMP_0561 no'lu izolat tek başına %97 ile ayrılmıştır. Diğer iki grupta düşük çeşitlilik görülmüştür. Konukçu ya da izolatın toplanma dönemi ile ilişkilendirilebilecek bir varyasyon bulunamamıştır. Maksimum Parsimony sonuçlarına göre *EndoPG* bölgesine üzerinden kuvvetli bir ayırım yakalanmamış, sadece yurt dışından gelen 2 izolat %60 değerinde bir alt grup oluşturmuştur. Diğer taraftan *EndoPG* bölgesinin de morfolojik tür ayrımı için önemli moleküler markır

olarak kullanılabilmesi belirlenmiştir. *Histon-3* bölgesinde 5 alt gruba işaret eden varyasyonlar yakalanmıştır. Bu varyasyonlara ek olarak intron girişi veya çıkışından kaynaklanan varyasyon tespit edilmiştir. Moleküler varyasyonun tespitinde, diğerlerinde olmayan bir intron bölgesini içeren 15 izolat tek başına bir alt grup oluşturmuştur. Steenkamp ve ark. (1999), *Histon* gen bölgesinin sekans ve RFLP analizleri ile çam ağaçlarının patojeni *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* için hem tür hem konukçu ayrımı yapılabildiğine dair sonuçlar almıştır. Tez kapsamında çalışılan koleksiyonda *Alternaria* spp.'nin *P. vera* ve yabancı konukçu gruplarına bakıldığında, konukçu veya bölge üzerinden anlamlı bir ayırım görülmemiştir. Yine bölge üzerinde restriksiyon enzimlerinin kesim noktalarına bakılmış ve herhangi bir ayırma işaret eden kesim noktalarının varlığı tespit edilememiştir. *OPAI.3* bölgesi için çizilen filogramda 2 ana grup içerisinde 6 adet alt dallanma görülmüştür. Çalışılan bu bölgeler içerisinde *OPAI.3*, izolatları ana gruplar içinde toplayan varyasyonlar sunmuştur ve bu bölge küçük sporlu *alternata* grubu için önceki çalışmalarda da oldukça başarılı bulunmuştur (Start ve ark., 2014; Andrew ve ark., 2009).

Çalışılan 4 genomik bölgenin çok-lokuslu veri seti üzerinden izolatların uzaklık-yakınlık temelli Neighbour-Joining ağacı da çeşitli dallanmalar ile varyasyonunu sergilemiş ancak *Alternaria* spp. popülasyonlarını herhangi bir faktör ile ilişkilendirmek mümkün olmamıştır. Gerek Neighbour-Joining gerek Parsimony temelli yaklaşımlarla ortaya çıkarılan bu varyasyonlar, sürekli desteklenen bir filogenetik hattı temsil etmemiştir. Bölgelerde var olan varyasyonlar, çoğunlukla ağaçlarda iç dallanmalar oluşturmuştur. İç dallanmaları ise filogenetik açıdan anlamlandırmak pek mümkün olmamaktadır.

Tez kapsamında çalışılan *Alternaria* türlerinin aseksüel olduğu bilinmektedir. Bu grup, eşeysiz üreme yapısı sergilemesine rağmen eşey tipini belirleyen ve eşeyli üremede fonksiyonel *MATI* lokusuna sahiptir. Türün *MATI* lokusuna ait *MATI.1* ve *MATI.2* idiomorflarını taşıdığı bilinmektedir (Arie ve ark., 1999). Eşey tipi dağılımları izolatların toplandığı konukçu, dönem ve bölge göz önüne alınarak değerlendirilmiştir. Bu üç faktör için değerlendirme yapıldığında, eşey tipi oranının 1:1 olduğu görülmüştür. A.B.D.'den gelen izolatlarında eşey tipi dağılımlarına bakılmıştır. *A. alternata/A. tenuissima* türüne ait 8 BMP kodlu izolatın eşey tipi dağılımları 1:1 oranında bulunmuştur. Eşey tiplerinde görülen bu varyasyon, aseksüel olan *Alternaria* spp. türlerinde, eşey üremenin söz konusu olduğunu/olabileceğini düşündürmektedir. Benzer bir sonuç, Çin'de patatesten örneklenmiş *A. alternata* popülasyonlarında görülmüş ve eşey tiplerinin eşit oranda dağılımı kriptik seksüel üreme olabileceği yorumuyla açıklanmıştır (Meng ve ark., 2015).

Tez çalışması kapsamında, aseksüel olduğu bilinen ve ülkemizde ciddi bir fitopatogen etmen olan *Alternaria* spp. popülasyonlarında tür içi genetik varyasyonlar çeşitli moleküler markırlar ile gösterilmiştir. Bu sonuçlar, olası bir seksüel veya kriptik eşeyli üremeye işaret etmektedir. Halen mevcut baskın klonal yapı olmasına rağmen bu çeşitliliğin, ileride bir anlam ifade etmesi ve farklı filogenetik hatların evrimleşmesi muhtemeldir. Güneydoğu Anadolu Bölgesi, ülkemizde Antepfıstığı üretiminin merkezi iken ve daha fazla patojen çeşitliği beklenirken Batı bölgelerindeki popülasyonlarda görülenden farklı bir varyasyona rastlanmamıştır. Türkiye ve A.B.D. orijinli izolatlar da ayrı genetik gruplar olarak görülmemiştir. Bu bağlamda, ülke orijininin de etkili bir faktör olmadığı yorumlanmıştır. Kültür veya yabancı konukçu faktörünün de patojen popülasyonlardaki varyasyonu etkilemesi beklenirken, bu patojen popülasyon için konukçu faktörü de anlamlı görülmemiştir. Tüm bunlar, patojen göçlerinde coğrafya veya konukçunun sınırlayıcı bir faktör olmayacağına da işaret etmektedir. Bu patojenle mücadelede tek bir genetik popülasyonun hâlihazırda bulunduğu görülmektedir. Ancak çeşitlenmenin hızı ve sonuçları da takip edilmelidir.

KAYNAKLAR

- Ak B.E., Sakar E., Yeşiloğlu H.M. ve Öztürk F.F., 2012. Antepfıstığı yetiştiriciliği. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Çiftçi Eğitim Seti yayın No: 2012/ 31, Ankara, 62 s.
- Andrew M., Peever T.L. ve Pryor B.M., 2009. An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex, *Mycologia*, 101: 95-109.
- Anderson J.P., Badruzsauhari E., Schenk P.M., Manners J.M., Desmond O.J., Ehlert C., Maclean D.J., Ebert P.R. ve Kazana K., 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate– ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16, 3460–3479.
- Aradhya M.K., Chan H.M. ve Parfit D.E., 2001. Genetic variability in the pistachio late blight fungus, *Alternaria alternata*, *Mycological Research*, 105, 300–6.
- Armitage ve Andrew D., 2013. *Alternaria alternata* leaf spot pathogens : genetics, evolutionary history and diagnostics. PhD thesis, University of Warwick.
- Arie T., Christiansen S.K., Yoder O.C. ve Turgeon B.G., 2007. Efficient cloning of ascomycete mating type genes by PCR amplification of the conserved MAT HMG Box., *Fungal Genet Biol.* 21(1):118-30.
- Arie T., Yoshida T., Shimizu T., Kawabe M., Yoneyama K. ve Yamaguchi I., 1999. Assessment of *Gibberella fujikuroi* mating type by PCR, *Mycoscience* 40:311-314.
- Arie T., Kaneko I., Yoshida T., Noguchi M., Nomura Y. ve Yamaguchi I., 2000. Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13,1330-38.
- Ash G.J. ve Lanoiselet V.M., 2001. First report of *Colletotrichum acutatum* causing a leaf spot and hull rot of Pistachio in New South Wales. *Australasian Plant Pathology*. 30, 365-366.
- Berbee M.L., Payne B.P., Zhang G., Roberts, R.G. ve Turgeon, B.G., 2003. Shared ITS DNA substitutions in isolates of opposite mating type reveal a recombining history for three presumed asexual species in the filamentous ascomycete genus *Alternaria*, *Mycological Research*, 107, 169-182.

- Billiard S., López-Villavicencio M., Hood M.E. ve Giraud T., 2012 . Sex, outcrossing and mating types: unsolved questions in fungi and beyond, *J Evol Biol.* Jun;25(6):1020-38.
- Bihon W., Cloete, M., Gerrano, A., Adebola, P., ve Oelofse, D., 2015. First report of *Alternaria alternata* causing leaf blight of onion in South Africa. *Pl. Dis.* 99(11): 1652.
- Bustan A., Cohen, S., Erlich, O., ve Tsrer, L., 2007. *Cladosporium* species and *Alternaria alternata* cause serious post-harvest early calyx decay (PHECD) in truss tomatoes in Israel. *New Disease Reports* 15: 62.
- Bolkan H.A., Ribeiro W.R.C., ve Dianese J.C., 1983. Occurrence and pathogenicity of *Alternaria brassicicola* in Brazil. *Plant Dis.* 67: 825-827.
- Crane J.C. ve Iwakiri B.T., 1981. Morphology and reproduction of pistachio. *Horticultural Reviews*, 3:376-393.
- Coppin E., Debuchy R., Arnaise S., ve Picard M., 1997. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 411–428.
- Dobinson ve Katherine F., 1995. Genetic transformation of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*, *Canadian Journal of Botany*, 1995, 73(5): 710-715, 10.1139/b95-076.
- Doster M.A. ve Michailides T. J., 1995. The development of early split pistachio nuts and their contamination by molds, aflatoxins and insects, *Acta Horticulturae*, 415:359-364.
- Doster M.A., ve Michailides T.J., 1999. Relationship between shell discoloration of pistachio nuts and incidence of fungal decay and insect infestation. *Plant Disease* 83(3): 259–264.
- Elliot J., 1917. Taxonomic characters of the genera *Alternaria* and *Macrosporium*, *American Journal of Botany*, 4, 439-476.
- Erkılıç A., Canihos Y., Kurt S. ve Pala H., 1997. *Mineola tangelo*'larda sorun olan *Alternaria alternata f. sp. citri*'nin biyolojisi, yaygınlığı ve epidemiyolojisi. TÜBİTAK-TOVAG Proje Kesin Raporu, Ankara.

- Esmail-Pour A., 2001. Distribution, use and conservation of pistachio in Iran. In: Padulosi S, Hadj-Hassan A (eds). Project on Underutilized Mediterranean Species. *Pistacia*: Towards a comprehensive documentation of distribution and use of its genetic diversity in Central and West Asia, North Africa and Mediterranean Europe. IPGRI, Rome, Italy.
- Evans N., Michailides T.J., Morgan D. ve Felts D., 1999. Studies on sources of inoculum of *Alternaria* late blight of *Pistacia*, KAC Plant Protection Quarterly, 9,4-7.
- Fao: Food and Agriculture Organization of the United Nations, www.fao.org
- Favier J.C., Ireland-Ripert, J., Toque, C. ve Feinberg, M., 1995. Répertoire général des aliments: Table de Composition. Lavoisier Tequaque & Documentation, INRA Editions Paris, France.
- Ferguson L., Polito V. ve Kallsen C., 2005. Pistachio Production Manual, <http://fruitsndnuts.udavis.edu/crop/pistachio>.
- Fries E.M., 1832. Systema Mycologicum. 3:261-524
- French A.M., 1989. California Plant Disease Host Index. Calif. Dept. Food Agric., Sacramento, 394 pages.
- Groenewald M., Groenewald J.Z., Braun U. ve Crous P.W., 2006. Host range of *Cercospora apii* and *C. beticola* and description of *C. apiicola*, a novel species from celery. Mycologia 98:2.
- Ginns J.H., 1986. Compendium of plant disease and decay fungi in Canada 1960-1980. Res. Br. Can. Agric. Publ. 1813: 416.
- Gonzales V., ve Tello, M.L., 2011. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. Fung. Diversity 47: 29-42.
- Hall T.A., 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis, Nucleic Acids Symposium Series, 41: 95-8.
- Herron J.C. ve Freeman S., 2014. Evolutionary Analysis (5th Edition), University of Washington, p. 822.

- Hjelmroos M., 1993. Relationship between airborne fungal spore presence and weather variables. *Grana* 32: 40–47.
- Hong S.G. ve Pryor B.M., 2004. Development of selective media for the isolation and enumeration of *Alternaria* species from soil and plant debris, *Canadian Journal of Microbiology*, 50:461-468.
- Ila H.B., Kafkas S. ve Topaktas M., 2003. Chromosome numbers of four *Pistacia* (Anacardiaceae) species. *J. Horticult. Sci. Biotechnol.* 78:35-38.
- Johnson L.J., Johnson R.D., Akamatsu H, Salamiah A, Otani H, Kohmoto K ve Kodama M., 2001. Spontaneous loss of a conditionally dispensable chromosome from the *Alternaria alternata* apple pathotype leads to loss of toxin production and pathogenicity, *Curr Genet.* 40(1):65-72.
- Kaska N., 2005. Pistachio nut growing in Turkey, *Acta Horticulturae (ISHS)*, 419: 161-164.
- Kallsen C.E., Parfitt, D.E., Maranto, J. ve Holtz, B.A. 2009. New pistachio varieties show promise for California cultivation. *California Agriculture* 63:18-23.
- Kearse M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P. ve Drummond, A., 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Konukoğlu F., Kusek M., Sarpkaya K., Karadağ S. ve Can C., 2009. Discoloration of Pistachio Nuts grown in Gaziantep province in Turkey. 5. International Symposium of Pistachio and Almond. 6-10 October Sanliurfa, Turkey. pp251.
- Konukoğlu F., Sarpkaya K., Karadağ S., Maden S., Can C. ve Kusek M., 2012. Antepfıstığı meyvelerinde görülen kararmaların olası fitopatolojik nedenlerinin araştırılması. TAGEM Program Değerlendirme raporu, Proje Gelişme Raporu.
- Kurt S., Soylu, E.M., ve Soylu, S., 2010. First report of black spot disease caused by *Alternaria alternata* in persimmon fruits in Turkey. *Pl. Dis.* 94: 1069.

- Lawrence D.P.; Park, M.S. ve Pryor, B.M., 2012. *Nimbya* and *Embellisia* revisited, with nov. comb. for *Alternaria celosiae* and *A. perpunctulata*. *Mycological Progress*. 11(3):799-815.
- Lawrence D.P., Gannibal P.B., Peever T.L. ve Pryor B.M. 2013. The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. *Mycologia*, 105 (3): 530-546.
- Lawrence D.P., Rotondo F. Ve Gannibal P.B., 2016. Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycological Progress*. 15:1-22.
- Luscombe N.M., Greenbaum, D., Gerstein, M. 2001. What is Bioinformatics? A Proposed Definition and Overview of the Field. *Methods of Information in Medicine*, 40: 346-358.
- Maddison W. P., M. J. Donoghue, and D. R. Maddison. 1984. Outgroup analysis and parsimony. *Systematic Zoology* 33: 83–103.
- McDonald B.A., 2004. *Population Biology: The Epidemiology and Population Genetics of Plant Pathogens*, Institute of Plant Sciences/Phytopathology, Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland McDonald, B.A. 2004. *Population Genetics of Plant Pathogens*.
- Meng J.W., Zhu W., Meng-Han He, Wu, E.J., Duan, G.H., Xie, Y.-K., Jin, Y.J., Yang, L.N., Shang, L.P. ve Zhan, J., 2015. Population genetic analysis reveals cryptic sex in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*, 5:18250, DOI: 10.1038/srep18250.
- Metzenberg R.L. ve Glass N.L., 1990. Mating type and mating strategies in *Neurospora*, *Bioessays*. 1990 Feb;12(2):53-9.
- Mycobank Database, <http://www.mycobank.org>.
- Michailides T., 2005. Above Ground Fungal Diseases. In: Ferguson, L., ed. *Pistachio production manual*, 4th ed. Davis, CA, USA, University of California Fruit and Nut Research Information Center, pp. 214-232.
- Michailides T.J. ve Morgan D.P., 2004. Panicle and shoot blight of Pistachio: A major treat to the California Pistachio industry.

- Michailides T. J., Morgan D. P., Doster M. A. ve Kolliker R., 1993/94. Biology, epidemiology, and control of *Alternaria* and *Aspergillus* blights of pistachio, and effects of these diseases on nut quality, Calif. Pistachio Industry Annu. Rep. Crop, Fresno. pp 49-56.
- Michailides T.J., Morgan D.P. ve Doster M.A., 1995. Diseases of Pistachio in California and their significance, *Acta Horticulturae* (ISHS), 419: 337-343.
- Michailides T.J., 1997. Foliar and fruit diseases of pistachio and their control in California, NUCIS Neswletter, 6:24-29.
- Michailides T.J. ve Morgan D.P., 1999. Felts E., Chemical control of *Alternaria* blight of California pistachio in 1998. In: California Pistachio Industry Annual Report Crop Year 1998-1999. Fresno, CA.
- Michailides T.J. ve Morgan D.P., 1993. Control of *Alternaria* late blight of Pistachio using multiple application of organic and other fungicides. Proceedings of the 67th Annual Western Orchard Pest & Disease management Conference 67:5-6.
- Milgroom M.G. ve Peever T.L., 2003. Population biology of plant pathogens: The Synthesis of Plant Disease Epidemiology and Population Genetics, *Plant Disease*, 87, 608-17.
- Ness Von Esenbeck C.G.D., 1816. Das System der Pilze und Schwämme. Ein Versuch, Stahelschen Buchhandlung, Würzburg.
- Özkılınç H., Rotondo F., Pryor B.M. ve Peever T.L. 2015. Species boundaries of an asexual fungal genus. Ecology and Evolutionary Biology Symposium Turkey, Middle East Technical University, Ankara / Turkey, August 6-7, Page 30.
- Parfitt D.E. ve Badenes, M.L. 1997. Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 94: 7987-7992.
- Paul N.C., Deng, J.X., Lee, H.B., ve Yu, S.-H., 2015. Characterization and pathogenicity of *Alternaria burnsii* from seeds of *Cucurbita maxima* (*Cucurbitaceae*) in Bangladesh. *Mycobiology* 43(4): 384-391.

- Peever T.L., Canihos Y., Olsen L., Ibañez A., Liu Y-C. ve Timmer L.W., 1999. Population genetic structure and host specificity of *Alternaria* spp. causing brown spot of *Minneola tangelo* and rough lemon in Florida, *Phytopathology*, 89, 851–860.
- Peever T.L., Ibanez A., Akimitsu K. ve Timmer L.W., 2002. Worldwide phylogeography of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata*, *Phytopathology*, 92, 794-802.
- Peever T.L., Su G., Carpenter-Boggs L. ve Timmer L.W., 2004. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species, *Mycologia*, 96, 119-134.
- Poggeler S., 2002. Genomic evidence for mating abilities in the asexual pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet* 42(3):153-60.
- Pryor B.M., Davis R.M. ve Gilbertson R.L., 1998. Detection of soilborne *Alternaria radicina* and its occurrence in California carrot fields, *Plant Disease*, 82:891-895.
- Pryor B.M. ve Gilbertson R.L., 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear *ITS* and mt *SSU rDNA* sequences, *Mycological Research*, 104, 1312-1321.
- Pryor B.M. ve Michailides T.J., 2002. Morphological, pathogenic and molecular characterization of *Alternaria* Isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio, *Phytopathology*, 92, 406-16.
- Pryor B.M. ve Bigelow D.M., 2003. Molecular characterization of *Embellisia* and *Nimbya* species and their relationship to *Alternaria*, *Ulocladium*, and *Stemphylium*, *Mycologia*, 95, 1139-152.
- Pryor B.M., Creamer, R., Shoemaker, R.A., McLain-Romero, J. ve Hambleton, S., 2009. *Undifilum*, a new genus for endophytic *Embellisia oxytropis* and parasitic *Helminthosporium bornmuelleri* on legumes. *Botany*. 87(2):178-194.
- Pryor B.M., Peever T.L. ve Lawrence C. NSF-DEB 0918668 projesi, 2010-2013. Collaborative research: Estimating speciation/reticulation boundaries in asexual *Alternaria*: a genomics approach.

- Ramires-Prado J.H., Moore, G.G., Horn, B.W. ve Carbone, I., 2008. Characterization and population analysis of the mating-type genes in *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*, *Fungal Genet. Biol.* 45:1292– 1299.
- Roberts R.J., March 1982. "Restriction and modification enzymes and their recognition sequences". *Nucleic Acids Res* 10 (5): r117–44. doi:10.1093/nar/10.5.1770. PMC 320569. PMID 6280143.
- Rotem J., 1994. The genus *Alternaria*. *Biology, Epidemiology and Pathogenicity*. American Phytopathological Society Press. Saint Paul, Minnesota (USA).
- Roberts R.G., Reymond S.T. ve Andersen B., 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups, *Mycology Research*, 104:151-160.
- Sato S., February 1978. "A single cleavage of Simian virus 40 (SV40) DNA by a site specific endonuclease from *Thermus aquaticus*, *TaqI*". *J. Biochem. (Tokyo)* 83 (2): 633–5. PMID 204628.
- Scott P.M., 2001. Analysis of agricultural comodities and foods for *Alternaria* mycotoxin. *J AOAC Int* 84: 1809-1817.
- Simmons E.G., 1992. *Alternaria* themes and variations, *Mycotaxon*, 48, 91-107.
- Simmons E.G. ve Roberts R.G., 1993. *Alternaria* themes and variations, *Mycotaxon*, 48, 10-140.
- Simmons E.G. 1994. *Alternaria* themes and variations (106-111). *Mycotaxon*. 50:409-427.
- Simmons E.G., 1999. *Alternaria* themes and variations, *Mycotaxon*, 70, 325-369.
- Simmons E.G., 2007. *Alternaria: An Identification Manual*. Utrecht, Netherlands: CBS Fungal Biodiversity Centre.
- Saitou N., ve M. Nei. 1987. The neighbor-joining method—A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406–425.

- Stewart J.E., Ozkilinc H., Timmer L.M., Pryor B.M. ve Peever T.L., 2011. Evolutionary history and species boundaries of the citrus brown spot fungus, *Phytopathology*, 101, 171.
- Stewart J.E. 2011. Mating system and speciation of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata*. PhD Dissertation, WSU.
- Stewart J.E., Kawabe M., Abdo Z., Arie T. ve Peever T.L., 2008. Contrasting Codon Usage Patterns and Purifying Selection at the Mating Locus in Putatively Asexual *Alternaria* Fungal Species, *PLOS ONE*, 6(5): e3. doi:10.1371/journal.pone.0020083.
- Stewart J. E., Thomas, K.A., Lawrence, C.B., Dang, H., Pryor, B.M., Timmer, L.M. ve Peever, T.L., 2013. Signatures of recombination in clonal lineages of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata* sensu lato. *Phytopathology*, 103, 741-749.
- Stewart J.E., Timmer L, Lawrence C.B.,Pryor M.B. ve Peever T.L., 2014. Discord between morphological and phylogenetic species boundaries: incomplete lineage sorting and recombination results in fuzzy species boundaries in an asexual fungal pathogen, *BMC Evolutionary Biology*, 14:38.
- Swart W.J., 2003. Biomonitoring of fungi in Pistachio orchards. Phase 3: 2003/4. Research Report.
- Swart W.J. ve Blodgett J.T., 1998. Fungi associated with diseased pistachio trees in South Africa. Combined Congress of the Southern African New Crop Research Association, South African Crop Production Society and the Southern African Weed Science.
- Swofford D.L., PAUP*, 2003. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Swofford D. L., G. J. Olsen, et al. 1996. Phylogenetic inference. In *Molecular Systematics*, ed. D. M. Hillis, C. Moritz, et al. Sunderland, MA:Sinauer, 407–514.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., ve Kumar S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, *Mol Biol Evol.* 2013 Dec; 30(12): 2725–2729.

- Taylor J.W., Jacobson D.J. ve Fisher M.C., 1999. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification, Annual Review Phytopathology, 37, 197-246.
- Timmer L.W., Peever T.L., Solel Z. ve Akimitsu K., 2003. *Alternaria* diseases of citrus- Novel pathosystems. Phytopathol. Mediterr. 42, 99-112.
- TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu, www.tuik.gov.tr
- Turgeon B.G., 1998. Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. Annu. Rev. Phytopathol. 36:115-137.
- Turgeon B.G. ve Yoder O.C., 2000. Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes, Fungal Genetics Biology, 31:1-5.
- Tymon L.S., Peever T.L. ve Johnson D.A., 2015. Identificaiton and enumeration of small-spored *Alternaria* species associated with potato in the U.S. Northwest, Plant Disease.
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2016. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory Fungus-Host Distributions Database. May 12, 2016, <https://nt.ars-grin.gov/fungalatabases>.
- WasfyE. H., Ibrahim I.A. ve Elarosi H. M., 1974. New *Alternaria* disease of pistachio in Egypt, Phytopathologia Mediterranea,13:110-111.
- WeirT.L., Huff D.R., Christ B.J. ve Romaine C.P., 1998. RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato, Mycologia, 90, 813-821.
- Wiltshire S.P. 1933. The foundation species of *Alternaria* and *Macrosporium*. Transactions of the British Mycological Society. 18(2):135-160.
- Woodroof J.G., 1967. Pistachio Nuts. In: Tree Nuts, Production, Processing and Products. Vol II. The AVI Publishing Company, Incorporated. Westport, Connecticut.
- Woudenberg J.H.C., Gronewald J.Z., Binder M. ve Crous P.W. 2013. *Alternaria* refined. Studies in Mycologia, 75:171-212.

- Wunsch A. ve Hormaza J.I., 2007. Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. *Scientia Horticulturae* 113: 37 – 43.
- Zohary M., 1952. A monographical study of the genus *Pistacia*. *Palestine Journal of Botany, Jerusalem Series* 5: 187–228.
- Zohary M., 1972. *Pistacia L.* Flora Palestine. Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem 2: 297–300.
- Zohary D. ve Hopf, M., 1988. Domestication of plants in the Old World. Oxford University Press. 249.





EKLERİ

Ek Çizelge 1. İzolatların temsil ettiği haplotip grupları ve *MAT1* lokusu skorları

İZOLAT NO	<i>MAT1</i>	<i>Alt_1_a</i>	<i>EndoPG</i>	<i>Histon-3</i>	<i>OPA1.3</i>
		5*	6*	10*	12*
27 - 02/1	2	Ht 1	Ht 1	Ht 2	Ht 1
27 - 11/1	1	Ht 1	Ht 1	Ht 1	Ht 2
27 - 16/1	2	Ht 1	Ht 4	Ht 2	Ht 11
27 - 16/3	2	Ht 1	Ht 4	Ht 2	Ht 11
27- 46/3	1	Ht 3	Ht 1	Ht 1	Ht 2
27 - 02 /1 - G	2	Ht 1	Ht 1	Ht 3	Ht 2
27 - 10 /2 - G	1	Ht 1	Ht 1	Ht 2	Ht 2
27 - 16 - G	2	Ht 1	Ht 1	Ht 9	Ht 2
27 - 31 /1 - G	2	Ht 3	Ht 1	Ht 2	Ht 8
27 - 34 - G	2	Ht 1	Ht 1	Ht 2	Ht 2
27 - 10 /2 - GY	2	Ht 1	Ht 1	Ht 5	Ht 6
63 - 02 /4	1	Ht 2	Ht 1	Ht 1	Ht 2
63 - 04 /4	1	Ht 1	Ht 4	Ht 2	Ht 11
63 - 09	1	Ht 1	Ht 1	Ht 1	Ht 2
63 - 12 /1	1	Ht 1	Ht 1	Ht 5	Ht 2
63 - 13 /4	2	Ht 1	Ht 1	Ht 1	Ht 2
63 - 22 /1	1	Ht 1	Ht 1	Ht 1	Ht 2
63 - 23 /2	1	Ht 3	Ht 3	Ht 9	Ht 3
63 - 37	2	Ht 1	Ht 1	Ht 3	Ht 2
63 - 21 /2 - G	2	Ht 3	Ht 5	Ht 3	Ht 2
63 - 23 - G	2	Ht 1	Ht 1	Ht 6	Ht 4
63 - 35 - G	2	Ht 1	Ht 1	Ht 1	Ht 2
63 - 48 - G	1	Ht 1	Ht 4	Ht 3	Ht 2
63 - 04 - GY	2	Ht 1	Ht 1	Ht 4	Ht 2
63 - 13 - GY	2	Ht 2	Ht 1	Ht 1	Ht 9
35-15	2	Ht 2	Ht 1	Ht 3	Ht 5
35-16/1	2	Ht 3	Ht 6	Ht 2	Ht 2
35-16/2	2	Ht 1	Ht 1	Ht 10	Ht 4
35-18	2	Ht 1	Ht 1	Ht 9	Ht 4
35-20/1	2	Ht 1	Ht 1	Ht 3	Ht 12
35-22/2 meyve	2	Ht 1	Ht 1	Ht 2	Ht 12
35-35	2	Ht 3	Ht 1	Ht 6	Ht 7
35-37	2	Ht 3	Ht 2	Ht 10	Ht 2
35-37 Y1	2	Ht 4	Ht 1	Ht 7	Ht 2
35-41	2	Ht 1	Ht 1	Ht 3	Ht 1
35-43	1	Ht 1	Ht 1	Ht 8	Ht 10

* Haplotip sayıları

Ek Çizelge 1.(devam) İzolatların temsil ettiği haplotip grupları ve MAT1 lokusu skorları

İZOLAT NO	<i>MAT1</i>	<i>Alt_1_a</i> 5*	<i>EndoPG</i> 6*	<i>Histon-3</i> 10*	<i>OPA1.3</i> 12*
45 - 16	1	Ht 1	Ht 1	Ht 3	Ht 4
45 - 26 /1	1	Ht 1	Ht 1	Ht 2	Ht 12
45 - 29	2	Ht 1	Ht 1	Ht 2	Ht 12
45 - 43	2	Ht 2	Ht 1	Ht 1	Ht 2
45 - 57	1	Ht 1	Ht 1	Ht 3	Ht 1
45 - 58	1	Ht 1	Ht 1	Ht 3	Ht 4
17 - 12	2	Ht 1	Ht 7	Ht 10	Ht 5
17 - 15	1	Ht 3	Ht 1	Ht 2	Ht 7
17 - 17	1	Ht 5	Ht 1	Ht 3	Ht 12
17 - 05 - G	1	Ht 5	Ht 1	Ht 2	Ht 12
17 - 07 - G	1	Ht 1	Ht 1	Ht 1	Ht 5
17 - 11 - GY	2	Ht 1	Ht 1	Ht 2	Ht 10
10-14	1	Ht 1	Ht 1	Ht 3	Ht 4
10-15	2	Ht 1	Ht 1	Ht 6	Ht 4

* Haplotip sayıları

Ek 2. *Alt_a_1* bölgesi haplotiplerin temsil ettiği gruplara ait sekans verileri

H1 (27_02_1_vera)

CCGAATTCTACGGACGCAAGCCGGAAGGAACCTACTACAACAGCCTCGGCTTCAACATCAAGGCCA
CCAACGGAGGAACCCCTCGACTTCACCTGCTCTGCTCAGGCCGATAAGCTTGAGGACCACAAGTGGT
ACTCCTGTGGCGAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTTTCGACAGCGACCCGACGGTCTGCTCCTGA
AGCAGAAGGTTAGCGACGAGTAAGTTACCCTTGTACCTTCGATTACTTCGCAGATTCAGATATACT
AACATATCCCAGCATCACCTATGTCGCTACCGCCACTCTTCCCAACTACTGCCGCGCTGGCGGTA
ACGGCCCTAAGGACTTTGTCTGCCAGGGTGTTGCCGAC

H2 (63_02_4_vera)

CCGAATTCTACGGACGCAAGCCGGAAGGAACCTACTACAACAGCCTCGGCTTCAACATCAAGGCCA
CCAACGGAGGAACCCCTCGACTTCACCTGCTCTGCTCAGGCCGATAAGCTTGAGGACCACAAGTGGT
ACTCCTGTGGCGAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTTTCGACAGCGACCCGACGGTCTGCTCCTGA
AGCAGAAGGTTAGCGACGAGTAAGTTACCCTTGTACCTTCGATTACTTCGCAGATTCAGATATACT
AACATATCCCAGCATCACCTATGTCGCTACCGCCACTCTTCCCAACTACTGCCGCGCTGGCGGTA
ACGGCCCTAAGGACTTTGTCTGCCAGGGTGTTGCCGAC

H3 (27_46_3_vera)

CCGAGTTCTACGGACGCAAGCCGGAAGGAACCTACTACAACAGCCTCGGCTTCAACATCAAGGCTA
CCAACGGAGGAACACTCGACTTCACCTGCTCTCACTCAGCCGACAAGCTTGAGGACCACACTTGGT
ACTCTTGCGGCGAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTTTCGACAGCGACCCGCAACGGTCTGCTCCTGA
AGCAGAAGGTTAGCGACGAGTAAGTTACCCTTGTACCTTCGATTACTTCGCAGATTCAGATATACT
AACATGTTCCAGCATCACCTATGTCGCTACCGCCACTCTTCCCAACTACTGCCGCGCTGGCGGTA
ACGGCCCTAAGGACTTTGTCTGCCAGGGTGTTGCCGAC

H4 (35_37_Y1_terebinthus)

CCGAATTCTACGGACGCAAGCCGGAAGGAACCTACTACAACAGCCTCGGCTTCAACATCAAGGCCA
CCAACGGAGGAACCCCTCGACTTCACCTGCTCTGCTCAGGCCGATAAGCTTGAGGACCACAAGTGGT
ACTCCTGTGGCGAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTTTCGACAGCGACCCGACGGTCTGCTCCTGA
AGCAGAAGGTTAGCGACGAGTAAGTTACCCTTGTACCTTCGATTACTTCGCAGATTCAGATATACT
AACATATCCCAGCATCACCTATGTCGCTACCGCCACTCTTCCCAACTACTGCCGCGCTGGCGGTA
ACGGCCCTAAGGACTTTGTCTGCCAGGGTGTTGCCGAC

H5 (17_17_vera)

CCGAATTCTACGGACGCAAGCCGGAAGGAACCTACTACAACAGCCTCGGCTTCAACATCAAGGCCA
CCAACGGAGGAACCCCTCGACTTCACCTGCTCTGCTCAGGCCGATAAGCTTGAGGACCACAAGTGGT
ACTCCTGTGGCGAGAACAGCTTCATGGACTTCTCTTTTCGACAGCGACCCGACGGTCTGCTCCTGA
AGCAGAAGGTTAGCGACGAGTAAGTTACCCTTGTACCTTCGATTACTTCGCAGATTCAGATATACT
AACATATCCCAGCATCACCTATGTCGCTACCGCCACTCTTCCCAACTACTGCCGCTGCTGGCGGTA
ACGGCCCTAAGGACTTTGTCTGCCAGGGTGTTGCCGAC

Ek 3. *EndoPG* bölgesi haplotiplerin temsil ettiği gruplara ait sekans verileri

H1 (27_02_1_vera)

CTAGTCTGGCTGACGGTACTACTGTCATCTTCGAGGGTACCACCACCTGGGGCTACTCGGAATGGA
AGGGTCCCCTTCTTGACATCCAAGGAAAGAAGATCACTGTCAAGGGCGCCGAGGGATCTGTTCTCA
ACGGTGATGGTGCTCGTTGGTGGGACGGTAAGGGTGAAATGGTGAAAGACCAAGCCCAAGTTCT
TCTCCGCTCACAACTGACCGACTCCACCATCACCGGCATTACCATCAAGAACCCTCCCCTCCAAG
TCGTTAGTATCAACGGCTGCGATGGTCTTACCATTACAGACATGACTATTGATGCGTCCGACGGCG
ACAAGGACGAGCAGGGCCACAACACAGATGGTTTTCGATATTGGCTCCAGCAACAACGTCATCATTG
ATGGCGCTAAGGTTTACAACCAG

H2 (35_37_terebinthus)

CTAGTCTGGCTGACGGTACTACTGTCATCTTCGAGGGTACCACCACCTGGGGCTACTCGGAGTGGA
AGGGTCCCTTCTTGACATCCAAGGAAAGAAGATCACTGTCAAGGGCGCTGAGGGATCTGTTCTCA
ATGGTGATGGTGCTCGTTGGTGGGACGGTAAGGGTGAAATGGTGAAAGACCAAGCCCAAGTTCT
TCTCCGCTCACAACTGACCGACTCCACCATCACCGGCATTACCATCAAGAACCCTCCCCTCCAAG
TCGTTAGTATCAACGGCTGCGATGGTCTTACCATTACAGACATGACTATTGATGCGTCTGACGGCG
ACAAGGACGAGCAGGGCCACAACACAGATGGTTTTCGATATTGGCTCCAGCAACAACGTCATCATTG
ATGGCGCTAAGGTTTACAACCAG

H3 (63_23_2_vera)

CTAGTCTGGCTGACGGTACTACTGTCATCTTCGAGGGTACCACCACCTGGGGCTACTCGGAATGGA
AGGGTCCCCTTCTTGACATCCAAGGAAAGAAGATCACTGTCAAGGGCGCCGAGGGATCTGTTCTCA
ACGGTGATGGTGCTCGTTGGTGGGACGGTAAGGGTGAAATGGTGAAAGACCAAGCCCAAGTTCT
TCTCCGCTCACAACTGACCGACTCCACCATCACCGGCATTGCCATCAAGAACCCTCCCCTCCAAG
TCGTTAGTATCAACGGCTGCGATGGTCTTACCATTACAGACATGACTATTGATGCGTCCGACGGCG
ACAAGGACGAGCAGGGCCACAACACAGATGGTTTTCGATATTGGCTCCAGCAACAACGTCATCATTG
ATGGCGCTAAGGTTTACAACCAG

H4 (27_16_1_vera)

CTAGTCTGGCTGACGGTACTACTGTCATCTTCGAGGGTACCACCACCTGGGGCTACTCGGAGTGGA
AGGGTCCCTTCTTGACATCCAAGGAAAGAAGATCACTGTCAAGGGCGCCGAGGGATCTGTTCTCA
ATGGTGATGGTGCTCGTTGGTGGGACGGTAAGGGTGAAATGGTGAAAGACCAAGCCCAAGTTCT
TCTCCGCTCACAACTGACCGACTCCACCATCACCGGCATTACCATCAAGAACCCTCCCCTCCAAG
TCGTTAGTATCAACGGCTGCGATGGTCTTACCATTACAGACATGACTATTGATGCGTCCGACGGCG
ACAAGGACGAGCAGGGCCACAACACAGATGGTTTTCGATATTGGCTCCAGCAACAACGTCATCATTG
ATGGCGCTAAGGTTTACAACCAG

H5 (63_21_2_G_vera)

CTAGTCTGGCTGACGGTACTACTGTCATCTTCGAGGGTACCACCACCTGGGGCTACTCGGAATGGA
AGGGTCCCCTTCTTGACATCCAAGGAAAGAAGATCACTATCAAGGGCGCCGAGGGATCTGTTCTCA
ACGGTGATGGTGCTCGTTGGTGGGACGGTAAGGGTGAAATGGTGAAAGACCAAGCCCAAGTTCT
TCTCCGCTCACAACTGACCGACTCCACCATCACCGGCATTACCATCAAGAACCCTCCCCTCCAAG
TCGTTAGTATCAACGGCTGCGATGGTCTTACCATTACAGACATGACTATTGATGCGTCCGACGGCG
ACAAGGACGAGCAGGGCCACAACACAGATGGTTTTCGATATTGGCTCCAGCAACAACGTCATCATTG
ATGGCGCTAAGGTTTACAACCAG

H6 (35_16_1_atlantica)

CTAGTCTGGCTGACGGTACTACTGTCATCTTCGAGGGTACCACCACCTGGGGCTACTCGGA?TGGA
AGGGTCC?CTTCTTGACATCCAAGGAAAGAAGATCACTGTCAAGGGCGCCGAGGGATCTGTTCTCA
A?GGTGATGGTGCTCGTTGGTGGGACGGTAAGGGTGAAATGGTGAAAGACCAAGCCCAAGTTCT
TCTCCGCTCACAACTGACCGACTCCACCATCACCGGCATTACCATCAAGAACCCTCCCCTCCAAG
TCGTTAGTATCAACGGCTGCGATGGTCTTACCATTACAGACATGACTATTGATGCGTCCGACGGCG
ACAAGGACGAGCAGGGCCACAACACAGATGGTTTTCGATATTGGCTCCAGCAACAACGTCATCATTG
ATGGCGCTAAGGTTTACAACCAG

H6(17_12_vera)

CTAGTCTGGCTGACGGTACTACTGTCATCTTCGAGGGTACCACCACCTGGGGCTACTCGGAATGGA
AGGGTCCCCTTCTTGACATCCAAGGAAAGAAGATCACTGTCAAGGGCGCCGAGGGATCTGTTCTCA
ACGGTGATGGTGCTCGTTGGTGGGATGGTAAGGGTGGAAATGGTGGAAAGACCAAGCCCAAGTTCT
TCTCCGCTCACAACTGACCGACTCCACCATCACCGGCATTACCATCAAGAACCCTCCCGTCCAAG
TCGTTAGTATCAACGGCTGCGATGGTCTTACCATTACAGACATGACTATTGATGCGTCCGACGGCG
ACAAGGACGAGCAGGGCCACAACACAGATGGTTTCGATATTGGCTCCAGCAACAACGTCATCATTG
ATGGCGCTAAGGTTTACAACCAG



Ek 4. *Histon-3* bölgesi haplotiplerin temsil ettiği gruplara ait sekans verileri

H1 (27_11_1_vera)

TCAAGGCTCGCATCCAAGGCAGCTCGCAAGTCCGCACCGGTTAGTACCATCTCCACACTATCTTGC
GATCCATCCTTCTAACATGCTCCAGTCAACCGGTGGTGTCAAGAAGCCTCACCGCTACAAGCCCGG
AACCGTCGCTCTCCGTGAGATCCGTGCTACCAGAAGTGCAGTCCATCCGCAAGCTGCC
CTTCCAGCGTCTTGTCCGTGAGATTGCCAGGACTTCAAGTCCGATCTCCGCTTCCAGTCTCCGC
CATCGGTGCTCTTCCAGGAGTCCGTGAGGCTACCTCGTCTCCCTCTTCGAGGACACCAACCTCTG
CGCCATCCAGCCAAGCGTGTACCATCCAGAGCAAGGACATCCAGCTCGCCCGCA

H2 (27_02_1_vera)

TCAAGGCTCGCATCCAAGGCAGCTCGTAAGAGTGCGCC-----

GTCTACCGGTGGTGTCAAGAAGCCTCACCGCTACAAGCCCGGAACCTGTCGCTCTCCGTGAGATCCG
TCGCTACCAGAAGTGCAGTCCATCCGCAAGCTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTCGTGAGAT
TGCCCAGGACTTCAAGTCCGATCTCCGCTTCCAGTCCCGCCATCGGTGCTCTTCCAGGAGTCCGT
CGAGGCTACCTCGTCTCCCTCTTCGAGGACACCAACCTCTGCGCCATCCACGCCAAGCGTGTAC
CATCCAGAGCAAGGACATCCAGCTCGCCCGCA

H3 (27_02_1_G_terebinthus)

TCAAGGCTCGCATCCAAGGCAGCTCGTAAGAGTGCGCC-----

GTCTACCGGTGGTGTCAAGAAGCCTCACCGCTACAAGCCCGGAACCGTTCGCTCTCCGTGAGATCCG
TCGCTACCAGAAGTGCAGTCCATCCGCAAGCTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTCGTGAGAT
TGCCCAGGACTTCAAGTCCGATCTCCGCTTCCAGTCCCGCCATCGGTGCTCTTCCAGGAGTCCGT
CGAGGCTACCTCGTCTCCCTCTTCGAGGACACCAACCTCTGCGCCATCCACGCCAAGCGTGTAC
CATCCAGAGCAAGGACATCCAGCTCGCCCGCA

H4 (63_04_GY_vera)

TCAAGGCTCGCATCTAAGGCAGCTCGTAAGAGTGCGCC-----

GTCTACCGGTGGTGTCAAGAAGCCTCACCGCTACAAGCCCGGAACCGTTCGCTCTCCGTGAGATCCG
TCGCTATCAGAAGTGCAGTCCATCCGCAAGCTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTCGTGAGAT
TGCCCAGGATTTCAAGTCCGATCTCCGCTTCCAGTCCCGCCATCGGTGCTCTCCAGGAGTCCGT
TGAGGCTACCTCGTCTCCCTCTTCGAGGACACCAACCTCTGCGCCATCCACGCCAAGCGTGTAC
CATCCAGAGCAAGGACATCCAGCTCGCCCGCA

H5 (27_10_2_GY_vera)

TCAAGGCTCGCATCCAAGGCAGCTCGTAAGAGTGCGCC-----

GTCTACCGGTGGTGTCAAGAAGCCTCACCGCTACAAGCCCGGAACCGTTCGCTCTCCGTGAGATCCG
TCGCTACCAGAAGTGCAGTCCATCCGCAAGCTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTCGTGAGAT
TGCCCAGGACTTCAAGTCCGATCTCCGCTTCCAGTCCCGCCATCGGTGCTCTCCAGGAGTCCGT
TGAGGCTACCTCGTCTCCCTCTTCGAGGACACCAACCTCTGCGCCATCCACGCCAAGCGTGTAC
CATCCAGAGCAAGGACATCCAGCTCGCCCGCA

H6 (63_23_G_vera)

TCAAGGCTCGCATCTAAGGCAGCTCGTAAGAGTGCGCC-----

GTCTACCGGTGGTGTCAAGAAGCCTCACCGCTACAAGCCCGGAACCGTTCGCTCTCCGTGAGATCCG
TCGCTATCAGAAGTGCAGTCCATCCGCAAGCTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTCGTGAGAT
TGCCCAGGACTTCAAGTCCGATCTCCGCTTCCAGTCCCGCCATCGGTGCTCTCCAGGAGTCCGT
TGAGGCTACCTCGTCTCCCTCTTCGAGGACACCAACCTCTGCGCCATCCACGCCAAGCGTGTAC
CATCCAGAGCAAGGACATCCAGCTCGCCCGCA

H7(35_37_Y1_terebinthus)

TCAAGGCTCGCATCCAAGGCAGCTCGTAAGAGTGCGCC-----

GTCTACCGGTGGTGTCAAGAAGCCTCACCGCTACAAGCCCGGAACCGTCGCTCTCCGTGAGATCCG
TCGCTACCAGAAGTCGACTGAGCTCCTCATCCGCAAGCTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTTCGTGAGAT
TGCCCAGGACTTCAAGTCCGATCTCCGCTTCCAGTCCTCCGCCATCGGTGCTCTTCAGGAGTCCGT
CGAGGCCTACCTCGTCTCCCTCTTCGAGGACACCAACCTCTGCGCCATTCACGCCAAGCGTGTCAC
CATCCAGAGCAAGGACATCCAGCTCGCCCGCA

H8(35_43_terebinthus)

TCAAGGCTCGCATCTAAGGCAGCTCGTAAGAGTGCACC-----

GTCTACCGGTGGTGTCAAGAAGCCTCACCGCTACAAGCCCGGAACCGTCGCTCTCCGTGAGATCCG
TCGCTATCAGAAGTCGACTGAGCTCCTCATCCGCAAGCTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTTCGTGAGAT
TGCCCAGGACTTCAAGTCCGATCTCCGCTTCCAGTCCTTGCCATCGGTGCTCTTCAGGAGTCCGT
TGAGGCCTACCTCGTCTCCCTCTTCGAGGACACCAACCTCTGCGCCATTCACGCCAAGCGTGTCAC
CATCCAGAGCAAGGACATCCAGCTCGCCCGCA

H9(27_16_G_vera)

TCAAGGCTCGCATCTAAGGCAGCTCGTAAGAGTGCGCC-----

GTCTACCGGTGGTGTCAAGAAGCCTCACCGCTACAAGCCCGGAACCGTCGCTCTCCGTGAGATCCG
TCGCTATCAGAAGTCGACTGAGCTCCTCATCCGCAAGCTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTTCGTGAGAT
TGCCCAGGACTTCAAGTCCGATCTCCGCTTCCAGTCCTCCGCCATCGGTGCTCTTCAGGAGTCCGT
CGAGGCCTACCTCGTCTCCCTCTTCGAGGACACCAACCTCTGCGCCATTCACGCCAAGCGTGTCAC
CATCCAGAGCAAGGACATCCAGCTCGCCCGCA

H10(35_16_2_atlantica)

TCAAGGCTCGCATCCAAGGCAGCTCGTAAGAGTGCGCC-----

GTCTACCGGTGGTGTCAAGAAGCCTCACCGCTACAAGCCCGGAACCGTCGCTCTCCGTGAGATCCG
TCGCTACCAGAAGTCGACTGAGCTCCTCATCCGCAAGCTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTTCGTGAGAT
TGCCCAGGACTTCAAGTCCGATCTCCGCTTCCAGTCCTCCGCCATCGGTGCTCTTCAGGAGTCCGT
CGAGGCCTACCTCGTCTCCCTCTTCGAGGACACCAACCTCTGCGCCATTCACGCCAAGCGTGTCAC
CATCCAGAGCAAGGACATCCAGCTCGCCCGCA

Ek 5. *OPA1.3* anonim DNA bölgesi haplotiplerin temsil ettiği gruplara ait sekans verileri

H1 (27_02_1_vera)

CCTAGTTGACATAGTATTCCATCCATGTTGAGAATAAGTCAGCTCAGCTTGGGCCCGATATCATCA
GGGCATGCGGTTGACTCACCCATTACCGTATAATCTTGGATCTGCACCTTCCATGGTGTAATCCAC
AAAACCTCCATCCGCTTCATACACGCTCATTACATCAAATTAAGTGTGTCCATTCAAACCACAATA
CCACAC-----
TTCAC TAAGGCGAAACTATATTCATCAAACCTTGTGCGAGAAGCTCTCGAATCCACCAAACAGCAA
TGTGTCTCTACCTGGTCGTTCACTACGGACCAAATCCCTTGTCACTTAAGCGTATCTTCTCACGTC
GGGCCCTGATGCAGATGAACAACGTATGTCTGAATGGCGAGTAGAGCGCCTAAGTCTAGATCGCT
TGCGGGAGCTTTGGCATTGAGATGTAGGAGTCAGGAGGATTTAATCAAGGTGGAGAAAGACGATG
ATTTTGACATGGGATACTGATATAAATAGTCAAGTGCATACATCACTCATTATCGGCATGGATTG
CAGGGGACAAAGTGAATGAACTTTTGAATTCTTCCTCCAGCTGATGTGCAGAAGATTGTCTAAG
CTAACCAGAGCATGTGGCTCGGCCTGCCCTCCATCCTCTGTGCGAGGAGTGGGCGACCAGTAGTCGT
GATCTTCATGGTATCGTTTTGAAGCTAACCGTTACTCCACCCATTGAACAAAAGCACAACAGCTTA
GTTTCATCTGCCTGACGAGCTGGTTGATGAACTCCTCGCGGTTACCAAGGTCACCACCCTCGATGAA
GTGCTTGAAC

H2 (27_11_1_vera)

CCTAGTTGACATAGTATTCCATCCATGTTGAGAATAAGTCAGCTCAGCTTGGGCCCGATATCATCA
GGGCATGCGGTTGACTCACCCATTACCGTATAATCTTGGATCTGCACCTTCCATGGTGTAATCCAC
AACACTCCATCCGCTTCATACACGCTCATTACATCAAATTAAGTGTGTCCATTCAAACCACAATA
CCACAC-----
TTCAC TAAGGCGAAACTATATTCATCAAACCTTGTGCGAGAAGCTCTCGAATCCACCAAACAGCAA
TGTGTCTCTACCTGGTCGTTCACTACGGACCAAATCCCTTGTCACTTAAGCGTATCTTCTCACGTC
GGGCCCTGATGCAGATGAACAACGTATGTCTGAATGGCGAGTAGAGCGCCTAAGTCTAGATCGCT
TGCGGGAGCTTTGGCATTGAGATGTAGGAGTCAGGAGGATTTAATCAAGGTGGAGAAAGACGATG
ATTTTGACATGGGATACTGATATAAATAGTCAAGTGCATACATCACTCATTATCGGCATGGATTG
CAGGGGACAAAGTGAATGAACTTTTGAATTCTTCCTCCAGCTGATGTGCAGAAGATTGTCTAAG
CTAACCAGAGCATGTGGCTCGGCCTGCCCTCCATCCTCTGTGCGAGGAGTGGGCGACCAGTAGTCGT
GATCTTCATGGTATCGTTTTGAAGCTAACCGTTACTCCACCCATTGAACAAAAGCACAACAGCTTA
GTTTCATCTGCCTGACGAGCTGGTTGATGAACTCCTCGCGGTTACCAAGGTCACCACCCTCGATGAA
GTGCTTGAAC

H3 (63_23_2_vera)

CCTAGTTGACATAGTATTCCATCCATGTTGAGAATAAGTCAGCTCAGCTTGGGCCCGATATCATCA
GGGCATGCGGTTGACTCACCTATTACCGTATAATCTTGGATCTGCACCTTCCATGGTGTAATCCAC
AACACTCCATCCGCTTCATACACGCTCATTACATCAAATTAAGTGTGTCCATTCAAACCACAATA
CCACAC-----
TTCAC TAAGGCGAAACTATATTCATCAAACCTTGTGCGAGAAGCTCTCGAATCCACCAAACAGCAA
TGTGTCTCTACCTGGTCGTTCACTACGGACCAAATCCCTTGTCACTTAAGCGTATCTTCTCACGTC
GGGCCCTGATGCAGATGAACAACGTATGTCTGAATGGCGAGTAGAGCGCCTAAGTCTAGATCGCT
TGCGGGAGCTTTGGCATTGAGATGTAGGAGTCAGGAGGATTTAATCAAGGTGGAGAAAGACGATG
ATTTTGACATGGGATACTGATAAAAATAGTCAAGTGCATACATCACTCATTATCGGCATGGATTG
CAGGGGACAAAGTGAATGAACTTTTGAATTCTTCCTCCAGCTGATGTGCAGAAGATTGTCTAAG
CTAACCAGAGCATGTGGCTCGGCCTGCCCTCCATCCTCTGTGCGAGGAGTGGGCGACCAGTAGTCGT
GATCTTCATGGTATCGTTTTGAAGCTAACCGTTACTCCACCCATTGAACAAAAGCACAACAGCTTA
GTTTCATCTGCCTGACGAGCTGGTTGATGAACTCCTCGCGGTTACCAAGGTCACCACCCTCGATGAA
GTGCTTGAAC

H4(63_23_G_vera)

CCTAGTTGACATAGTATTCCATCCATGTTGAGAACAGGTCAGCCCAGCTTGGGCCCGATATCATCA
GGGCATGTGGTTGACTCACCCATTACAGTATAATCTTGGATCTGCACCTTCCATGGTGTAAATCCAC
AACTCCATCCGCTTCATACACGCTCATTACATCAAATTAAGTCTGTTTCGTTCAAACCACAATA
CCACAC-----
TACTACTAAGACGAACTTTATTTCATCGAACCTTGTTCGAGAAGCTCTGGAACACACCCGAAACAGCAA
TGTGTCTTTACCTGGTCGTTCACTACGGACCAAATCCCTTCTCACTTAAACGTATATTTTTCACGTC
GGGCCCTGATGCAGATGAACAACGTATATCCGAATGGCGAGTAGAGCGCCTAAGTCTAGATCGTT
TGCGGGAGCTATGGCATTGAGATGTAGGAGTCAGGAGGATTTGATCAAGGTTGAGAAAGACGATG
ATTTTGGACATGGGATACTGATATAAA-
AGTCAAGTGCGAACATTCACTCATTAGCGGCATAGATCGCAGAGGACAAAGTGGAAATGAACTTTTT
GAATTCTTCCCTCCAGCTGATGTGCAGAAGATTGTCTAAGCTAACCCAGAGCATGTGGCTCGGCCTGC
CCTCCATCCTCTGTTCGAGGAGTGGGCGACCAGTAGTCGTAATCTTCATGGTATCGTTTTGAAGCTA
ACCGTTACTCCACCCATGGAACAAAAGCACAACAGCTTAGTTCATCTGCCTGACGAGCTGGTTGAT
GAACTCCTCGCGGTTACCAAGGTCACCACCCTCGATGAAGTGCTTGAAC

H5(35_15_vera)

CCTAGTTGACATAGTATTCCATCCATGTTGAGAACAAAGTCAGCTCAGCTTGGGCCCGATATCATCA
GGGCATGCGGTTGACTCACCCATTACAGTATAATCTTGGATCTGCACCTTCCATGGTGTAAATCCAC
AACTCCATCCGCTTCATACACGCTCATTACATCAAATTAAGTCTGTTTATCCAAAACCACAATA
CCACTACCACAATACACTAAGACGAACTTTGTTTCATCGAACCTTGTTCGAGAAGCTTTGGAACA
CACCGAAACAGCAATGTGTCTCTACATGGTCGTTCACTACGGACCAAATCCCTTGTCACTTAAGCG
TATCTTCTCACGTCGGGCCCTGATGCAGATGAACAACGTATGTTCGGAATGGCGAGTAGAGCGCCT
AAGTCTAGATCGTTTACGGGAGCTTTGGCATTGAGATGTAGGAGTCAGGAGGATTTAATCAAGGT
GGAGAAAGACGATGATTTTGGACATGGGATACTGATATAACAAGTCAAGTGCATACATTCACTCATT
ATCGGCATGGATCGCAGGGGACGAAGTGGAAATGAACTTTTTGAATTCTTCCCTCCAGCTGATGTGCA
GAAGATTGTCTAAGCTAACCCAGAGCATGTGGCTCGGCCTGCCCTCCATCCTCTGTTCGAGGAGTGGG
CGACCAGTAGTCGTAATCTTCATGGTATCGTTTTGAAGCTAACCGTTACTCCACCCATGGAACAAA
AGCACAACAGCTTAGTTCATCTGCCTGACGAGCTGGTTGATGAACTCCTCGCGGTTACCAAGGTCA
CCACCCTCGATGAAGTGCTTGAAC

H6(27_10_2_GY_vera)

CCTAGTTGACATAGTATTCCATCCATGTTGAGAAATAAGTCAGCTCAGCTTGGGCCCGATATCATCA
GGGCATGCGGTTGACTCACCCATTACAGTATAATCTTGGATCTGCACCTTCCATGGTGTAAATCCAC
AACTCCATCCGCTTCATACACGCTCATTACATCAAATTAAGTCTGTTTCATTCAAAACCACAATA
CCACAC-----
TTCACTAAGGCGAACTATATTTCATCAAACCTTGTTCGAGAAGCTCTCGAATCCACAAAACAGCAA
TGTGTCTCTACCTGGTCGTTCACTACGGACCAAATCCCTTGTCACTTAAAGCGTATCTTCTCACGTC
GGGCCCTGATGCAGATGAACAACGTATGTCTGAATGGCGAGTAGAGCGCCTAAGTCTAGATCGCT
TGCGGGAGCTTTCGCATTGAGATGTAGGAGTCAGGAGGATTTAATCAAGGTGGAGAAAGACGATG
ATTTTGGACATGGGATACTGATATAAATAGTCAAGTGCATACATTCACTCATTATCGGCATGGATTG
CAGGGGACAAAGTGGAAATGAACTTTTTGAATTCTTCCCTCCAGCTGATGTGCAGAAGATTGTCTAAG
CTAACCCAGAGCATGTGGCTCGGCCTGCCCTCCATCCTCTGTTCGAGGAGTGGGCGACCAGTAGTCGT
GATCTTCATGGTATCGTTTTGAAGCTAACCGTTACTCCACCCATTGAACAAAAGCACAACAGCTTA
GTTTCATCTGCCTGACGAGCTGGTTGATGAACTCCTCGCGGTTACCAAGGTCACCACCCTCGATGAA
GTGCTTGAAC

H7(35_35_lentiscus)

CCTAGTTGACATAGTATTCCATCCATGTTGAGAATAAGTCAGCTCAGCTTGGGCCCGATATCATCA
GGGCATGCGGTTGACTCACCCATTACAGTATAATCTTGGATCTGCACCTTCCATGGTGTAAATCCAC
AACTCCATCCGCTTCATACACGCTCATTACATCAAATTAAGTCTGCTGTTTCGTTCAAACCACAATA
CCACAC-----

TACTACTAAGACGAACTTTATTCATCGAACCTTGTGCGAGAAGCTCTGGAACACACCCGAAACAGCAA
TGTGTCTTTACCTGGTCGTTCACTACGGACCAAATCCCTTCTCACTTAAACGTATATTTTTCACGTC
GGGCCCTGATGCAGATGAACAACGTATATCCGAATGGCGAGTAGAGCGCCTAAGTCTAGATCGTT
TGCGGGAGCTATGGCATTGAGATGTAGGAGTCAGGAGGATTTGATCAAGGTTGAGAAAGACGATG
ATTTTGACATGGGATACTGATATAAA-

AGTCAAGTGCGAACATTCACTCATTAGCGGCATAGATCGCAGAGGACAAAGTGGAAATGAACTTTTT
GAATTCTTCCCTCCAGCTGATGTGCAGAAGATTGTCTAAGCTAACCGAGCATGTGGCTCGGCCTGC
CCTCCATCCTCTGTGCGAGGAGTGGGCGACCAGTAGTCGTAATCTTCATGGTATCGTTTTGAAGCTA
ACCGTTACTCCACCCATGGAACAAAAGCACAACAGCTTAGTTCATCTGCCTGACGAGCTGGTTGAT
GAACTCCTCGCGGTTACCAAGGTCACCACCCTCGATGAAGTGCTTGAAC

H8(27_31_1_G_vera)

CCTAGTTGACATAGTATTCCATCCATGTTGAGAATAAGTCAGCTCAGCTTGGGCCCGATATCATCA
GGGCATGCGGTTGACTCACCCATTACAGTATAATCTTGGATCTGCACCTTCCATGGTGTAAATCCAC
AACTCCATCCGCTTCATACACGCTCATTACATCAAATTAAGTCTGCTGTCCATTCAAACCACAATA
CCACAC-----

TTACTAAGGCGAACTATATTCATCAAACCTTGTGCGAGAAGCTCTCGAATCCACCAAACAGCAA
TGTGTCTCTACCTGGTCGTTCACTACGGACCAAATCCCTTGTCACTTAAAGCGTATCTTCTCACGTC
GGGCCCTGATGCAGATGAACAACGTATGTCTGAATGGCGAGTAGAGCGCCTATGTCTAGATCGCT
TGCGGGAGCTTTGGCATTGAGATGTAGGAGTCAGGAGGATTTAATCAAGGTTGAGAAAGACGATG
ATTTTGACATGGGATACTGATATAAATAGTCAAGTGCATACATTCACTCATTATCGGCATGGATTG

CAGGGGACAAAGTGGAAATGAACTTTTTGAATTCTTCCCTCCAGCTGATGTGCAGAAGATTGTCTAAG
CTAACCGAGCATGTGGCTCGGCCTGCCCTCCATCCTCTGTGCGAGGAGTGGGCGACCAGTAGTCGT
GATCTTCATGGTATCGTTTTGAAGCTAACCGTTACTCCACCCATTGAACAAAAGCACAACAGCTTA
GTTTCATCTGCCTGACGAGCTGGTTGATGAACTCCTCGCGGTTACCAAGGTCACCACCCTCGATGAA
GTGCTTGAAC

H9(63_13_GY_vera)

CCTAGTTGACATAGTATTCCATCCATGTTGAGAATAAGTCAACTCAGCTTGGGCCCGATATCATCA
GGGCATGCGGTTGACTCACCCATTACAGTATAATCTTGGATCTGCACCTTCCATGGTGTAAATCCAC
AACTCCATCCGCTTCATACACGCTCATTACATCAAATTAAGTCTGCTGTCCATTCAAACCACAATA
CCACAC-----

TTACTAAGGCGAACTATATTCATCAAACCTTGTGCGAGAAGCTCTCGAATCCACCAAACAGCAA
TGTGTCTCTACCTGGTCGTTCACTACGGACCAAATCCCTTGTCACTTAAAGCGTATCTTCTCACGTC
GGGCCCTGATGCAGATGAACAACGTATGTCTGAATGGCGAGTAGAGCGCCTAAGTCTAGATCGCT
TGCGGGAGCTTTGGCATTGAGATGTAGGAGTCAGGAGGATTTAATCAAGGTTGAGAAAGACGATG
ATTTTGACATGGGATACTGATAAAAAATAGTCAAGTGCATACATTCACTCATTATCGGCATGGATTG

CAGGGGACAAAGTGGAAATGAACTTTTTGAATTCTTCCCTCCAGCTGATGTGCAGAAGATTGTCTAAG
CTAACCGAGCATGTGGCTCGGCCTGCCCTCCATCCTCTGTGCGAGGAGTGGGCGACCAGTAGTCGT
GATCTTCATGGTATCGTTTTGAAGCTAACCGTTACTCCACCCATTGAACAAAAGCACAACAGCTTA
GTTTCATCTGCCTGACGAGCTGGTTGATGAACTCCTCGCGGTTACCAAGGTCACCACCCTCGATGAA
GTGCTTGAAC

H10(35_43_terebinthus)

CCTAGTTGACATAGTATTCCATCCATGTTGAGAATAAGTCAGCTCAGCTTGGGCCCGATATCATCA
GGGCATGCGGTTGACTCACCCATTACAGTATAATCTTGGATCTGCACCTTCCATGGTGTAAATCCAC
AACTCCATCCGCTTCATACACGCTCATTACATCAAATTAAGTCTGCTGTTTATCCAAAACCACAATA
CCACACTACCACAATACTAAGACGAACTTTGTTTCATCGAACCTTGTGCGAGAAGCTTTGGAACA
CACCGAAACAGCAATGTGTCTCTACATGGTCGTTCACTACGGACCAAATCCCTTGTCACTTAAGCG
TATCTTCTCACGTCGGGCCCTGATGCAGATGAACAACGTATGTCGGAATGGCGAGTAGAGCGCCT
AAGTCTAGATCGTTTACGGGAGCTTTGGCATTGAGATGTAGGAGTCAGGAGGATTTAATCAAGGT
GGAGAAAGACGATGATTTTGACATGGGATACTGATATAACAAGTCAAGTGCATACATCACTCATT
ATCGGCATGGATCGCAGGGGACGAAAGTGAATGAACTTTTTGAATTCTTCCCTCCAGCTGATGTGCA
GAAGATTGTCTAAGCTAACCAGAGCATGTGGCTCGGCCTGCCCTCCATCCTCTGTGCGAGGAGTGGG
CGACCAGTAGTCGTAATCTTCATGGTATCGTTTTGAAGCTAACCCTTACTCCACCCATGGAACAAA
AGCACAACAGCTTAGTTCATCTGCCTGACGAGCTGGTTGATGAACTCCTCGCGGTTACCAAGGTCA
CCACCTCGATGAAGTGCTTGAAC

H11(27_16_1_vera)

CCTAGTTGACATAGTATTCCATCCATGTTGAGAATAAGTCAGCTCAGCTTGGGCCCGATATCATCA
GGGCATGCGGTTGACTCACCCATTACAGTATAATCTTGGATCTGCACCTTCCATGGTGTAAATCCAC
AACTCCATCCGCTTCATACACGCTCATTACATCAAATTAAGTCTGCTGTCCATTCAAAACCACAATA
CCACAC-----
TTCCTAAGGCGAACTATATTCATCAAACCTTGTGCGAGAAGCTCTCGAATCCACAAAACAGCAA
TGTGTCTCTACCTGGTCGTTCACTACGGACCAAATCCCTTGTCACTTAAGCGTATCTTCTCACGTC
GGGCCCTGATGCAGATGAACAACGTATGTCTGAATGGCGAGTAGAGCGCCTGAGTCTAGATCGCT
TGCGGGAGCTTTGGCATTGAGATGTAGGAGTCAGGAGGATTTAATCAAGGTGGAGAAAGACGATG
ATTTTGACATGGGATACTGATATAAATAGTCAAGTGCATACATCACTCATTATCGGCATGGATTG
CAGGGGACAAAGTGAATGAACTTTTTGAATTCTTCCCTCCAGCTGATGTGCAGAAGATTGTCTAAG
CTAACCAGAGCATGTGGCTCGGCCTGCCCTCCATCCTCTGTGCGAGGAGTGGGCGACCAGTAGTCGT
GATCTTCATGGTATCGTTTTGAAGCTAACCCTTACTCCACCCATGAAACAAAAGCACAACAGCTTA
GTTTCATCTGCCTGACGAGCTGGTTGATGAACTCCTCGCGGTTACCAAGGTCAACCACCTCGATGAA
GTGCTTGAAC

H12(35_20_1_atlantica)

CCTAGTTGACATAGTATTCCATCCATGTTGAGAATAAGTCAGCTCAGCTTGGGCCCGATATCATCA
GGGCATGCGGTTGACTCACCCATTACAGTATAATCTTGGATCTGCACCTTCCATGGTGTAAATCCAC
AACTCCATCCGCTTCATACACGCTCATTACATCAAATTAAGTCTGCTGTCCATTCAAAACCACAATA
CCACAC-----
TTCCTAAGGCGAACTATATTCATCAAACCTTGTGCGAGAAGCTCTCGAATCCACAAAACAGCAA
TGTGTCTCTACCTGGTCGTTCACTACGGACCAAATCCCTTGTCACTTAAGCGTATCTTCTCACGTC
GGGCCCTGATGCAGATGAACAACGTATGTCTGAATGGCGAGTAGAGCGCCTAAGTCTAGATCGCT
TGCGGGAGCTTTGGCATTGAGATGTAGGAGTCAGGAGGATTTAATCAAGGTGGAGAAAGACGATG
ATTTTGACATGGGATACTGATAAAAATAGTCAAGTGCATACATCACTCATTATCGGCATGGATTG
CAGGGGACAAAGTGAATGAACTTTTTGAATTCTTCCCTCCAGCTGATGTGCAGAAGATTGTCTAAG
CTAACCAGAGCATGTGGCTCGGCCTGCCCTCCATCCTCTGTGCGAGGAGTGGGCGACCAGTAGTCGT
GATCTTCATGGTATCGTTTTGAAGCTAACCCTTACTCCACCCATGAAACAAAAGCACAACAGCTTA
GTTTCATCTGCCTGACGAGCTGGTTGATGAACTCCTCGCGGTTACCAAGGTCAACCACCTCGATGAA
GTGCTTGAAC

Ek Çizelge 6. Elektroforez tampon çözeltisi 5X TBE (1lt) pH: 8.00

Bileşen	Miktar
Tris base	54 g
Borik asit	27,5 g
EDTA	20 ml
dH ₂ O	~1000

Ek Çizelge 7. Na-EDTA solüsyonu (1lt-0,5M)

Bileşen	Miktar
EDTA	186,1 g
NaOH	20 g
dH ₂ O	~1000

Ek Çizelge 8. Manuel DNA izolasyonunda kullanılan liziz tampon çözeltisi içeriği

Bileşen	Final Concentration	Volume
1M Tris-HCl, pH 8.0	0.2M Tris HCl, pH 8.0	25mL
1M NaCl	0,5M	62,5mL
0,5M EDTA	0,01M EDTA	2,5 mL
2% SDS	1% SDS	6.25mL
		100mL

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ünal Sevinç

Doğum Yeri : Bafra

Doğum Tarihi : 12/11/1990

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

- Yayımlar -SCI -Diğer
- Bildiriler -Uluslararası -Ulusal

IV.Ulusal Moleküler Biyoloji Ve Biyoteknoloji Kongresi, 21-24/08/2015

Sevinc Ü. Özkılınç H., 2015. “*Pistacia* spp. Türlerinde *Alternaria* Yanıklığı Etmeni *Alternaria* Patojenlerinin *Major Allergen Geni Alt_a_1*’e Göre Populasyon Genetik Analizleri” V.Ulusal Moleküler Biyoloji Ve Biyoteknoloji Kongresi, Aydın, Türkiye, 21 Ağustos- 24 Ağustos 2015, 168 s.

Uluslararası XVI GREMPA Meeting 12-14/05/2015

Özkılınç H., Kurt S., Can C., Konukoglu F., Aktan A., Uysal A., Polatbilek H., Yasar A., Sevinc U., Sarpkaya K., 2015. "Alternaria blight of *Pistacia* species in Turkey", XVI GREMPA Meeting, Meknes, FAS, 12 Mayıs - 14 Mayıs 2015, pp.80

Pamukkale Gıda Sempozyumu III: Kurutulmuş ve Yarı Kurutulmuş Gıdalar 13-15/05/2015

Özsoy, N., Ünal, S., Özkılınç, H., Uysal Pala, Ç. 2015. Kuru Gıda Örneklerinden Mikotoksik Fungal Türlerin İzolasyonu Ve Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması”, Pamukkale Gıda Sempozyumu III: Kurutulmuş ve Yarı Kurutulmuş Gıdalar, 13-15 Mayıs2015, Denizli (Poster Bildiri).

c) Katıldığı Projeler

TÜBİTAK-TOVAG 1120554 numaralı Proje (bursiyer)

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Yok

İLETİŞİM

E-posta Adresi :unalsevinc90@gmail.com