

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİ'NDE BUĞDAYDA KÖK VE KÖK BOĞAZI
ÇÜRÜKLÜĞÜ ETMENİ *FUSARIUM* SPP.'NİN TESPİTİ VE *FUSARIUM GRAMINEARUM*
SMALL SECRETED PROTEİN GENLERİNİN KARAKTERİZASYONU**

DOKTORA TEZİ

Fatih ÖLMEZ

Bitki Koruma Anabilim Dalı

HAZİRAN 2015
SAMSUN



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİ'NDE BUĞDAYDA KÖK VE KÖK BOĞAZI
ÇÜRÜKLÜĞÜ ETMENİ *FUSARIUM* SPP.'NİN TESPİTİ VE *FUSARIUM GRAMINEARUM*
SMALL SECRETED PROTEİN GENLERİNİN KARAKTERİZASYONU**

DOKTORA TEZİ

**Fatih ÖLMEZ
(09210511)**

Tezin Savuma Tarihi : 15 Haziran 2015

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Berna TUNALI

Bu Doktora Tez Çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.ZRT.
1904.11.022'nolu Proje ile desteklenmiştir.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalında

Fatih ÖLMEZ Tarafından Hazırlanan

**GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİ'NDE BUĞDAYDA KÖK VE KÖK BOĞAZI
ÇÜRÜKLÜĞÜ ETMENİ *FUSARIUM* SPP.'NİN TESPİTİ VE *FUSARIUM GRAMINEARUM*
SMALL SECRETED PROTEİN GENLERİNİN KARAKTERİZASYONU**

**başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 15/06/2015 tarihinde yapılan sınav ile
DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.**

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

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

Yrd.Doç. Dr. İsmail SEZER
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Doç. Dr. Handan ALTINOK
Erciyes Üniversitesi

Prof. Dr. Fatma Sara DOLAR
Ankara Üniversitesi

....../.... / 2015

Prof. Dr. Hüseyin DEMİR

Enstitü Müdürü

Gönül eşim, hayat arkadaşım Pınar'a ...

ÖNSÖZ

Beni bir öğrenci olarak kabul eden ve mesleki gelişimim için her türlü desteği sağlayan başta tez danışmanım Prof.Dr. Berna TUNALI olmak üzere, katkılarıyla bu çalışmayı tamamlamama yardımcı olan Bayram KANSU ve Kim H.KOSACK'a, verdiği bursla yurtdışında eğitim almamı sağlayan ve gerçek anlamda mesleki kariyerimin yön değiştirmesine neden olan Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na, doktora çalışmam süresince benimle aynı sıkıntılara katlanan ve desteklerinden güç aldığım Sevgili Eşim Pınar ve çocuklarım Elif Büşra ile Ali Hamza'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Haziran 2015

Fatih ÖLMEZ
Ziraat Mühendisi

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	xv
SİMGELER ve KISALTMALAR	xvii
ÖZET.....	xix
ABSTRACT	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Buğday Tarımında Sorun Olan Önemli <i>Fusarium</i> Türleri.....	5
2.1.1. <i>Fusarium graminearum</i> (Teleomorph: <i>Gibberella zea</i> (Schwein.) Petch, (1936))	5
2.1.2. <i>Fusarium culmorum</i> (W.G. Smith) Saccardo	7
2.2. Bitki-Fungus İnteraksiyonlarına Genel Bakış	9
2.2.1. Funguslarda tam-genom sekans analizleri ve small secreted protein (SSP) genleri	10
2.3 Buğdayda Sorun Olan <i>Fusarium</i> spp. ile İlgili Çalışmalar	12
2.3.1. Buğdayda kök boğazı hastalıkları ile ilgili Türkiye’de yapılan çalışmalar	12
2.3.2. Buğdayda kök ve kök boğazı hastalıkları ile ilgili yurtdışında yapılan çalışmalar	14
2.4. Funguslardaki SSP Genleri ve Eftörler İle İlgili Çalışmalar	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	21
3.1. Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde Buğdayda Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü Etmeni <i>Fusarium</i> spp.’lerin Belirlenmesi	22
3.1.1. Buğday alanlarından <i>Fusarium</i> spp.’nin sürveyi ve izolasyonu.....	22
3.1.2. İzole edilen <i>Fusarium</i> spp.’lerin morfolojik teşhisi çalışmaları.....	23
3.1.3. İzole edilen <i>Fusarium</i> spp.’lerin moleküler teşhisi çalışmaları.....	24
3.1.3.1. Fungal miselial kitlenin eldesi ve DNA izolasyonu.....	24
3.1.3.2. <i>Fusarium</i> cinsine ait primer ile tüm koleksiyonun taranması ..	25
3.1.3.3. Bazı moleküler teknikler ile <i>Fusarium</i> izolatlarının tür teşhisi	26
3.2. <i>F. graminearum</i> Genomundaki Bazı SSP (Small Secreted Protein) Genlerinin Moleküler Karakterizasyonu	29
3.2.1. Karakterize edilecek <i>F. graminearum</i> SSP genlerinin belirlenmesi ...	29
3.2.2. Seçilen <i>F. graminearum</i> SSP genlerindeki genetik varyasyonun belirlenmesi.....	29
3.2.2.1. Fungal strainlerin belirlenmesi ve hazırlanması	29
3.2.2.3. Primer dizaynı	30
3.2.2.4. PCR analizleri	32
3.2.2.5. Dizi analizi için PCR ürünlerinin pürifikasyonu ve	

hazırlanması	33
3.2.2.6. Sonuçların analiz edilmesi	34
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	37
4.1. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Buğdayda Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü	
Etmeni <i>Fusarium</i> spp.'lerin Belirlenmesi	37
4.1.1. Buğday alanlarından <i>Fusarium</i> izolatlarının eldesi	37
4.1.2. İzole edilen <i>Fusarium</i> spp.'lerin moleküler teşhis sonuçları	38
4.2. Small Secreted Protein (SSP) Genlerinin Moleküler Karakterizasyonu	52
4.2.1. Karakterizasyon için belirlenen <i>F. graminearum</i> SSP genleri	52
4.2.2. SSP genlerinde belirlenen genetik varyasyonlar	54
4.2.3. SSP genlerinin sekans analizleri temelinde elde edilen bulgular	56
4.2.3.1. FGSG_09066 (<i>Fusarium graminearum</i> korunmuş hipotetik protein)	56
4.2.3.2. FGSG_11047 (<i>Fusarium graminearum</i> hipotetik protein)	64
4.2.3.3. FGSG_10212 ve FGSG_11205 (<i>F. graminearum</i> Probable SnodProt1 Precursors)	70
4.2.3.4. FGSG_05046 (<i>F. graminearum</i> korunmuş hipotetik protein)	80
4.2.3.5. FGSG_04074 (<i>Fusarium graminearum</i> korunmuş hipotetik protein)	86
4.2.3.6. FGSG_07988 (<i>Fusarium graminearum</i> korunmuş hipotetik protein)	94
4.2.3.7. FGSG_04583 (<i>Fusarium graminearum</i> korunmuş hipotetik protein)	99
4.2.3.8. FGSG_08238 (<i>Fusarium graminearum</i> korunmuş hipotetik protein)	105
4.2.3.9. FGSG_11046 (<i>Fusarium graminearum</i> korunmuş hipotetik protein)	110
4.2.3.10. FGSG_04735 (<i>Fusarium graminearum</i> korunmuş hipotetik protein)	118
4.2.3.11. FGSG_08493 (<i>F. graminearum</i> korunmuş hipotetik protein)	125
4.2.3.12. FGSG_09586 (Probable phosphatidylglycerol/ phosphatidylinositol transfer protein)	129
4.2.4. SSP Genlerinin kromozomal lokasyonları ve varyasyonların önemi	135
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	141
KAYNAKLAR	145
ÖZGEÇMİŞ	159

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Başak yanıklığı etmeni <i>Fusarium graminearum</i> 'un hayat döngüsü (Trail, 2009).	5
Şekil 2.2.	Buğdayda <i>Fusarium graminearum</i> tarafından neden olunan başak yanıklığı hastalığının belirtileri.	6
Şekil 2.3.	Bazı <i>Fusarium</i> spp. tarafından neden olunan kök boğazı çürüklüğü belirtisi (a) ve hastalık nedeniyle başakların vaktinden önce beyazlaşması (b).	8
Şekil 3.1.	Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde buğday alanlarında <i>Fusarium</i> spp.'nin izolasyonu için yapılan survey ve izolasyon çalışmalarından görüntüler.	23
Şekil 3.2.	DNA izolasyonları için liyofilize edilmiş <i>Fusarium</i> spp. kültürleri ve ezme işleminde kullanılan mini havaneli.	24
Şekil 3.3.	DNA miktar tayininde kullanılan NanoDrop cihazı ve yapılan işlemlerden bir görüntü.	25
Şekil 3.4.	Sekans analizi yoluyla tür teşhisi işleminde konsensus dizilerinin oluşturulması.	27
Şekil 3.5.	İzolatlara ait sekans dizileri kullanılarak NCBI veri tabanından yapılan tarama çalışması.	28
Şekil 3.6.	Geneious programında çalışılacak genler için primer dizaynı çalışmaları.	31
Şekil 3.7.	Varyasyon çalışmalarında kullanılan PCR ve elektroporasyon cihazları.	33
Şekil 3.8.	PCR ürünlerinin sekans analizleri için temizlenmesi.	34
Şekil 3.9.	Geneious genetik analiz programında yapılan soyağacı oluşturma çalışmalarından bir görüntü.	35
Şekil 3.10.	Allelik varyasyonların yorumlanmasında kullanılan tablo.	35
Şekil 4.1.	İzolasyon sonucu elde edilen <i>Fusarium culmorum</i> izolatının petride ve mikroskop altındaki görüntüsü.	37
Şekil 4.2.	<i>Fusarium</i> spp.'nin cins düzeyinde PCR ile teşhisi çalışmasından bir jel görüntüsü.	38
Şekil 4.3.	İzolatların ITS bölgelerinin çoğaltılması çalışmasından bir görüntü.	39
Şekil 4.4.	ITS bölgelerinin <i>MspI</i> enzim kesimi sonrası oluşan bant profilleri.	39
Şekil 4.5.	ITS bölgelerinin <i>HinfI</i> ve <i>HaeIII</i> enzimleri ile kesimi sonrası oluşan bant profilleri.	41
Şekil 4.6.	<i>Fusarium semitectum</i> için yapılan PCR ile teşhis sonuçları.	44
Şekil 4.7.	<i>Fusarium equiseti</i> için yapılan PCR ile teşhis sonuçları.	44

Şekil 4.8. <i>Fusarium proliferatum</i> için yapılan PCR ile teşhis sonuçları.	45
Şekil 4.9. <i>Fusarium verticillioides</i> için yapılan PCR ile teşhis sonuçları.	45
Şekil 4.10. <i>Fusarium acuminatum</i> için yapılan PCR ile teşhis sonuçları.....	46
Şekil 4.11. <i>Fusarium culmorum</i> için yapılan PCR sonuçları.	46
Şekil 4.12. <i>Fusarium graminearum</i> secretome verileri üzerinde yapılan analizlerin özetini gösteren diagram.	53
Şekil 4.13. PCR çalışmaları sonucu elde edilen jel görüntüleri.	55
Şekil 4.14. FGSG_09066 genine ait jel görüntüsü.	57
Şekil 4.15. FGSG_09066 genine ait BROAD web sitesinde yer alan bilgilerden bir görüntü (http://mips.helmholtzmuenchen.de/genre/proj/FGDB/ingleGeneReport.html?entry=FGSG_09066 ; 28.09.2012).	57
Şekil 4.16. FGSG_09066 genine ait Geneious programında oluşturulan alignment görüntüsü.	58
Şekil 4.17. FGSG_09066 genine ait allelik varyasyonlar. “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.	59
Şekil 4.18. <i>Fusarium graminearum</i> izolatlarında FGSG_09066 geni üzerindeki mutasyonların ve bunların protein ürününe olası etkilerinin karşılaştırılması	60
Şekil 4.19. FGSG_09066 geni için nükleotid alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.	61
Şekil 4.20. FGSG_11047 genine ait jel görüntüsü.	64
Şekil 4.21. FGSG_11047 geninin homoloji durumunu gösteren analiz (GeneTree EFGT00090000013698).	65
Şekil 4.22. FGSG_11047 genine ait Geneious programında oluşturulan alignment görüntüsü.	66
Şekil 4.23. FGSG_11047 genine ait allelik varyasyonlar. “SP” sinyal peptid dizisini, “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.	67
Şekil 4.24. <i>Fusarium graminearum</i> izolatlarında FGSG_11047 geni üzerindeki mutasyonların ve bunların protein ürününe olası etkilerinin karşılaştırılması.	68
Şekil 4.25. FGSG_11047 geni için nükleotid alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.	69
Şekil 4.26. FGSG_10212 genine ait jel görüntüsü.	70
Şekil 4.27. FGSG_11205 genine ait jel görüntüsü.	71
Şekil 4.28. FGSG_10212 genine ait homoloji araştırmasından bir görüntü (www.fungi.ensemble.org-GeneTree EFGT00050000006250).	72
Şekil 4.29. Referans izolat olan F01 (PH-1) straininde FGSG_10212 ve FGSG_11205 SnodProt1 precursor genlerine ait sekans verileri kullanılarak oluşturulmuş alignment işlemi (Benzer olmayan alanlar nokta ile gösterilmiştir).	73
Şekil 4.30. FGSG_10212 genine ait Geneious programında oluşturulan alignment görüntüsü.	76
Şekil 4.31. FGSG_10205 genine ait allelik varyasyonlar. “SP” sinyal peptid dizisini, “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.	78
Şekil 4.32. FGSG_10212 ve FGSG_11205 genleri için nükleotid alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı	79
Şekil 4.33. FGSG_05046 genine ait jel görüntüsü.	80
Şekil 4.34. FGSG_05046 genine ait homoloji araştırmasından bir görüntü (www.fungi.ensemble.org- GeneTree EFGT00090000013110).	81
Şekil 4.35. FGSG_05046 genine ait Geneious programında oluşturulan nükleotid	

alignment görüntüsü.....	82
Şekil 4.36. FGSG_05046 genine ait allelik varyasyonlar. “SP” sinyal peptid dizisini, “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.....	83
Şekil 4.37. FGSG_05046 geni için nükleotid alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.....	84
Şekil 4.38. FGSG_04074 genine ait jel görüntüsü.....	86
Şekil 4.39. FGSG_04074 geninin homoloji durumunu gösteren analiz (GeneTree EFGT00050000002186).....	87
Şekil 4.40. FGSG_04074, FGSG_07988, FGSG_03662 ve FGSG_08122 genleri arasındaki genetik uzaklık.....	88
Şekil 4.41. FGSG_04074 genine ait alignment görüntüsü.....	89
Şekil 4.42. FGSG_04074 genine ait allelik varyasyonlar. “SP” sinyal peptid dizisini, “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.....	91
Şekil 4.43. <i>Fusarium graminearum</i> izolatlarında FGSG_04074 geni üzerindeki mutasyonların ve bunların protein ürününe olası etkilerinin karşılaştırılması.....	92
Şekil 4.44. FGSG_04074 geni için nükleotid alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.....	93
Şekil 4.45. FGSG_07988 genine ait jel görüntüsü.....	94
Şekil 4.46. FGSG_07988 genine ait nükleotid alignment görüntüsü.....	95
Şekil 4.47. FGSG_07988 genine ait allelik varyasyonlar. “SP” sinyal peptid dizisini, “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.....	96
Şekil 4.48. Türkiye’ye ait <i>Fusarium culmorum</i> straininde oluşan ekstra mutasyonlar.....	97
Şekil 4.49. FGSG_07988 geni için alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.....	98
Şekil 4.50. FGSG_04583 genine ait jel görüntüsü.....	99
Şekil 4.51. FGSG_04583 geninin homoloji durumunu gösteren analiz (GeneTree EFGT00050000008285).....	100
Şekil 4.52. FGSG_04583 genine ait Geneious programında oluşturulan nükleotid alignment görüntüsü.....	101
Şekil 4.53. FGSG_04583 genine ait allelik varyasyonlar. “SP” sinyal peptid dizisini, “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.....	102
Şekil 4.54. <i>Fusarium graminearum</i> izolatlarında FGSG_04583 geni üzerindeki mutasyonların ve bunların protein ürününe olası etkilerinin karşılaştırılması.....	103
Şekil 4.55. FGSG_04583 geni için alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.....	104
Şekil 4.56. FGSG_08238 genine ait jel görüntüsü.....	105
Şekil 4.57. FGSG_8238 genine ait Geneious programında oluşturulan nükleotid alignment görüntüsü.....	106
Şekil 4.58. FGSG_08238-04583 ve 03445 genlerinin homoloji durumunu gösteren Geneious programında oluşturulan nükleotid alignment görüntüsü.....	107
Şekil 4.59. FGSG_08238 genine ait allelik varyasyonlar. “SP” sinyal peptid dizisini, “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.....	108
Şekil 4.60. FGSG_08238 geni için alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.....	109
Şekil 4.61. FGSG_11046 genine ait jel görüntüsü.....	110
Şekil 4.62. FGSG_11046 geninin homoloji durumunu gösteren analiz (GeneTree EFGT00050000003747).....	111

Şekil 4.63. <i>F. graminearum</i> 'a ait FGSG_11046 geninin aynı fungusta ve <i>F. oxysporum</i> ile <i>F. verticillioide</i> s'te bulunan homologlarının homoloji durumunu gösteren Geneious programında oluşturulan nükleotid hizalama görüntüsü.....	113
Şekil 4.64. FGSG_11046 genine ait Geneious programında oluşturulan nükleotid alignment görüntüsü.	115
Şekil 4.65. FGSG_11046 genine ait allelik varyasyonlar. "SP" sinyal peptid dizisini, "C" Cysteine aa'ni ifade etmektedir.....	116
Şekil 4.66. FGSG_11046 geni için alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.	117
Şekil 4.67. FGSG_04735 genine ait jel görüntüsü.	118
Şekil 4.68. FGSG_04735 genine ait Geneious programında oluşturulan nükleotid alignment görüntüsü.	119
Şekil 4.69. FGSG_04735 geninin homoloji durumunu gösteren analiz (GeneTree EFGT00090000011718).....	120
Şekil 4.70. <i>Fusarium graminearum</i> 'a ait FGSG_04735 geninin aynı fungusta ve <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Nectria haematococca</i> ile <i>Fusarium verticillioide</i> s'te bulunan homologlarının homoloji durumunu gösteren Geneious programında oluşturulan nükleotid hizalama görüntüsü.	121
Şekil 4.71. FGSG_04735 genine ait allelik varyasyonlar. "SP" sinyal peptid dizisini, "C" Cysteine aa'ni ifade etmektedir.....	123
Şekil 4.72. FGSG_04735 geni için alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.	124
Şekil 4.73. FGSG_08493 genine ait jel görüntüsü.	125
Şekil 4.74. FGSG_08493 genine ait Geneious programında oluşturulan nükleotid alignment görüntüsü.	126
Şekil 4.75. FGSG_08493 genine ait allelik varyasyonlar. "SP" sinyal peptid dizisini, "C" Cysteine aa'ni ifade etmektedir.....	127
Şekil 4.76. FGSG_08493 geni için alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.	128
Şekil 4.77. FGSG_09586 genine ait jel görüntüsü.	129
Şekil 4.78. FGSG_09586 genine ait Geneious programında oluşturulan nükleotid alignment görüntüsü.	130
Şekil 4.79. FGSG_09586 geninin homoloji durumunu gösteren analiz (GeneTree EFGT00050000004241).....	131
Şekil 4.80. FGSG_09586 genine ait allelik varyasyonlar. "SP" sinyal peptid dizisini, "C" Cysteine aa'ni ifade etmektedir.....	133
Şekil 4.81. FGSG_07988 geni için alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.....	134
Şekil 4.82. Seçilen SSP genlerinin <i>Fusarium graminearum</i> kromozomları üzerindeki pozisyonları	135
Şekil 5.1. FGSG_05046 kodlu gen için <i>Fusarium culmorum</i> üzerinde oluşan SNP mutasyonu ile ortaya çıkan yeni enzim kesim bölgeleri.	142
Şekil 5.2. FGSG_09586 kodlu gen için <i>F. pseudograminearum</i> üzerinde oluşan SNP mutasyonu ile ortaya çıkan yeni enzim kesim bölgeleri.	143

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1. Türkiye’de ve Güneydoğu Anadolu’daki bazı illerde buğday üretim alanları ve miktarları (TUIK, 2015).....	1
Çizelge 3.1. Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nden 2009-2010 yıllarında <i>Fusarium</i> spp. izolasyonu için yapılan sürveye ait bilgiler.....	22
Çizelge 3.2. <i>Fusarium</i> ’ların cins düzeyinde moleküler teşhisi için hazırlanan PCR karışımının içeriği ve miktarları.....	26
Çizelge 3.3. <i>Fusarium</i> spp. teşhislerinde kullanılan türe özgü primerler ve PCR koşulları.....	27
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan <i>Fusarium</i> türüne ait fungal izolatlar.....	30
Çizelge 3.5. Karektirizasyon için belirlenen Small Secreted Protein genleri ve dizayn edilen primerlere ait bilgiler.....	32
Çizelge 4.1. ITS-RFLP işlemi sonucu oluşan bant profilleri.....	42
Çizelge 4.2. Sekans analizleri sonucunda teşhisi yapılan izolatlara ait bilgiler.....	47
Çizelge 4.3. Çalışmada belirlenen <i>Fusarium</i> türleri ve dağılımları.....	48
Çizelge 4.4. Filtreleme çalışmaları sonucu elde edilen genlere ait bilgiler.....	53
Çizelge 4.5. FGSG_08238-04583 ve 03445 genlerinin genetik uzaklıkları.....	107
Çizelge 4.6. FGSG_11046 geninin farklı funguslardaki homologlarının genetik uzaklıkları.....	114
Çizelge 4.7. FGSG_04735 geninin farklı funguslardaki homologlarının genetik uzaklıkları.....	122
Çizelge 4.8. İncelenen genlerde gözlenen genetik çeşitlilik.....	139

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	: Yüzde
ha	: Hektar
SSP	: Small Secreted Protein (Küçük, hücre arasına salınan protein)
MIPS	: The Munich Information Center for Protein Sequences
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
<i>Avr Geni</i>	: Avirülenslik Geni
R Geni	: Dayanıklılık Geni
PAMP	: Pathogen Associated Molecular Pattern (Patojen ile ilişkili moleküler motif)
LysM Type	: Lysin Motif tipi
PTI	: Pathogen Triggered Immunity (Patojen tarafından tetiklenen dayanıklılık)
ETI	: Effector Triggered Immunity (Patojen tarafından tetiklenen dayanıklılık)
HR	: Hypersensitive Response (Aşırı duyarlılık)
Nep1	: Necrosis and ethylene-inducing peptide1 (Nekroz ve etileni tetikleyen peptid1)
NLPs	: Necrosis and ethylene-inducing peptide1 like proteins (Nekroz ve etileni tetikleyen peptid1 benzeri protein)
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism (Tek nükleotid değişimi)
US	: Amerika Birleşik Devletleri
UK	: İngiltere
DE	: Almanya
NED	: Hollanda
TR	: Türkiye

**GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİ'NDE BUĞDAYDA KÖK VE KÖK BOĞAZI
ÇÜRÜKLÜĞÜ ETMENİ *FUSARIUM* SPP.'NİN TESPİTİ VE *FUSARIUM GRAMINEARUM*
SMALL SECRETED PROTEİN GENLERİNİN KARAKTERİZASYONU**

ÖZET

Bu çalışma, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde buğday alanlarında kök ve kök boğazı çürüklüğüne neden olan *Fusarium* türlerinin tespiti ve bir model organizma olan *F. graminearum*'a ait bir dizi fungal efektör adayı Small Secreted Protein (SSP) geninin karakterizasyonu yoluyla, fungal efektör adaylarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Diyarbakır, Şanlıurfa, Mardin ve Adıyaman illerine ait buğday üretim alanlarından 19 farklı türe ait 143 *Fusarium* izolatu elde edilmiştir. Teşhisi yapılan türler içerisinde en yoğun olarak %17.4 ile *F. proliferatum* izole edilirken, en önemli buğday kök çürüklüğü etmenlerinden *F. culmorum* ve *F. pseudograminearum*'un izolasyon sıklığı %13 olarak bulunmuştur.

F. graminearum secretome'unu oluşturan 1369 gen içerisinde tipik fungal efektör kriterlerini karşılayan 16 adet gen seçilmiş ve bu genlerin sekans analizleri yoluyla karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sekans verileri üzerinden dünyanın farklı bölgelerinden 9 farklı *F. graminearum*, 4 adet *F. culmorum*, 2 adet *F. pseudograminearum* ve 1 adet *F. venenatum* izolatında bu genlerin genetik çeşitliliği, oluşan mutasyonların proteinlerin yapısına etkileri incelenmiştir. Seçilen genlerin tam genom sekansı tamamlanan diğer funguslardaki varlığı ve benzerlik durumları ortaya konulmuştur. Bu bilgilerin çalışılan türlerin ayrımında ve *F. graminearum* efektörlerinin belirlenmesinde kullanım olanakları tartışılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Buğday; *Fusarium*; Güneydoğu Anadolu Bölgesi; *F. graminearum*; Efektör.

**DETERMINATION OF *FUSARIUM* SPP. CAUSING ROOT AND CROWN ROT ON
WHEAT AT SOUTHEAST ANATOLIA AND CHARACTERIZATION OF
FUSARIUM GRAMINEARUM SMALL SECRETED PROTEIN GENES**

ABSTRACT

This study aimed that determination of *Fusarium* spp. causing root and crown rot on wheat at Southeast Anatolia and analysis of Small Secreted Proteins (SSPs) of *F. graminearum*, which is a model organism for plant-fungi interactions, via sequence analysis.

143 *Fusarium* isolates including 19 species were obtained from wheat producing areas at Diyarbakır, Şanlıurfa, Mardin and Adıyaman provinces. Although the most frequently isolated species was *F. proliferatum* at the rate of 17.4%, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum* which were the most important crown rot pathogens were isolated at 13% of totally isolated *Fusarium* isolates.

Sixteen genes reflecting typical fungal effector characteristics within 1369 *F. graminearum* secreted genes were selected and characterized. By using the sequence data, genetic variation, effects of occurred mutation on protein structure were investigated within 9 *F. graminearum*, 4 *F. culmorum*, 2 *F. pseudograminearum* and 1 *F. venenatum* isolate obtained from different part of the world. Presence of selected genes within the fungal species of which whole genome analysis were finished and their homology rate were clarified. Possibilities of usage of these knowledge were discussed.

Key Words: Wheat; *Fusarium*; Southeast Anatolia Region; *F. graminearum*; Effector.

1. GİRİŞ

Buğday tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de insan beslenmesinde çok önemli bir yer tutan temel gıda maddelerinden biridir. Buğday ülkemizin tarım alanlarının üçte birinde yetiştirilmekte ve yaklaşık 15 milyon insan için geçim kaynağı olmaktadır. Buğday üretimi 2014 verilerine göre yaklaşık 19 milyon ton olup, ekim alanı 7.9 milyon ha olarak bildirilmektedir (TUİK, 2015). Güneydoğu Anadolu Bölgesi dünyada diploid ve makarnalık buğdayın ilk kültüre alındığı yerdir. (Heun ve diğ., 1997; Ozkan ve diğ., 2002, 2005). Bu bölgede yaklaşık 1 milyon ha alanda buğday tarımı yapılmaktadır ve bu miktar Türkiye buğday üretim alanlarının yaklaşık olarak sekizde birine karşılık gelmektedir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Türkiye’de ve Güneydoğu Anadolu’daki bazı illerde buğday üretim alanları ve miktarları (TUİK, 2015).

Lokasyon	Alan (da)	Üretim (ton)
TÜRKİYE	79 192 000	19 000 000
Diyarbakır	3 876 147	1 076 609
Şanlıurfa	3 077 726	867 558
Mardin	1 950 581	727 995
Adıyaman	872 511	238 572

Buğday alanlarında gerek çiftçi alışkanlıkları gerekse arazi özelliklerinin başka ürünlerin yetiştirilmesine olanak vermemesi gibi nedenlerle monokültür tarım yaygındır. Üst üste aynı kültür bitkisinin yetiştirilmesi zamanla bu alanda belirli hastalıklar yönüyle inokulum yoğunluğunun ve hastalıklardan kaynaklanan ürün kayıplarının artması anlamına gelmektedir.

Buğday alanlarında sorun olan başlıca patojen grubu, funguslardır. Bunlar içerisinde paslar, yaprak leke hastalıkları, kök ve kök boğazı çürüklükleri, başak yanıklığı önemli kalite ve kantite kayıplarına neden olurlar. Bu hastalıklardan

bazıları için fungusit uygulamaları etkili olabilmesine rağmen, birim alandan elde edilen gelirin çok düşük olduğu buğday tarımında, fungusit uygulamaları uygun bir çözüm olamamaktadır.

Fusarium cinsine dahil funguslar buğdayın çeşitli dönemlerinde önemli bitki koruma sorunlarına neden olabilmektedirler. Bu grubun üyelerinden *F.culmorum* ve *F.graminearum* erken dönemde fide çürüklükleri, ilerleyen dönemlerde kök ve kök boğazı çürüklükleri ve çiçeklenme dönemindeki bulaşmalarla da başak yanıklığı hastalıklarına neden olmaktadır (Mitter ve diğ., 2006). Sebep oldukları kök çürüklükleri ile birim alandaki bitki sayısında azalma, bitkilerde gelişme geriliğine ve dane doldurmadaki neden oldukları aksaklıklar nedeniyle bazı dönemler önemli verim kayıplarına neden olurlar (Goswami ve Kistler, 2004; McMullen ve diğ., 1997). Çiçeklenme dönemindeki *Fusarium* enfeksiyonları cılız, tebeşirleşmiş daneler oluşturup, doğrudan ürün kayıplarına neden olurlar (Klein ve diğ., 1991). *Fusarium* cinsine dahil olan bu funguslar, tarlada ve depoda dane üzerinde oluşturdukları mikotoksinler ile hasat edilen ürünü insan ve hayvan sağlığı açısından elverişsiz hale getirebilmektedirler (D'mello ve diğ., 1999; Peraica ve diğ., 1999).

Etmenleri etkili bir şekilde kontrol altına alacak kimyasal bir mücadele yöntemi bulunmamaktadır. Son zamanlarda bazı kimyasallar ruhsat almış olsa da, bunların buğday tarımında etkin kullanımı, özellikle ekonomik nedenlerle zor görünmektedir. Yine fungusit uygulamalarının etkinliği, özellikle toprak kökenli patojenler için, toprağın yapısı, uygulamanın derinliği, uygulamanın yeknesaklığı, inokulum yoğunluğu gibi birçok değişkene bağlıdır. Bu nedenle dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi hastalıkla mücadelede en etkili yol olarak görülmektedir.

Bir bölgede var olan fungal türlerin bilinmesi, bu etmenlere karşı gerekli tedbirlerin zamanında alınması açısından oldukça önemli olabilmektedir. Örneğin münavebe programları oluşturulurken aynı fungal türlerin konukçusu olabilen ürün deseninin belirlenmesi için o alanda mevcut fungal floranın bilinmesi gerekmektedir. Bu çalışmanın ilk bölümü bu gereklilikten ortaya çıkmıştır. Güneydoğu Anadolu Projesi çerçevesinde bölgede her geçen gün sulanan alanların miktarının hızla artmasına paralel olarak, yeni ürünlerin bölgeye girmesi anlamına gelmektedir. Bu noktada hangi ürünlerin uygun münavebe programları çerçevesinde ekilebileceği, ya da hangi ürünleri yetiştirmenin riskli olabileceği gibi konular çözüm bekleyen

sorunlardandır. Buğday alanlarındaki fungal floranın belirlenmesi bu nedenlerle çok önemli bir konu haline gelmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmı çok önemli bir buğday patojeni olan *F.graminearum*'da efektör adayları bazı küçük, hücre arasına salınan proteinlerin (SSP) karakterizasyonu amacıyla ele alınmıştır. Fungusun –birkaç gün de olsa- semi biyotrof olarak yaşadığının gösterilmesinin ardından, bu süreçte buğdayın savunma mekanizmasının fungusu tanımasını engelleyen fungal proteinlerin belirlenmesi, bu ilişkinin moleküler düzeyde açıklanması açısından çok büyük önem kazanmıştır. Çünkü fungal efektörler birkez belirlendiklerinde, fungusitler için yeni hedef bölgeleri olarak kullanılabilmekte ya da fungusa karşı bitki dayanıklılığının anlaşılmasında ve dayanıklılık ıslahı çalışmalarında kullanılabilirler. Bu çerçevede, bu tez çalışması, *F. graminearum*'a ait yakın zamanda belirlenen 1369 adet, hücre arasına salınan, küçük (small secreted) proteinin efektör olma potansiyeline sahip olanlarını ortaya çıkarmayı hedeflemiştir.

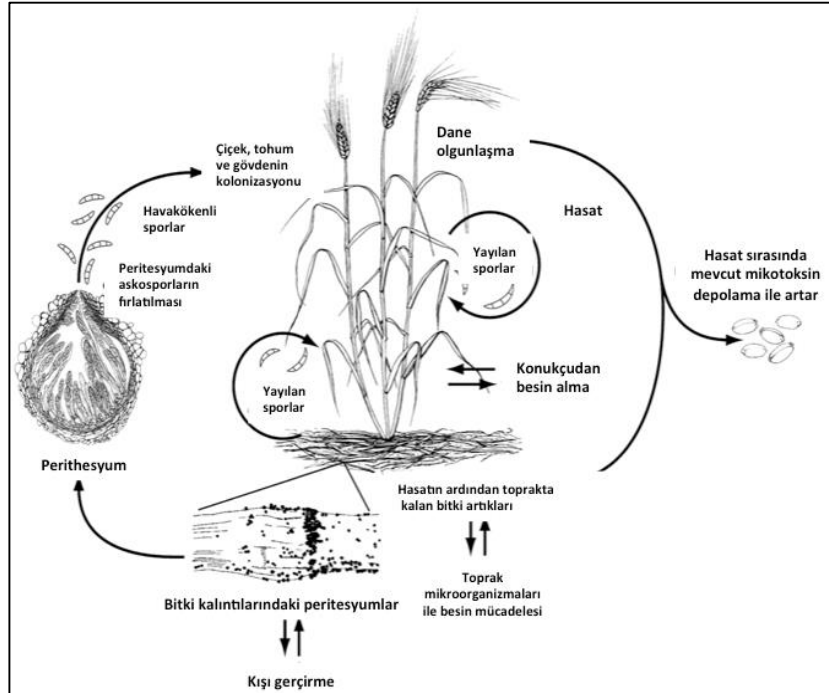
Çalışmanın, *Fusarium* türlerinin belirlendiği ilk kısmı Diyarbakır Ziraî Mücadele Araştırma İstasyonu ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü fitopatoloji laboratuvarlarında; SSP proteinlerinin karakterize edildiği ikinci kısmı ise İngiltere'deki Rothamsted Research araştırma merkezi ve Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü biyoteknoloji laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Buğday Tarımında Sorun Olan Önemli *Fusarium* Türleri

2.1.1. *Fusarium graminearum* (Teleomorph: *Gibberella zea* (Schwein.) Petch, (1936))

Hastalık özellikle Asya, Avrupa ve Amerika kıtasında görülmekte, buğdayın çiçeklenme döneminin ılıman ve nemli geçtiği bölgelerde ortaya çıkmaktadır (Dubin, 1997). Bulaşık bitkilerde oluşan spesifik olarak gluten ve albumin kayıplarından oluşan cılız danelerden kaynaklanan verim kayıplarının yanında (Boyacıoğlu ve Hettiarachchy, 1995), belki de en önemli zararını insan ve hayvan sağlığı için zararlı olan deoxynivalenol (DON) gibi mikotoksinlerle ürünü kirletmesi nedeniyle vermektedir (Kimura ve diğ., 2007). Etmen buğdayın yanında arpa, çavdar, yulaf ve mısırdaki da hastalık oluşturabilmektedir.



Şekil 2.1. Başak yanıklığı etmeni *Fusarium graminearum*'un hayat döngüsü (Trail, 2009).

Hasat sonrası, tarlada kalan hastalıkla bulaşık bitki materyalleri gelecek yıllar için inokulum kaynağı olarak işlev görür. Fungus bu artıklar üzerinde saprofitik olarak yaşar ve kışı böylece geçirir. Buğdayın çiçeklenme döneminde oluşan ılık ve nemli hava koşulları, rüzgarla ya da yağmur damlalarıyla buğday çiçeğine ulaşan fungusun eşeyli ve eşeysiz sporlarının gelişmesi için uygun şartlar oluştururlar (D. Parry ve diğ., 1995) (Şekil 1.2).

Etmenin enfeksiyon biyolojisi ile ilgili detaylı araştırmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan bazılarında göre kavuz ya da çiçek üzerine konan sporlar uygun şartlar altında inokulasyondan 12 saat sonra çimlenirler ve çoğunlukla stoma ile etkileşime giren dallanmamış hifler üretirler (Pritsch ve diğ., 2000; Wanjiru ve diğ., 2002). Apresorium oluşturmamasına rağmen, çiçeğin dış kavuz, iç kavuz ve kapçık gibi parçalarının stomal açıklıklarından penetre edildiği rapor edilmiştir (Pritsch ve diğ., 2000). Yumurtalık ve çiçek katmanları inokulasyonun ardından 36 saat sonra istila edilirler (Wanjiru ve diğ., 2002). Başakçığın istilasının ardından, fungus bir başakçıktan diğerine geçerek tüm başağın bulaşık hale gelmesini sağlar. Başakçıktan başakçığa geçişin biyolojisi üzerine yakın zamanda tamamlanan bir çalışma, enfeksiyonun en uç noktasında ilerleyen hifler tarafından DON üretiminin yanında bir takım hücre arasına salınan (secreted) proteinlerin de üretildiğini ve bunların buğdayın savunma mekanizmasını baskılayarak konukçunun istilasını kolaylaştırdığını ortaya koymuştur (Brown ve diğ., 2010).



Şekil 2.2. Buğdayda *Fusarium graminearum* tarafından neden olunan başak yanıklığı hastalığının belirtileri.

2.1.2. *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Saccardo

Fusarium culmorum buğdayda kök boğazı çürüklüğüne neden olan *Fusarium* türlerinin en önemlilerinden biridir (Dyer ve diğ., 2009). Dünyanın birçok bölgesinde yaygın olan kök boğazı çürüklüğü (Hogg ve diğ., 2007), özellikle karasal iklime sahip ve geleneksel tarım metodlarının yaygın olarak kullanıldığı ülkelerde son derece yaygın bir hastalıktır (Smiley ve diğ., 2005).

Genellikle bir önceki yıldan tarlada kalan bulaşık bitki artıklarında kışlayan fungusun misel ve sporları aracılığıyla buğday bitkileri enfekte edilirler (Southwell ve diğ., 2003). Buğday fideleri üzerinde *F.culmorum*'un başlangıç enfeksiyonunun histopatolojisi, patojenin buğdayın kök boğazındaki yaprak kınlarını sırasıyla enfekte ettiğini göstermiştir. Buna konukçunun yanıtı olarak, fungus tarafından enfekte edilen ilk yaprak kınlarının, sistemik sinyal mekanizması ve içerdikleri savunma genlerini aktive ettikleri düşünülür (Beccari ve diğ., 2011). Stephen ve arkadaşları (Stephens ve diğ., 2008) tarafından yapılan bir çalışma kök boğazı çürüklüğü hastalığının gelişiminin, iyi tanımlanmış fungal gen ekspresyonu ile ilişkili olan farklı kolonizasyon evreleri içerdiğini ortaya koymuştur.

Birçok çalışma, kök boğazındaki fungal enfeksiyon işlemi tamamlandıktan sonra *Fusarium culmorum*'un da dahil olduğu kök boğazı çürüklüğü patojeni *Fusarium* türlerinin, bitkinin uzak noktalarına sistemik olarak da yayıldığını ortaya koymuştur. Bazı çalışmalar bu yayılmanın hiçbir türde, buğdayın başağına ulaşmadığını iddia etse de (Burgess ve diğ., 1975; Clement ve Parry, 1998; Gelisse ve diğ., 2006; Purss, 1971; Snijders, 1990), bazı araştırmacılar bu yayılmanın başağa kadar ulaşabildiğini belirtmişlerdir (Mudge ve diğ., 2006; Poels ve diğ., 2006). *F.culmorum*'un bitkideki sistemik yayılımının boyutlarını ortaya koymak için çok yakın zamanda tamamlanan bir çalışma, fungusun ancak 3. noda kadar izole edilebilmesine rağmen, başaktan izole edilemediğini belirtmektedir. Araştırmacılar bu durumu fungusun sistemik yayılma yoluyla başağa ulaşmasının mümkün olmadığı şeklinde yorumlamışlardır. Bununla birlikte yapılan çalışmada fungus tarafından üretilen DON'e başakta dahi rastlanmış ve araştırmacılar kök boğazı çürüklüğü belirtilerinin çok görüldüğü yerlerde sağlık açısından dikkat edilmesi gereken bir durum oluşabildiğini ortaya koymuşlardır (Covarelli ve diğ., 2012).

Fusarium culmorum da, diğer önemli kök boğazı patojeni olan *F. graminearum* ve *F. pseudograminearum* etmenleri gibi DON üreticisidir. *F. graminearum* ve *F.*

pseudograminearum tarafından kök boğazı çürüklüğü oluşturulmasında, DON'un etkilerini araştırmak için DON üretemeyen fungal izolatlar ile yapılan çalışmalar, kök boğazı çürüklüğü symptomlarının oluşması için bu toksinin gerekli olmadığını fakat fungusun kolonizasyonu için önemli olduğunu ortaya koymuştur (Poels ve diğ., 2006). Her ne kadar benzer bir durumun *F. culmorum* için de geçerli olabileceği düşünülebilirse de, bu hipotezi ispatlayan herhangi bir araştırmaya rastlanılamamıştır. Tunalı ve diğ., (2012) tarafından yapılan bir çalışmada bu üç fungusun canlı dokular üzerinde organik maddelere oranla daha yüksek oranda toksin ürettiğini ortaya koymuştur. Araştırmacılar yine de saprofitik dokular üzerinde fungusların toksin üretme yeteneklerinin, onların, bulundukları çevreye uyum ve rekabet etme yetenekleri üzerinde etkili olabileceğini ifade etmişlerdir.



Şekil 2.3. Bazı *Fusarium* spp. tarafından neden olunan kök boğazı çürüklüğü belirtisi (a) ve hastalık nedeniyle başakların vaktinden önce beyazlaşması (b).

Münavebe ve kimyasal kullanımı *Fusarium* türleri tarafından neden olunan kök boğazı çürüklüğü ve başak yanıklığı için ancak kısmi çözümler sunabilmektedir ve bu hastalıklara karşı tam anlamıyla dayanıklı ticari çeşitler bulunmamaktadır (Buerstmayr ve diğ., 2009).

2.2. Bitki-Fungus İnteraksiyonlarına Genel Bakış

İlk defa Flor tarafından ortaya atılan ve bitki-patojen ilişkilerine olan algıyı temelinden değiştiren gene karşı gen hipotezi, patojendeki her bir dominant avirulenslik (*Avr*) genine karşılık konukçu bitkide soydaş bir dayanıklılık (*R*) geni olduğunu, iki gen ürünü arasındaki reaksiyonun, konukçuda aşırı duyarlılık reaksiyonu gibi bir dizi savunma mekanizmasını harekete geçirdiğini ve böylece konukçunun biyotrofik fungusların gelişimini sınırlandırdığını iddia etmektedir (Flor, 1942). Flor'un dayanıklılık ıslahı çalışmalarına ışık tutan çalışmalarının ardından, birçok araştırmacı O'nun hipotezinin moleküler ve biyokimyasal kanıtlarını bulabilmek için çalışmalar yürütmüşlerdir. İlk bakteriyel *Avr* geni 1984'de (Staskawicz ve diğ., 1984), ilk fungal *Avr* geni 1991'de (van Kan ve diğ., 1991) ve ilk Oomycete *Avr* geni ise 2004'te (Shan ve diğ., 2004) klonlanmıştır.

Öte yandan *Avr* genlerinin ürünleri, soydaş bir *R* geni taşımayan bitkilerde, virülenslik faktörü olarak işlev görürler. Kısacacı patojen tarafından salgılanan ve "efektör" olarak isimlendirilen bazı proteinler konukçu hücrenin yapısını ve fonksiyonunu değiştirip konukçunun savunma sistemini baskılayarak patojenin konukçu bitkiyi kolonizasyonunu sağlarlar ya da *R* geni taşıyan bitkilerde konukçunun savunma sistemini harekete geçirerek dayanıklılık oluşmasına neden olurlar (de Jonge ve Thomma, 2009).

Son yirmi yıldır yeni *Avr* ve *R* genlerinin tanımlanması bitki-patojen interaksiyonlarındaki bilgi birikimini önemli ölçüde arttırmıştır. Patojen saldırılarına tepki olarak bitkiler en az iki temel savunma mekanizmasını aktive ederler. İlk sistem bütün potansiyel patojenlere karşı gösterilen temel savunma mekanizmasıdır ve patojen tarafından salgılanan bazı moleküllerin (Patojen Associated Molecular Patterns- PAMPs) tanınması temelinde, PAMP tarafından tetiklenen bağışıklığı (PAMP Triggered Immunity- PTI) aktive eden, ünlü PAMP tanıma reseptörleri (PAMP Recognition Receptors- PRRs) yardımıyla gerçekleşir. Bu dayanıklılık mekanizmasının aktive edilmesi konukçunun patojen tarafından daha fazla kolonize edilmesini durdurur (De Wit, 2007; Jones ve Dangl, 2006). En iyi bilinen fungal PAMP'lardan biri fungal hücre duvarının da yapıtaşı olan, *Arabidopsis* ve çeltikte kendisi için LysM-type (Lysin motif tipi) reseptörün tanımlandığı kitindir (Kaku ve diğ., 2006; Miya ve diğ., 2007). Şu an bazı *Avr* genlerinin kodladığı efektör proteinlerinin bitkideki PTI mekanizmasını baskılayarak patojenin bitkiyi istila

etmesine ve hastalık oluşturmasına yol açtığını gösteren kanıtlar vardır. Bitkinin temel savunma mekanizması patojen tarafından birkez alt edildiğinde devreye giren ve bitkideki *R* geni tarafından kodlanan R proteini aracılığıyla fungal efektörün algılanması ve bunun sonucunda da efektör tarafından tetiklenen bağışıklık (Effector Triggered Immunity- ETI) denilen bir sistem oluşturulmuştur. Bu sistem bitkilerde hipersensitif yanıt (HR) gibi hızlı ve güçlü savunma reflekslerinin gösterilmesine yol açar. Bu ikinci sistem patojen tarafından salgılanan efektrde oluşan mutasyonlarla patojenin bitkinin tanınmasından kaçması ve bitkideki dayanıklılık geninin geçirdiği mutasyonlarla yeni tip efektörü tanır hale gelmesi ile sonuçlanan sürekli döngü yaratır (de Wit, 2007; Jones ve Dangl, 2006).

Nekrotrofik patojenlerin gene-karşı-gen hipotezine uymadığı varsayılmaktadır. Bununla birlikte birkaç nekrotrofik fungal patojenin bazı bitkilerde nekroz oluşumunu harekete geçiren efektörler olarak görev alabilecek ribosomal proteinleri ürettiği gösterilmiştir (Friesen ve diğ., 2007). Bu durum fungusların da dahil olduğu birçok organizma tarafından üretildiği tespit edilen nekroz ve etilen indükleyen peptit-1 benzeri protein (necrosis and ethylene-inducing peptide1 (Nep1)- like protein) (NLPs)’ler için de geçerli olabilir (Ottmann ve diğ., 2009). Yine *F. graminearum*’da yapılan bir çalışma bitkinin savunma mekanizmasını baskılayarak, görünür simptomların oluşmasının engellenmesine yol açan bir takım efektör proteinlerin bulunduğu hipotezinin geliştirilmesine yol açmıştır (Brown ve diğ., 2010). Araştırıcı ekibi bu çalışmada fungusun bitkiye penetrasyonunun ardından ilk görünür simptomların görünmeye başlaması arasında yaklaşık 3 günlük bir süre olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmaya kadar tam bir nekrotrofik fungus olduğu düşünülen *F. graminearum*’un da aslında bitki dayanıklılığını baskılayacak ya da bitkide kendisini “görünmez” kılacak bir takım efektör proteinleri kullanıyor olabileceği fikri ortaya çıkmıştır.

2.2.1. Funguslarda tam-genom sekans analizleri ve small secreted protein (SSP) genleri

Son on yılda birçok fungusa ait tam genom sekansları bitirilmiş ve yayınlanmıştır. Bazı zel bioinformatik programlar yardımıyla, tamamlanan bu sekans verileri kullanarak, ilgili canlılara ait secretome analizleri yapılabilmektedir. Secretome, bir canlı tarafından hücre arasına salınan proteinleri ifade etmektedir ve o canlıdaki proteomun bir parçasıdır. Proteinler sahip oldukları bazı sinyal peptid dizileri

aracılığıyla, hücrede sentezlendikleri yerden, ilgili oldukları lokasyona taşınırlar. Bu korunmuş sinyal peptit dizilerini tanıyan, çok özel bioinformatik araçlar kullanılarak, bir canlıda hücre dışına gönderilmek üzere üretilen proteinler (secreted proteins) tespit edilebilmektedirler. Bu proteinler canlı hücrenin başka hücrelerle, konukçu bitki ve çevreyle olan etkileşimlerinde rol alırlar. Bitkideki dayanıklılığı baskılayarak hastalık oluşumunu kolaylaştıran (virülenslik) ya da bitkideki dayanıklılığın aktivasyonuna neden olarak hastalık gelişimini sınırlayan (avirülenslik) bu proteinler, bitki-fungus moleküler interaksyonlarında çok önemli bir yere sahiptirler (De Wit ve diğ., 2009).

Fusarium graminearum'a ait tam genom sekans verileri üzerinde yapılan ilk detaylı çalışma 2007 yılında yayınlanarak araştırmacıların hizmetine sunulmuştur (Cuomo ve diğ., 2007). O tarihten bu yana bu veriler üzerinde yapılan analizler, tüm dünyadaki önemi nedeniyle bitki-fungus moleküler interaksyonları açısından “ilk 10” listelerine giren (Dean ve diğ., 2012) bu patojenin genetik yapısı ile ilgili önemli ipuçları vermiştir. *F.graminearum* 'un genomunun son sürümüne (version FG3.2) the Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) sitesinden ulaşılabilir. Bu güncel bilgilere göre bu fungus 13.718 gen içermektedir (Wong ve diğ., 2011).

Bitkilerde hastalık oluşturma yeteneğine sahip birçok fungus olmasına rağmen, fungusların önemli bir kısmı non-patojeniktir. Hatta endofitik ve mikorizal funguslar gibi bazıları, bitkilerle simbiyotik bir yaşam formu oluşturarak, karşılıklı fayda temelinde yaşamlarını sürdürürler. “Patojen olan bir fungusu patojen olmayan akrabalarından ayıran unsurlar nelerdir?” sorusu uzun zamandan beri bilim insanlarının cevabını aradığı bir konudur. Öncelikle bu unsurların, patojen saldırısı sonrası canlı bitki ile ölü olanı birbirinden ayıran ve bitkinin aktif savunma mekanizması ile etkileşime giren unsurlar olduğu düşünülebilir. Aktif savunma mekanizmaları funguslar tarafından, bitki hücrelerindeki özel bir biyolojik döngünün (pathway) ya da gen ekspresyonu işleminin baskılanması, antifungal enzim ve bileşiklere karşı koruma ya da nekrotrof funguslarda olduğu gibi- konukçu hücrenin ölümünün harekete geçirilmesi (nekroz oluşumu) gibi değişik şekillerde kullanılır (Rep, 2005).

Birçok çalışmada küçük, hücre arasına salınan (small-secreted) proteinlerin bu etkileşimlerde önemli bir rol aldığı belirlenmiştir. Genel bir kural olarak bu proteinleri kodlayan genler türe özgüdürler ve hatta saprofitik alt türler ile patojenik

olanlar arasında bile farklılık gösterebilirler. Bu proteinler ayrıca, bugüne kadar tespit edilen genel avirülenslik faktörleridirler. Bu faktörler bitkilerin doğuştan gelen bağışıklık sistemleri tarafından tanınır ve hastalığa dayanıklılığı tetiklerler (Rep, 2005).

Fusarium graminearum'un enfeksiyon biyolojisini ortaya çıkarmak için yapılan bir çalışma (Brown ve diğ., 2010), fungusun hiflerinin, enfeksiyonun en uç noktasında konukçu ile temasa geçtiği alanlarda, DON sentezlenmesine ilave olarak, bir takım virülenslik faktörlerini de sentezlediğini, bu durumun da konukçunun savunma sistemini baskılayarak hastalığın gelişimini kolaylaştırdığını ortaya koymuştur. Bu semptomsuz evrenin oluşmasında rol alan hücre arasına salınan (secreted) proteinlerin belirlenmesi amacıyla, aynı ekip tarafından yapılan ve sonuçları 2012 yılında yayınlanan “secretome” analiz sonuçlarına göre; *F. graminearum* 1369 adet secreted protein genine sahiptir (Brown ve diğ., 2010).

Bu aşamada, bu secreted proteinler içerisindeki, fungal efektör adayı SSP (Small Secreted Protein) genlerinin belirlenmesi ve bu genlerdeki genetik varyasyonun araştırılması çalışmamızın da temel çıkış noktasını oluşturmuştur.

2.3 Buğdayda Sorun Olan *Fusarium* spp. ile İlgili Çalışmalar

2.3.1 Buğdayda kök boğazı hastalıkları ile ilgili Türkiye’de yapılan çalışmalar

Yılmazdemir’in (1976) Trakya Bölgesinde buğday kök, kök boğazı ve sap çürüklüğüne neden olan etmenleri belirlemek için yaptığı bir çalışmada, 28 farklı etmen belirlemiş ve hâkim türün *Fusarium* spp. olduğunu, bunu da *Alternaria*, *Helminthosporium* ve *Drechslera* spp.’nin takip ettiğini bildirmiştir.

Aktaş ve diğ., (1997) Sakarya yöresinde buğday alanlarında yaptıkları bir çalışmada en yaygın *Fusarium* türlerini *F. graminearum* ve *F. moniliforme* (= *F. verticillioide*s) olarak bulmuşlardır. *F. moniliforme* ve *F. culmorum*’a karşı 26 çeşit ve hattın reaksiyonlarını da incelemişler ve *F. moniliforme*’ye karşı yalnızca bir hatta orta düzeyde dayanıklılık gözlerken *F. culmorum*’a karşı denenen hiçbir çeşit ve hat’ta dayanıklılık reaksiyonu oluşmadığını belirtmişlerdir.

Aktaş ve diğ., (1999), tarafından yürütülen bir araştırmada Konya ilinde hububat kök ve kökboğazı çürüklüğü hastalık şiddeti %36,21 olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar alınan örneklerden 29 farklı fungus türü saptamışlar ve en fazla bulunanların *Fusarium culmorum* (%24), *Rhizoctonia cerealis* (%13), *Cladosporium*

herbarum (%10), *Alternaria alternata* (%9), *Drechlera sorakiniana* (%7), *Rhizophus stolonifer* (%7) ve *F.moniliforme* (%7) olduğunu bildirmiştir.

Uçkun ve Yıldız (2004) yaptıkları bir çalışmada İzmir, Aydın ve Denizli illerinde buğday alanlarında 2000–2001 yılları arasında kök ve kök boğazı çürüklüğüne neden olan etmenleri ve yoğunluklarını araştırmışlardır. Araştırma alanındaki hastalığa yakalanma oranı ve hastalık şiddetini sırasıyla, yıllara göre %58,28 ve %25,07 olarak saptamışlar, ayrıca tüm araştırma alanının hastalık etmenleriyle bulaşık olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar kök ve kök boğazından yaptıkları izolasyonlarda en yüksek oranda izole edilen fungusların, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia cerealis*, *Alternaria alternata* ve *Dreschlera sorokiniana* olduğunu bildirmişlerdir. *R. cerealis* ve *Fusarium* spp. izolatlarının patojenisitelerinin sırasıyla %26-76 ve %0-72 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. İzole edilen funguslar içerisinde en patojen türler *R. cerealis* ve *F. culmorum* olarak tespit etmişlerdir.

Bentley ve diğ., (2006) Türkiye'nin kuzey bölgelerinde buğdayda ve bazı buğdaygil yabancı otlarında yaptıkları süreyde buğdaydan 15 farklı *Fusarium* türü ve buğdaygil bitkilerinden bu türlere ilaveten üç farklı tür tespit etmişlerdir. İzole edilen patojenik türler içinde en yaygın türün *F.culmorum* olduğunu ve sürey alanlarının %28'inden izole edilebildiğini bildirmişlerdir.

Tunalı ve diğ., (2006a), yaptıkları bir çalışmada Orta Anadolu Bölgesi'nde buğday kök boğazından 13 farklı türe ait toplam 51 *Fusarium* izolatu elde etmişler ve bunların kışlık buğday çeşidi Pehlivan üzerinde patojenisitelerini belirlemişlerdir. Patojenisite değerleri, en yüksek hastalık şiddetine ve bitki ağırlığında azalmaya neden olan *F. culmorum*, *F. pseudograminearum* ve *F. graminearum*'da değişkenlik göstermiştir. Bitki ağırlığı ile hastalık şiddeti arasında güçlü bir negatif ilişki bulunmuştur. Yine aynı çalışmada *F.subglutinans*, *F.oxysporum*, *F.equiseti*, *F. acuminatum*, *F. solani* ve *F. verticillioide*s'in zayıf patojenisite gösterdikleri ve bu nedenle bu çalışmada patojen olarak nitelendirilmediklerini bildirmişlerdir.

Tunalı ve diğ., (2006b), yaptıkları süreyde 2000 ve 2001 yıllarında Marmara bölgesinde *Fusarium* spp. İçinde *F. graminearum*'u başaklardan %20.7 oranında izole ederken, *F. culmorum*'u %5.8 oranında izole etmiş ve bu alanlardan doğal DON toksin bulunuşunu sırasıyla 0-2.7 ile 0-2.3ppm olarak analiz etmişlerdir. Bazı yerel ve yabancı menşeyli çeşitlerin *F. graminearum* ve *F.culmorum*'un oluşturduğu başak yanıklığı hastalığı ve DON üretimi miktarı incelemişler, en yüksek DON

akümülyasyonunun 22.34ppm ile Adana 99 çeşidinde endüşük ise 0.1 ppm ile Martar çeşidinde olduğu bildirilmişlerdir.

Tunalı ve diğ., (2008)'nın Türkiye'de buğday alanlarında sorun olan kök ve kök boğazı etmenlerini belirlemek için yaptıkları bir araştırmada, sürvey yapılan alanların yaklaşık %26'sının bir ya da birden fazla kök çürüklüğü etmeni ile bulaşık olduğunu ve en yaygın türlerin *F. culmorum* (%14), *Bipolaris sorokiniana* (%10) ve *F. pseudograminearum* (%2) olduğunu belirtmişlerdir. Yine aynı araştırmada, bölgelere göre bu etmenlerin yaygınlıkları ile ilgili olarak Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde de *F. culmorum* (%20) ve *Bipolaris sorokiniana* (%17)'nin en yaygın türler olduğu ifade edilmektedir.

Çepni ve diğ., (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, Türkiye'de üç farklı agro ekolojik bölgeden elde edilen *Fusarium* spp. izolatlarını IGS bölgesi temelinde geliştirdikleri RFLP markırları ile analiz etmişlerdir. Seçtikleri 14 restrüksiyon enziminden yalnız 3 tanesinin *Fusarium* spp.'lerdeki polimorfizmi değerlendirmede yeterli olduğunu ve *PstI* enziminin ise en iyi sonucu verdiğini ifade etmişlerdir. Mating type analizlerinin *F. graminearum*'dan *F. pseudograminearum*'u ayırt etmede etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. *F. culmorum*'daki IGS bölgesindeki varyasyonların fungusun çevreye uyumunda etkili olabileceğini ifade etmişlerdir.

2.3.2 Buğdayda kök ve kök boğazı hastalıkları ile ilgili yurtdışında yapılan çalışmalar

Oswald (1949), Amerika'da yaptığı bir çalışmada hububat kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığı etmenlerini: en yaygın patojenler, (*Drechslera sorokiniana*, *Fusarium roseum* f. sp. *cerealis*(= *F. crookwellense*), *Ophiobolus graminis* ve *Fusarium nivale*), yaygın patojenler (*Pythium graminicolum*, *Sclerotium rolfsii* ve *Rhizoctonia solani*) ve daha az yaygın patojenler (*Wojnovicia graminis*, *Fusarium moniliforme* ve *Fusarium roseum*) olarak üç gruba ayırmıştır.

Cook ve Christensen (1976), *F. culmorum*, *F. graminearum* ve *Gaeumannomyces graminis*'i buğday kök ve kök boğazı çürüklüğü etmenleri olarak belirlemişler ve *F. culmorum*'un daha kuru koşullarda etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Miedaner ve Schilling (1996), buğdayda başak yanıklığı ve çavdarda kök boğazı çürüklüğü simptomları gösteren örneklerden izole ettikleri 25 *F.graminearum* ve 70 *F.culmorum* izolatının bitkilerde oluşturdukları reaksiyonları seralarda bir kışlık çavdar çeşidi üzerinde testlemişler ve hastalık şiddetini 0-9 skalası kullanarak

belirlemişlerdir. Araştırmacılar çalışılan izolatların patojenisite değerlerinin 1.5 ile 5.7 arasında değiştiğini ortaya koymuşlardır. Toplam genetik varyasyonun %57-66'ının bireysel tarla popülasyonlarından kaynaklandığını bulan araştırmacılar, doğal epidemilere neden olan *F.culmorum* ve *F.graminearum* izolatlarının tek tarla popülasyonlarında bile virulensliklerinde büyük farklar olduğunu belirtmişlerdir.

Mergoum ve diğ., (1998), ak başak oluşumunun genelde buğday kök çürüklüğünün belirgin bir göstergesi olduğunu ve ARRS (Average Root Rot Score) skalasından daha hassas bir ölçü olarak kullanılabileceğini tavsiye etmişlerdir. Öte yandan, inoküle edilen bitki yaprağında düşük su içeriği, daha kısa bitki boyu, daha az kardeş sayısı ve yüksek hücre iyon sızıntısı olduğunu belirlemişlerdir.

Aoki ve O' Donnell (1999) yaptıkları araştırmada buğdaygillerin kök boğazlarından izole edilen *F. graminearum* olarak bilinen fungusun eşeyli döneminin *Gibberella coronicola* olduğunu ve askus ile askosporlarının *G. zea*'dan farklı bir yapısı bulunduğunu ortaya koymuş ve fungusun eşeysiz devresini de *F. pseudograminearum* olarak isimlendirip Grup 1 içine almışlardır. *F. graminearum* (eşeyli devresi *G. zea*) ise Grup 2 içerisine alınmıştır.

Scott ve diğ., (2003), Avustralya'da New South Wales ve Güney Queensland'da 2001–2003 yılları arasında buğday alanlarında yaptıkları survey sonucunda *Fusarium* cinsine ait 16 farklı tür bulmuşlardır. Bunlar içerisinde *F.pseudograminearum*'un en yaygın tür olduğunu ve bunu sırasıyla *F.crookwellense*, *F.graminearum* ve *F.avenaceum*'un takip ettiğini bildirmişlerdir. Kök boğazından izole edilen patojenlerin büyük bir kısmının *F.pseudograminearum* olduğunu buna karşın basal gövde nodlarından izole edilen *Fusarium*'lar içinde en büyük oranın *F.graminearum* olduğunu belirtmişlerdir.

Backhouse ve diğ., (2004), Avustralya'da New South Wales ve Queensland eyaletlerinde buğday ve arpa alanlarında 1996-1999 yılları arasında yaptıkları survey çalışmasında 409 buğday örneğinden yaptıkları izolasyonlar sonucunda New South Wales ve Queensland'da izole edilen neredeyse tek türün *F.pseudograminearum* olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar yağışın 550 mm'nin üzerinde olduğu Victorian bölgesinden ve güney Avustralya'nın güneydoğu bölgesinden elde edilen izolatların %70'inin, Victorian bölgesinin 350-500 mm yağış alan bölgelerindeki izolatların %38'inin ve güney Avusturalya'nın orta-kuzey bölgesi ile Victorian bölgesinin düşük yağış alan bölgelerinden elde edilen türlerin %7'sinin *F.culmorum* olduğunu belirlemişlerdir. *F.culmorum*'un bu oransal dağılımında bu bölgelerdeki

özellikle yetiştirme sezonunun sonundaki iklimik koşulların özellikle de Eylül ayı yağışlarının önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Saremi ve diğ., (2007), Kuzey batı İran'da kök boğazı çürüklüğü hastalığının buğdayda önemli bir sorun olduğunu belirtmiş ve hastalığı oluşturan fungal kompleksi ortaya koymak için Qazvin, Zanzan, Doğu Azerbaycan ve Ardabil bölgelerinde 1999–2004 yılları arasında çalışma yapmışlardır. Çalışma sonunda elde ettikleri beş fungal cinse ait 155 izolatin büyük çoğunluğunun *F.pseudograminearum* olduğunu, etmenin özellikle ilkbaharın kuru geçtiği yerlerde %18-45.5 arasında verim kayıplarına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Obanor ve diğ., (2010), yaptıkları çalışmada tür-spesifik primer FcOIF/ FcOIR primer çiftini kullanarak *F. culmorum*'u diğer türlerden ayırt etmiş ve daha 4 *Fusarium* türü için multilokus, TEF ve RED gen sekans analizi yapıldığında *F. culmorum* cladinde *Fusarium* türlerinin oluşturduğu 3 ile 4 farklı grup olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bu çalışmada Avustralya, Avrupa, Batı Asya ve Kuzey Afrika dan alınan isolatlarla yapılan çalışmada *F. culmorum*'un tek bir filogenetik tür olduğu coğrafik farklılıklardan dolayı bir farklılık oluşmadığı görülmektedir.

2.4. Funguslardaki SSP Genleri ve Efektörler İle İlgili Çalışmalar

Cuzick ve diğ., (2008), *F. graminearum*'un iki mutantının hastalık yapma yeteneğini, buğday ve Arabidopsis floral patosisteminde analiz etmişlerdir. Yabani form *F. graminearum* (PH-1), mitojen tarafından aktive edilen protein kinase (*MIP1*) geni ve trichodiene synthase (*TRI5*) geni mutantları kullanarak yaptıkları inokulasyon çalışması sonuçlarını makroskopik ve mikroskopik olarak analiz etmişlerdir. Her iki bitki türünün de yabani form ile inokulasyonu yüksek hastalık şiddeti ve DON oluşumu ile sonuçlanmıştır. *map1* mutantının her iki bitkide de en düşük hastalık şiddeti ve DON miktarını oluşturduğunu, trichothecene üretemeyen *tri5* mutantının azalmış patojenisite gösterdiğini başakçıkta göz-şekilli lezyonlara sebep olduğunu fakat başak eksenini enfekte edemediğini ortaya koymuşlardır. *mip1* mutantının aksine, *tri5* mutantının *Arabidopsis*'in yaprak inokulasyonlarında herhangi bir patojenisite kaybı göstermediğini bunun da *Arabidopsis*'in yaprak kolonizasyonu için DON üretiminin zorunlu olmadığını ortaya koyduğunu bildirmişlerdir.

Matteram ve diğ., (2009), *Mycosphaella graminicola*'nın tüm genomunun sekanslanmasının ardından, dikotiledon bitkilerde hücre ölümü ve savunma sinyal mekanizmalarını harekete geçirdiği bilinen NLP (Necrosis and ethylene inducing-

peptide 1 (Nep1) like proteine) familyasına ait proteini kodlayan *MgNLP* geninin, bu fungustaki fonksiyonunu araştırmışlardır. Hastalığın bitkideki gelişimi süresince yapılan Real Time Q-PCR denemeleri, ilgili genin hassas konukçuda en yüksek oranda gen ifadesinin belirti oluşumu öncesi devrede gerçekleştiğini ve programlanmış hücre ölümünün karakteristik özelliğinin sergilendiği hastalık lezyon oluşumu süresince ekspresyon seviyesinde dramatik bir düşüşün ortaya çıktığını belirtmişlerdir. “Gen için gen” temelli hastalık dayanıklılığı gösteren bir konukçudaki uyumsuz (incompatible) reaksiyon süresince, ilgili genin kıyaslanabilir herhangi bir pik oluşturmadığını bildirmişlerdir. *MgNLP* proteininin çeşitli süreçler sonunda saflaştırılarak *Nicotiana benthamiana* yapraklarına infiltrasyonunun, bu bitkide programlanmış hücre ölümünü harekete geçirmesine rağmen, hassas buğdayda herhangi bir etki oluşturmadığını ifade etmişlerdir. *MgNLP* infiltrasyonunun ayrıca buğdayda mitojen tarafından aktive edilen kinazları (MAPKs) da harekete geçirmede başarısız olduğunu ifade etmişlerdir. Sonuç olarak *MgNLP* geninin fungusta aktivitesinin durdurulmasının (targeted deletion), fungusun patojenisite ya da virülensliğinde herhangi bir tespit edilebilir etki oluşturmadığını, bu durumun da ilgili genin fungusun konukçuyu enfeksiyonu süresince ana virülenslik faktörü olamayacağını ortaya koymuşlardır.

Hacquard ve diğ., (2012), obligat biotrof bir fungus olan kavak pası etmeni *Melampsora larici-populina* etmeninde SSP genlerini incelemiştir. Araştırmacılar Duplessis ve diğ., (2011) tarafından ortaya konulan *M. larici-populina* genomundaki 1184 adet SSP genini, gen ifadesi ve evrimsel dinamikleri yönüyle incelemiştir. Daha önceki çalışmalarda *Melampsora* cinsine dahil funguslarda belirlenen efektörlerle karşılaştırmalı analizler yapmışlardır. Ayrıca belirledikleri efektör adayları genlerin fungusun bitkiyi enfeksiyonu süresince ne denli aktif olduğunu ortaya koymak için gen ifadesi ve immunolokalizasyon testlemeleri yapmışlardır. Çalışmalarının sonunda, gen ifadesi testleri ile de desteklenen 4 adet fungal efektör adayları gen belirlemişler ve bu çalışmayı yapmakta kullandıkları yaklaşımların fungal efektör adaylarının belirlenmesinde kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Saitoh ve diğ., (2012), çeltik yanıklığı etmeni *Magnaporthe oryzae* etmeninde virülensliği yöneten efektörleri kodlayan genleri belirlemek için çalışma yürütmüşlerdir. Fungusun bitkiyi enfeksiyonunun erken safhasında salgıladığı proteinleri kodlayan 78 geni öncelikli olarak hedeflemişlerdir. Bu amaçla ilgili genlerin ürünlerini üretemeyen mutant izolatları elde etmek için “geniş ölçekli gen

bozma (large scale gene disruption)” tekniğini kullanmışlardır. İnceledikleri 78 genin etkilerini gelişme, konidi oluşturma ve virülenslik yönleriyle irdelemişlerdir. Bu genlerin içinde sadece 54 amino asitten oluşan ve sinyal peptid taşıyan, MC69 geninin virülenslik üzerinde önemli etkiye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. MC69 mutantının, enfeksiyon davranışının mikroskopik analizinin bu genin ürününün apresoryum oluşumunda rol aldığını ve canlı hücre görüntüleme yöntemiyle mutant izolatin çeltik sitoplazmasına ulaşamadığını belirlemişlerdir. Bu genin bir homologunun *Colletotrichum orbicularia*’da da benzer şekilde virülensliği önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu genin *F. graminearum*’da FGSG_08493 kodlu gen ile homoloji gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Yang ve diğ., (2012), birçok fungusun patojenisitesinde “salınan (secreted) enzimlerin” önemli bir rol oynadığını belirtmişler ve *F. graminearum*’un secretome analizlerini yapmak amacıyla, patojen konukçu interaksyonunu taklit etmek için, fungusu sıvı gelişme ortamı olarak buğday ya da arpa unu kullanılan besi yerinde geliştirmişlerdir. Sıvı kültür ortamına salınan proteinleri belirlemek için “jel temelli proteomiks yaklaşım” kullanmışlardır. Araştırmacılar 154 protein noktasında, hücre duvarı, nişasta ve protein yıkımında görev alan 69 adet *F. graminearum*’a özgü fungal protein belirlemişlerdir. Bu proteinlerin %35’inin daha önce hiçbir *in vitro* ve *in planta* çalışmada belirlenemediğini, %70’inin sinyal peptid içerdiğini belirtmişlerdir. Bu proteinleri kodlayan *F. graminearum* genlerinin *in planta*’daki varlığını, qRT-PCR ile, inokulasyondan 2-6 gün sonra hasat edilen arpa ve buğday bitkileri kullanarak göstermişlerdir. Araştırmacılar, mevcut çalışmalarının *F. graminearum* secreted protein veri bankası için önemli katkılar sunacağını bildirmişlerdir.

Horevaj ve Bluhm (2012), çalışma mekanizması henüz tam olarak açıklanamamasına rağmen, G-protein sinyal mekanizmasının *F. graminearum*’da kullanıldığını belirtmektedir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada phosducin benzeri bir gen olduğu varsayılan *BDMI* geninin gelişmedeki rolünü araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan hedeflenmiş gen silme (targeted deletion) tekniğiyle, ilgili genin seksüel ve aseksüel sporlanma, çim borusu gelişimi, hifsel dallanma ve miselial morfoloji üzerindeki etkilerini belirlemişlerdir. Hastalık oluşumu süresince, mısırın koçanının süt olum devresinde ve daha sonra, orjinal (wild-type) izolat seviyesinde inokulasyonu için *BDMI* geninin gerekli olduğunu fakat tane kolonizasyonu için gerekli olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca bu genin silinmesinin buğday fidesi ve

başığının enfeksiyonu süresince fungusun virülensliğini azalttığını ve bunun da fungal kütle ve gözle görülür simptom oluşumunu önemli ölçüde azalttığını gözlemlemişlerdir. Buğday başağı ve mısır koçanının süt olum dönemindeki DON birikiminin wild-type izolat seviyesine ulaşabilmesi için de bu genin ürününün gerekli olduğunu ortaya koymuşlardır.

Vincent ve diğ., (2012), buğday yaprak lekesi etmeni *Stagonospora nodorum*'un efektör proteini SnToxA'nin etki mekanizmasını araştırmak için proteomics ve metabolomics yaklaşımları kullanarak bir çalışma yapmışlardır. SnToxA ile inokulasyonun ardından geçen 72 saatlik sürede, 91 asidik protein ve 101 metabolitin uygulama yapılan ve yapılmayan buğday yapraklarında farklı oranlarda belirlendiğini ifade etmişlerdir. Uygulamadan hemen sonra patojenisite ile ilgili proteinlerin marjinal bir şekilde arttığını daha sonra hızlı ve önemli oranda azaldığını bildirmişlerdir. Kloroplastta aktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu ile ilgili metabolit ve proteinlerin SnToxA muamelesinin ardından farklı oranlarda bol olarak bulunduğunu bunun da fotosentezin durdurulmasının aktif oksijen türlerinin hızlı birikmesine neden olduğuna işaret ettiğini belirtmişlerdir. Metabolitlerin profillenmesinin, merkezi karbon mekanizmasındaki temel metabolik düzensizlikleri ortaya koyduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, patojenin ya da başka patojen ile ilişkili moleküler düzenlerin (PAMPs) yokluğunda bile, SnToxA infiltrasyonunun patojenisite ile ilişkili birçok proteinin miktarında önemli artışlara neden olduğunu ifade etmişlerdir. Araştırmacılar bu araştırma yaklaşımının, metabolomics ve proteomics yaklaşımların efektör-konukçu interaksyonu çalışmalarındaki tamamlayıcı doğasına işaret ettiğini ve çalışmalarının *S. nodorum* gibi nekrotrofik organizmaların patojen gelişimini desteklemek ve hastalığa sebep olmak için varolan konukçu hücrenin öldürülmesi mekanizmalarını kullandığı hipotezini destekleyen sonuçlar ortaya koyduğunu bildirmişlerdir.

Merhej ve diğ., (2012), *F. graminearum*'un da içinde bulunduğu *Gibberella zeae* kompleksi tarafından üretilen trichothecene'lerin biyosentezinde birkaç fungal genin görev aldığını ifade etmişlerdir. Trichothecene familyasına ait ikincil metabolitlere ilave olarak *F. graminearum*'un kırmızı renk pigmenti aurofusarin ürettiğini fakat sistemin altında yatan mekanizmaların hala yeteri miktarda anlaşılamadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar, daha önce *Aspergillus nidulans*'ta ikincil metabolizma ve gelişmeyi düzenleyen velvet kompleksinin anahtar bir komponenti olan velvet proteinini kodlayan *veA* geninin bir benzerini, BLAST

analizi yardımıyla *F. graminearum* genomunda bulmuşlar ve *FgVel* olarak isimlendirdikleri bu genin fungustaki fonksiyonunu çalışmışlardır. Bu genin susturulmasının bazı fenotipik etkileri olduğunu ve bunların miselin aşırı dallanması, havai misel oluşumunun baskılanması, misel hidrofobisinin azaltılması ve yüksek oranda azaltılmış sporulasyon olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca çalışmalarının *FgVel* geninin aurofusarin üretimini ayarladığını, *Tri* geninin ifade edilmesi ve trichothecene oluşumu için zorunlu olduğu sonucunu çıkardığını bildirmişlerdir. Çiçeklenen buğday bitkileri üzerinde yürüttükleri patojenisite çalışmalarının *FgVel* geninin *F. graminearum*'un patojenisitesi üzerinde pozitif bir regülatör olarak rol aldığını ortaya koymuşlardır.

Zhang ve diğ., (2015) ökaryotik hücrelerde membran füzyonu ve vesikül transferinde önemli bir rol alan SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) proteinlerinin *F. graminearum*'daki homoloğu olan *FgVam7* geninin fonksiyon analizini yapmışlardır. Bu genin *F. graminearum*'da hücrel farklılaşmada ve virülenslikte düzenleyici bir rol oynadığını belirtmişlerdir. İlgili genin *F. graminearum*'dan silinmesiyle elde edilen mutant izolatlarda vejetatif gelişmede, konidi oluşumunda, konidi çimlenmesinde, eşeyli üreme oranında ve virülenslikte çok önemli düşüşler olduğunu ortaya koymuşlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışma iki temel kısımdan oluşmuştur. İlk kısımda Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde bulunan Diyarbakır, Şanlıurfa, Mardin ve Adıyaman illeri buğday üretim alanlarından 2009 ve 2010 yıllarında, kök ve kök boğazı çürüklüğü etmeni *Fusarium* spp.'lerin belirlenmesi amacıyla geniş bir survey yürütülmüştür. Elde edilen *Fusarium* spp. izolatlarının morfolojik ve moleküler teşhisleri yapılmıştır. Bu kısmın ana materyallerini toplanan hastalıklı bitki örnekleri ve bu örneklerden elde edilen *Fusarium* spp. izolatları oluşturmuştur. Çalışmanın diğer materyallerini fitopatoloji ve moleküler biyoloji laboratuvarı alet-ekipmanları ve kimyasalları oluşturmuştur.

İkinci kısımda buğdayda kök ve kök boğazı çürüklüğü ve başak yanıklığı hastalığı etmeni *F. graminearum*'a ait "Secretome" verileri, bugüne kadar belirlenen fungal efektörlerin, belirli karakteristik özellikleri temelinde analiz edilerek, bu fungusa ait fungal efektör aday genler belirlenmiştir. Belirlenen, Small Secreted Protein (SSP) genlerinin moleküler farklılıkları sekans analizleri yardımıyla ortaya konulmuştur. Bu kısımdaki çalışmanın materyallerini *F. graminearum* SSP genleri, ilgili Enstitü'nün stok kültürlerinden oluşturulan bir *Fusarium* spp. izolat seti ve ülkemize ait bazı izolatlar, moleküler biyoloji laboratuvarı alet-ekipmanları ve GENEIOUS genetik analiz programı oluşturmuştur. Bu bölümdeki araştırmaların bir kısmı Rothamsted Research (UK) araştırma merkezinde, belli bir kısmı ise Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'ne bağlı Biyoteknoloji Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Buğdayda Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü Etmeni *Fusarium* spp.'lerin Belirlenmesi

3.1.1. Buğday alanlarından *Fusarium* spp.'nin sürveyi ve izolasyonu

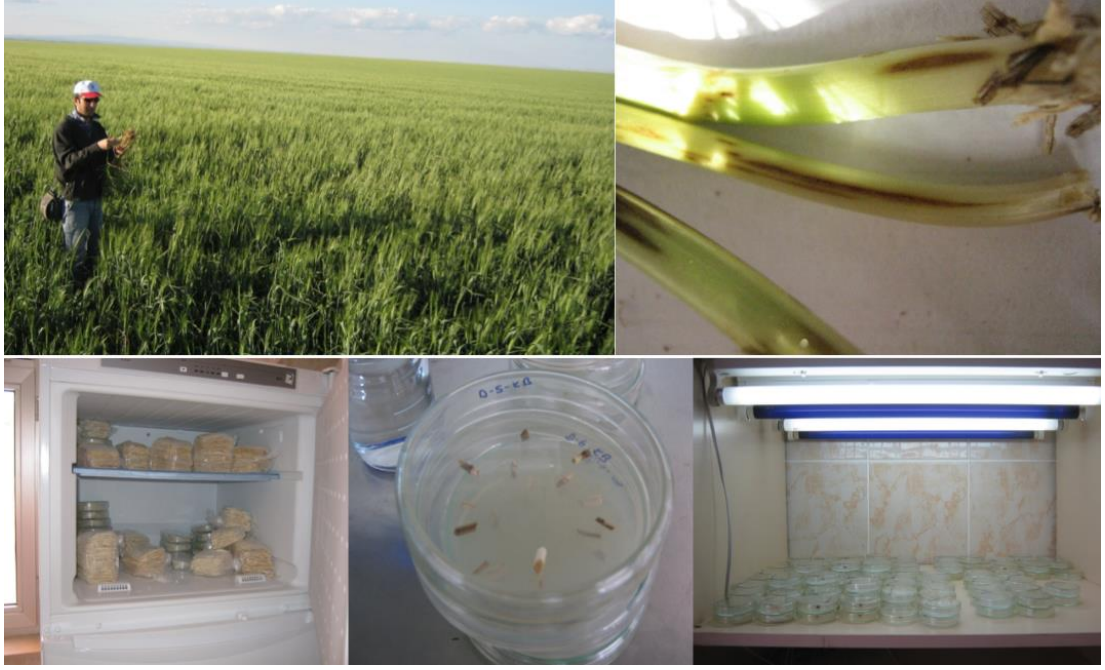
Diyarbakır (Merkez, Kocaköy, Ergani, Kulp, Lice, Çermik, Bismil, Çınar, Silvan, Hazro, Eğil ilçeleri), Şanlıurfa (Merkez, Viranşehir, Ceylanpınar, Harran, Suruç, Bozova, Siverek, Hilvan, Akçakale ilçeleri), Mardin (Derik, Mazıdağı, Nusaybin, Kızıltepe ilçeleri) ve Adıyaman (Merkez, Kahta, Besni, Samsat ilçeleri) illeri buğday ekim alanlarından 2009 ve 2010 yıllarında sürveyin iş yükü ve mevcut iş gücü olanakları göz önüne alınarak kardeşlenme ile süt olum dönemleri arasında sürveyler yapılmıştır. Sürvey alanına giren illerdeki 408 tarladan alınan örneklerle ait bilgiler Çizelge 3.1'de verilmektedir.

Çizelge 3.1. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden 2009-2010 yıllarında *Fusarium* spp. izolasyonu için yapılan sürveye ait bilgiler.

İl	Buğday Ekim Alanı (Ha)	İncelenen tarla sayısı		Alınan hastalıklı bitki sayısı	
		2009	2010	2009	2010
Diyarbakır	387 183	68	75	340	425
Şanlıurfa	364 483	65	62	325	310
Adıyaman	119 579	33	30	165	150
Mardin	130 878	39	33	195	165
Toplam	918 123	208	200	1025	1050

İncelenen her tarladan, kök ve kök boğazı çürüklüğü simptomu gösteren 5 adet hastalıklı bitki, kese kâğıtları arasında laboratuara getirilmiş ve yüzey sterilizasyonu yapılana kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Örnek alınacak tarlalar en az 3-5 km aralıklarla seçilmiştir (Şekil 3.1).

Sürvey çalışmaları sonucunda etiketlenerek laboratuara getirilen örneklerden *Fusarium* spp. izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonu amacıyla her bir örnek için yaklaşık 1 cm uzunluğunda parçalara ayrılan buğday kök ve kök boğazı parçaları %1'lik sodyum hipoklorit içerisinde 3 dakika bekletilmiş ardından iki-üç kez steril destile sudan geçirilmiştir. Steril kurutma kâğıtları arasında kurutulan hastalıklı bitki parçaları ekim yapılcaya kadar -20°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.1. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde buğday alanlarında *Fusarium* spp.'nin izolasyonu için yapılan sürvey ve izolasyon çalışmalarından görüntüler.

İzolasyonların yapılmasında agar plate tekniği kullanılmıştır. Buna göre ekim sırasında bitki parçaları PPA (Peptone PCNB agar) seçici ortamına alınmıştır (Nash ve Synder, 1962). Gelişen *Fusarium* spp. SNA (Synthetic Nutrient Agar) ortamına alınarak $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de ve 15 saat black light ışık ve 9 saat karanlık şartlarda 1 hafta geliştirilmiş, su agar ve mikroskop kullanılarak yapılan tek spor izolasyonunun ardından teşhis çalışmaları yapılmıştır.

3.1.2. İzole edilen *Fusarium* spp.'lerin morfolojik teşhisi çalışmaları

İzolasyonları tamamlanan *Fusarium* spp. izolatlarının

- 1) PDA üzerindeki koloni karakteri : a) gelişme hızı b) havai miselyum c) koloninin üstten ve tersten görünüşü
- 2) Makrokonidi özellikleri : a) Konidial kitle b) makrokonidinin şekli c) makrokonidinin en geniş bölümü d) makrokonidinin en-boy ölçüsü e) bölme sayısı f) bazal hücrenin yapısı g) apikal hücrenin uzunluğu h) apikal hücrenin şekli
- 3) Mikrokonidi özellikleri : a) havai miselyumdaki mikrokonidilerin kısmi bolluğu b) zincir ya da başçık oluşturma durumu c) mikrokonidinin şekli d) havai miselyumdaki fialitlerin şekli

4) Klamidospor özellikleri : Klamidospor olup olmadığı, oluşma süresi ve miktarı gibi makroskobik ve mikroskobik özellikleri temelinde Leslie ve Summerell (2006)'e göre ön teşhisleri yapılmıştır.

3.1.3. İzole edilen *Fusarium* spp.'lerin moleküler teşhisi çalışmaları

3.1.3.1. Fungal miselial kitlenin eldesi ve DNA izolasyonu

Bu amaçla daha önce arazi çalışmaları sonucunda elde edilen ve morfolojik olarak *Fusarium* spp. olduğu doğrulanan izolatlar DNA izolasyonunda kullanılacak misel kitlesinin eldesi için PDA besi yerinde kültüre alınmıştır. Besi yerinde 7 gün süre ile 24°C'de inkübe edilen kültürler, gelişimlerinin ardından steril bir bistüri ucu yardımıyla katı besi yeri üzerinden kazınmış ve 2 ml'lik steril tüplere aktarılmıştır. Daha sonra 12 saat süreyle liyofilizatörde kurutulmuş ve ezme işlemine hazır hale getirilmiştir; ezme işleminde minik havaneli (micropestle) kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. DNA izolasyonları için liyofilize edilmiş *Fusarium* spp. kültürleri ve ezme işleminde kullanılan mini havaneli.

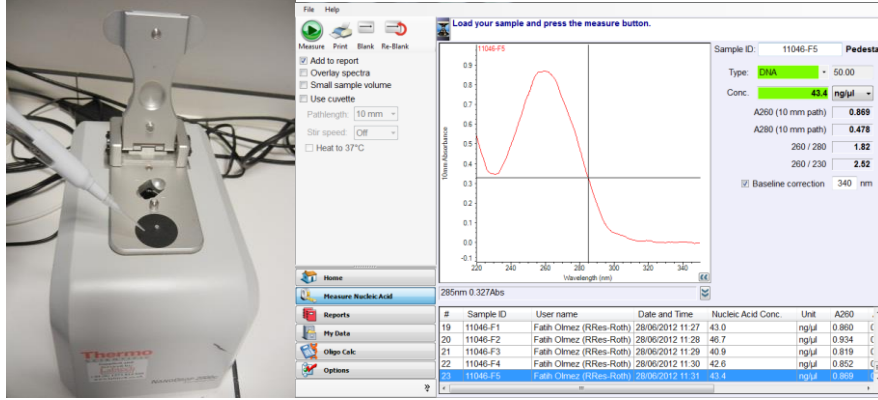
DNA izolasyonunda kullanmak üzere Ekstraksiyon Solüsyonları I (200 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA) ve II (%5 SDS) hazırlanmıştır.

Liyofilizasyonun ardından ezilerek toz haline getirilen miseller kullanılarak ve aşağıdaki bir dizi işlem takip edilerek DNA izolasyonları yapılmıştır:

1. Toz haline getirilen miseller 1,5 ml'lik ependorf tüplerine $\frac{1}{4}$ oranında konulmuştur.
2. Üzerine 700 μ l ekstraksiyon solüsyonu I eklenmiştir.
3. 2000 rpm' de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Karışımdan 90 μ l çekilerek yeni bir ependorf tüpe aktarılmış ve üzerine 10 μ l ekstraksiyon solüsyonu II eklenip ve karıştırılmıştır.

5. 65°C’de 1 saat inkübe edilmiştir.
6. Çıkarılan tüpler 3500 rpm’ de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Santrifüj edilen ependorf tüplerdeki karışımdan 40 µl çekilerek yeni bir ependorf tüpe aktarılmış, üzerine 100 µl absolute ethanol eklenip ve karışım iyice karıştırılmıştır.
8. 2000 rpm devirde 10 dakika santrifüjlenmiştir.
9. Santrifüjden çıkan ependorf tüplerin içindeki sıvı kısım dökülerek, kurumaya bırakılmıştır.

Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra 100 µl steril saf su eklenmiştir. Çözünen DNA’nın konsantrasyonu ve kalitesi Nano-Drop yardımıyla belirlenmiştir (Şekil 3.3). Daha sonra stok DNA, PCR çalışmalarında kullanılmak üzere 40 ng/ µl olacak şekilde seyreltilmiştir.



Şekil 3.3. DNA miktar tayininde kullanılan NanoDrop cihazı ve yapılan işlemlerden bir görüntü.

3.1.3.2. *Fusarium* cinsine ait primer ile tüm koleksiyonun taranması

Fusarium cinsine ait oldukları morfolojik olarak teşhis edilen izolatlar, DNA izolasyonlarının ardından, Jurada ve diğ., (2006) tarafından geliştirilen cinse spesifik bir primer seti kullanılarak doğrulama işlemi yapılmıştır. Forward primer olarak Fps-F (5' CGCACGTATAGATGGACAAG 3') ve reverse primer olarak Fus-R (5' GGCGAAGGACGGCTTAC 3') kullanılmıştır. PCR karışımın içeriği Çizelge 3.2’de gösterildiği gibi olmuştur. PCR döngü koşulları 94°C’de 85 s ilk denatürasyon; 95°C’de 35 s denatürasyon, 67°C’de 30 s yapışma ve 72°C’de s zaman aşamalarından oluşan 25 döngü ve son uzama 72 °C’de 5 dk. olarak ayarlanmıştır.

Çizelge 3.2. *Fusarium*'ların cins düzeyinde moleküler teşhisi için hazırlanan PCR karışımının içeriği ve miktarları.

	Konsantrasyon	Örnek başına µl
PCR buffer	10 X	2.5
MgCl ₂	25 mM	2
dNTP	10 mM	0.5
Primer (F)	10 µM	1.25
Primer (R)	10 µM	1.25
Taq	5 U/ µL	0.2
ddH ₂ O	-	15.8
DNA	40 ng/ µL	1,5
Toplam		25 µL

Tüm PCR işleminin ardından elde edilen PCR ürünleri, EtBr (10mg/mL) içeren %2.5 ultra saf agaroz ile elektroforez jel dökümentasyon ünitesi ve dijital görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

3.1.3.3. Bazı moleküler teknikler ile *Fusarium* izolatlarının tür teşhisi

Bu amaçla koleksiyonu oluşturan izolatların tür düzeyinde teşhisi için öncelikle mikroskopik teşhisi hiç yapılamayan ya da mikroskopik teşhiste türü belirlenemeyen izolatlar hakkında bir fikir edinebilmek adına, bazı kesim enzimleri (*MspI*, *HinfI*, *HaeIII*) kullanılarak *F.solani*, *F.oxysporum*, *F.semitectum*, *F.equiseti* ve *F.proliferaum* gibi bazı türler için PCR-ITS-RFLP testlemeleri yapılmıştır. Bu amaçla önce testlenecek izolatların ITS bölgelerinin bir kısmı White ve diğ., (1990) çalışmasında belirtilen ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri 37 °C'de 12 saat süreyle *MspI*, *HinfI* ve *HaeIII* enzimleriyle muamele edilmiştir. Daha sonra elde edilen enzim kesim ürünleri %1.5'lik jelde 2.5 saat süreyle 70 V'ta koşulmuş ve EtBr ile boyanarak görsel hale getirilmiştir. Oluşan bant profilleri Chehri ve diğ., (2011) tarafından belirtilen profiller ile karşılaştırılarak, tür tahminleri yapılmıştır.

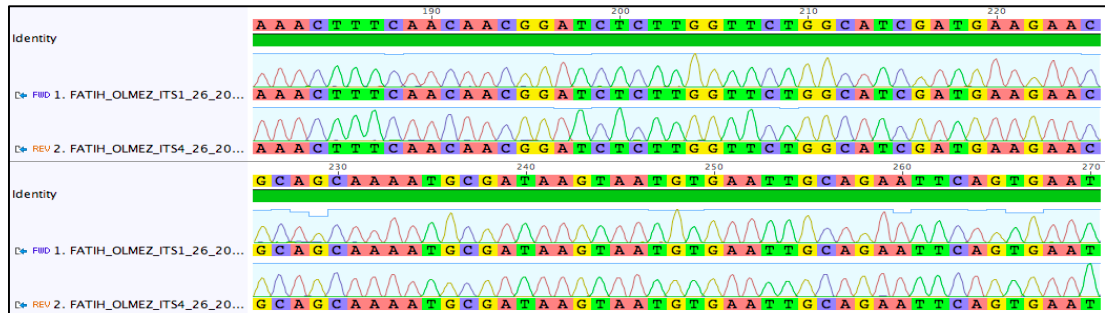
Daha sonra mikroskopik tür teşhisi ve ITS-RFLP tahminleri doğrultusunda belirlenen türler için Çizelge 3.3'de verilen tür spesifik primerler kullanılarak tür teşhisleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. *Fusarium* spp. teşhislerinde kullanılan türe özgü primerler ve PCR koşulları.

Primerler	Primer dizileri	Tür*	Referans	PCR koşulları	Beklenen Uzun. (bp)
C51F ^a C51R	ATG GTG AAC TCG TCG TGGC CCC TTC TTA CGC CAA TCT CG	<i>F. cul</i>	(Nicholson ve diğ., 1998)	94, 30 sn; 66-64-62, 20 sn; 72, 45 sn; (20 d)	570
53-6F ^e 53-6R	TTT ACG AGG CGG CGA TGG GT GGC CGT TTA CCT GGC TTC TT	<i>F. vert</i>	(Mulè ve diğ., 2004)	94, 50 sn; 56, 50 sn; 72, 1 dk; (35 d)	578
FE-F ^f FE-R	CAT ACC TAT ACG TTG CCT CG TTA CCA GTA ACG AGG TGT ATG	<i>F. equ</i>	(Mishra ve diğ., 2003)	94, 1 dk; 58, 40 sn; 72, 1 dk; (25 d)	400
SmibolFM ^b SmibolRM	CAA GCA AAC AGG CTC TTC ACC TGT TCC ACC TCA GTG ACA GGT T	<i>F. sem</i>	(Hong ve diğ., 2010)	95, 30 sn; 57, 30 sn; 72, 30 sn; (25 d)	424
FAC-Ff FAC-R	GGG ATA TCG GGC CTC A GGG ATA TCG GCA AGA TCG	<i>F. acum</i>	(Williams ve diğ., 2002)	94, 30 sn; 66-56, 20 sn; 72, 45 sn; (35 d) (Touchdown)	602
PFO3i PFO2	CGG GGG ATA AAT GCG G CCC AGG GTA TTA CAC GGT	<i>F. oxy</i>	(Edel ve diğ., 2000)	94, 50 sn; 59, 50 sn; 72, 30 sn; (33 d)	70
Fp3-Fj Fp4-R	CGG CCA CCA GAG GAT GTG CGG CCA CCA GAG GAT GTG	<i>F. pro</i>	(Jurado ve diğ., 2006)	94, 50 sn; 56, 50 sn; 72, 1 dk; (35 d)	234
ITS1 ITS4	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	rDNA	(White ve diğ., 1990)	94, 50 sn; 56, 50 sn; 72, 1 dk; (35 d)	550/570

**F.cul* = *F. culmorum*; *F.vert* = *F. verticillioides*; *F.equ* = *F. equiseti*; *F.sem* = *F. semitectum*; *F.acum* = *F. acuminatum*; *F.oxy* = *F. oxysporum*; *F.pro* = *F. proliferatum*

Tür spesifik primerler ile de sonuç alınamayan bazı izolatlar için ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak çoğaltılan rDNA bölgesi kullanılarak sekans analizleri yoluyla izolatların türleri belirlenmiştir. Elde edilen PCR fragmentleri PCR temizleme kitleri yardımıyla temizlenmiş ve firmanın direktifleri doğrultusunda hazırlanarak sekans hizmeti alınan firmaya gönderilmiştir. Gelen çift yön dizi sonuçları elektroferogram verileri kullanılarak Geneious genetik analiz programında işlenmiş (Şekil 3.4) ve konsensüs dizileri elde edilmiştir.



Şekil 3.4. Sekans analizi yoluyla tür teşhisi işleminde konsensus dizilerinin oluşturulması.

Bu diziler NCBI veri tabanında BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizlerine tabi tutulmuş ve yüklenen dizinin, veritabanındaki hangi organizmaya ait sekans verisiyle en yüksek oranda benzerlik gösterdiğine göre tür teşhisi yapılmıştır (Şekil 3.5).

Download ▾ GenBank Graphics					
Gibberella moniliformis isolate FM2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence					
Sequence ID: gb JF499676.1 Length: 548 Number of Matches: 1					
Range 1: 11 to 548 GenBank Graphics ▾ Next Match ▲ Previous					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
994 bits(538)	0.0	538/538(100%)	0/538(0%)	Plus/Plus	
Query 1	GAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC	TCCCAACCCCTGTGAACATACCAAT	60		
Sbjct 11	GAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAAC	TCCCAACCCCTGTGAACATACCAAT	70		
Query 61	TGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAAC	CGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCT	120		
Sbjct 71	TGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAAC	CGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCT	130		
Query 121	AAACTCTGTTTCTATATGTAAC	TCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACTTTCAACA	180		
Sbjct 131	AAACTCTGTTTCTATATGTAAC	TCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACTTTCAACA	190		
Query 181	ACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC	CGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAA	240		
Sbjct 191	ACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC	CGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAA	250		
Query 241	TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC	GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGG	300		
Sbjct 251	TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC	GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGG	310		
Query 301	CGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCT	CAAGCCCAGCTTGGTGTGGGACTCGC	360		
Sbjct 311	CGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCT	CAAGCCCAGCTTGGTGTGGGACTCGC	370		
Query 361	GAGTCAAATCGCGTTCCCAAATTGATTGGCGGT	CACGTCGAGCTTCATAGCGTAGTAG	420		
Sbjct 371	GAGTCAAATCGCGTTCCCAAATTGATTGGCGGT	CACGTCGAGCTTCATAGCGTAGTAG	430		
Query 421	TAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCC	CACGCGTTAAAACCCCAACTTCTGAATGT	480		
Sbjct 431	TAAAACCCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCC	CACGCGTTAAAACCCCAACTTCTGAATGT	490		
Query 481	TGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAAC	TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA	538		
Sbjct 491	TGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAAC	TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA	548		

Şekil 3.5. İzolatlara ait sekans dizileri kullanılarak NCBI veri tabanından yapılan tarama çalışması.

3.2. *F. graminearum* Genomundaki Bazı SSP (Small Secreted Protein) Genlerinin Moleküler Karakterizasyonu

3.2.1. Karakterize edilecek *F. graminearum* SSP genlerinin belirlenmesi

Bu amaçla Brown ve diğ., (2010) tarafından yayınlanan *F. graminearum* secretome verileri (1369 gen), MIPS, BROAD, PLEXdb veri bankaları verileri kullanılmıştır. Oluşturulan *F. graminearum* veri tabanından, bugüne kadar belirlenen fungal efektörlerin tipik özelliklerini (175 amino asitten daha küçük, hücre arasına (extracellular) salınan, Cysteine sayısı 4 ve daha fazla olan proteinleri kodlayan genler) taşıyan genler seçilmiştir. Bu genler içinde, PLEXdb verileri kullanılarak *F. graminearum* inokulasyonunun ardından, arpa bitkisinde ekspresyonu gerçekleştiği belirlenen genler seçilmiştir. Belirlenen genlerin dahil olduğu gen kümelerinde birbirine çok yakın bulunan bazı genler ile SSP olarak tanımlanan fakat ekspresyon verileri nedeniyle seçilemeyen bazı genler, farklı bazı özellikleri temelinde çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2.2. Seçilen *F. graminearum* SSP genlerindeki genetik varyasyonun belirlenmesi

3.2.2.1. Fungal strainlerin belirlenmesi ve hazırlanması

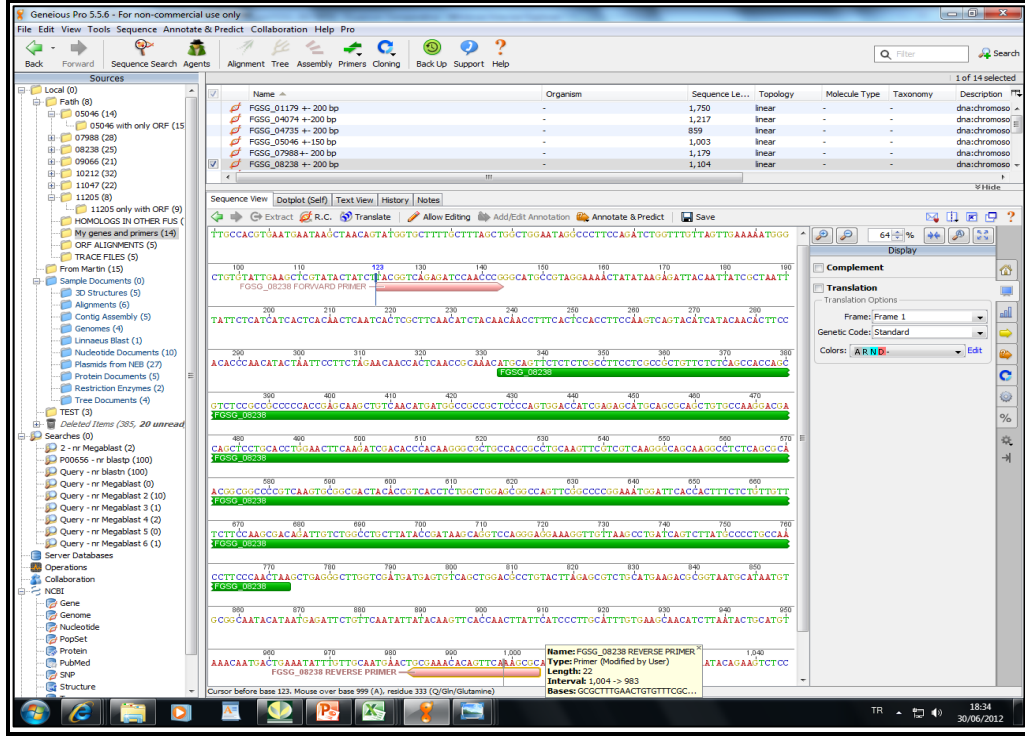
Çalışmada, Rothamsted Araştırma Merkezi (İngiltere) stoklarında bulunan farklı türlerde ve kemotiplerde *Fusarium* izolatları ile Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yapılan survey çalışmalarından elde edilen bazı izolatlar (Çizelge 3.4) kullanılmıştır. Hazırlanan sette 10 adet *F. graminearum*, 4 adet *F. culmorum*, 2 adet *F. pseudograminearum* ve 1 adet non-patojenik fungus *F. venenatum* izolatu yer almıştır. İzolatlar toprak kültürlerinden SNA besi yerlerine ekilmiş ve 24°C'de, 5 gün süre ile geliştirilmişlerdir. Geliştirilen kültürlerden DNA izolasyonu bir bölüm 3.1.3.1'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan *Fusarium* türüne ait fungal izolatlar.

Strain kodu	Strain adı	Kemotipi	Tür	Referanslar
F1	Fg Ph-1	15-ADON	<i>F.gram</i>	Cuomo ve diğ., (2007); Gale ve diğ., (2005); Winnenbourg ve diğ., (2008)
F2	FgGZ3639	15-ADON	<i>F.gram</i>	Bowden and Leslie, (1992); Jurgenson ve diğ., (2002); Cuomo ve diğ., (2007)
F3	Fg00-676	15-ADON	<i>F.gram</i>	Gale ve diğ., (2005)
F4	Fg16A	15-ADON	<i>F.gram</i>	K.E.Hammond Kosack, <i>per. com</i> Urban ve diğ.,(2002; 2003)
F5	Fg820	15-ADON	<i>F.gram</i>	Luongo ve diğ., 2005;
F6	FcUK99	3-ADON	<i>F.cul</i>	M.Urban, N. Hall and K.E. Hammond Kosack, <i>kişisel gör.</i> ; Baldwin ve diğ., (2010)
F7	Fc98/11	3-ADON: 15-ADON	<i>F.cul</i>	C. Bass, M. Urban and K.E. Hammond Kosack, <i>kişisel gör.</i>
F8	Fc97/7	3-ADON	<i>F.cul</i>	C. Bass,M. Urban and K.E.Hammond Kosack, <i>kişisel gör.</i>
F9	Fc-TR1	-	<i>F.cul</i>	Bu çalışma
F10	FpCS3212	3-ADON	<i>F.pseud</i>	Akinsanmi ve diğ., (2006)
F11	FpCS3096	3-ADON	<i>F.pseud</i>	Akinsanmi ve diğ., (2004); Scott ve Chakroborty (2006).
F12	FvA3/5	DAS	<i>F.ven</i>	Wiebe 2004
F13	DOAM	15-ADON	<i>F.gram</i>	L. Harris, AAFC, Ottawa, Ontario, Canada
F14	FG25	DON	<i>F.gram</i>	Maier ve diğ., (2006)
F15	FG2311	DON	<i>F.gram</i>	Maier ve diğ., (2006)
F16	FG06	NIV	<i>F.gram</i>	Maier ve diğ., (2006)

3.2.2.3. Primer dizaynı

Çalışılacak genlerin belirlenmesinin ardından ilgili genlere ait nükleotid dizileri PhytoPath (http://fungi.ensembl.org/Gibberella_zeae/Info/Index/) veri tabanından, gen kodları girilerek indirilmiş ve FASTA formatında Genious genetik analiz programında oluşturulan dosyaya kaydedilmiştir. Daha sonra bu veri dosyaları kullanılarak Geneious programında her bir gen için forward ve reverse primerler dizayn edilmiştir. Primer dizaynı çalışmaları sırasında dizayn edilen primerlerin genin, protein kodlayan dizilerinin dışında kalmasına özellikle dikkat edilmiştir (Şekil 3.6). Primer dizileri sipariş edilmiş ve firmasından geldikten sonra 10 µM olacak şekilde ayarlanmıştır.



Şekil 3.6. Geneious programında çalışılacak genler için primer dizaynı çalışmaları.

Çalışmanın bir önceki kısmında belirlenen 16 gen ve PCR çalışmalarında kontrol olarak kullanılan Tubulin (FGSG_09530-Tub 2) geni için dizayn edilen primerlere ait detaylı bilgiler Çizelge 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Karakterizasyon için belirlenen Small Secreted Protein genleri ve dizayn edilen primerlere ait bilgiler.*

GEN ID	Gen Transkript Uzunluğu	PCR Ürünü Uzunluğu	Oligo Kodu	PRİMERLER
1	FGSG_11046	696	829	FOT1 ACGGTCTTTACCACCAGTCACTC FOT2 AGATACAGCCGAGTGTGGTCATC
2	FGSG_11047	479	807	FOT3 TCTTTTGATCGCCCAGTCACTCT FOT4 CTGTTCTGTTGGCCTTGATGCTT
3	FGSG_10212	932 (477)	1000	FOT5 CGTGATGGACAAGGCAGGGTA FOT6 CCAATTCGATCAAGCAGAGCA
4	FGSG_11205	605	672	FOT25 GAGAGTGAAGTCCTCACCAAT FOT26 GCATATGAATGTCATCGTATG
5	FGSG_05046	703 (443)	605	FOT29 GGTCGGCTGGTCTACTTTTACAT FOT30 CCCGGTAGATCTATTTTCATATCCCA
6	FGSG_09066	568	659	FOT11 CATCCTCCCTCTCAAACATCAT FOT12 GCAACAAACATTACCAAAATG
7	FGSG_04074	817 (573)	880	FOT13 CATCAACCTCTCATCAACCTT FOT14 AAGGTGTTTGCATAATGATGC
8	FGSG_07988	779 (540)	860	FOT15 GTAAAGATATAAAAAGACCTGCACC FOT16 CGTTAAGCATTCAACATCACTA
9	FGSG_12300	576	640	FOT17 GCTGATACAGCAGCTAATATCTCA FOT18 CAACGATTCAACAGTGTGCAT
10	FGSG_09403	1301 (733)	1376	FOT19 TCTTCTTCTCTCTCCTCACCT FOT20 GTCCCTCACTGTTCTCCTTTT
11	FGSG_04735	459	722	FOT28 CCGGCTGTTTCCAATTCCAATCA FOT27 TGTACAAAAGGCTACCTTGTCGG
12	FGSG_01179	1350 (720)	1410	FOT23 CCTTGGCCCTTCGCGTTTGAA FOT24 AGGGGGGCAAGGACGAGTTTTG
13	FGSG_08328	704	882	FOT41 TACGGTCAGAGATCCAACCCG FOT42 GCGCTTTGAACTGTGTTTCGCA
14	FGSG_04583	995 (447)	1126	FOT43 TCGATGGGTTGAACTGTGCCC FOT44 GCCATCTATCACACTCACGACAACCA
15	FGSG_09586	1003 (651)	1130	FOT45 CCACTTGCCGTCCGCCATTCT FOT46 CGCATGGGCTTGTTTTGGGGT
16	FGSG_08493	220	341	FOT47 TTCAAGCATCACGCCACTGCG FOT48 TGGCACGCCCAAGTTGAACAGT
17	FGSG_09530	Kontrol Tubulin2	609	U83 CTGGTCCCTTCGGACAGCTT U84 AAGAGTGAGCACCACGGCTG

* Veri filtreleme çalışmaları sonucu elde edilen 11 (sarı), Cys sayısının fazlalığı nedeniyle seçilen 3 (turuncu), FGSG_11047'ye olan yakınlığı nedeniyle seçilen 1 (yeşil) ve Magnaporthe grisea MC69 geni homoloğu olan 1 (mor) gene ait bilgiler. (Farklı veri bankalarında –BROAD/MIPS- farklı gösterilen bilgiler aynı kutucukta parantez içinde gösterilmiştir. İlk veri BROAD, parantez içindeki veri MIPS Enstitüsü'ne aittir.)

3.2.2.4. PCR analizleri

İlgili genler için PCR analizi HotStar Taq PCR MasterMix (Qiagen) kullanılarak yapılmıştır. PCR tüpleri içerisine her bir örnek için 12.5 µL mastermix, 1 µL forward primer (10 µM), 1 µL reverse primer (10 µM), 1 µL kalıp DNA (40 ng/µL) konulmuş ve karışım PCR grade su ile 25 µL'ye tamamlanmıştır. PCR amplifikasyon koşulları olarak; başlangıç denatürasyon sıcaklığı 95°C/15 dak, son döngü 72°C/10 dk. ve 94°C/30 s denatürasyon, 55°C/30 s yapışma, 72°C/2 dak uzama safhalarından oluşan

30 döngü şeklinde ayarlanmıştır. PCR ürünleri ethidium bromide ile boyanarak %1'lik agaroz jelde 70 dk, 400 A ve 90 V'ta koşulmuş ve jel görüntüleme cihazında görsel hale getirilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Varyasyon çalışmalarında kullanılan PCR ve elektroporasyon cihazları.

3.2.2.5. Dizi analizi için PCR ürünlerinin pürifikasyonu ve hazırlanması

Çalışılan genlerin DNA dizi analizleri için, PCR ürünleri Quick Clean (Qiagen) DNA pürifikasyon kiti kullanılarak temizlenmiştir (Şekil 3.7). Bu amaçla 25 µL'lik PCR ürününün jele yüklenmesinin ardından kalan yaklaşık 22 µL ürün için 110 µL PB buffer tüp içerisine konulmuş ve tüp içeriği tamamıyla kolon üzerine aktarılmıştır. Maksimum devirde (13 600 rpm) 1 dk. santrifüj işleminin ardından kolonun üzerine 750 µL PE buffer eklenmiş ve aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. İşlemin ardından kolonun içine girdiği tüpteki supernatant kısım uzaklaştırılmış ve kolon alkol kalıntısından tamamen kurtulmak için bir kez daha santrifüj edilmiştir. Daha sonra temiz bir tüpe aktarılan kolon üzerine EB bufferden 30 µL konularak filtrede tutulan DNA'nın tampona geçmesi için 1 dk oda sıcaklığında inkube edilmiş ve sonra santrifüj edilmiştir. Elde edilen üründeki DNA konsantrasyonu NanoDrop DNA miktar tayin cihazı yardımıyla ölçülmüştür. İngiltere'de çalışılan izolatlara ait örnekler Eurofins (Almanya) firmasında, Ülkemizde, GAB'inden elde edilen izolata ait örnekler ise Ankara Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü'nde sekans işlemine tabi tutulmuştur. Bu amaçla örnekler ilgili kurumların direktifleri doğrultusunda hazırlanmış ve sekans analizi için bu kurumlara gönderilmiştir.



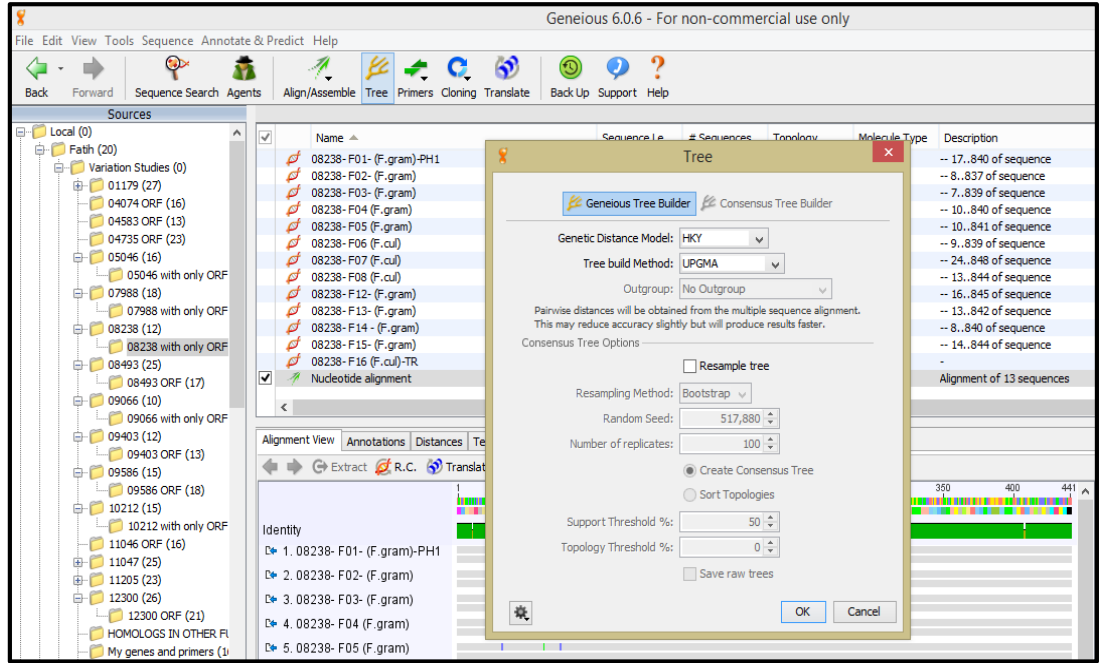
Şekil 3.8. PCR ürünlerinin sekans analizleri için temizlenmesi.

3.2.2.6. Sonuçların analiz edilmesi

Genlere ait dizi sonuçları FASTA formatında her gen için ayrı ayrı oluşturulan dosyalara kaydedilmiş ve Geneious programına yüklenmiştir. Öncelikle aynı izolata ait dizi sonuçları üzerinden konsensus dizileri oluşturulmuştur. Bu amaçla ilgili genin başlangıç ve bitiş dizilerine BROAD, MIPS Enstitüleri web sayfalarından ulaşılmış ve elde edilen dizi sonuçlarından genin nükleotid dizileri ekstrakte edilmiştir. Aynı gen için forward ve reverse primer dizileri kullanılarak elde edilen çift yön DNA iplikçikleri arasında aynı pozisyonda nükleotid farklılıkları olup olmadığı manuel olarak, gerektiğinde “elektroferogram” dosyaları da kullanılarak, kontrol edilmiştir.

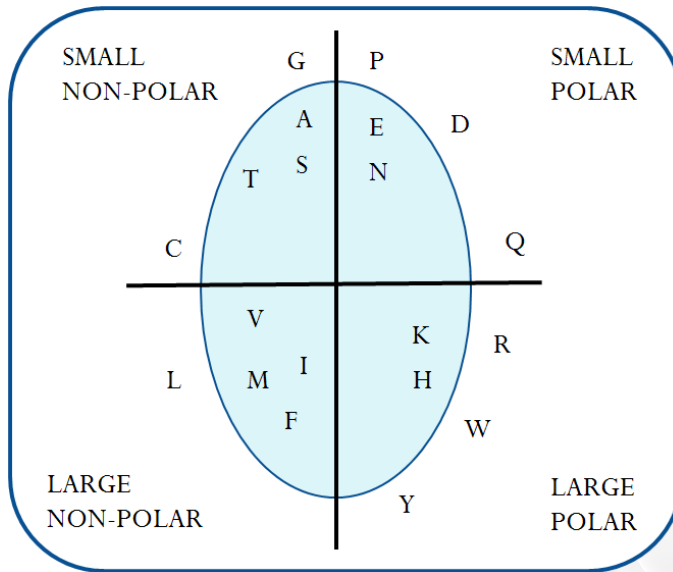
Konsensus dizilerinin oluşturulmasının ardından, bu diziler kullanılarak proteinini kodlayan bölgeler olan Open Reading Frame (ORF) bölgeleri, BROAD, MIPS enstitüleri web sayfaları ve Bhasi ve diğ., (2007) tarafından ortaya konulan, DNA üzerindeki ökaryot organizmalar için evrensel olan intronların kesip çıkarılma bölgeleri (splicing) temelinde, Geneious programı kullanılarak elde edilmiştir. Bilgiler Geneious programında oluşturulan, çalışılan genlere ait ORF dosyalarında kaydedilmiştir.

Farklı izolatlar arasındaki varyasyon analizlerinde, programın “alignment (hizalama)” özelliği kullanılarak aynı gen için farklı izolatlardan elde edilen diziler analiz edilmiştir. Yine alignment sonuçları üzerinden soyağacı oluşturma işlemi için programın “tree” opsiyonu kullanılmıştır. İşlem sırasında genetik uzaklık modeli olarak HKY (Hasegawa, Kishino, Yano) Modeli ve ağaç oluşturma metodu olarak da UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) metodu seçenekleri belirlenmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Geneious genetik analiz programında yapılan soyağacı oluşturma çalışmalarından bir görüntü.

Genlere ait ORF bölgelerinde meydana gelen mutasyonların yerini ve önemini daha iyi açıklamak için, Microsoft PowerPoint programı yardımıyla alignment sonuçları kullanılarak grafikler oluşturulmuştur. Gen üzerinde oluşan mutasyonların aa değişikliklerine yol açıp açmaması, ya da meydana gelen aa değişikliğinin proteinde yapısal bir değişikliğe yol açıp açmaması gibi hususlar Şekil 3.10 yardımıyla yorumlanmıştır.



Şekil 3.10. Allelik varyasyonların yorumlanmasında kullanılan tablo.

Yine ilgili gen üzerinde meydana gelen mutasyonların, protein ürünü üzerindeki etkisini yorumlamak için “Temel yüzey olasılık tahmini yazılımı (basic surface probability prediction software)”ndan yararlanılmıştır. http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input adresinden çalıştırılan programda “Emini Surface Accessibility Prediction” tekniği (Emini ve diğ., 1985) kullanılarak diagramlar oluşturulmuş ve yorumlanmıştır.

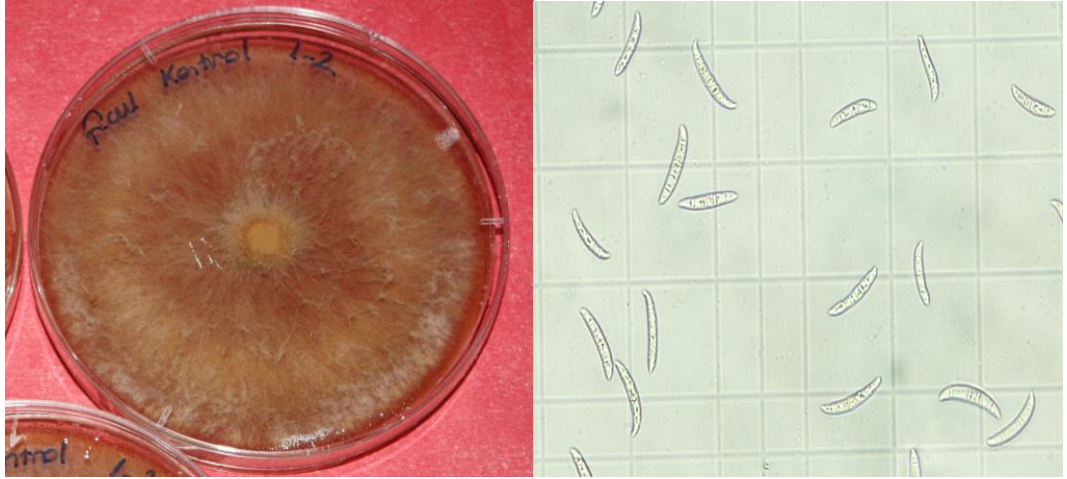
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Buğdayda Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü Etmeni *Fusarium* spp.'lerin Belirlenmesi

4.1.1. Buğday alanlarından *Fusarium* izolatlarının eldesi

Diyarbakır, Şanlıurfa, Mardin, ve Adıyaman illeri buğday ekim alanlarından, 2009 ve 2010 yıllarında, sürveyin iş yükü ve mevcut iş gücü olanakları göz önüne alınarak kardeşlenme ile olgunlaşma dönemleri arasında, incelenen toplam 408 tarladan metoda uygun bir şekilde bitki örnekleri alınarak kese kağıtları içerisinde laboratuara getirilmiştir.

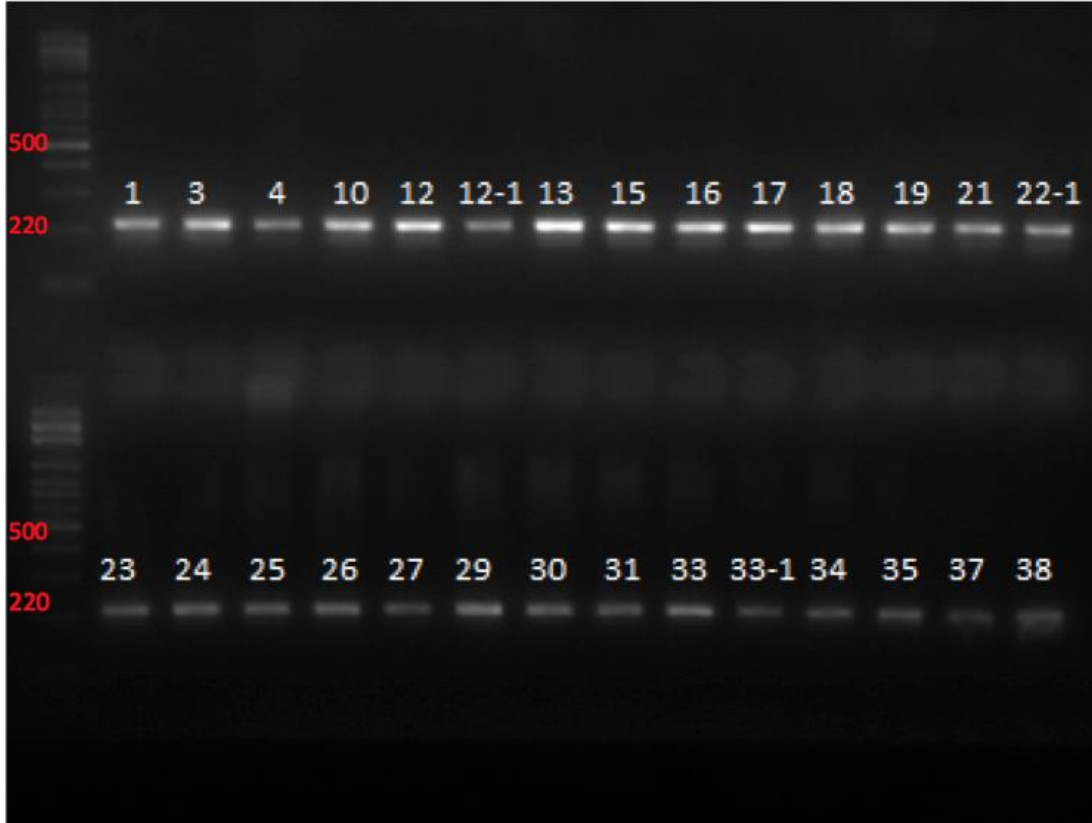
Yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda *Fusarium* cinsine ait 140'tan fazla izolat elde edilmiş olup (Şekil 4.1) tek spor izolasyonları ve morfolojik tür teşhisleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1. İzolasyon sonucu elde edilen *Fusarium culmorum* izolatının petride ve mikroskop altındaki görüntüsü.

4.1.2. İzole edilen *Fusarium* spp.'lerin moleküler teşhis sonuçları

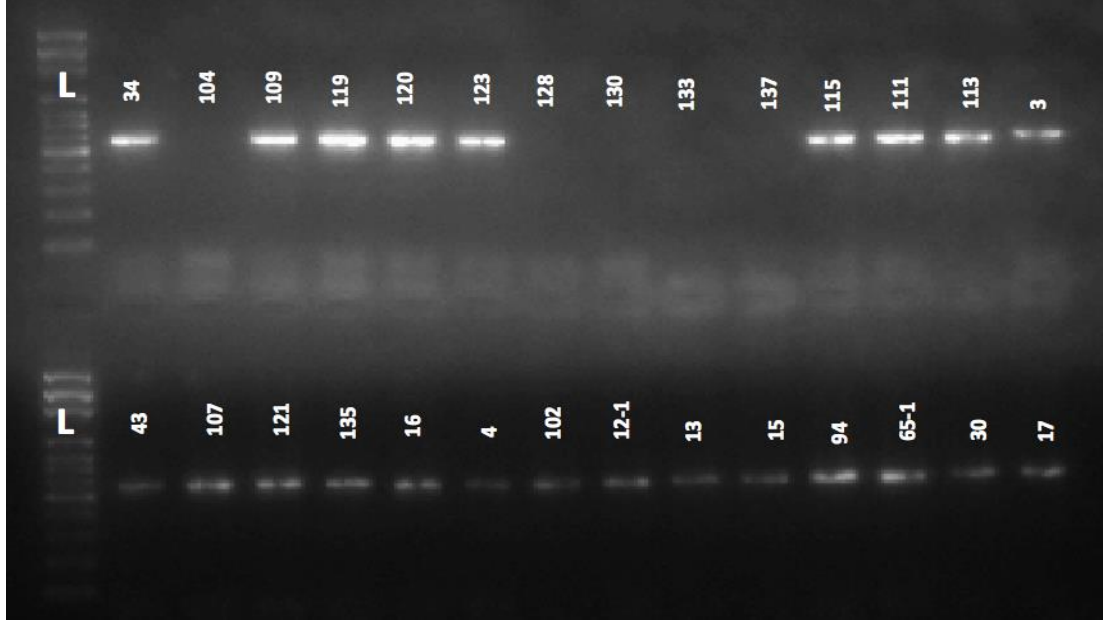
Metot kısmında detayları anlatıldığı üzere DNA izolasyonları ve miktar tayinleri yapılan fungal DNA örnekleri kullanılarak, eldeki tüm koleksiyon *Fusarium* spp.'yi cins düzeyinde tarayabilen bir primer setiyle analiz edilmiştir. Şekil 4.2'de yapılan çalışmadan bir görüntü verilmiştir. Beklenildiği gibi testlenen tüm izolatların çok büyük bir bölümü 220 bp seviyesinde bant oluşturmuştur.



Şekil 4.2. *Fusarium* spp.'nin cins düzeyinde PCR ile teşhisi çalışmasından bir jel görüntüsü.

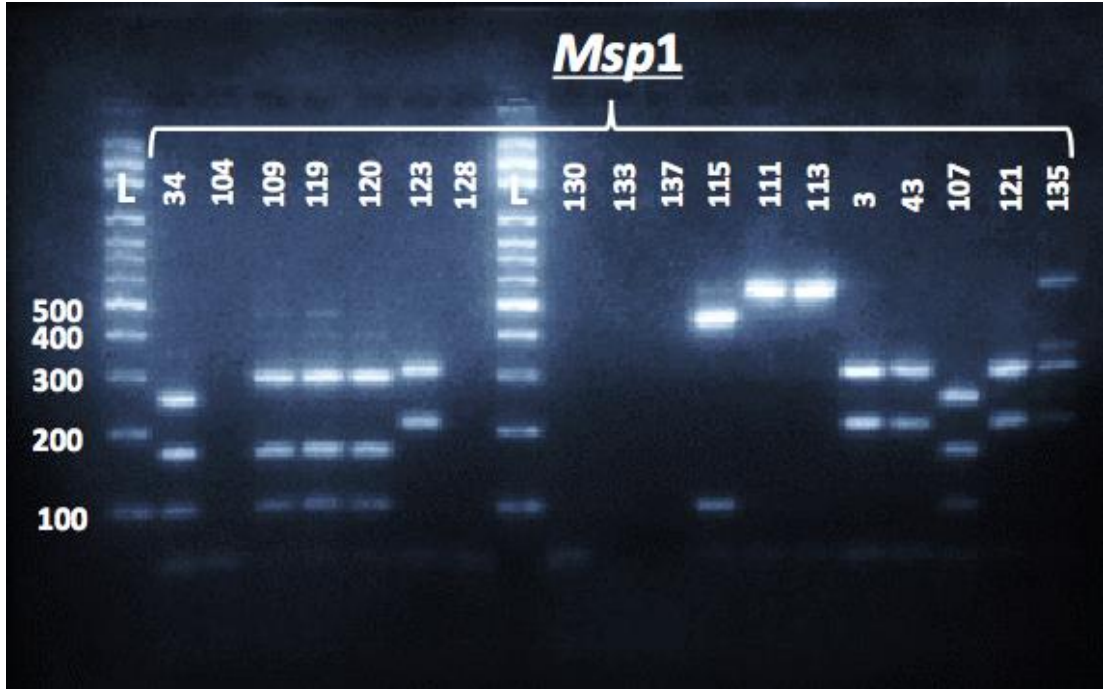
Fusarium olduğu netleşen izolatlar tür teşhisi için PCR-ITS-RFLP tekniği, tür spesifik primerler ve sekanslama ile analiz edilmiştir.

Öncelikle mikroskopik teşhis sırasında herhangi bir tanılama yapılamayan izolatlar için PCR-ITS-RFLP yapılmıştır. Enzim kesim işleminde kullanılacak ITS bölgeleri metot kısmında belirtildiği şekilde PCR ile çoğaltılmıştır. Testlenen 67 izolattan 62'si 550-570 bp civarında bant oluşturmuştur. 104, 128, 130, 133, 137 nolu izolatlar herhangi bir ürün vermemiştir (Şekil 4.3).

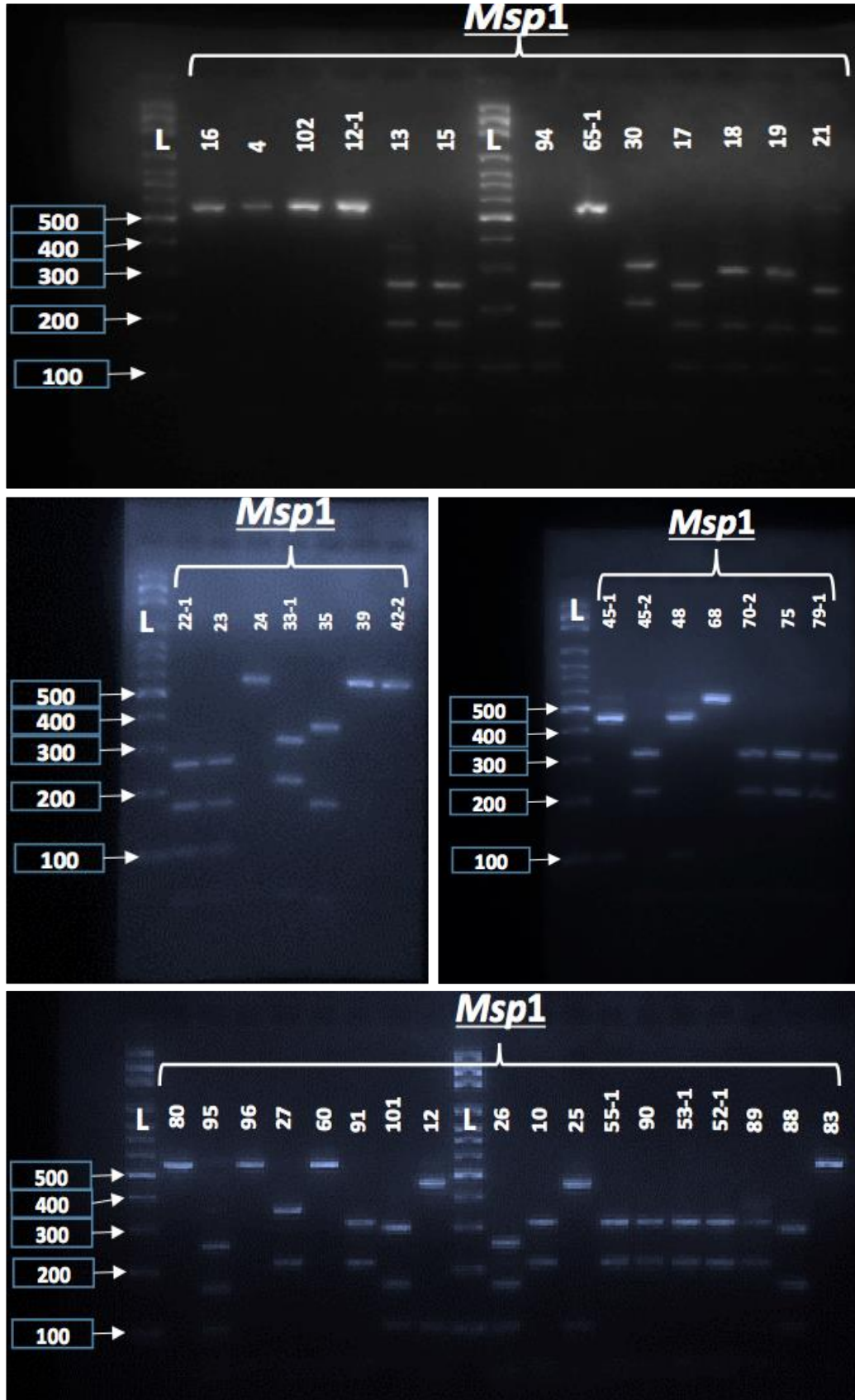


Şekil 4.3. İzolatların ITS bölgelerinin çoğaltılması çalışmasından bir görüntü.

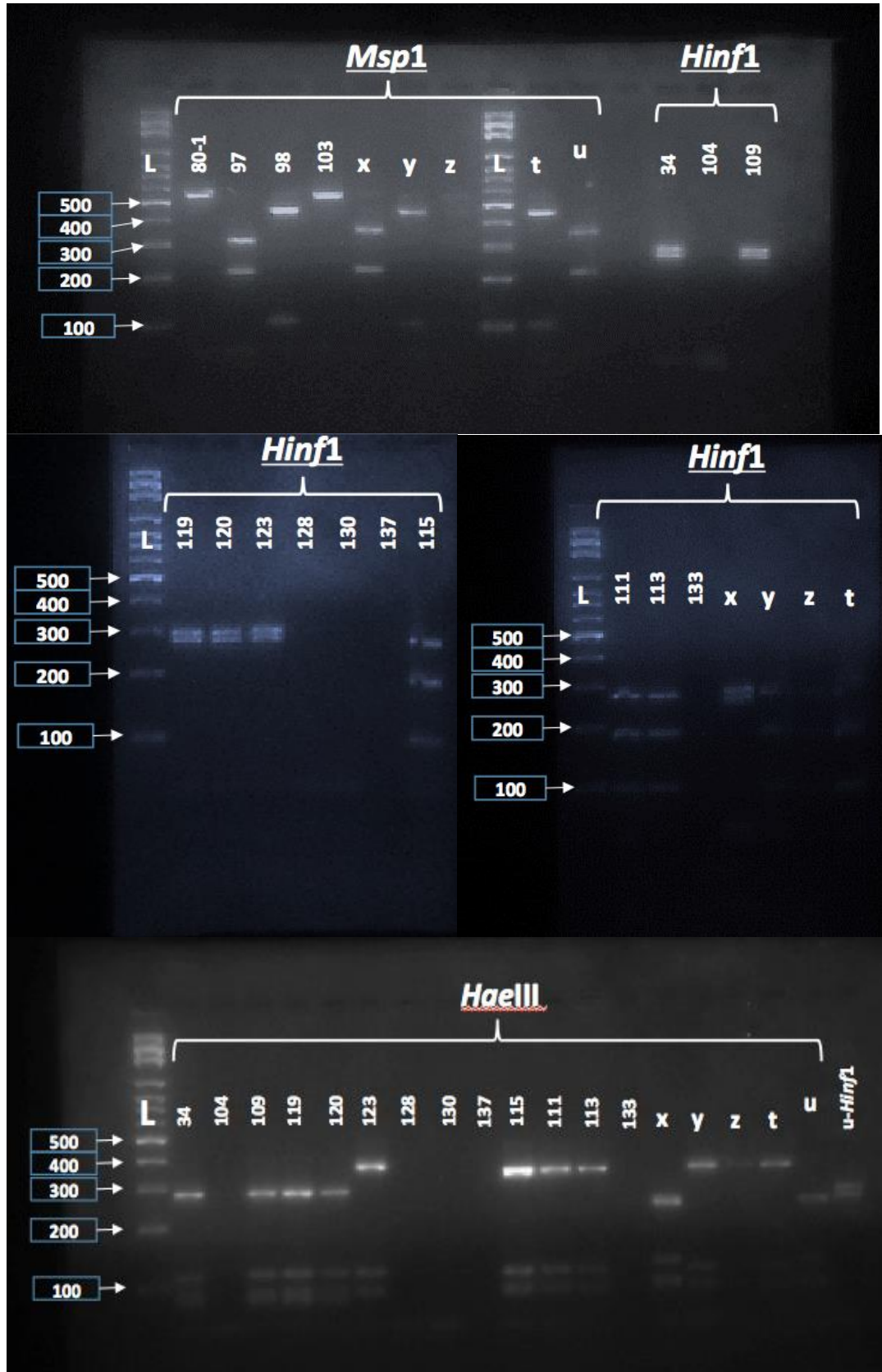
Çoğaltılan ITS bölgelerinin *MspI*, *HinfI* ve *HaeIII* enzimleri ile kesilmesinden sonra oluşan bant profilleri Şekil 4.4 ve 4.5’de verilmektedir.



Şekil 4.4. ITS bölgelerinin *MspI* enzim kesimi sonrası oluşan bant profilleri.



Şekil 4.4 (Devam). ITS bölgelerinin *MspI* enzim kesimi sonrası oluşan bant profilleri.



Şekil 4.5. ITS bölgelerinin *HinfI* ve *HaeIII* enzimleri ile kesimi sonrası oluşan bant profilleri.

Elde edilen enzim kesim ürünlerine ait bant profilleri Chehri ve diğ., (2011) tarafından yayınlanan makalede belirtilen profillerle karşılaştırılarak izolatların ait oldukları türler hakkında tahminler yapılmıştır (Çizelge 4.1) .

Çizelge 4.1. ITS-RFLP işlemi sonucu oluşan bant profilleri.

İzolat kodu	<i>MpsI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HaeIII</i>	Tahminler*
16	550			equ,sem
4	550			equ,sem
102	550			equ,sem
12-1	550			equ,sem
65-1	550			equ,sem
24	550			equ,sem
39	550			equ,sem
42-1	550			equ,sem
68	550			equ,sem
80	550			equ,sem
96	550			equ,sem
60	550			equ,sem
83	550			equ,sem
80-1	550			equ,sem
103	550			equ,sem
115	100-450	100-200-280	90-120-340	oxy
45-1	100-450			oxy
48	100-450			oxy
12	100-450			oxy
25	100-450			oxy
98	100-450			oxy
111	550	100-200-280	90-120-340	oxy,equ,sem
113	550	100-200-280	90-120-340	oxy,equ,sem
34	100-180-250	280-290	100-110-130-230	pro
109	120-180-300	270-280	100-110-130-230	pro
119	120-180-300	270-280	100-110-130-230	pro
120	120-180-300	270-280	100-110-130-230	pro
13	100-180-250			pro
15	100-180-250			pro
94	100-180-250			pro
17	100-180-250			pro

Çizelge 4.1 (Devam). ITS-RFLP işlemi sonucu oluşan bant profilleri.

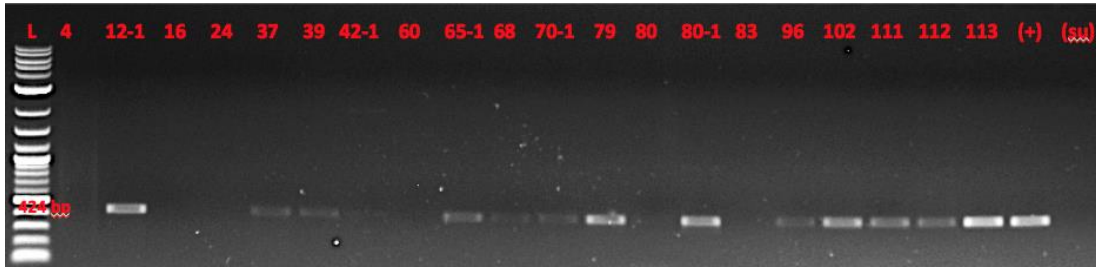
18	100-180-300			pro
19	100-180-300			pro
21	100-180-250			pro
22-1	100-180-250			pro
23	100-180-250			pro
95	100-180-250			pro
101	100-180-300			pro
26	100-180-250			pro
88	100-180-300			pro
123	220-310	280-290	90-120-340	?
3	220-310			?
43	220-310			?
107	100-180-250			?
121	220-310			?
135	220-310-380-550			?
30	220-310			?
33-1	240-350			?
35	180-360			?
45-2	240-320			?
70-2	240-320			?
75	240-320			?
79-1	240-310			?
27	240-360			?
91	240-320			?
10	240-320			?
55-1	240-320			?
90	240-320			?
53-1	240-320			?
52-1	240-320			?
89	240-320			?
97	240-320			?
104	boş	boş		
128	boş	boş	boş	
130	boş	boş	boş	
133	boş	boş	boş	
137	boş	boş	boş	
z	boş			
x	240-360	270-280		sol
u	240-360	270-280		sol
y	100-450	100-200-280		oxy
t	100-450	100-200-280		oxy

*sem: *F. semitectum*; equ: *F. equiseti*; oxy: *F. oxysporum*; sol: *F. solani*; pro: *F. proliferatum*

Çizelge 4.1’de gösterilen enzim kesim bulguları ile bu çalışmaya esas alınan Cherry ve diğ., (2011) tarafından yapılan çalışmadaki kesim bulguları

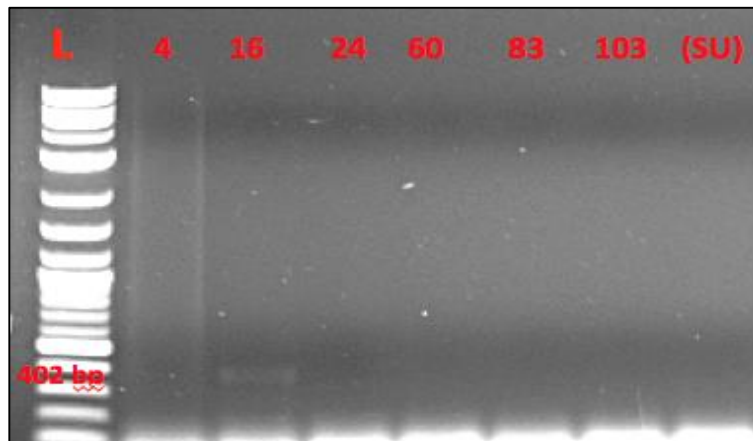
karşılaştırıldığında bazı farklılıklar olduğu görülmektedir. Yine çoğu izolatin ITS bölgesinde sadece tek bir enzim (MspI) tarafından kesim bölgesi bulunduğu ortaya çıkmıştır. Yine bazı izolatların birden fazla türe özgü kesim profillerine sahip oldukları görülmüştür. Bu sebeplerle enzim kesim verileri doğrultusunda yapılan tahminler, PCR ile tür spesifik teşhisi optimize edilebilen türler için doğrulama amacıyla tekrar test edilmiştir.

Bu kapsamda enzim kesim verileri temelinde *F. semitectum* ya da *F. equiseti* olabileceği tahmin edilen 17 izolat ile, mikroskopik olarak *F. semitectum* olarak teşhis edilen 3 izolat için yapılan PCR çalışmasının sonuçları Şekil 4.6’da verilmiştir.



Şekil 4.6. *Fusarium semitectum* için yapılan PCR ile teşhis sonuçları.

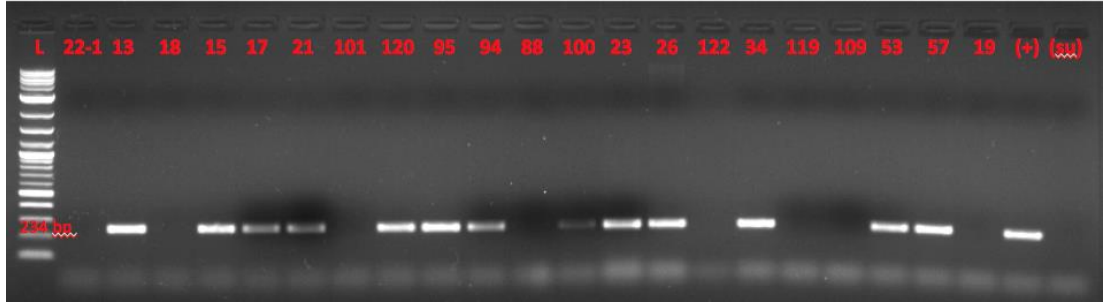
F. semitectum için testlenen 20 izolattan 15 tanesi yaklaşık 424 bp civarında bant vererek *F. semitectum* olarak kaydedilmişlerdir. Burada bant vermeyen 4, 16, 24, 60 ve 83 nolu izolatlar ile mikroskopik olarak *F. equiseti* teşhisi konulan 103 nolu izolat bu kez *F. equiseti* için testlemeye alınmışlardır. Sonuçlar Şekil 4.7’de verilmektedir.



Şekil 4.7. *Fusarium equiseti* için yapılan PCR ile teşhis sonuçları.

Çizelge 4.2’de enzim kesim sonuçlarına göre *F. proliferatum* olabileceği düşünülen toplam 17 izolat ile mikroskopik olarak *F. proliferatum* olarak teşhis

edilen 4 adet izolatin tür teşhisleri, doğrulama amacıyla tür spesifik primerler kullanılarak PCR işlemi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8).



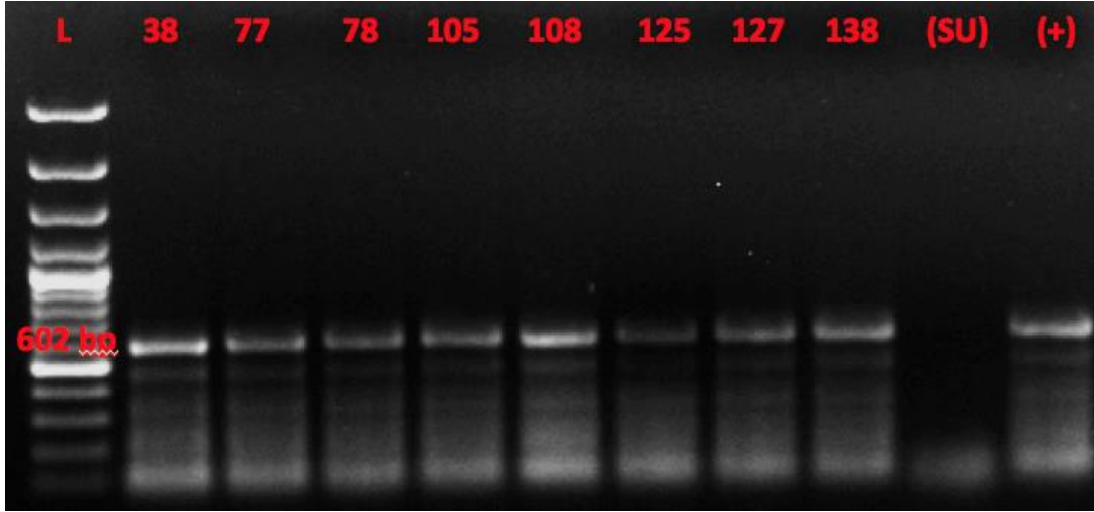
Şekil 4.8. *Fusarium proliferatum* için yapılan PCR ile teşhis sonuçları.

Analiz edilen 21 izolattan 14 tanesi beklenildiği gibi 234 bp’de bant vermiş ve *F. proliferatum* olarak kaydedilmiştir. Negatif çıkan 18, 19, 22-1, 88, 101, 109 ve 119 nolu örnekler bu kez *F. verticillioides* için tür spesifik primerler ile testlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.9’da verilmektedir.



Şekil 4.9. *Fusarium verticillioides* için yapılan PCR ile teşhis sonuçları.

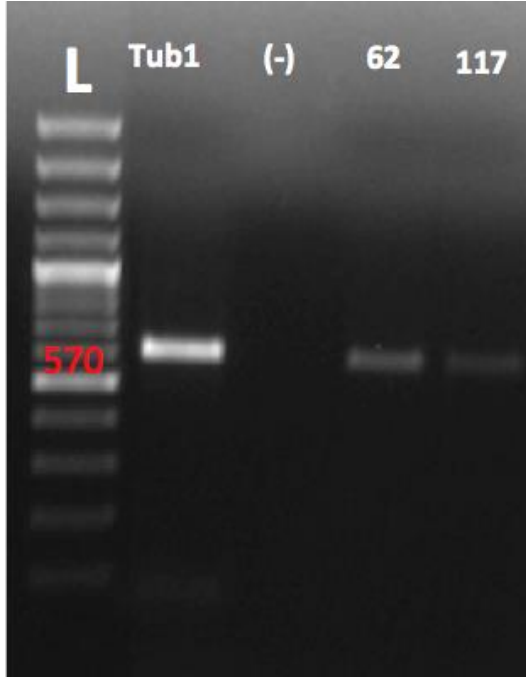
Şekil 4.9’da görülebileceği üzere test edilen 8 izolattan sadece 109 nolu izolat, beklenildiği gibi 578 bp’de bant vermiştir. Bu izolat *F. verticillioides* olarak, hem burada hem de *F. proliferatum* testlemesinde negatif sonuç veren 18, 19, 22-1, 88, 101, 119 nolu izolatlar ise *Fusarium* spp. olarak kaydedilmişlerdir.



Şekil 4.10. *Fusarium acuminatum* için yapılan PCR ile teşhis sonuçları

Morfolojik olarak *F. acuminatum* olarak teşhis edilen 38, 77, 78, 105, 108, 125, 127 ve 138 nolu örneklerle ait DNA kullanılarak, bu türe özel primerler yardımıyla yapılan PCR analizlerinde, testlenen tüm izolatlar beklenildiği gibi 602 bp civarında bant vermiş ve bu örnekler *F. acuminatum* olarak kaydedilmişlerdir.

Yine izolatlardan 62 ve 117 nolu izolatlar *F. culmorum* primerleri ile testlemeye alınmış ve her iki izolat da beklenildiği gibi 570 bp seviyesinde bant vermiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. *Fusarium culmorum* için yapılan PCR sonuçları.

Enzim kesim işlemi sonrası ve mikroskopik teşhislerin ardından izolatin ait olduğu türe dair herhangi bir çıkarım yapılamayan izolatlardan yaklaşık 40 adedi sekans analizleri yoluyla tür düzeyinde teşhis edilmişlerdir. Sekans analizi sonucu tür teşhisi yapılan izolatlara ait bilgiler Çizelge 4.2’de verilmektedir.

Çizelge 4.2. Sekans analizleri sonucunda teşhisi yapılan izolatlara ait bilgiler.

İzolat Kodu	Tür	Eşleşme Oranı (%)	İzolat Kodu	Tür	Eşleşme Oranı (%)
42	<i>F. tricinctum</i>	99	45-2	<i>F. proliferatum</i>	100
44	<i>F. tricinctum</i>	100	70-2	<i>F. oxysporum</i>	99
45	<i>F. proliferatum</i>	100	75	<i>F. cerealis</i>	99
47	<i>F. tricinctum</i>	99	79-1	<i>F. culmorum</i>	99
51	<i>F. tricinctum</i>	99	27	<i>F. culmorum</i>	99
52	<i>F. tricinctum</i>	100	91	<i>F. tricinctum</i>	100
55	<i>F. avenaceum</i>	99	10	<i>F. tricinctum</i>	100
58-1	<i>F. tricinctum</i>	100	55-1	<i>F. tricinctum</i>	100
58	<i>F. tricinctum</i>	100	90	<i>F. tricinctum</i>	100
71	<i>F. tricinctum</i>	99	53-1	<i>F. tricinctum</i>	99
73	<i>F. tricinctum</i>	100	89	<i>F. avenaceum</i>	99
82	<i>F. equiseti</i>	99	52-1	<i>F. tricinctum</i>	100
123	<i>F. tricinctum</i>	100	97	<i>F. tricinctum</i>	100
3	<i>F. tricinctum</i>	96	104	<i>F. redolens</i>	100
43	<i>F. tricinctum</i>	100	98	<i>F. oxysporum</i>	100
107	<i>F. proliferatum</i>	100	25	<i>F. oxysporum</i>	100
121	<i>F. avenaceum</i>	99	12	<i>F. verticillioides</i>	100
135	<i>Fusarium değil</i>	-	48	<i>F. chlamydosporum</i>	99
30	<i>F. tricinctum</i>	100	45-1	<i>F. proliferatum</i>	99
33-1	<i>F. equiseti</i>	99	115	<i>F. oxysporum</i>	100
35	<i>F. tricinctum</i>	99	132	<i>F. avenaceum</i>	99

Bu aşamaya kadar elde edilen bulgular kapsamında, izole edilen ve hem moleküler hem de mikroskopik teşhis metotları kullanılarak tür teşhisleri tamamlanan izolatların iller ve türler düzeyinde dağılımları Çizelge 4.3’te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Çalışmada belirlenen *Fusarium* türleri ve dağılımları.

İller		Diyarbakır		Şanlıurfa		Mardin		Adıyaman		Toplam	%
Türler	Teşhis Metodu	Mol*	Mik**	Mol	Mik	Mol	Mik	Mol	Mik		
<i>F. culmorum</i>		2		1				2	1	6	4.1
<i>F. pseudograminearum</i>			4		6		2		1	13	9.0
<i>F. crookwellence</i>				1	1					2	1.3
<i>F. tricinctum</i>		4		9		4		4		21	14.6
<i>F. equiseti</i>		1		1						2	1.3
<i>F. semitectum</i>		4		6				4		14	9.7
<i>F. proliferatum</i>		3	1	10		4		2	5	25	17.4
<i>M. nivale</i>			4						3	7	4.8
<i>F. acuminatum</i>			3		2		1		2	8	5.5
<i>F. subglutinans</i>			1							1	0.6
<i>F. oxysporum</i>		1	2		2	1	2	3	2	13	9.0
<i>F. verticilloides</i>		1				1				1	0.6
<i>F. chlamydosporum</i>				1						1	0.6
<i>F. avenaceum</i>		1	1	2				1		5	3.4
<i>F. redolens</i>					2	1			1	3	2.0
<i>F. inflexum</i>					1					1	0.6
<i>F. concolor</i>					1					1	0.6
<i>F. heterosporoides</i>			3							3	2.0
<i>F. dimerum</i>					1		2			3	2.0
<i>Fusarium</i> spp.		3		5		1		4		13	9.0
Toplam										143	≈100

*Moleküler teşhis; **Mikroskopik teşhis

Klasik ve moleküler tekniklerle yapılan çalışmalar sonunda çalışma alanına giren 4 ilde 2009 ve 2010 yıllarında, buğday üretim alanlarından toplanan 143 adet izolatın tür teşhisleri tamamlanmıştır. Teşhis edilen 143 izolatın 130 adedinin, 19 farklı türe ait olduğu belirlenmiştir. Cins düzeyinde ise 13 izolat *Fusarium* spp. olarak tanımlanabilmiştir. Yapılan moleküler analizler ile toplanan izolatların *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. acuminatum*, *F. verticillioide*s, *F. chlamydosporum* ve *F. tricinctum* türlerine ait tür teşhisleri moleküler yöntemler ile yapılırken; *F. pseudograminearum*, *F.*

crookwellence, *M. nivale*, *F. subglutinans*, *F. avenaceum*, *F. redolens*, *F. inflexum*, *F. concolor*, *F. heterosporoides*, *F. dimerum* teşhisleri ise mikroskopik olarak Prof.Dr. Berna TUNALI tarafından yapılmıştır.

Belirlenen türlerin ülkemizde ve dünyada daha önce buğday alanlarında buğday mikroflorasından izole edilen türlerle önemli oranda örtüştüğü görülmektedir (Hüseyin Aktaş ve diğ., 2000; H Aktaş ve diğ., 1996; Araz ve diğ., 2010; Arıcı ve diğ., 2013; Aydan ve diğ., 2009; Kınacı, 1984; Nirenberg, 1981; Özer ve Soran, 1991; Soran ve Damgaci, 1980; Tunali ve diğ., 2006a; Tunali ve diğ., 2006b; Uçkun ve Yıldız, 2004; Yılmazdemir, 1976). Bu türler içerisinde *F. tricinctum* için bölgede buğday alanlarında daha önce bir kayda rastlanmamıştır. Türkiye’de de Uçkun ve Yıldız (2004) tarafından Ege Bölgesi hububat alanlarından izole edilerek tanımlanmıştır. Bu tez kapsamında etmenin moleküler olarak ilk kez tespiti yapılmış ve izolasyon sıklığı %13 gibi önemli bir oran olarak belirlenmiştir. Uçkun ve Yıldız yaptıkları bu çalışmada bu etmeni %6-52 oranlarında hastalandırma yeteneği gösteren türler içerisinde tanımlamışlar ve zayıf patojen olarak değerlendirmişlerdir. Bu etmenin *F. avenaceum*/*F. acuminatum*/ *F. tricinctum* tür kompleksinin bir parçası olarak bulunduğu ve mikroskopik ayrımlarının çok zor olduğu bilinmektedir. Bu üç türün bu çalışmada tanımlanan türler içindeki oranı yaklaşık %24’tür. Kök çürüklüğü patojeni olarak çok önemli olmasa da ürettiği anniatin ve moniliformin gibi mikotoksinlerle Avrupa’da Fusarium başak yanıklığı hastalık kompleksinin bir üyesi olduğu bilinen (Kulik, 2008) bu türün GAB’inde GAP projesinin sulama ile kısmının tamamen hayata geçmesi durumunda, iklimin başak yanıklığı için uygun hale gelmesiyle önemli olabileceği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında, *F. acuminatum* örnekleri PCR ile analiz edilebilirken, *F. avenaceum* ve *F. tricinctum* teşhisleri sekans analizleri ile yapılmıştır. Yeni Zellanda’da yapılan bir çalışmada β -tubulin (β TUB), translation elongation factor 1 α (EF1 α) genlerine ait sekans verileri kullanılarak her üç tür birbirinden ayırt edilebilirken, mitokondrial SSU genine ait diziler türleri ayırt etmede yeterli olmamıştır (Harrow ve diğ., 2010). Kulik (2008) tarafından yapılan bir çalışmada rDNA’nın IGS bölgesinden dizayn edilen primer kullanılarak yapılan deneyde *F. acuminatum* ve *F. nuragi* ile *F. tricinctum*’u ayırmanın mümkün olmadığını belirtilmiştir.

Belirlenen türlerden yaklaşık %13’ünün, buğdayda önemli kök boğazı çürüklüğü patojenleri olan *F. pseudograminearum* (ya da *F. graminearum*) ve *F. culmorum* olduğu görülmektedir. Daha önce bölgede Tunali ve diğ., (2008)

tarafından yapılan bir çalışmada bu patojenlerin oranının %23'lere ulaştığı görülmektedir. Bu oransal düşüşün her iki çalışmada kullanılan örnek sayıları ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. İlgili çalışma yaklaşık 60 örnek üzerinde yürütülmüştür. Bu çalışma ise iki yılda toplanan yaklaşık 400 örnekten elde edilen izolatlar üzerinden değerlendirilmiştir. İki çalışma arasındaki en büyük fark Tunalı ve diğ., (2008) tarafından yapılan çalışmada baskın tür *F. culmorum* iken, bu çalışmada *F. pseudograminearum* olmasıdır. Son yıllarda bölgede sulanan alanlardaki artışla sıcaklık ve nemde meydana gelen değişiklikler de bunda etkili olabilir. Nitekim yapılan bazı çalışmalar bu iki türün farklı iklim isteklerini ortaya koymuştur (Poole ve diğ., 2013). Amerika'da yapılan bu çalışmaya göre *F. pseudograminearum* düşük rakımlı, düşük nemli ve daha sıcak alanlarda görülürken, *F. culmorum* yüksek rakımlı, orta ve yüksek derecede nemli, daha soğuk alanlarda görülmektedir. Yine aynı çalışmada türlerin dağılımının yıllara göre de farklılık gösterdiği belirtilmiş ve bu patojenlerin kısa süreli iklimsel değişikliklere tepki vererek yoğunluklarında yıllık değişimlerin olabileceği ifade edilmiştir.

Tespit edilen türler içerisinde önemli sayılabilecek türlerden biri *M. nivale*'dir. Bu tür daha çok soğuk sezonlarda ve erken dönemde kışlık ekilen çeşitlerde "kar küfü" denilen bir belirtiyeye neden olmaktadır (Cockerell ve diğ., 1997; D. W. Parry ve diğ., 1995; Smiley ve Patterson, 1996). Etmen Diyarbakır ve Adıyaman'da bulunabilmiştir. İklimlerinin Şanlıurfa ve Mardin'e oranla daha soğuk olduğu bu illerde bulunmuş olması, etmenin bilinen iklim istekleri ile de örtüşmektedir. Bu patojenin Ülkemizde daha çok Doğu Anadolu Bölgesi'nde zaman zaman sorunlara neden olduğu bilinmektedir (Demirci ve Dane, 2003). Eken ve diğ., (2014) tarafından, Erzurum'da, farklı gübre kaynakları ve ekim sıklığının organik buğdayda kök ve kök boğazı patojenlerine etkisini ortaya koymak için yapılan bir çalışmada Doğu 88 ve Kırık buğday çeşitlerinin kök bölgesinden farklı zamanlarda ve farklı besi yerleri kullanılarak fungal florayı belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmada *M. nivale* izolasyon sıklığının %18'lere ulaştığı belirtilmektedir. Araştırmacılar ayrıca çıkış sonrası etmeni izole edemediklerini fakat kış sonrası yapılan izolasyonlardan etmenin izolasyonunun gerçekleştirilebildiğini ifade etmektedirler. Araştırmacılar bu etmenin bu bölge dışında rapor edilmediğini ifade etmişlerdir. Yine aynı ilde Demirci ve Dane (Demirci ve Dane, 2003) tarafından yapılan bir çalışmada, *M. nivale* Türkiye için ilk kez kayıt edilmiş ve bu etmenin izolasyon sıklığının %15'lere ulaştığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise etmenin Güneydoğu Anadolu

Bölgesi’nde de izole edildiği kayıt altına alınmış ve izolasyon sıklığı yaklaşık %5 olarak bulunmuştur. Etmenin buğdayın iki ay kadar kar örtüsü altında kalan alanlarda daha fazla görüldüğü ve izole edilebildiği bilinmektedir (Ergon ve diğ., 2003).

İzolasyonlardan sonra tür teşhisleri yapılan *F. proliferatum*, *F. acuminatum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*’nin buğday mikroflorasının doğal üyeleri olduğu ve bunlardan bazılarının buğdayda zayıf da olsa patojenisite gösterebildikleri bazı çalışmalarda ortaya konulmuştur (Aktas ve diğ., 1997; H Aktaş ve diğ., 1996; Bentley ve diğ., 2006; Demirci ve Dane, 2003; Tunalı ve diğ., 2006a). Diğer türlerin ise toprak florasının doğal üyeleri oldukları düşünülmektedir.

Sürvey yapılan alanlar içerisinde önemli bir buğday ekim alanına sahip olan Diyarbakır ilinde önümüzdeki yıllarda, Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) kapsamında önemli miktarda tarım alanının sulamaya açılacak olmasının, bu ildeki buğday üretim alanlarında *Fusarium* florası üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Sulanan alanların artması ile birlikte bu alanlardaki ürün deseninin değişeceğini ve buna bağlı olarak yeni gelecek kültür bitkilerine özelleşmiş mikroorganizmaların topraktaki yoğunluğunun değişmesiyle, buğdayla ilişkili *Fusarium* türleri için daha rekabetçi bir ortam oluşacaktır. Nispeten monokültür gibi görünen bu üretim deseninin sulama imkanlarının gelişmesi ile birlikte değişmesiyle, buğdayda sorun olan *Fusarium* türlerinde bir azalma beklenmesi öngörülebilir.

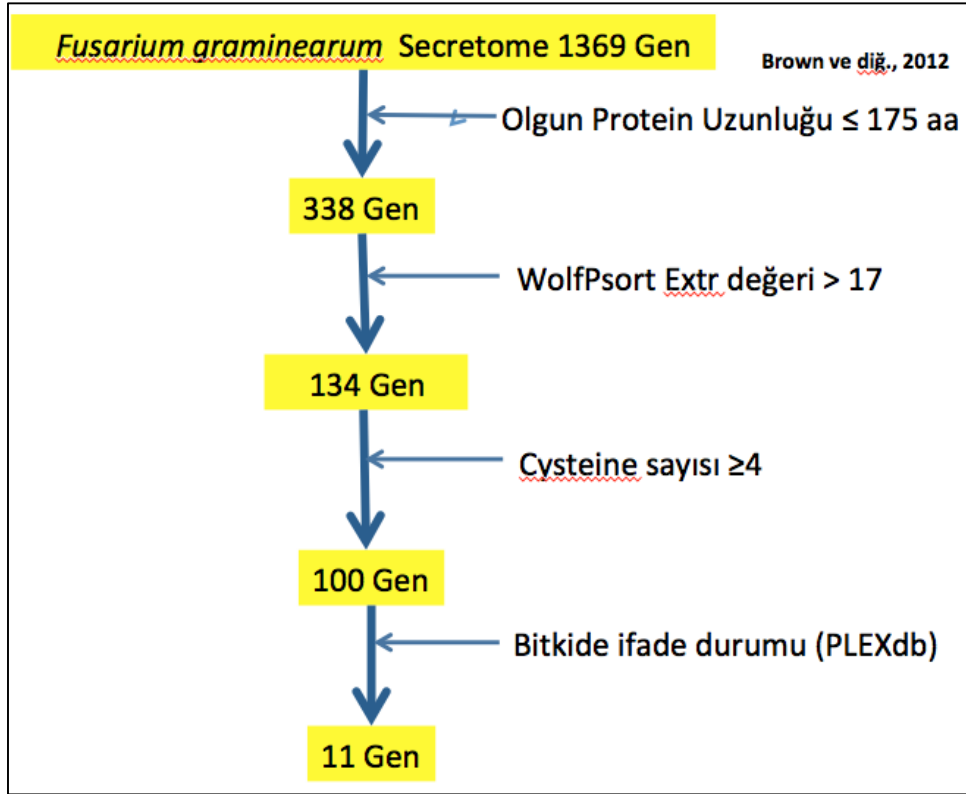
4.2. Small Secreted Protein (SSP) Genlerinin Moleküler Karakterizasyonu

4.2.1. Karakterizasyon için belirlenen *F. graminearum* SSP genleri

SSP'leri belirlemek için yapılan ilk çalışmada *F. graminearum* Secretome verileri üzerine metot kısmında bahsedilen kriterler uygulanarak 11 gen belirlenmiştir. Microsoft Office Excell programı yardımıyla yapılan ilk filtreleme sonucu olgun protein uzunluğu 175* amino asite eşit ve bu sayıdan küçük olan 338 gen belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra hücre arasına salınma değeri (WolfPsort) 17'den büyük olan genler belirlenmiş ve bu amaçla yapılan filtreleme 134 gen vermiştir. Daha sonra bu kapsamdaki genlerden 4 ve daha fazla Cysteine ihtiva eden genler filtrelenmiş ve bu çalışma sonucu 100 genin istenilen özellikte olduğu anlaşılmıştır. Son olarak bu 100 gen içerisinde PLEXdb verilerinden arpada yapılmış çalışmalarda, *F. graminearum*'un arpa başağını enfeksiyonu süresince aktif olan genlerine ait veriler kullanılarak, bu süreçte rol aldığı belirlenen 11 SSP belirlenmiştir (Şekil 4.12).

Seçilen bu ilk grup gen içerisinde yer alamayan 231 aa uzunluğundaki FGSG_11046 geni, FGSG_11047 ile genom üzerinde 3. kromozom üzerinde ard arda gelmektedirler. Bu iki genin aynı biyolojik aktivitede rol alabileceği düşünülerek çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca yüksek Cysteine içerikleri nedeniyle FGSG_09403, FGSG_01179, FGSG_12300 genleri seçilmiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, *Magnaporthe grisea*'da MC69 kodlu genin bu patojenin virülensliği ile doğrudan ilişkili olduğu belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada bu genin *F. graminearum*'da bir homologunun bulunduğu (FGSG_08493 geni) yapılan blast analizleri ile ortaya konulmuştur (Saitoh ve diğ., 2012). Bu nedenle bu genin *F. graminearum*'daki durumunu görmek amacıyla ilgili gen projeye dâhil edilmiştir.

*Not: 175 aa sayısı, bu çalışmanın kapsamı dışında yapılan Virüs Over-Expression (VOX) çalışmalarında virüsün üç parçalı (α , β ve γ) genomundan bir parçası olan γ genomu içerisinde, klonlama yapılabilecek alanın kapasitesini ifade etmektedir ve daha büyük DNA parçaları bu alana klonlanamamaktadır.



Şekil 4.12. *Fusarium graminearum* secretome verileri üzerinde yapılan analizlerin özetini gösteren diagram.

F. graminearum secretome verileri üzerinde yapılan filtreleme çalışmaları sonucu elde edilen 11 gen, daha sonra eklenen 5 gene ait detaylı bilgiler Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Filtreleme çalışmaları sonucu elde edilen genlere ait bilgiler.

	Gen ID	Olgun Protein Uzunluğu	Cystein aa. sayısı	Varsayılan fonksiyonu
1	FGSG_09066	64	8	<i>F. graminearum</i> PH-1 hypothetical protein
2	FGSG_11047	91	8	<i>F. graminearum</i> PH-1 hypothetical protein
3	FGSG_05046	112	8	<i>F. graminearum</i> PH-1 hypothetical protein
4	FGSG_10212	121	4	<i>F. graminearum</i> PH-1 SnodProt1 precursor
5	FGSG_11205	122	4	<i>F. graminearum</i> PH-1 SnodProt1 precursor
6	FGSG_08238	127	4	<i>F. graminearum</i> PH-1 hypothetical protein

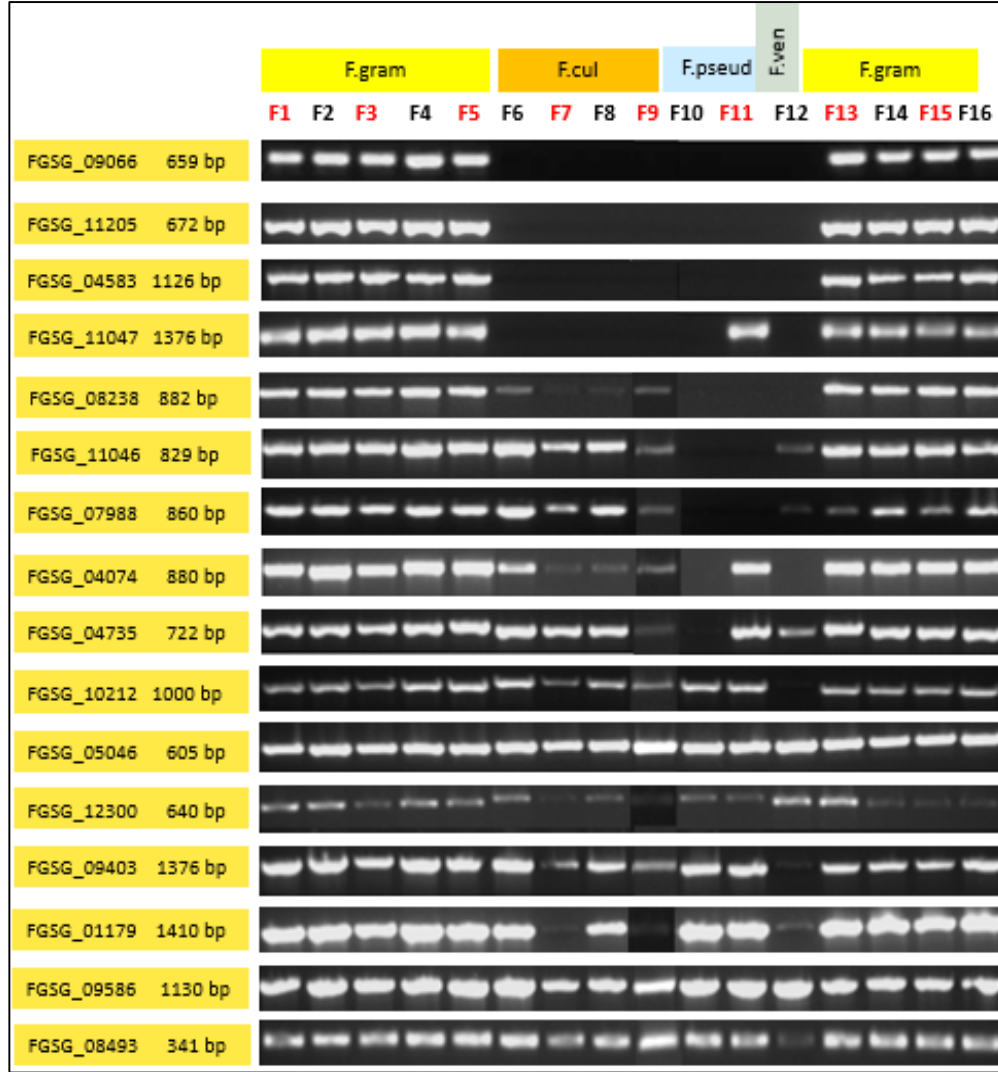
Çizelge 4.4 (Devam). Filtreleme çalışmaları sonucu elde edilen genlere ait bilgiler.

7	FGSG_04583	130	4	<i>F. graminearum</i> PH-1 hypothetical protein
8	FGSG_04735	134	6	<i>F. graminearum</i> PH-1 hypothetical protein
9	FGSG_07988	161	4	<i>F. graminearum</i> PH-1 hypothetical protein
10	FGSG_09586	161	4	<i>F. graminearum</i> PH-1 phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein precursor
11	FGSG_04074	171	6	<i>F. graminearum</i> PH-1 hypothetical protein
12	FGSG_12300	89	5	<i>F. graminearum</i> PH-1 hypothetical protein
13	FGSG_09403	185	12	<i>F. graminearum</i> PH-1 hypothetical protein
14	FGSG_01179	185	10	<i>F. graminearum</i> PH-1 hypothetical protein
15	FGSG_11046	211	4	<i>F. graminearum</i> PH-1 hypothetical protein
16	FGSG_08493	35	2	<i>F. graminearum</i> PH-1 hypothetical protein

Çizelge 4.4 incelendiğinde, belirlenen SSP genlerinin birçoğunun fonksiyonel görevleri için bugüne kadar yapılmış herhangi bir varsayımda bulunulmadığı ve bu genlerin “hypothetical protein” olarak isimlendirildiği görülmektedir. FGSG_10212 ve FGSG_11205 genlerinin ise “SnodProt1 Precursor” proteinlerini kodladıkları varsayılmaktadır. Bu proteinlerin özelliklerine ilgili genlerin varyasyon analizleri kısmında detaylı olarak değinilmiştir. Muhtemel protein fonksiyonu hakkında tahminde bulunulan bir diğer gen ise FGSG_09586 genidir. Bu genin de bir “phosphatidylinositol transfer protein precursor” proteinini kodladığı varsayılmaktadır.

4.2.2 SSP genlerinde belirlenen genetik varyasyonlar

Genetik varyasyonları ve fonksiyonları araştırılacak genler için metot kısmında belirtilen primer setleri kullanılarak PCR amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir. PCR sonuçları özet halinde Şekil 4.13’de verilmiştir.



Şekil 4.13. PCR çalışmaları sonucu elde edilen jel görüntüleri.

PCR analiz sonuçlarını özetleyen Şekil 4.13 dikkatlice incelendiğinde varyasyonu araştırılan genlerin 7 tanesinin (FGSG_10212, FGSG_05046, FGSG_12300, FGSG_09403, FGSG_01179, FGSG_09586 ve FGSG_08493) ülkemizde GAB'inden elde edilen Fc-TR1 de dahil olmak üzere çalışılan bütün strainlerde, kullandığımız primer setleri ile görülebildikleri anlaşılmıştır.

FGSG_04735 geni sadece, iki *F. pseudograminearum* straininden biri olan FpCS 3212 izolatında bulunamamıştır.

FGSG_04074 geni bu çalışmadaki primerler kullanılarak, 15 *Fusarium* izolatının 2'sinde bulunamamıştır. Bunlardan biri izolat setinde iki strain ile temsil edilen *F. pseudograminearum* straininden biri olan FpCS 3212 straini ve diğeri ise non-patojenik bir *Fusarium* türü olan *F. venenatum* izolatıdır.

FGSG_07988 ve FGSG_11046 genleri çalışmada kullanılan iki *F. pseudograminearum* izolatının dışındaki bütün izolatlarda tespit edilebilmiştir.

FGSG_08238 geni kullanılan iki *F. pseudograminearum* ve bir *F. venenatum* izolatında tespit edilememiştir.

FGSG_11047 geni sadece *F. graminearum*'a ait 9 izolatta ve çalışmamızda kullandığımız iki *F. pseudograminearum* izolatından biri olan FpCS 3096'da tespit edilmiştir.

Geriye kalan üç gen olan, FGSG_09066, FGSG_11205 ve FGSG_04583 kullandığımız primer setleri ile sadece *F. graminearum* izolatlarında belirlenebilmişlerdir.

Bazı genlerin çalıştığımız izolatların birkaçında tespit edilememesi tabii ki o genin ilgili izolatta kesinlikle bulunmadığı anlamına gelmemektedir. Çalışmada kullandığımız primerler ilgili genlerin upstream ve downstream nükleotid dizileri kullanılarak dizayn edilmişlerdir. Bu bölgeler de herhangi bir proteini kodlamadıklarından mutasyona açık bölgelerdir. PCR tekniği çok hassas çalışmaktadır ve primerlerin genom üzerindeki yapışma bölgelerinde meydana gelmiş olabilecek küçük mutasyonlar bile, primerlerin yapışmasını engelleyip, PCR işlemi sonunda herhangi bir amplifikasyon ürünü elde edilememesine, dolayısıyla böyle bir durumun ortaya çıkmasına neden olabilir. Gen içerisinden dizayn edilecek primerlerle yapılacak taramalar daha kesin bir şekilde çalışılan genin o organizmadaki varlığı ile ilgili bilgiler sunabilir.

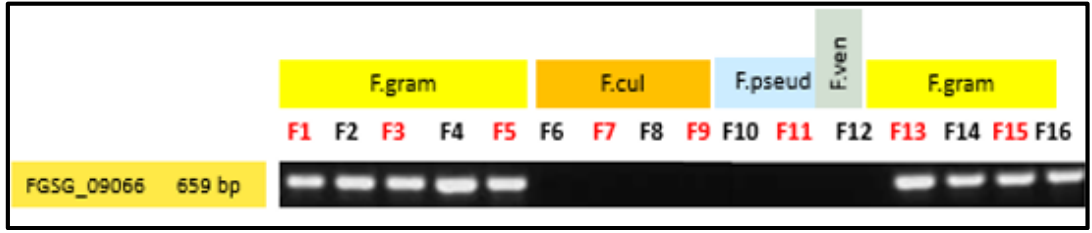
4.2.3 SSP genlerinin sekans analizleri temelinde elde edilen bulgular

Metot kısmında detayları verildiği şekilde hazırlanan örnekler Almanya'daki Eurofins MWG firmasına gönderilmiş ve firmadan gelen sekans sonuçları Geneious genetik analiz programı yardımıyla analiz edilmiştir. Bu kısımda her gen için yapılan analizler ayrı ayrı verilmiştir. FGSG_12300, FGSG_09403 ve FGSG_01179 genleri için birkaç kez tekrarlanmasına rağmen sağlıklı sekans verileri elde edilemediği için, bu genlerle ilgili herhangi bir analiz gerçekleştirilememiştir.

4.2.3.1 FGSG_09066 (*Fusarium graminearum* korunmuş hipotetik protein)

FGSG_09066 geni BROAD verilerine göre 584 nt uzunluğunda olup 83 aa'lık bir proteini kodlamaktadır (http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/FGDB/singleGeneReport.html?entry=FGSG_09066; 28.09.2012). Bu 83 aa'lık proteinin ilk 19 aa'lık kısmı proteinin hücre arasına taşınmasını sağlayan sinyal peptid dizileridir ve bu kısım proteinden uzaklaştırıldığında olgun protein 64 aa'ten oluşmaktadır. Protein 8 adet Cys aa'i içermektedir ve bu da olgun proteinin %12.5'ini ifade

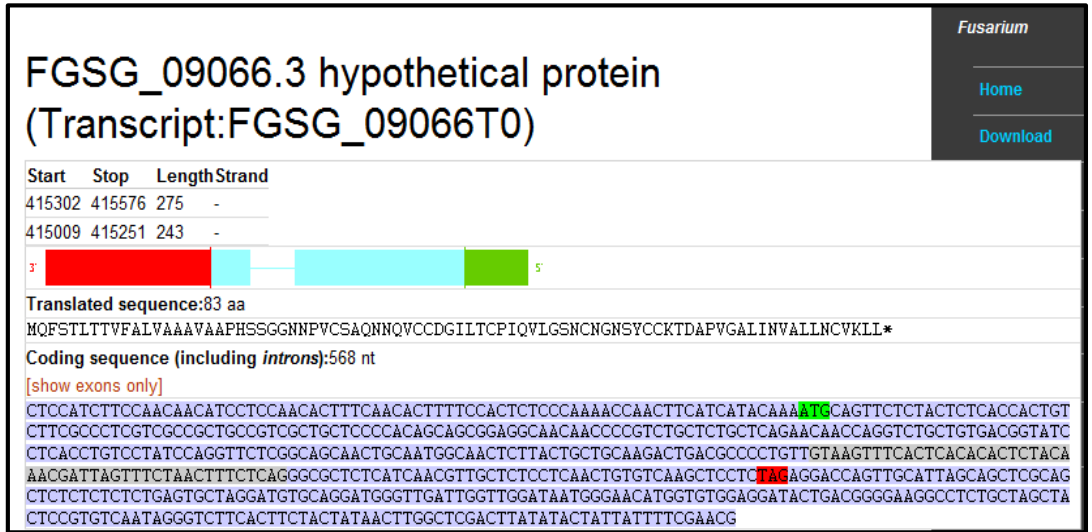
etmektedir (Brown ve diğ., 2012). Çalışmamızda sadece *F. graminearum* 'a ait olan 9 adet fungal strainde 659 bp'lık bir PCR ürünü ile tespit edilebilmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. FGSG_09066 genine ait jel görüntüsü.

Yukarıda görüldüğü üzere elde edilen PCR ürünleri metot kısmında detayları anlatıldığı şekilde temizlenmiş ve sekans analizleri için ilgili firmaya gönderilmiştir.

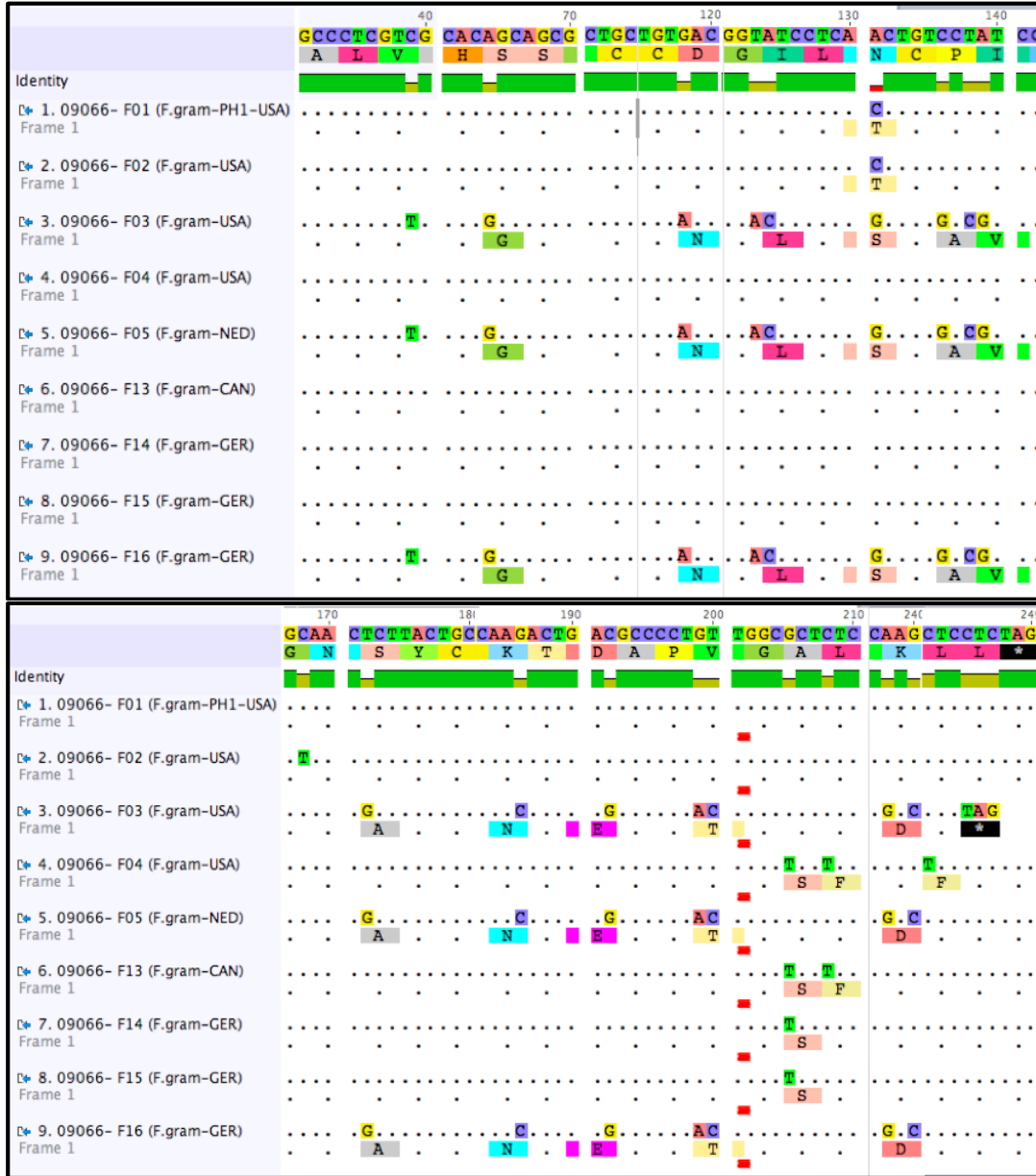
Firmadan gelen sekans sonuçları kullanılarak öncelikle ilgili gen için elde edilen iki DNA ipliğine ait diziler align (çakıştırma) edilmiştir. Ardından BROAD Enstitüsü verileri kullanılarak genin başlangıç ve bitiş sıraları temelinde konsensus dizisi belirlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. FGSG_09066 genine ait BROAD web sitesinde yer alan bilgilerden bir görüntü http://mips.helmholtzmuenden.de/genre/proj/FGDB/ingleGeneReport.html?entry=FGSG_09066; 28.09.2012).

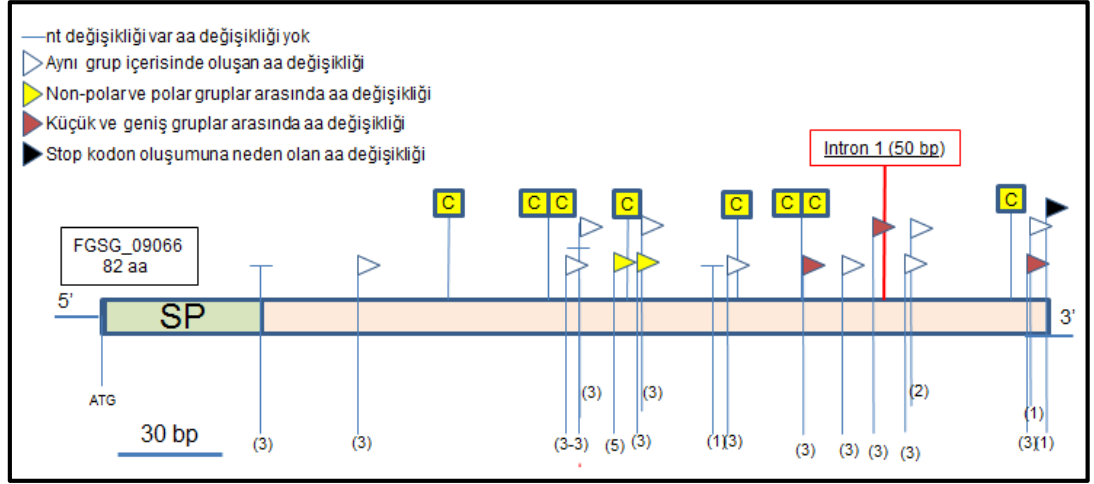
Yapılan bir dizi işlemle genin upstream ve downstream bölgelerinde yer alan nükleotidler uzaklaştırılarak veri kaydedilmiştir. BROAD verilerine göre belirlenen, gen üzerinde 202 ve 203'üncü nükleotidler arasındaki 50 nt uzunluğundaki intron bölgesinin silinmesi suretiyle genin ORF bölgesi elde edilmiş ve oluşturulan dosyaya kaydedilmiştir. Sekans analizi yapılan 9 *F. graminearum* izolatu için de aynı işlem tekrarlanmıştır.

Protein kodlayan ORF bölgesi içerisine giren mutasyonları görmek için ORF dizileri kullanılarak alignment işlemi yapılmıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. FGSG_09066 genine ait Geneious programında oluşturulan alignment görüntüsü.

Alignment sonuçlarını daha basit bir şekilde ifade etmek ve yorumlayabilmek için Microsoft PowerPoint programı kullanılarak izolatlar arasındaki allelik varyasyonları gösteren bir grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.17).



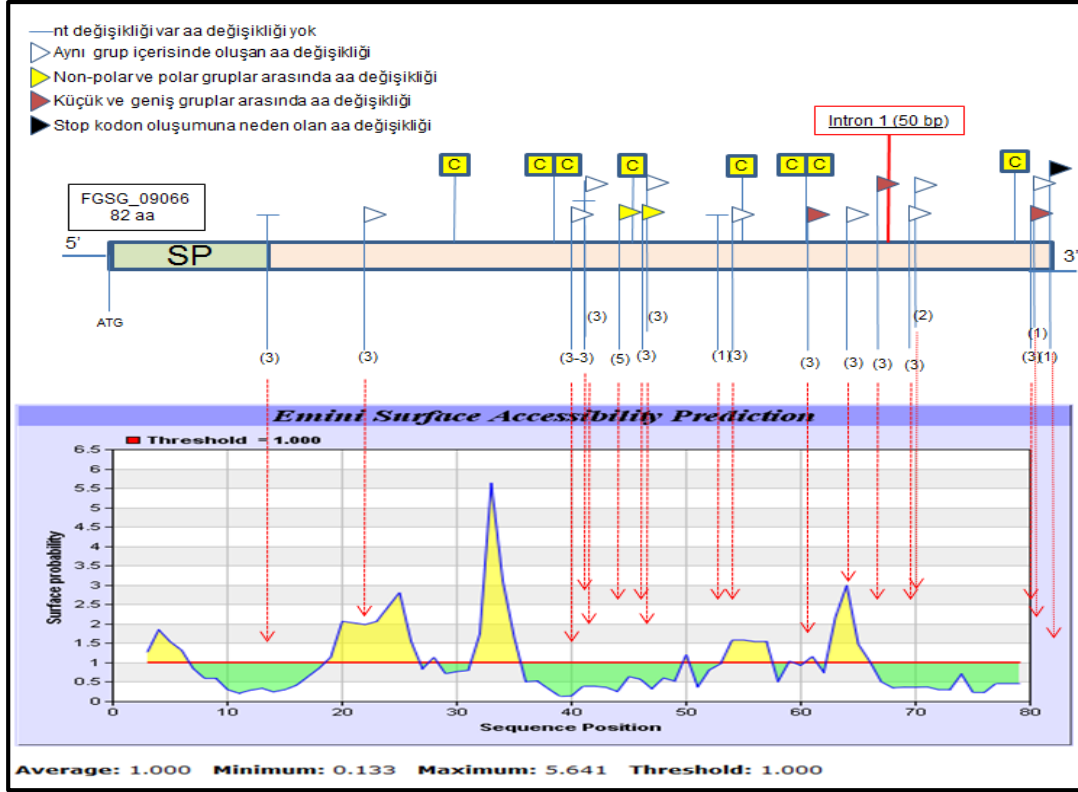
Şekil 4.17. FGSG_09066 genine ait allelik varyasyonlar. “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.

Her iki şekil (Şekil 4.16 ve 4.17) birlikte incelendiğinde genel anlamda gen üzerindeki mutasyonların bazı aa değişikliklerine yol açtığı söylenebilmektedir. Bu değişikliklerden bazıları proteinde yapısal değişikliklere yol açabilecek mutasyonlardır. Örneğin 3, 5 ve 16 nolu *F. graminearum* izolatlarında, özellikle iki Cys aa’ının arka arkaya geldiği pozisyonun ardından 186. nükleotidde oluşan bir G→C nükleotid değişikliği ilgili izolatlarda large-polar aa grubuna giren K (Lysin) aa’ının, small-polar aa grubuna giren N (Asparagine) aa’ine dönüşmesine neden olmuştur. Yine aynı izolatlarda 199. ve 200. nükleotidler olan GT nükleotidlerinin AC nükleotidlerine dönüşmesiyle large non-polar grubu aa olan V (Valine) aa’i, small non-polar aa grubundan olan T (Threonine) aa’ine dönüşmüştür. Protein üzerindeki son Cys aa’nden sonra 238. nt’te meydana gelen A→G ve 240. nt’te meydana gelen G→C mutasyonu, large-polar grubuna dahil K (Lysin) aa’ının small-polar grubuna dahil D (Aspartic acid) aa’ine dönüşmesine neden olmuştur. F03 nolu izolatin ilgili geninin sonunda meydana gelen delesyonla proteinin son aa’leri olan iki L (Leucine) aa’inden birini kaybettiği ve bu strainde proteinin bir aa küçüldüğü görülmüştür.

Özetle FGSG_09066 geni üzerinde meydana gelen mutasyonlar F03, F05 ve F16 nolu izolatlarda önemli aa değişikliklerine neden olmuştur. Diğer izolatlarda da bazı aa değişikliklerine neden olan mutasyonlar olmasına rağmen bu değişikliklerin aynı grup içinde sınırlı kaldığı görülmektedir.

Gen üzerinde meydana gelen mutasyonların neden olduğu aa değişikliklerinin, proteinin yapısı üzerinde nasıl bir etkiye yol açmış olabileceğini görmek için, proteinlerin dış yüzeyinde kalarak, başka substratlarla etkileşimi girdikleri alanları

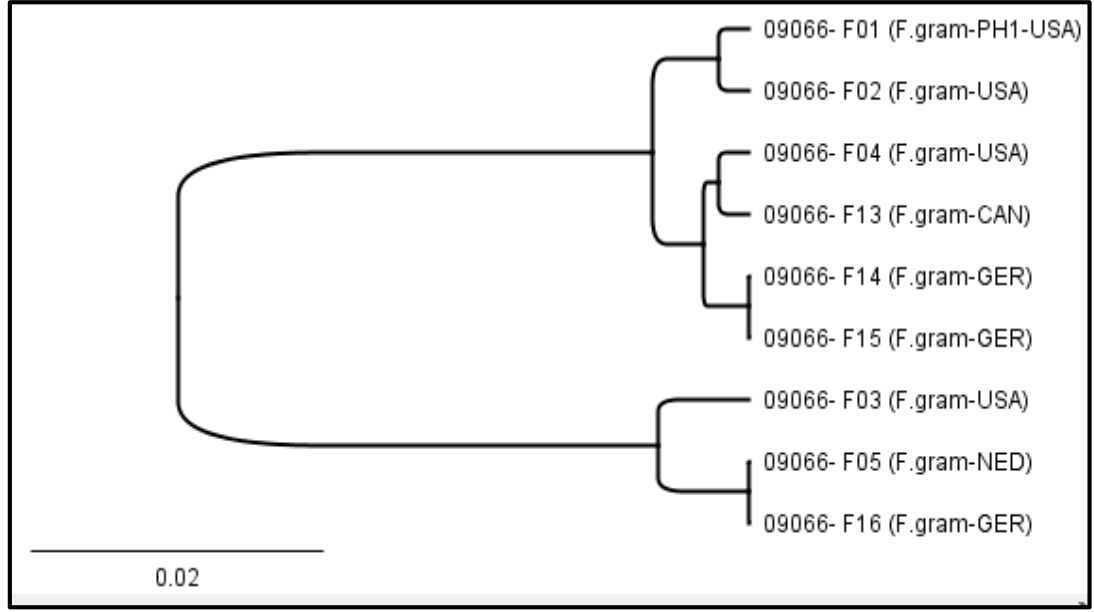
belirlemede kullanılan, Emini Surface Accessibility Prediction programından yararlanılmıştır (Emini ve diğ., 1985). İlgili gen için oluşturulan diagram Şekil 4.18’de verilmiştir.



Şekil 4.18. *Fusarium graminearum* izolatlarında FGSG_09066 geni üzerindeki mutasyonların ve bunların protein ürününe olası etkilerinin karşılaştırılması

Şekil 4.18 incelendiğinde FGSG_09066 geni ürünü olan protein üzerinde meydana gelen mutasyonların çoğunun, proteinin diğer substratlarla etkileşime giren dış yüzeyinde değil, daha çok proteinin iç kısımlarında meydana geldiği tahmin edilmektedir. Fakat F03, F04 ve F16 nolu *F. graminearum* strainlerinde, proteinin 22. ve 64. aa’lerinde meydana gelen değişiklikler proteinin üç boyutlu yapısı düşünüldüğünde, yüzey kısmında oluşmuş olabilecek mutasyonlardır ve bu anlamda önemli olabilecekleri düşünülmektedir.

Nükleotid alignment (çakıştırma) analiz sonuçları temelinde oluşturulan soyağacı Şekil 4.19’de verilmiştir.



Şekil 4.19. FGSG_09066 geni için nükleotid alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.

Şekil 4.19 incelendiğinde, yine F03, F05 ve F16 izolatlarının içerdikleri mutasyonlar nedeniyle diğer izolatlardan ayrılarak soyağacında ayrı bir anadal oluşturdukları gözlemlenmiştir. Oluşan grupların, izolatların coğrafik kökeninden bağımsız oldukları görülmektedir. Bu durum, ilgili mutasyonların çok eski bir zaman öncesinde, belli bir popülasyon içerisinde olduğu ve yayılmadan sonra, bu popülasyonun bireylerinde korunduğu şeklinde yorumlanabilir.

Bu genin başka organizmalarda homologlarının bulunup bulunmadığını belirlemek amacıyla yapılan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizleri, ilgili genin birkaç fungusta homologunun bulunduğunu ortaya koymuştur. FGSG_09066 geninin tarımsal açıdan oldukça önemli olan bazı *Fusarium* türlerinde (*F. culmorum*; *Nectria haematococca*; *Gibberella moniliformis*) homologlarının bulunduğu görülmektedir. Genin olası fonksiyonu ile ilgili *F. culmorum* ve *G. moniliformis* funguslarında, ilgili genin ürününün bir hydrophobin proteini olabileceğine dair bilgiler vardır. FGSG_09066 kodlu, *F. graminearum* geni tarafından kodlanan proteinin, 8 Cysteine (Cys) aa'i içermesi ve hücre dışına salınan proteinlerden olması (secreted) nedeniyle tipik (Linder ve diğ., 2005; Wösten, 2001) bir hydrophobin proteininin özelliklerini taşıdığını söylenebilir.

Wessels ve diğ., (1991)'ne göre hydrophobinler fungal alem için spesifik proteinlerdir. Mikroorganizmalar genellikle harici moleküler akıntı için bir elek görevi gören, harici saldırılardan mikroorganizmaları koruyan ve mikrobial

yayılmaya yardımcı olan bir protein tabaka ile kaplıdır. Bakterilerdeki “S-layer” proteinleri, aktinomiseteslerdeki “rod-like fibrillar layer” proteinleri ve funguslardaki “rodlet layer” proteinleri bu amaçlara hizmet ederler. Yine Wang ve diğ., (2005)’ne göre funguslar, maya formu ve filamentöz gelişim olmak üzere iki tür gelişim morfolojisine sahiptirler. Mayalar hidrofiliktirler ve bu nedenle hidrofobin proteinleri yoktur. Nemli koşullarda gelişen, filamentöz fungusların vejetatif hifleri de yüzeylerinde rodlet proteinleri içermezler. Fakat, bunun tam tersi olarak, aerial hifler ve aseksüel sporlar (konidi gibi), hidrofobinlerin varlığından dolayı hidrofobiktirler. Hidrofobinlerin bu özellikleri onların yüksek yüzey aktif madde (surfactant) özelliklerinden ileri gelir; hidrofobin katman, fungusların üzerinde geliştikleri ortamın ya da substratın yüzey gerilimini azaltır. Bu durum, fungusa bu alanda, gaz fazındaki değiş-tokuş için geçirgenliği muhafaza ederken, su girişini engelleme ya da su-hava arayüzünde bir çatlak oluşturmaları için izin verir. Latge ve diğ., (1988) filamentöz fungusların aerial yapıları üzerinde ürettikleri sporların dış yüzeyi, konidileri suya dayanıklı ve hidrofobik yapan, hidrofobin rodlet tabaka ile kaplı olduğunu belirtmişlerdir. Rodlet oluşturan hidrofobinlerin, bu tarz fungusların tam bir hayat döngülerini tamamlamaları için zorunlu olduklarını, birçok “akışkan” fungusta (örneğin *Conidiobolus obscurus*), rodlet tabakanın, konidilerin substrata tutunmalarını kolaylaştıran zamksı bir madde ile kaplı olduğunu ve tutunma birkez gerçekleştiğinde, hidrofobik rodlet tabakanın çevre şartlarına olan dayanıklılığı arttırmak için, bu zamksı tabakadan sıyrıldığını ve kendini gösterdiğini söylemişlerdir. Bu tabakanın sporların hava yoluyla yayılmalarını da kolaylaştırdığını belirtmişlerdir. De Grot ve diğ., (1996) yemeklik şapkalı mantarlardan biri olan, basidiomiset fungus *Agaricus bisporus*’un hidrofobin proteininin (HypA), fungusun şapka yapısının kabuk dokusunda bulunduğunu ve bu durumun meyve gelişimi süresince koruyucu bir tabaka olarak işlev gördüğünü bildirmişlerdir. Yine Kazmierczak ve diğ., (2005) kestane kanseri etmeni *Cryphonectria parasitica*’da sınıf II türü hidrofobin proteini olan cryparin geninin silinmesi ile elde edilen mutantların, enfekte ettiği ağaçların kabuk dokusunu patlatamadığını tespit etmişlerdir. (Kim ve diğ., 2005) Hidrofobin proteinlerinin ayrıca çeltik yanıklığı etmeni *M. grisea*’da enfeksiyon oluşumu sırasındaki gelişimi süresince yüzey interaksiyonlarında rol aldığını göstermişlerdir.

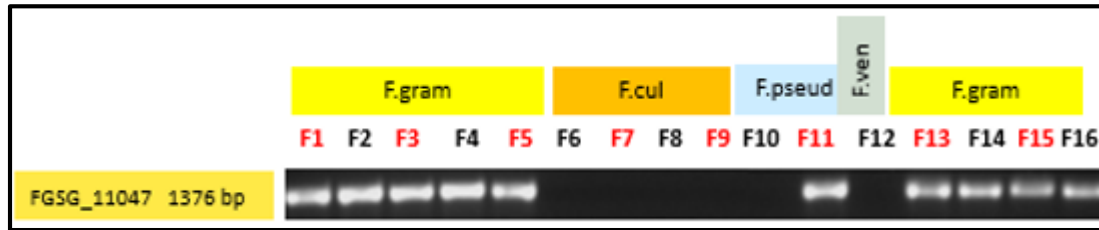
Yapılan çalışma, fungal âlem içerisinde önemli protein gruplarından biri olan hydrophobin grubu proteinlerin, bu önemli başak yanıklığı ve kök çürüklüğü

patojeninde de var olduğunu ortaya koymuştur. Sekans analizleri ile yapılan varyasyon analizleri bazı strainlerde proteinin yapısında önemli sayılabilecek değişikliklere yol açabilecek mutasyonlar saptamıştır. Ayrıca proteinin, fungusun başağı enfeksiyonu sırasında, henüz semptomların oluşmadığı bölgede (symptomless advancing front) yüksek oranda ifade edildiği (expression) bilinmektedir (Brown ve diğ., 2012). Fungal efektörlerin fungal enfeksiyonu gizleyip, bir şekilde bitkinin fungusu tanımasını engelleyerek, enfeksiyonun gelişmesine yardımcı olma ve “tür içinde dahi yüksek genetik varyasyon gösterme” gibi özellikleri birlikte düşünüldüğünde bu proteinin iyi bir efektör adayı olabileceği düşünülmektedir.

4.2.3.2 FGSG_11047 (*Fusarium graminearum* hipotetik protein)

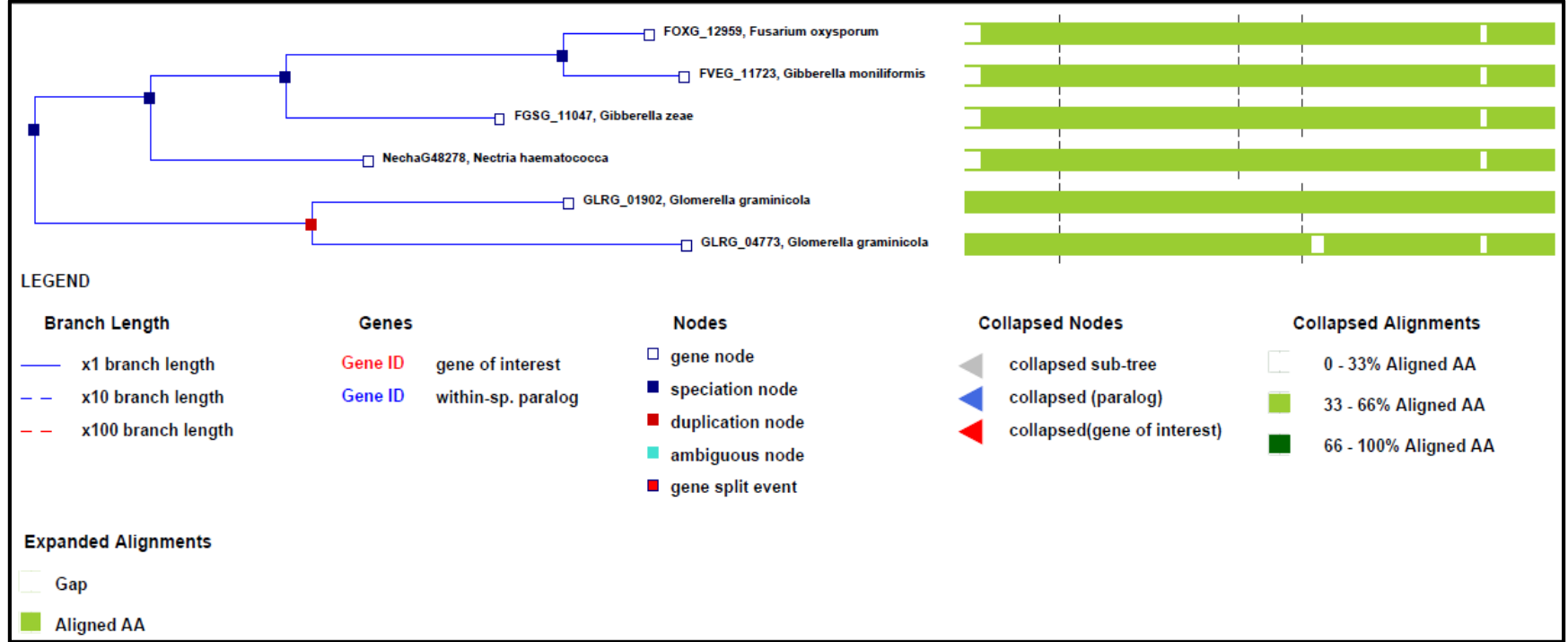
FGSG_11047 geni BROAD verilerine göre 479 nt uzunluğunda olup 108 aa'lık bir proteini kodlamaktadır (http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/FGDB/singleGeneReport.html?entry=FGSG_11047; 28.09.2012). Bu 108 aa'lık proteinin ilk 17 aa'lık kısmı proteinin hücre arasına taşınmasını sağlayan sinyal peptit dizileridir ve bu kısım proteinden uzaklaştırıldığında olgun protein 91 aa'ten oluşmaktadır. Protein 8 adet Cys aa'ı içermektedir ve bu da olgun proteinin %8.79'unu ifade etmektedir (Brown ve diğ., 2012).

Çalışmamızda kullandığımız primer dizileri yardımıyla testlenen 9 adet *F. graminearum* straininin tamamında 807 bp'lik bir band oluşturarak tespit edilebilmiştir. Bununla birlikte testlenen 3 *F. culmorum* izolatının hiçbirisinde bulunamamıştır. Testlenen iki *F. pseudograminearum* izolatından biri olan FpCS3096 (F11) izolatında tespit edilebilirken FpCS3212 (F10) izolatında tespit edilememiştir. Yine non-patojen *F. venenatum* (F12) izolatında da kullandığımız primerler ile herhangi bir PCR ürünü elde edilememiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. FGSG_11047 genine ait jel görüntüsü.

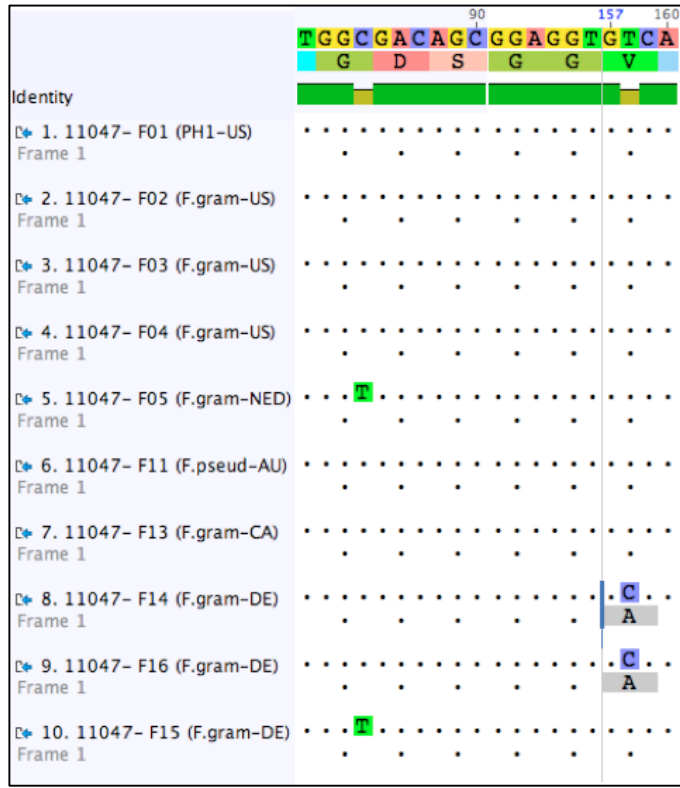
FGSG_11047 geninin sekanslanan diğer fungal genomlarda herhangi bir homologunun bulunup bulunmadığı, ilgili genin kodu kullanılarak www.fungi.ensemble.org sitesinden yapılan arama sayesinde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.21'de verilmektedir. İlgili şekil incelendiğinde bu genin *Glomerella graminicola*'da iki adet olmak üzere *Nectria haematococca*, *F. oxysporum* ve *Gibberella moniliformis*'te birer homologunun bulunduğu görülmektedir.



Şekil 4.21. FGSG_11047 geninin homoloji durumunu gösteren analiz (GeneTree EFGT00090000013698).

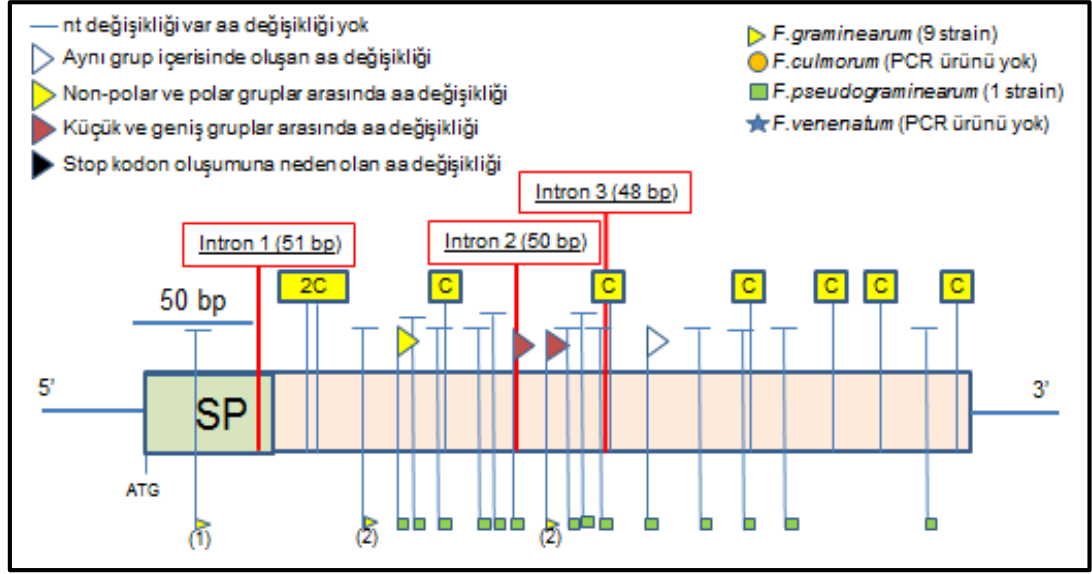
FGSG_09066 geni ile ilgili kısımda detayları verildiği şekilde elde edilen sekans verileri temelinde, FGSG_11047 genine ait BROAD Enstitüsü verileri kullanılarak, sekans dizileri üzerinden genin konsensus dizisi elde edilmiştir. Bu amaçla genin downstream ve upstream bölgesindeki nükleotid dizileri uzaklaştırılmıştır.

Yine gen içerisinde 44-45. nt'ler arasındaki 51 nt'lik; 147-148. nt'ler arasındaki 53 nt'lik ve 183-184. nt'ler arasındaki 48 nt'lik intron bölgeleri kesip çıkartılarak genin ORF bölgesi elde edilmiştir. Protein kodlayan ORF bölgesi içerisine giren mutasyonları görmek için ORF dizileri kullanılarak alignment işlemi yapılmıştır (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. FGSG_11047 genine ait Geneious programında oluşturulan alignment görüntüsü.

Alignment sonuçları incelendiğinde genin ORF bölgesinde bazı izolatlarda, bazı nükleotid mutasyonları olmasına rağmen, bunların büyük bir bölümünün herhangi bir amino asit değişikliğine yol açmadığı görülmektedir. Alignment sonuçlarını daha basit bir şekilde ifade etmek ve yorumlayabilmek için Microsoft PowerPoint programı kullanılarak izolatlar arasındaki allelik varyasyonları gösteren bir grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.23).

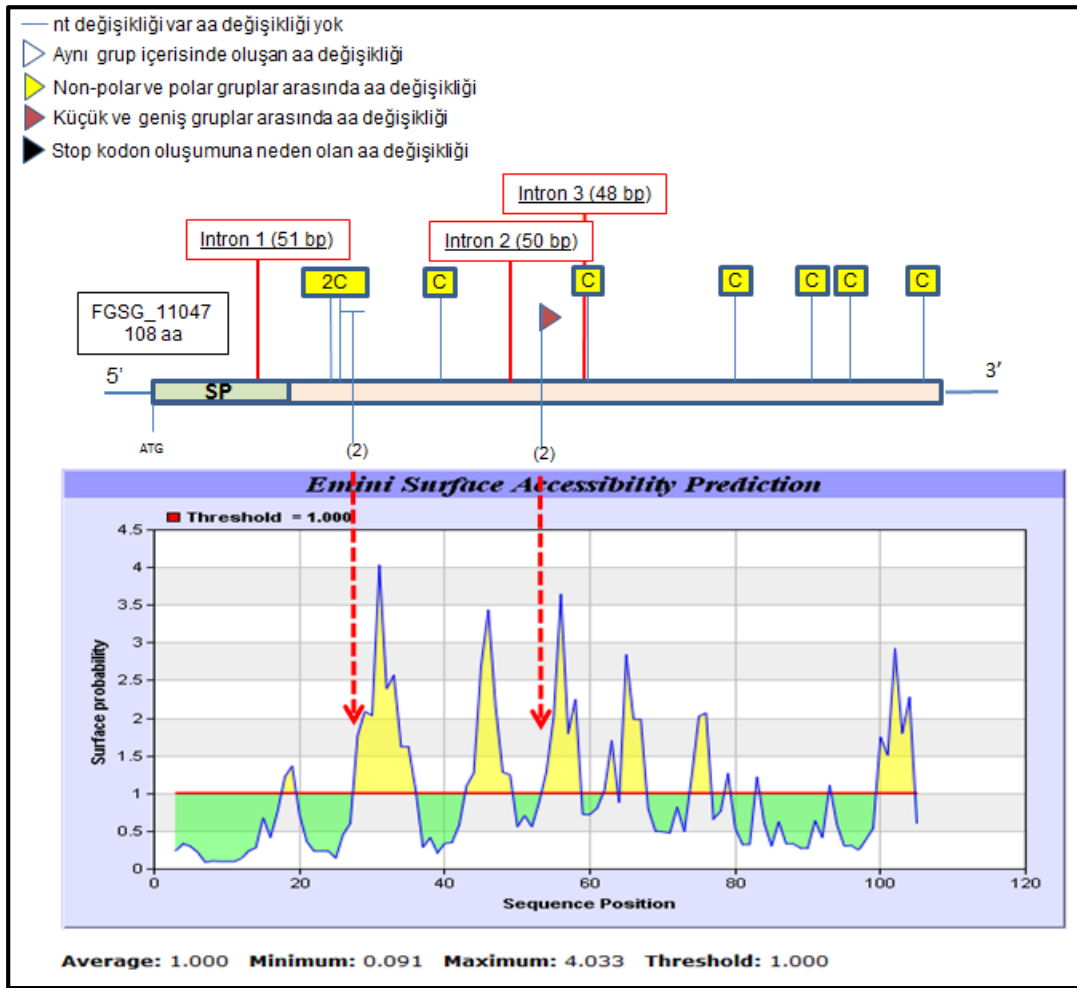


Şekil 4.23. FGSG_11047 genine ait allelik varyasyonlar. “SP” sinyal peptid dizisini, “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.

Şekil 4.23 incelendiğinde PCR işlemi sonunda, ilgili gene sahip olduğu belirlenen 9 adet *F. graminearum* ve 1 adet *F. pseudograminearum* izolatında, genin bazı noktalarında önemli aa değişikliklerine neden olan mutasyonlar olduğu görülmektedir. Örneğin çalışmamızda referans izolat olarak bulundurulan F01 (PH-1) straininde 33.aa pozisyonundaki large-polar grubundaki Y (Trozin) aa’i, FpCS3096 kodlu *F. pseudograminearum* straininde, large-nonpolar grubundaki F (Fenilalanin) aa’ine dönüşmüştür. Yine aynı strainde 49. aa, large-polar gruptaki K (Lisin) olması gerekirken, oluşan mutasyonla small-polar grubundaki Q (Glutamin) aa’ine dönüşmüştür.

F14 ve F16 nolu *F. graminearum* strainlerinin 54.aa’inde meydana gelen mutasyonla, referans izolatta large-nonpolar grubundan olan V (Valin) aa’i, small-non polar grubundan A (Alanin) aa.’ine dönüşmüştür.

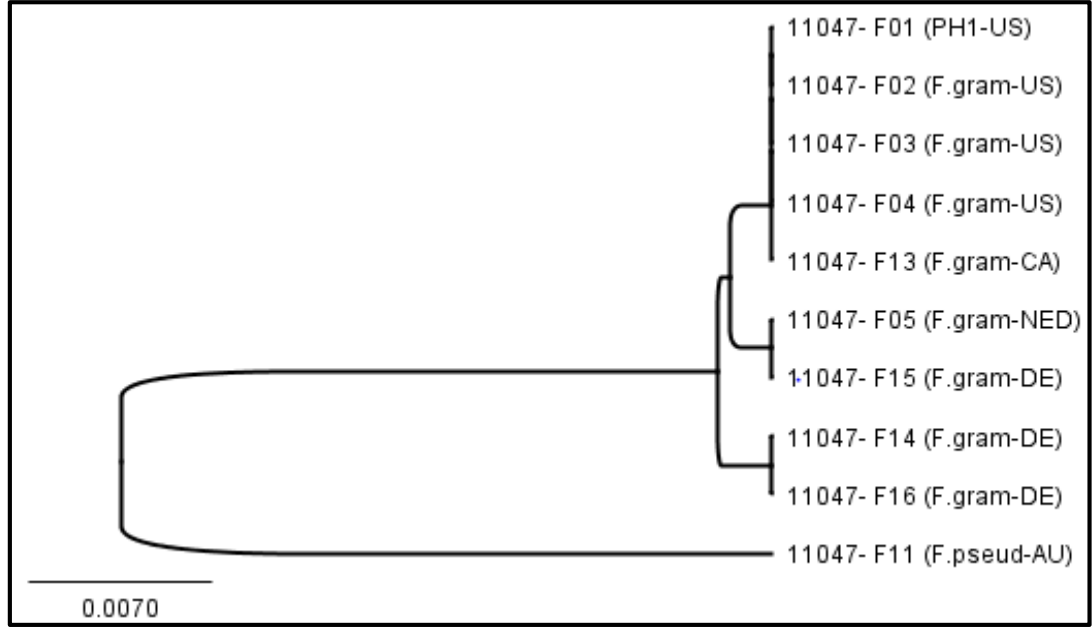
F. graminearum strainlerine ait FGSG_11047 geni üzerinde meydana gelen mutasyonların neden olduğu aa değişikliklerinin, proteinin yapısı üzerinde nasıl bir etkiye yol açmış olabileceğini görmek için, Emimi Surface Accessibility Prediction programı (Emimi ve diğ., 1985) kullanılarak oluşturulan diagram Şekil 4.24’de verilmiştir.



Şekil 4.24. *Fusarium graminearum* izolatlarında FGSG_11047 geni üzerindeki mutasyonların ve bunların protein ürününe olası etkilerinin karşılaştırılması.

Diagram incelendiğinde F14 ve F16 nolu *F. graminearum* strainlerinde oluşan iki adet mutasyonun da proteinin, başka proteinlerle etkileşime girmesi muhtemel olan kısımlarında gerçekleştiği görülmüştür. Özellikle yapısal olarak çok farklı aa grupları arasında meydana gelen 54. aa pozisyonundaki V (Val) →A (Ala) değişiminin proteinin işlevinde değişikliğe sebep olabileceği düşünülebilir.

Genel anlamda, ilgili gen üzerinde oluşan mutasyonların çok az sayıda *F. graminearum* straini ile (sadece F14 ve F16'te iki noktada) sınırlı kalması, bu genin ürünü olan proteinin fungus için önemli olduğu ve oluşacak mutasyonların fungusun biyolojisi üzerine olan etkilerinden dolayı popülasyondan temizlenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Alignment işlemleri temelinde oluşturulan soyağacı Şekil 4.25'de verilmiştir.



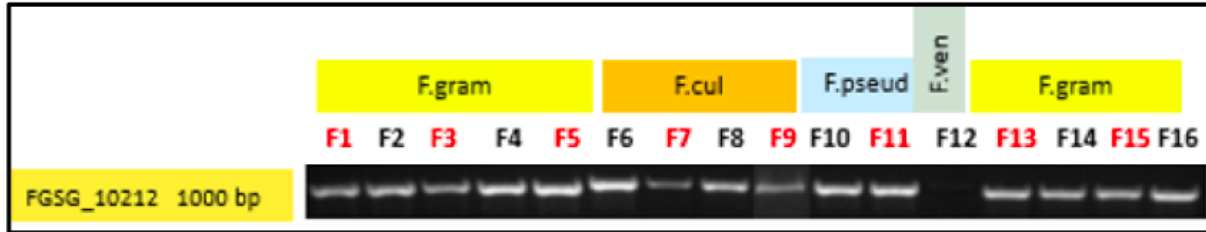
Şekil 4.25. FGSG_11047 geni için nükleotid alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.

Şekil 4.25 incelendiğinde, beklenildiği gibi ayrı bir tür olan F11 kodlu *F. pseudograminearum* izolatının apayrı bir grup oluşturduğu görülmektedir. *F. graminearum* içerisindeki grupsal dağılım genel olarak coğrafik yakınlığı yansıtmaktadır. Amerika kıtasındaki ülkelerde bulunan izolatlar aynı grup içerisinde yer alırken, Avrupa izolatları da yine yakın gruplar içerisinde yer almışlardır.

4.2.3.3 FGSG_10212 ve FGSG_11205 (*F. graminearum* Probable SnodProt1 Precursors)

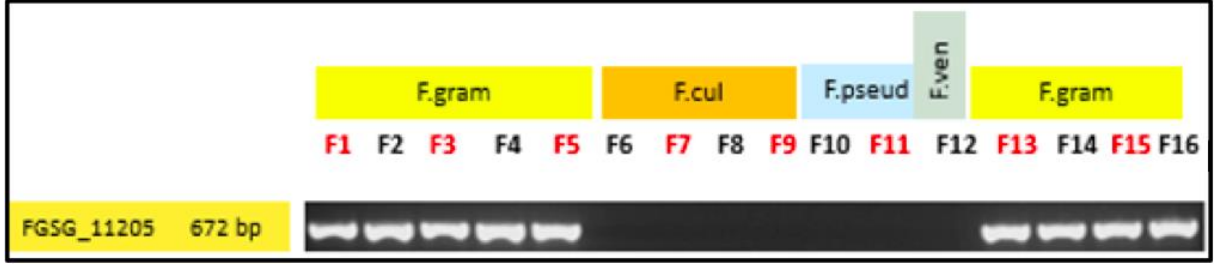
FGSG_10212 geni MIPS verilerine göre 477 nt uzunluğunda olup 139 aa'lık bir proteini kodlamaktadır (http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/FGDB/single_GeneReport.html?entry=FGSG_10212; 28.09.2012). Bu 139 aa'lık proteinin ilk 18 aa'lık kısmı proteinin hücre arasına taşınmasını sağlayan sinyal peptit dizileridir ve bu kısım proteinden uzaklaştırıldığında olgun protein 121 aa'ten oluşmaktadır. Protein 4 adet Cys aa'ı içermektedir ve bu da olgun proteinin %3.31'ini ifade etmektedir (Brown ve diğ., 2012).

Çalışmamızda kullandığımız primer dizileri yardımıyla testlenen 16 adet *Fusarium* izolatının tamamında yaklaşık 1000 bp'lik bir band oluşturarak tespit edilebilmiştir (Şekil 4.26). *F. veninatum* izolatında (F12) çok zayıf bir bant alınmasına karşılık sekans analizleri için yeterli miktarda PCR ürünü elde edilebilmiştir.



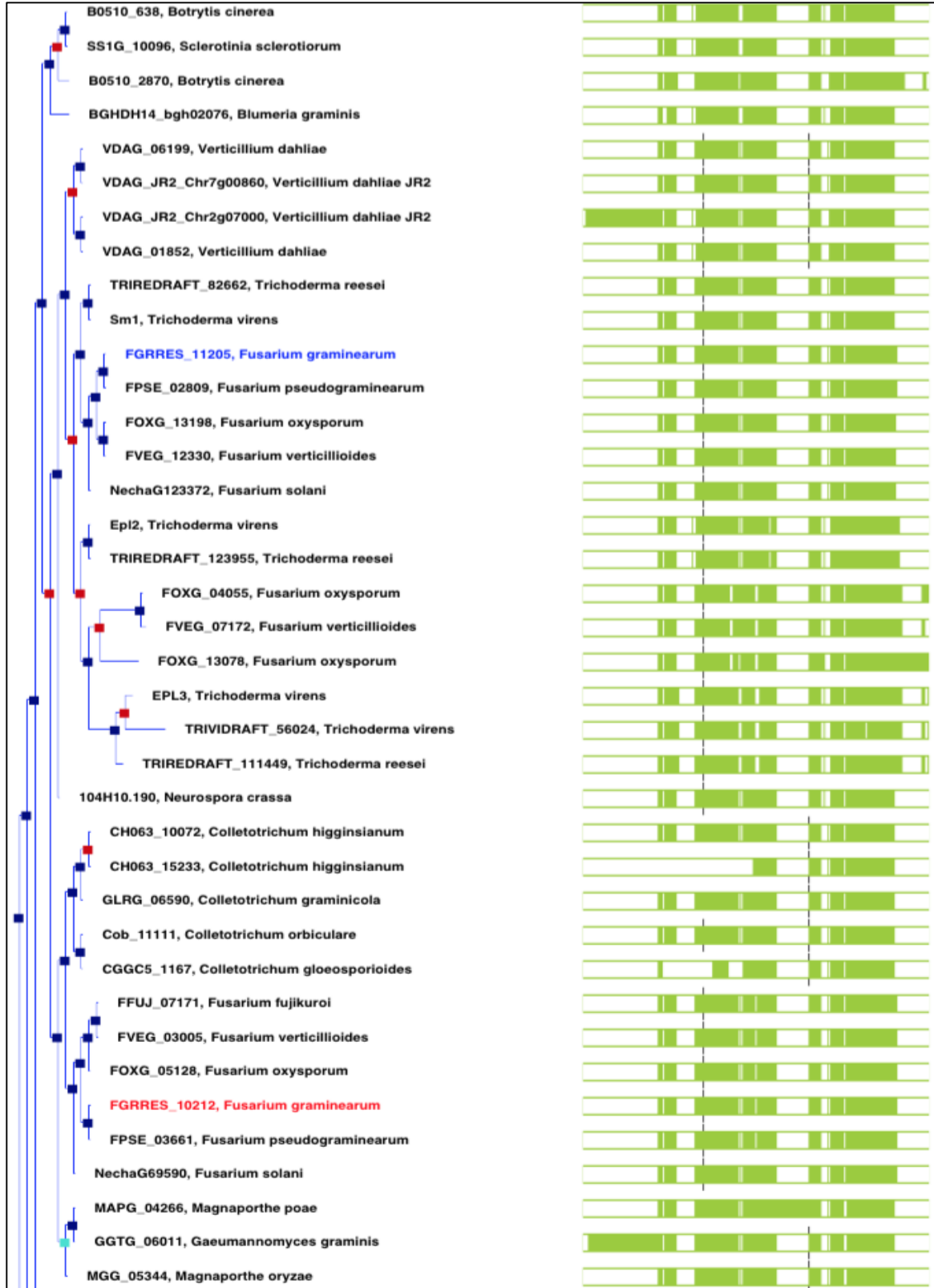
Şekil 4.26. FGSG_10212 genine ait jel görüntüsü.

FGSG_11205 geni MIPS verilerine göre 479 nt uzunluğunda olup 140 aa'lık bir proteini kodlamaktadır (http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/FGDB/single_GeneReport.html?entry=FGSG_11205; 28.09.2012). Bu 140 aa'lık proteinin ilk 18 aa'lık kısmı proteinin hücre arasına taşınmasını sağlayan sinyal peptit dizileridir ve bu kısım proteinden uzaklaştırıldığında olgun protein 122 aa'ten oluşmaktadır. Tam protein içerisinde 5 adet Cys aa'ı vardır fakat bunlardan bir tanesi sinyal peptit dizisi içerisindedir. Olgun proteini oluşturmak için sinyal peptit dizisi proteinden uzaklaştırıldığında, *F. graminearum* genomundaki bir diğer SnodProt1 Precursor proteini olan FGSG_10212'de olduğu gibi olgun protein 4 Cys aa içermektedir ve bu da olgun proteinin %3.28'ini ifade etmektedir (Brown ve diğ., 2012). Çalışmamızda sadece *F. graminearum* 'a ait olan 9 adet fungal strainde 672 bp'lik bir PCR ürünü ile tespit edilebilmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. FGSG_11205 genine ait jel görüntüsü.

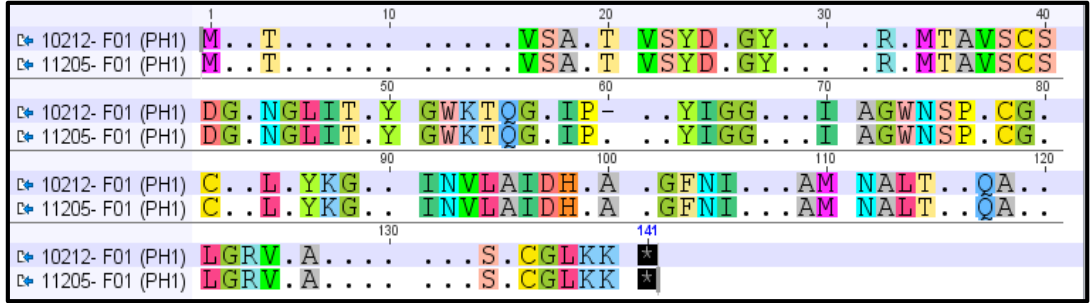
FGSG_10212 ve FGSG_11205 genlerinin sekanslanan diğer fungal genomlarda herhangi bir homologunun bulunup bulunmadığı, ilgili genin kodu kullanılarak “www.fungi.ensemble.org” sitesinden yapılan arama sayesinde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.28’de verilmektedir. İlgili şekil incelendiğinde bu genlerin 30 farklı fungal genomda, yaklaşık 44 homologunun bulunduğu görülmektedir. Bu genin homologlarını içeren funguslar arasında *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Blumeria graminis*, *Verticillium dahliae*, *M. grisea* ve *Gaumannomyces graminis*’in de aralarında bulunduğu çok sayıda bitki patojeninde var olduğu görülmektedir. Yine bu çalışmada kullanılan *Fusarium* koleksiyonundaki türlerin dışında *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. solani*’de de bu genin homologlarının bulunduğu anlaşılmaktadır. Bu çalışma, henüz tam genom sekansı tamamlanmayan, Ülkemiz ve dünyada çok önemli bir kök boğazı çürüklüğü ve başak yanıklığı etmeni olan, *F. culmorum*’da ve fungal protein kaynağı olarak kullanılan *F. venenatum*’da bu genlerden en az birinin (FGSG_10212) varlığını göstermiştir.



Şekil 4.28. FGSG_10212 genine ait homoloji araştırmasından bir görüntü (www.fungi.ensembl.org-GeneTree EFGT00050000006250).

FGSG_10212 ve FGSG_11205 *F. graminearum* genomunda iki kopyası bulunan Cerato platanin protein ailesinden (<http://pfam.janelia.org/family/PF07249>; 27.09.2012), bu fungusun genomunda iki adet bulunan SnodProt1 precursor proteinleridirler. Cerato plataninler ilk defa çınar ağaçlarında kansere yol açan Ascomyset bir fungus olan *Ceratocystis platani*'de, yeni bir fitotoksik protein grubu olarak tanımlanmışlardır. Pazzagli ve diğ., (1999) tarafından yapılan bu çalışmada, bu grup proteinlerin yapısal olarak orta derecede hidrofobik oldukları ve iki disülfid köprüsü oluşumuna izin veren, korunmuş 4 Cys içerdikleri belirtilmektedir.

Her iki genin nükleotid dizileri ve aa ürünleri Geneious programı yardımıyla karşılaştırıldığında iki proteinin %63 oranında homoloji gösterdikleri anlaşılmaktadır (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. Referans izolat olan F01 (PH-1) straininde FGSG_10212 ve FGSG_11205 SnodProt1 precursor genlerine ait sekans verileri kullanılarak oluşturulmuş alignment işlemi (Benzer olmayan alanlar nokta ile gösterilmiştir).

Şekil 4.29 incelendiğinde, olağan olmayan bir şekilde, FGSG_11205 genin tarafından kodlanan proteinin, her ne kadar sinyal peptit dizileri içinde kalsa da fazladan bir Cys aa içerdiği görünmektedir. Buna karşın her iki proteinde de Cys aa pozisyonlarının korunmuş oldukları ve aynı lokasyonda bulundukları görülmektedir. Bilindiği üzere gen dublikasyonu canlılarda sıklıkla rastlanan ve canlının çevreye uyumunda zaman zaman önemli rol oynayan biyolojik bir mekanizmadır. Bu durum homolog rekombinasyon sırasında oluşan bir hatadan ya da tam bir kromozomun dublikasyonundan kaynaklanabilir (Zang, 2003). Bu olay daha çok, mayoz bölünme sırasında yanlış bir şekilde eşleşmiş homolog kromozomlar arasında oluşan “eşit olmayan krosing-over” denilen olaydan kaynaklanmaktadır. Oluşan ikinci kopya gen, sıklıkla seleksiyon baskısı altında değildir ve bunun sonucu olarak da bu gen üzerinde oluşacak mutasyonlar organizmanın hayati fonksiyonlarını etkileyecek sonuçlar doğurmazlar (URL-1, 2012). Çalışmamızda kullandığımız primer setleri ile FGSG_10212 geni, testlediğimiz bütün izolatlarda tespit edilebilirken, FGSG_11205

geni *F. graminearum* izolatları ile sınırlı kalmıştır. Özellikle farklı *Fusarium* türlerinde, yeni oluşan kopyanın mutasyonlar nedeniyle seleksiyon baskısına daha az maruz kalması, yukarıdaki bilgiler ışığında oldukça muhtemeldir. Primerlerimiz *F. graminearum* referans izolat (PH-1) nükleotid dizileri kullanılarak üretilmiştir. Bu primerlerin yapışma alanlarındaki mutasyon oranlarının tür içinde düşük, türler arasında ise yüksek olma ihtimali fazladır. Bu durum primer yapışma alanlarında oluşan mutasyonlar nedeniyle FGSG_11205 geninin *F. graminearum* dışındaki *Fusarium* türlerinde tespit edilememesine bir açıklama getirebilir.

Cerato-platanin'ler, grubu proteinlerin fungal alem içerisinde bu denli yaygın olması, aslında bu protein grubunun funguslar için önemini de ortaya koymaktadır. Fitotoksik yeni bir protein grubu olarak tanımlandıktan sonra, birçok bitki patojeni ve patojen olmayan fungusta bu grup proteinlerin varlığı ve karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

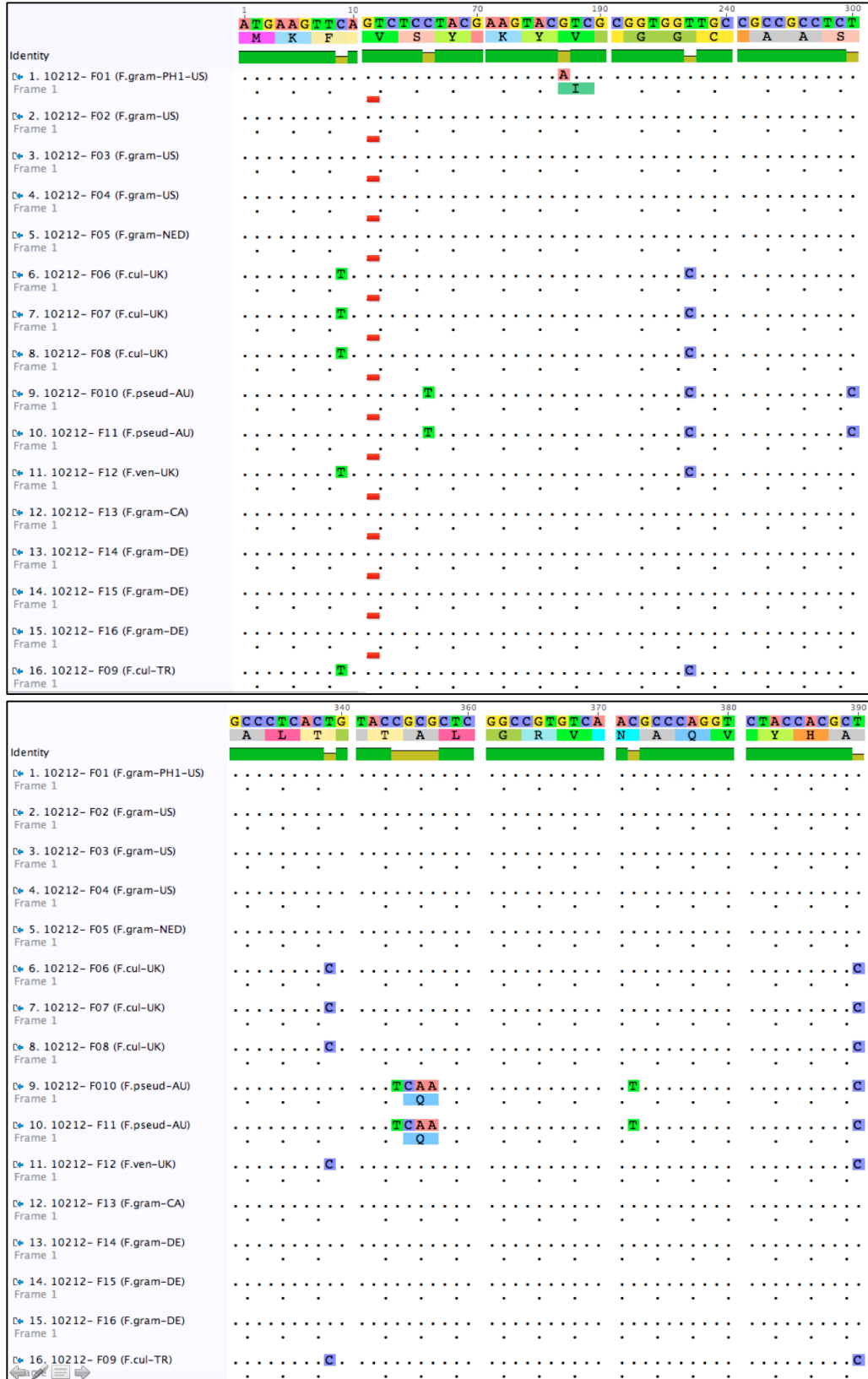
Önemli buğday patojeni olan *Septoria nodorum*'da Hall ve diğ., (1999) tarafından yapılan çalışmada tanımlanan SnodProt1 geninin, Cerato-platanin protein grubuna ait bir domain içerdiği belirlenmiş ve bu genin ürününün buğdayda fitotoksik olduğu gösterilmiştir. Frias ve diğ., (2011) *B. cinerea* patojenine ait secretome verileri kullanarak belirledikleri BsSpI1 kodlu cerato-platanin grubu proteininin, fungusun infeksiyon döngüsündeki rolünü araştırmışlardır. Bu genin ifade (expression) analizi çalışmasında, en yüksek ifade oranına infeksiyonun geç dönemlerinde ulaşıldığını belirlemişlerdir. Ürettikleri knock-out mutantların, testlenen birçok konukçuda fungusun virülensliğinde azalmaya neden olduğunu saptamışlardır. Saf proteinin bitkiler üzerindeki etkilerini görmek için, proteini bir mayaya (*Pichia pastoris*) klonlamışlar ve ekstrakte ettikleri saf proteinin uygulandığı bir çok bitkide –dozdan bağımsız olarak- uygulama alanında proteinin nekroz oluşumuna neden olduğunu göstermişlerdir. BsSpI1 proteini uygulanan bitkilerde, aşırı duyarlılığın göstergesi olan genlerin aktivasyonuna ilave olarak, reaktif oksijen türlerinin harekete geçirilmesi, elektrolit salımı, sitoplazma büzüşmesi ve hücre otoflorosanslığı (outoflourecense) gibi aşırı duyarlılık simptomlarını gözlemlemişlerdir.

Cerato-platanin (CP) grubu proteinlerin fitotoksik etkilerini araştıran çalışmalar (Comparini ve diğ., 2009; Djonovic ve diğ., 2006; Jeong ve diğ., 2007) yanında, bu grup proteinlerden bazılarının ait olduğu organizmanın dışında, başka organizmalara aktarılan genin (ectopic), yeni konukçuda ifadesi ile ilginç sonuçların alındığı

alışmalar da mevcuttur. Yang ve diğ., (2009) tarafından yapılan bir çalışmada *M.grisea* genomundaki bir CP grubu bir protein olan MGSm1 geninin fungusun bitkiyi infeksiyonu ve normal yaşam olayları süresince ifade edildiğinin saptandığını belirlemişlerdir. Gen ürünü olan proteinin *Agrobacterium* yardımıyla, *Arabidopsis* bitkisinde geçici (transient) olarak ifade edilmesinin, bitkide *B.cinerea* ve *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000'e karşı dayanıklılıkta bir artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Daha sonra MGSm1 genini *Arabidopsis* bitkisine klonlamışlar ve klonladıkları *Arabidopsis* bitkilerinde, genin ifade edilmesiyle birlikte *B.cinerea*, *Pst* DC3000 ve *Alternaria brassicola* dayanıklılıkta bir artış olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar, patojen tarafından salgılanan ve bitkide dayanıklılığı aktive eden proteinlerin, ektopik olarak ifadesi yoluyla, hastalıklara karşı geniş spektrumlu dayanıklılık gösteren çevre dostu bitkilerin geliştirilmesinin mümkün olabileceğini ifade etmişlerdir.

İlgili gene ait BROAD Enstitüsü verileri kullanılarak, sekans dizileri üzerinden genin konsensus dizisi elde edilmiştir. Bu amaçla genin downstream ve upstream bölgesindeki nükleotid dizileri uzaklaştırılmıştır. Yine gen içerisinde 61-62. nt'ler arasındaki *F. graminearum*'da 57 nt'lik; *F. culmorum* ve *F. venenatum*'da 59 nt'lik ve *F. pseudograminearum*'da 58 nt'lik intron bölgeleri kesip çıkartılarak genin ORF bölgesi elde edilmiştir. Protein kodlayan ORF bölgesi içerisine giren mutasyonları görmek için ORF dizileri kullanılarak alignment işlemi yapılmıştır (Şekil 4.30).

Şekil 4.30 dikkatlice incelendiğinde gen üzerinde meydana gelen mutasyonları fazla olmadığı ve çok önemli aa değişikliklerine yol açmadığı görülmektedir. Örneğin *F. graminearum* izolatlarında sadece bir noktada meydana gelen mutasyon (A→G nükleotid değişimine neden olan SNP-Single Nükleotid Polimorfizm) referans izolatta (F01-PH1) 63. aa olan large-polar gruptan I (Isoleucine-Ile) yine aynı gruptan V (Valine-Val) aa'ine dönüşmüştür. Bunun dışında çalışılan tüm *Fusarium* strainlerinde aa değişikliğine neden olan tek mutasyon, *F. pseudograminearum* izolatlarında 119. aa pozisyonundaki bir small non-polar aa olan A (Alanin-Ala) ile small polar gruptan Q (Glutamine-Gln) arasında olan değişimine neden olmuştur.

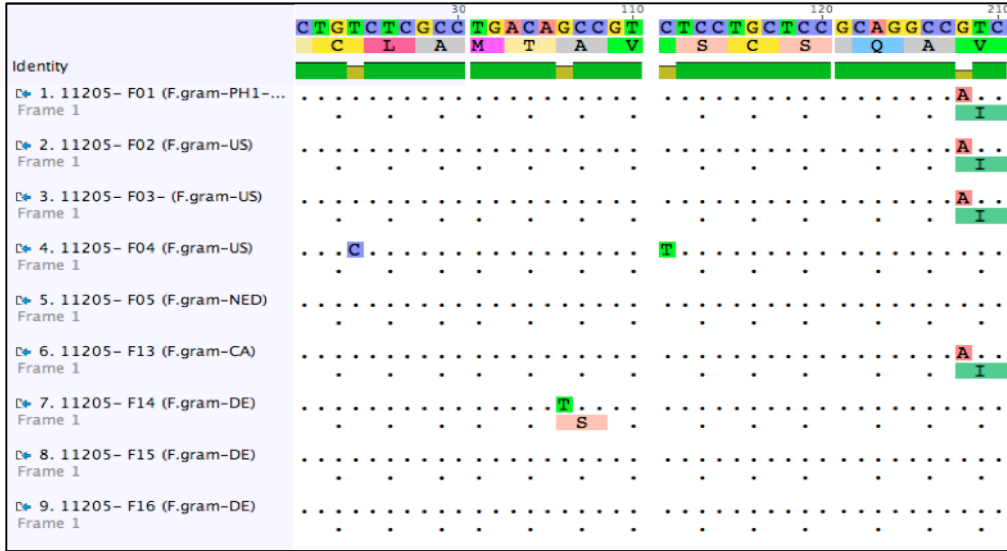


Şekil 4.30. FGSG_10212 genine ait Geneious programında oluşturulan alignment görüntüsü.

Genel anlamda, ilgili gen üzerinde oluşan mutasyonların çok az sayıda olması nedeniyle, bu genin ürünü olan proteinin fungus için önemli olduğu ve oluşacak mutasyonların fungusun biyolojisi üzerine olan etkilerinden dolayı popülasyondan temizlenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca bu mutasyonun referans izolat dışında, dünyanın farklı bölgelerinden elde edilen tüm izolatlarda görülmesi, tam genom dizi bilgileri çıkarılan PH-1 izolatında oluşan bir mutasyonla, bu noktada “Ile” aa’ine sahip olduğu, aslında genel anlamda *F. graminearum* strainlerinin bu noktada “Val” aa’ine sahip olmaları daha yüksek bir olasılıktır.

Tüm dünyada, bu patojenle çalışılan laboratuvarlarda halihazırda kullanılıyor olması nedeniyle, çalışmada kullanılan *F. graminearum* referans izolatında (PH-1) meydana gelen SNP mutasyonu çok önemlidir. Dünyanın farklı bölgelerinden izole edilen izolatlar kıyaslayarak elde ettiğimiz bu sonuç, bu SNP mutasyonunun referans izolatın diğerlerinden ayırt edilmesinde kullanılabileceğini göstermektedir. Bu durum özellikle açık alan denemelerinin değerlendirilmesinde büyük önem arz etmektedir. Spreyleme tekniğiyle ile açık alanda yapılan bulaştırmalarda, çalıştığımız bitkinin gerçekten sizin bulaştırdığınız PH-1 ile mi, yoksa doğal popülasyonlardan biri ile mi hastalandırıldığını tespit etmek oldukça zordur. SnodProt1 Precursor geni FGSG_10212’de bu çalışma kapsamında belirlenen bu SNP mutasyonu, bu izolatın özellikle açık alan çalışmalarında diğer izolatlardan ayırt edilmesinde kullanılabilecektir.

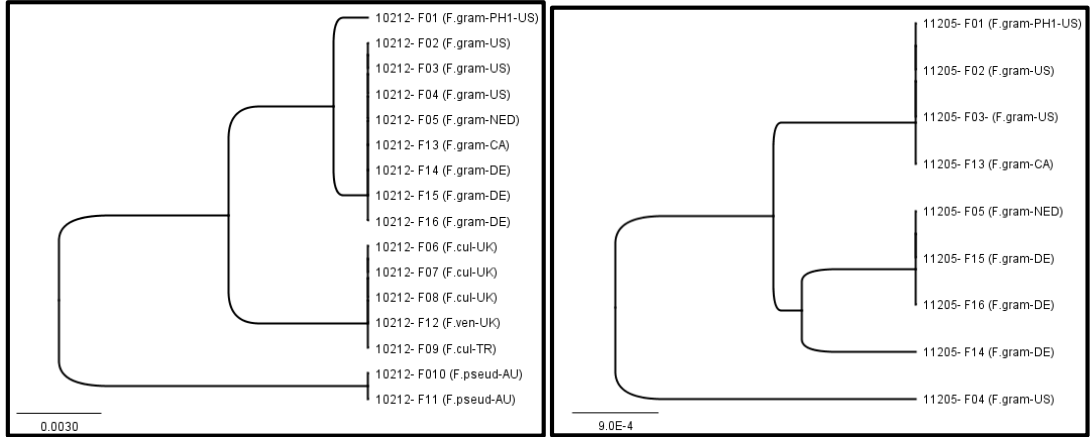
Diğer Cerato-Platanin homologu olan FGSG_11205 genine ait, sekans dizileri üzerinden genin konsensus dizisi elde edilmiştir. Bu amaçla genin downstream ve upstream bölgesindeki nükleotid dizileri uzaklaştırılmıştır. Yine gen içerisinde 61-62. nt’ler arasındaki 56 nt’lik intron bölgesi kesip çıkartılarak genin ORF bölgesi elde edilmiştir. Protein kodlayan ORF bölgesi içerisine giren mutasyonları görmek için ORF dizileri kullanılarak alignment işlemi yapılmıştır (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. FGSG_10205 genine ait allelik varyasyonlar. “SP” sinyal peptid dizisini, “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.

Şekil 4.31 dikkatlice incelendiğinde gen üzerinde meydana gelen mutasyonların bir önceki SnodProt1 precursor geni FGSG_10212’de olduğu gibi, çok az sayıda olduğu ve çok önemli aa değişikliklerine yol açmadığı görülmektedir. Örneğin F14 nolu *F. graminearum* izolatının 36. aa’ini kodlayan nükleotid dizilerinde meydana gelen bir G→T mutasyonu ilgili aa’in A (Ala)’den, S (Serine-Ser)’e dönüşmesine neden olmuştur. Her iki aa de small non-polar gruptandır. Yine referans izolatta (F01-PH1) 70. aa olan large-polar gruptan I (Isoleucine-Ile) aa’i, F04, F05, F14, F15 ve F16 nolu izolatlarda, oluşan mutasyonla yine aynı gruptan V (Valine-Val) aa’ine dönüşmüştür. Bunun dışında birkaç noktada meydana gelen nükleotid mutasyonlarının herhangi bir aa değişikliğine yol açmadıkları görülmektedir.

F.graminearum izolatlarına ait FGSG_10212 ve FGSG_11205 genleri üzerinde meydana gelen mutasyonların neden olduğu aa değişikliklerinin aynı grup içinde sınırlı kalması nedeniyle, bu değişikliklerin proteinin yapısı üzerinde nasıl bir etkiye yol açmış olabileceğini ile ilgili analiz yapılmamıştır. Alignment verileri kullanılarak oluşturulan soy ağaçları Şekil 4.32’de verilmektedir.



Şekil 4.32. FGSG_10212 ve FGSG_11205 genleri için nükleotid alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı

FGSG_10212 için şekil incelendiğinde referans izolatımız PH-1 dışındaki tüm *F.graminearum* strainlerinin aynı grup içerisinde yer aldıkları görülmektedir. *F.pseudograminearum* izolatları en uzak grup içerisinde yer alırken, *F.culmorum* ve *F.venenatum* aynı grup içerisinde yer almışlardır.

Diğer Şekil incelendiğinde F04 nolu izolatın sahip olduğu mutasyonlarla, diğer izolatlardan ayrıldığı görülebilmektedir. F02, F03 ve F13'nin referans izolatımız PH-1 ile aynı grup içinde yer aldıkları görülmektedir. Yine F05, F14, F15 ve F16 bu gruptan ayrılmış kendi içlerinde bir alt grup oluşturmuşlardır. Bu alt grup içerisinde ise F14 nolu *F.graminearum* izolatının diğer üçünden ayrılarak yeni bir alt grup içerisinde yer aldığı görülmektedir. Şekil incelendiğinde bu grubun coğrafik olarak tutarlı bir grup olduğu ve tamamıyla Avrupa izolatları tarafından oluşturulduğu görülmektedir. F04 nolu izolat ise diğer izolatlara göre daha fazla oranda içerdiği mutasyonlar nedeniyle, geri kalan tüm izolatlardan ayrılarak bağımsız bir grup oluşturmuştur.

Sonuç olarak Cerato-plataninlerin, birçok bitki patojeninde homologlarının olduğu belirlenmiş, bazılarında karakterizasyon ve fonksiyon analizleri ile virülenslik ile ilişkileri ispatlanmıştır. Aynı protein grubuna dahil olan *F.graminearum* SSP genlerinden FGSG_10212 ve FGSG_10205 kodlu genlerin, iyi birer efektör adayı olabileceği düşünülmektedir.

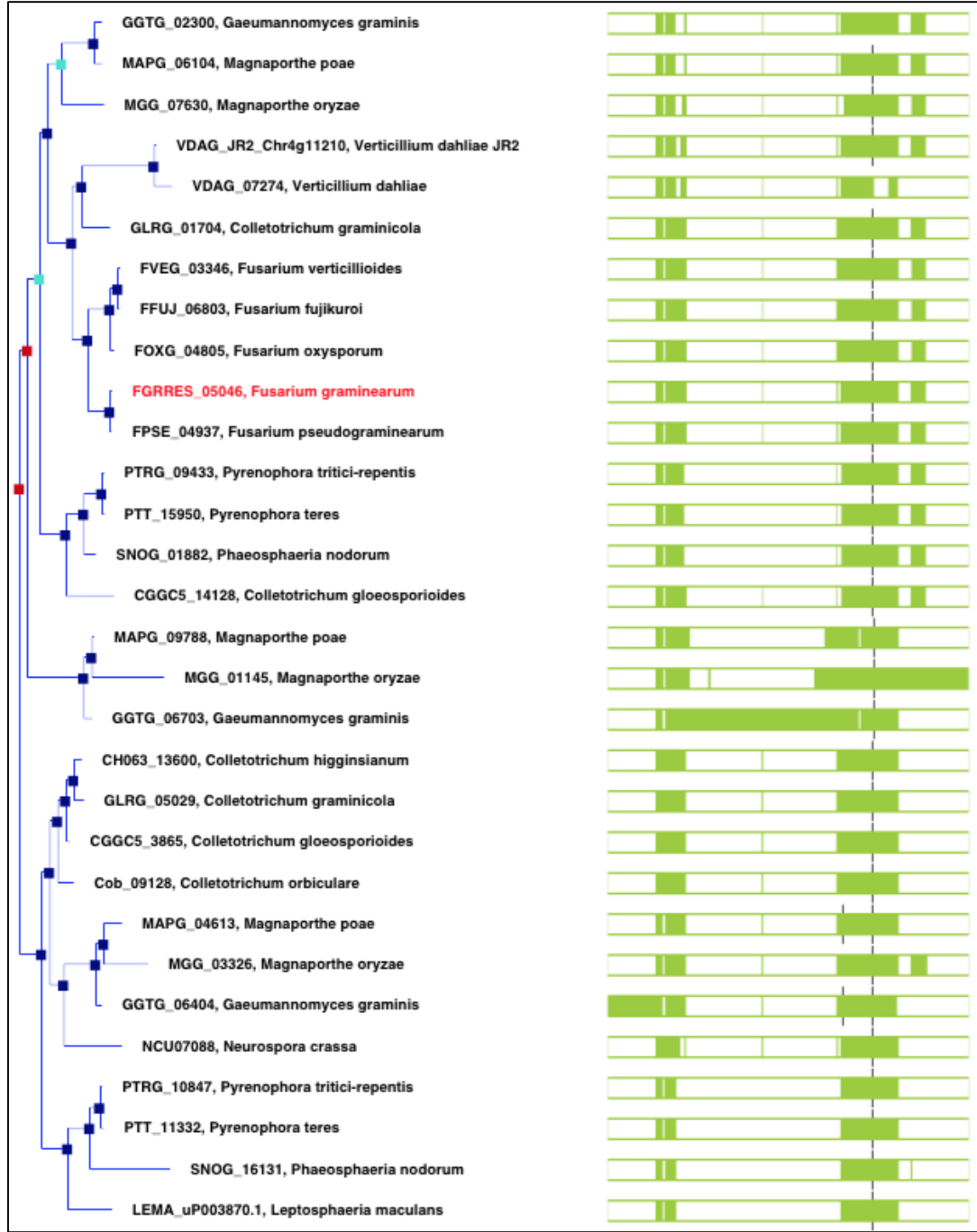
4.2.3.4 FGSG_05046 (*F.graminearum* korunmuş hipotetik protein)

FGSG_09066 geni MIPS verilerine göre 443 nt uzunluğunda olup 130 aa'lık bir proteini kodlamaktadır (http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/FGDB/singleGeneReport.html?entry=FGSG_05046; 28.09.2012). Bu 130 aa'lık proteinin ilk 19 aa'lık kısmı proteinin hücre arasına taşınmasını sağlayan sinyal peptit dizileridir ve bu kısım proteinden uzaklaştırıldığında olgun protein 112 aa'ten oluşmaktadır. Protein 8 adet Cys aa'i içermektedir ve bu da olgun proteinin %7.14'ini ifade etmektedir (Brown ve diğ., 2012). Çalışmamızda bütün izolatlarda 605 bp'lik bir PCR ürünü ile tespit edilebilmiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. FGSG_05046 genine ait jel görüntüsü.

FGSG_05046 geninin sekanslanan diğer fungal genomlarda herhangi bir homologunun bulunup bulunmadığı, ilgili genin kodu kullanılarak www.fungi.ensemble.org sitesinden yapılan arama sayesinde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 4.34'de verilmektedir.

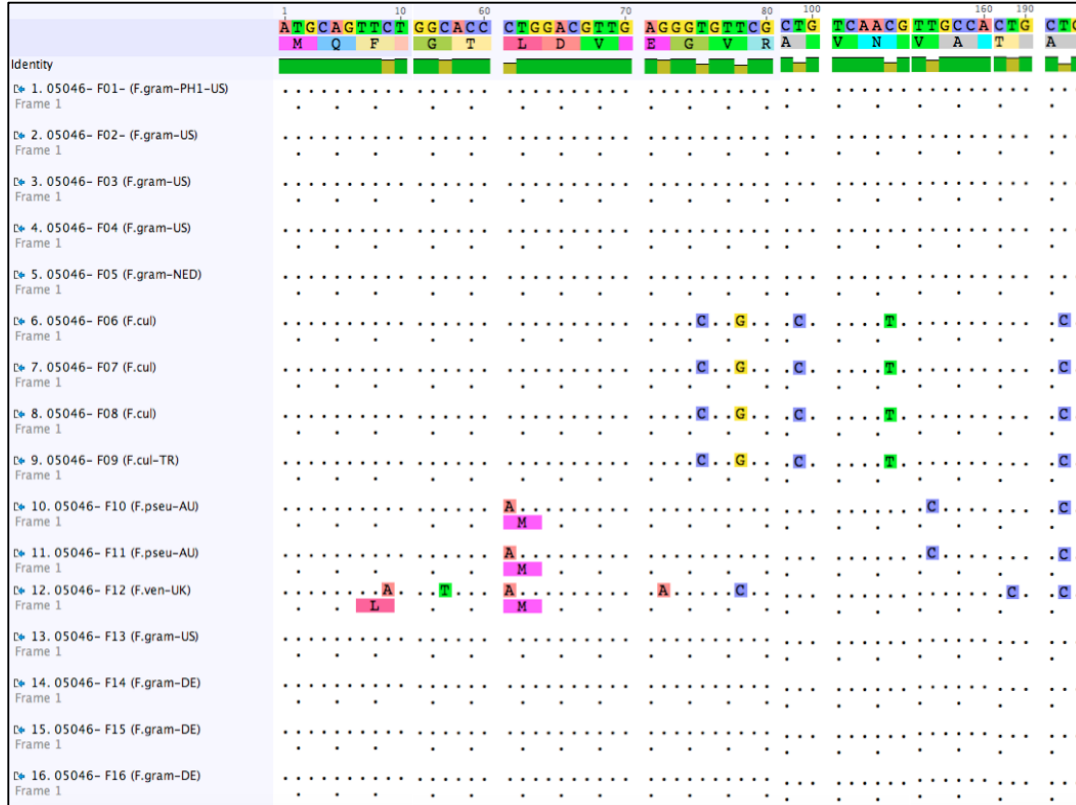


Şekil 4.34. FGSG_05046 genine ait homoloji araştırmasından bir görüntü (www.fungi.ensembl.org- GeneTree EFGT00090000013110).

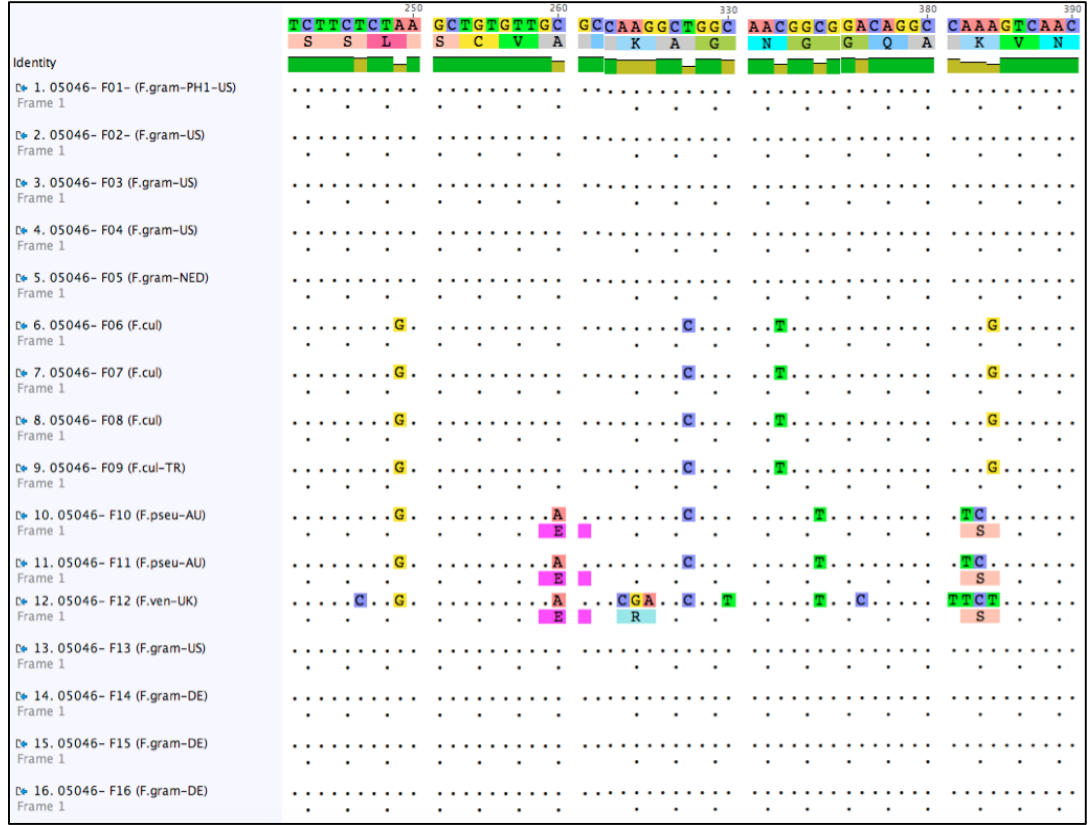
İlgili şekil incelendiğinde bu genin içlerinde *G. graminis*, *M. grisea*, *Pyrenophora tritici repentis*, *Septoria nodorum* ve bazı *Fusarium* türleri olmak üzere 18 farklı fungal genomda, yaklaşık 23 homologunun bulunduğu görülmektedir.

FGSG_09066 geni ile ilgili kısımda detayları verildiği şekilde elde edilen sekans verileri temelinde, FGSG_05046 genine ait BROAD Enstitüsü verileri kullanılarak, sekans dizileri üzerinden genin konsensus dizisi elde edilmiştir. Bu

amaçla genin downstream ve upstream bölgesindeki nükleotid dizileri uzaklaştırılmıştır. Yine gen içerisinde 236-237. nt'ler arasındaki *F.graminearum*'da 50 nt'lik; *F.culmorum* ve *F.pseudograminearum*'da 55 nt'lik ve *F.venenatum*'da 51 nt'lik intron bölgeleri kesip çıkartılarak genin ORF bölgesi elde edilmiştir. Protein kodlayan ORF bölgesi içerisine giren mutasyonları görmek için ORF dizileri kullanılarak alignment işlemi yapılmıştır (Şekil 4.35).

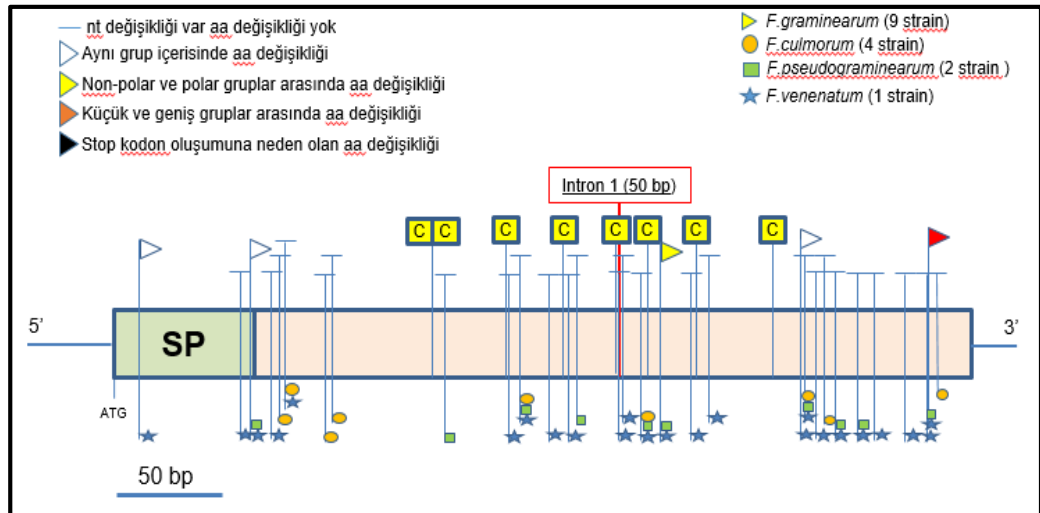


Şekil 4.35. FGSG_05046 genine ait Geneious programında oluşturulan nükleotid alignment görüntüsü.



Şekil 4.35 (Devam). FGSG_05046 genine ait Geneious programında oluşturulan nükleotid alignment görüntüsü.

Şekil 4.35’deki alignment sonuçlarını daha basit bir şekilde ifade etmek ve yorumlayabilmek için Microsoft PowerPoint programı kullanılarak izolatlar arasındaki allelik varyasyonları gösteren bir grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.36).

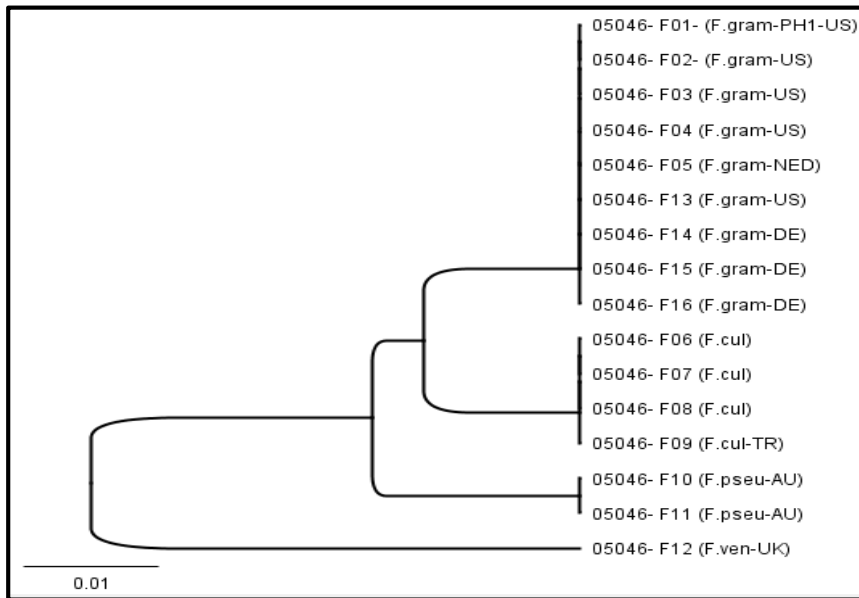


Şekil 4.36. FGSG_05046 genine ait allelik varyasyonlar. “SP” sinyal peptid dizisini, “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.

Şekil 4.36 dikkatlice incelendiğinde *F.graminearum*'a ait 9 adet izolatın hiçbirinde aa değişikliğine neden olan ya da olmayan herhangi bir mutasyon oluşmadığı görülmektedir. Bu durum bu genin fungal metabolizmada çok önemli bir işleve sahip olması ve mutasyonlara karşı yüksek derecede korunduğu şeklinde yorumlanabilir. Diğer izolatlarda meydana gelen mutasyonların da çok az sayıda ve genellikle tür spesifik olduğu ve çok önemli aa değişikliklerine yol açmadığı görülmektedir. 3 noktada, *F.pseudograminearum* ile *F.venenatum* İzolatlarının aynı aa değişikliklerine yol açan mutasyona sahip oldukları görülmektedir. Bunlardan en önemlisi 128. aa pozisyonundaki large-polar aa grubuna giren K (Lysin) aa'inin, small-non polar aa grubuna giren S (Serine) aa'ine dönüşmesine neden olmuştur. Ülkemizden bir izolatın da bulunduğu *F.culmoum* izolatlarında, farklı noktalarda bu izolatları PH1'dan ayıran SNP mutasyonları olsa da bunlardan hiçbirisi herhangi bi aa değişikliğine neden olmamıştır.

F.graminearum strainlerine ait FGSG_05046 geni üzerinde aa değişiklikleri meydana getiren herhangi bir mutasyon olmadığı için Emimi Surface Accessibility Prediction programı (Emimi ve diğ., 1985) kullanılarak herhangi bir çalışma yapılamamıştır.

Nükleotid alignment verileri kullanılarak oluşturulan soyağacı şekil 4.37'de verilmiştir.



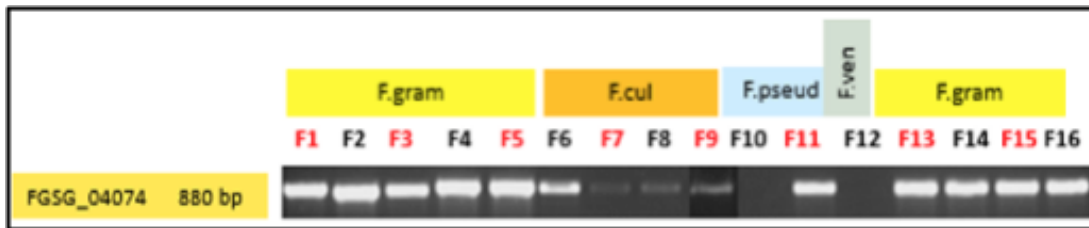
Şekil 4.37. FGSG_05046 geni için nükleotid alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.

Şekil 4.37 incelendiğinde tüm *F.graminearum* İzolatlarının aynı grup içerisinde yer aldığı görülmektedir. Yine çalışmada kullanılan bütün türler kendi içerisinde gruplanmışlardır. En fazla genetik uzaklığın *F.venenatum* izolatında olduğu tespit edilmiştir.

4.2.3.5 FGSG_04074 (*Fusarium graminearum* korunmuş hipotetik protein)

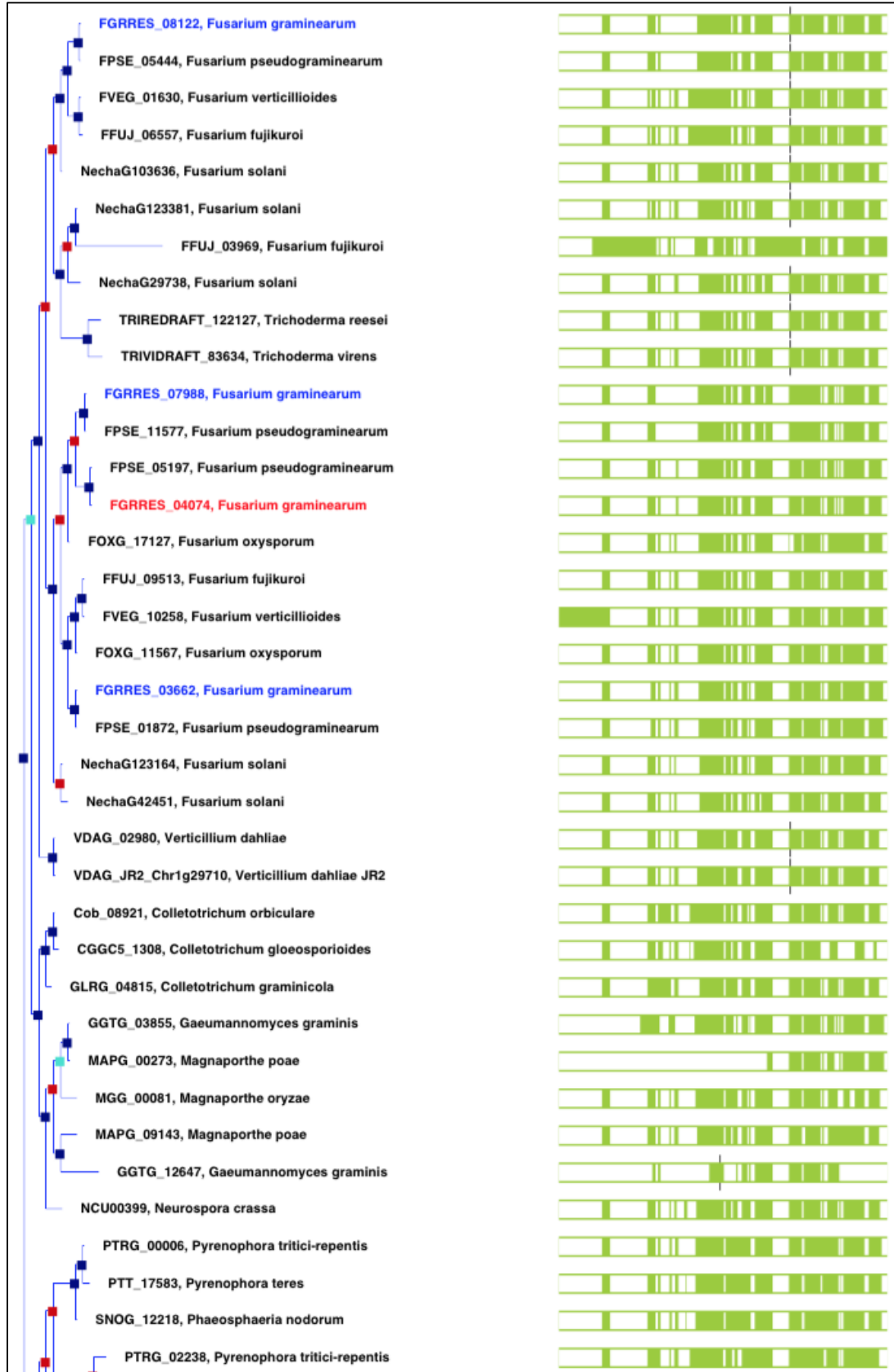
FGSG_04074 geni BROAD verilerine göre 817 nt uzunluğunda olup 191 aa'lık bir proteini kodlamaktadır (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_graminearum/TranscriptDetails.html?sp=S7000005385112612; 28.09.2012). Bu 191 aa'lık proteinin ilk 20 aa'lık kısmı proteinin hücre arasına taşınmasını sağlayan sinyal peptit dizileridir ve bu kısım proteinden uzaklaştırıldığında olgun protein 171 aa'ten oluşmaktadır. Protein 6 adet Cys aa'ı içermektedir ve bu da olgun proteinin %3.51'ini ifade etmektedir (Brown ve diğ., 2012).

Çalışmamızda kullandığımız primer dizileri yardımıyla testlenen 9 adet *F.graminearum* straininin tamamında 880 bp'lik bir band oluşturarak tespit edilebilmiştir. Bununla birlikte testlenen Türkiye'den Fcul-TR1 kodlu *F.culmorum* izolatlarının tamamında, testlenen iki *F.pseudograminearum* izolatından biri olan FpCS3096 (F11) izolatında tespit edilebilirken FpCS3212 (F10) izolatında tespit edilememiştir. Yine non-patojen *F.venenatum* (F12) izolatında da kullandığımız primerler ile herhangi bir PCR ürünü elde edilememiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. FGSG_04074 genine ait jel görüntüsü.

FGSG_04074 geninin sekanslanan diğer fungal genomlarda herhangi bir homologunun bulunup bulunmadığı, ilgili genin kodu kullanılarak www.fungi.ensemble.org sitesinden yapılan arama sayesinde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 4.39'da verilmektedir. İlgili şekil incelendiğinde bu genin aralarında *Aspergillus niger*, *A.flavus*, *A.terreus*, *N.haematococca*, *F.oxysporum* ve *Gibberella moniliformis*, *F.pseudograminearum*, *F.fujikuroi*, *Verticillium dahliae*, *M.oryzae*, *G.graminis*, gibi tarımsal açıdan önemli fungal türlerin de bulunduğu, 38 farklı fungusta 52 homologunun bulunduğu görülmektedir.



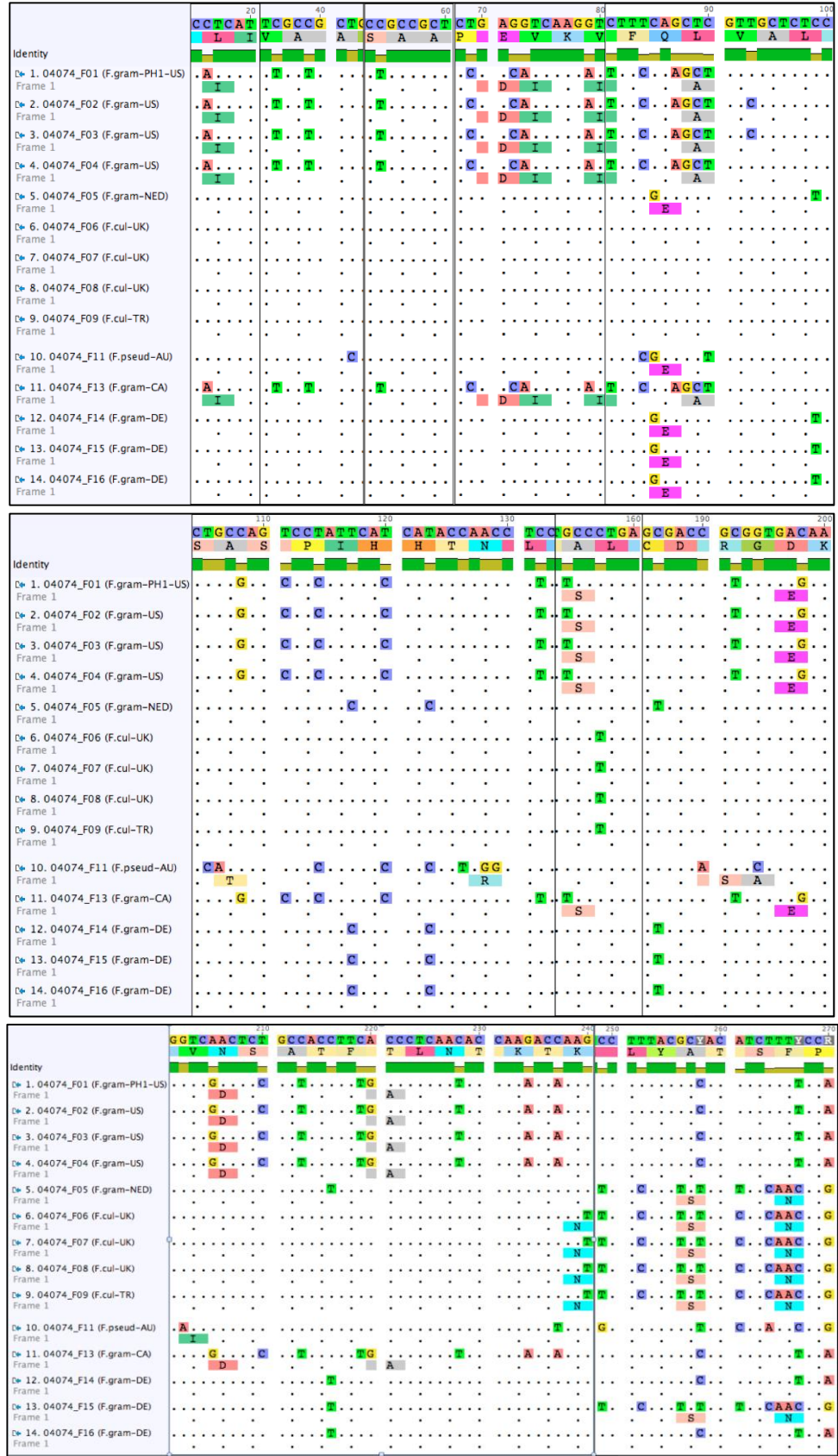
Şekil 4.39. FGSG_04074 geninin homoloji durumunu gösteren analiz (GeneTree EFGT00050000002186).

Bu tablo ilgili genin özellikle bitki patojeni funguslarda bulunduğunu ve bu çalışma kapsamında üzerinde çalışılan *F. graminearum*'da da FGSG_04074, FGSG_07988, FGSG_08122 ve FGSG_03662 kodlarıyla 4 adet homoloğunun bulunduğu görülmektedir. Bu genlerin benzerlikleri görmek için yapılan homoloji çalışması bu genlerin FGSG_04074 genine en fazla %50.4 oranında benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Genler arasındaki Cysteine amino asitlerinin yerleri de dahil, önemli farklılıklar olduğu ve benzerlik oranının nispeten düşük olduğu görülmektedir (Şekil 4.40).

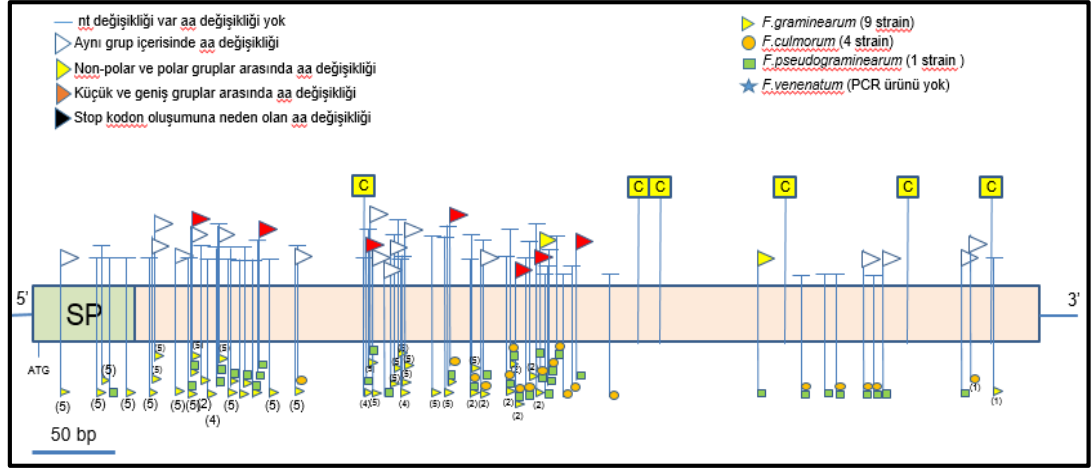
	03662	04074	07988	08122
03662		48.5%	53.5%	40.2%
04074	48.5%		50.4%	49.4%
07988	53.5%	50.4%		39.2%
08122	40.2%	49.4%	39.2%	

Şekil 4.40. FGSG_04074, FGSG_07988, FGSG_03662 ve FGSG_08122 genleri arasındaki genetik uzaklık.

FGSG_09066 geni ile ilgili kısımda detayları verildiği şekilde elde edilen sekans verileri temelinde, FGSG_04074 genine ait BROAD Enstitüsü verileri kullanılarak, sekans dizileri üzerinden genin konsensus dizisi elde edilmiştir. Bu amaçla genin downstream ve upstream bölgesindeki nükleotid dizileri uzaklaştırılmıştır. Gen intron içermediğinde genin geriye kalan kısmı ORF bölgesi olarak kayıt edilmiştir. Protein kodlayan ORF bölgesi içerisine giren mutasyonları görmek için ORF dizileri kullanılarak alignment işlemi yapılmıştır (Şekil 4.41).



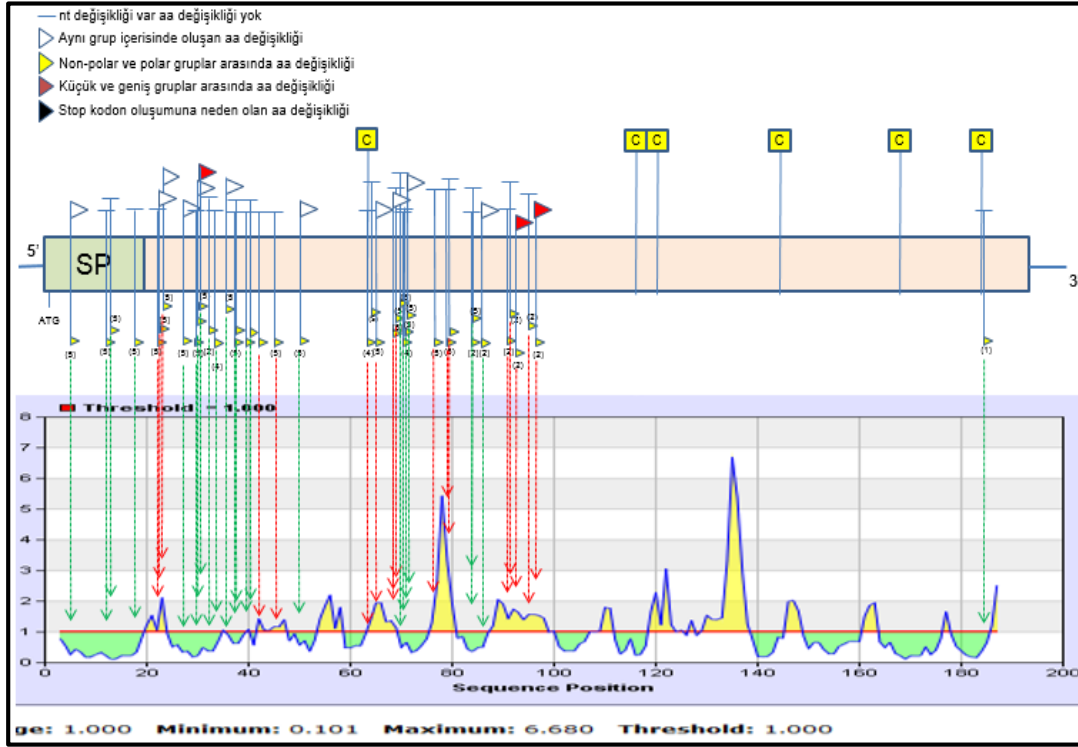
Şekil 4.41. FGSG_04074 genine ait alignment görüntüsü.



Şekil 4.42. FGSG_04074 genine ait allelik varyasyonlar. “SP” sinyal peptid dizisini, “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.

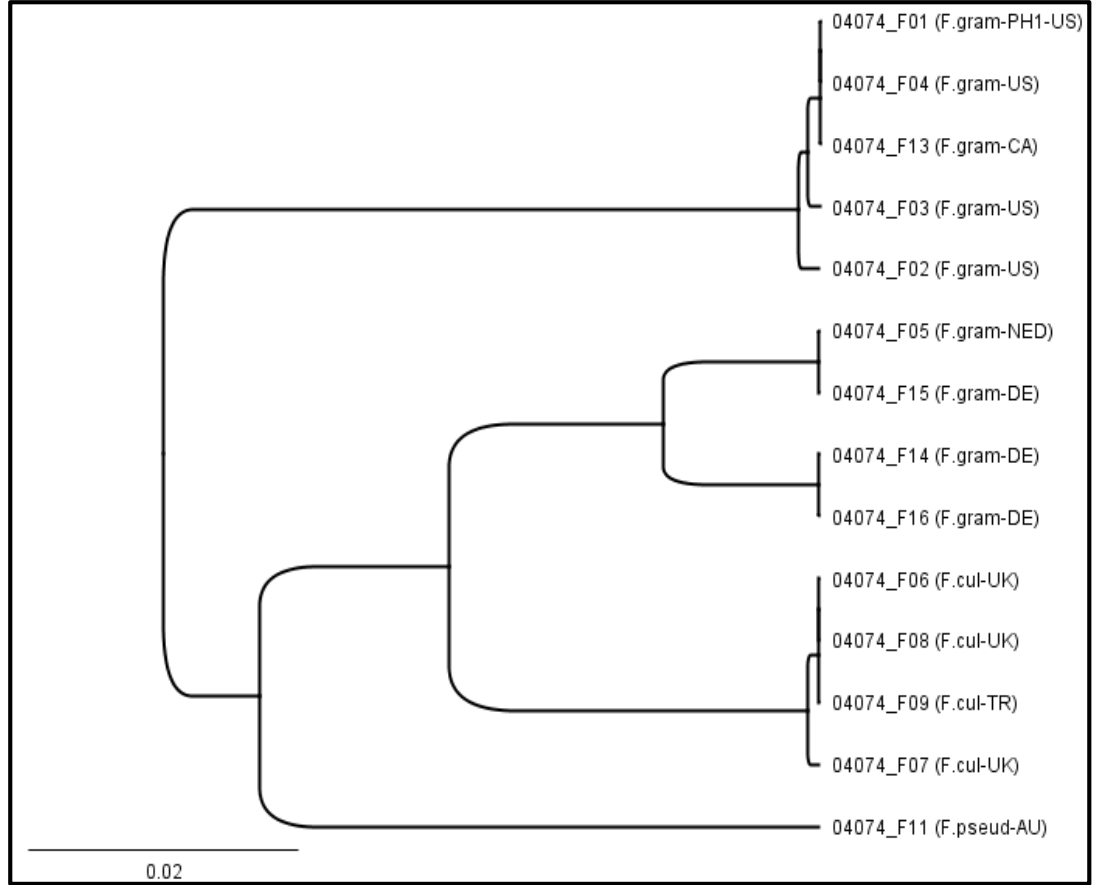
Şekil 4.41 ve 4.42 birlikte incelendiğinde PCR işlemi sonunda, ilgili gene sahip olduğu belirlenen 9 adet *F. graminearum*, 4 adet *F. culmorum* ve 1 adet *F. pseudograminearum* izolatında, genin bazı noktalarında önemli aa değişikliklerine neden olan mutasyonlar olduğu görülmektedir. İlginç bir şekilde *F. graminearum* izolatlarındaki mutasyonların Amerika izolatların ve Avrupa izolatlarında belirgin bir şekilde farklılık gösterdiği görülmektedir. Birleşik Devletler (F01, F02, F03, F04) ve Kanada’dan (F13) izole edilen izolatların 6., 25., 27. ve 52. aa’lerinde protein yapısında herhangi bir radikal değişikliklere neden olmayacağı düşünülen, benzer aa grupları arasında değişimler gözlemlenmiştir. Fakat bu grupta 30. aa pozisyonunda meydana gelen Large non-polar bir aa olan L (Leucine) oluşan mutasyon nedeniyle small non-polar gruptan aa’ine dönüşmüştür. Avrupa grubunda yer alan Hollanda izolatı ile (F05), Almanya izolatlarından birinde (F15), 89. aa pozisyonunda meydana gelen Large non-polar bir aa olan F (Phenylalanine), oluşan mutasyon nedeniyle non-polar gruptan N (Asparagine) aa’ine dönüşmüştür. Bu çok önemli aa değişikliğinin testlenen tüm *F. culmorum* izolatlarında da görülmesi kayda değerdir. Yine aynı Avrupa izolatlarında 94. aa pozisyonunda meydana gelen small non-polar bir aa olan A (Alanine) oluşan mutasyon nedeniyle large non-polar gruptan V (Valine) aa’ine dönüşmüştür. Dört Avrupa izolatının tamamında da görülen ve aa değişikliğine neden olan tek mutasyon 24. aa pozisyonunda meydana gelen ve benzer gruplar arasında oluşan Q (Glutamine) aa’nin E (Glutamate) aa’ine dönüşmesine neden olmuştur.

F. graminearum izolatlarına ait FGSG_04074 geni üzerinde meydana gelen mutasyonların neden olduğu aa değişikliklerinin, proteinin yapısı üzerinde nasıl bir etkiye yol açmış olabileceğini görmek için, Emimi Surface Accessibility Prediction programı (Emimi ve diğ., 1985) kullanılarak oluşturulan diagram Şekil 4.43’de verilmiştir.



Şekil 4.43. *Fusarium graminearum* izolatlarında FGSG_04074 geni üzerindeki mutasyonların ve bunların protein ürününe olası etkilerinin karşılaştırılması.

Diagram incelendiğinde 89. ve 94 aa pozisyonunda bazı izolatlarda meydana gelen mutasyonların proteinin başka proteinlerle etkileşime girdiği bölümlerinden birinde olduğu gözlemlenmektedir. Bu açıdan bu mutasyonlar proteinin işlevi üzerinde değişikliğe yol açabilir. Bu protein ile ilgili yapılan diagramda görülen en ilginç nokta mutasyonların hemen hemen tamamının proteinin amino ucunda ve Cysteine köprülerinden uzak noktalarda oluşmasıdır. Cysteine köprülerinin proteinlerdeki önemi eskiden beri bilinmektedir (Liu ve diğ., 2012) ve belki de bu nedenle bu kısımda oluşan mutasyonlara sahip bireyler fungusun biyolojisi üzerine olan etkilerinden dolayı popülasyondan temizlenmiştir. Alignment işlemleri temelinde oluşturulan soyağacı Şekil 4.44’de verilmiştir.

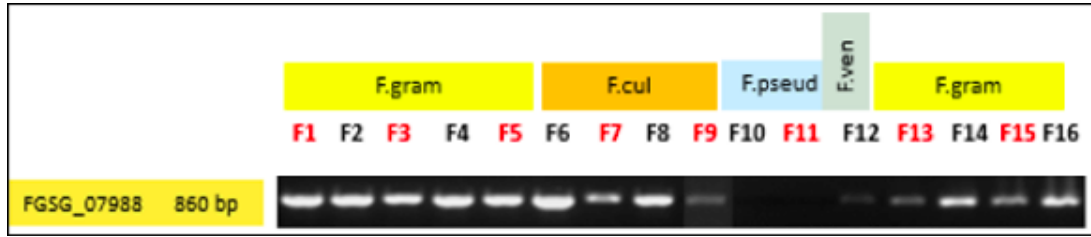


Şekil 4.44. FGSG_04074 geni için nükleotid alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.

Şekil 4.44 incelendiğinde, Amerika kıtasındaki ülkelerde bulunan *F. graminearum* izolatları aynı grup içerisinde yer alırken, aynı fungusun Avrupa İzolatlarının kendi içinde ayrı bir grup oluşturduğu görülmektedir. *F. culmorum* 'a ait Türkiye izolatının, F07 kodlu İngiltere izolatından daha fazla aynı fungusun diğer İngiltere izolatlarına benzediği belirlenmiştir. *F. pseudograminearum* izolatı ise içerdiği mutasyonlar nedeniyle tamamen ayrı bir grup oluşturmuştur.

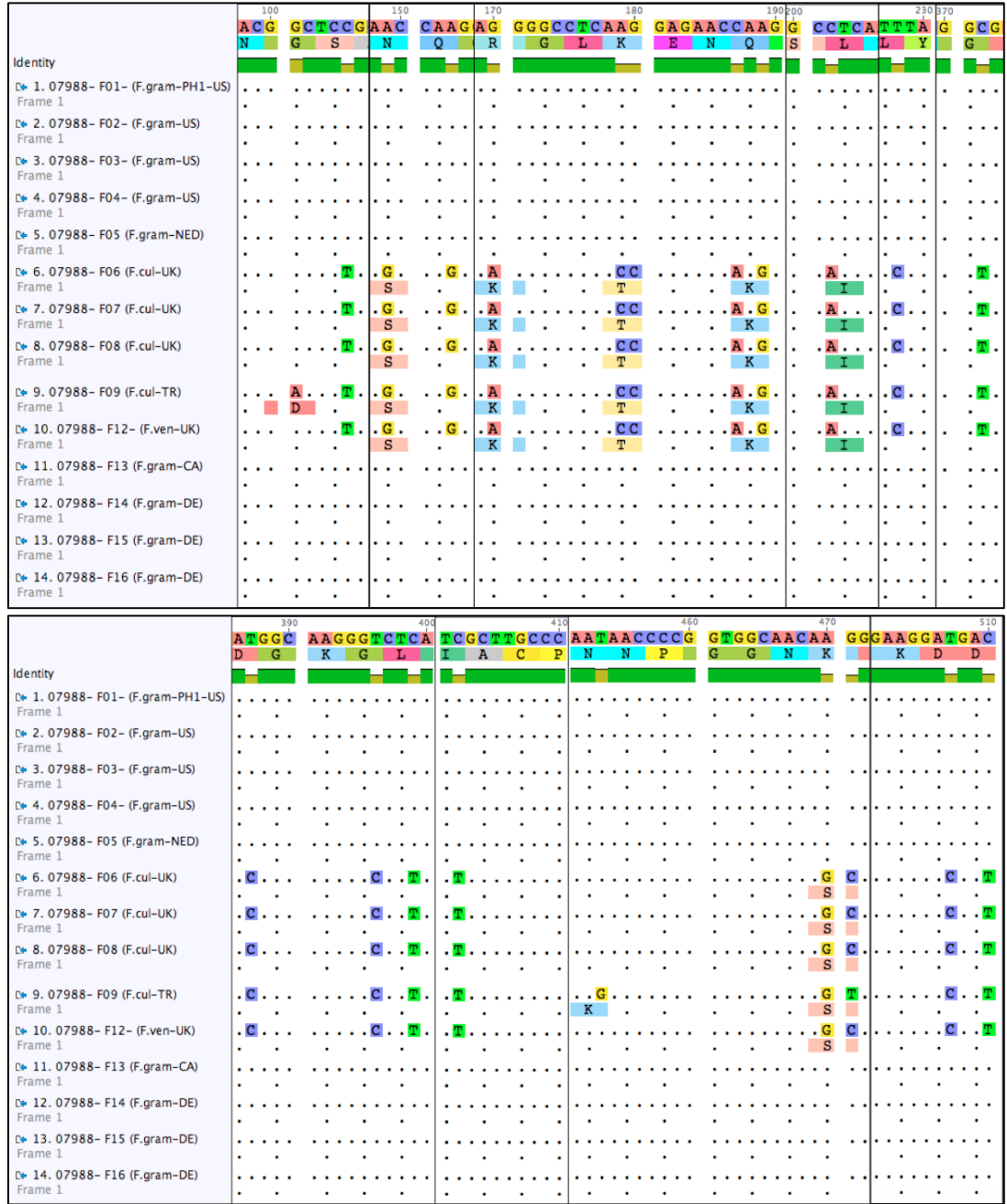
4.2.3.6. FGSG_07988 (*Fusarium graminearum* korunmuş hipotetik protein)

FGSG_07988 geni BROAD verilerine göre 779 nt uzunluğunda olup 180 aa'lık bir proteini kodlamaktadır (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_graminearum/GeneDetails.html?sp=S7000005385041215;29.04.2014). Bu 180 aa'lık proteinin ilk 19 aa'lık kısmı proteinin hücre arasına taşınmasını sağlayan sinyal peptit dizileridir ve bu kısım proteinden uzaklaştırıldığında olgun protein 161 aa'ten oluşmaktadır. Tam protein içerisinde 4 adet Cys aa'ı vardır ve bu da olgun proteinin %2.48'ini ifade etmektedir (Brown ve diğ., 2012). Çalışmamızda sadece *F. graminearum*'a ait olan 9 adet fungal strainde, ülkemizden bir izolata da yer aldığı 4 adet *F. culmorum* straininde ve bir adet *F. venenatum* straininde yaklaşık 860 bp'lık bir PCR ürünü ile tespit edilebilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 2 adet *F. pseudograminearum* straininin hiç birinden PCR ürünü almak mümkün olmamıştır (Şekil 4.45).



Şekil 4.45. FGSG_07988 genine ait jel görüntüsü.

FGSG_07988 genine ait BROAD Enstitüsü verileri kullanılarak, sekans dizileri üzerinden genin konsensus dizisi elde edilmiştir. Bu amaçla genin downstream ve upstream bölgesindeki nükleotid dizileri uzaklaştırılmıştır. Gen intron içermemektedir ve bu nedenle genin tamamı ORF bölgesi olarak kaydedilmiştir. Protein kodlayan ORF bölgesi içerisine giren mutasyonları görmek için ORF dizileri kullanılarak alignment işlemi yapılmıştır (Şekil 4.46).

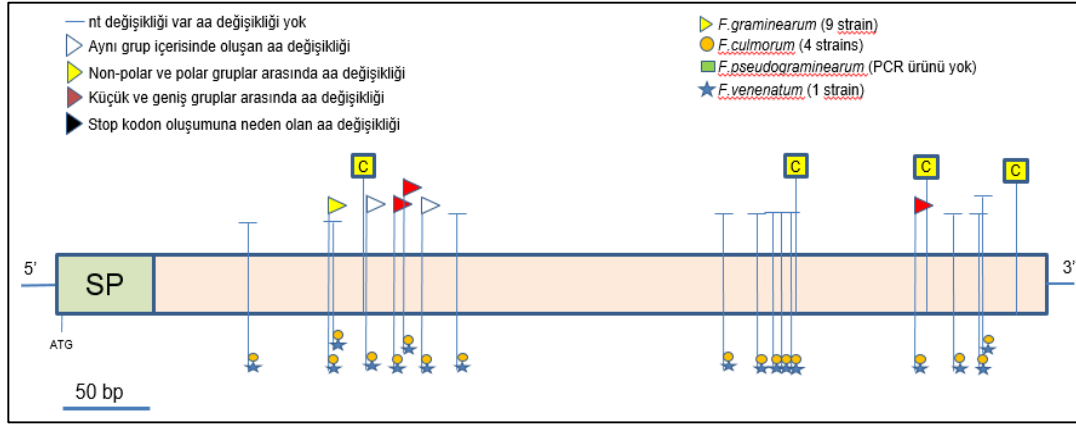


Şekil 4.46. FGSG_07988 genine ait nükleotid alignment görüntüsü.

FGSG_07988 geninin sekanslanan diğer fungal genomlarda herhangi bir homologunun bulunup bulunmadığı, ilgili genin kodu kullanılarak www.fungi.ensemble.org sitesinden yapılan arama sayesinde belirlenmiştir. Oluşan GeneTree EFGT00050000002186 kodlu soyağacı incelendiğinde bu genin aynı fungustaki bir diğer homologunun, daha önce detaylı incelemesi verilen FGSG_04074 kodlu gen olduğu görülmektedir. Elde edilen soyağacı FGSG_04074 ile ilgili bölümde verildiğinden burada tekrar verilmemiştir. İlgili şekil (Şekil 4.39) incelendiğinde bu genin aralarında *Nectria haematococca*, *F. oxysporum*,

Magnaporthe oryzae, *Pyrenophora tritici-repentis* gibi tarımsal açıdan önemli fungal türlerin de bulunduğu 38 farklı fungal genomda, yaklaşık 52 homologunun bulunduğu görülmektedir.

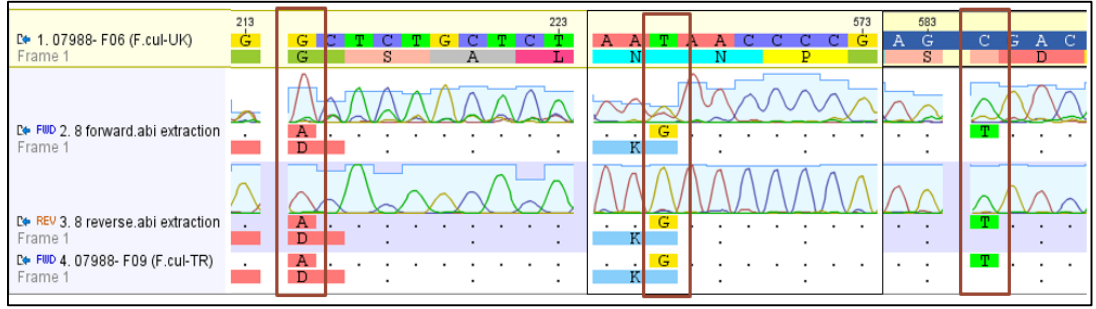
Alignment sonuçlarını daha basit bir şekilde ifade etmek ve yorumlayabilmek için Microsoft PowerPoint programı kullanılarak izolatlar arasındaki allelik varyasyonları gösteren bir grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.47).



Şekil 4.47.FGSG_07988 genine ait allelik varyasyonlar. “SP” sinyal peptid dizisini, “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.

Şekil 4.47 dikkatlice incelendiğinde, *F. graminearum* izolatlarının hiçbirinde herhangi bir nükleotid değişikliği mutasyonu dahi oluşmadığı, gen üzerinde meydana gelen mutasyonların tüm türler göz önüne alındığında çok az sayıda olduğu ve çok önemli aa değişikliklerine yol açmadığı görülmektedir. Daha önce incelemesi tamamlanan ve bu genin *F. graminearum* genomundaki homologlarından biri olan FGSG_04074’ün gösterdiği yüksek polimorfizm düzeyi düşünüldüğünde, bu genin bu denli korunmuş olması ilginçtir ve genin işlevinin fungusun yaşamı açısından çok önemli olabileceği şeklinde yorumlanabilir. İncelenen 4 adet *F. culmorum* izolatının bazılarında aa değişikliğine neden olan nükleotid mutasyonların gerçekleştiği görülmüştür. Bu mutasyonların bazılarının proteinin yapısında değişikliğe neden olabilecek ciddi aa mutasyonlarına neden olduğu saptanmıştır. *F. culmorum*’a ait FO9 kodlu Türkiye izolatında diğer *F. culmorum* izolatlarında görülmeyen bir takım nükleotid mutasyonları tespit edilmiştir ve bunların bazıları aa değişikliklerine neden olmuştur. Örneğin 213. nükleotid pozisyonundaki G→ A mutasyonu, bu pozisyonundaki small nonpolar gruptan bir aa olan G (Glycine)’in aynı gruptan A (Alanine) aa’ine; 566. Nükleotid pozisyonundaki T→ G değişikliği, bu pozisyonundaki small polar gruptan N (Asparagine) aa’inin, small nonpolar gruptan G (Glycine)

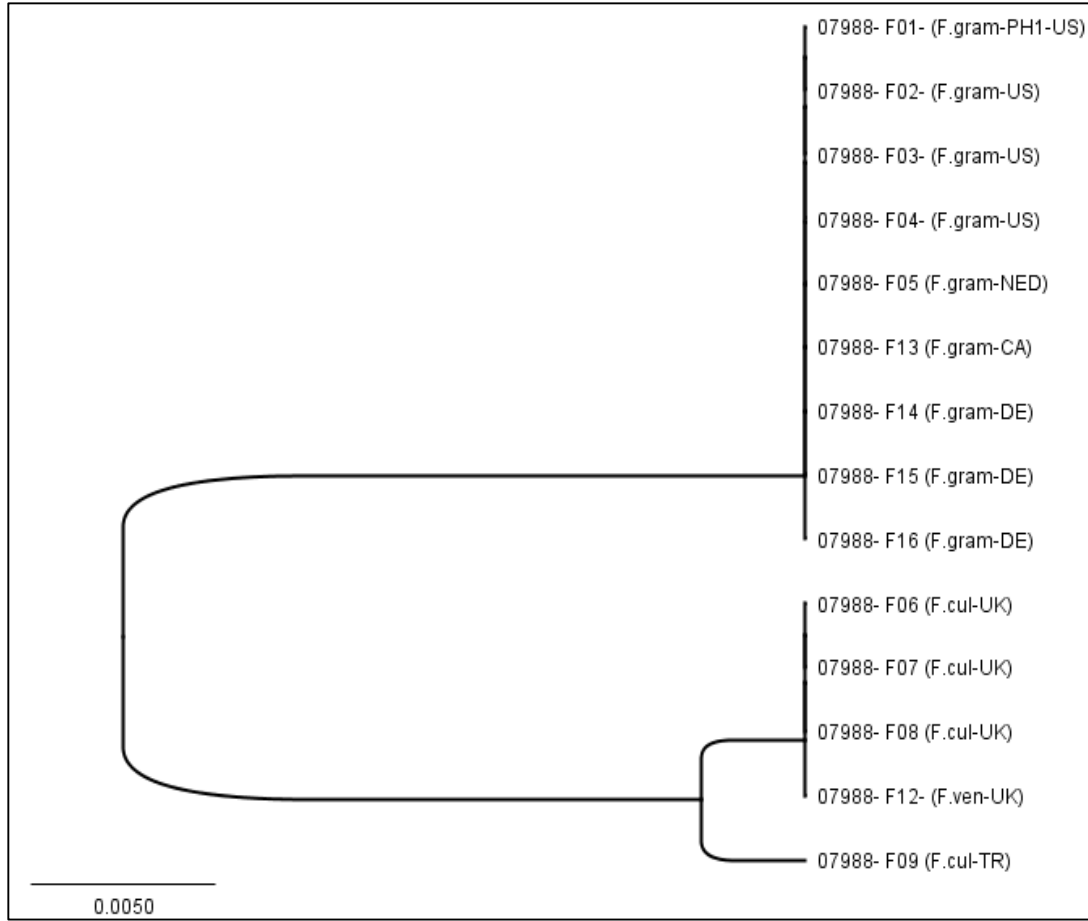
aa'ine dönüşmesine neden olmuştur. 584. nükleotid pozisyonundaki C → T mutasyonu ise herhangi bir aa değişikliğine neden olmamıştır. (Şekil 4.48).



Şekil 4.48. Türkiye'ye ait *Fusarium culmorum* straininde oluşan ekstra mutasyonlar.

İlginç bir şekilde -Türkiye izolatının gösterdiği ekstra mutasyonlar hariç olmak üzere- *F. culmorum* strainlerinde taranan mutasyonların, aynı nükleotid pozisyonlarında *F. venenatum* izolatında da tespit edildiği görülmektedir. Türkiye izolatı dışındaki *F. culmorum* izolatlarını sekans analizleri yoluyla bile *F. venenatum* izolatlarından ayırt etmek mümkün olmamıştır. *F. graminearum* izolatlarında meydana gelen mutasyonlar herhangi bir aa değişikliğine neden olmadıkları için, önemli mutasyonların olduğu önceki genlerin bazıları için yapılan; aa değişikliklerinin, proteinin yapısı üzerinde nasıl bir etkiye yol açmış olabileceğini gösteren, Emmini Surface Accessibility Prediction programı (Emmini ve diğ., 1985) kullanılarak herhangi bir diagram oluşturulmamıştır.

Nükleotid alignment verileri kullanılarak oluşturulan soyağacı şekil 4.49'de verilmiştir.



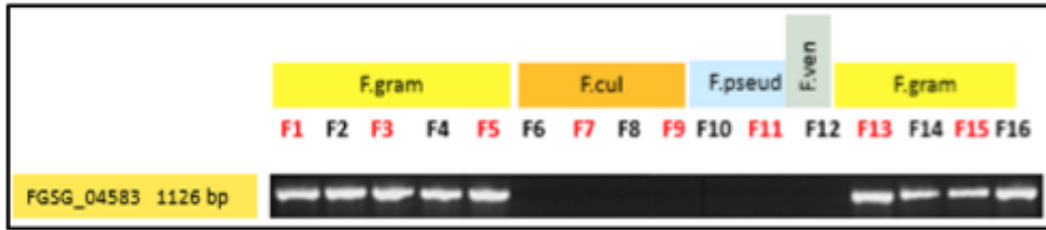
Şekil 4.49. FGSG_07988 geni için alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.

Şekil 4.49 incelendiğinde incelenen türler temelinde 2 temel grup oluştuğu görülmektedir. *F. graminearum* grubu içerisinde izolatlarda herhangi bir mutasyon oluşmadığı için tüm strainler aynı grup içerisinde yer almıştır. Diğer grup ise yukarıdaki paragrafta detayları tartışıldığı üzere *F. culmorum*'un İngiltere izolatları ile yine İngiltereden izole edilen *F. venenatum* izolatu aynı grup içerisinde yer alırken, *F. culmorum* Türkiye izolatu, içerdiği ekstra mutasyonlar nedeniyle ayrı bir küçük grup oluşturmuştur.

Yüksek derecede korunmuş olması, farklı coğrafik alanlardan izole edilen izolatlarda bile bir SNP mutasyonunun bile olmaması nedeniyle, FGSG_07988 geninin *F. graminearum*'un diğer fungal türlerden, özellikle de *F. culmorum*, *F. pseudograminearum* gibi çok yakın türlerden, sekans analizleri yoluyla ayrılmasında kullanılabileceğini görülmektedir.

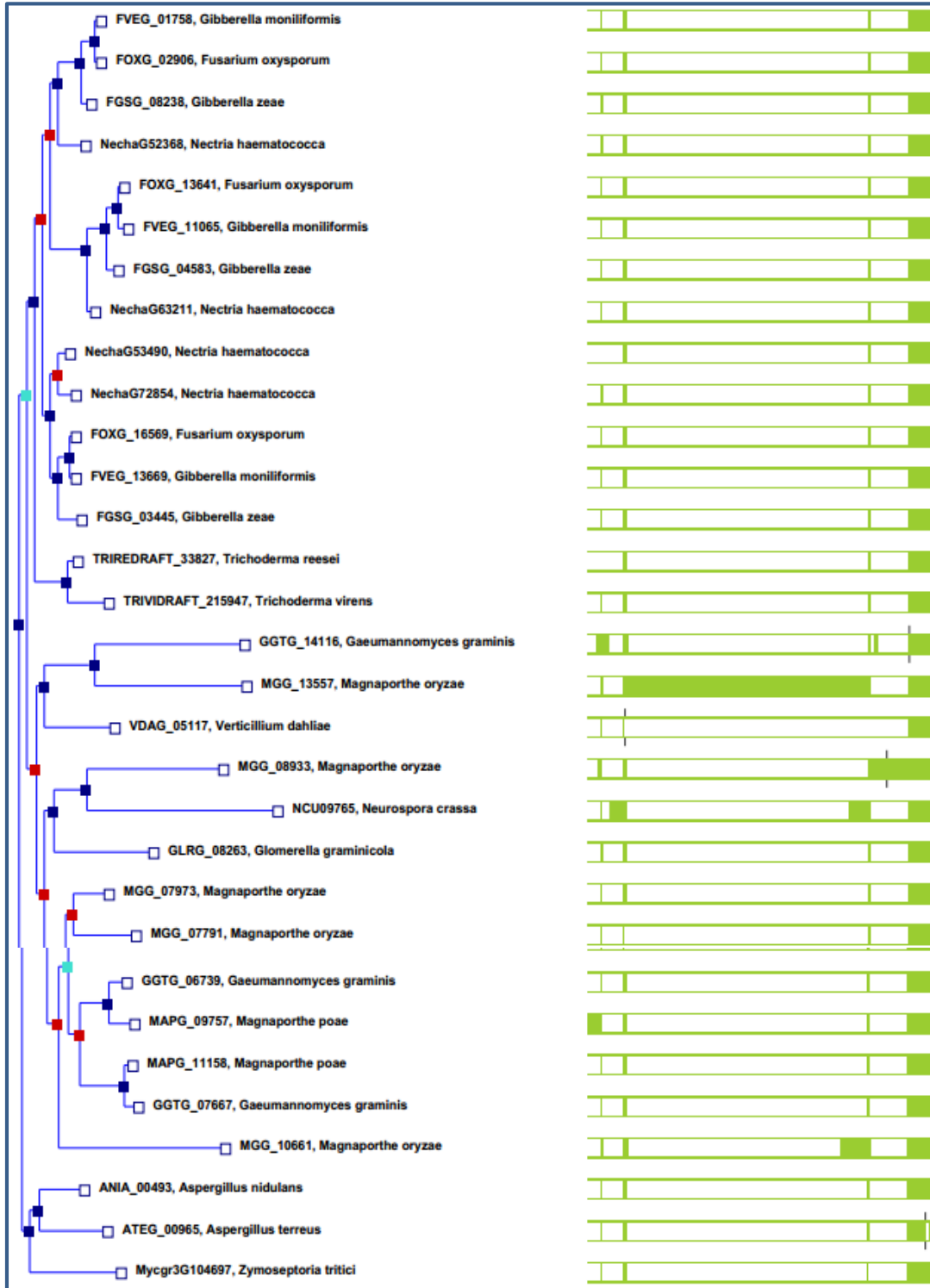
4.2.3.7 FGSG_04583 (*Fusarium graminearum* korunmuş hipotetik protein)

FGSG_04583 geni BROAD verilerine göre 447 nt uzunluğunda olup 148 aa'lık bir proteini kodlamaktadır (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_graminearum/GeneDetails.html?sp=S7000005385106321;29.04.2014). Bu 149 aa'lık proteinin ilk 18 aa'lık kısmı proteinin hücre arasına taşınmasını sağlayan sinyal peptit dizileridir ve bu kısım proteinden uzaklaştırıldığında olgun protein 131 aa'ten oluşmaktadır. Tam protein içerisinde 4 adet Cys aa'i vardır ve bu da olgun proteinin %3.08'ini ifade etmektedir (Brown ve diğ., 2012). Çalışmamızda sadece *F. graminearum*'a ait olan 9 adet fungal strainde 1126 bp'lik bir PCR ürünü ile tespit edilebilmiştir (Şekil 4.50).

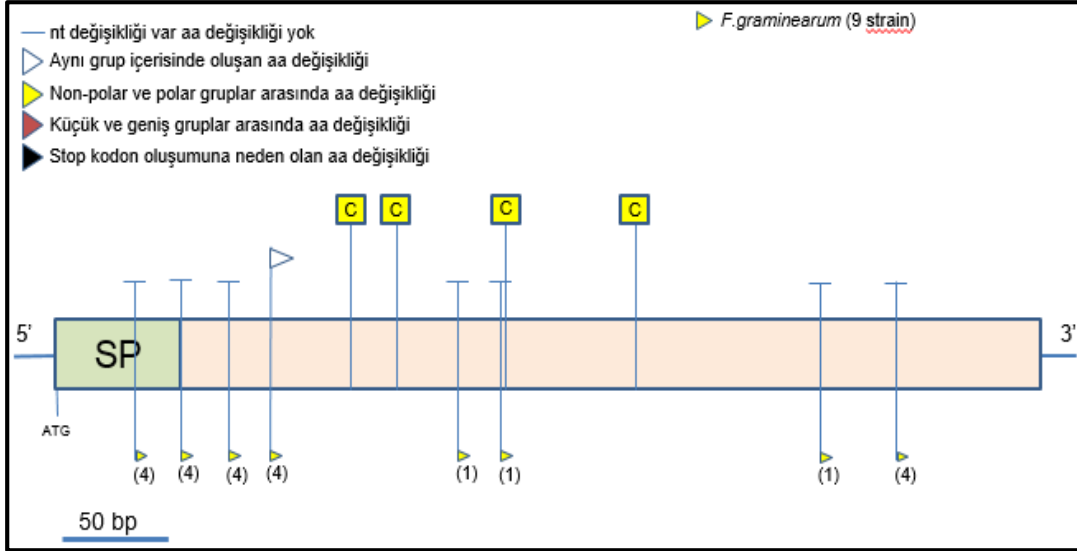


Şekil 4.50. FGSG_04583 genine ait jel görüntüsü.

FGSG_04583 geninin sekanslanan diğer fungal genomlarda herhangi bir homologunun bulunup bulunmadığı, ilgili genin kodu kullanılarak www.fungi.ensemble.org sitesinden yapılan arama sayesinde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.55'de verilmektedir. İlgili Şekil incelendiğinde bu genin aralarında *Aspergillus nidulans*, *A. flavus*, *Zymoseptoria tritici*, *Nectria haematococca*, *F. oxysporum* ve *Gibberella moniliformis*, *Magnaporthe oryza* gibi tarımsal açıdan önemli fungal türlerin de bulunduğu 20 farklı fungal genomda, yaklaşık 31 homologunun bulunduğu görülmektedir (Şekil 4.51).



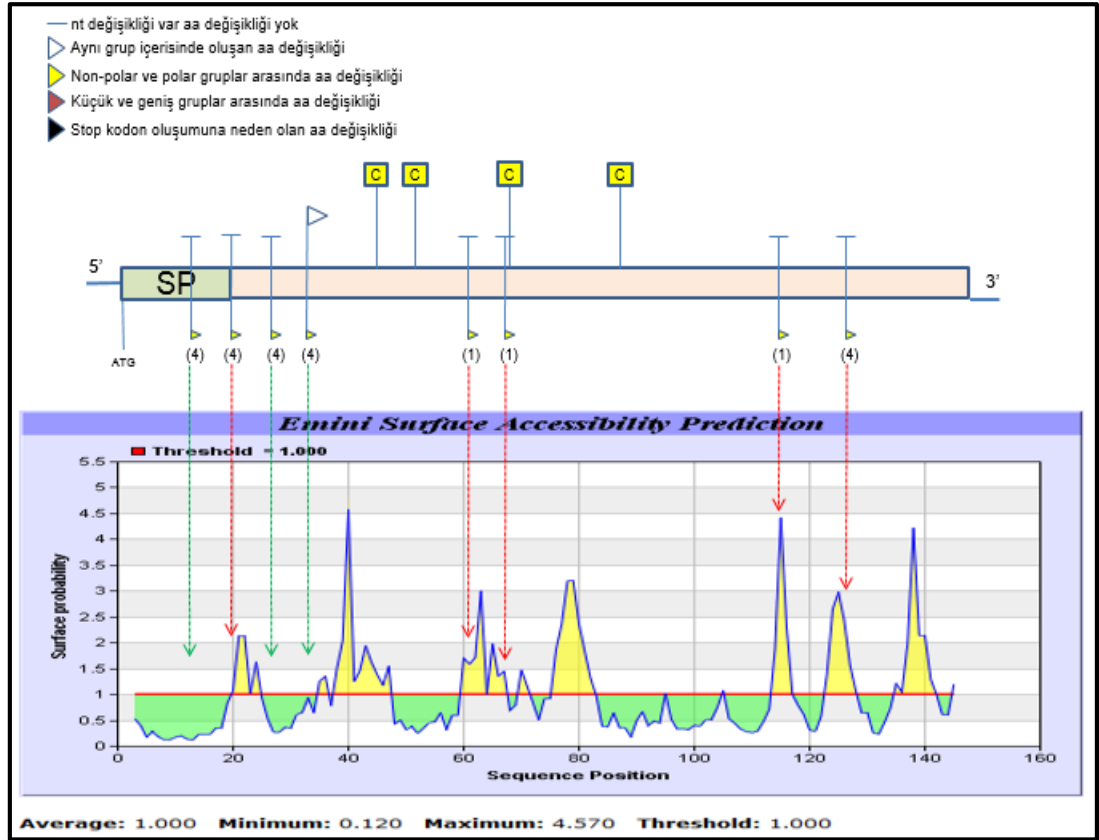
Şekil 4.51. FGSG_04583 geninin homoloji durumunu gösteren analiz (GeneTree EFGT00050000008285).



Şekil 4.53.FGSG_04583 genine ait allelik varyasyonlar. “SP” sinyal peptid dizisini, “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.

Şekil 4.53 dikkatlice incelendiğinde gen üzerinde meydana gelen mutasyonların çok az sayıda olduğu ve çok önemli aa değişikliklerine yol açmadığı görülmektedir. Aa değişikliğine yol açan tek mutasyon Birleşik Devletler İzolatlarının tamamında 32 aa pozisyonundaki small non-polar gruptan T (Threonine), aynı gruptan A (Alanine) aa’ine dönüşmüştür. Diğer nükleotid değişikliklerinin hiçbirinin aa değişikliğine neden olmadığı görülmektedir. İlginç bir şekilde nükleotid mutasyonlarının izolatların coğrafik orjinine uygun bir şekilde dağılım gösterdiği görülmektedir. Örneğin bazı mutasyonlar sadece Avrupa izolatların arasında görülürken, bazıları sadece Amerika orjinli izolatlarda görülmektedir. Bu durum nükleotid alignment verileri kullanılarak oluşturulan soyağacında daha net bir şekilde ortaya çıkmaktadır (Şekil 4.55).

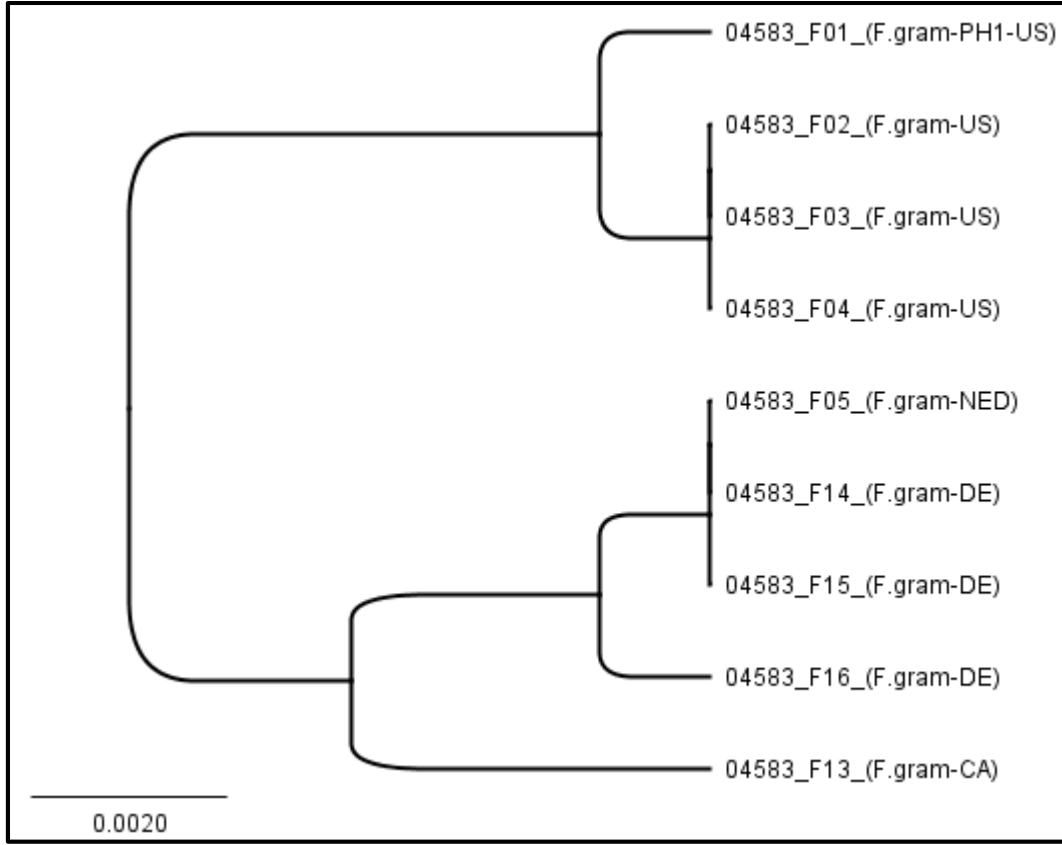
F. graminearum strainlerine ait FGSG_04583 geni üzerinde meydana gelen mutasyonların neden olduğu aa değişikliklerinin, proteinin yapısı üzerinde nasıl bir etkiye yol açmış olabileceğini görmek için, Emmini Surface Accessibility Prediction programı (Emmini ve diğ., 1985) kullanılarak oluşturulan diagram Şekil 4.54’de verilmiştir.



Şekil 4.54. *Fusarium graminearum* izolatlarında FGSG_04583 geni üzerindeki mutasyonların ve bunların protein ürününe olası etkilerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.54 incelendiğinde FGSG_04583 geni üzerinde *F. graminearum* izolatlarında 8 noktada oluşan mutasyonların sadece 1'i aa değişikliğine neden olmuş, ve bu değişiklik de proteinin yüzey kısmında yer alabilecek bir noktada oluşmamıştır. Bu durum, genin ürünü olan proteinin fonksiyonuna, mutasyonun etkilerinin nispeten daha az olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Nükleotid alignment verileri kullanılarak oluşturulan soyağacı Şekil 4.55'de verilmiştir.

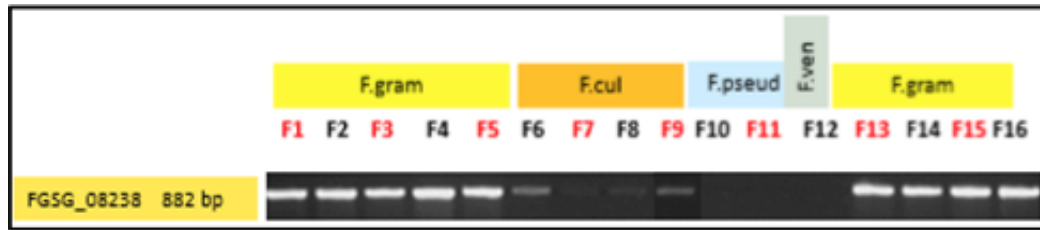


Şekil 4.55. FGSG_04583 geni için alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.

Şekil incelendiğinde iki temel grup olduğu görülmektedir. Bunlardan ilki Birleşik Devletler izolatlarının (F01, F02, F03, F04) yer aldığı grup ve diğeri Kanada izolatın (F13)'dan ayrıldığı görülen Avrupa izolatlarının oluşturduğu gruptur. Kümelenmenin coğrafik olarak tutarlı bir şekilde olduğu görülmektedir.

4.2.3.8 FGSG_08238 (*Fusarium graminearum* korunmuş hipotetik protein)

FGSG_08238 geni BROAD verilerine göre 447 nt uzunluğunda olup 147 aa'lık bir proteini kodlamaktadır (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_graminearum/GeneDetails.html;jsessionid=A57BBD2539AF65B17C7FCB7F942FABDF.route980?sp=S7000005385039806; 29.04.2014). Bu 147 aa'lık proteinin ilk 20 aa'lık kısmı proteinin hücre arasına taşınmasını sağlayan sinyal peptit dizileridir ve bu kısım proteinden uzaklaştırıldığında olgun protein 127 aa'ten oluşmaktadır. Tam protein içerisinde 4 adet Cys aa'i vardır ve bu da olgun proteinin %3.15'ini ifade etmektedir (Brown ve diğ., 2012). Çalışmamızda sadece *F. graminearum*'a ait olan 9 adet fungal strainde ve ülkemizden bir izolattın da yer aldığı 4 adet *F. culmorum* straininde, yaklaşık 882 bp'lik bir PCR ürünü ile tespit edilebilmiştir (Şekil 4.56).



Şekil 4.56. FGSG_08238 genine ait jel görüntüsü.

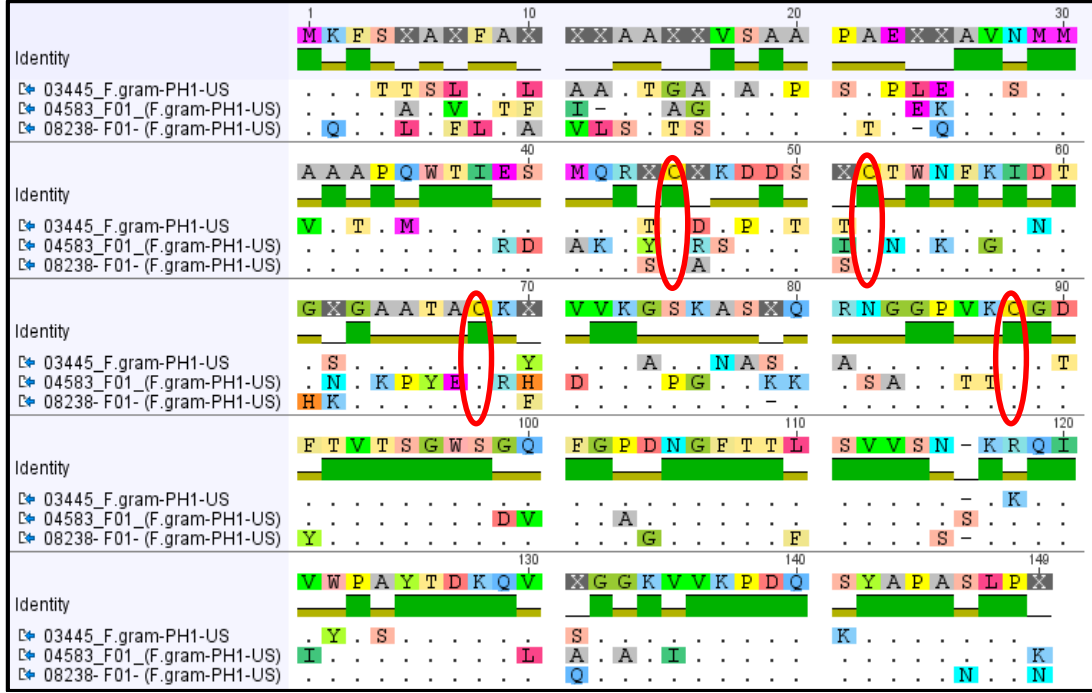
FGSG_08238 genine ait BROAD Enstitüsü verileri kullanılarak, sekans dizileri üzerinden genin konsensus dizisi elde edilmiştir. Bu amaçla genin downstream ve upstream bölgesindeki nükleotid dizileri uzaklaştırılmıştır. Gen intron içermemektedir ve bu nedenle genin tamamı ORF bölgesi olarak kaydedilmiştir. Protein kodlayan ORF bölgesi içerisine giren mutasyonları görmek için ORF dizileri kullanılarak alignment işlemi yapılmıştır (Şekil 4.57).

																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Şekil 4.57. FGSG_8238 genine ait Geneious programında oluşturulan nükleotid alignment görüntüsü.

FGSG_08238 geninin sekanslanan diğer fungal genomlarda herhangi bir homologunun bulunup bulunmadığı, ilgili genin kodu kullanılarak www.fungi.ensemble.org sitesinden yapılan arama sayesinde belirlenmiştir. Yapılan aramada ilgili gen için oluşturulan GeneTree EFGT00050000008285 kodlu homoloji ağacının bir önceki sırada incelenen FGSG_04583 kodlu gen için üretilen ağaç ile aynı olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle ilgili homoloji ağacı burada

verilmemiştir. Bu ağaç ilgili bölümde incelendiğinde bu fungusta FGSG_04583, FGSG_08238 ve FGSG_03445 kodlarıyla üç adet homolog gen bulunduğu tespit edilmiştir. İlgili genlerin BROAD verileri kullanılarak elde edilen nükleotid verileri üzerinden yapılan alignment işlemine ait sonuçlar şekil 4.58’de verilmektedir.



Şekil 4.58. FGSG_08238-04583 ve 03445 genlerinin homoloji durumunu gösteren Geneious programında oluşturulan nükleotid alignment görüntüsü.

Bu veriler kullanılarak genler arasındaki genetik uzaklığı ortaya koymak için Geneious programında hazırlanan çizelge 4.5 aşağıda verilmiştir.

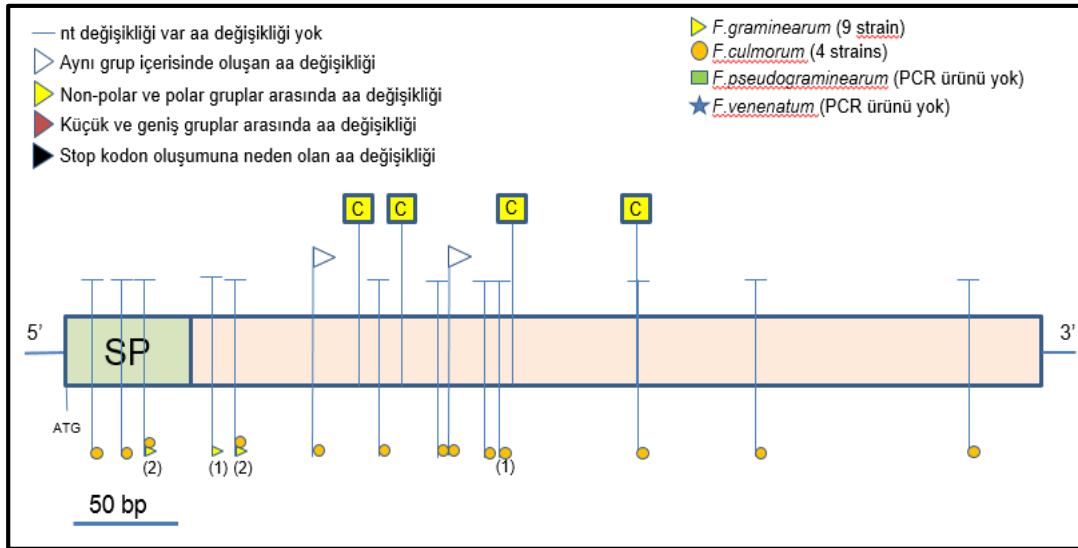
Çizelge 4.5. FGSG_08238-04583 ve 03445 genlerinin genetik uzaklıkları.

	03445_F.gra...	04583_F01_...	08238-F01-...
03445_F.gram-PH1-US		53.4%	66.7%
04583_F01_(F.gram-PH1-US)	53.4%		61.7%
08238-F01-(F.gram-PH1-...	66.7%	61.7%	

Şekil 4.58 ve Çizelge 4.5 birlikte incelendiğinde bu çalışma kapsamında seçilen ve analizleri yapılan FGSG_04583 ve FGSG_08238 genlerinin birbirlerine %61.7 oranında benzedikleri belirlenmiştir. Bu bölümde incelenen FGSG_08238 geni ile homolog olan fakat Brown ve diğ., (2012) tarafından yapılan çalışmada *F.graminearum* secretomunu oluşturan 1369 adet gen içerisinde yer almayan FGSG_03445 geni daha yüksek oranda (%66.7) homoloji göstermiştir. Bu homolog genler için yapılan protein alignment şekli dikkatli incelendiğinde, bu 3 homolog gen

arasındaki en yüksek farklılığın, proteinin hücre arasında salınmasını yöneten ve ilk 20 aa'ten oluşan bölümde olduğu görülmektedir. Brown ve diğ., (2012) tarafından yapılan çalışmada FGSG_03445 kodlu genin *F. graminearum* secretomu içerisinde tespit edilememesinin nedeni muhtemelen sinyal peptit bölgesindeki bu yüksek varyasyondan kaynaklanmaktadır. Yine ilginç bir şekilde homoloji gösteren bu üç gende de aynı aa pozisyonunda, 4'er adet Cysteine aa'ı olduğu ve bunların korunmuş olduğu görülmektedir. Bu durum Cysteinlerin proteinin işlevi üzerindeki etkinliğini ortaya koymaktadır.

Alignment sonuçlarını daha basit bir şekilde ifade etmek ve yorumlayabilmek için Microsoft PowerPoint programı kullanılarak izolatlar arasındaki allelik varyasyonları gösteren bir grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.59).

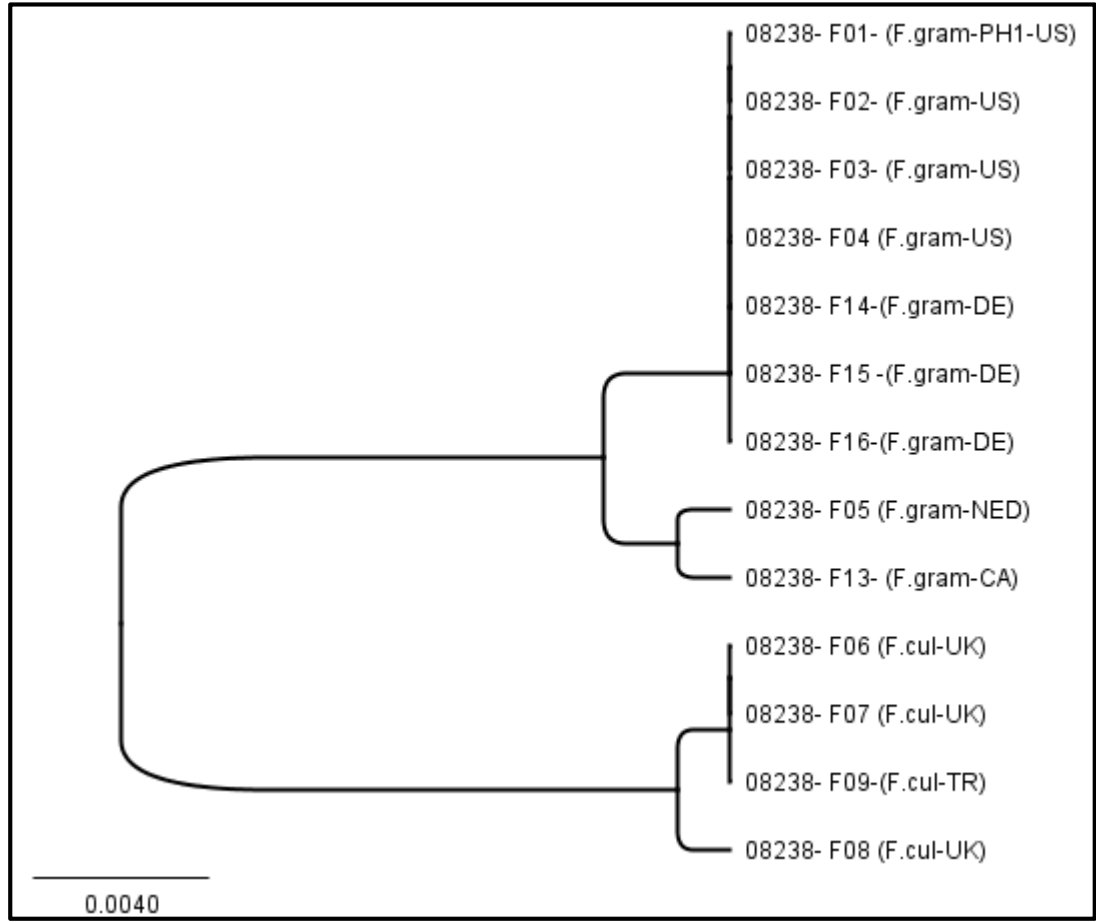


Şekil 4.59. FGSG_08238 genine ait allelik varyasyonlar. “SP” sinyal peptid dizisini, “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.

Şekil 4.59 dikkatlice incelendiğinde gen üzerinde meydana gelen mutasyonların bu genin homoloğu olan bir önceki FGSG_04583 geninde olduğu gibi çok az sayıda olduğu ve çok önemli aa değişikliklerine yol açmadığı görülmektedir. Öyle ki *F. graminearum* izolatlarının hiçbirinde aa değişikliğine yol açan bir mutasyon oluşmadığı tespit edilmiştir. Tüm *F. culmorum* izolatlarının tamamında 39 aa pozisyonundaki small non-polar gruptan S (Serine), yine aynı gruptan T (Threonine) aa’ine; 68. aa pozisyonundaki small polar gruptan D (Aspartic acid), aynı gruptan N (Asparagine) aa’tine dönüşmüştür. Diğer nükleotid değişikliklerinin hiçbirinin aa değişikliğine neden olmadığı görülmektedir. *F. graminearum* izolatlarından Kanada (F13) ve Hollanda (F05) izolatlarında birkaç yerde aynı

noktada benzer mutasyonlar oluşmuştur. Bu mutasyonların herhangi bir aa değişikliğine neden olmadıkları görülmüştür. Bu nedenle diğer izolatlar için yapılan aa değişikliklerinin, proteinin yapısı üzerinde nasıl bir etkiye yol açmış olabileceğini gösteren, Emmini Surface Accessibility Prediction programı (Emmini ve diğ., 1985) kullanılarak herhangi bir diagram oluşturulmamıştır.

Nükleotid alignment verileri kullanılarak oluşturulan soyağacı Şekil 4.60'da verilmiştir.

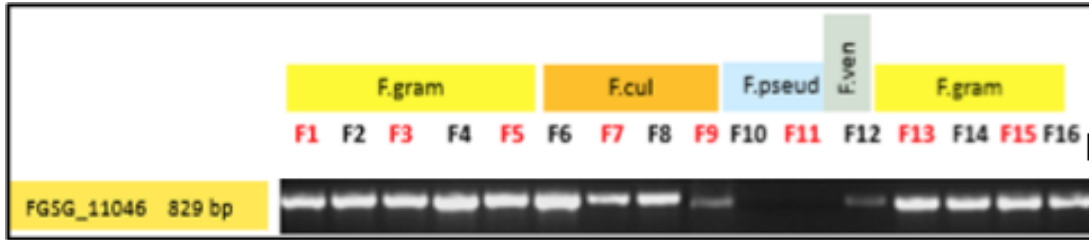


Şekil 4.60. FGS_08238 geni için alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.

Şekil incelendiğinde incelenen türler temelinde iki temel grup olduğu görülmektedir. Kanada (F13) ve Hollanda (F05) İzolatlarının, sahip oldukları ortak birkaç nükleotid mutasyonları nedeniyle, *F. graminearum* izolatların içerisinde küçük bir grup oluşturdukları görülmektedir. *F. culmorum* izolatların içerisinde ise F08 kodlu İngiltere izolatı ayrı bir grup oluşturmuştur. Türkiye izolatı ise diğer İngiltere izolatları ile aynı grupta yer almıştır.

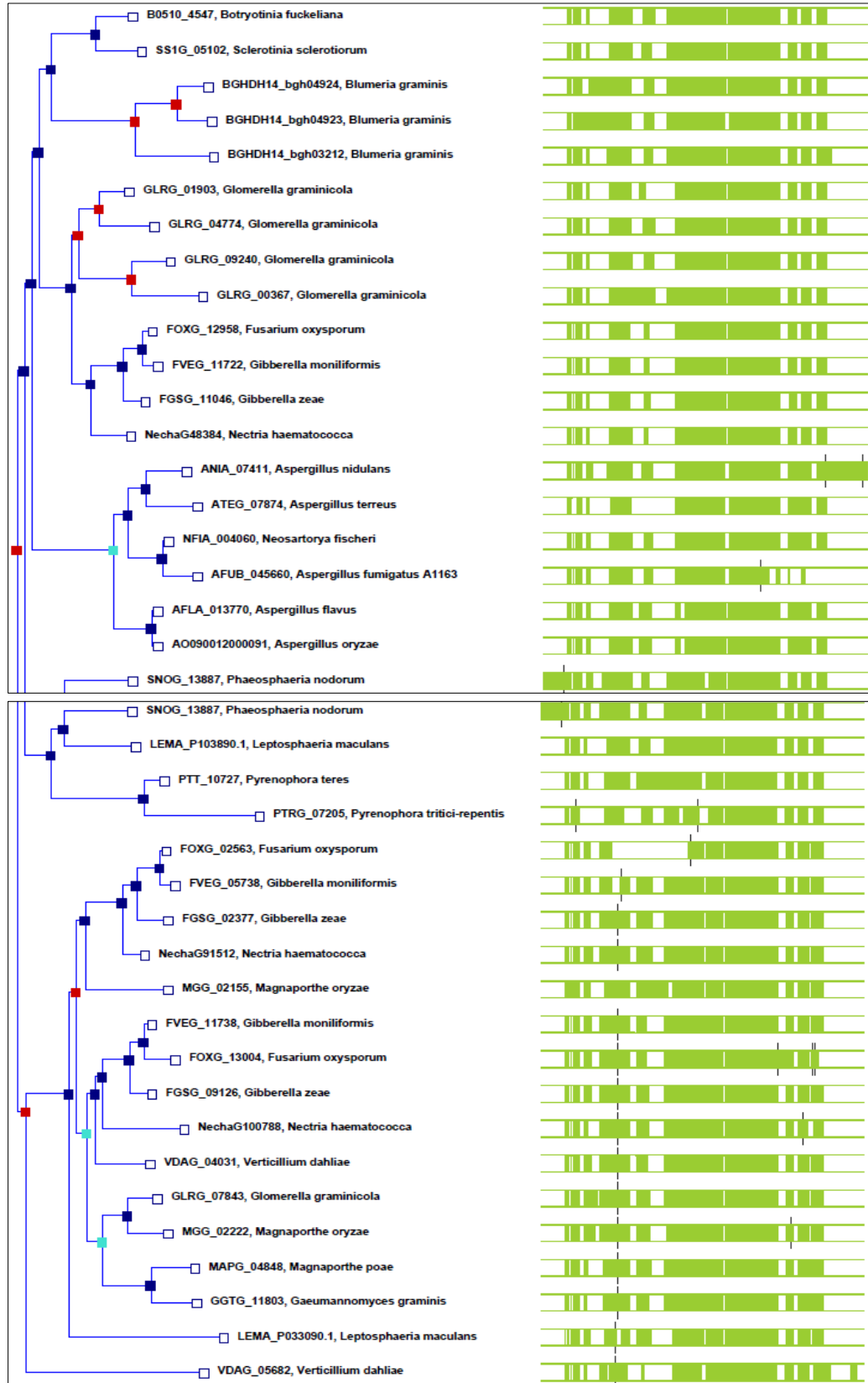
4.2.3.9. FGSG_11046 (*Fusarium graminearum* korunmuş hipotetik protein)

FGSG_11046 geni BROAD verilerine göre 696 nt uzunluğunda olup 232 aa'lık bir proteini kodlamaktadır (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_graminearum/GeneDetails.html?sp=S7000005384995024;29.04.2014). Bu 232 aa'lık proteinin ilk 21 aa'lık kısmı proteinin hücre arasına taşınmasını sağlayan sinyal peptit dizileridir ve bu kısım proteinden uzaklaştırıldığında olgun protein 211 aa'ten oluşmaktadır. Tam protein içerisinde 4 adet Cys aa'i vardır ve bu da olgun proteinin %1.9'unu ifade etmektedir (Brown ve diğ., 2012) Çalışmamızda sadece *F. graminearum*'a ait olan 9 adet fungal strainde, ülkemizden bir izolatin da yer aldığı 4 adet *F. culmorum* straininde ve bir adet *F. venenatum* straininde yaklaşık 829 bp'lık bir PCR ürünü ile tespit edilebilmiştir (Şekil 4.61).



Şekil 4.61. FGSG_11046 genine ait jel görüntüsü.

FGSG_11046 geninin sekanslanan diğer fungal genomlarda herhangi bir homologunun bulunup bulunmadığı, ilgili genin kodu kullanılarak www.fungi.ensemble.org sitesinden yapılan arama sayesinde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 4.62'de verilmektedir. İlgili şekil incelendiğinde bu genin aralarında *Aspergillus nidulans*, *A. flavus*, *G. graminis*, *N. haematococca*, *F. oxysporum* ve *Gibberella moniliformis*, *Magnaporthe oryzae*, *P. tritici repentis*, *S. sclerotiorum*, *Phaeosphaeria nodorum* gibi tarımsal açıdan önemli fungal türlerin de bulunduğu 27 farklı fungal genomda, yaklaşık 39 homologunun bulunduğu görülmektedir (Şekil 4.62).



Şekil 4.62. FGSG_11046 geninin homoloji durumunu gösteren analiz (GeneTree EFGT00050000003747).

Şekil 4.66 incelendiğinde bu fungusta FGSG_11046 geninin, bugüne kadar tam genom sekans analizleri tamamlanan *F. graminearum* dışındaki diğer iki *Fusarium* türü olan *F. oxysporum* ve *F. verticillioides*'te de bazı homologlarının olduğu görülmektedir. Bu genler *F. oxysporum*'da FOXG_12958-02563 ve 13004; *F. verticillioides*'te FVEG_11738-05738 ve 11722 kodlu genlerdir. Yine *F. graminearum*'un kendisinde de FGSG_11046'nın FGSG_09126 ve 02377 gen kodlarıyla iki homoloğu bulunmaktadır. İlgili genlerin BROAD verileri kullanılarak elde edilen nükleotid verileri üzerinden yapılan alignment işlemine ait sonuçlar şekil 4.63'de verilmektedir.



Şekil 4.63. *F. graminearum*'a ait FGSG_11046 geninin aynı fungusta ve *F. oxysporum* ile *F. verticillioide*s'te bulunan homologlarının homoloji durumunu gösteren Geneious programında oluşturulan nükleotid hizalama görüntüsü.

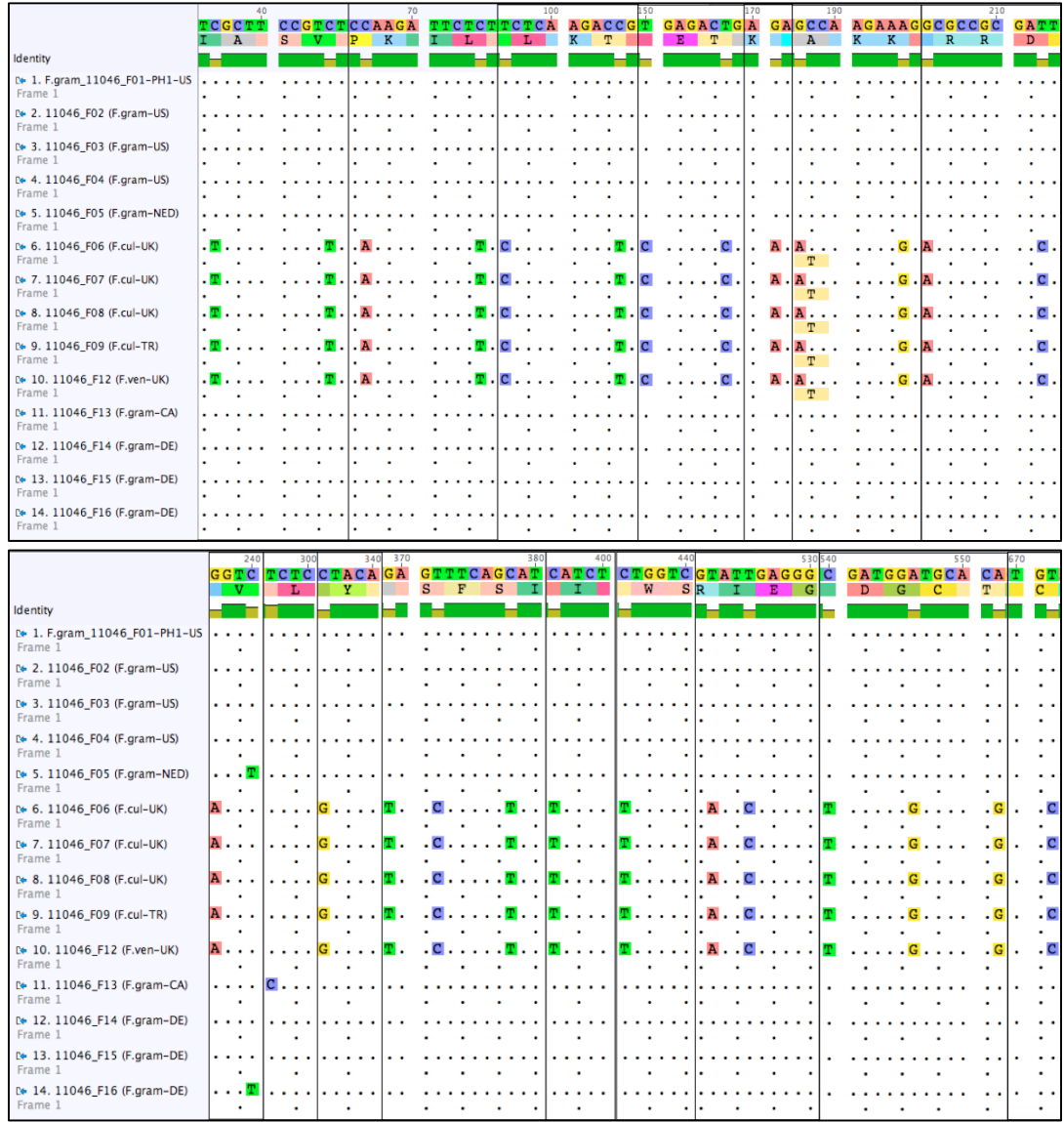
Bu veriler kullanılarak genler arasındaki genetik uzaklığı ortaya koymak için Geneious programında hazırlanan çizelge 4.6 aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.6. FGSG_11046 geninin farklı funguslardaki homologlarının genetik uzaklıkları.

	F.gram_023...	F.gram_091...	F.gram_110...	F.oxy_02563	F.oxy_12958	F.oxy_13004	F.vert_05738	F.vert_11722	F.vert_11738
F.gram_02377-PH1-US		45.3%	24.8%	85.1%	20.6%	44.6%	71.8%	21.3%	44.0%
F.gram_09126-PH1-US	45.3%		25.5%	55.9%	22.6%	83.0%	44.8%	24.6%	84.1%
F.gram_11046_F01-PH1-US	24.8%	25.5%		30.1%	77.2%	26.8%	27.2%	75.5%	26.8%
F.oxy_02563	85.1%	55.9%	30.1%		26.6%	58.0%	97.2%	26.6%	57.0%
F.oxy_12958	20.6%	22.6%	77.2%	26.6%		24.3%	22.2%	91.3%	24.7%
F.oxy_13004	44.6%	83.0%	26.8%	58.0%	24.3%		44.8%	26.0%	92.3%
F.vert_05738	71.8%	44.8%	27.2%	97.2%	22.2%	44.8%		21.8%	43.8%
F.vert_11722	21.3%	24.6%	75.5%	26.6%	91.3%	26.0%	21.8%		26.0%
F.vert_11738	44.0%	84.1%	26.8%	57.0%	24.7%	92.3%	43.8%	26.0%	

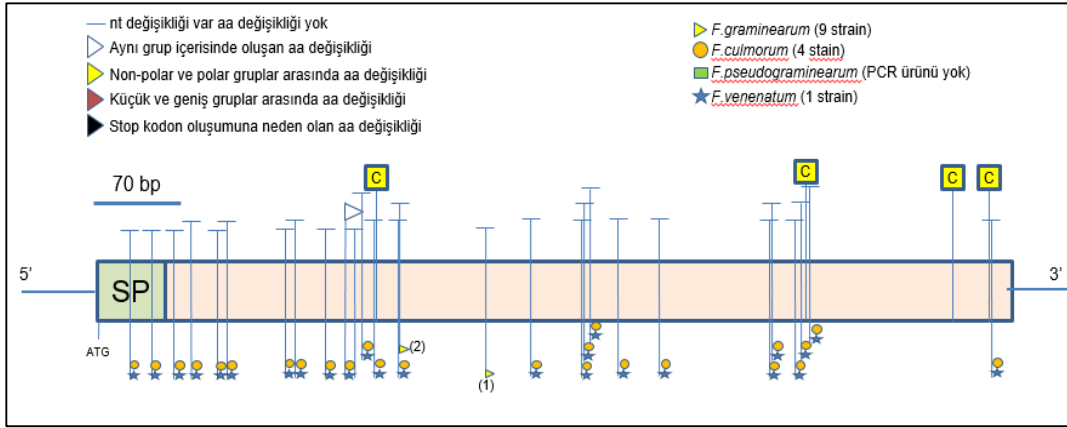
Şekil 4.63 ve Çizelge 4.6 birlikte incelendiğinde bu bölümde incelenen FGSG_11046 geninin, aynı fungusta homologları olan FGSG_02377 ve 09126 genlerine sırasıyla %24.8 ve 25.5 oranında benzerlik gösterdiği görülmektedir. İlginç bir şekilde bu gen, *F. oxysporum* ve *F. verticillioide*s'teki bazı homologlarına çok daha yüksek oran homoloji göstermektedir. Örneğin FGSG_11046, F.oxy_12958 genine %77.2, F.vert_11722 genine %75.5 oranında benzerlik göstermektedir. Yine ilginç bir şekilde homoloji durumu incelenen bu 9 genin, % benzerlik oranı %20.6 ile %97.2 arasında değişmesine rağmen, 9 gende de aynı aa pozisyonunda, 4'er adet Cysteine aa'i olduğu ve bunların korunmuş olduğu görülmektedir. Bu durum Cysteinlerin proteinin işlevi üzerindeki etkinliğini ve bu genlerin aslında ortak bir genden türemiş olabileceğini akla getirmektedir.

FGSG_11046 genine ait BROAD Enstitüsü verileri kullanılarak, sekans dizileri üzerinden genin konsensus dizisi elde edilmiştir. Bu amaçla genin downstream ve upstream bölgesindeki nükleotid dizileri uzaklaştırılmıştır. Gen intron içermemektedir ve bu nedenle genin tamamı ORF bölgesi olarak kaydedilmiştir. Protein kodlayan ORF bölgesi içerisine giren mutasyonları görmek için ORF dizileri kullanılarak alignment işlemi yapılmıştır (Şekil 4.64).



Şekil 4.64. FGSG_11046 genine ait Geneious programında oluşturulan nükleotid alignment görüntüsü.

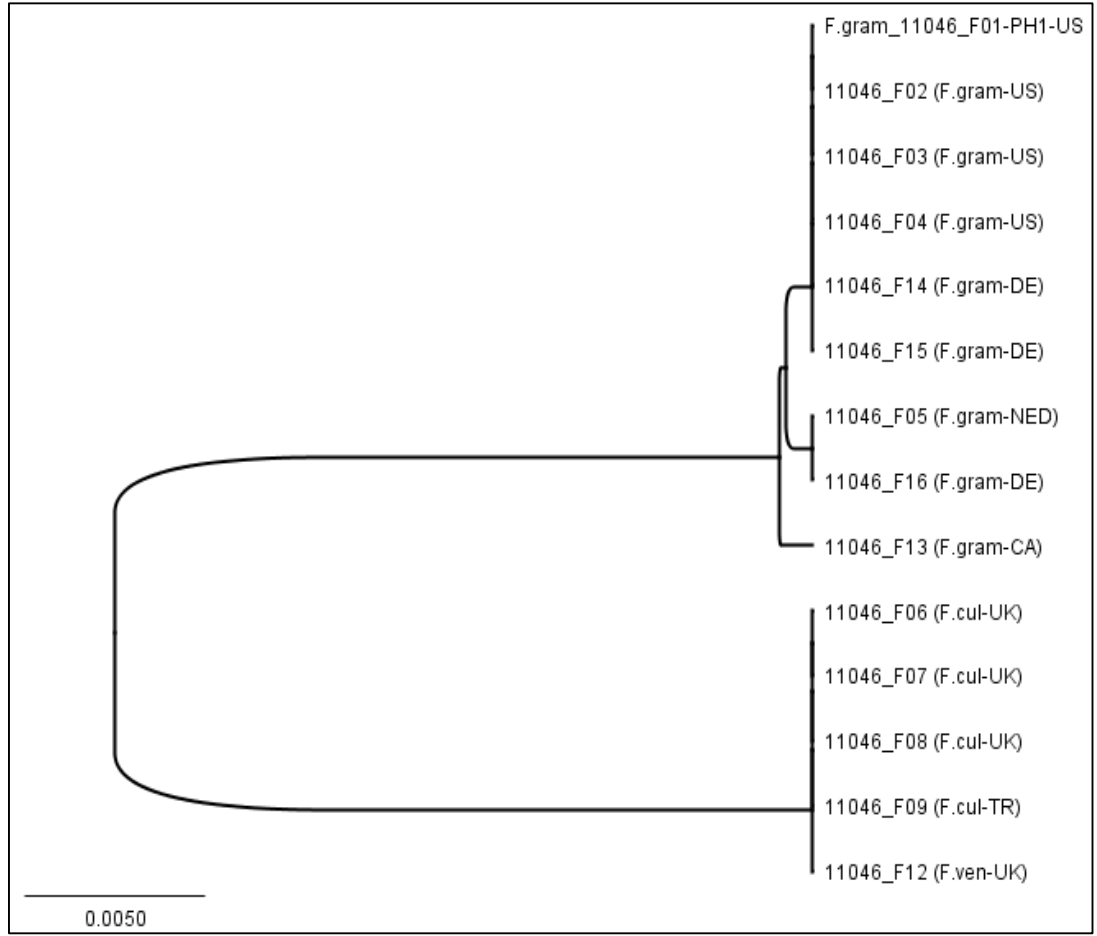
Alignment sonuçlarını daha basit bir şekilde ifade etmek ve yorumlayabilmek için Microsoft PowerPoint programı kullanılarak izolatlar arasındaki allelik varyasyonları gösteren bir grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.65).



Şekil 4.65.FGSG_11046 genine ait allelik varyasyonlar. “SP” sinyal peptid dizisini, “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.

Şekil 4.64 ve 4.65 dikkatlice incelendiğinde gen üzerinde meydana gelen mutasyonların çok az sayıda olduğu ve çok önemli aa değişikliklerine yol açmadığı görülmektedir. *F. graminearum* izolatlarının hiçbirinde aa değişikliğine yol açan bir mutasyon oluşmadığı görülmektedir. 4 adet *F. culmorum* izolatının tamamında ve *F. venenatum* izolatında 63 aa pozisyonundaki small non-polar gruptan A (Alanine), yine aynı gruptan T (Threonine) aa’ine dönüşmüştür. Diğer nükleotid değişikliklerinin hiçbirinin aa değişikliğine neden olmadığı görülmektedir. *F. graminearum* izolatlarından Almanya (F16) ve Hollanda (F05) izolatlarında bir yerde (240. Nükleotid) aynı noktada benzer mutasyon oluşmuştur. Bu mutasyonların herhangi bir aa değişikliğine neden olmadıkları görülmüştür. Bu nedenle diğer izolatlar için yapılan aa değişikliklerinin, proteinin yapısı üzerinde nasıl bir etkiye yol açmış olabileceğini gösteren, Emimi Surface Accessibility Prediction programı (Emimi ve diğ., 1985) kullanılarak herhangi bir diagram oluşturulmamıştır.

Nükleotid alignment verileri kullanılarak oluşturulan soyağacı Şekil 4.66’da verilmiştir.

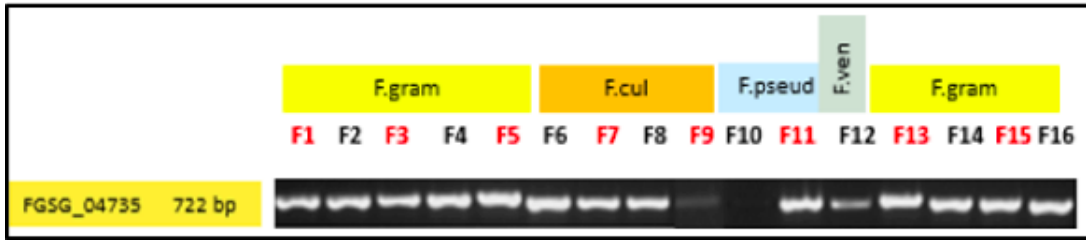


Şekil 4.66. FGSG_11046 geni için alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.

Şekil incelendiğinde incelenen türler temelinde iki temel grup olduğu görülmektedir. *F.graminearum* grubu içerisinde Almanya izolatlarından biri (F16) ve Hollanda (F05) izolatı diğerlerinden ayrılırken, *F. culmoum* ve *F. venenatum* İzolatlarının tek bir grup içerisinde yer aldıkları görülmektedir. 0.0050 olan genetik uzaklık birimi dikkate alındığında, *F. graminearum* içerisindeki farklılıkların çok önemli olmadıkları söylenebilir. İlginç bir şekilde, sekans analizi yoluyla bile *F. culmoum* ve *F. venenatum* izolatlarının birbirinden ayırt edilmedikleri görülmektedir.

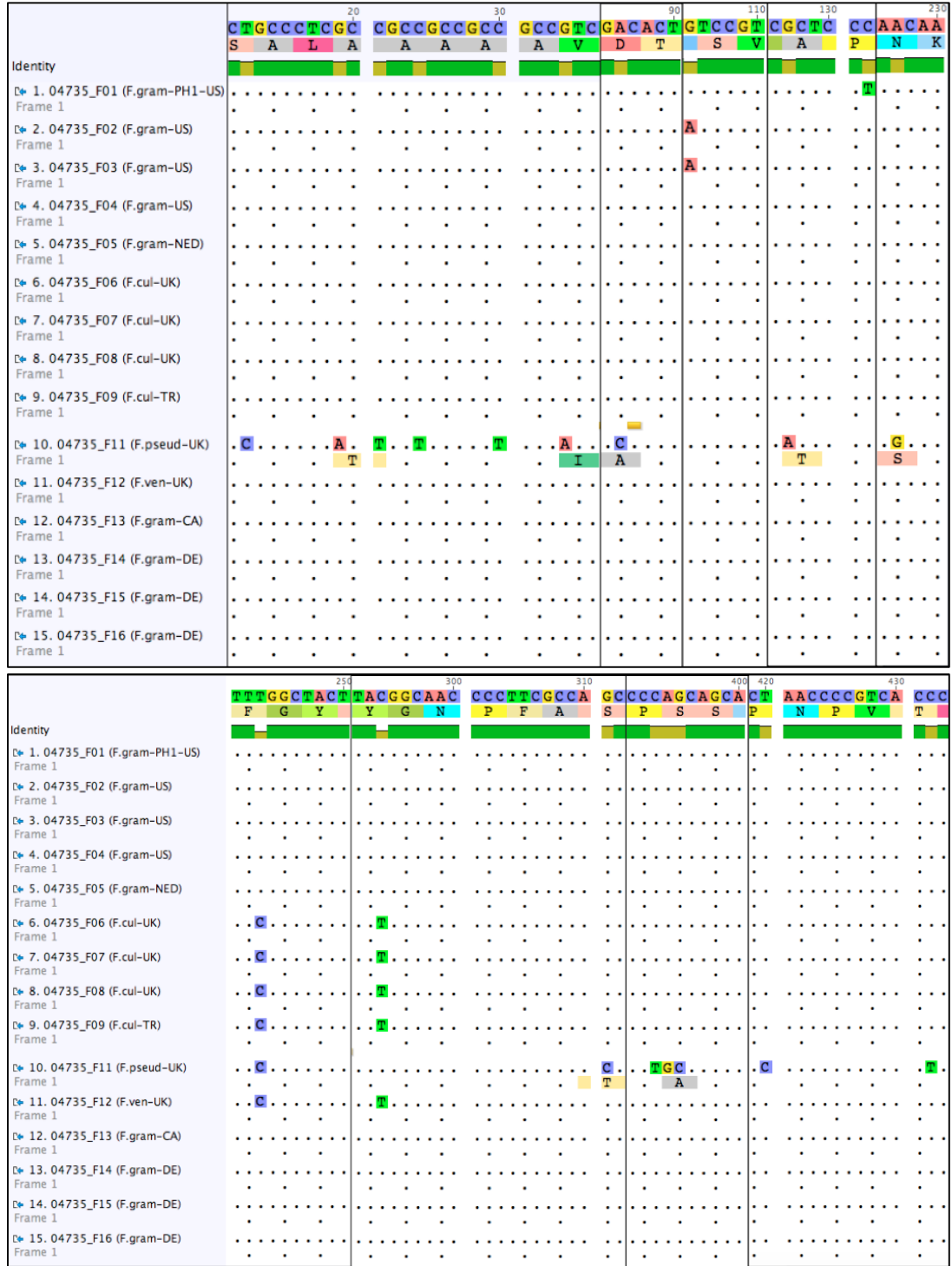
4.2.3.10. FGSG_04735 (*Fusarium graminearum* korunmuş hipotetik protein)

FGSG_04735 geni BROAD verilerine göre 459 nt uzunluğunda olup 153 aa'lık bir proteini kodlamaktadır (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_graminearum/GeneDetails.html?sp=S7000005385085576;29.04.2014). Bu 153 aa'lık proteinin ilk 19 aa'lık kısmı proteinin hücre arasına taşınmasını sağlayan sinyal peptit dizileridir ve bu kısım proteinden uzaklaştırıldığında olgun protein 134 aa'ten oluşmaktadır. Tam protein içerisinde 6 adet Cys aa'ı vardır ve bu da olgun proteinin %4.48'ini ifade etmektedir (Brown ve diğ., 2012). Çalışmamızda sadece *F. graminearum*'a ait olan 9 adet fungal strainde, ülkemizden bir izolata da yer aldığı 4 adet *F. culmorum* straininde, 2 *F. pseudograminearum* straininin birinde ve bir adet *F. venenatum* straininde yaklaşık 722 bp'lik bir PCR ürünü ile tespit edilebilmiştir (Şekil 4.67).



Şekil 4.67. FGSG_04735 genine ait jel görüntüsü.

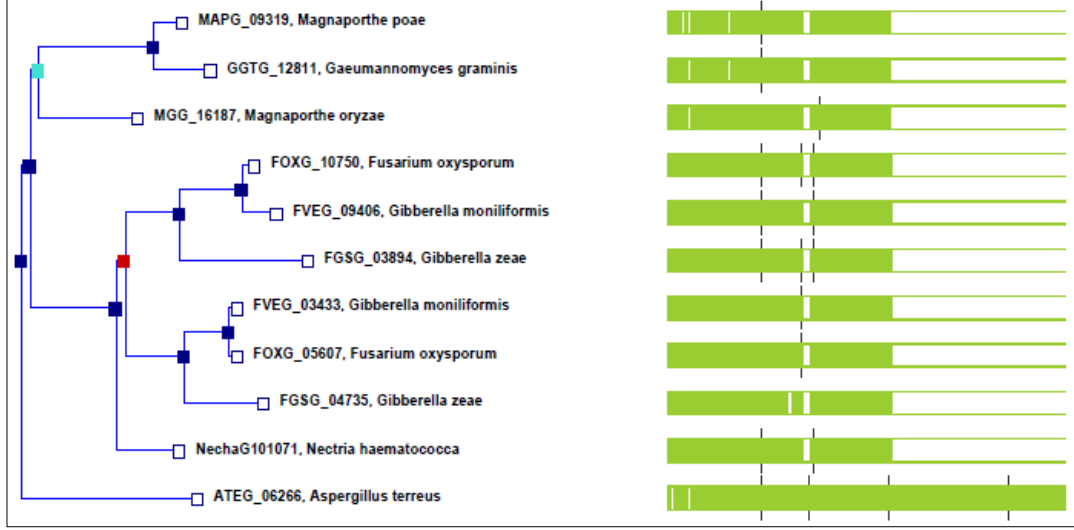
FGSG_04735 genine ait BROAD Enstitüsü verileri kullanılarak, sekans dizileri üzerinden genin konsensus dizisi elde edilmiştir. Bu amaçla genin downstream ve upstream bölgesindeki nükleotid dizileri uzaklaştırılmıştır. Gen intron içermemektedir ve bu nedenle genin tamamı ORF bölgesi olarak kaydedilmiştir. Protein kodlayan ORF bölgesi içerisine giren mutasyonları görmek için ORF dizileri kullanılarak alignment işlemi yapılmıştır (Şekil 4.68).



Şekil 4.68. FGSG_04735 genine ait Geneious programında oluşturulan nükleotid alignment görüntüsü.

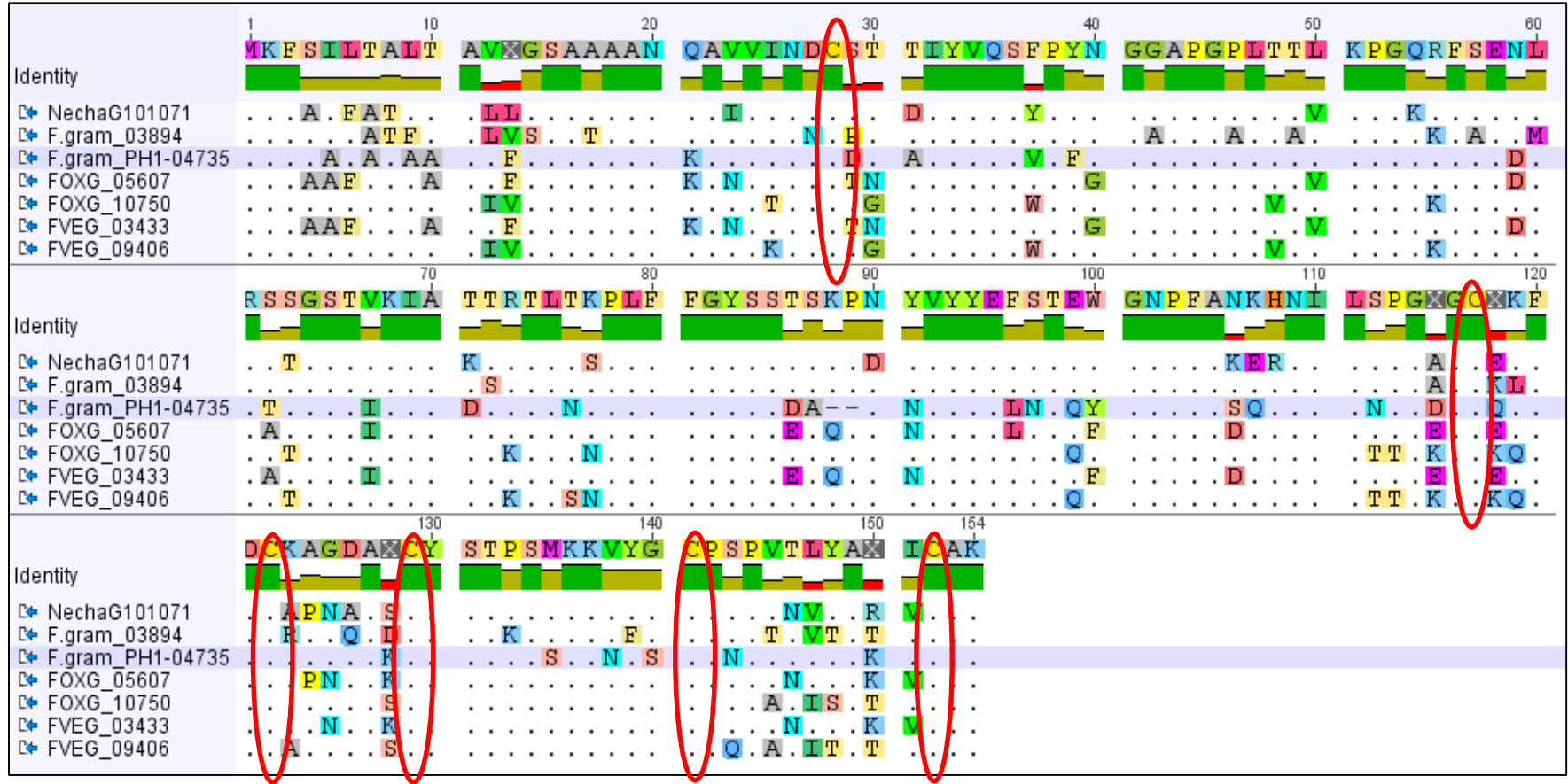
FGSG_04735 geninin sekanslanan diğer fungal genomlarda herhangi bir homologunun bulunup bulunmadığı, ilgili genin kodu kullanılarak www.fungi.ensemble.org sitesinden yapılan arama sayesinde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 4.69'de verilmektedir. İlgili şekil incelendiğinde bu genin aralarında *Aspergillus terreus*, *Gaumannomyces graminis*, *Nectria haematococca*, *F.*

oxysporum ve *Gibberella moniliformis*, *Magnaporthe oryzae* gibi tarımsal açıdan önemli fungal türlerin de bulunduğu 8 farklı fungal genomda, yaklaşık 11 homologunun bulunduğu görülmektedir (Şekil 4.69).



Şekil 4.69. FGSG_04735 geninin homoloji durumunu gösteren analiz (GeneTree EFGT00090000011718).

Şekil 4.69 incelendiğinde bu fungusta FGSG_11046 geninin, bugüne kadar tam genom sekans analizleri tamamlanan *F.gramineum* dışındaki diğer üç *Fusarium* türü olan *F. oxysporum*, *Nectria haematococca* ve *F. verticillioides*'te de bazı homologlarının olduğu görülmektedir. Bu genler *F.oxysporum*'da FOXG_10750 ve 05607; *F.verticillioides*'te FVEG_03433 ve 09406; *Nectria haematococca*'da NechaG101071 kodlu genlerdir. Yine *F. graminarum*'un kendisinde de FGSG_11046'nın FGSG_03894 koduyla bir homologu bulunmaktadır. İlgili genlerin BROAD verileri kullanılarak elde edilen nükleotid verileri üzerinden yapılan alignment işlemine ait sonuçlar şekil 4.70'de verilmektedir.



Şekil 4.70. *Fusarium graminearum*'a ait FGSG_04735 geninin aynı fungusta ve *Fusarium oxysporum*, *Nectria haematococca* ile *Fusarium verticillioides*'te bulunan homologlarının homoloji durumunu gösteren Geneious programında oluşturulan nükleotid hizalama görüntüsü.

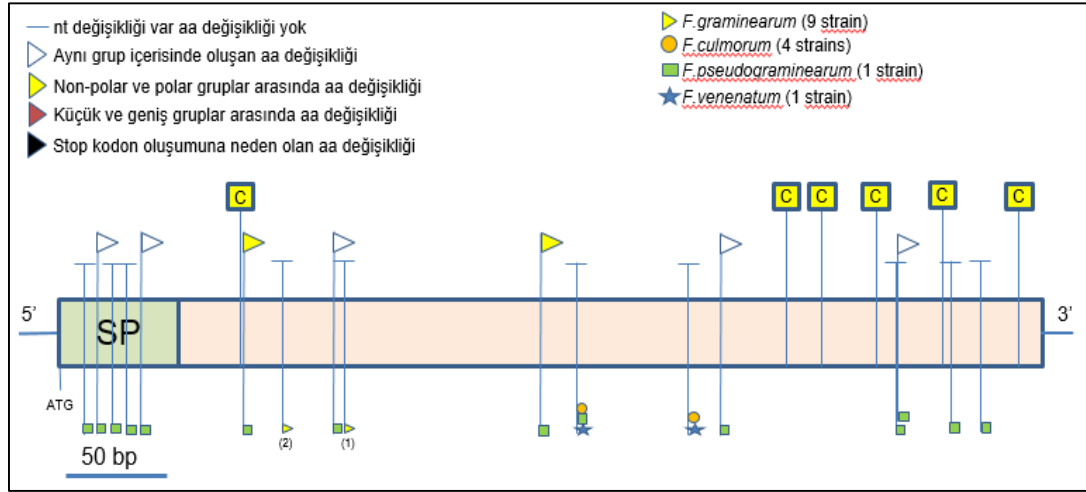
Bu veriler kullanılarak genler arasındaki genetik uzaklığı ortaya koymak için Geneious programında hazırlanan Çizelge 4.7 aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.7. FGSG_04735 geninin farklı funguslardaki homologlarının genetik uzaklıkları.

	NechaG101071	F.gram_03894	F.gram_PH1...	FOXG_05607	FOXG_10750	FVEG_03433	FVEG_09406
NechaG101071		73.4%	66.2%	77.3%	75.3%	77.3%	74.7%
F.gram_03894	73.4%		64.9%	67.5%	77.9%	68.8%	77.3%
F.gram_PH1-04735	66.2%	64.9%		77.3%	69.5%	77.3%	68.8%
FOXG_05607	77.3%	67.5%	77.3%		72.1%	98.7%	70.1%
FOXG_10750	75.3%	77.9%	69.5%	72.1%		73.4%	96.8%
FVEG_03433	77.3%	68.8%	77.3%	98.7%	73.4%		71.4%
FVEG_09406	74.7%	77.3%	68.8%	70.1%	96.8%	71.4%	

Şekil 4.70 ve Çizelge 4.7 birlikte incelendiğinde bu bölümde incelenen FGSG_04583 geninin, aynı fungusta homoloğu olan FGSG_03894 genine %64.9 oranında benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bu gen, *F. oxysporum* ve *F. verticillioide*s'teki bazı homologlarına, *F. graminearum*'un kendi içindeki homologlarına kıyasla daha yüksek oranda homoloji göstermektedir. Örneğin FGSG_04583, *F.ox_05607* ve *Fvert_03433* genlerine %77.3, *F.vert_09406* genine %68.8, *F.ox_10750* genine % 69.5, *NechaG101071* genine %66.2 oranında benzerlik göstermektedir. Homoloji durumu incelenen bu 7 genin, % benzerlik oranı %66.2 ile %98.7 arasında yüksek oranda homoloji gösterdikleri belirlenmiştir. Analiz edilen 7 gende de aynı aa pozisyonunda, 6'şar adet Cysteine aa'i olduğu ve bunların korunmuş olduğu görülmektedir. Bu durum daha önceki gen analizlerinde de görüldüğü üzere, Cysteinlerin proteinin işlevi üzerindeki etkinliğini ve bu genlerin aslında ortak bir genden türemiş olabileceğini akla getirmektedir. Yine bu genin çeltik yanıklığı patojeni *Magnaporthe grisea*'daki homoloğu olan MGG_16187 kodlu genin bitki-patojen ilişkilerinde rol aldığına dair bilgiler olması nedeniyle (www.fungi.ensemble.org., 21.04.2015), patojen funguslar içerisinde yaygın ve yüksek oranda homoloji gösteren bu genin *F. graminearum* için de muhtemel bir efektör adayı olabileceği düşünülmektedir.

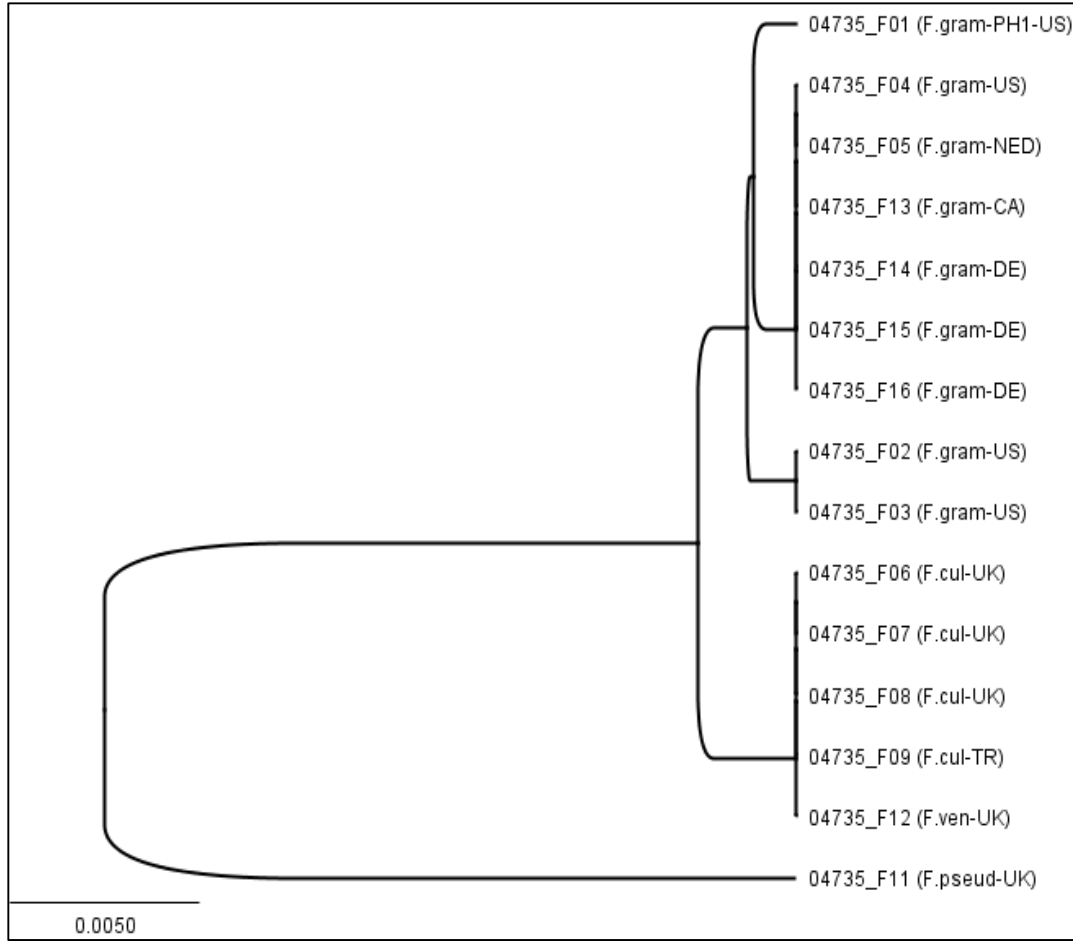
Alignment sonuçlarını daha basit bir şekilde ifade etmek ve yorumlayabilmek için Microsoft PowerPoint programı kullanılarak izolatlar arasındaki allelik varyasyonları gösteren bir grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.71).



Şekil 4.71.FGSG_04735 genine ait allelik varyasyonlar. “SP” sinyal peptid dizisini, “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.

Şekil 4.70 ve 4.71 dikkatlice incelendiğinde bir önceki gende olduğu gibi, gen üzerinde meydana gelen mutasyonların çok az sayıda olduğu ve çok önemli aa değişikliklerine yol açmadığı görülmektedir. *F. graminearum* izolatlarının hiçbirinde aa değişikliğine yol açan bir mutasyon oluşmadığı görülmektedir. 4 adet *F. culmorum* izolatının tamamında ve *F. venenatum* izolatında nükleotid değişikliklerinin hiçbirinin de aa değişikliğine neden olmadığı görülmektedir. Sadece birkaç noktadaki SNP mutasyonu ile bu türler *F. graminearum*’dan ayrılmışlardır. Fakat sekans analizleri bile *F. culmorum* ve *F. venenatum*’u bu gen verileri kullanarak ayırt edememiştir. *F. graminearum* izolatlarında meydana gelen mutasyonlar herhangi bir aa değişikliğine neden olmadıkları için, önemli mutasyonların olduğu önceki genlerin bazıları için yapılan; aa değişikliklerinin, proteinin yapısı üzerinde nasıl bir etkiye yol açmış olabileceğini gösteren, Emmini Surface Accessibility Prediction programı (Emmini ve diğ., 1985) kullanılarak herhangi bir diagram oluşturulmamıştır.

Nükleotid alignment verileri kullanılarak oluşturulan soyağacı şekil 4.72’de verilmiştir.

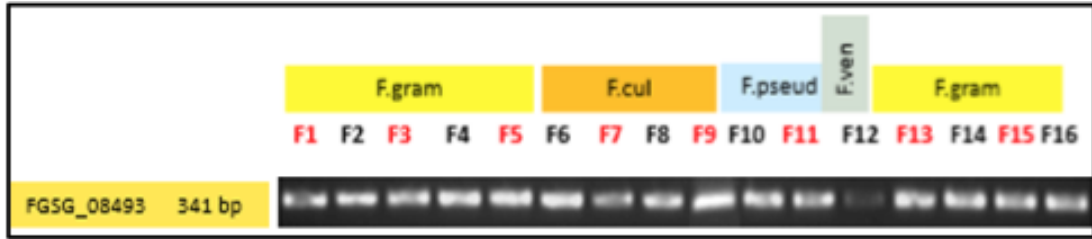


Şekil 4.72. FGSG_04735 geni için alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.

Şekil 4.72 incelendiğinde incelenen türler temelinde 3 temel grup oluştuğu görülmektedir. *F. graminearum* grubu içerisinde referans izolat (PH-1) 132. Nükleotidteki bir SNP mutasyonu ile diğer tüm *F. graminearum* izolatlarından ayrılabilmiştir. Teoride bu SNP kullanılarak tüm dünyada referans izolat olarak kullanılan PH-1 izolatı işaretlenmiş olmaktadır ve gerektiğinde bu mutasyon yoluyla teşhis edilebilir. Yine F02 ile F03 kodlu US izolatları da ayrı bir grup oluşturmuşlardır. Tüm Avrupa İzolatlarının F04 kodlu US ve F13 kodlu Kanada izolatı ile birlikte tek bir grup içerisinde yer aldıkları belirlenmiştir. *F. culmorum* ve *F. venenatum* İzolatlarının tek bir grup içerisinde yer aldıkları görülmektedir. Bir önceki gende olduğu gibi bu gende de sekans analizi yoluyla bile *F. culmorum* ve *F. venenatum* izolatlarının birbirinden ayırt edilemedikleri görülmektedir.

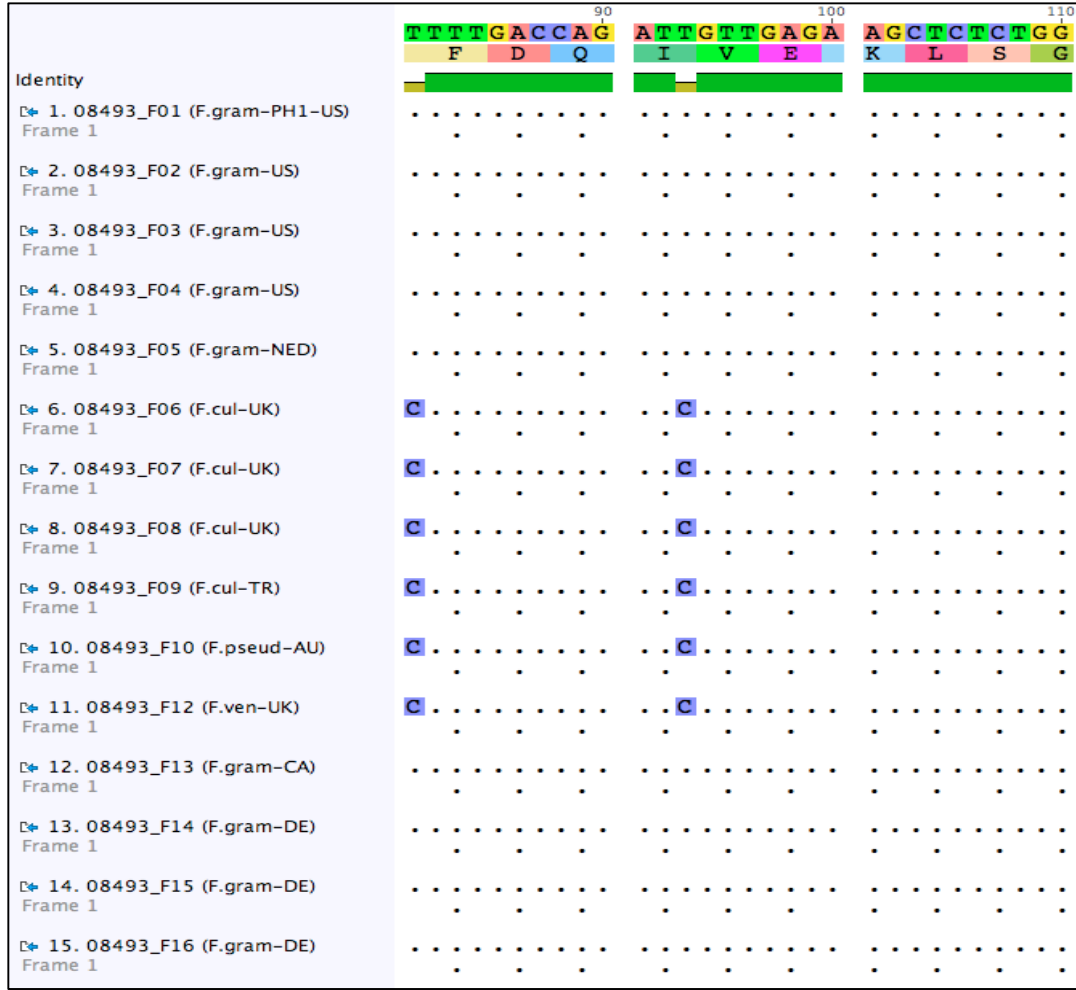
4.2.3.11 FGSG_08493 (*F.graminearum* korunmuş hipotetik protein)

FGSG_08493 geni BROAD verilerine göre 220 nt uzunluğunda olup 55 aa'lık bir proteini kodlamaktadır ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_graminearum/TranscriptDetails.html?component=%24DirectLink&service=direct&session=T&sp=S7000005385038416&sq=transcriptId%2C%2CS7000005385038416&sqpage=release%2FTranscriptDetails](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_graminearum/TranscriptDetails.html?component=%24DirectLink&service=direct&session=T&sp=S7000005385038416&sq=transcriptId%2C%2CS7000005385038416&sqpage=release%2FTranscriptDetails;); 29.04.2014). Bu 55 aa'lık proteinin ilk 20 aa'lık kısmı proteinin hücre arasına taşınmasını sağlayan sinyal peptit dizileridir ve bu kısım proteinden uzaklaştırıldığında olgun protein 35 aa'ten oluşmaktadır. Tam protein içerisinde 2 adet Cys aa'i vardır ve bu da olgun proteinin %5.71'ini ifade etmektedir (Brown ve diğ., 2012). Çalışmamızda kullanılan 9 adet *F. graminearum*, ülkemizden bir izolatın da yer aldığı 4 adet *F. culmorum*, 2 *F. pseudograminearum* ve 1 adet *F. venenatum* straininin tamamında yaklaşık 341 bp'lik bir PCR ürünü ile tespit edilebilmiştir (Şekil 4.73).



Şekil 4.73: FGSG_08493 genine ait jel görüntüsü.

FGSG_08493 genine ait BROAD Enstitüsü verileri kullanılarak, sekans dizileri üzerinden genin konsensus dizisi elde edilmiştir. Bu amaçla genin downstream ve upstream bölgesindeki nükleotid dizileri uzaklaştırılmıştır. Gen 149 ile 150. nükleotidler arasında incelenen tüm izolatlarda 55 nükleotidlik bir intron içermektedir ve bu bölge kesip çıkarılarak ORF bölgesi olarak kaydedilmiştir. Daha sonra, sekansların protein kodlayan ORF bölgesi içerisine giren mutasyonları görmek için ORF dizileri kullanılarak alignment işlemi yapılmıştır. F10 kodlu *F. pseudograminearum* izolatından PCR ile bant elde edilebilmesine rağmen, sekans analizlerinde sağlıklı veriler elde edilemediği için analizlere dahil edilememiştir (Şekil 4.74).

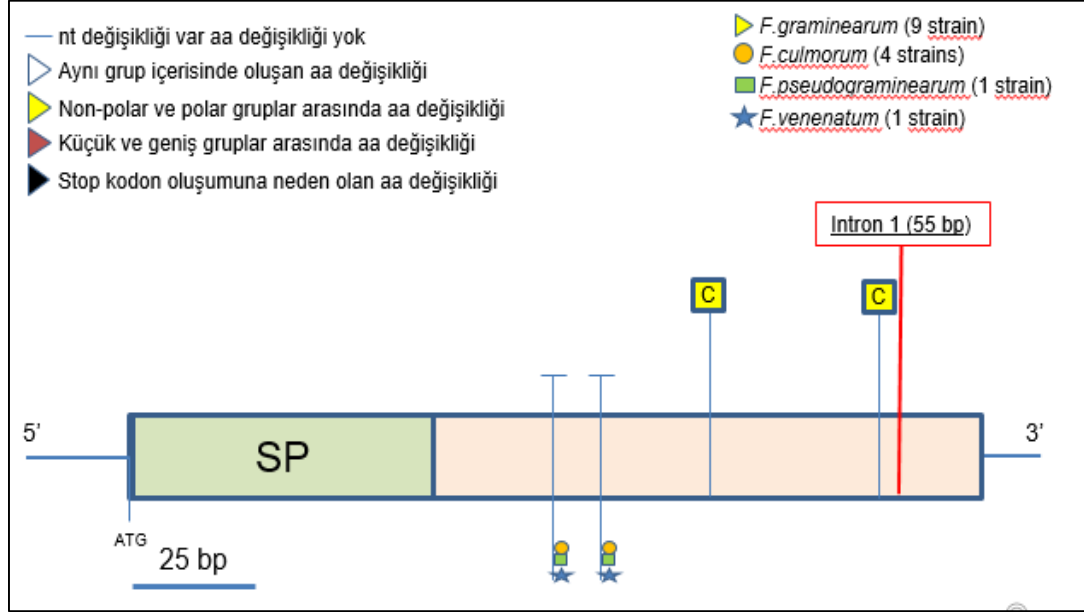


Şekil 4.74. FGSG_08493 genine ait Geneious programında oluşturulan nükleotid alignmant görüntüsü.

Saitoh ve diğ., (2012) tarafından tamamlanan bir çalışma temel alınarak FGSG_08493 geni bu çalışmaya dahil edilmiştir. İlgili çalışmada, dünyada en önemli fungal patojenlerden biri olan ve çeltikte yaprak, salkım ve dallarda yanıklıklara yol açarak önemli verim kayıplarına neden olan *M. grisea* patojeninde, MC69 kodlu gen için fonksiyon analizleri yapılmıştır. Yapılan analizler ilgili genin fungal patojenisitede mutlak bir rol oynadığını ve genin silinmesinin fungusun patojenisite yeteneğinde önemli kayıplara neden olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçların ardından aynı araştırma grubu bu fungusun başka funguslarda da orthologlarının olup olmadığını araştırmışlar ve kabak antraknozu etmeni *Colletotrichum orbiculare* fungusunda da MC69'un bir ortholoğunun bulunduğunu ve benzer şekilde bu genin susturulmasının da bu antraknoz patojeninde fungusun patojenisite yeteneğini azalttığını belirlemişlerdir. Yaptıkları analizlerle, bu genin *Trichoderma virens* ve *F. graminearum*'da da birer ortholoğunun bulunduğunu ortaya koymuşlardır. Bu

sonuçlar bu genin *F. graminearum*'da da hastalık oluşturma yeteneği ile ilgili olabileceği kanısı uyandırmaktadır ve bu genin fonksiyon analizleri bu genin bir fungal efektör olup olmadığını kesin olarak ortaya koyacaktır.

Alignment sonuçlarını daha basit bir şekilde ifade etmek ve yorumlayabilmek için Microsoft PowerPoint programı kullanılarak izolatlar arasındaki allelik varyasyonları gösteren bir grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.75).

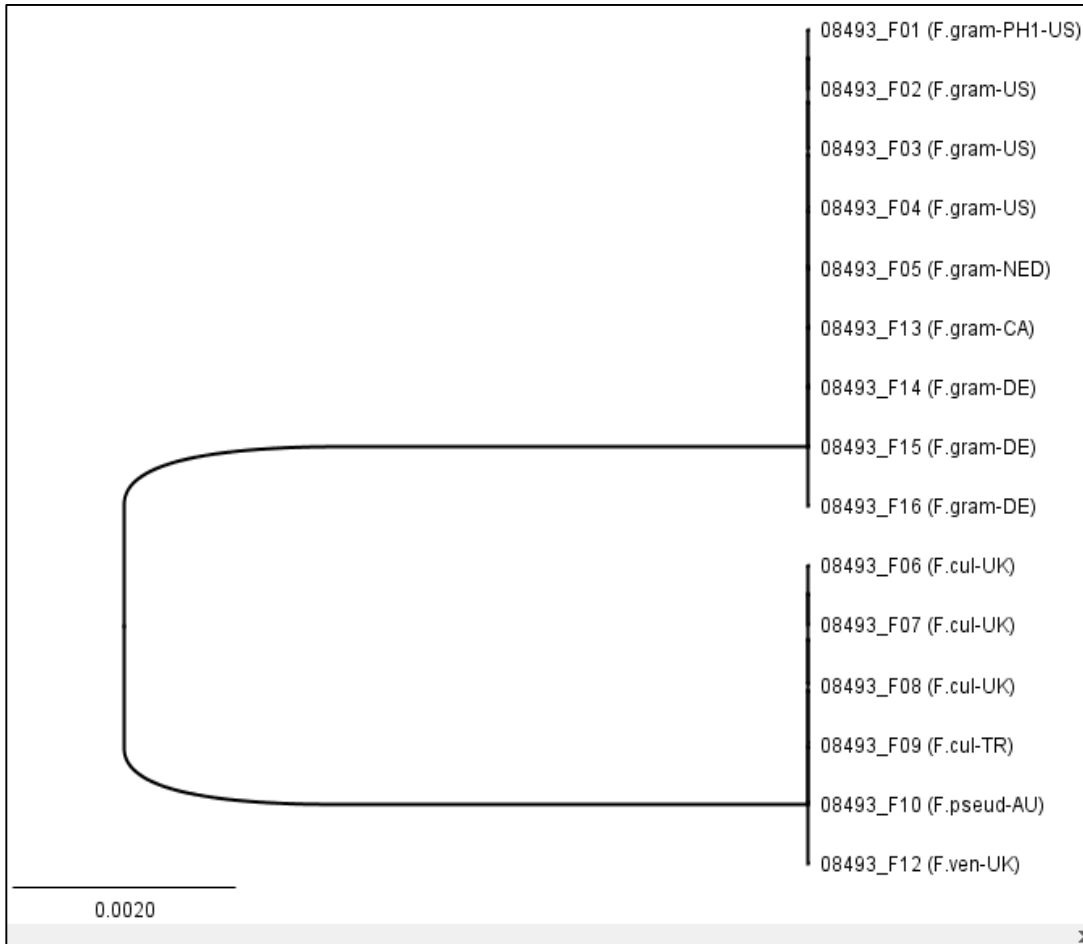


Şekil 4.75. FGSG_08493 genine ait allelik varyasyonlar. “SP” sinyal peptid dizisini, “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.

Şekil 4.75 dikkatlice incelendiğinde *F. graminearum* izolatlarının hiçbirinde bir nükleotid mutasyonu dahi oluşmadığı görülmektedir. 4 adet *F. culmorum* izolatının tamamında, *F. pseudograminearum* ve *F. venenatum* izolatında sadece birkaç noktada ve aynı pozisyonda oluşan nükleotid değişikliklerinin hiçbirinin de aa değişikliğine neden olmadığı görülmektedir. Sadece birkaç noktadaki SNP mutasyonu ile bu türler *F. graminearum*'dan ayrılmışlardır. Daha önceki bazı genlerde olduğu gibi sekans analizleri bile *F. culmorum*, *F. pseudograminearum* ve *F. venenatum*’u bu gen verileri kullanarak ayırt edememiştir.

Nükleotid alignment verileri kullanılarak oluşturulan soyağacı şekil 4.76’da verilmiştir. Şekil 4.76 incelendiğinde incelenen türler temelinde 2 temel grup oluştuğu görülmektedir. *F. graminearum* içerisinde herhangi bir mutasyon görülmediğinden testlenen tüm izolatlar aynı grup içerisinde yer almıştır. Diğer türlerde görülen SNP mutasyonları da geriye kalan tüm türlerde aynı noktada

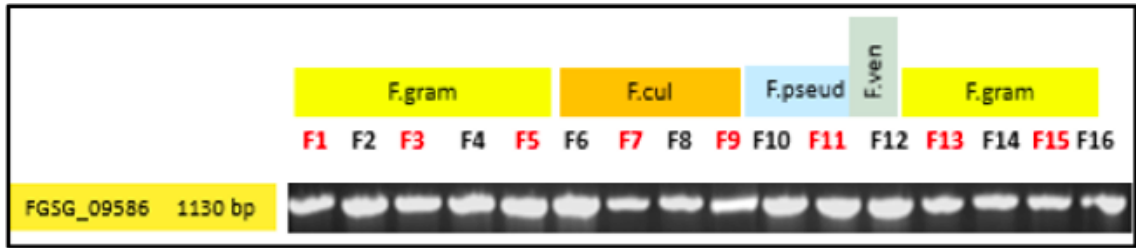
oluştugu için türleri ayırt edememiş ve oluşturulan soyağacında *F. culmorum*, *F. pseudograminearum* ve *F. venenatum* izolatların aynı grup içerisinde yer almıştır. Yukarıda açıklandığı üzere bu gen *M. grisea*'da fungusun yaşamında çok önemli görevleri olan bir proteini kodlamaktadır ve anlaşılmaktadır ki, bu genin ürünü test ettiğimiz fungal türlerde de önemli görevler alabilir çünkü çok yüksek oranda, türler arasında bile, mutasyonlara karşı korunmuştur. Bu çalışma ile bu önemli genin varlığı Saitoh ve diğ., (2012) tarafından yapılan çalışmada belirtilmeyen ve çalışılmayan, ancak bu çalışmada incelenen *F. culmorum*, *F. pseudograminearum* ve *F. venenatum* varlığı ispatlanmıştır ve bu funguslarda fonksiyon analizi çalışmalarında kullanılabilir. Farklı türlerde bir efektör olarak belirlendiği için bu genin *Fusarium* türlerinde de iyi bir efektör adayı olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.76. FGSG_08493 geni için alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı.

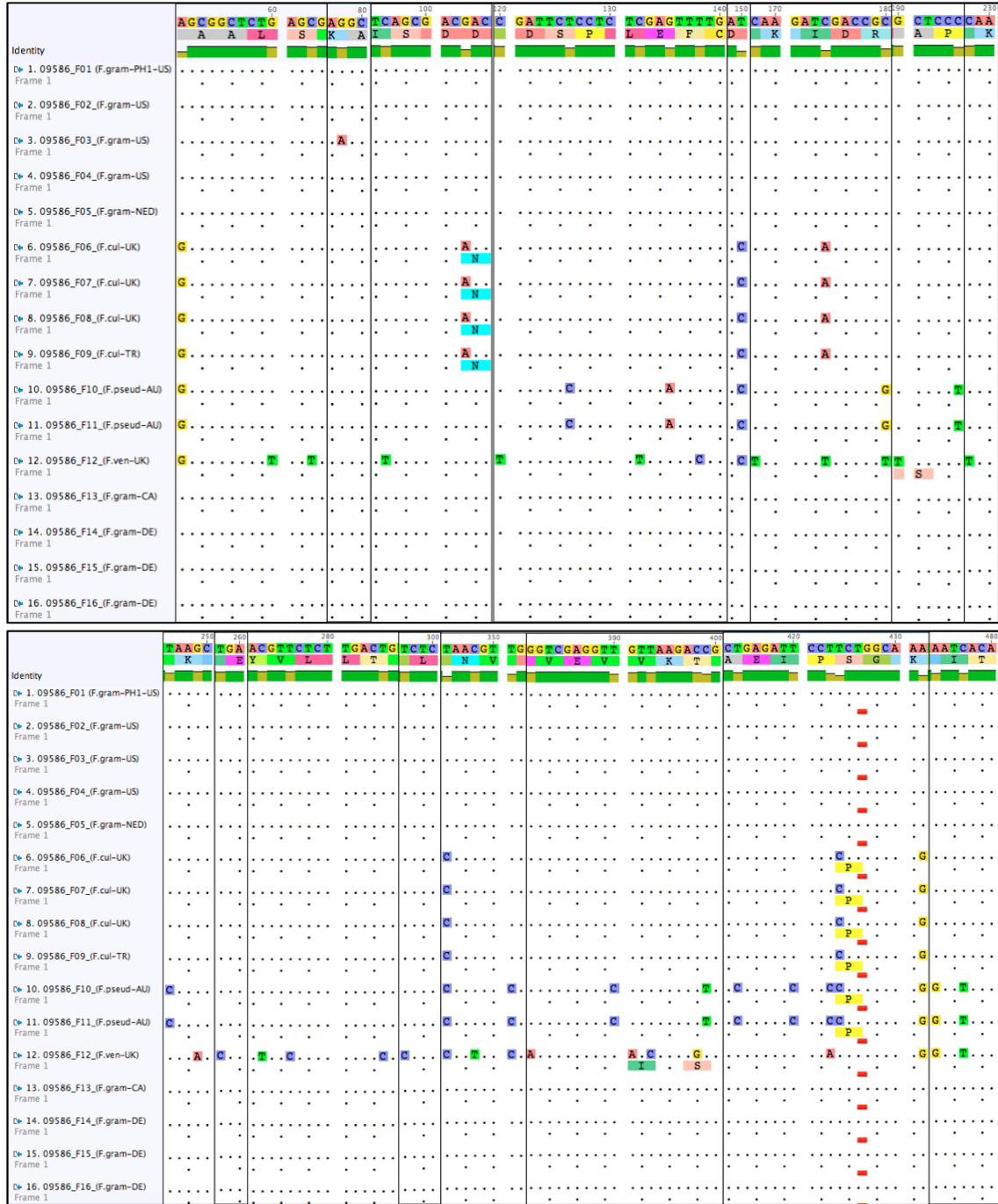
4.2.3.12 FGSG_09586 (Probable phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein)

FGSG_09586 geni BROAD verilerine göre 779 nt uzunluğunda olup 181 aa'lık bir proteini kodlamaktadır (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_graminearum/GeneDetails.html?sp=S7000005385041215;29.04.2014). Bu 181 aa'lık proteinin ilk 20 aa'lık kısmı proteinin hücre arasına taşınmasını sağlayan sinyal peptit dizileridir ve bu kısım proteinden uzaklaştırıldığında olgun protein 161 aa'ten oluşmaktadır. Tam protein içerisinde 4 adet Cys aa'i vardır ve bu da olgun proteinin %2.48'ini ifade etmektedir (Brown ve diğ., 2012). Çalışmamızda kullanılan *F. graminearum*'a ait olan 9 adet fungal strainde, ülkemizden bir izolattan da yer aldığı 4 adet *F. culmorum* straininde, 2 adet *F. pseudograminearum* straininde ve bir adet *F. venenatum* straininde yaklaşık 1130 bp'lik bir PCR ürünü ile tespit edilebilmiştir (Şekil 4.77).



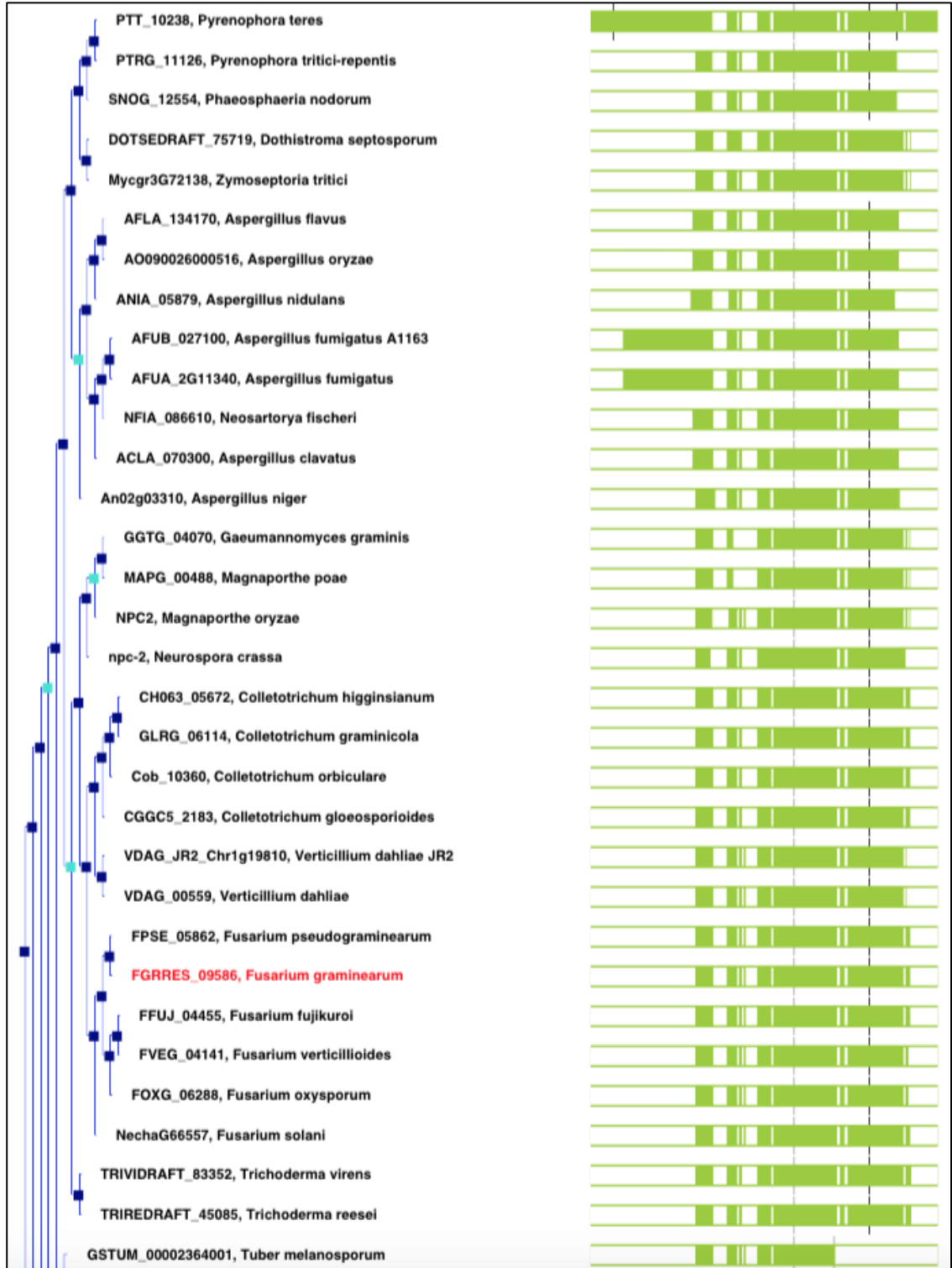
Şekil 4.77. FGSG_09586 genine ait jel görüntüsü.

FGSG_09586 genine ait BROAD Enstitüsü verileri kullanılarak, sekans dizileri üzerinden genin konsensus dizisi elde edilmiştir. Bu amaçla genin downstream ve upstream bölgesindeki nükleotid dizileri uzaklaştırılmıştır. Gen 2 adet intron içermektedir. *F. venenatum* dışındaki tüm türlerde bu intronlar, 209 ve 210. nükleotidler arasında 58 ve 426 ve 427. nükleotidler arasında ise 50 nükleotid uzunluğundadır. *F. venenatum* türünde ise ikinci intronun uzunluğu 51 nt'dir. Intron kısımları çıkarıldıktan sonra kalan bölge ORF bölgesi olarak kaydedilmiştir. Protein kodlayan ORF bölgesi içerisine giren mutasyonları görmek için ORF dizileri kullanılarak alignment işlemi yapılmıştır (Şekil 4.78).

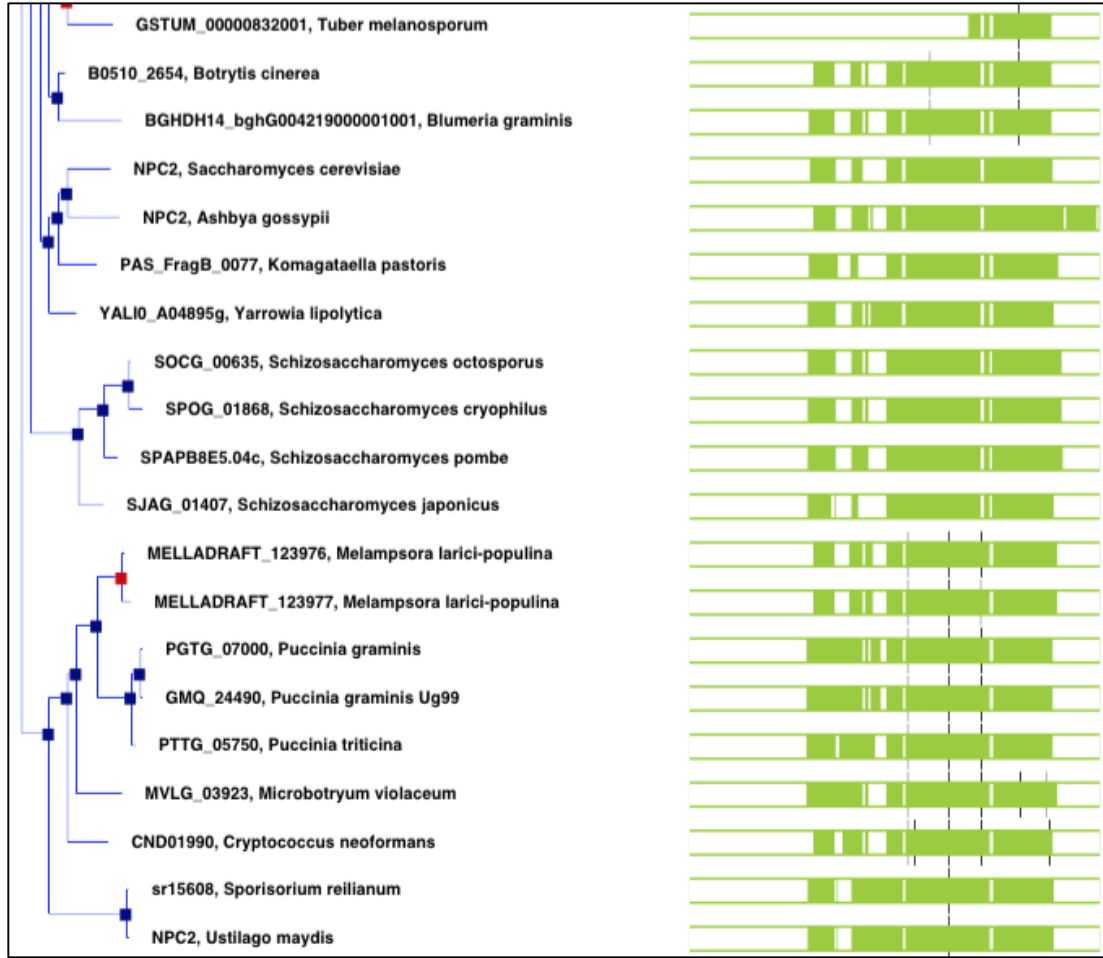


Şekil 4.78.FGSG_09586 genine ait Geneious programında oluşturulan nükleotid alignment görüntüsü.

FGSG_09586 geninin sekanslanan diğer fungal genomlarda herhangi bir homologunun bulunup bulunmadığı, ilgili genin kodu kullanılarak www.fungi.ensembl.org sitesinden yapılan arama sayesinde belirlenmiştir. Oluşan GeneTree EFGT00050000004241 kodlu soyağacı incelendiğinde bu genin aralarında *G. graminis*, *Puccinia graminis*, *N. haematococca*, *F. oxysporum*, *M. oryzae*, *P. tritici-repentis*, *V. dahliae*, gibi tarımsal açıdan önemli fungal türlerin de bulunduğu 45 farklı fungal genomda, yaklaşık 52 homologunun bulunduğu görülmektedir (Şekil 4.79).

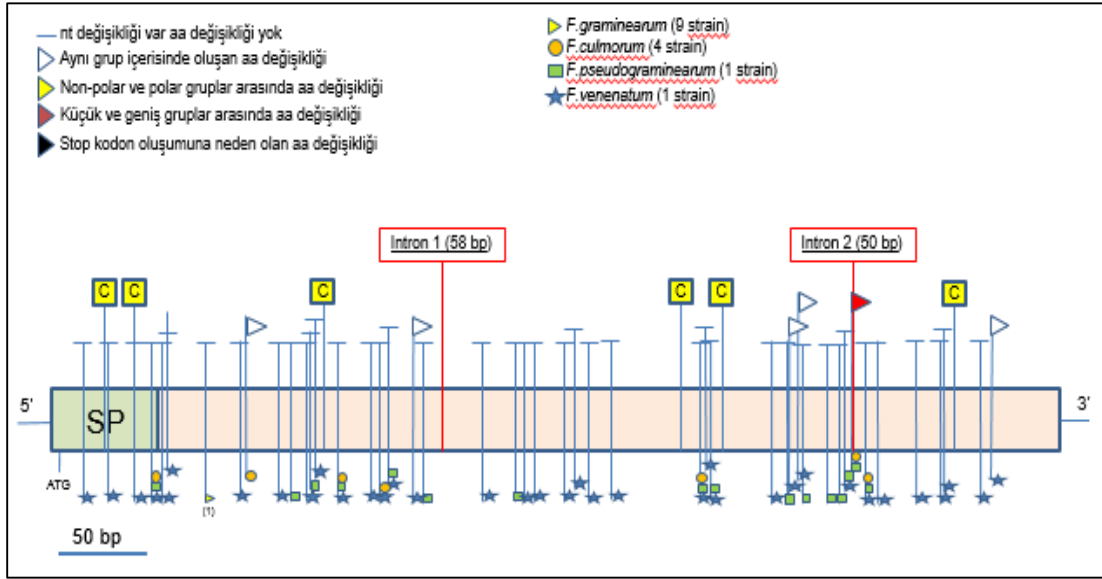


Şekil 4.79. FGSG_09586 geninin homoloji durumunu gösteren analiz (GeneTree EFGT00050000004241).



Şekil 4.79 (Devam). FGSG_09586 geninin homoloji durumunu gösteren analiz (GeneTree EFGT00050000004241).

Alignment sonuçlarını daha basit bir şekilde ifade etmek ve yorumlayabilmek için Microsoft PowerPoint programı kullanılarak izolatlar arasındaki allelik varyasyonları gösteren bir grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.80).

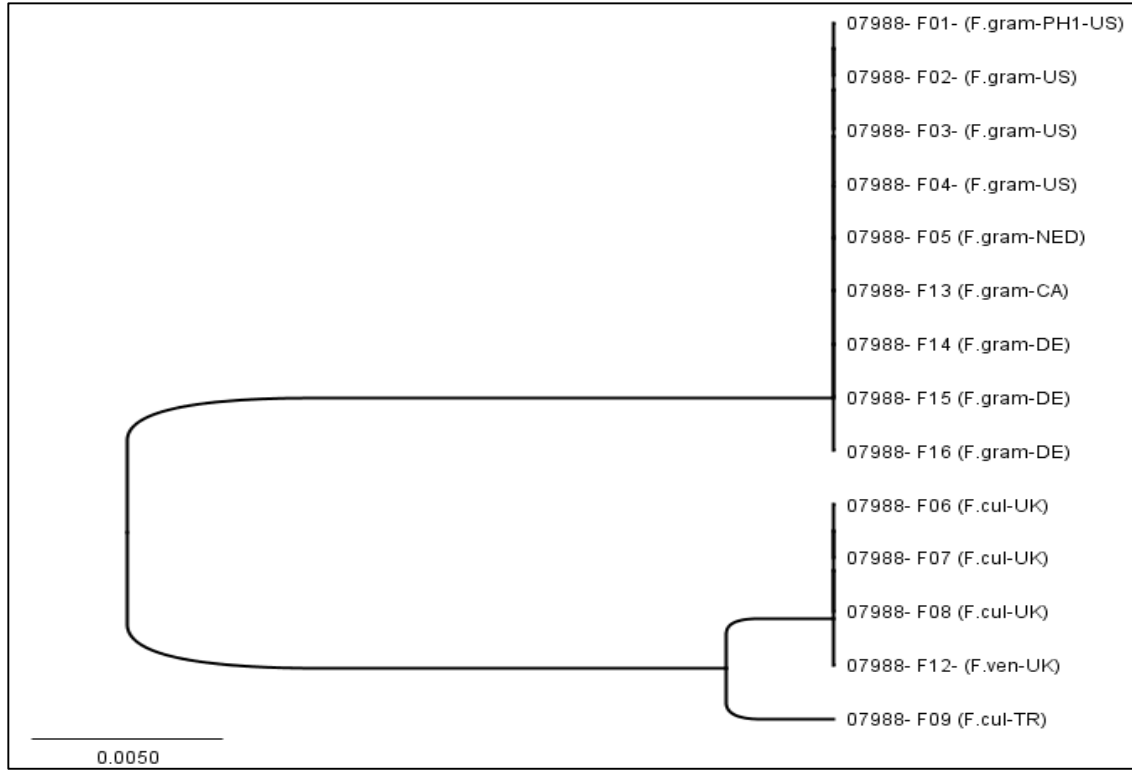


Şekil 4.80. FGSG_09586 genine ait allelik varyasyonlar. “SP” sinyal peptid dizisini, “C” Cysteine aa’ni ifade etmektedir.

Şekil 4.80 dikkatlice incelendiğinde genin tür içinde yüksek oranda korunmuş olduğu ve oluşan mutasyonların türlere özgü olduğu görülmektedir. Öyleki *F. graminearum* izolatların içerisinde sadece F03 kodlu US izolatında 78.nükleotid pozisyonunda referans izolatta mevcut olan guanine nükleotidinin yerini adenine almıştır. Fakat oluşan SNP mutasyonu herhangi bir aa değişikliğine neden olmamıştır.

İlginç bir şekilde –Türkiye izolatının gösterdiği ekstra mutasyonlar- hariç olmak üzere- *F. culmorum* strainlerinde taranan mutasyonların, aynı nükleotid pozisyonlarında *F. venenatum* izolatında da tespit edildiği görülmektedir. Türkiye izolatın dışındaki *F. culmorum* izolatlarını sekans analizleri yoluyla bile *F. culmorum* izolatlarından ayırt etmek mümkün olmamıştır. *F. graminearum* izolatlarında meydana gelen mutasyonlar herhangi bir aa değişikliğine neden olmadıkları için, önemli mutasyonların olduğu önceki genlerin bazıları için yapılan; aa değişikliklerinin, proteinin yapısı üzerinde nasıl bir etkiye yol açmış olabileceğini gösteren, Emmini Surface Accessibility Prediction programı (Emmini ve diğ., 1985) kullanılarak herhangi bir diagram oluşturulmamıştır.

Nükleotid alignment verileri kullanılarak oluşturulan soyağacı şekil 4.81’de verilmiştir.

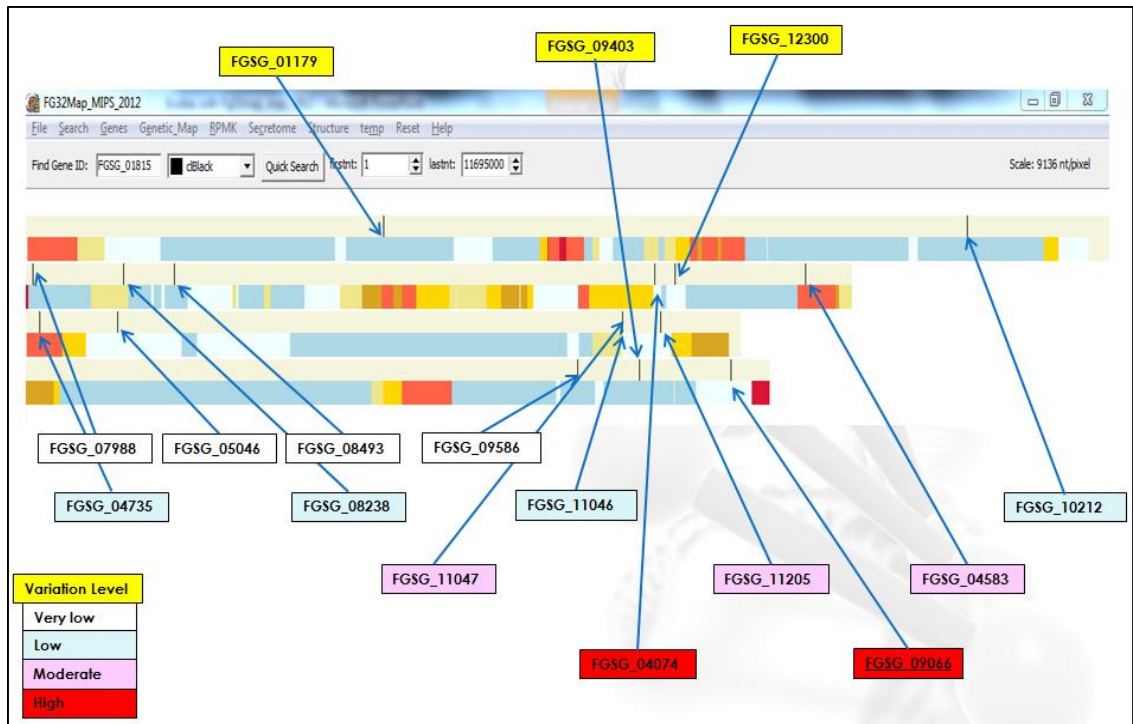


Şekil 4.81. FGSG_07988 geni için alignment sonuçları kullanılarak oluşturulan soyağacı

Şekil 4.81 incelendiğinde incelenen türler temelinde 2 temel grup oluştuğu görülmektedir. *F. graminearum* grubu içerisinde izolatlarda herhangi bir mutasyon oluşmadığı için tüm strainler aynı grup içerisinde yer almıştır. Diğer grup ise yukarıdaki paragrafta detayları tartışıldığı üzere *F. culmorum*'un İngiltere izolatları ile yine İngiltereden izole edilen *F. venenatum* izolatu aynı grup içerisinde yer alırken, *F. culmorum* Türkiye izolatu, içerdiği ekstra mutasyonlar nedeniyle ayrı bir küçük grup oluşturmuştur.

4.2.4 SSP Genlerinin kromozomal lokasyonları ve varyasyonların önemi

Çalışma süresince karakterize edilen SSP genlerinin, *F. graminearum* kromozomları üzerindeki lokasyonlarının belirlenmesinde Antoniow ve diğ., (2011) tarafından geliştirilen “omnimapfree” programından yararlanılmıştır. Bu program iki *F. graminearum* izolatının melezlenmesi ve fungusun tüm genlerinin bu kromozom haritasındaki yerlerinin belirlenmesi sonucu oluşturulmuştur. Bu harita üzerinde mutasyonun en fazla görünmesinin beklendiği “sıcak bölgeler” kırmızı ile gösterilmekte, mutasyon sıklığı sırasıyla turuncu, mavi ve beyaz bölgelerde azalmaktadır (Şekil 4.82).



Şekil 4.82. Seçilen SSP genlerinin *Fusarium graminearum* kromozomları üzerindeki pozisyonları

Bu tez çalışmasının kapsamında sekans analizleri ile karakterize edilebilen 13 adet *F. graminearum* SSP geni, 9 farklı *F. graminearum* izolatında gösterdikleri varyasyon oranıyla, OmniMap programının bu genler için öngördüğü varyasyon oranları karşılaştırılmıştır. Programın öngördüğü sonuçlar ile bu çalışmadan elde edilen sonuçların önemli oranda farklılıklar içerdiği görülmektedir. Örneğin bu çalışmada 9 farklı *F. graminearum* izolatında en fazla genetik varyasyonun gözlemlendiği FGSG_04074 ve FGSG_09066 kodlu genlerin, programda beyaz alanda, yani çok düşük oranda varyasyon oluşan “soğuk bölgeler”de yer aldığı

görülmektedir. Bu sonuçlar aslında bu tip haritaların daha fazla sayıda, farklı coğrafyaları temsil edilen izolatların melezlenmesiyle oluşturulması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu çerçevede, fungal efektör adaylarının belirlenmesinde kullanılan bir kriter olan “tür içinde yüksek varyasyon” olgusunu ortaya koyacak en güvenilir yöntemin, geniş bir izolat kültürü kullanılarak yapılacak sekans analizleri olduğu görülmektedir.

SNP (Tek Nükleotid Değişimleri- Single Nucleotide Polymorphism) analizleri bitki patojenleri üzerinde yapılan genetik çeşitlilik çalışmalarında başarıyla kullanılmaktadır. SNP temelinde geliştirilen moleküler markırlar tür teşhisinde ve genetik karakterizasyon çalışmalarında geniş bir kullanım alanı bulmaktadırlar (Delmotte ve diğ., 2008; Sun ve diğ., 2013; Taylor ve Fisher, 2003). Bu çalışma kapsamında bulunan SNP mutasyonlarının da türlerin ayrımını sağlayacak veriler içerdiği belirlenmiştir.

Çalışmada incelenen genlerde ortaya konun SNP mutasyonlarının birçoğunun aynı tür içinde ya da türler arasında herhangi bir amino asit değişikliğine neden olmadan oluştuğu görülmüştür. İlk bakışta herhangi bir amino asit değişikliğine neden olmadığı için nispeten önemsiz görünmektedirler. Fakat bu SNP mutasyonların, aynı tür içindeki bireyler için bir genetik parmak izi oluşturma ya da türleri birbirinden ayırt etmede kullanılabileme gibi potansiyellerinin yanında aslında içinde bulunduğu proteinin işlevini de etkileyebildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Doğada varlığı bilinen ve proteinlerin yapı taşları olan 20 farklı amino asit bilinmektedir. Genetikte “genetik kodun dejenere doğası” (Crick ve diğ., 1961) olarak da Türkçeleştirebileceğimiz bir olgu sayesinde aynı amino asit için birden fazla kodon (üçlü nükleotid yapıları) opsiyonu mevcuttur; kısaca aynı amino asidi kodlayan kodonlara “sinonim kodonlar” denmektedir. Örneğin leucine amino asiti için UUA, UUG, CUA, CUG, CUC ve CUU olmak üzere 6 adet kodon opsiyonu mevcuttur. Organizmadaki proteinin işlevini en iyi şekilde yerine getirebilmesi için bu sinonim kodonlardan hangisinin seçileceği ya da farklı kodon seçimlerinin proteinin işlevine etki edip etmeyeceği ile ilgili son yıllarda önemli araştırmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların bazılarında farklı organizmaların sinonim kodon kullanımında farklı davrandığını ortaya konulmuştur (Grantham ve diğ., 1980; Lynn ve diğ., 2002). Hatta bir canlıya ait genomda yüksek oranda ifade (expression) edilen genlerde, daha az ifade edilenlere oranla spesifik bir kodon setinin kullanıldığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Ikemura, 1981; McInerney, 1998). Özellikle

günümüzde moleküler biyolojinin çok popüler bir bölümü olan sentetik biyoloji alanında, yapay olarak sentezlenecek proteinlerde en uygun kodonların belirlenebilmesi için bu mekanizmanın iyi anlaşılması çok önemli görünmektedir (Plotkin ve Kudla, 2011). Bu çalışma kapsamında incelediğimiz genlerin çok büyük bir bölümünde tür içi, hemen hepsinde de türler arasında yukarıda açıklanan sinonim mutasyonlar, yani herhangi bir amino asit değişikliğine neden olmayan, fakat aynı amino asidin farklı bir kodon motifinin kullanılmasına neden olan mutasyonlar olduğu ortaya konmuştur. Bu mutasyonlar herhangi bir amino asit değişikliğine neden olmadıklarından, çalışma kapsamında mutasyonların proteinin başka proteinlerle etkileşime geçen yüzeylerinde herhangi bir değişikliğe neden olup olmayacağını belirlemek için yapılan analizlere (Emini Surface Accessibility Analizleri) konu olmamışlardır. Ama yukarıda açıklanmaya çalışıldığı gibi, gerçekte bu sessiz mutasyonların bile proteinin işlevinde bazı değişikliklere neden olabileceği anlaşılmaktadır. Genetik çeşitliliğin bugüne kadar klonlanan efektör proteinlerin temel özelliklerinden olduğu bilinmektedir. Bitki dayanıklılığını baskılayarak patojenin bitkide kurulumuna olanak sağlayacak ortamın oluşmasını sağlayan efektörler ile onları tanıyıp bitkideki dayanıklılık mekanizmalarını harekete geçirmeye çalışan bitki dayanıklılık genleri arasındaki ilişki, her iki grubun doğal mutasyonlar gibi araçlarla sürekli olarak değiştiği, çeşitlendiği bir süreçte varoluştan bu yana ilerlemektedir. Bu çalışma kapsamında, özellikle türler arasında bir gen içinde tanımlanan SNP mutasyonlarının, yukarıda anlatılan mekanizma ışığında genin ürünü olan proteinin işlevinde farklılaşmalara neden olarak, fungusun konukçusuna özelleşmesi ve alt türleşmesi (ya da türleşmesi) gibi süreçlerde önemli olabileceği ve bu anlamda çok değerli olduğu sonucu çıkarılabilir.

Oluşan SNP mutasyonları dikkatli incelendiğinde, birçoğunun genetikte transition mutasyon olarak da adlandırılan, pürin (Adenin, Guainin) ya da pirimidin (Sitozin, Timin) bazlarının kendi aralarında yer değiştirmesi sonucu olduğu görülmektedir. Colilins ve Jukes, (1994) kendilerini oluşturan mekanizmalardan kaynaklı nedenlerle, doğada transisyon (transition) mutasyonların, farklı baz grupları arasında meydana gelen transversiyon (transversion)'lara göre en az iki kat daha fazla olduğu görülmektedir (Collins ve Jukes, 1994). Transisyonlar genellikle amino asit değişikliğine neden olmazlar ve bu nedenle “sessiz yer değiştirmeler” (silent substitutions) olarak da bilinirler ve bu nedenle, gen üzerindeki bu tip SNP mutasyonları daha kalıcı (persist) olabilirler. İki halkalı olan pürinlerle, tek halkalı

olan primidinlerin yer değiştirmesi ile oluşan transversiyonlar ise bir amino asidi kodlayan kodonun geniş kısmını oluşturduklarından, etkisi daha belirgin mutasyonlar oluştururlar (<http://en.wikipedia.org/wiki/Transversion>, 21.04.2015). Bu alışma kapsamında incelenen genlerin önemli bir bölümünde her iki tip SNP mutasyonu da görülmüştür. Daha zor oluşmaları ve daha yüksek bir olasılıkla amino asit değişimine neden olmaları nedeniyle transversiyon tipi SNP mutasyonların proteinlerin işlevine nispeten daha fazla etki edeceği düşünülebilir. Bu da ilgili proteinin değişen evre şartlarına ve konukçu proteinlerindeki değişimlere daha kolay uyum sağlamasını kolaylaştırabilir.

Wakeley (1994), bu iki tip SNP mutasyonlardan hangilerinin bir gen üzerinde yaygın olduğunun bilinmesinin, genlere ait dizilerle ilgili evrimsel mesafenin ve doğal seleksiyonun gücünün ve modunun belirlenmesinde kullanılabileceğini ifade etmiştir. Bu çalışmada da bu bilgiye paralel olarak aynı gen üzerinde, tür içindeki SNP mutasyonlarının daha çok transisyon oranlarının daha yüksek bir oranda görünürken, türler arasındaki SNP mutasyonlarında transversiyon oranının daha yüksek oranla göründüğü tespit edilmiştir.

Birçok effektör proteinin ait olduğu patojen türüne özelleştiği ve hatta çok yakın türlerin efektör yapılarının bile birbiriyle çok az örtüştüğü görülmektedir (Tyler ve diğ., 2006). Bunun, muhtemelen konukçunun immune sisteminin reseptörlerinden kaçma ya da konukçuda hedef alınan proteinlerdeki çeşitliliğe ayak uydurmanın bir sonucu olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir (Panstruga ve Dodds, 2009). Bu alışmalar ışığında, dünyada moleküler bitki patolojisi alanında üzerinde en fazla çalışılan fungal bitki patojenlerinden biri olan (Dean ve diğ., 2012) *F. graminearum*'da uygun efektör adaylarını belirlemek için ele alınan bu çalışmada “aynı tür içinde dahi yüksek varyasyon gösteren” genlerin varlığı ortaya konulmuştur.

Çizelge 4.8. İncelenen genlerde gözlenen genetik çeşitlilik.

İZOLAT ADI	Fg Ph-1	FgGZ3639	Fg00-676	Fg16A	Fg820	DOAM	FG25	FG2331	FG06
GEN KODU	15-ADON	15-ADON	15-ADON	15-ADON	15-ADON	15-ADON	DON	DON	NIV
FGSG_09066	A	A	C*	B	C	B	AB	AB	C
FGSG_11205	A	A	A	AB*	AB	A	AB*	AB	AB
FGSG_04583	A	A	A	A	B	C	B	B	B*
FGSG_11047	A	A	A	A	AB	A	A	A	AB
FGSG_08238	A	A	A	A	AB*	AB	A	A	A
FGSG_11046	A	A	A	A	AB	A*	A	A	AB
FGSG_07988	A	A	A	A	A	A	A	A	A
FGSG_04074	A	A	A	A	B	A	BC	B	BC
FGSG_04735	A*	A**	A**	A	A	A	A	A	A
FGSG_10212	A	A	A	A	A	A	A	A	A
FGSG_05046	A	A	A	A	A	A	A	A	A
FGSG_08493	A	A	A	A	A	A	A	A	A
FGSG_12300	A								
FGSG_09403	A								
FGSG_01179	A		A		A	A	A	A	A
FGSG_09586	A	A	A*	A	A	A	A	A	A

*Tek bir nükleotid değişikliğini ifade eder

Çizelge 4.8’de de görülebileceği üzere, çalışılan SSP genleri içerisindeki en yüksek varyasyonu FGSG_09066, FGSG_11205 ve FGSG_04583 genleri göstermiştir. En düşük genetik varyasyon ise FGSG_10212, FGSG_05046, FGSG_09586 ve FGSG_08493 genleri göstermiştir. FGSG_12300, FGSG_09403 ve FGSG_01179 genlerine ait sağlıklı sekans sonuçları elde edilemediği için bu genler ile ilgili bir yorum yapılamamaktadır.

İlginç bir şekilde incelenen genlerin çoğunda türler arasındaki genetik benzerlik *F. graminearum*- *F. culmorum* - *F. pseudograminearum* ve *F. venenatum* olarak sıralanmıştır. Bu sonuçlar kaydadeğerdir çünkü, çok yakın bir zamana kadar, tek bir tür olarak değerlendirilen ve moleküler tekniklerin sistematik çalışmalarında kullanılmaya başlamasıyla birbirinden farklı iki tür olduğu tespit edilen *F. graminearum* ve *F. pseudograminearum* arasındaki incelenen genler yönüyle genetik benzerlik seviyesi, *F. graminearum* ve *F. culmorum* arasındaki genetik benzerlikten daha düşük çıkmıştır. *F. graminearum* ile birlikte dünyada başak yanıklığı hastalığına neden olan en önemli *Fusarium* türü olan *F. culmorum* ile ilgili çalışmalarda, *F. graminearum* için dizayn edilen primerlerin büyük bir kısmının kullanılabileceği görülmektedir. Örneğin bu çalışmada ele alınan 16 genden 12 tanesi *F. culmorum*’da da bant vermiştir. Bu durum bu iki başak yanıklığı patojeninin bitkiye girmek ve bitkide hastalık oluşturmak için benzer bir altyapı (genler) kullandıkları anlamına gelebilir. Her iki tür de başak yanıklığına neden olabilmek için benzer biyolojik araçlar (enzimler, proteinler) kullanıyor olabilirler ve doğal olarak bu durum, bu iki fungusun SSP genlerindeki benzerliği açıklayabilir. Bilindiği

gibi yakın bir zamana kadar *F. graminearum* olarak bilinen *F. pseudograminearum* buğdayda, temel olarak bir kök boğazı çürüklüğü patojenidir ve nadiren başak yanıklığına neden olur (Mudge ve diğ., 2006). Buğdayın kök ve kök boğazından girerek enfeksiyon oluşturan *F. pseudograminearum*'un, temel olarak çiçekten girerek başağı hastalandıran *F. graminearum*'dan farklı mekanizmalarla bitkiyi enfekte ettiğini düşünmek daha doğru olacaktır. Dolayısıyla enfeksiyon için gereken muhtemel proteinleri kodlayan SSP genlerindeki farklılıklar, bu iki patojenin enfeksiyon döngülerindeki farklılıklardan kaynaklanabilir. Bu sonuçlardan, ayrıca, *F. graminearum*'da yapılacak fonksiyon belirleme çalışmalarının diğer bir çok *Fusarium* türü için de bir model oluşturabileceği anlaşılmaktadır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Tam genom sekans analizi tamamlanan bir tür olan *F. graminearum*'a ait bir dizi efektör adayı genin analiz edildiği bu çalışmanın sonuçları ileride yapılacak başka araştırmalar için önemli sayılabilecek çıktılar içermektedir. Homoloji çalışmaları incelenen genlerin homologlarının aynı cinse giren türlerin yanında çok uzak türlerde de mevcut olduğunu ortaya koymuştur. Bu homolog genlerdeki dizi farklılıkları kullanılarak tür spesifik yeni primerler dizayn edilebilir ve birbirine çok yakın türlerin bile ayrımını mümkün kılabilir. Nitekim bu çalışmada SSP genlerinin karakterizasyonu için tasarlanan 3 adet primer çiftinin (FGSG_09066, FGSG_11205 ve FGSG_04583 için geliştirilen primerler) sadece *F. graminearum*'a spesifik olduğu, bu türe çok yakın bir tür olan hatta uzun zaman aynı isimle adlandırılan *F. pseudograminearum*'da bile herhangi bir bant vermediği görülmüştür. Belirlenen bu primerlerin tür teşhisi çalışmalarında kullanılabilmesi amacıyla daha geniş bir izolat koleksiyonu kullanılarak bu primerler testlenecek ve benzer sonuçlar alınması durumunda *F. graminearum*'a spesifik primerler olarak yayınlanarak araştırmacıların kullanımına sunulabilecektir.

Bu çalışmada da, elde edilen sekans verileri göstermiştir ki, incelenen genlerde çalışılan 4 türü birbirinden ayırt edebilecek SNP mutasyonları vardır. Hatta FGSG_10212 geninde *F. graminearum* referans izolatı olan ve tam genom sekansı tüm dünyada referans olarak kullanılan PH1 izolatına özgü bir SNP tanımlanmıştır. Bilindiği üzere özellikle epidemiyoloji ya da dayanıklı bitki seçimi için kurulan tarla denemelerinde, hastalık bulaştırılmakta ve daha sonra, değerlendirme aşamasında re-izolasyon ile hastalık etmeni patojen, tekrar elde edilmeye çalışılmaktadır. Fakat bitkide görülen belirtinin yapay inokulasyonda kullanılan referans izolat tarafından mı (PH1) yoksa patojenin tarla popülasyonu tarafından mı neden olunduğu belirlenememektedir. İşte bu çalışma kapsamında referans izolat olan PH1'da tanımlanan bu SNP

mutasyonu belirlenmiştir. Şekil 5.2’de de gösterildiği gibi FGSG_09586 geninin 399. nükleotinde oluşan bir C-T mutasyonu bu bölgeyi *F. pseudograminearum* için elde edilen fragmentte *BfmI*, *BstSFI* ve *SfcI* restriksiyon enzimleri için tanınır hale getirmiştir. Fragmentin başka hiçbir yerinde bu enzimler tarafından tanınan bir bölge olmadığı da görülmektedir. Bu bilginin de bir dizi doğrulama testinin ardından bu türün diğer *Fusarium* türlerinden ayırımını mümkün kılacağı düşünülmektedir.

Şekil 5.2. FGSG_09586 kodlu gen için *F. pseudograminearum* üzerinde oluşan SNP mutasyonu ile ortaya çıkan yeni enzim kesim bölgeleri.

Tabi ki efektör adaylarının belirlenmesinde tek kriter yüksek genetik varyasyon değildir. Tür içinde yüksek varyasyon gösteren yukarıdaki genler dışında başka organizmalarda efektör oldukları belirlenen bazı genlerin *F. graminearum*'daki homologları olan birkaç gen en güçlü adaylar olarak öne çıkmaktadırlar. Örneğin birçok çalışmada (Frías ve diğ., 2011; Martellini ve diğ., 2013; Pazzagli ve diğ., 1999; Scala ve diğ., 2004; Yu ve diğ., 2012) fungal patojenisite ile ilişkili olduğu ispatlanan bir protein grubu olan cerato-platanin grubu proteinlerin *F. graminearum*'daki homologları olan FGSG_10212 ve FGSG_11205 genleri, bu fungusda da en önemli efektör adayları olarak görülmektedir.

M. grisea'da, Saitoh ve diğ., (2012) tarafından fungal efektör olarak tanımlanan MC69 geninin bir homologunun FGSG_08493 koduyla *F. graminearum*'da var olduğu belirtilmiştir. Bu sebeplerle bu tez kapsamına dahil edilen bu gen, her ne kadar varyasyon çalışmalarında düşük varyasyon göstere, başka funguslarda efektör olarak tanımlandığı için *F. graminearum*'da da önemli efektör adaylarından bir olmaktadır. Ayrıca bu tez çalışmasıyla, Saitoh ve diğ.,(2012) tarafından ilgili genin başka funguslardaki homologlarının tanımlandığı çalışmada bulunmayan *F. culmorum*, *F. pseudograminearum* ve *F. venenatum*'da da MC69 geninin homologunun olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmanın ikinci bölümünde *F. graminearum*'da belirlenmiş 13 937 adet gen içerisinde fungal efektör adayı 16 adet genin belirlenmesi ve karakterizasyonu amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda belirlenen bu genler içerisinde bazı genlerin hem klasik efektör özelliklerini taşımaları hem de homoloji çalışmaları sonucunda başka funguslarda belirlenmiş fonksiyonları nedeniyle uygun efektör adayları oldukları belirlenmiştir. Bu veriler ışığında belirlenen bu genlerin fonksiyon kaybı ya da fonksiyon kazanımı gibi teknikler kullanılarak *F. graminearum*-Buğday interaksiyonundaki gerçek fonksiyonu tanımlanmalıdır. Böylelikle bu etmene karşı yürütülen dayanıklılık ıslahı ve yeni fungusit geliştirme gibi çalışmalar için hedef proteinlerin belirlenmesi aşamasına geçilebilecektir.

Yine çalışmamız kapsamında Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde, buğday alanlarında kök ve kök boğazı çürüklüğü belirtisi gösteren bitkilerden izole edilen *Fusarium* türleri moleküler ve klasik teknikler yardımıyla tanımlanmış ve bölgedeki güncel tür dağılımı ile ilgili durum ortaya konmuştur. *F. tricinctum* ve *M. nivale* bölgede buğday florasında ilk kez kayıt altına alınmıştır. Genel olarak belirlenen etmenlerin buğday, mercimek ve son yıllarda bölgede üretimi hızla artan mısırın ortak patojenleri olduğu düşünüldüğünde, bu etmenlerden kaynaklanan ürün kayıplarının önüne geçilmesi için münavebe sistemine bu çalışmada belirlenen *Fusarium* türleri tarafından hastalandırılmayan kültür bitkilerinin sisteme dahil edilmesinin uygun olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışma kapsamında buğday florasında belirlenen türler göz önüne alınarak münavebe programlarının hazırlanması gerekmektedir. Burada belirlenen türlerin konukçusu olmayan kültür bitkilerinin münavebe programlarına dahil edilmesi büyük önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Akinsanmi O., Backhouse D., Simpfendorfer S., Chakraborty S., 2006. Genetic diversity of Australian *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum*. *Plant Pathology*, 55(4), 494-504.
- Akinsanmi O., Mitter V., Simpfendorfer S., Backhouse D., Chakraborty S., 2004. Identity and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from wheat fields in Queensland and northern New South Wales. *Crop and Pasture Science*, 55(1), 97-107.
- Aktaş H., Tunalı B., Bostancıoğlu H., Bayram E., 1997. Reaction of some wheat varieties and lines against to root and foot-rot disease agents in the Field and Laboratory conditions. *Journal of Turkish Phytopathology*. 26, 61-68.
- Aktaş H., Bolat N., Keser M., İnce T., 2000. Eskişehir ili hububat ekim alanlarında hububat kök ve kökboğazı çürüklüğü hastalık etmenlerinin saptanması, buğday ve arpada *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subram. and Jain'ya karşı genitör çeşit ve hatların belirlenmesi. *Bitki Koruma Bülteni*.
- Aktaş H., Bostancıoğlu H., Tunalı B., Bayram E., 1996. Sakarya yöresinde buğday kök ve kökboğazı çürüklüğüne neden olan hastalık etmenlerinin belirlenmesi ve bu etmenlerin buğday yetiştirme teknikleri ile ilişkileri üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*.
- Aktaş H., Kınacı E., Yıldırım A., Sayın L., Kural A., 1999. Konya Yöresinde Hububatta Sorun Olan Kök ve Kökboğazı Çürüklüğü Etmenlerinin Hububatta Verim Komponentlerine Etkileri ve Mücadelesi Üzerine Araştırmalar. *Orta Anadolu da Hububat Tarımının Sorunları ve Çözüm Yolları Sempozyumu*, 392-403.
- Aoki T., O'Donnell K., 1999. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia*, 597-609.
- Araz A., Uğuz N., Güler, P., 2010. *Fusarium* türlerinin izolasyonu ve patojenitelerinin belirlenmesi. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 3(1), 1-5.

- Arıcı Ş. E., Arap Ü., Yatağan F. B., 2013. Isparta ve Burdur İlleri Buğday Ekim Alanlarındaki Kök ve Kök Boğazı Fungal Hastalık Etmenlerinin Belirlenmesi. *Journal of Natural and Applied Science*, 17(2), 26-30.
- Aydan A., Bayram M. E., Babaroğlu E. N., 2009. Sakarya ilinde bazı buğday çeşitlerinde kök ve kök boğazı hastalıklarına neden olan etmenlerin belirlenmesi. *Bitki Koruma Bülteni*, 49(1).
- Backhouse D., Abubakar A., Burgess L., Dennisc J., Hollaway G., Wildermuth G., Henry F., 2004. Survey of *Fusarium* species associated with crown rot of wheat and barley in eastern Australia. *Australasian Plant Pathology*, 33(2), 255-261.
- Baldwin T. K., Urban M., Brown N., Hammond-Kosack K. E., 2010. A role for topoisomerase I in *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* pathogenesis and sporulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(5), 566-577.
- Beccari G., Covarelli L., Nicholson P., 2011. Infection processes and soft wheat response to root rot and crown rot caused by *Fusarium culmorum*. *Plant Pathology*, 60(4), 671-684.
- Bentley A., Tunali B., Nicol J., Burgess L., Summerell B., 2006. A survey of *Fusarium* species associated with wheat and grass stem bases in northern Turkey.
- Bhasi A., Pandey R. V., Utharasamy S. P., Senapathy, P., 2007. EuSplice: a unified resource for the analysis of splice signals and alternative splicing in eukaryotic genes. *Bioinformatics*, 23(14), 1815-1823.
- Bowden R. L., Leslie J. F., 1992. Nitrate-nonutilizing mutants of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) and their use in determining vegetative compatibility. *Experimental Mycology*, 16(4), 308-315.
- Boyacıoğlu D., Hettiarachchy N., 1995. Changes in some biochemical components of wheat grain that was infected with *Fusarium graminearum*. *Journal of Cereal Science*, 21(1), 57-62.
- Brown N. A., Antoniow J., Hammond-Kosack K. E., 2012. The predicted secretome of the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*: a refined comparative analysis. *Plos One*, 7(4), e33731.
- Brown N. A., Urban M., Van de Meene A. M., Hammond-Kosack K. E., 2010. The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal Biology*, 114(7), 555-571.
- Buerstmayr H., Ban T., Anderson J. A., 2009. QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding*, 128(1), 1-26.

- Burgess L., Wearing A., Toussoun T., 1975. Surveys of *Fusaria* associated with crown rot of wheat in eastern Australia. *Crop and Pasture Science*, 26(5), 791-799.
- Cafer E., Bulut S., Tuba G., Öztürk A., 2014. Farklı Gübre Kaynakları ve Ekim Sıklığının Organik Buğdayda Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü Etmenlerine Etkisi. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2014(1).
- Chehri K., Salleh B., Yli-Mattila T., Reddy K., Abbasi S., 2011. Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. *Saudi journal of biological sciences*, 18(4), 341-351.
- Clement J., Parry D., 1998. Stem-base disease and fungal colonisation of winter wheat grown in compost inoculated with *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *Microdochium nivale*. *European Journal of Plant Pathology*, 104(4), 323-330.
- Cockerell V., Hutchins, J., Reeves J., 1997. *New and priority seedborne diseases in western Europe*. Paper presented at the Seed health testing: progress towards the 21st century.
- Collins D. W., Jukes T. H., 1994. Rates of transition and transversion in coding sequences since the human-rodent divergence. *Genomics*, 20(3), 386-396.
- Comparini C., Carresi L., Pagni E., Sbrana F., Sebastiani F., Luchi N., Pazzagli L., 2009. New proteins orthologous to cerato-platanin in various *Ceratocystis* species and the purification and characterization of cerato-populin from *Ceratocystis populicola*. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(2), 309-322.
- Cook R. J., Christen A. A., 1976. Growth of cereal root-rot fungi as affected by temperature-water potential interactions. *Phytopathology*, 66(2), 193-197.
- Covarelli L., Beccari G., Steed A., Nicholson P., 2012. Colonization of soft wheat following infection of the stem base by *Fusarium culmorum* and translocation of deoxynivalenol to the head. *Plant pathology*, 61(6), 1121-1129.
- Crick F., Barnett L., Brenner S., Watts-Tobin R. J., 1961. *General nature of the genetic code for proteins*: Macmillan Journals Limited.
- Cuomo C. A., Güldener U., Xu J.-R., Trail F., Turgeon B. G., Di Pietro A., Rep M., 2007. The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science*, 317(5843), 1400-1402.
- Cuzick A., Urban M., Hammond-Kosack K., 2008. *Fusarium graminearum* gene deletion mutants map1 and tri5 reveal similarities and differences in the pathogenicity requirements to cause disease on Arabidopsis and wheat floral tissue. *New Phytologist*, 177(4), 990-1000.

- Çepni E., Tunalı B., Gürel F., 2013. Genetic diversity and mating types of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* originating from different agro-ecological regions in Turkey. *Journal of Basic Microbiology*, 53(8), 686-694.
- D'mello J., Placinta, C., Macdonald A., 1999. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology*, 80(3), 183-205.
- De Groot P. W., Schaap P. J., Sonnenberg A. S., Visser J., Van Griensven L. J., 1996. The *Agaricus bisporus* *hypA* gene encodes a hydrophobin and specifically accumulates in peel tissue of mushroom caps during fruit body development. *Journal of Molecular Biology*, 257(5), 1008-1018.
- De Jonge, R., Thomma B. P., 2009. Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends in Microbiology*, 17(4), 151-157.
- De Wit P. J., 2007. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(21), 2726-2732.
- De Wit P. J., Mehrabi R., Van den Burg H. A., Stergiopoulos I., 2009. Fungal effector proteins: past, present and future. *Molecular Plant Pathology*, 10(6), 735-747.
- Dean R., Van Kan J. A., Pretorius Z. A., Hammond-Kosack K. E., Di Pietro A., Spanu, P. D., Ellis J., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430.
- Delmotte F., Giresse X., Richard-Cervera S., M'Baya J., Vear F., Tourvieille J., De Labrouhe D. T., 2008. Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), 534-540.
- Demirci E., Dane, E., 2003. Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. from stem bases of winter wheat in Erzurum, Turkey. *Phytoparasitica*, 31(2), 170-173. doi: 10.1007/BF02980787
- Djonovic S., Pozo M. J., Dangott L. J., Howell C. R., Kenerley C. M., 2006. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(8), 838-853.
- Dubin H. J., 1997. *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects: Proceedings of a Workshop Held at CIMMYT, El Batan, Mexico, 13-17 October, 1996*: CIMMYT.
- Dyer A. T., Johnston R. H., Hogg A. C., Johnston, J. A., 2009. Comparison of pathogenicity of the Fusarium crown rot (FCR) complex (*F. culmorum*, *F. pseudograminearum* and *F. graminearum*) on hard red spring and durum wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 125(3), 387-395.

- Edel V., Steinberg C., Gautheron N., Alabouvette C., 2000. Ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probe and PCR assay specific for *Fusarium oxysporum*. *Mycological Research*, 104(05), 518-526.
- Emini E., Hughes J. V., Perlow D., Boger J., 1985. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *Journal of virology*, 55(3), 836-839.
- Ergon Å., Skinnes H., Tronsmo A. M., 2003. Testing snow mould resistance of winter wheat: inoculation experiments with *Microdochium nivale* in the field. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Plant Soil Science*, 53(3), 110-117.
- Flor H., 1942. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*, 32(653), e69.
- Frías M., González C., Brito N., 2011. BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytologist*, 192(2), 483-495.
- Friesen T. L., Meinhardt S. W., Faris J. D., 2007. The *Stagonospora nodorum*-wheat pathosystem involves multiple proteinaceous host-selective toxins and corresponding host sensitivity genes that interact in an inverse gene-for-gene manner. *The Plant Journal*, 51(4), 681-692.
- Gale L. R., Bryant J., Calvo S., Giese H., Katan T., O'Donnell K., Ward, T. J., 2005. Chromosome complement of the fungal plant pathogen *Fusarium graminearum* based on genetic and physical mapping and cytological observations. *Genetics*, 171(3), 985-1001.
- Gelisse S., Peizer E., Dore T., Lannou C., 2006. Contamination des épis et des grains par la fusariose du blé. *Phytoma-La Défense des végétaux*(596), 28-32.
- Goswami R. S., Kistler H. C., 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5(6), 515-525.
- Grantham R., Gautier C., Gouy M., 1980. Codon frequencies in 119 individual genes confirm consistent choices of degenerate bases according to genome type. *Nucleic Acids Research*, 8(9), 1893-1912.
- Hacquard S., Joly D. L., Lin Y.-C., Tisserant E., Feau N., Delaruelle C., Petre B., 2012. A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(3), 279-293.
- Hall N., Keon J., Hargreaves J., 1999. A homologue of a gene implicated in the virulence of human fungal diseases is present in a plant fungal pathogen and is expressed during infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(1), 69-73.

- Harrow S. A., Farrokhi-Nejad R., Pitman A. R., Scott I. A., Bentley A., Hide C., Crome M. G., 2010. Characterisation of New Zealand *Fusarium* populations using a polyphasic approach differentiates the *F. avenaceum*/*F. acuminatum*/*F. tricinctum* species complex in cereal and grassland systems. *Fungal Biology*, 114(4), 293-311.
- Hogg A., Johnston R., Dyer A., 2007. Applying real-time quantitative PCR to *Fusarium* crown rot of wheat. *Plant Disease*, 91(8), 1021-1028.
- Hong S. Y., Choi E. J., Yun, S. H., 2010. Specific PCR detection of four quarantine *Fusarium* species in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 26(4), 409-416.
- Horevaji P., Bluhm B. H., 2012. BDM1, a phosphatase-like gene of *Fusarium graminearum*, is involved in virulence during infection of wheat and maize. *Molecular Plant Pathology*, 13(5), 431-444.
- Ikemura T., 1981. Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. *Journal of Molecular Biology*, 146(1), 1-21.
- Jeong J. S., Mitchell T. K., Dean R. A., 2007. The *Magnaporthe oryzae* snodpro1 homolog, MSP1, is required for virulence. *FEMS Microbiology Letters*, 273(2), 157-165.
- Jones J. D., Dangl J. L., 2006. The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329.
- Jurado M., Vázquez C., Marín S., Sanchis V., González-Jaén M. T., 2006. PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(8), 681-689.
- Jurgenson J., Bowden R., Zeller K., Leslie J., Alexander N., Plattner R., 2002. A genetic map of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). *Genetics*, 160(4), 1451-1460.
- Kaku H., Nishizawa Y., Ishii-Minami N., Akimoto-Tomiyama C., Dohmae N., Takio K., Shibuya N., 2006. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(29), 11086-11091.
- Kazmierczak P., Kim D. H., Turina M., Van Alfen N. K., 2005. A hydrophobin of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, is required for stromal pustule eruption. *Eukaryotic Cell*, 4(5), 931-936.
- Kimura M., Tokai T., Takahashi-Ando N., Ohsato S., Fujimura M., 2007. Molecular and genetic studies of *Fusarium trichothecene* biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(9), 2105-2123.
- Kınacı E., 1984. Monitoring wheat root and foot rots in Central Anatolian Region of Turkey. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 13(2-3), 71-74.

- Klein T., Burgess L., Ellison F., 1991. The incidence and spatial patterns of wheat plants infected by *Fusarium graminearum* Group 1 and the effect of crown rot on yield. *Crop and Pasture Science*, 42(3), 399-407.
- Kulik T., 2008. Detection of *Fusarium tricinctum* from cereal grain using PCR assay. *Journal of Applied Genetics*, 49(3), 305-311. doi: 10.1007/BF03195628
- Latgé J.-P., Bouziane H., Diaquin M., 1988. Ultrastructure and composition of the conidial wall of *Cladosporium cladosporioides*. *Canadian Journal of Microbiology*, 34(12), 1325-1329.
- Linder M. B., Szilvay G. R., Nakari-Setälä T., Penttilä M. E., 2005. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), 877-896.
- Liu Z., Zhang Z., Faris J. D., Oliver R. P., Syme R., McDonald M. C., Shelver W. L., 2012. The cysteine rich necrotrophic effector SnTox1 produced by *Stagonospora nodorum* triggers susceptibility of wheat lines harboring Snn1. *PLoS pathogens*, 8(1), e1002467.
- Lynn D. J., Singer G. A., Hickey D. A., 2002. Synonymous codon usage is subject to selection in thermophilic bacteria. *Nucleic Acids Research*, 30(19), 4272-4277.
- Maier F. J., Miedaner T., Haderl B., Felk A., Salomon S., Lemmens M., Schaefer W., 2006. Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology*, 7(6), 449-461.
- Martellini F., Faoro F., Carresi L., Pantera B., Baccelli I., Maffi D., Pazzagli L., 2013. Cerato-Populin and Cerato-Platanin, Two Non-Catalytic Proteins from Phytopathogenic Fungi, Interact with Hydrophobic Inanimate Surfaces and Leaves. *Molecular Biotechnology*, 55(1), 27-42. doi: 10.1007/s12033-012-9618-4
- McInerney J. O., 1998. Replicational and transcriptional selection on codon usage in *Borrelia burgdorferi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18), 10698-10703.
- McMullen M., Jones R., Gallenberg D., 1997. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*, 81(12), 1340-1348.
- Mergoum M., Quick J., Hill J., Nsarellah N., Nachit M., Pfeiffer W., 1998. Root rot of wheat: Inoculation and screening techniques, yield loss assessment and germplasm evaluation. *Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot*, 263-276.
- Miedaner T., Schilling A. G., 1996. Genetic variation of aggressiveness in individual field populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* tested on young plants of winter rye. *European Journal of Plant Pathology*, 102(9), 823-830.

- Mishra P. K., Fox R. T., Culham A., 2003. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. *FEMS Microbiology Letters*, 218(2), 329-332.
- Mitter V., Zhang M., Liu C., Ghosh R., Ghosh M., Chakraborty S., 2006. A high-throughput glasshouse bioassay to detect crown rot resistance in wheat germplasm. *Plant Pathology*, 55(3), 433-441.
- Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu K., Shibuya N., 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19613-19618.
- Motteram J., Küfner I., Deller S., Brunner F., Hammond-Kosack K. E., Nürnberger T., Rudd J. J., 2009. Molecular characterization and functional analysis of MgNLP, the sole NPP1 domain-containing protein, from the fungal wheat leaf pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(7), 790-799.
- Mudge A. M., Dill-Macky R., Dong Y., Gardiner D. M., White R. G., Manners J. M., 2006. A role for the mycotoxin deoxynivalenol in stem colonisation during crown rot disease of wheat caused by *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69(1), 73-85.
- Mulè G., Susca A., Stea G., Moretti A., 2004. Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* from asparagus plants using primers based on calmodulin gene sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 230(2), 235-240.
- Nicholson P., Simpson D., Weston G., Rezanoor H., Lees A., Parry D., Joyce D., 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53(1), 17-37.
- Nirenberg H. I., 1981. A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. *Canadian Journal of Botany*, 59(9), 1599-1609.
- Obanor F., Erginbas-Orakci G., Tunali B., Nicol J., Chakraborty S., 2010. *Fusarium culmorum* is a single phylogenetic species based on multilocus sequence analysis. *Fungal Biology*, 114(9), 753-765.
- Oswald J. W., 1949. Cultural variation, taxonomy and pathogenicity of *Fusarium* species associated with cereal root rots. *Phytopathology*, 39(5), 359-376.
- Ottmann C., Luberacki B., Küfner I., Koch W., Brunner F., Weyand M., Seitz H. U., 2009. A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25), 10359-10364.
- Özer N., Soran, H., 1991. *Fusarium* species of Turkey. *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 6(6).

- Panstruga R., Dodds P. N., 2009. Terrific Protein Traffic: The mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5928), 748-750. doi: 10.1126/science.1171652
- Parry D., Jenkinson P., McLeod L., 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant Pathology*, 44(2), 207-238.
- Parry D. W., Rezanoor H. N., Pettitt T. R., Hare M. C., Nicholson P., 1995. Analysis of *Microdochium nivale* isolates from wheat in the UK during 1993. *Annals of Applied Biology*, 126(3), 449-455.
- Pazzagli L., Cappugi G., Manao G., Camici G., Santini A., Scala A., 1999. Purification, characterization, and amino acid sequence of cerato-platanin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(35), 24959-24964.
- Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M., 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(9), 754-766.
- Plotkin J. B., Kudla G., 2011. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nature Reviews Genetics*, 12(1), 32-42.
- Poels P., Sztor E., Cannaert F., 2006. Fusariose: elle peut migrer de la semence à l'épi. *Phytoma-La Défense des végétaux*(593), 9-12.
- Poole G. J., Smiley R. W., Walker C., Huggins D., Rupp R., Abatzoglou J., Paulitz T. C., 2013. Effect of climate on the distribution of *Fusarium* spp. causing crown rot of wheat in the Pacific Northwest of the United States. *Phytopathology*, 103(11), 1130-1140.
- Pritsch C., Muehlbauer G. J., Bushnell W. R., Somers D. A., Vance C. P., 2000. Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(2), 159-169.
- Purss G., 1971. Pathogenic specialization in *Fusarium graminearum*. *Crop and Pasture Science*, 22(4), 553-561.
- Rep M., 2005. Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS Microbiology Letters*, 253(1), 19-27.
- Saitoh H., Fujisawa S., Mitsuoka C., Ito A., Hirabuchi A., Ikeda K., Matsumura H., 2012. Large-scale gene disruption in *Magnaporthe oryzae* identifies MC69, a secreted protein required for infection by monocot and dicot fungal pathogens. *PLoS Pathogens*, 8(5), e1002711.
- Saremi H., Ammarellou A., Jafary H., 2007. Incidence of crown rot disease of wheat caused by *Fusarium pseudograminearum* as a new soil born fungal species in north west Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 10(20), 3606-3612.

- Scala A., Pazzagli L., Comparini C., Santini A., Tegli S., Cappugi G., 2004. Ceratoplatanin, an early-produced protein by *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*, elicits phytoalexin synthesis in host and non-host plants. *Journal of Plant Pathology*, 27-33.
- Scott J., Akinsami O., Mitter V., Simpfendorfer S., Dill-Macky R., Chakraborty S., 2003. Prevalence of *Fusarium* crown rot pathogens of wheat in southern Queensland and northern New South Wales.
- Scott J. B., Chakraborty S., 2006. Multilocus sequence analysis of *Fusarium pseudograminearum* reveals a single phylogenetic species. *Mycological Research*, 110(12), 1413-1425.
- Shan W., Cao M., Leung D., Tyler B. M., 2004. The Avr1b locus of *Phytophthora sojae* encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on soybean plants carrying resistance gene Rps 1b. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(4), 394-403.
- Smiley R. W., Gourlie J. A., Easley S. A., Patterson L.-M., Whittaker R. G., 2005. Crop damage estimates for crown rot of wheat and barley in the Pacific Northwest. *Plant Disease*, 89(6), 595-604.
- Smiley R. W., Patterson L.-M., 1996. Pathogenic fungi associated with *Fusarium* foot rot of winter wheat in the semiarid Pacific Northwest. *Plant Disease*, 80(8), 944-949.
- Snijders C., 1990. Systemic fungal growth of *Fusarium culmorum* in stems of winter wheat. *Journal of phytopathology*, 129(2), 133-140.
- Soran H., Damgaci E., 1980. Ankara ili bugday ekim alanlarında kök ve kökboğazi hastalığına neden olan fungal etmenlerin saptanması üzerinde araştırmalar. *TUBİTAK VII. Bilim Kongresi. TOAG Grubu. Bildiri kitabı*, 119-128.
- Southwell R., Moore K., Maiming W., Hayman P., 2003. An outbreak of *Fusarium* head blight of durum wheat on the Liverpool Plains in northern New South Wales in 1999. *Australasian Plant Pathology*, 32(4), 465-471.
- Staskawicz B. J., Dahlbeck D., Keen N. T., 1984. Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.) Merr. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(19), 6024-6028.
- Stephens A. E., Gardiner D. M., White R. G., Munn A. L., Manners J. M., 2008. Phases of infection and gene expression of *Fusarium graminearum* during crown rot disease of wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(12), 1571-1581.
- Sun X., Kang S., Zhang Y., Tan X., Yu Y., He H., Sun W., 2013. Genetic diversity and population structure of rice pathogen *Ustilaginoidea virens* in China. *PloS One*, 8(9), e76879.

- Taylor J. W., Fisher M. C., 2003. Fungal multilocus sequence typing—it's not just for bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 6(4), 351-356.
- Trail F., 2009. For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiology*, 149(1), 103-110.
- TÜİK, 2015. Bitkisel Üretim İstatistikleri. Retrieved 10.03.2015, from Türkiye İstatistik Kurumu <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>
- Tunali B., Nicol J., Erol F. Y., Altıparmak G., (2006a). Pathogenicity of Turkish crown and head scab isolates on stem bases on winter wheat under greenhouse conditions. *Plant Pathology Journal*, 5(2), 143-149.
- Tunali B., Nicol J. M., Hodson D., Uçkun Z., Büyük O., Erdurmus D., Bağcı S. A., 2008. Root and crown rot fungi associated with spring, facultative, and winter wheat in Turkey. *Plant Disease*, 92(9), 1299-1306.
- Tunali B., Obanor F., Erginbaş G., Westecott R. A., Nicol J., Chakraborty S., 2012. Fitness of three *Fusarium* pathogens of wheat. *FEMS Microbiology Ecology*, 81(3), 596-609.
- Tunali B., Özseven I., Büyük O., Erdurmus D., Demirci A., 2006b. *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation of wheat in marmara region and reactions of wheat cultivars and lines to *F. graminearum* and *F. culmorum*. *Plant Pathology Journal*.
- Tyler B. M., Tripathy S., Zhang X., Dehal P., Jiang R. H., Aerts A., Boore J. L., 2006. Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science*, 313(5791), 1261-1266. doi: 10.1126/science.1128796
- Uçkun Z., Yıldız M., 2004. İzmir, Aydın ve Denizli illeri buğday alanlarındaki kök ve kökboğazı hastalıklarının yoğunluğunun ve etmenlerinin belirlenmesi. *Bitki Koruma Bülteni*.
- Urban M., Daniels S., Mott E., Hammond-Kosack K., 2002. Arabidopsis is susceptible to the cereal ear blight fungal pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *The Plant Journal*, 32(6), 961-973.
- Urban M., Mott E., Farley T., Hammond-Kosack K., 2003. The *Fusarium graminearum* MAP1 gene is essential for pathogenicity and development of perithecia. *Molecular plant pathology*, 4(5), 347-359.
- Van Kan J. A., Van Den Ackerveken G., De Wit P., 1991. Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene avr9 of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 4, 52-59.
- Vincent D., Du Fall L. A., Livk A., Mathesius U., Lipscombe R. J., Oliver R. P., Solomon P. S., 2012. A functional genomics approach to dissect the mode of action of the *Stagonospora nodorum* effector protein SnToxA in wheat. *Molecular Plant Pathology*, 13(5), 467-482.

- Wakeley, J., 1994. Substitution-rate variation among sites and the estimation of transition bias. *Molecular Biology and Evolution*, 11(3), 436-442.
- Wang X., Shi F., Wösten H., Hektor H., Poolman B., Robillard G., 2005. The SC3 hydrophobin self-assembles into a membrane with distinct mass transfer properties. *Biophysical Journal*, 88(5), 3434-3443.
- Wanjiru W. M., Zhensheng K., Buchenauer H., 2002. Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. *European Journal of Plant Pathology*, 108(8), 803-810.
- Wessels J. G., De Vries O. M., Asgeirsdottir S. A., Schuren F. H., 1991. Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*. *The Plant Cell Online*, 3(8), 793-799.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18, 315-322.
- Williams K., Dennis J., Smyl C., Wallwork H., 2002. The application of species-specific assays based on the polymerase chain reaction to analyse *Fusarium* crown rot of durum wheat. *Australasian Plant Pathology*, 31(2), 119-127.
- Winnenburg R., Urban M., Beacham A., Baldwin T. K., Holland S., Lindeberg M., Köhler J., 2008. PHI-base update: additions to the pathogen–host interaction database. *Nucleic Acids Research*, 36(suppl 1), D572-D576.
- Wong P., Walter M., Lee W., Mannhaupt G., Münsterkötter M., Mewes H.-W., Güldener U., 2011. FGDB: revisiting the genome annotation of the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl 1), D637-D639.
- Wösten H. A., 2001. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 625-646.
- Yang F., Jensen J. D., Svensson B., Jørgensen H. J., Collinge D. B., Finnie C., 2012. Secretomics identifies *Fusarium graminearum* proteins involved in the interaction with barley and wheat. *Molecular Plant Pathology*, 13(5), 445-453.
- Yang Y., Zhang H., Li G., Li W., Wang X., Song F., 2009. Ectopic expression of MgSM1, a Cerato-platanin family protein from *Magnaporthe grisea*, confers broad-spectrum disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal*, 7(8), 763-777.
- Yılmazdemir F., 1976. Edirne, Tekirdağ ve Kırklareli illerinde buğday kök hastalıklarının fungal etmenleri ve bu hastalıkların dağılışına toprak Ph ve nem'inin etkisi üzerinde araştırmalar. *Uzmanlık Tezi, Ege Üni. Zir. Fak.*
- Yu H., Duan J., Wang B., Jiang X., 2012. The Function of Snodprot in the Cerato-Platanin Family from *Dactylellina cionopaga* in Nematophagous Fungi.

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 76(10), 1835-1842. doi: 10.1271/bbb.120173

Zhang H., Li B., Fang Q., Li Y., Zheng X., Zhang Z., 2015. SNARE protein FgVam7 controls growth, asexual and sexual development, and plant infection in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Pathology*.

ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı : Fatih ÖLMEZ

Doğum Yeri ve Tarihi : KONYA / 1979

Adres : Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü
Biyoteknoloji Birimi, Yenimahalle Tarım Kampüsü
ANKARA

E-Posta : fatiholmez@hotmail.com

Lisans : Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi ,
Bitki Koruma Bölümü

Yüksek Lisans : Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi ,
Bitki Koruma Bölümü

Mesleki Deneyim ve Ödüller :

Yayın ve Patent Listesi :