



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fusarium graminearum İZOLATLARININ CAPS
MARKIRLARIYLA GENOTİPLENDİRMESİ

Funda KAYA

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Gülruh ALBAYRAK

Haziran , 2014

İSTANBUL

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

Tez Jürisi:



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



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



Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Şule ARI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Kadir TURAN
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 25290 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim boyunca her aşamada ilgisini, desteğini ve sevgisini daima hissettiğim sevgili danışman hocam Doç. Dr. Gülruh ALBAYRAK'a en içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Başta Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Nazlı ARDA olmak üzere, bölümümüzün diğer tüm saygıdeğer Öğretim Üyelerine teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarım esnasında yardımını esirgemeyen Uzm. Biyolog Emre YÖRÜK ve laboratuvar çalışmalarındaki yardımları için Aylin GAZDAĞLI'ya teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi manevi her türlü desteği sağlayan sevgili AİLEME ve desteğini her daim hissettiğim Önder KILIÇ'a en içten teşekkürlerimi, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Haziran 2014

Funda KAYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	2
2.1. MOLEKÜLER MARKIRLAR.....	3
2.2. MOLEKÜLER MARKIR YÖNTEMLERİ.....	4
2.2.1. Dizileme Temelli Markır Yöntemleri	5
2.2.2. Restriksiyon Endonükleazı Kesimi Temelli Markır Yöntemleri	5
2.2.3. Çoğaltım Temelli Markır Yöntemleri	6
2.2.4. Çoğaltım ve Restriksiyon Endonükleazı Kesimi Temelli Yöntemler.....	6
2.3. <i>Fusarium graminearum</i>	7
2.4. <i>Fusarium</i> GENUSU VE MOLEKÜLER MARKIRLAR.....	10
2.4.1. İmmunolojik Markırlar	10
2.4.2. Türe Özgün Markırlar	10
2.4.3. Polimorfizm Belirleme Markırları	11
2.4.4. Filogenetik Markırlar	13
2.4.5. SNP	14
2.6. CAPS MARKIRLARI	16
3. MALZEME VE YÖNTEM	20
3.1. MANTAR MATERYALİ	20
3.2. KÜLTÜR KOŞULLARI VE SAKLAMA	20
3.3. GENOMİK DNA İZOLASYONU	21
3.3.1. DNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi.....	22
3.4. SCAR MARKIRI ÇOĞALTIMI İLE TÜR TANISI.....	23

3.4.1. SCAR Markır Analizi	23
3.5. CAPS MARKIRLARININ ÇOĞALTIMI VE ANALİZİ	23
3.5.1. Çoğaltımı Hedeflenen Bölgelerin Seçimi	24
3.5.2. Primer Tasarımı	24
3.5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bileşenleri ve Koşulları.....	25
3.5.4. Çoğaltım Ürünlerinin Analizi	25
3.5.5. Çoğaltım Ürünlerinin RE ile Kesimi	26
3.5.5.1. Uygun RE Seçimi.....	26
3.5.5.2. RE Kesim Koşulları	27
3.5.6. SNP Analizi	27
3.5.6.1. Nusiv Agaroz Jel Elektroforezi.....	27
3.5.6.2. Dizi Analizi.....	28
3.5.6.3. Verilerin Biyoinformatik Araçlarla Analizi.....	28
4. BULGULAR	29
4.1. MANTAR ÜRETİMİ	29
4.2. MOLEKÜLER ANALİZLER	30
4.2.1. Genomik DNA Analizi	30
4.2.2. İzolatların PZR Temelli Tanısı	31
4.2.3. CAPS Moleküler Markır Analizi	33
4.2.3.1. Histon 3 geninin PZR ile çoğaltılması	33
4.2.3.2. Restriksiyon endonükleazlarının seçilmesi.....	33
4.2.3.3. Histon 3 genine ait çoğaltım ürünlerinin Ava II ve Tfi I restriksiyon endonükleazları ile kesilmesi.....	33
4.2.3.4. FG10010.1 geninin PZR ile çoğaltılması.....	37
4.2.3.5. Restriksiyon endonükleazlarının seçilmesi.....	37
4.2.3.6. FG10010.1 geninin Ava II ve Tfi I restriksiyon endonükleazları ile kesilmesi	37
4.2.3.7. D3G3 markırının PZR ile çoğaltılması	42
4.2.3.8. Restriksiyon endonükleazının seçilmesi	42
4.2.3.9. D3G3 markırına ait çoğaltım ürünlerinin Hae III ve EcoR I restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi.....	42
4.2.3.10. Aktin geninin PZR ile çoğaltılması.....	44
4.2.3.11. Restriksiyon endonükleazının seçilmesi	44
4.2.3.12. Aktin genine ait çoğaltım ürünlerinin Fok I ve Cla I restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi	44

4.2.3.13. Hipotetik proteini kodlayan FG08859.1 geninin PZR ile çoğaltılması	47
4.2.3.14. Restriksiyon endonükleazlarının seçilmesi.....	47
4.2.3.15. Hipotetik proteini kodlayan gene ait çoğaltım ürünlerinin Ava II ve Rsa I restriksiyon endonükleazları ile kesilmesi	47
4.2.3.16. Dizi ve Dizi Bilgilerinin Analizi	50
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ.....	75

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** *Fusarium graminearum* genomunda bulunan yaklaşık SNP sayısı.15
- Şekil 2.2:** SNP'lerin neden olduğu restriksiyon endonükleazı tanıma bölgelerinin kaybolması veya yeniden oluşmasına bağlı olarak farklı boyutlardaki parçaların oluşması.18
- Şekil 3.1:** NCBI ana sayfası arama çubuğunda EST bölgelerinin seçilmesi.24
- Şekil 3.2:** NEBcutter V2.0 programı ile uygun restriksiyon endonükleazlarının seçilmesi.26
- Şekil 4.1:** Türkiye'de hastalık etmeni olan PDA besi ortamında üretilen 14 *F. graminearum* izolatının 7 günlük kültürleri.29
- Şekil 4.2:** İran'da hastalık etmeni olan PDA besi ortamında üretilen 31 *F. graminearum* izolatının 7 günlük kültürleri.30
- Şekil 4.3:** UBC85 SCAR markırının özgün primer çifti kullanılarak *F. graminearum* izolarında çoğaltılan ve agaroz jelde gözlenen 332 bç boyutundaki DNA fragmenti, M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.32
- Şekil 4.4:** Özgün H3 I/G primer çifti kullanılarak *F. graminearum* izolatlarında çoğaltılan ve agaroz jelde gözlenen 437 bç boyutundaki DNA fragmenti, M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.34
- Şekil 4.5:** *H3* genine ait çoğaltım ürünlerinin *Ava* II restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi sonucu oluşan 155 ve 282 bç boyutundaki kesim ürünlerinin nusiv agaroz jel elektroforezi ile gözlenmesi, M: 100 bç ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.35
- Şekil 4.6:** *H3* geninine ait çoğaltım ürünlerinin *Tfi* I retrfiksiyon endonükleazı ile kesilmesi sonucu oluşan 117 ve 320 bç boyutundaki kesim ürünlerinin nusiv agaroz jel elektroforezi ile gözlenmesi, M: 100 bç ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.36
- Şekil 4.7:** Özgün Rib I/G primer çifti kullanılarak *F. graminearum* izolarında çoğaltılan ve agaroz jelde gözlenen 801 bç boyutundaki DNA fragmenti, M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA.38
- Şekil 4.8:** Ribozomal proteini kodlayan gene ait çoğaltım ürünlerinin *Ava* II restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi sonucunda 120 ve 645bç boyutundaki kesim ürünlerinin nusiv agaroz jel elektroforezi ile gözlenmesi, M: 100 bç ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.....39
- Şekil 4.9:** Ribozomal proteini kodlayan gene ait çoğaltım ürünlerinin *Tfi* I restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi sonucunda oluşan 331 ve 470 bç boyutundaki kesim

- ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile gözlenmesi, M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.40
- Şekil 4.10:** F5 ve F7 izolatlarının *Tfi* I restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi ve nusiv agaroz jel elektroforezi ile polimorizm gösterilmesi, M: 100 bç ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.41
- Şekil 4.11:** Özgün D3G3 I/G primer çifti kullanılarak *F. graminearum* izolarında çoğaltılan ve agaroz jelde gözlenen 735 bç boyutundaki DNA fragmenti, M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.43
- Şekil 4.12:** D3G3 markırına ait çoğaltım ürünlerinin *Eco* RI restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi sonucunda oluşan 136 ve 599 bç boyutundaki kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile gösterilmesi, M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.43
- Şekil 4.13:** Özgün Act I/G primer çifti kullanılarak *F. graminearum* izolatlarında çoğaltılan ve agaroz jelde gözlenen 1209 bç boyutundaki DNA fragmenti, M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.45
- Şekil 4.14:** Aktin genine ait çoğaltım ürünlerinin *Cla* I restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi sonucunda oluşan 275 ve 934bç boyutundaki kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile gösterilmesi, M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.46
- Şekil 4.15:** Özgün Hip I/G primer çifti kullanılarak *F. graminearum* izolarında çoğaltılan ve agaroz jelde gözlenen 1030 bç boyutundaki DNA fragmenti, M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.48
- Şekil 4.16:** Hipotetik proteini kodlayan gene ait çoğaltım ürünlerinin *Ava* II restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi sonucunda oluşan 142 ve 888 bç boyutundaki kesim ürünlerinin nusiv agaroz jel elektroforezi ile gösterilmesi, M: 100 bç ağırlığındaki standart DNA.48
- Şekil 4.17:** Hipotetik proteini kodlayan gene ait çoğaltım ürünlerinin *Rsa* I restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi sonucunda oluşan 204 ve 826 bç boyutundaki kesim ürünlerinin nusiv agaroz jel elektroforezi ile gösterilmesi, M: 100 bç ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.49
- Şekil 4.18:** Clustal W yazılımı ile F5 ve F7 izolatına ait *FG1010.1* geninin *F.graminearum* PH-1 referans genomu dizisi ile karşılaştırılması. * identik nukleotidleri, - delesyonlu bazları, ↓ SNP'leri göstermektedir. RE kesim bölgesi kutu içine alınmıştır.....51
- Şekil 4.19:** Clustal W yazılımı ile Sh15 izolatına ait *D3G3* markırınının *F.graminearum* PH-1 referans genomu dizisi ile karşılaştırılması. * identik nukleotidleri, - delesyonlu bazları, ↓ SNP'leri göstermektedir. RE kesim bölgesi kutu içine alınmıştır 52
- Şekil 4.20:** Clustal W yazılımı ile Sh14 izolatına ait *FG08855.1* geninin *F.graminearum* PH-1 referans genomu dizisi ile karşılaştırılması...* identik nukleotidleri, - delesyonlu bazları, ↓ SNP'leri göstermektedir. RE kesim bölgesi kutu içine alınmıştır53

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan <i>F. graminearum</i> izolatları ve etkili oldukları coğrafik bölgeler.	20
Tablo 3.2: <i>Fusarium graminearum</i> izolatlarının üretilmesinde kullanılan besi ortamları ve içerikleri, pH 6.5.	21
Tablo 3.3: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar.	22
Tablo 3.4: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar.	23
Tablo 3.5: CAPS markır analizinde kullanılan primerler ve nukleotid dizilimleri.	25
Tablo 3.6: CAPS yönteminde kullanılan restriksiyon endonükleazları ve kesim ürünleri boyutu.	27

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fusarium graminearum İZOLATLARININ CAPS MARKIRLARIYLA GENOTİPLENDİRMESİ

Funda KAYA

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Gülruh ALBAYRAK

Fusarium graminearum tüm dünyada tür içi çeşitliliği yüksek olan bir bitki patojenidir. Bu nedenle, bu türe ait izolatların genotiplendirmesi büyük bir önem taşımaktadır. Bu Yüksek Lisans tez çalışmasında, farklı coğrafik bölgelerden sağlanan 45 *F. graminearum* izolatının genotiplendirmesi ve tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, CAPS moleküler markır yöntemi dört genin (*histon 3*, *ribozomal protein*, *aktin* ve *hipotetik protein* genleri) ve bir RAPD markırının (hipotetik proteinle ilişkili D3G3) analizinde kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) çoğaltım ürünleri yedi farklı restriksiyon endonukleazı (*Ava* II, *Rsa* I, *Fok* I, *Hae* III, *Eco* RI, *Cla* I, *Tfi* I) ile kesilerek SNP'ler tarandı.

Bu çalışmada, *histon 3* ve *aktin* genlerinde polimorfizm gözlenemedi. Ancak, F5 ve F7 izolatlarında *ribozomal protein* geninin *Tfi* I restriksiyon kesimi ile sırasıyla C'nin G'ye transversiyonu ve C'nin T'ye transisyonu belirlendi. Ek olarak, bu gen dizilerinde tekli (G) ve ikili baz delesyonu (AG) bulundu. Ayrıca, Sh15 izolatının D3G3 RAPD markırında bir SNP (C'nin T'ye dönüşümü) ve altı nükleotidlik delesyon(GCGGGG) görüldü. *Eco*R I restriksiyon kesimi bu farklılıkları ortaya koydu. Aynı zamanda, transisyon tipte bir mutasyon (G→A) Sh14 izolatında hipotetik proteini kodlayan gen dizisinin *Ava* II restriksiyon kesimi ile belirlendi. Bu mutasyonların hiçbirinin çalışılan gen bölgelerinin okunma çerçevesi (ORF) ve markır dizilerinde dur kodonuna yol açmadığı gözlemlendi. Sonuç olarak bu çalışmada, temel hücresel süreçlerde görev alan genlerde ve RAPD markırında mutasyonlar –SNP'lerle birlikte delesyonlar- bulundu.

Bu mutasyonların proteinlerle ilişkili amino asit dizilerinde değişime yol açabileceği öngörülmektedir.

Haziran 2014, 75.

Anahtar kelimeler: *Fusarium graminearum*, CAPS moleküler markır yöntemi, tek nukleotid polimorfizmi (SNP), markır aracılı seçim.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

GENOTYPING OF *Fusarium graminearum* ISOLATES WITH CAPS MARKERS

Funda KAYA

Istanbul University

Graduate School of Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Associated Prof. Gülruh ALBAYRAK

Fusarium graminearum is a prevalent plant pathogen which has a high intraspecific diversity all over the world. Therefore, genotyping of isolates belonging to the species has a great importance. In this thesis, it was aimed to both genotype of 45 *F. graminearum* isolates obtained from different geographic regions and determine of single nucleotide polymorphisms (SNPs). In this context, CAPS molecular marker method was used in the analysis of four genes (*histone 3*, *ribosomal protein*, *actin* and *hypothetical protein* genes) and one RAPD marker (D3G3 related to hypothetical protein). SNPs were searched by digestion of polymerase chain reaction (PCR) amplification products of them with seven different restriction endonucleases (*Ava* II, *Rsa* I, *Fok* I, *Hae* III, *EcoR* I, *Cla* I, *Tfi* I).

In this study, polymorphism was not obtained in *histone 3* and *actin* genes. However, transversion of C to G and transition C to T as SNPs were determined with *Tfi* I restriction digestion of *ribosomal protein* gene in F5 and F7 isolates, respectively. In addition, single (G) and double base deletion (AG) were found in the gene sequences. Besides, one SNP (C to T transition) and an deletion with 6 nucleotides (GCGGGG) were seen in D3G3 RAPD marker of Sh15 isolate. *EcoR* I restriction digestion revealed these differences. Also, a transition type mutation (G to A) was determined with the *Ava* II restriction digestion of gene sequences encoding hypothetical protein in Sh14 isolate. It was observed that none of these mutations resulted in stop codon in open reading frame (ORF) of studied gene regions and in marker sequences. As a result, mutations-deletions together with SNPs- were found in the genes which are participating in basic

cellular process by employing both RAPD with CAPS marker analysis, in this study. It is estimated that these mutations could change amino acid sequence of related proteins.

June 2014, 75.

Keywords: *Fusarium graminearum*, CAPS molecular marker method, single nucleotide polymorphism (SNP), marker assisted selection.

1. GİRİŞ

Farklı patojeniteye sahip olan ve çeşitli mikotoksinleri üretme potansiyeli bulunan *Fusarium* türleri yüksek düzeyde genetik çeşitlilik barındırmaktadır. *Fusarium* genusundan *F. solani* klinik hastalıklardan keratit, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* ve *F. verticillioides* nötropeni, keratomikoz ve onkomikozun etmenidir. *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* *F. moniliforme* de sırasıyla solgunluk, başak yanıklığı ve sap çürümesi, kök çürümesi, tane çürümesi olarak bilinen bitki hastalıklarının etmenidir. *Fusarium graminearum* dünyanın birçok yerinde *Fusarium* başak yanıklığı hastalığına yol açan en agresif ajandır (Goswami ve Kistler, 2004). *Fusarium graminearum* enfeksiyonu çiçekçiklerde kısırlık ve renk kaybı, tanelerde kuruma, solgunlaşma ve ağırlıkta azalma ile sonuçlanan ürün ve kalite kaybına neden olmaktadır. Bu türün izolatları üzerindeki çalışmalar kemotiplendirme ve genotiplendirme üzerinde yoğunlaşmıştır. Geleneksel yöntemler ile tanımlanması oldukça güç olan mantarların, moleküler markır teknikleri kullanılarak karakterizasyonu günümüzde olası hale gelmiştir (Miedaner ve diğ., 2003). Kemotiplendirme ve genotiplendirmede daha çok bu markır yöntemlerinin kullanımı tercih edilmektedir.

Bu tez çalışmasında, ülkemizin ve İran'ın çeşitli yörelerinden izole edilen 45 *F. graminearum* izolatının genotiplendirmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda izolatlar arasındaki çeşitlilik CAPS (ing, "cleaved amplified polymorphic sequence") yöntemi kullanılarak araştırıldı. İlk olarak *F. graminearum* izolatları polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli yöntemler ile tür düzeyinde tanımlandı. CAPS moleküler markır yönteminde aktin (*act*), histon3 (*H3*), 60S ribozomal protein, hipotetik protein geni ve D3G3 RAPD markır (JN638063.1) çoğaltılacak hedef bölgeler olarak seçildi. Çoğaltım ürünleri *Ava* II, *Tfi* I, *Rsa* I, *Cla* I, *Eco* RI, *Hae* III ve *Fok* I RE kesimine bırakılarak tek nukleotid polimorfizmlerinin varlığı araştırıldı. CAPS markırları organizmanın bir karakteri ile ilişkilendirilebildiği için elde edilen farklılıklar markır aracılı seçim yapma olanağı sağlayabilmektedir. Ayrıca, CAPS yönteminden elde edilen polimorfizmlerin çalışılan genlerin işlevlerine olan etkisi araştırılabilmekte ve elde edilen veriler barkod kitaplıklarında kayıt altına alınabilmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

Tek nukleotid polimorfizmleri (ing., ‘‘single nucleotide polymorphism; SNP’’) aynı türün farklı bireyleri arasındaki veya farklı türe ait organizmalar arasındaki identik DNA dizilerinde gözlenen tek nukleotid (A, T, G, C) değişimleridir. Bir bazın eklenmesi (insersiyon) ve eksilmesi (delesyon) gibi DNA molekülünde meydana gelen yeniden düzenlenme mekanizmaları SNP’lerin oluşmasına yol açan temel mekanizmalardır (Twyvan, 2005). Bu değişimler genomda nokta mutasyonları olarak da adlandırılmaktadır. Genomda bir purin (A, G) bazının bir purin ile veya bir pirimidin (C, T) bazının bir pirimidin ile yer değiştirmesi transisyon, bir purin bazının bir pirimidin ile veya bir pirimidin bazının bir purin ile yer değiştirmesi ise transversiyon olarak adlandırılır. Bu değişimler de nokta mutasyonlarını temsil etmektedir ve SNP’lerin oluşmasında etkilidir. Nokta mutasyonları bir gende ya da genin düzenleyici bölgesinde meydana geldiğinde bireyin fenotipinde önemli değişiklikler gözlenebilir. Bir DNA molekülünde meydana gelen tek nükleotid değişimi aynı amino asidi şifreleyen bir başka kodonun oluşumuna yol açtığına sentezlenen polipeptidde amino asit değişimi gözlenmez. Yani mutasyon sessiz mutasyon (ing., ‘‘silent’’) olarak isimlendirilir. Tek nukleotid değişimi polipeptiddeki tek bir amino asit değişimine yol açtığına meydana gelen yanlış anlamlı (ing., ‘‘missense’’) mutasyon çoğunlukla işlevsel bir değişimle sonuçlanmaz. Ancak mutasyonun meydana geldiği yere bağlı olarak resesif ilaç direnci ve mutant protein oluşumu gibi işlev farklılıklarına yol açabilir (Zila ve diğ., 2013). Bu nedenle mantarlar aleminde de bu tip mutasyonların ve neden olduğu işlev farklılıklarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, SNP’nin yol açtığı mutasyon sonucunda oluşan bitim kodonu ile polipeptid sentezi sonlanabilmektedir. Bu mutasyonlar anlamsız (ing., ‘‘nonsense’’) mutasyon olarak bilinmektedir ve daha kısa, tamamlanmamış protein ürünü oluşumu ile sonuçlanır. Bu mutasyonlar hücrede işlevsel olmayan proteinlerin birikimine neden olur. Özellikle düzenleyici bölgelerdeki SNP’lerin *Fusarium*’un neden olduğu hastalıklarda, programlı hücre ölümüne yol açarak hastalık direncinin gelişmesine neden olmaktadır (Olukolu ve diğ., 2013).

Fusarium genomunda yüksek dizi benzerliği gösteren ve ortolog olduğu düşünülen 9000 gen bulunmaktadır. Ancak bu homolojinin yanı sıra her genom kendi içinde binlerce farklı gen

taşımaktadır. Bu genler kromozomların telomer bölgelerinde bulunmaktadır. *Fusarium* genomunda özellikle bu bölgelerin yüksek SNP içerdiği ve bunların da rekombinasyondan sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu organizmanın genomunda telomer bölgelerinde 10000'den fazla SNP bulunmaktadır. Bazal metabolizma ile ilişkili yaklaşık 2001 gen yüksek oranda SNP bölgesi içermektedir (Cuomo ve diğ., 2007).

Patojeniteden ve sekonder metabolit üretiminden sorumlu genlerde yüksek oranda SNP bulunmaktadır (Cuomo ve diğ., 2007). Ayrıca genomda DON (ing., ‘‘deoxynivalenol’’) üretiminde görevli *Tri1*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri10* ve *Tri14* genlerin ve patojenin agresifliği belirleyen genlerde de SNP'lerin varlığı belirlenmiştir (Talas ve diğ., 2012). Arpa enfeksiyonunda anlatım yapan 408 gende SNP içeren bölgeler tanımlanmıştır (Cuomo ve diğ., 2007). Bu organizmanın genomda kodlama yapmayan bölgelerinde meydana gelen SNP'lerin çoğunlukla fenotipe etkisi bulunmamaktadır. Bu SNP'ler, özellikle populasyon genetiği çalışmalarında elverişli markırlar olarak değerlendirilmektedir (Chen ve Sullivan, 2003).

Genomda temsil edilen SNP'ler organizmanın bir karakteri ile ve/veya genin ürünü olan proteinle ilişkilendirildiğinde markır aracılı seçim (MAS) yapma olanağı sağladığından moleküler genetik çalışmalarında değerli markırlar olarak kullanılırlar. Özellikle anlatım yapılan dizi etiketi (ing., ‘‘expressed sequence tag; EST’’) bölgelerindeki SNP'ler MAS için büyük önem taşımaktadır. Ayrıca çeşitli organizmaların temel hücresel işlevleri ile ilişkili genlerindeki SNP'lerin belirlenmesi bu genlerin evrimsel değişiminin izlenmesine olanak sağlayabilmektedir (Syvanen, 2001).

Genomun kodlama yapmayan bölgelerindeki SNP'ler bireyin DNA parmakizi profillerinin çıkarılmasını ve böylece bireyler arasındaki çeşitliliğin belirlenmesini sağlar. Organizma genomlarındaki SNP'lerin belirlenmesinde kullanılan stratejiler DNA parmakizinin belirlenmesinde kullanılan moleküler markır stratejilerini kapsamaktadır (Gupta ve diğ., 2001).

2.1. MOLEKÜLER MARKIRLAR

Bireylerin tanımlanmasında ayırt edici morfolojik özelliklerinden sorumlu morfolojik markırlar; çoğunlukla tek bir lokus tarafından kontrol edilen, polimorfizmi ortaya koyan değişimleri temsil ettiğinden bu markırların varlığı herhangi bir biyokimyasal veya moleküler tekniğe gerek duyulmaksızın doğrudan gözlenebilmektedir. Morfolojik markır için seçilen karakterlerin kalıtımı Mendel kurallarına uygunluk gösterdiğinde bu morfolojik karakterler

özgün genler için güvenilir belirteçler olarak kullanılabilirler. Ancak organizmaların karakterlerinin kalıtımının çoğunlukla Mendel yasalarına uygunluk göstermemesi çevresel koşulların karakterlerin kalıtımını etkilemesi bu markırların kullanımını sınırlamış, yerini temeli moleküler düzeyde belirleme stratejilerine dayanan moleküler markır yöntemlerine bırakmıştır (Liu, 1998).

Bir bireyin biyokimyasal farklılıklarını belirlemeye olanak sağlayan protein molekülleri ya da genomda bir gen bölgesini ve/veya gen bölgesi ile ilişkili bir DNA parçasını temsil eden veya genomun kodlama yapmayan herhangi bir bölgesi ile ilişkili olan ayırıcı özellikteki DNA fragmentleri moleküler markırlar olarak ifade edilmektedir (Agarwal ve diğ., 2008)

Biyokimyasal markır olarak da adlandırılan, organizmalar arasındaki polimorfizmi belirlemeyi sağlayan gen anlatım ürünü olan proteinler, protein düzeyinde çeşitliliği yansıtan moleküler markırlardır. Kullanılan en yaygın biyokimyasal markırlar izozim ve allozimlerdir. Bu protein markırları bir anlamda genomdaki farklılıkları yansıtmaktadır. Ancak bu protein markır sistemleri tüm genom düzeyindeki farklılıkları belirleme olanağı sağlamadığı için yerini DNA temelli markırlara bırakmıştır (Staub ve diğ., 1982).

DNA markırları, bir popülasyonu oluşturan bireyler arasındaki DNA dizi çeşitliliğini yansıtan, bir organizma genomunun belli bir bölgesi ile ilişkili DNA segmenti olarak tanımlanabilir (Liu, 1998). DNA markırları taksonomi çalışmalarından evrime kadar çeşitli alanlarda popülasyon ve/veya tür düzeyinde kullanışlı veriler sunar. Moleküler markırlar genotiplendirme ve kemotiplendirmede, tanı ve tanımlama çalışmalarında, cinsiyet belirlemede, genetik çeşitliliğin ortaya konmasında ve gen kaynaklarının kökeninin belirlenmesinde kullanılan etkili belirteçlerdir (Nayaka ve diğ., 2011).

Eğer organizmanın taşıdığı moleküler markır çeşitlilik taşıyor ve tüm genoma dağılabiliyorsa, genetik farklılıkları temsil edebiliyor, fenotip ve/veya bir karakterle ilişkilendirilebiliyorsa, günümüzde o moleküler markır çok farklı yaklaşımlarla tanımlamak mümkündür (Agarwal ve diğ., 2008).

2.2. MOLEKÜLER MARKIR YÖNTEMLERİ

Polimorfizmin belirlenmesinde tanı ve tanımlama çalışmalarında kullanılmak üzere geçtiğimiz son 20 yıl içerisinde moleküler biyolojideki ilerlemelere paralel olarak çok çeşitli moleküler markır yöntemi geliştirilmiştir. Organizmanın genomlarında bulunan moleküler markırların belirlenmesini sağlayan bu yöntemlerin kolay uygulanabilir olması, hızlı sonuç

eldesine olanak tanınması ve her şeyden önce düşük maliyetli olması çok büyük önem taşımaktadır. Ayrıca tekrarlanan denemeler sonucunda aynı bulgulara ulaşılabilmesinin sağlanması yöntemin güvenilirliği açısından da önemlidir (Agarwal ve diğ., 2008). Günümüzde kullanılan markır yöntemleri dört ana grup altında sınıflandırılmaktadır.

2.2.1. Dizileme Temelli Markır Yöntemleri

Dizileme temelli markır yöntemleri bir bireyin hücrelerinde taşınan kalıtsal materyalinin dizilim sırasının belirlenmesi temeline dayanır. Tüm genom düzeyinde dizileme özellikle SNP'lerin doğrudan belirlenmesini sağlayan araçlar haline gelmiştir. Ancak bu yaklaşım oldukça maliyetli cihaz ve sarf gerektirdiği için rutinde kullanılmamaktadır (Troggio ve diğ., 2008). Genom dizisinin belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan yöntem, zincir sonlandırma metodu olarak da adlandırılan "shotgun" tekniği ile Sanger (dideoksi) metodudur. Shotgun dizileme uzun DNA parçalarının dizilenmesinde kullanılır. Bir kerede dizi analizi yapılamayacak kadar uzun olan DNA moleküllerinin dizilenmesi için kalıp önce küçük parçalara bölünür. Elde edilen her bir parça bir plazmide klonlanır. Klonlanan plazmidler tek tek dizilenir. Bioinformatik araçlarla bir araya getirilen nukleotid dizileri ile uzun DNA parçası elde edilir. Sanger yöntemi DNA molekülünün çoğaltımı esasına dayanır. *In vitro* çoğaltım araçlarından PZR kullanır (bkz.2.2.3). Bir DNA molekülünün çoğaltılması için kalıp dizinin yanı sıra primer molekülü, tek değerli iyonlar, DNA polimeraz enzimi ve dört çeşit dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) moleküllerine gereksinim duyulmaktadır. Sanger metodunda ise bu karışıma tek bir nukleotidin dideoksi formu olan ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) moleküllerinden biri eklenir. Her yeni nukleotid bir önceki nukleotidin 3' OH ucuna eklenir. Dideoksinukleotid trifosfat (ddNTP) ise 3' OH ucu içermez. Dolayısıyla böyle bir molekül zincir uzamasını durdurur ve zincirin son nukleotidini oluşturur. Farklı ddNTP içeren sonlandırılmış DNA dizileri kapiller jel elektroforezi kullanılarak okunur (Sanger ve Coulson, 1977).

2.2.2. Restriksiyon Endonükleazı Kesimi Temelli Markır Yöntemleri

Kesim temelli olan markır yöntemlerinin esası genomun restriksiyon endonükleazı (RE) ile kesimi sonucu oluşturulan farklı DNA parçalarının belirlenmesine dayanır. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (ing., "Restriction fragment length polymorphism; RFLP") olarak adlandırılan moleküler markır yönteminde (Botstein ve diğ., 1980) iki veya daha fazla örneğin

homolog DNA bölgeleri arasındaki restriksiyon kesim bölgelerindeki farklılıkların ortaya konması hedeflenir. DNA örnekleri öncelikle bir RE ile kesime bırakılır. DNA parçacıkları poliakrilamid ve/veya agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılır. DNA dizilim farklılıklarına göre genom bölgesinde farklı RE kesim alanları ve dolayısıyla bireyler arasında farklı DNA fragment profilleri oluşur. Ancak bu profillerin gözlenebilir fragmentler şeklinde izlenebilmesi için ‘‘Southern Melezleme’’ yönteminin uygulanması gerekmektedir.

2.2.3. Çoğaltım Temelli Markır Yöntemleri

Karry Mullis tarafından geliştirilen PZR teknolojisi moleküler markırların belirlenmesi ve organizmalar ve/veya bölgeler arasındaki çeşitliliğin ortaya konmasında kullanılan güçlü bir yaklaşım haline gelmiştir (Mullis ve Faloona, 1987). PZR ile genomun özgün bölgeleri *in vitro* çoğaltılabilmekte ve elektroforez teknikleri ile görüntülenebilmektedir. Günümüzde PZR’un kullanıldığı çok sayıda moleküler markır yöntemi geliştirilmiştir. Bu yaklaşımla kalıp DNA molekülü, uygun bir çift primer molekülün, tek değerlikli iyonları içeren bir tamponun, dNTP molekülünün ve MgCl₂ bileşenlerinin varlığında enzimatik olarak çoğaltılabilmektedir. DNA amplifikasyonu birbirini izleyen bir seri özgün sıcaklık derecelerinin belli sürelerle uygulandığı döngülerle sağlanır. Oldukça düşük miktarlarda kalıp DNA molekülü ile başlayan yöntemle milyonlarca DNA fragmenti kopyası üretilir. PZR’nun keşfinin ardından çok sayıda yeni PZR temelli moleküler markır yöntemleri geliştirilmiştir. DNA teknolojisi ve moleküler biyolojideki hızlı gelişmeye paralel olarak daha ekonomik, hassas, kolay ve polimorfik olmalarından dolayı özellikle PZR temelli DNA markır sistemleri genetik çalışmalarda daha yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Weber ve May, 1989; Liu, 1998; Tingey ve diğ., 1992). PZR metodunun bulunması ve patojen tanımlanmasında yaygın olarak kullanılması, *Fusarium* türlerinin tanısı ve karakterizasyonunda PZR’a dayalı birçok metodun geliştirilmesine olanak sağlamıştır (Doohan ve diğ., 1998). PZR temelli yöntemler aynı zamanda *Fusarium* türlerinin genetik çeşitliliğinin ve filogenisinin anlaşılmasında büyük ölçüde kullanılmaktadır.

2.2.4. Çoğaltım ve RE Kesimi Temelli Yöntemler

Moleküler markırların iki farklı stratejinin uygulanması ile belirlendiği yaklaşımlarda ya DNA molekülü önce RE kesimine bırakılıp ardından PZR ile çoğaltılır, ya da PZR ile çoğaltılan genomik DNA fragmentleri RE kesimi ile analiz edilir.

Örneğin, çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (ing., ‘‘amplified fragment length polymorphism’’; AFLP) yönteminde DNA molekülü RE ile kesilerek parçalara ayrılmakta, oluşan parçaların uç bölgelerine primer tanıma dizileri (adaptör) eklenmekte ve ardından bu parçalar seçici PZR aracılığıyla çoğaltılmaktadır (Vos ve diğ., 1995). Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PCR-RFP) yaklaşımında ise genomun özgün ve/veya rastgele bölgeleri önce PZR aracılığı ile çoğaltılmakta, elde edilen ampliconlarda farklılıklar RE kesimi ile ortaya konmaktadır. CAPS moleküler markır yöntemi olarak adlandırılan yaklaşımda da bu strateji kullanılmaktadır (Konieczny ve Ausubel 1993).

2.3. *Fusarium graminearum*

Fusarium 1821 yılında Link ex Gray tarafından tanımlanmıştır. (Larone, 1995). Başak yanıklığının en önemli patojeni olarak belirlenmiştir (Leisova ve diğ., 2006). *Gibberella* olarak da bilinen *Fusarium* genusu Ascomycota filumunun, Ascomycetes sınıfı, Hypocreales ailesine ait bir mantar grubudur (Leslie ve Raju, 1985). *Fusarium* genusuna ait türler hemen hemen tüm tahıllar olmak üzere bitkilerde, insanlarda ve evcil hayvanlarda hastalıklara neden olmaktadır (Leslie ve Summerell, 2006). Ekonomik öneme sahip tahıl bitkilerinde neden olduğu ürün kayıpları sebebiyle de ülke ekonomisini zarara uğratmaktadır (Rudd ve diğ., 2001). *Fusarium* türleri toprakta, toprak altında, havayla temas eden bitki parçaları ve bitki kalıntıları üzerinde, ayrıca organik materyaller üzerinde de bulunabilir. Altmış beş farklı türünün varlığı rapor edilen *Fusarium* cinsi, bitki patolojisinde önemli bir yer tutmaktadır (Gutleb ve diğ., 2002; De Hoog ve diğ. 2000; Toussoun ve Nelson, 1975). *Fusarium* türleri bitkilerde özellikle de tahıllarda sebep oldukları hastalıklar nedeniyle tarımsal endüstride ciddi problem haline gelmiştir. (McMullen ve diğ., 1997; Clear ve diğ., 2000; Rudd ve diğ., 2001).

Fusarium graminearum (Schwabe) dünya genelinde ve ülkemizde bulunan en yaygın bitki patojenlerinden biridir. Bu fungal patojen arpa ve buğday gibi kültüre alınmış tahıl bitkilerini enfekte ederek ürün kayıplarına neden olmakla birlikte üretmiş olduğu mikotoksinler aracılığıyla da hayvan ve insan sağlığını tehdit etmektedir (Parry ve diğ., 1995; Miedaner ve diğ., 2001; Tunalı ve diğ., 2006b). *Fusarium graminearum* tahıllarda başak yanıklığı, sap çürümesi ve solgunluk etmeni olan enfektif ajanların başında gelmektedir (Sonal ve Oruç, 2000; Gutleb ve diğ., 2002).

Fusarium genusu ile çalışmak oldukça güçtür (Leslie, 1991). Çünkü morfolojik olarak birbirine çok benzeyen farklı coğrafik bölgelerden izole edilen birçok türe sahiptir. Bu enfektif ajan mikrokonidyum oluşturamadığı için makrokonidyum morfolojisine göre tanımlanır. Ancak birbiriyle çok yakın ilişkili olan *Fusarium* türlerini ayırt etmede bu morfolojik karakterler yetersiz kalmaktadır. *Fusarium* türlerinin tanımlanmasında kullanılan geleneksel yöntemler; makrokonidiaların şekli ve büyüklüğü, klamiosporların bulunması veya yokluğu, mikrokonidiaların şekli, sklerotyum veya sporodokyum varlığı gibi sekonder özelliklerin tanımlanmasına dayanmaktadır (Leslie ve Summerell, 2006). Bu nedenle *Fusarium* gibi morfolojik olarak ayırt edilmesi güç olan, tür içi ve türler arası çeşitliliği yüksek organizmalarda moleküler markırlarla tanımlama oldukça büyük önem taşımaktadır. *Fusarium* türlerinin neden olduğu hastalıklarla mücadelede özellikle hastalık etmeni olan türlerin tanımlanması ve karakterizasyonu bir gerekliliktir. Bu nedenle tür içi çeşitliliği oldukça yüksek olan *Fusarium* türlerinin taksonomisi ve tanımlanması geleneksel yöntemlerle oldukça güçtür. Günümüzde moleküler markır teknikleri kullanılarak polimorfizm belirlenmesi ve bireylerin tanımlanması olası hale gelmiştir (Miedaner ve diğ., 2003).

Patojenik populasyonlar arasındaki çeşitliliği belirleme ve dirençli genotiplerin seçimi dirençli varyetelerin geliştirilmesi amacıyla yapılan ıslah programlarında büyük önem taşımaktadır. Farklı patojeniteye sahip ve çeşitli mikotoksinleri üretme potansiyeli olan yüksek düzeyde türler arası ve tür içi genetik çeşitliliği barındıran *Fusarium* genusu üyelerinin moleküler markır yöntemleri ile tanı ve tanımlama çalışmaları yoğun biçimde gerçekleştirilmektedir (Baayen ve diğ., 2000; O'Donnell ve diğ., 1998).

Ülkemizde de tahıllarda hastalık yapabilen yirmi sekiz farklı *Fusarium* türünün varlığı tespit edilmiştir (Özer ve Soran, 1991). Bunlar arasından *F. graminearum* Ülkemizde özellikle Marmara Bölgesinde en yaygın ve en agresif tür olup büyük ürün kayıplarına yol açmaktadır (Miedaner ve diğ., 2001; Tunalı ve diğ., 2006b; Bernardo ve diğ., 2007). Ülkemizde olduğu gibi birçok ülkede de buğday (*Triticum aestivum* L.) ve arpa (*Hordeum vulgare* L.) başta olmak üzere tahıllarda *Fusarium* Başak Yanıklığı (ing., ‘‘fusarium head blight’’; FHB) hastalığının en önemli etmenidir. Ayrıca, başak solgunluğu ve sap çürümesi hastalıklarına da yol açmaktadır. FHB ilk olarak 1884 yılında İngiltere’de tanımlanmış ve 20. yüzyılın ilk yıllarında da tahılları tehdit eden en önemli etken olarak gösterilmiştir (Muriuki, 2001).

Hemi-biotrofik yaşam döngüsüne sahip *F. graminearum*, Nectriaceae ailesinin üyesidir (Goswami ve Kistler, 2004). *Fusarium graminearum* kladı biyocoğrafik olarak tanımlanmış

filogenetik açıdan farklı türleri içermektedir (O'Donnell ve diğ., 1999, 2004, 2008; Carter ve diğ., 2000, 2002; Starkey ve diğ., 2007). Patojen daha çok ılıman ve yarı tropik bölgelerde buğday, arpa ve diğer küçük taneli tahılları etkilemekte ve çok kısa sürede ürünlerde tahribata yol açmaktadır (McMullen ve diğ., 1997).

Genom projesi tamamlanan *F. graminearum*'un tür içi çeşitliliğinin yüksek düzeyde olması geliştirilen patojenle mücadele stratejilerini etkisiz kılmaktadır. Bu nedenle farklı coğrafik bölgelerden elde edilen izolatların genotiplendirilmesi büyük önem taşımaktadır (Miedaner ve diğ., 2001; Saharan ve diğ., 2007; Walker ve diğ., 2001; Parry ve diğ., 1995). Tahıllar yaşam döngüsünün her aşamasında patojenle enfeksiyon riski taşımaktadır. *Fusarium graminearum* bitki kısımlarını farklı şekilde enfekte etmektedir. Özellikle çiçeklenme ve tohum oluşumunun görüldüğü generatif evrede nemli ortam koşulları hastalık riskini daha da artırmaktadır (Carter ve diğ., 2002; Bai ve Shaner, 2004; Tunalı ve diğ., 2006a). Patojen, dölleme sırasında veya döllemeden kısa bir süre sonra, başak gelişiminin her evresinde de enfeksiyona neden olabilmektedir. Buğday başağında enfeksiyon, optimum sıcaklık ve nem koşullarında *Fusarium* türlerinin sporları aracılığı ile meydana getirilir. Optimum sıcaklık ve nem koşulları her tür için farklıdır. *Fusarium graminearum* için %100 civarında nem ve 25°C sıcaklık en uygun koşullardır. Hayvanlar, konidyumları taşıyan yağmur, bitki ve tahıl artıkları üzerinde gelişen askosporları taşıyan hava hastalığın yayılmasında etkili olan faktörlerdir (Champeil ve diğ., 2004). Sporlar konak bitki dokusu üzerinde çimlenmekte, nemli bitki yüzeyine yapışarak kütikül tabakası üzerinde koloni oluşturmakta ve farklı dokulardan hücreye giriş yapmaktadır (Nicholson ve diğ., 2007). Hastalık belirtileri tahıl bitkilerinde benzerlik gösterir. İnfeksiyon ilk olarak eksende veya başakçıkların kabuklarında oluşan kahverengi küçük noktalar şeklinde kendini gösterir. Suyun çekilmesi sonucunda tohumda meydana gelen büzüşme ve solma tüm başağa yayılır. FHB ürün azalması, tohum çimlenmesinde gerileme, tanelerde renk bozukluğu ve tohumların çürümesi ile sonuçlanır (Sutton, 1982).

Fusarium graminearum genom projesi tamamlanmış bir bitki patojenidir. *F. graminearum*'un PH-1 ve H11 ırklarının genomundan elde edilen veriler (1) tek nukleotid polimorfizm (SNP) yoğunluklarının çeşitlilik gösterdiğini, (2) tekrarlı ve duplikasyonlu bölgelerde meydana gelen nokta mutasyonlarının tekrar ve duplikasyon sayısını sınırladığını, (3) türe özgü genlerin çoğunluğunun telomer bölgelerinde konumlandığını, (4) telomerde bulunan bu genlerin

bazılarının sadece bitki infeksiyonu sürecinde anlatım yaptığını *F. graminearum*'u hifli mantarlar arasında ilgi odağı haline getirmiştir (Cuomo ve diğ., 2007).

2.4. *Fusarium* GENUSU VE MOLEKÜLER MARKIRLAR

Moleküler markırlar enfekte ürünlerden izole edilen yeni izolatların belirlenmesinde, her bir bireyin gruplandırılması ve standart sınıflar (kladların oluşturulması) içine dahil edilmesinde ve DNA parmakizi profillerinin çıkarılmasında etkin biçimde kullanılmaktadır. DNA dizi farklılıklarının moleküler markırlarla karşılaştırılması farklı türler arasındaki evrimsel ilişkilerin doğru bir şekilde açıklanmasını da sağlamaktadır (Mule ve diğ., 2005). Aynı zamanda elde edilen veriler fungal genetiğini, fungal genomunu yapı ve davranışını anlamamıza katkıda bulunmaktadır. *Fusarium* izolatlarının teşhisinde, tanımlama ve karakterizasyon çalışmalarında farklı markırların varlığı taranabilmektedir.

2.4.1. İmmunolojik Markırlar

İmmunolojik markırlar fungal bitki patojenlerinin teşhisinde ve nicel analizinde etkin olarak kullanılmaktadır. Hassas olan antikor temelli yöntemlerde patojen ile ilişkili özgün antiijenleri tanıyan antikorların geliştirilmesi yöntemin temelini oluşturur. Geliştirilen ticari kitler sayesinde tarlada hastalık tanısı ve patojen tespiti mümkün hale gelmiştir (Cooke ve diğ., 2006; Narayanasamy, 2008). Bunlar arasından ELISA (ing., ‘‘enzyme-linked immunosorbent assay’’) testi fungal patojenlerin miktar tayininde ve konağın farklı fizyolojik aşamalarının belirlenmesinde etkin olarak kullanılmaktadır (Beyer ve diğ., 1993). Ancak bu yaklaşım türler arasında var olan farklılığın belirlenmesinde yetersiz kalmaktadır.

2.4.2. Türe Özgün Markırlar

Bir bireyin genomundaki özgün bölgeyi temsil eden bir türün ayırt edilmesinde kullanılan özgün markırlar, fungal patojenlerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. SCAR (ing., ‘‘sequence characterized amplified region’’) yöntemi genomik DNA fragmentlerinin, özgün oligonükleotid primerler kullanılarak PZR ile çoğaltımına dayanır (Paran ve Michelmore, 1993). SCAR markırlarının geliştirilmesi AFLP, RFLP ve RAPD gibi moleküler markır yöntemleri ile çoğaltılan ürünlerin klonlanması, çift yönlü olarak dizilenmesi ve elde edilen bu dizilere özgün 15-30 bp uzunluğunda bir çift primer molekülün tasarlanması ile

gerçekleştirilmektedir. Böylece parça uzunluk polimorfizmlerine ait tek bir bölgenin çoğaltılması ile dominant markırlar kodominant markırlara dönüştürülmektedir (Paran ve Michelmore, 1993; McDermott ve diğ., 1994; Nicholson ve diğ., 1998; Gherbawy ve Voigt, 2010). Ayrıca genomda türe özgün olarak taşınan bölgelerin PZR ile çoğaltımı aracılığıyla da türe özgün markırlar elde edilebilmektedir.

2.4.3. Polimorfizm Belirleme Markırları

Populasyon içerisinde bir lokusdaki DNA dizi çeşitliliğini yansıtan, bireyler arasındaki farklılığı temsil eden markırlar genellikle genomda kodlama yapmayan bölgelerin taranması ile elde edilmektedir. Genomda rastgele bölgelerin PZR ile çoğaltıldığı çoğaltılmış polimorfik DNA (ing., ‘random amplified polymorphic DNA’; RAPD) yöntemi bireyler arasındaki polimorfizmin ortaya konmasında kullanılan en etkili yöntemlerden biri haline gelmiştir. Dizi özgünlüğü bulunmayan, genomda rastgele bölgelerin çoğaltımını hedefleyen bu yöntemin esası 10 baz uzunluğundaki tek bir oligonükleotid primerle PZR’una dayanır. Primer molekülün genomda çok sayıda bölgeye bağlanması guanin ve sitozin bazlarının oranı yüksek tutularak (%50’den fazla) ve primer bağlanma sıcaklığı düşürülerek (37°C) sağlanır. (Williams ve diğ., 1990). Çok sayıdaki bölgenin etkin biçimde çoğaltımı için döngü sayısı da arttırılır. Çoğaltım ürünleri agaroz jel elektroforeziyle analiz edilir. Aynı türün farklı bireylerinde, RAPD çoğaltım ürünleri arasında gözlenen çeşitliliğin moleküler temeli, özellikle primer bağlanma bölgelerinde gerçekleşen delesyon, insersiyon gibi yeniden düzenlenmelere dayanır (Tingey ve Tufo, 1993). RAPD markırları dominant olduğundan alleli heterozigot olarak taşıyan bireyler ayırt edilemez. Genom boyunca rastgele bölgelerdeki farklılıkları belirlemeyi sağlayan RAPD polimorfizm belirlenmesinde oldukça etkili ve hızlı bir yaklaşımdır (Rafalski ve diğ., 1993). Bu yaklaşımda primer molekülde tek bir nükleotidin farklı tasarlanması ile tamamen farklı bir polimorfik markır elde edilebilmektedir. Bu da sistemin polimorfizm saptama duyarlılığını göstermektedir. RAPD yöntemi birçok değişkene bağlı olduğundan tekrarlanabilir verilerin eldesi güç olmakla birlikte günümüzde mümkün hale gelmiştir. RAPD markırları; genom haritalama, genetik parmakizi belirleme ve çeşit tanımlama, populasyon farklılığı, taksonomik ve filogenetik çalışmalar, ve ebeveyn analizi, taksonomik kimliğin belirlenmesi, akrabalık derecelerinin belirlenmesi ve karışık genom örneklerinin analizi gibi çok değişik amaçlı çalışmalarda kullanılmaktadır (Lodhi, 1994).

Yüksek organizmalarda henüz görevleri tam olarak tanımlanmamış ancak düzenleyici rollere sahip oldukları düşünülen, rastgele ardışık tekrarlanan 1-6 baz çiftlik kısa tekrarlı diziler, basit

dizi tekrarları (ing., ‘‘simple sequence repeats’’; SSR) ve kısa ardışık tekrarlar (ing., ‘‘short tandem repeats; STR’’) olarak da bilinen mikrosatellitlerdir (Tautz ve diğ., 1986; McDonald ve Potts, 1997; Litt ve Luty, 1989; Goldstein ve Pollock, 1997; Chambers ve MacAvoy, 2000). Mikrosatellitler, polimorfizm belirleme markırları olarak kullanılan elverişli genomik bölgelerdir. Tekrarlanan bölgelerin çoğaltımını sağlayacak primerler geliştirilerek PZR gerçekleştirilmektedir. Genomdaki mikrosatellit içeriği organizmaların genom büyüklüğü ile ilişkilidir (Hancock, 1996b). Tekrarlı dizilerin genomdaki lokasyonu ve tekrar sayısı bireyden bireye değişiklik göstermektedir. Mikrosatellit polimorfizmi heterozigot bireylerin seçimine olanak sağlamaktadır. Mikrosatellitler ökaryotik organizmaların tümünde, özellikle yüksek yapıllı organizmalarda farklı bölgelerde hatta organel genomlarında çok sayıda (Field ve Wills, 1996; Hancock, 1996a), prokaryotlarda da az sayıda bulunmaktadır (Sia ve diğ., 2000). Bu elementler farklı türlerde farklı sayıda tekrarlar içermekle birlikte en sık rastlananları (GT)_n, (CA)_n, (CAA)_n, (GACA)_n tekrarlarıdır (Wöstemeyer ve Kreibich, 2002). Mikrosatellitlerin PZR yoluyla çoğaltımında kullanılan genellikle 20-25 bç uzunluğundaki özgün primerler, tekrarlara komşu bölgelerdeki nukleotid dizilerine, özellikle varsa korunmuş ve/veya kararlı bölgelere göre tasarlanmaktadır. Bu amaçla öncelikle genomda bulunan tekrarlı bölgeler çoğaltılarak dizilenmektedir. Son aşamada ise elde edilen bu dizi bilgisi temel alınarak primerler tasarlanmaktadır. Bu yaklaşım dizi etiketli mikrosatellit bölge (ing., ‘‘sequence-tagged microsatellite site’’; STMS) olarak da ifade edilir. Primerlerin tasarlanmasında izlenen diğer yol mikrosatellit bölgeleri ve komşu dizilerini içeren genomik kütüphanelerin kurulmasıdır. Kütüphanenin işaretli sentetik oligonükleotid tekrarlar ile taranması ve pozitif klonların dizilenmesinin ardından primer dizileri oluşturulur (Zane ve diğ., 2002; Squirrell ve diğ., 2003). Veri tabanından bir türe ait yeterli bilgiye ulaşılamadığında yakın türler için geliştirilmiş primerler mikrosatellit markırların eldesinde kullanılmakta ve bu nedenle yöntem maliyetli ve zahmetli olmaktadır.

RAPD ile maliyeti hemen aynı olan ISSR (ing., ‘‘inter-simple sequence repeats’’) (Zietjiewicz, ve diğ., 1994) tekniği RAPD’e göre oldukça güvenilir, tekrarlanabilirlik oranı yüksek ve PZR koşullarından çok etkilenmeyen bir tekniktir. ISSR yönteminde kısa tekrarlı ardışık dizileri taşıyan mikrosatellit bölgeler arasındaki DNA fragmentleri ikili, üçlü ya da dörtlü tekrarlar içeren, 3' ya da 5' ucunda seçici nukleotid bulunan oligonükleotid primerler kullanılarak PZR aracılığı ile çoğaltılmaktadır. Primer moleküllerinin GC içeriği %45 ile %65 aralığında olabilmektedir (Singh ve diğ., 2011). ISSR yöntemi bir popülasyondaki bireylerin ayırımında etkin biçimde kullanılmaktadır.

Bu teknik genetik çeşitlilik, sınıflandırma, moleküler markır bulma çalışmaları, evrim ve genom haritası oluşturma tür içi ve türler arası polimorfizm çalışmalarında son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Fang ve diğ., 1997). Dezavantajları ise primerlerin ayrı ayrı bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi ve benzer büyüklükteki bantların aynı olmama durumudur.

2.4.4. Filogenetik Markırlar

Filogenetik markırlarla evrimsel düzeyde korunmuş ancak bireyler arasındaki farklılıkların belirlenmesini sağlayan değişken bölgeleri taşıyan, rDNA'ya ait genler, nüklear genler ve mitokondri genomuna ait genler hedeflenir (Moricca ve diğ., 1998). Ökaryotlarda protein sentezinde görevli olan rRNA'ların genomda şifrelendiği bölge (rDNA) tekrarlı gen kümeleri şeklinde düzenlenmiştir. Küme içinde yer alan 18S, 5.8S ve 28S rDNA alanları ve bunlar arasında bulunan ITS (ing., "internal transcribed spacer") ve tekrar ünitelerini ayıran IGS (ing., "intergenic spacer") kısımları genomda bir arada yer almaktadır. rDNA'nın kodlama yapan bölgeleri türler arasında büyük ölçüde korunmuştur (Sumida ve diğ., 2004). Bu nedenle moleküler tanı çalışmalarında en çok tercih edilen hedef bölge genomdaki rDNA dizileridir (Wu ve diğ., 2002). Ökaryotik organizmaların ribozomal RNA'ları 5.8S, 18S ve 28S çökme sabitine sahiptir. Bu rRNA'ları şifreleyen genlerden 18S ve 5.8S genlerinin arasında ITS1, 5.8S ve 28S genleri arasında ise ITS2 bölgesi bulunmaktadır (Hillis ve Dixon, 1991). 18S ve 28S rRNA genleri arasında bulunan IGS bölgeleri de PZR ile çoğaltılarak fungal izolatlar tanımlanmaktadır. Korunmuş olan ve insersiyon, delesyon ve nokta mutasyonları sebebiyle türler arasında çeşitlilik gösteren rDNA genleri, bu özelliklerinden dolayı tanı analizleri kapsamında yaygın olarak kullanılmaktadır (Bosshard ve diğ., 2000; Cruz-Perez ve diğ., 2001). Bu ribozomal genlerin özgün primerler yardımıyla PZR ile çoğaltılması ile birçok türde varlığı tespit edilmiştir. Çoğaltılan bu bölgeler dizilenecek, yakın ilişkili olan türler filogenetik olarak karşılaştırılmakta, akrabalık dereceleri belirlenebilmektedir (Conrad ve diğ., 2011).

rDNA genleri mantarların moleküler düzeyde tanımlanmasında önemli bölgelerdir. Bu bölgelerden başka fungal izolatların tanımlanmasında alternatif DNA bölgeleri de kullanılmaktadır. Bunların başında "housekeeping" genler yer almaktadır. Yüksek varyasyon taşıyan ve büyük ölçüde korunmuş olan bu genler temel hücresel olaylarda görev alan ve sürekli anlatım yapan genlerdir. Nüklear genlerden *β -tubulin* (Aroca ve diğ., 2008; Fraaije ve diğ., 2001; Mostert ve diğ., 2006), *TEF 1 α* (ing., "translation elongation factor 1 alpha")

(Knutsen ve diğ., 2004, Kristensen ve diğ., 2005), *calmodulin* (Mule ve diğ., 2004) ve mitokondriyal genlerden *cox I* ve *cox II* ve bunların intergenik bölgeleri (Nguyen ve Seifert, 2008; Keith ve diğ., 2007) fungal izolatların tanımlanmasında kullanılan diğer bölgelerdir.

2.4.5. SNP

SNP'ler aynı türün farklı bireyleri arasındaki veya farklı türe ait organizmalar arasındaki identik DNA dizilerinde gözlenen tek nukleotid (A, T, G, C) değişimleridir. SNP'ler organizma genomlarında bulunan en yaygın mutasyon türüdür. Genomda ya bir bazın değişimi ya da birden fazla bazın insersiyonu ve/veya delesyonu gibi yeniden düzenlenme mekanizmalarının ortaya koyduğu polimorfizmleri temsil etmektedir (Chelkowski ve Stephen 2001; Konieczny ve Ausubel 1993). Organizma genomlarında SNP yoğunluğu oldukça yüksektir. Bu nedenle SNP'ler en yaygın polimorfik markırlar haline gelmiştir. SNP'ler haritalama, markır aracılı seleksiyon, polimorfizm belirleme ve klonlama gibi çalışmalarda kullanışlı veriler sağlamaktadır (Gupta ve diğ., 2001; Rafalski, 2002; Batley ve diğ., 2003).

Fusarium genomunda tüm organizmalarda olduğu gibi yüksek oranda SNP bulunmaktadır. Bu SNP'lerin belirli genlerle ilişkili olduğu bilinmektedir. *Fusarium* genomunda yüksek dizi benzerliği gösteren ve ortolog olduğu düşünülen 9000 gen bulunmaktadır. Ancak bu homolojinin yanı sıra her genom kendi içinde binlerce farklı gen taşımaktadır. SNP taşıyan kromozomların daha çok telomer bölgelerinde bulunmaktadır. *Fusarium* genomunda özellikle yüksek SNP içeren bu bölgelerin rekombinasyondan sorumlu olduğu da bilinmektedir. Bu organizmanın genomunda telomer bölgelerinde 10000'den fazla SNP belirlenmiştir. Bazal metabolizma ile ilişkili olan yaklaşık 2001 gen yüksek oranda SNP içermektedir (Cuomo ve diğ., 2007). Şekil 2.1 NCBI veritabanında *F. graminearum* genomunda gerçekleştirilen tarama sonucunda belirlenen toplam SNP sayısını (10709) göstermektedir.

The screenshot shows the dbSNP search interface. The search bar contains 'SNP' and 'fusarium graminearum'. The results are displayed in a table with columns for SNP ID, sequence, and validation status. The first two results are:

SNP ID	Sequence	Validated
rs119058160	TGGGTTGAAAATGGACTTTTCATCA [A/T] TGTRAAATCTCGAAAATTGATTGTCC	no info
rs119058161	GAAAGAGACACAGGCTACGGATTG [A/C] TCAAGAGGTTGTCCGAGAACAAAAT	no info

The sidebar on the right shows a 'Filter your results' section with a blue arrow pointing to the 'All (10709)' option. Other filters include 'Human (active) (0)', 'Clinical SNP Submissions (0)', and 'Cited in PubMed (0)'. There is also a 'Find related data' section with a 'Database' dropdown and a 'Find items' button.

Şekil 2.1: *Fusarium graminearum* genomunda bulunan yaklaşık SNP sayısı.

Sekonder metabolit üretiminden ve patojeniteden sorumlu genlerde de yüksek oranda SNP bulunmaktadır (Cuomo ve diğ., 2007). Trikotesen grubu mikotoksinlerden DON'un üretiminde görevli *Tri5* gen kümesindeki genlerde (*Tri1*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri10* ve *Tri14*) ve patojenin agresifliği belirleyen genlerinde de SNP'lerin varlığı belirlenmiştir (Talas ve ark., 2012). Arpa enfeksiyonu sırasında anlatım yapan 408 genin SNP'leri tanımlanmıştır (Cuomo ve diğ., 2007). Kodlama yapmayan bölgelerde taşınan SNP'ler çoğunlukla fenotipi etkilememektedir. Ancak bu SNP'ler, özellikle populasyon genetiği çalışmalarında elverişli markırlar olarak kullanılmaktadır (Chen ve Sullivan, 2003).

SNP'ler kodlama yapan ve kodlama yapmayan bölgelerde tüm genom boyunca dağılmış durumdadır. DNA parmakizi çalışmalarında çoğunlukla kodlama yapmayan bölgelerdeki SNP'ler taranmaktadır. Ancak, kodlama yapan bölgelerde (cDNA kitaplıkları, EST, STS) bulunan SNP'ler organizmanın bir karakteri ile ve/veya genin ürünü olan proteinle ilişkilendirildiğinde markır aracılı seçim (MAS) yapma olanağı sağladığından moleküler genetik çalışmalarında değerli markırlar olarak işlev görürler. Ayrıca çeşitli organizmaların temel hücresel işlevleri ile ilişkili genlerindeki SNP'lerin belirlenmesi bu genlerin evriminin izlenmesine olanak sağlayabilmektedir (Syvanen, 2001).

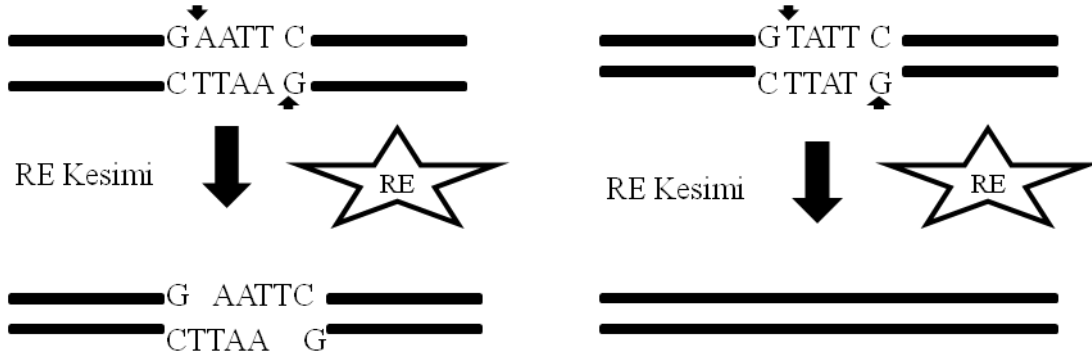
Genomun kodlama yapmayan bölgelerindeki SNP'ler bireyin DNA parmakizi profillerinin çıkarılmasını ve böylece bireyler arasındaki çeşitliliğin belirlenmesine katkıda bulunurlar. Bu amaçla geliştirilmiş yöntemler jel elektroforezi temelli veya dizileme temelli olmak üzere iki temel grupta sınıflandırılırlar. "Pyrosequencing, resequencing, minisequencing" gibi dizileme temelli yöntemler ile doğrudan SNP'ler belirlenmektedir (Kirk ve diğ., 2002).

Bunlar arasından ‘‘resequencing’’ (Sanger ve Coulson 1977) en yaygın kullanılan yöntemdir (bkz. 2.2.1). Ancak tüm genom düzeyinde dizileme, çok maliyetli olduğundan rutin çalışmalar için uygun değildir. Jel elektroforezine dayalı yöntemler ise daha az maliyetli yaklaşımları kapsamaktadır. Bunlar arasından DGGE (ing; ‘‘denaturing gradient gel electrophoresis’’) çift iplikli DNA molekülünün denatürasyonuna ve ardından farklı elektroforez yöntemleri ile jelde yürütülmesi temeline dayanmaktadır (Myers ve diğ., 1986). SSCP (ing; ‘‘single strand conformational polymorphism analysis’’) yönteminde ise PZR ile elde edilen DNA ürünlerinin farklı katlanma profilleri poliakrilamid jel elektroforezi aracılığıyla belirlenir (Orita ve diğ., 1989). Hem DGGE hem de SSCP yöntemleri ile genomdaki SNP’ler belirlenebilmektedir. CAPS metodu SNP belirlenmesinde kullanılan bir diğer yöntemdir. Yöntemin temeli özgün bölgelerin PZR ile çoğaltımı ve ardından restriksiyon endonükleazları ile kesimine dayalıdır (Konieczny ve Ausubel 1993). CAPS kapsamında uygulanan dizileme yaklaşımı, SNP belirleme yöntemlerinin çoğunda belli bir bölgenin analizinde araç olarak etkin biçimde kullanılmaktadır. Son yıllarda büyük genomların dizilenmesinde DNA çipleri (Gunderson ve diğ., 2005) ve kütle spektrometrisi (Ross ve diğ., 1998; Berlin ve Gut, 1999; Buetow ve diğ., 2001) de kullanılmaktadır. Geniş ölçekli, hızlı tarama olanağı sağlayan, yüksek doğruluk ve verimde olan bu yeni nesil yaklaşımlar oldukça maliyetli sarf ve cihaz gerektirmektedir. Bu nedenle pratikte rutin olarak kullanımları yaygın değildir (Troggio ve diğ., 2008).

2.6. CAPS MARKIRLARI

Organizmalar arasındaki çeşitliliği belirlemeye yönelik olan moleküler markırlar genellikle genomda kodlama yapmayan bölgelerin taranması sonucu elde edilmektedir. Polimorfizm analizlerinde daha çok kodlama yapmayan bu bölgelerin PZR ile çoğaltımı hedeflenir. CAPS yönteminde ise genomda çoğaltımı hedeflenen bölge iki yaklaşıma göre seçilmektedir. Hedeflenen bölgelerden biri gen sınırlarının çoğaltımının hedeflendiği ve EST kitaplıklarından, cDNA klonlarından seçilen dizilerden oluşabilir. EST dizileri, bilinen anlatımı yapılan bir genin küçük bir kısmını temsil etmektedir. İlgili genlerin cDNA kütüphanelerinden elde edilirler ve dolayısıyla protein kodlama bölgelerine ait DNA kısımlarını taşırlar. Diğer yaklaşımda ise daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen, kararlı olarak çoğaltılmış, bir karakter, fenotip veya bir protein ile ilişkilendirilmiş RAPD, RFLP ve AFLP gibi moleküler markır dizilerinden seçilebilir. CAPS yönteminde 20 nukleotidden oluşan özgün bir çift primer molekülü ile genomda belli bir bölge PZR aracılığıyla çoğaltıldıktan sonra elde edilen fragmentler RE ile kesime bırakılır

(Konieczny and Ausubel, 1993; Michaels ve Amasino, 1998). Analiz edilecek hedef bölge genle ilişkiliyse CAPS primerleri ekzon dizileri temel alınarak tasarlanır. Hedef bölge bir markır olduğunda ise markıra ait nükleotid dizilimine göre primer molekülü özgün olarak tasarlanır. CAPS yöntemi üç temel aşamanın ardışık uygulamasını kapsamaktadır. Yöntemin ilk aşaması, çoğaltılacak hedef bölgenin ve/veya genlerin nükleotid dizilimlerinin NCBI veritabanından taranarak belirlenmesi ve çoğaltım ürünlerinin kesiminde kullanılacak RE'nın seçilmesidir. CAPS yönteminde çoğaltılacak bölgeler çoğunlukla, evrim sürecinde seleksiyon baskısından kaçmış ve temel hücrel işlevlerde görevli olan genlerden seçilmektedir. Restriksiyon endonükleazlarının belirlenmesindeki temel kriter ise seçilen enzimin hedef gende kesim noktasının bulunması ve enzim kesimi sonucu oluşan parçaların jel elektroforezi ile gözlenebilecek boyutlarda ayrılabilmesidir. Hedef genler ve uygun RE'nın seçilmesinin ardından ikinci aşama, PZR aracılığı ile hedef genlerin belirli parçalarının özgün bir çift primer kullanılarak çoğaltılmasıdır. PZR için çok düşük miktarlardaki kalıp DNA molekülü (her bir reaksiyon için 2-50 ng) çoğaltım için yeterli ve polimorfizmin belirlenmesinde etkili olmaktadır. Hedeflenen bölge gen içinde olduğunda CAPS yönteminde kullanılan primerler genin orta kısmının çoğaltımını sağlayacak şekilde tasarlanmalıdır. Çoğaltım ürünlerinin en az 300 bp boyutunda olması, primer molekülünün RE kesim noktasını taşımaması, primer molekülü boyutunun 20-25 bp olması ve GC içeriğinin yüksek olmaması da yöntemin etkinliğini belirleyen diğer önemli ölçütlerdir. CAPS markırlarının çoğaltımında standart PZR yöntemi kullanılmaktadır. Bu nedenle çoğaltılan gen bölgelerinden primer bağlanma bölgesindeki değişimin bir sonucu olarak da polimorfik DNA parçaları elde edilebilmektedir. Ancak seçilen genik bölgeler ve işlevleri göz önüne alındığında bu olasılık oldukça düşüktür. Çoğaltım ürünlerinde polimorfizm RE kesimi ile taranır. Bireyler arasındaki polimorfizm jel elektroforezinde RE kesim bölgelerinin kaybolmasına ve/veya yeniden oluşmasına bağlı olarak gözlemlenir (Şekil 2.2). Polimorfizm elde edildiği markırlara ait dizilim bilgisinin belirlenmesi de seçilen bölgenin tümünde mevcut olan SNP'lerin ve/veya polimorfizmlerin tespitini sağlar (Semagn ve diğ., 2006). Bu nedenle CAPS yönteminde PZR ve polimorfik bölgelerin belirlenmesini sağlayacak olan uygun RE'nın seçilmesi yöntemin en kritik aşamasını oluşturmaktadır (Tanaka ve diğ., 2010).



Şekil 2.2: SNP'lerin neden olduğu restriksiyon endonükleazı tanıma bölgelerinin kaybolması veya yeniden oluşmasına bağlı olarak farklı boyutlardaki parçaların oluşması.

PZR ürünlerinin ve RE kesimi sonucu oluşan parçaların analizi agaroz jel elektroforezi ile hızlı bir şekilde gerçekleştirilmektedir (Tanaka ve diğ., 2010). CAPS markırlarının jel elektroforezi ile analiz edilebilmesi yöntemin maliyetini oldukça azaltmaktadır. Kısa sürede hızlı sonuç alınmasını sağlayan yöntemin metodolojisinin uygulanması da oldukça kolay olduğundan CAPS markırları günümüzde parmakizi profillerinin belirlenmesinde, klonlama ve çeşitlilik çalışmalarında, gen işaretlenmesi ve haritalama çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Konieczny and Ausubel, 1993; Michaels ve Amasino, 1998; Troglio ve diğ., 2008; Kumar ve diğ., 2009).

Polimorfik CAPS markırlarının çoğaltılması çoğaltımı yapılacak doğru bölgenin seçimine, bu bölgeye göre tasarlanan primerlere ve ürünlerin doğru RE ile kesimine bağlıdır. Dolayısıyla yöntemin metodolojisinin doğru biçimde kurgulanması halinde elde edilecek veriler genomik çalışmalara büyük katkı sağlamaktadır. Hem PZR hem de kesim temelli olan CAPS yöntemi "Southern hibridizasyon" gerektirmediğinden kolay, maliyeti düşük ve daha az zaman alan bir yöntemdir. Lokus spesifik özelliğe sahiptir. Diğer markır sistemleri ile karşılaştırıldığında CAPS yöntemi birçok avantaja sahiptir. AFLP ve RAPD markırlarında "null" alleller elde edilirken CAPS yönteminde her zaman çoğaltılmış bir gen bölgesi elde edilir. Çoğaltım ürününün ortadan kalkması genetikte bir genin mutant kopyası nedeniyle işlevini tamamen kaybetmesi durumunu taklit eder. Jelde artık gözlenmeyen bu markır 'null' allel olarak da ifade edilir. Sonuç itibarıyla 'null' alleller genotiplerin hatalı olarak değerlendirilmesine yol açabilir. Ayrıca CAPS markırları EST dizilerinden geliştirildiğinde fonksiyonel olmayan dizilerden türetilen markırlara göre karşılaştırılmalı haritalama çalışmalarında daha kullanışlıdır. EST lokusları genom çapındaki genetik haritaların hazırlanmasında ve markır aracılı seleksiyonda etkin biçimde kullanılmaktadır. Bu nedenle CAPS markırları

karakterlerle ilişkilendirilebilmektedir. Bu markırlar gerçek fonksiyonel genleri temsil ederler ve fonksiyonel olmayan (SSR) bölgeleri temel alan markırlara göre daha kullanışlıdır. Bu markırlar bir karakterle ilişkilendirilebildiği için MAS yapmak için uygun markırlardır. Ayrıca CAPS markırları ko-dominant kalıtım modeline sahip olduğu için heterozigot bireylerin belirlenmesi de mümkün olabilmektedir (Matsumoto ve Tsumura, 2004).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MANTAR MATERYALİ

Yüksek lisans tez çalışmasında CAPS markırlarının analizinde kullanılan *Fusarium graminearum* izolatlarından 14'ü, Samsun 19 Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü 31'i de Isfahan Teknik Üniversitesi Ziraat Enstitüsü Bitki Koruma Bölümü'nde geleneksel yöntemlere göre tek spor analizi ile kurulan (Booth, 1977; Gerlach ve Nirenberg, 1982) kültür koleksiyonundan (Tablo 3.1) sağlandı.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan *F. graminearum* izolatları ve etkili oldukları coğrafik bölgeler.

İzolat	Bölge	İzolat	Bölge
F5	Marmara	M1	Mazandaran
F6	Sakarya	T12	Mazandaran
F7	Marmara	Fg18	Moghon
F8	Sakarya	Fg4	Mazandaran
F9	Sakarya	T7	Mazandaran
1F	Sakarya	Fg56	Gorgan
2F	Balıkesir	T10	Mazandaran
3F	Balıkesir	Fg170	Gorgan
4F	Bilecik	Sh4	Mazandaran
5F	Bilecik	M10	Mazandaran
6F	Bilecik	T9	Mazandaran
7F	Sinop	Sh13	Bilinmiyor
14F	Konya	M5	Mazandaran
15F	Konya	Sh5	Mazandaran
Sh1	Bilecik	F49	Moghon
Sh7	Uşak	T3	Mazandaran
Sh14	Marmara	M3	Mazandaran
Sh15	Bilinmiyor	M9	Mazandaran
T2	Mazandaran	Fg174	Gorgan
T11	Mazandaran	Fg5	Sari
M6	Mazandaran	Sh10	Mazandaran
T16	Mazandaran	M7	Mazandaran
Fg165	Kordkooy		

3.2. KÜLTÜR KOŞULLARI VE SAKLAMA

Moleküler markır çalışmasında kullanılacak *F. graminearum* izolatlarının üretimi patates dekstroz agar (PDA) besi ortamında, uzun süreli saklamaya alınacak örneklerin üretimi de sentetik nutrient agar (SNA) besi ortamında (Nirenberg, 1976) gerçekleştirildi (Tablo3.2). Hazırlanan her iki besi ortamı 121°C'de, 1.2 atmosfer basınç altında 15 dakika steril edildikten sonra steril petrilere döküldü.

Tablo 3.2: *Fusarium graminearum* izolatlarının üretilmesinde kullanılan besi ortamları ve içerikleri, pH 6.5.

Besi ortamı	Besi ortamı bileşenleri	Derişimi
Patates dekstroz agar	Patates dekstroz özütü	15 g/l
	Agar	20 g/l
Sentetik nutrient agar	KH ₂ PO ₄	1 g/l
	KCl	0.5 g/l
	KNO ₃	1 g/l
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g/l
	Glukoz	0.2 g/l
	Sukroz	0.2 g/l
	Agar	20 g/l

Fusarium graminearum kültürleri, steril hava akımlı kabin içerisinde, her bir izolata ait -80°C’de saklanan stok örneğinden mikropipet yardımıyla 500µl alınıp SNA besi ortamının ortasına bırakılmak suretiyle başlatıldı. Kültürler 25°C’de gece-gündüz periyodu uygulanarak yedi gün süre ile inkübe edildi. SNA besi ortamında bu sürenin sonunda üremenin olduğu kültürden steril kürdan yardımı ile süpürülen vejetatif hifler PDA besi ortamının ortasına bırakılarak yeni kültürler başlatıldı. İzolatlar 7 gün süre ile aynı şartlarda kültürlendi. Ayrıca SNA’da aynı koşullarda üretilen izolatlardan alınan miselyum süpürülüp %15’lik gliserol içeren propilen tüpe aktarıldı ve uzun süreli saklama amacı ile 1 gün -20°C’de bekletildikten sonra -80°C’ye alındı.

3.3. GENOMİK DNA İZOLASYONU

Bu çalışmada *Fusarium* izolatlarının moleküler düzeyde tanımlanması ve izolatlar arasındaki polimorfizmin belirlenmesinde PZR temelli yöntemler kullanıldı. Bu amaçla öncelikle yedi (7) günlük kültürlerden Doyle ve Doyle (1987) tarafından geliştirilen CTAB yöntemine göre genomik DNA molekülleri izole edildi. Kültürden alınan 100 mg’lık miselyum parçası sıvı azot ile toz haline getirildi. Toz halindeki örnekler 1.5 ml’lik mikrotüplere alındıktan sonra üzerine 65°C’de ısıtılmış 2x CTAB tamponu (Tablo 3.3) eklendi. CTAB tamponu ile ezme işlemine devam edildi. Homojenat üzerine 8M LiCl eklendi ve birkaç kez karıştırıldı. RNazA (10 mg/ml) eklenen tüpler 65°C’de 30 dakika inkübe edildi (her 5 dakikada bir örnekler karıştırıldı). Kloroform:izoamilalkol (24:1) eklenen tüpler 14000 xg’de 1 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı yeni mikrotüpe aktarıldı. Eşit hacimde kloroform:izoamilalkol (24:1) eklenen homojenat ters yüz edilmek suretiyle karıştırıldıktan sonra 14000 xg’de 1 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı yeni mikrotüpe aktarıldı. 1/10 hacimde 3 M NaOAc, 2 hacim soğuk etanol eklenen örnekler -80°C’de 15 dakika bekletildi. 14000 xg’de 1 dakika santrifüj edildikten

sonra üst sıvı döküldü. Çökelti %70 soğuk etanol ile 2 kere yıkandı ve kurutuldu. Genomik DNA molekülleri toplam 50 µl 1x TE tamponu (Tablo 3.3) içinde çözdürüldü.

Tablo 3.3: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar.

Tampon	Bileşenler	Derişim
Tris-EDTA (TE) Tamponu	Tris HCl (pH 8.0)	10 mM
	Glasiyal asetik asit	% 0.0571
	EDTA (pH 8.0)	1 mM
	Tris-HCl (pH 7.6)	100mM
CTAB Tamponu	NaCl	1.2 M
	EDTA	20mM
	CTAB	% 2
	β- merkaptotanol	%0.2
3 M NaOAC	Sodyum Asetat	3 M
	Glasiyal asetik asit	% 0.0571
8 M LiCl	LiCl	8 M

3.3.1. DNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi

Genomik DNA'nın nitel ve nicel analizinde spektral yöntemler kullanıldı. Bu amaçla spektrofotometrede DNA'nın UV ışığının 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçüldü. Çift iplikli DNA molekülü için 1 optik densite (OD) değeri 50 µg/ml'ye karşılık geldiği için DNA miktarları; $DNA(\mu g/ml) = A_{260} \times \text{sulandırım oranı} \times 50$ formülüne göre hesaplandı. Saflık kontrolünde 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerlerinin oranı (A_{260}/A_{280}) kullanıldı. Bu oran 1.8-2.0 değer aralığında olduğunda genomik DNA'nın saf olduğu kabul edildi (Maniatis ve diğ., 1982).

Aynı zamanda izolatlara ait DNA örnekleri agaroz jel elektroforezi ile de analiz edildi. Fragment ağırlıkları bilinen standart DNA markırı yardımıyla izole edilen DNA'nın boyutu ve miktarı kontrol edildi. Bu amaçla %0.8'lik agaroz jel kullanıldı. Jelin derişimine göre tartılan agaroz, tris asetat (TAE) tamponunda (Tablo 3.4) eritilerek ve etidyum bromür (10 mg/ml) eklenerek jel kasetine döküldü. İzole edilen DNA örnekleri agaroz jele yükleme tamponuyla (Tablo 3.4) birlikte uygulandı. Elektroforez 70 V sabit güçte gerçekleştirilerek, elektroforez sonrası genomik DNA jel görüntüleme cihazı kullanılarak görüntülendi ve fotoğraflandı (Avegene, X-lite 200).

Tablo 3.4: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar.

Tampon	Bileşenler	Derişim
Tris-Asetat (TAE) Tamponu	Tris bazı	2 M
	Glasiyal asetik asit	% 0.0571
	EDTA (pH 8.0)	0.05 M
Yükleme tamponu (6X)	Tris-HCl (pH 7.6)	10mM
	Bromofenol mavisi	% 0.03
	Xylene siyanol FF	% 0.03
	Gliserol	% 60
	EDTA	60 mM

3.4. SCAR MARKIRI ÇOĞALTIMI İLE TÜR TANISI

Bu çalışmada 45 *Fusarium graminearum* izolatının tür düzeyinde tanısı özgün SCAR markırlarının PZR ile çoğaltımı aracılı gerçekleştirildi. Schilling ve diğ., (1996) tarafından geliştirilen UBC85 markırı UBC85F (5'-GCAGGGTTTGAATCCGAGAC-3') ve UBC85R (5'-AGAATGGAGCTACCAACGGC-3') primerleri kullanılarak çoğaltıldı. Bu amaçla PZR bileşenleri son derişimleri; 1x PZR tamponu, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTP karışımı, 50 pmol primer çifti (UBC85F/UBC85R), 0.04 u/μl Taq DNA polimeraz enzimi olacak şekilde toplam 25 μl hacim içerisinde bir araya getirildi. Ön denatürasyon işleminin (95°C'de 5 dakika) ardından DNA çoğaltımı; 94°C'de 1 dakika, 63°C'de 1 dakika ve 72°C'de 1.5 dakikadan oluşan döngülerin 35 kez tekrarlanması ile sağlandı. Son uzama aşaması için tüpler 72°C'de 10 dakika bekletildi.

3.4.1. SCAR Markır Analizi

Çoğaltılan SCAR markırları agaroz jel elektroforezi yardımı ile analiz edildi. Markırlar %1'lik agaroz jelde ayrıldı. Jelin derişimine göre tartılan agaroz, tris-asetat (TAE) tamponunda eritildi ve etidyum bromür eklenerek jel kasetine döküldü (Tablo 3.4). Çoğaltım ürünleri, jele yüklem tamponu ile karıştırılarak uygulandı. Elektroforez 70 V sabit güç altında 1 saat 30 dakikada gerçekleştirildi. Elektroforez sonrası çoğaltım ürünleri jel görüntüleme cihazı kullanılarak görüntülendi ve fotoğraflandı (Avegene, X-lite 200).

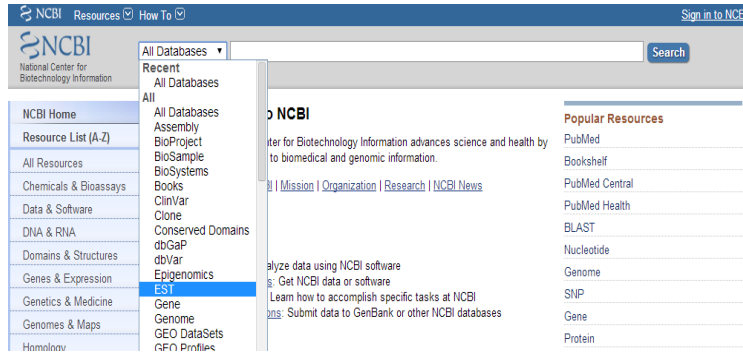
3.5. CAPS MARKIRLARININ ÇOĞALTIMI VE ANALİZİ

Toplam 45 *F. graminearum* izolatında genetik çeşitlilik ve tek nukleotid polimorfizmleri CAPS markırları analiz edilerek belirlendi. Bu amaçla, genomda beş farklı bölge hedef olarak

seçilerek PZR aracılı çoğaltıldı. Çoğaltım için 5 farklı primer çifti tasarlandı. Daha sonra çoğaltım ürünleri 7 farklı RE ile kesime bırakılarak tek nukleotid polimorfizmleri tarandı.

3.5.1. Çoğaltımı Hedeflenen Bölgelerin Seçimi

Tez çalışmasında CAPS markırlarının eldesinde temel hücrel süreçlerde görev alan ve evrim sürecinde seleksiyon baskısından kaçan hücre iskeleti proteinini şifreleyen aktin geni (*Act*), 60S ribozomal proteinini şifreleyen gen, evrimsel düzeyde en çok korunan histon 3 geni (*H3*) ile birlikte NCBI'da kayıt altına alınmış ve hipotetik proteini şifreleyen gen (XM_389035.1) ile hipotetik protein ile ilişkili olduğu bulunmuş ve SCAR markırı taraması amaçlı gerçekleştirilen çalışmada, tüm *F. graminearum* izolatlarında RAPD yöntemi ile çoğaltılan ve bu izolatları *F. culmorum* izolatlarından ayıran D3G3 (JN638063.1) markırı seçildi. Web ortamında arama motorundan www.ncbi.nlm.nih.gov¹ adresi aracılığıyla NCBI veritabanına ulaşıldı ve siteye girişin ardından gerçekleştirilecek olan analiz konu başlığı; nukleotid, gen, EST, protein, genom ölçütlerinin bulunduğu sekmeden EST ve gen olarak seçilerek *Fusarium graminearum* genomunda ilgili genlere ait EST dizilimleri çıkarıldı. Elde edilen nukleotid dizilimleri *F. graminearum*'un tüm genomu ile www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi adresi aracılığı ile BLAST analizine tabi tutularak yüksek homoloji gösteren gen sınırlarını da temsil eden diziler belirlendi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: NCBI ana sayfası arama çubuğunda EST bölgelerinin seçilmesi.

3.5.2. Primer Tasarımı

CAPS analizi ile çoğaltılacak genom bölgeleri belirlendikten sonra PZR'unda kullanılacak primer molekülleri Primer3 programı kullanılarak tasarlandı. Bu amaçla, NCBI'dan alınan EST dizilimleri FASTA formatına çevrildi. Primer çifti arasındaki Tm farkının 2°C'yi geçmemesi, primer molekülleri boyutunun yaklaşık 20 nukleotid olması ve GC içeriğinin %

¹ www.ncbi.nlm.nih.gov [Ziyaret tarihi: 10 Ocak 2014].

50 olması gibi ölçütler temel alınarak tasarım yapıldı. Tasarlanan primerlerin kontrolü, “Integrated DNA Technologies” (www.eu.idtdna.com/site²) internet sitesinden “Oligoanalyser” (www.eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Oligoanalyzer³) yazılım programı kullanılarak gerçekleştirildi. Primer dizilerinin, “self-dimer”, “heterodimer” ve “hairpin” yapısı oluşturma olasılıkları test edildi. Primer moleküllerinin tek iplikli halde kararlı biçimde kalabilmelerini sağlamak üzere, serbest enerji değişim (ΔG) değerleri pozitif aralıkta olan primerler PZR’nda kullanılmak üzere seçildi. Tablo 3.5 çalışmada kullanılan primer moleküllerinin nukleotid dizilerini göstermektedir.

Tablo 3.5: CAPS markır analizinde kullanılan primerler ve nukleotid dizilimleri.

Primer	İleri/Geri	Nükleotid Dizisi (5'-3')	Hedef Gen	Ürün Boyutu (bp)
H3	İleri	TCCAAGGCTGGTAAGTTCTCA	Histon3	437
	Geri	TTGGACTGGATGGTAACACG		
Act	İleri	AGCTAGGTTTCGCCGTAAC	Aktin	1209
	Geri	CTTGGTACTCGGCCTTGGTA		
Rib	İleri	GGCAAGACCGATTACTACGC	60Sribozomal protein	801
	Geri	CTGGACACGCTTCTCCTTCT		
D3G3	İleri	CAGGAGAGATGAGGATCTTGTCG	D3G3	735
	Geri	GATGATTGGCGGGCAGAA		
Hip	İleri	CAGTCTTGGGGCTAGTCTCG	Hipotetik Protein	1030
	Geri	AGCTGCCCAAAGAGTTGTCA		

3.5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bileşenleri ve Koşulları

PZR bileşenlerin son derişimleri; 1x PZR tamponu, 1.5 mM MgCl₂, 0.1mM dNTP karışımı, 0.5 µM primer çifti, 0.04 u/µl Taq DNA polimeraz enzimi ve 50 ng/µl genomik DNA olacak şekilde bir araya getirildi. 95°C’ de 5 dakika olarak uygulanan ön denatürasyonun ardından PZR; 94°C’ de 1 dakika, 56 - 60°C ’de 1 dakika ve 72°C’de 2 dakika olacak şekilde 30 döngü olarak gerçekleştirildi. Son uzama aşaması 72°C’de 10 dakikada tamamlandı.

3.5.4. Çoğaltım Ürünlerinin Analizi

Özgün primerlerin kullanıldığı PZR çoğaltım ürünleri 3.3.1’de belirtilen şekilde % 1’lik agaroz jel kullanılarak 3.4.1’de verilen protokole göre elektroforezle analiz edildi.

² www.eu.idtdna.com/site, [Ziyaret tarihi: 10 Ocak 2014].

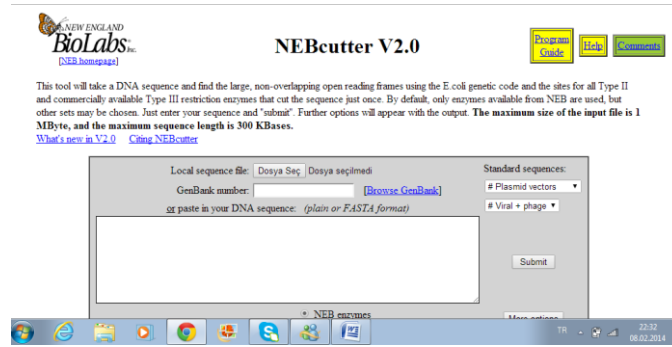
³ www.eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Oligoanalyzer, [Ziyaret tarihi: 10 Ocak 2014].

3.5.5. Çoğaltım Ürünlerinin RE ile Kesimi

Polimeraz zincir reaksiyonu ile elde edilen çoğaltım ürünleri 7 farklı RE ile kesime bırakıldı. 45 *F. graminearum* restriksiyon uzunluk polimorfizmi bakımından taranarak SNP'ler gösterildi.

3.5.5.1. Uygun RE Seçimi

CAPS markırları için çoğaltılacak hedef genlerin www.ncbi.nlm.nih.gov adresi aracılığı ile EST dizilimleri çıkarıldı. Ardından bu dizilimler için ‘‘NEBcutter V2.0’’ programı kullanılarak RE kesim bölgeleri tarandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: NEBcutter V2.0 programı ile uygun restriksiyon endonükleazlarının seçilmesi.

Bu amaçla çoğaltımı hedeflenen bölgelere ait nukleotid dizileri FASTA formatına çevrilerek ‘‘NEBcutter V2.0’’ programında bu dizilere ait restriksiyon endonükleazları belirlendi. Bunlar arasında en az bir kesim noktası içeren, ortak kesim yapan 7 RE seçildi (Tablo 3.6).

Tablo 3.6: CAPS yönteminde kullanılan restriksiyon endonükleazları ve kesim ürünleri boyutu.

Hedef Gen	RE	Kesim Bölgesi	Boyut (bç)	RE	Kesim Bölgesi	Boyut (bç)
Aktin	<i>Cla</i> I	ATCG ∇ AT	275	<i>Fok</i> I	GGATG(N) ₉ ∇ NNNN \blacktriangle	1107
			934			102
Histon3	<i>Ava</i> II	G ∇ GWC \blacktriangle C	155	<i>Tfi</i> I	G ∇ AWT \blacktriangle C	117
			282			320
D3G3	<i>Hae</i> III	GG ∇ CC	396	<i>Eco</i> RI	G ∇ AATT \blacktriangle C	136
			178			599
			126			
			35			
Rib	<i>Ava</i> II	G ∇ GWC \blacktriangle C	120	<i>Tfi</i> I	G ∇ AWT \blacktriangle C	331
			36			470
Hip	<i>Ava</i> II	G ∇ GWC \blacktriangle C	142	<i>Rsa</i> I	GT ∇ AC	204
			888			826

3.5.5.2. RE Kesim Koşulları

Restriksiyon endonükleazı kesimi için PZR karışımınının 10 μ l'si kullanıldı. Kesim için bileşenler 1x reaksiyon tamponu, 1 ünite enzim ve distile su olacak şekilde toplam 30 μ l'de bir araya getirildi. Karışım 1.5 saat 37°C'de su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda enzim inaktivasyonu örneklerin 65°C'de 15 dakika bekletilmeleri ile sağlandı. Kesim ürünleri % 1'lik agaroz jel kullanılarak 3.4.1'e göre elektroforezle analizi ile kontrol edildi. Jel görüntüleme cihazı kullanılarak görüntülendi ve fotoğraflandı (Avegene, X-lite 200).

3.5.6. SNP Analizi

Çoğaltım ürünlerinin RE ile kesimi sonucu oluşan ürünler %4 (3:1)'lük nusiv agaroz (Prona-Nu Reducta) kullanılarak jel elektroforezi ile ayrıldı.

3.5.6.1. Nusiv Agaroz Jel Elektroforezi

Hazırlanacak jelin miktarına göre tartılan %3 nusiv agaroz ve %1 normal agaroz +4°C'de bekletilmiş tris-asetat (TAE) tamponunda eritildi ve etidyum bromür (10mg/ml) eklenerek jel kasetine döküldü (Tablo 3.4). Jelin polimerize olmasının ardından 1 saat süre ile +4°C'de bekletildi. Çoğaltım ürünleri, polimerize olan jele yükleme tamponu ile karıştırılarak uygulandı. Aynı zamanda PZR ürünlerinin boyut analizinde 100 bç'lik standart DNA örnekleri kullanıldı. Elektroforez 70 V sabit güç altında 1 saat 15 dakikada gerçekleştirildi.

3.5.6.2. Dizi Analizi

CAPS analizi sonucunda polimorfizm taşıyan izolatlara ait PZR karışımı 3.5.3’de anlatılan koşullara göre hazırlandı ve ‘‘Sanger metoduna’’ göre çift yönlü dizileme, hizmet alımı ile gerçekleştirildi.

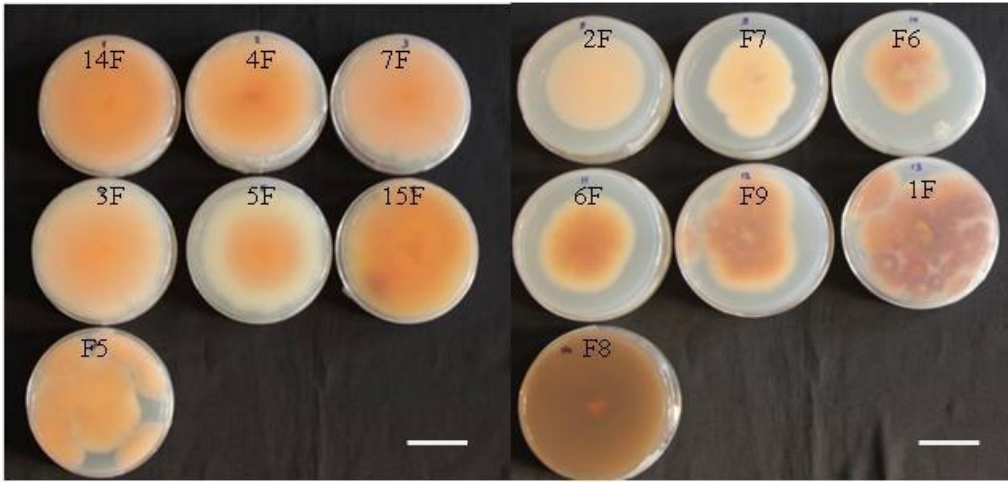
3.5.6.3. Verilerin Biyoinformatik Araçlarla Analizi

Refgen A.Ş. tarafından dizileme hizmeti alınan polimorfizm taşıyan 5 izolatın nukleotid dizileri ‘‘Chromas lite’’ yazılım programı ile analiz edildi. Elde edilen nukleotid dizisi, veri tabanında kayıtlı organizma genomları ile karşılaştırılarak nukleotid dizi homolojileri ve tek nukleotid değişimleri tarandı ve belirlendi. Bu amaçla öncelikle dizi bilgisi FASTA formatına çevrildi. Ardından BLASTN’de ‘‘nukleotid koleksiyonu’’ ve ‘‘yüksek dizi benzerlikleri’’ ölçütleri temel alınarak tarama gerçekleştirildi. Clustal W yazılım programı ile polimorfik kesim profili gösteren izolatlara ait nukleotid dizilimleri referans genom ile karşılaştırılarak SNP’ler tarandı.

4. BULGULAR

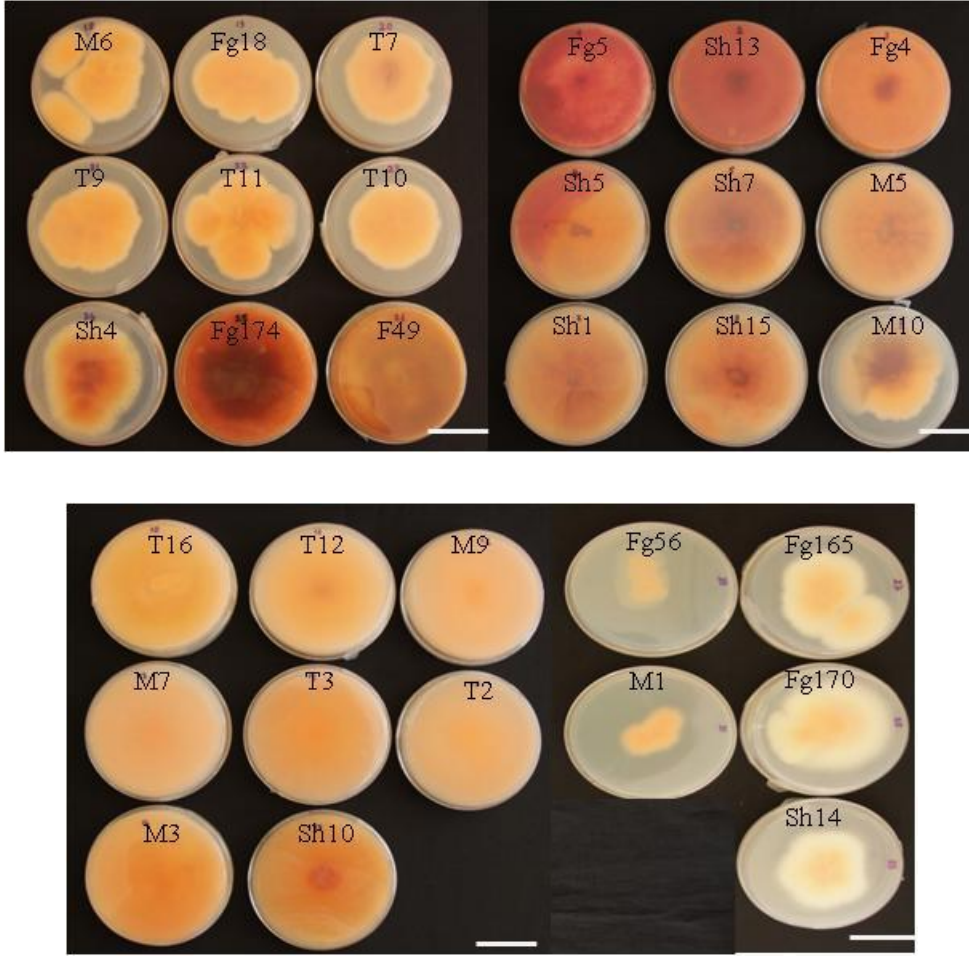
4.1. MANTAR ÜRETİMİ

Tez projesi kapsamında PDA besi ortamında *in vitro* üretilen *F. graminearum* saf kültürlerinde miselyum renginin beyazdan sarıya, pembeden kahverengiye kadar değiştiği gözlemlendi. Samsun 19 Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünden elde edilen izolatlara ait hiflerin sarı, beyaz ve kahverengi pigmentli olduğu görüldü (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Türkiye’de hastalık etmeni olan PDA besi ortamında üretilen 14 *F. graminearum* izolatının 7 günlük kültürleri.

İsfahan Teknik Üniversitesi Ziraat Enstitüsü Bitki Koruma Bölümü kültür koleksiyonundan sağlanan izolatların ise daha çok pembe, sarı ve kahverengi pigmentli hife sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.2). Yedi günden fazla kültürlenmiş izolatların miselyum renginde koyulaşmanın meydana geldiği ve vejetatif hiflerin petri yüzeyini kapladığı saptandı. Ayrıca sarı-beyaz olan *F. graminearum* miselyumlarının, kültürün yaşlanması ile sarı-kahverengiye dönüştüğü görüldü. Bu nedenle moleküler analizler için yedi gün kültürlenmiş izolatlar seçildi.



Şekil 4.2: İran'da hastalık etmeni olan PDA besi ortamında üretilen 31 *F. graminearum* izolatının 7 günlük kültürleri.

4.2. MOLEKÜLER ANALİZLER

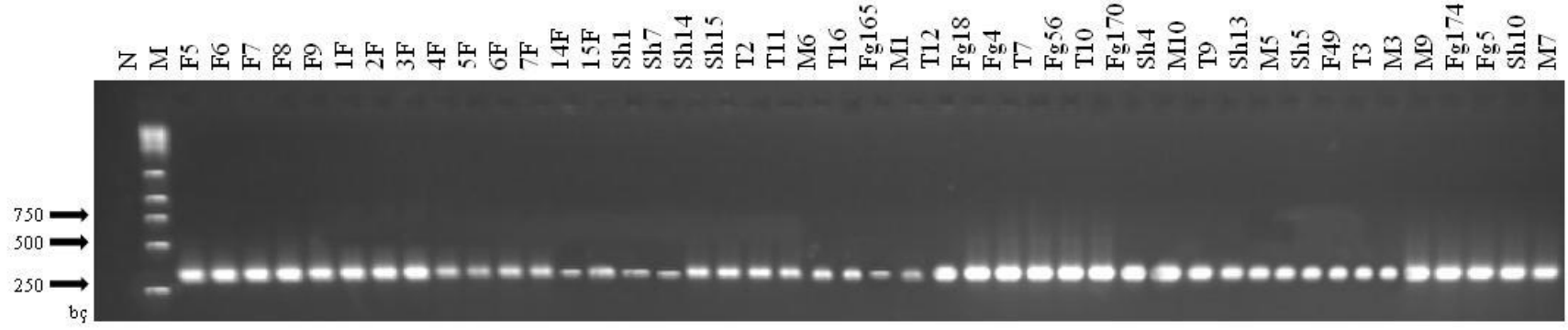
Toplamda 45 farklı *F. graminearum* izolatu öncelikle PZR temelli olarak SCAR markırı ile moleküler düzeyde tanımlandı. *Fusarium graminearum* izolatlarının tür içi çeşitliliği CAPS moleküler markır yöntemi kullanılarak analiz edildi.

4.2.1. Genomik DNA Analizi

Toplam 45 *F. graminearum* izolatının 50 mg yaş ağırlığına sahip miselyumundan izole edilen genomik DNA moleküllerinin miktarı 30-340 µg/ml aralığında, saflık oranları (OD₂₆₀/OD₂₈₀) ise 1.8-2.0 değer aralığında hesaplandı. Genomik DNA molekülleri final derişimi 50 ng olacak şekilde moleküler analizlerde kullanıldı.

4.2.2. İzolatların PZR Temelli Tanısı

Geleneksel yöntemlerle tanımlanmış *F. graminearum* izolatları, SCAR markırlarına özgün olarak tasarlanmış, 3.4'te nukleotid dizileri verilen primer çiftleri kullanılarak tür düzeyinde tanımlandı. UBC85F/R primerleri tüm *F. graminearum* izolatlarının PZR'unda 332 bp boyutundaki DNA markırını çoğalttı (Şekil 4.3). Sonuç olarak 45 izolatın da *F. graminearum* türüne ait olduğu moleküler düzeyde doğrulandı.



Şekil 4.3: UBC85 SCAR markırının özğün primer çifti kullanılarak *F. graminearum* izolarında çoğaltılan ve agaroz jelde gözlenen 332 bç boyutundaki DNA fragmenti, M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.

4.2.3. CAPS Moleküler Markır Analizi

CAPS moleküler markırlarının eldesi için öncelikle *F. graminearum* genomunda evrim baskısından kaçmış, temel hücrel olaylarda görev alan 3 gen (*Histon 3*, *Ribozomal protein* ve *Aktin*) ve NCBI’da kayıt altına alınmış hipotetik protein ile ilişkili olduğu bulunmuş D3G3 (JN638063.1) markırı ve hipotetik proteini şifreleyen gen tüm izolatların genomunda Tablo 3.5’te nukleotid dizileri verilen özgün primer çiftleri kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Çoğaltım ürünleri farklı RE kesimine bırakılarak tür içi polimorfizmi tarandı.

4.2.3.1. *Histon 3* geninin PZR ile çoğaltılması

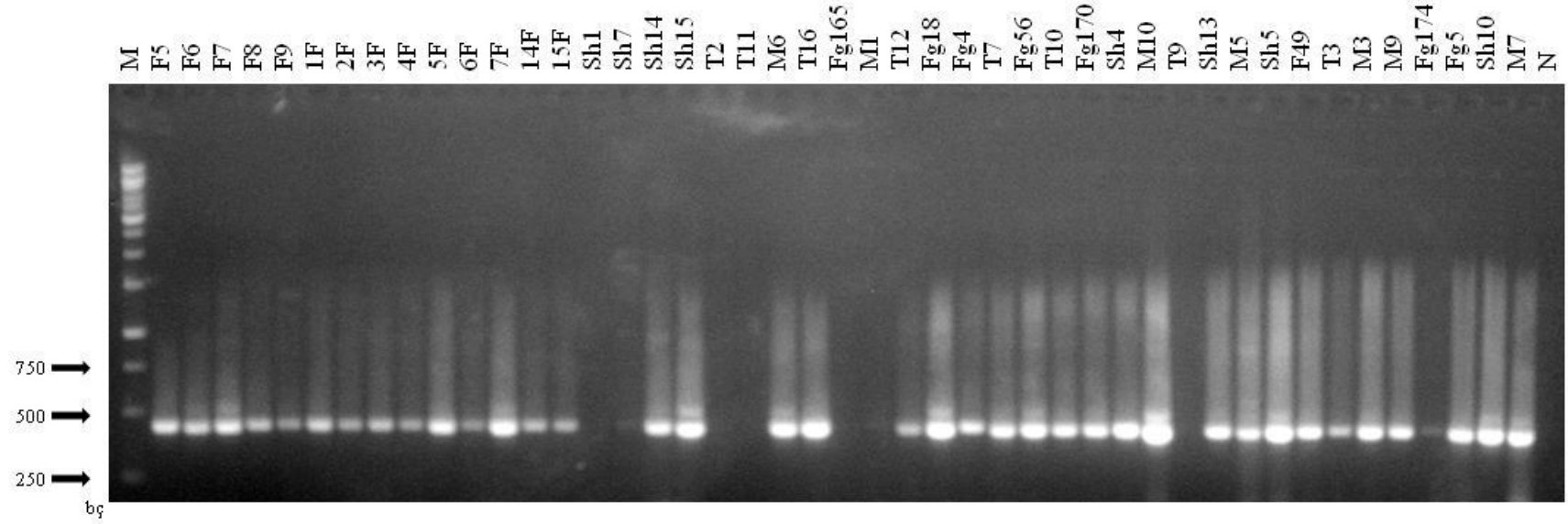
Histon 3 geninin (AF314476.1) 1. ekzonun 48, 3. ekzonun 41 nukleotidi dışında kalan 3 ekzon ve 2 intron bölgesi Tablo 3.5’te verilen H3 primer çifti kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Sh1, T2, T11, Fg165, M1 ve T9 izolatlarında ürün elde edilemedi. Sh7 ve Fg174 izolatlarının çoğaltım ürünlerinin kesim reaksiyonları için yeterli olmadığı görüldü. F7, Sh15, M6, Fg18 ve M10 izolatlarında ise özgün olmayan bölgeler elde edildi. Geri kalan 32 izolatta beklenen 437 bç boyutundaki çoğaltım ürünü agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (Şekil 4.4).

4.2.3.2. Restriksiyon endonükleazlarının seçilmesi

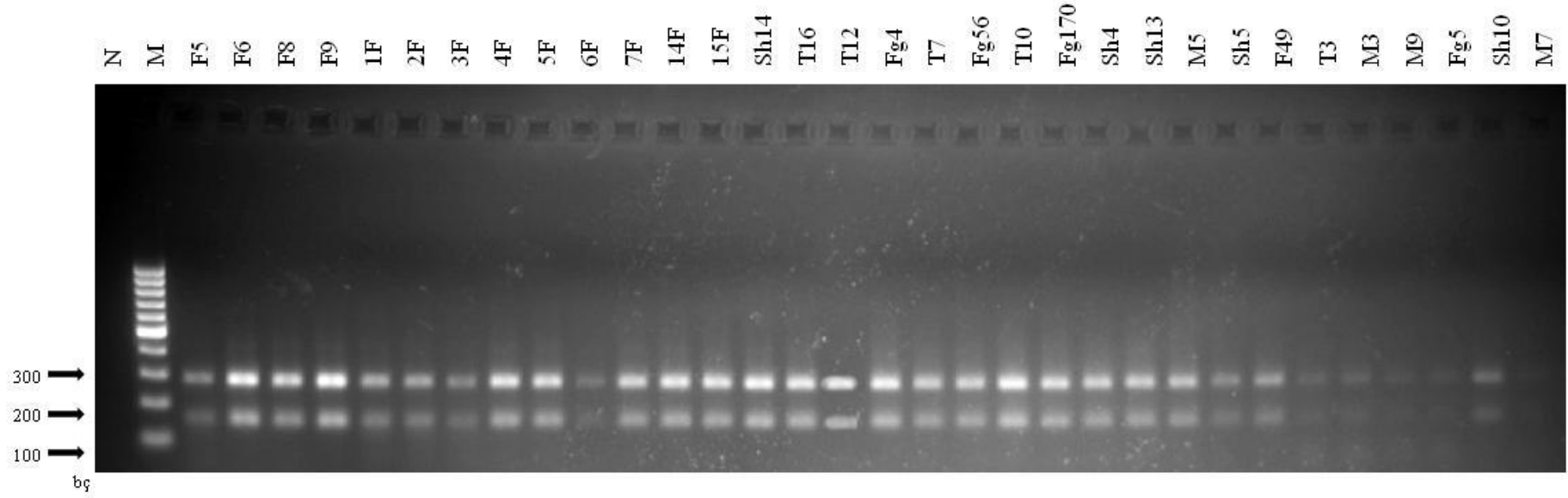
Çoğaltımı hedeflenen bölgeye ait FASTA formatındaki dizi ‘NEBcutter V2.0’ programı kullanılarak RE kesim bölgeleri bakımından taranarak, hedef dizide kesim yapabilen RE’nın listesi çıkarıldı. RE seçimi için 3.5.5.1’de anlatılan yol izlenerek her bir enzim için kesim sonucu oluşacak DNA parçalarının boyutları analiz edildi. Hedef dizilimde birden fazla kesim bölgesi içeren ve kesim ürünleri jelde gözlenebilecek boyutta olan enzimlerden *Ava II* ve *Tfi I* endonükleazları çalışmada kullanılmak üzere seçildi.

4.2.3.3. *Histon 3* genine ait çoğaltım ürünlerinin *Ava II* ve *Tfi I* restriksiyon endonükleazları ile kesilmesi

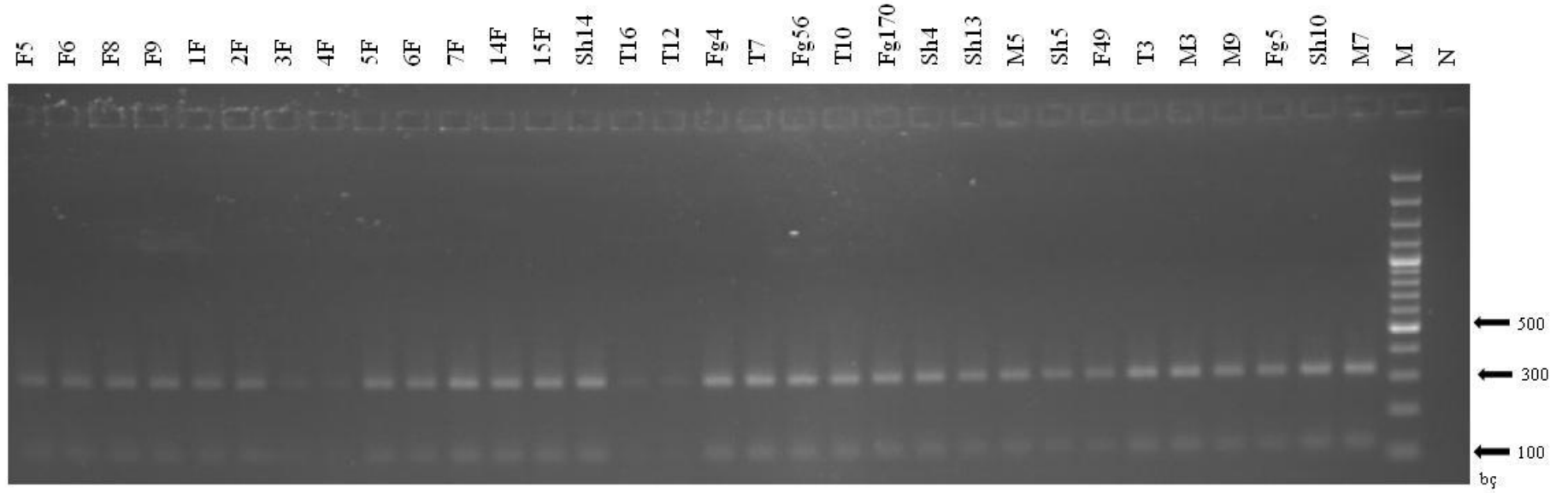
Yüksek hacimde (100µl) çoğaltılan 32 izolata ait 437 bç boyutundaki *H3* geni bölgesine ait dizi *Ava II* ve *Tfi I* restriksiyon endonükleazları kullanılarak kesildi. *Ava* RE ile 32 izolatın hepsinde beklenen 155 ve 282 bç boyutundaki kesim ürünleri elde edildi. Sonuç olarak, tüm izolatlarda monomorfik kesim profili gözlemlendi. Şekil 4.5 nusiv agaroz jel elektroforezi ile ayrılan DNA parçalarını göstermektedir. *H3* gen bölgesinin *Tfi I* RE ile kesimi sonucunda da beklenen 117 ve 320 bç boyutundaki kesim ürünleri elde edildi. Nusiv agaroz jel elektroforezinde ayrılan monomorfik bantlar Şekil 4.6’da görülmektedir.



Şekil 4.4: Özgün H3 I/G primer çifti kullanılarak *F. graminearum* izolatlarında çoğaltılan ve agaroz jelde gözlenen 437 bç boyutundaki DNA fragmenti, M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.



Şekil 4.5: *H3* genine ait çoğaltım ürünlerinin *Ava* II restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi sonucu oluşan 155 ve 282 bç boyutundaki kesim ürünlerinin nusiv agaroz jel elektroforezi ile gözlenmesi, M: 100 bç ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.



Şekil 4.6: *H3* geninine ait çoğaltım ürünlerinin *Tfi* I retrfiksion endonükleazı ile kesilmesi sonucu oluşan 117 ve 320 bç boyutundaki kesim ürünlerinin nusiv agaroz jel elektroforezi ile gözlenmesi, M: 100 bç ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.

4.2.3.4. *FG10010.1* geninin PZR ile çoğaltılması

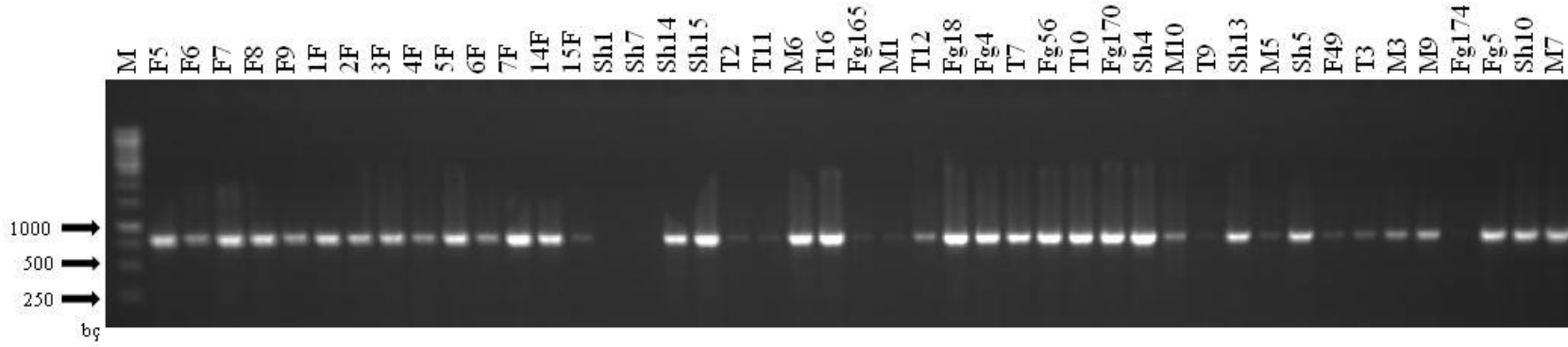
Ribozomal proteini kodlayan *FG10010.1* geninin (XM_390186.1) kodlama yapan intron içermeyen bölgesi Rib primer çifti (Tablo 3.5) kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Bu primer çifti ile Sh1, Sh7, T9 ve Fg174 izolatlarında ürün elde edilemedi. 15F, T2, T11, Fg165, M1, M5, F49 ve T3 izolatlarında da etkin çoğaltım sağlanamadı. F8, F9, 2F, 4F, 6F, T12, M10, M3 ve M9 izolatlarında da etkin kesim reaksiyonu gerçekleştirilemedi. Bu nedenle *FG10010.1* geninin analizi için 21 izolat çalışma dışı bırakıldı. Geriye kalan 24 izolatta beklenen 801 bç boyutundaki DNA parçası restriksiyon polimorfizminin araştırılmasında kullanıldı (Şekil 4.7).

4.2.3.5. Restriksiyon endonükleazlarının seçilmesi

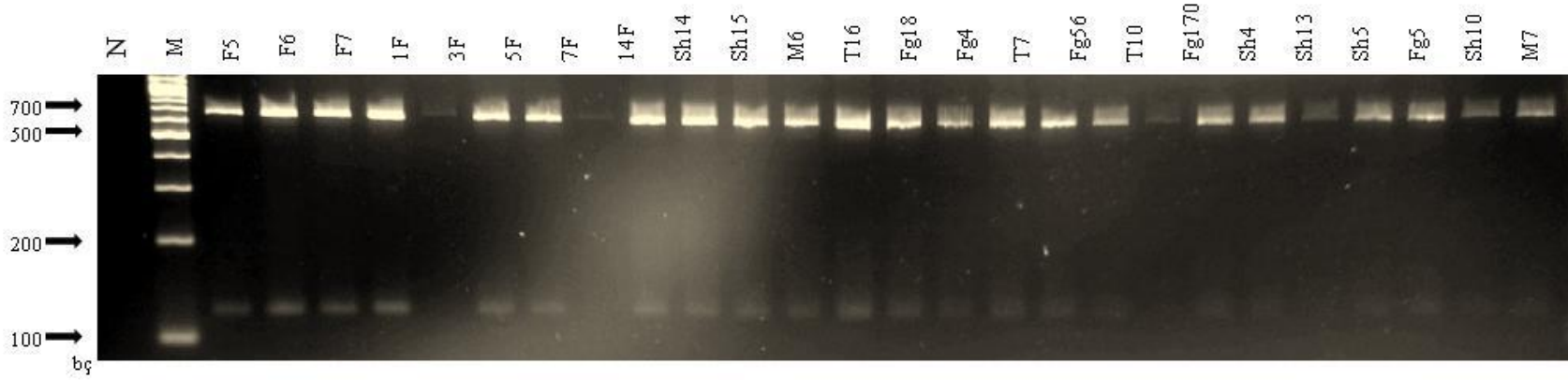
Çoğaltımı hedeflenen 801 bç boyutundaki dizilimin FASTA formatı restriksiyon endonükleazı kesim bölgelerinin 'NEBcutter V2.0' programında taranmasında kullanıldı. Hedef bölgede kesim yapabilen restriksiyon endonükleazları taranarak her bir enzim için kesim sonucu oluşacak DNA parçalarının boyutları 3.5.5.1'de verildiği şekilde analiz edildi. Kesim için birden fazla hedef bölge taşıyan, aynı zamanda kesim ürünlerinin jelde gözlenebilecek boyutta olan enzimlerden ikisi; *Ava II* ve *Tfi I* endonükleazları polimorfizmi araştırmasında kullanılmak üzere seçildi.

4.2.3.6. *FG10010.1* geninin *Ava II* ve *Tfi I* restriksiyon endonükleazları ile kesilmesi

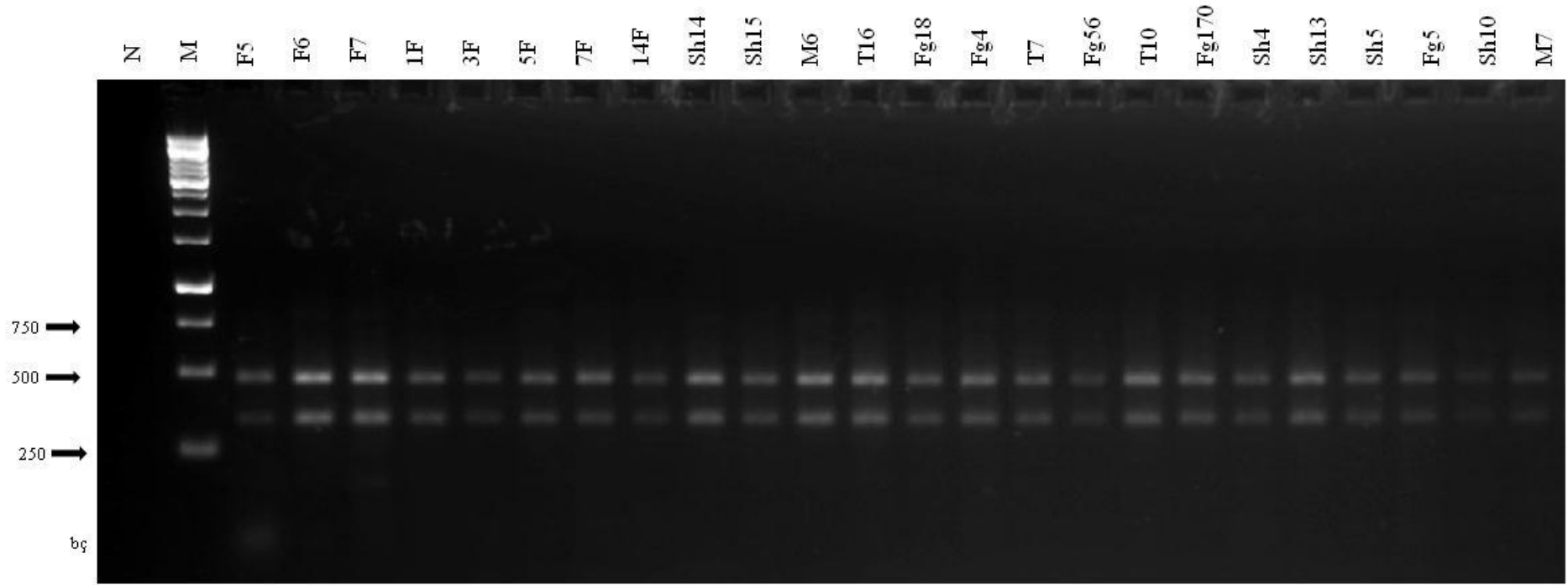
Toplam 100 µl içinde PZR ile çoğaltılan *FG10010.1* geni ürünleri *Ava II* ve *Tfi I* restriksiyon endonükleazları kullanılarak kesime bırakıldı. *Ava II* RE ile 24 izolatta beklenen 36, 120 ve 645 bç boyutundaki kesim ürünlerinden ikisi (120 ve 645 bç) nusiv agaroz jel elektroforezi ile ayrılarak UV ışık altında gözlemlendi (Şekil 4.8). Küçük boyutta olan 36 bç uzunluğundaki parça jelde gözlenemedi. Bu RE da tüm izolatlarda identik kesim profilini verdi. *Tfi I* restriksiyon endonükleazı ile 24 izolatta gerçekleştirilen kesim işlemi sonucu 22 izolatta beklenen 331 ve 470 bç boyutundaki ürünler nusiv agaroz jel elektroforezinde ayrıldı. 22 izolatta monomorfik kesim profili gözlemlendi. F5 ve F7 izolatlarında diğer izolatlardan elde edilen kesim ürünlerinin yanında sırasıyla 84 ve 171 bç'lik birer polimorfik DNA parçası daha elde edildi (Şekil 4.9). Restriksiyon uzunluk polimorfizminin belirlendiği izolatlarda RE kesim işlemi tekrarlandığında aynı boyuttaki polimorfik fragmentler tekrar elde edildi (Şekil 4.10). Bu nedenle F5 ve F7 izolatlarına ait çoğaltım ürünleri dizileme analizi için seçildi. Sonuç olarak ribozomal proteini kodlayan *FG10010.1* geninde *Tfi I* ile restriksiyon polimorfizmi elde edildi.



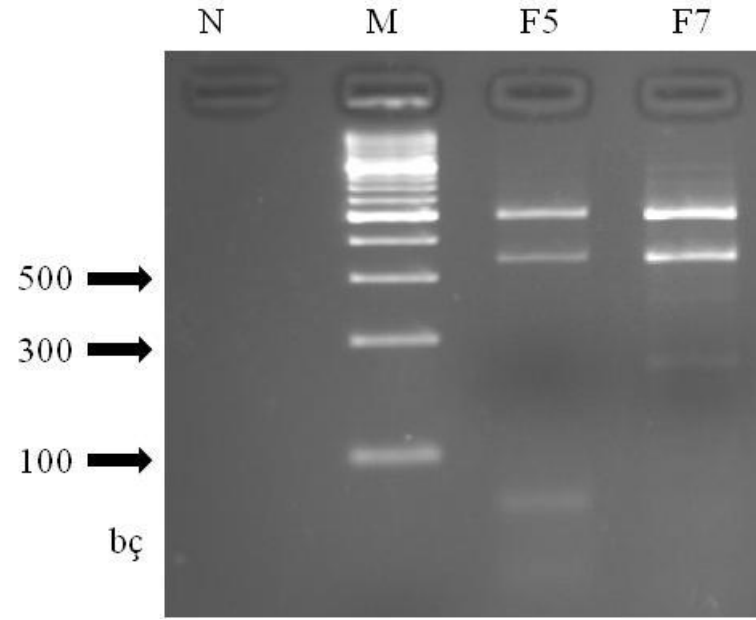
Şekil 4.7: Özgün Rib I/G primer çifti kullanılarak *F. graminearum* izolarında çoğaltılan ve agaroz jelde gözlenen 801 bp boyutundaki DNA fragmenti, M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA.



Şekil 4.8: Ribozomal proteini kodlayan gene ait çoğaltım ürünlerinin *Ava* II restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi sonucunda 120 ve 645bç boyutundaki kesim ürünlerinin nusiv agaroz jel elektroforezi ile gözlenmesi, M: 100 bç ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.



Şekil 4.9: Ribozomal proteini kodlayan gene ait çoğaltım ürünlerinin *Tfi* I restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi sonucunda oluşan 331 ve 470 bp boyutundaki kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile gözlenmesi, M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.



Şekil 4.10: F5 ve F7 izolatlarının *Tfi* I restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi ve nusiv agaroz jel elektroforezi ile polimorizm gösterilmesi, M: 100 bç ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.

4.2.3.7. D3G3 markırının PZR ile çoğaltılması

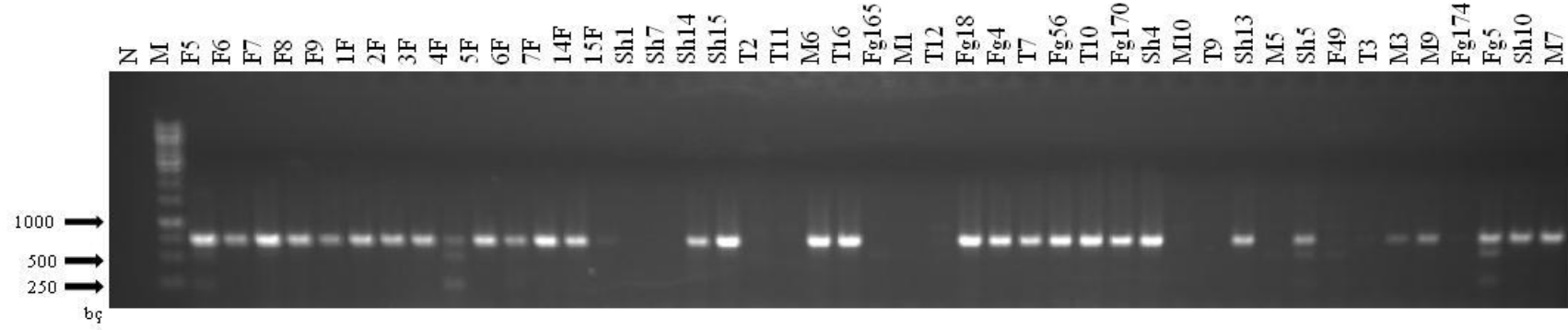
D3G3 markırı (JN638063.1) D3G3 ileri/geri primer çifti kullanılarak PZR ile 45 izolatta çoğaltıldı. İzolatların 13'ünde (Sh1, Sh7, T2, T11, Fg165, M1, T12, M10, T9, M5, F49, T3 ve Fg174) PZR ürünü elde edilemedi. 4F, Sh5 ve Fg5 izolatlarında ise özgün olmayan çoğaltım ürünleri gözlemlendi. 6F, 15F, M3, M9 ve M7 izolatlarında ise etkin kesim reaksiyonu sağlanamadı. İzolatlardan 21'i restriksiyon kesimi işlemine tabi tutulmadı. D3G3 primer çifti geri kalan 24 izolatta beklenen 735 bç boyutundaki DNA parçasını çoğalttı. Bu izolatlardan elde edilen ürünler RE kesiminde kullanıldı (Şekil 4.11).

4.2.3.8. Restriksiyon endonükleazının seçilmesi

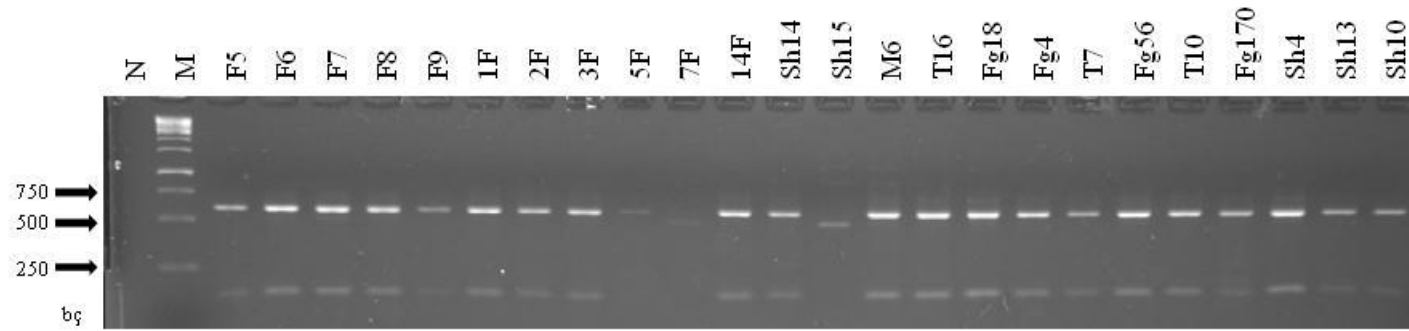
Çoğaltımı hedeflenen bölgeye ait FASTA formatındaki dizi 'NEBcutter V2.0' programı kullanılarak restriksiyon endonükleazı kesim bölgeleri bakımından tarandı. Hedef dizide kesim yaptığı belirlenen restriksiyon endonükleazı listesinden seçilenler 3.5.5.1'de anlatılan yol izlenerek tarandı. DNA parçalarının boyutları analiz edildiğinde birden fazla hedef bölgede kesim yapabilenler ve kesim ürünleri boyutları jelde gözlenebilecek olanlar, *Hae* III ve *Eco* R I endonükleazları seçildi.

4.2.3.9. D3G3 markırına ait çoğaltım ürünlerinin *Hae* III ve *Eco*R I restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi

Toplamda 50 µl'de PZR ile elde edilen D3G3 markırına ait 735 bç boyutundaki çoğaltım ürünleri *Hae* III restriksiyon endonükleazı ile kesime bırakıldığında tüm örneklerde kesim reaksiyonu sağlanamadı. Bu DNA parçaları *Eco* RI restriksiyon endonükleazı ile kesildiğinde 7F ve Sh15 izolatları hariç diğer 22 izolatta beklenen 136 ve 599 bç boyutlarındaki DNA parçaları elde edildi. 7F ve Sh15 izolatlarına ait kesim ürünleri yaklaşık 400 bç boyutundaki bir DNA parçası tarafından temsil edildi (Şekil 4.12). Sonuç olarak *Eco* RI ile D3G3 markırının farklı izolatlarda polimorfizme sahip olduğu gösterildi.



Şekil 4.11: Özgün D3G3 I/G primer çifti kullanılarak *F. graminearum* izolarında çoğaltılan ve agaroz jelde gözlenen 735 bç boyutundaki DNA fragmenti, M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.



Şekil 4.12: D3G3 markırına ait çoğaltım ürünlerinin *Eco RI* restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi sonucunda oluşan 136 ve 599 bç boyutundaki kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile gösterilmesi, M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.

4.2.3.10. Aktin geninin PZR ile çoğaltılması

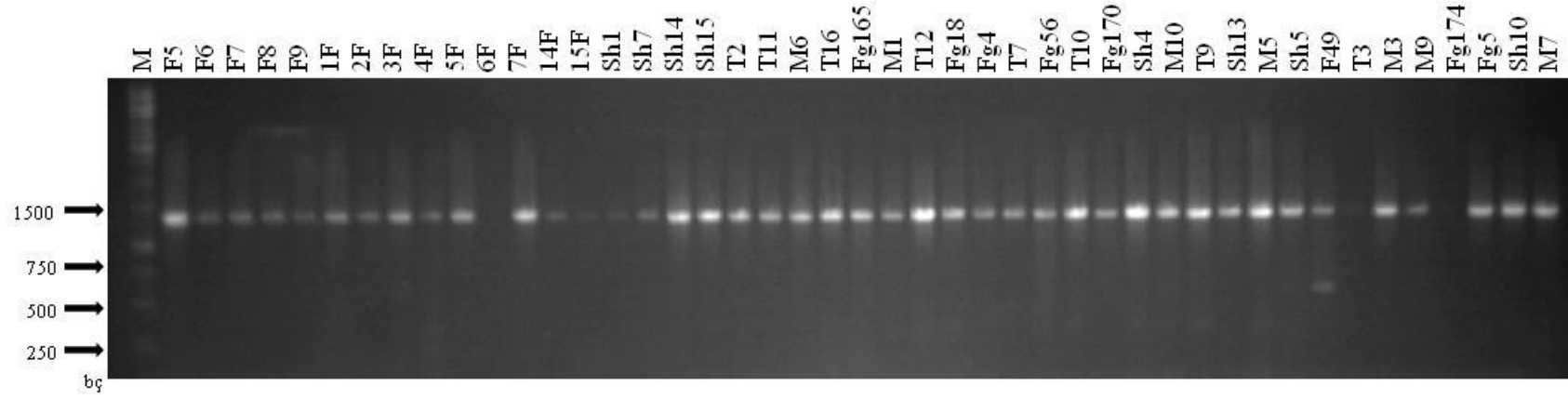
Aktin geninin intron içermeyen kodlama bölgesi (XM_391032.1) Act primer çifti (Tablo 3.5) kullanılarak PZR ile çoğaltıldığında 6F, T3 ve Fg174 izolatlarında ürün elde edilemedi. Act primeri F49 izolatında özgün olmayan ürünü çoğalttı. Dört izolatta (14F, 15F, Sh1 ve Sh7) izolatlarında yetersiz ürün elde edilirken 13 izolatta (F6, F7, F8, F9, 2F, 3F, 4F, M9, Sh5, Sh4, M10, T9 ve M5) etkin kesim reaksiyonu gerçekleştirilemedi. Bu nedenlerden dolayı 21 izolat restriksiyon polimorfizmi analizi dışında bırakıldı. Geriye kalan 24 izolatta 1209 bç boyutundaki çoğaltım ürününün agaroz jel elektroforezi analizi Şekil 4.13'te gösterilmektedir.

4.2.3.11. Restriksiyon endonükleazının seçilmesi

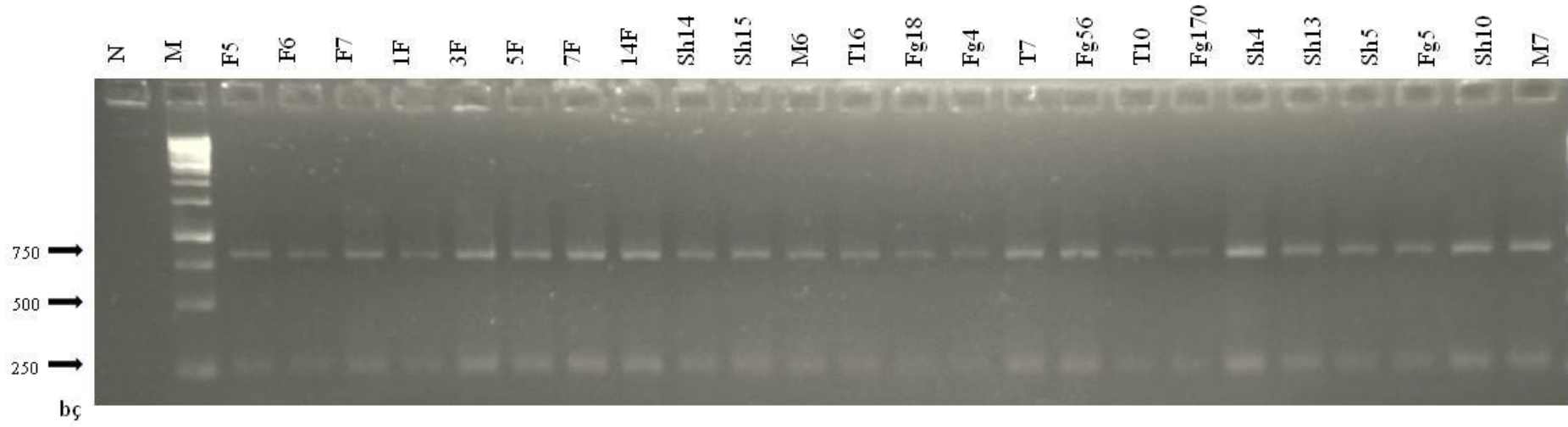
Çoğaltımı hedeflenen bölgenin FASTA formatındaki diziliminde restriksiyon endonükleazı kesim bölgeleri 'NEBcutter V2.0' programı kullanılarak tarandı. Hedef dizide kesim yapabilen RE arasından 3.5.5.1'de belirtildiği gibi seçim yapıldı. Birden fazla hedef bölgede kesim yapabilecek enzimler arasından ve kesim ürünleri jelde gözlenebilecek boyutta olan iki enzim; *Fok I* ve *Cla I* *aktin* geninin çoğaltım ürünlerinin kesiminde kullanılmak üzere seçildi.

4.2.3.12. Aktin genine ait çoğaltım ürünlerinin *Fok I* ve *Cla I* restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi

Fok I RE, *aktin* genine ait 1209 bç boyutundaki çoğaltım ürünlerini etkin olarak kesemediği için bu enzim çalışma kapsamı dışında bırakıldı. Çoğaltım ürünleri *Cla I* RE ile kesildiğinde ise 275 ve 934 bç boyutundaki beklenen DNA parçaları elde edildi. Bu parçalar nusiv agaroz jel elektroforezi ile ayrıldı. *Cla I* enzimi ile muamele edilen 24 izolatın çoğaltım ürünlerinden monomorfik kesim profilleri elde edildi (Şekil 4.14). Sonuç olarak bu izolatların *aktin* genlerinin enzim kesim bölgesinde polimorfizm belirlenmedi.



Şekil 4.13: Özgün Act I/G primer çifti kullanılarak *F. graminearum* izolatlarında çoğaltılan ve agaroz jelde gözlenen 1209 bç boyutundaki DNA fragmenti, M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.



Şekil 4.14: Aktin genine ait çoğaltım ürünlerinin *Cla* I restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi sonucunda oluşan 275 ve 934bç boyutundaki kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile gösterilmesi, M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.

4.2.3.13. Hipotetik proteini kodlayan *FG08859.1* geninin PZR ile çoğaltılması

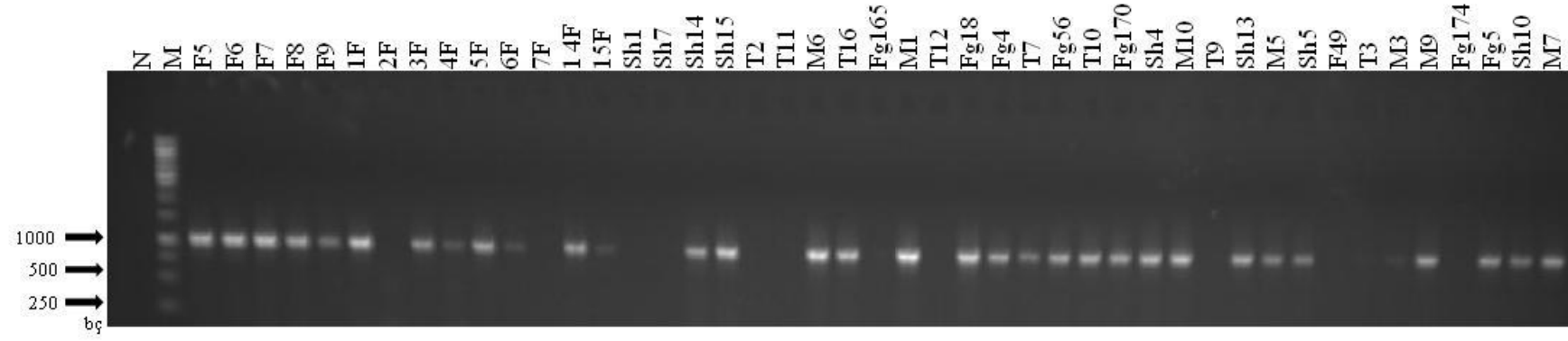
Hipotetik proteini kodlayan *FG08859.1* geninin (XM_389035.1) intronsuz ekzon bölgesinin PZR ile çoğaltımında Tablo 3.5'te dizilim bilgisi verilen Hip ileri/geri primer çifti kullanıldı. 2F, 7F, Sh1, Sh7, T2, T11, Fg165, T12, T9, F49, T3, M3 ve Fg174 izolatlarında bu genin çoğaltımı sağlanamadı. 4F, 6F, 15F ve T7 izolatlarında etkin kesim için yeterli düzeyde amplikon elde edilemedi. F9, 3F, Fg4, Sh13, M5, Sh5 ve M7 izolatlarında ise etkin kesim reaksiyonu için yeterli ürün eldesi sağlanamadı. 24 izolat restriksiyon polimorfizmi analizi için kullanılmadı. Geri kalan 21 izolatta beklenen 1030 bç boyutundaki çoğaltım ürünü elde edildi. Şekil 4.15 agaroz jel elektroforezi sonucunu göstermektedir.

4.2.3.14. Restriksiyon endonükleazlarının seçilmesi

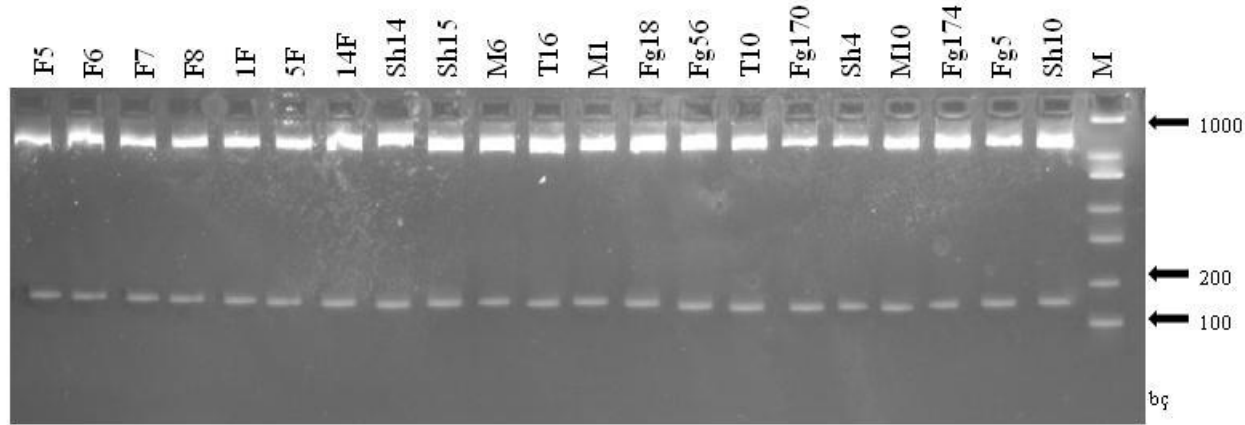
Çoğaltımı hedeflenen bölgenin FASTA formatındaki dizisi 'NEBcutter V2.0' programında RE kesim bölgeleri bakımından tarandı. Hedef bölgede kesim yapabilen restriksiyon endonükleazları belirlendi. RE seçimi için 3.5.5.1'de anlatılan yol izlenerek her bir enzim için kesim sonucu oluşan DNA parçalarının olası boyutları kontrol edildi. Birden fazla hedef kesim bölgesi içeren ve kesim ürünleri jelde gözlenebilecek boyutta olan iki enzim; *Ava II* ve *Rsa I* endonükleazları kesimde kullanılmak üzere seçildi.

4.2.3.15. Hipotetik proteini kodlayan gene ait çoğaltım ürünlerinin *Ava II* ve *Rsa I* restriksiyon endonükleazları ile kesilmesi

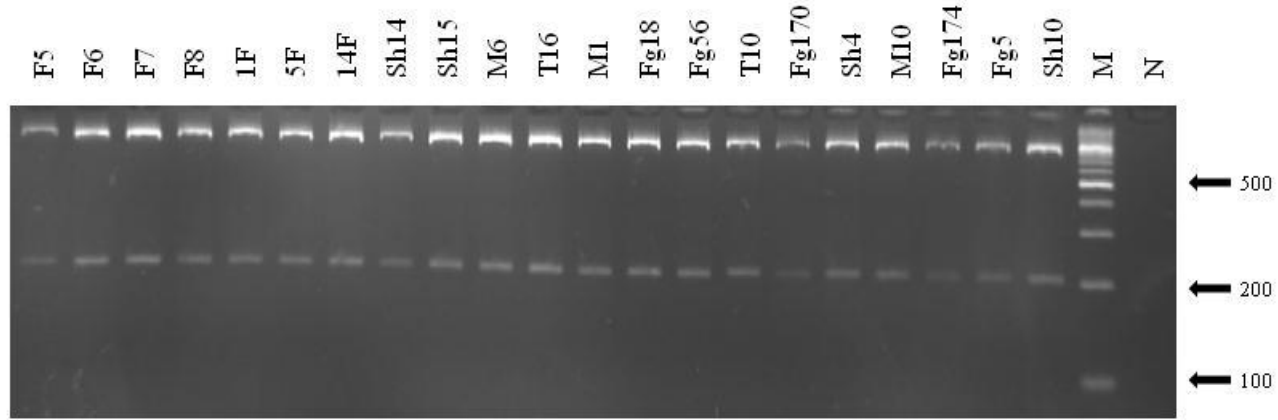
FG08859.1 genine ait 1030 bç boyutundaki çoğaltım ürünleri *Ava II* ve *Rsa I* restriksiyon endonükleazları kullanılarak kesildi. *Ava II* RE kesimi sonucunda 142 ve 888 bç boyutundaki kesim ürünleri nusiv agaroz jel elektroforezi ile gösterildi. 20 izolat benzer kesim profili gösterirken, Sh14 izolatının polimorfik kesim profiline sahip olduğu belirlendi. (Şekil 4.16). *Rsa I* RE ile elde edilen 204 ve 826 bç boyutundaki DNA parçaları nusiv agaroz jel elektroforezi ile ayrıldı 21 izolatta da benzer kesim profili elde edildi (Şekil 4.17).



Şekil 4.15: Özgün Hip I/G primer çifti kullanılarak *F. graminearum* izolarında çoğaltılan ve agaroz jelde gözlenen 1030 bp boyutundaki DNA fragmenti, M: 1 kb ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.



Şekil 4.16: Hipotetik proteini kodlayan gene ait çoğaltım ürünlerinin *Ava* II restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi sonucunda oluşan 142 ve 888 bp boyutundaki kesim ürünlerinin nusiv agaroz jel elektroforezi ile gösterilmesi, M: 100 bp ağırlığındaki standart DNA.



Şekil 4.17: Hipotetik proteini kodlayan gene ait çoğaltım ürünlerinin *Rsa* I restriksiyon endonükleazı ile kesilmesi sonucunda oluşan 204 ve 826 bp boyutundaki kesim ürünlerinin nusiv agaroz jel elektroforezi ile gösterilmesi, M: 100 bp ağırlığındaki standart DNA, N: Kalıp DNA içermeyen negatif kontrol.

4.2.3.16. Dizi ve Dizi Bilgilerinin Analizi

CAPS moleküler markır yöntemi ile 45 izolatta çeşitliliğin araştırıldığı tez çalışması kapsamında *Histon 3* ve *Aktin* genlerinde polimorfizm belirlenmediği için bu iki gen bölgesine ait çoğaltım ve kesim ürünlerinde dizileme işlemi gerçekleştirilmedi. Restriksiyon polimorfizminin belirlendiği F5 ve F7 izolatlarında ribozomal protein geni (*Fg1010.1*), Sh15 izolatında D3G3 markırı ve Sh14 izolatında hipotetik proteini şifreleyen gene ait nukleotid dizilim bilgileri Refgen A.Ş. tarafından çift yönlü dizileme hizmeti ile elde edildi.

Ribozomal proteini şifreleyen *Fg1010.1* geni farklı restriksiyon endonükleazı kesim örneği gösteren F5 ve F7 izolatından çoğaltıldığında elde edilen dizilim bilgisi Şekil 4.18'de verilmektedir. *F.graminearum* PH-1 referans genomundaki gen bölgesi ile F5'e ait bölgenin % 98, F7 ile de % 96 homolojiye sahip olduğu belirlendi. Her iki izolata ait nukleotid dizilimlerinde enzim kesimi için tasarlanan bölgede değişim olmadığı görüldü. *Fg1010.1* geninin F5 izolatında, F7 ve referans genomdan farklı olarak 203. pozisyonda SNP taşıdığı, C bazının T'e dönüştüğü yani transizyon tipte değişimin olduğu belirlendi. *Fg1010.1* geninin F7 izolatında ise F5 ve referans genomdan farklı olarak 725. pozisyonda SNP taşıdığı, C bazının G'e dönüştüğü yani transversiyon tipte değişimin olduğu belirlendi. Ayrıca *F.graminearum* F5 izolatında tek baz delesyonu F7 izolatında da iki baz delesyonu saptandı.

FgPh1	CCCAGGCCAAGAACAAGTACAACGCCCCCAAGTACCGCCTGGTTGTCGCTTACCAACA
FgF5	CCCAGGCCAAGAACAAGTACAACGCCCCCAAGTACCGCCTGGTTGTCGCTTACCAACA
FgF7	CCCAGGCCAAGAACAAGTACAACGCCCCCAAGTACCGCCTGGTTGTCGCTTACCAACA

FgPh1	AGGACATCATCTGCCAGATCGTCACCTCTGAGATCTCCGGTGACAAGGTCTTATCTCCG
FgF5	AGGACATCATCTGCCAGATCGTCACCTCTGAGATCTCCGGTGACAAGGTCTTATCTCCG
FgF7	AGGACATCATCTGCCAGATCGTCACCTCTGAGATCTCCGGTGACAAGGTCTTATCTCCG

FgPh1	CCTACGCTCACGAGCTCAAGGCTTACGGTATCGAGCACGGTCTCACCAACTGGGCCGCTG
FgF5	CCTACGCTCACGAGCTCAAGGCTTACGGTATCGAGCACGGTCTCACCAACTGGGCCGCTG
FgF7	CCTACGCTCACGAGCTCAAGGCTTACGGTATCGAGCACGGTCTCACCAACTGGGCCGCTG

FgPh1	CTTACGCTACCGGTCTTCTCGTGCCTCGCCCGCTGCCCTCAAGAAGCTCGGCCTCGACGAGG
FgF5	CTTACGCTACCGGTCTTCTCGTGCCTCGCCCGCTGCCCTCAAGAAGCTCGGCCTCGACGAGG
FgF7	CTTACGCTACCGGTCTTCTCGTGCCTCGCCCGCTGCCCTCAAGAAGCTCGGCCTCGACGAGG

FgPh1	ACTTCGCCGTGTTGAGGAGGCCGATGGTGAAGTACAAGCTACCGAGGCCGCCGAGACCCG
FgF5	ACTTCGCCGTGTTGAGGAGGCCGATGGTGAAGTACAAGCTACCGAGGCCGCCGAGACCCG
FgF7	ACTTCGCCGTGTTGAGGAGGCCGATGGTGAAGTACAAGCTACCGAGGCCGCCGAGACCCG

FgPh1	ACGATGGTGAGCGCCGCCCTTCAAGGTCTTCTTGTGATGTTGGTCTGAAGCGAACCTCCA
FgF5	ACGATGGTGAGCGCCGCCCTTCAAGGTCTTCTTGTGATGTTGGTCTGAAGCGAACCTCCA
FgF7	ACGATGGTGAGCGCCGCCCTTCAAGGTCTTCTTGTGATGTTGGTCTGAAGCGAACCTCCA

FgPh1	CCGGTGCCCGTGTCTTTGGTGCCATGAAGGGTGCCTCTGACGGTGGTATCCTCGTCCCC
FgF5	CCGGTGCCCGTGTCTTTGGTGCCATGAAGGGTGCCTCTGACGGTGGTATCCTCGTCCCC
FgF7	CCGGTGCCCGTGTCTTTGGTGCCATGAAGGGTGCCTCTGACGGTGGTATCCTCGTCCCC

FgPh1	ACTCCGAGAAGCGATTCCCGGTTACGACATGGAGACCAAGGAGCTCGACGCCGACACCC
FgF5	ACTCCGAGAAGCGATTCCCGGTTACGACATGGAGACCAAGGAGCTCGACGCCGACACCC
FgF7	ACTCCGAGAAGCGATTCCCGGTTACGACATGGAGACCAAGGAGCTCGACGCCGACACCC

FgPh1	TCCGAAACTACATCTTCGGTGGTCACGTCGCTGAGTACATGGAGACCCCTCGCCGATGAGC
FgF5	TCCGAAACTACATCTTCGGTGGTCACGTCGCTGAGTACATGGAGACCCCTCGCCGATGAGC
FgF7	TCCGAAACTACATCTTCGGTGGTCACGTCGCTGAGTACATGGAGACCCCTCGCCGATGAGC

FgPh1	ATGAGGAGCGTTTCCGTAGTCAGTCCAGAAGTACGTCGACGACGACGTTGAGGCTGAGG
FgF5	ATGAGGAGCGTTTCCGTAGTCAGTCCAGAAGTACGTCGACGACGACGTTGAGGCTGAGG
FgF7	ATGAGGAGCGTTTCCGTAGTCAGTCCAGAAGTACGTCGACGACGACGTTGAGGCTGAGG

FgPh1	GTCTTGAGGACCTTACACCGAGGCCACGCCCATCCGTGAGGACCCCTCAAGAAGG
FgF5	GTCTTGAGGACCTTACACCGAGGCCACGCCCATCCGTGAGGACCCCTCAAGAAGG
FgF7	GTCTTGAGGACCTTACACCGAGGCCACGCCCATCCGTGAGGACCCCTCAAGAAGG

FgPh1	TTGAGAGTGACGCTCCCAAGAAGACCAAGGAGGAGTGAAGGAGATCTCCCAAGATACA
FgF5	TTGAGAGTGACGCTCCCAAGAAGACCAAGGAGGAGTGAAGGAGATCTCCCAAGATACA
FgF7	TTGAGAGTGACGCTCCCAAGAAGACCAAGGAGTGAAGGAGATCTCCCAAGATACA

FgPh1	AGAGCAAG
FgF5	AGAGCAAG
FgF7	AGAGGAAG
	**** *

Şekil 4.18: Clustal W yazılımı ile F5 ve F7 izolatlarına ait *FG1010.1* geninin *F.graminearum* PH-1 referans genomu dizisi ile karşılaştırılması. * identik nukleotidleri, - delesyonlu bazları, ↓ SNP'leri göstermektedir. RE kesim bölgesi kutu içine alınmıştır.

D3G3 markırına ait nukleotid dizisi farklı restriksiyon endonükleazı kesim örneği gösteren Sh15 izolatından çoğaltıldığında elde edilen dizilim bilgisi Şekil 4.19'da referans genomla birlikte verilmektedir. *F.graminearum* PH-1 referans genomundaki gen bölgesi ile Sh15'e ait bölgenin % 98 homolojiye sahip olduğu belirlendi. Sh15 izolatına ait nukleotid diziliminde enzim kesimi için tasarlanan bölgede değişim olmadığı görüldü. D3G3 markırınının Sh15 izolatında referans genomdan farklı olarak 162. pozisyonda SNP taşıdığı, C bazının T'e dönüştüğü yani transisyon tipte değişimin

olduğu belirlendi. Ayrıca enzim kesim bölgesinin 26 nukleotid yukarı bölgesinde ‘‘GCGGGG’’ bazlarından oluşan altı nukleotidlik delesyon bölgesi belirlendi. Hipotetik proteinle ilişkili olan bu bölgeden sentezlenen polipeptidde orijinal polipeptidden farklı olarak arada iki amino asidin değişebileceği belirlendi.

FgPh1	AGACGACTTTACGATATTTGCGACGGTTCGAGCGGGCGAGAATGTGCGATTTGACGGCTTC
FgSh15	AGACGACTTTACGATATTTGCGACGGTTCGAGCGGGCGAGAATGTGCGATTTGACGGCTTC *****
FgPh1	GTTACCAAACCTGGCGCTTCTTCCTCCCCTGACTAGAAATATGTTAGCGAGTTGAATCGAC
FgSh15	GTTACCAAACCTGGCGCTTCTTCCTCCCCTGACTAGAAATATGTTAGCGAGTTGAATCGAC *****
FgPh1	GGTGAGGGTTGGGGTGAGGATAAACGCCTCTCGGACGACGATAAAAAGGACGGCCTTGCT
FgSh15	GGTGAGGGTTGGGGTGAGGATAAACGCCTCTCGGACGACGATAAAAAGGACGGCCTTGCT *****
FgPh1	CATCCTTCATCACC GCCGCTGT CATTGTTAGCTGGGAACCACCATCATGGCAAGTCGTCG
FgSh15	CATCCTTCATCACC GCCGCTGT CATTGTTAGCTGGGAACCACCATCATGGCAAGTCGTCG *****
FgPh1	TAAATACCGTTGGACATGTCCAAATCTGTCCCCTCGTTAGCTACCCCTCGCCCCTCGTTG
FgSh15	TAAATACCGTTGGACATGTCCAAATCTGTCCCCTCGTTAGCTACCCCTCGCCCCTCGTTG *****
FgPh1	ACAAAAGTGTGCAGGACTCACTCATGCCATCCATATTGACTATATCCGTTCCACCCGTGG
FgSh15	ACAAAAGTGTGCAGGACTCACTCATGCCATCCATATTGACTATATCCGTTCCACCCGTGG *****
FgPh1	GGAGCTGTATCCGTAAGAGTTATGGCGTTTACGGTGGTATCGAAAAGTCCCCTCGAAAAGT
FgSh15	GGAGCTGTATCCGTAAGAGTTATGGCGTTTACGGTGGTATCGAAAAGTCCCCTCGAAAAGT *****
FgPh1	TGGTGGTCGTCAGGAGCTTGATCGTTTTCGTGATCGATCCAATGCTAATCCTCCCACCT
FgSh15	TGGTGGTCGTCAGGAGCTTGATCGTTTTCGTGATCGATCCAATGCTAATCCTCCCACCT *****
FgPh1	TTACCAATTTTTTGAAGATTTGGGTGCCTTGCACACCGATTCCGGGGCGGGGCGGGGCGG
FgSh15	TTACCAATTTTTTGAAGATTTGGGTGCCTTGCACACCGATTCCGGGGCGGGGCGGGGCGG *****
FgPh1	GGAAACGAGATAGTCCGGGAATTCAGGGGCCTGCCTGGAGGTTTGGGCTATCGACCCCGC
FgSh15	GGAAACGAGATAGTCCGGGAATTCAGGGGCCTGCCTGGAGGTTTGGGCTATCGACCCCGC *****
FgPh1	TAGACCTCAGCGCCTCAGGTCAGGCTGGCATTGAGTCTGTGACT
FgSh15	TAGACCTCAGCGCCTCAGGTCAGGCTGGCATTGAGTCTGTGACT *****

Şekil 4.19: Clustal W yazılımı ile Sh15 izolatına ait *D3G3* markırının *F.graminearum* PH-1 referans genomu dizisi ile karşılaştırılması. * identik nukleotidleri, - delesyonlu bazları, ↓ SNP’leri göstermektedir. RE kesim bölgesi kutu içine alınmıştır.

FG08859.1 geninde restriksiyon polimorfizmi taşıyan Sh14 izolatının nukleotid dizilimi referans genomla karşılaştırıldığında iki izolat arasındaki benzerliğin % 99 olduğu görüldü (Şekil 4.20). CAPS analizi için RE kesimi sonucu beklenen iki fragmentten (142 ve 888 bp) birinin bu izolatta farklı boyutta temsil edildiği (900 bp) gözlemlendi. Ancak RE kesim bölgelerinde farklılık saptanmadı. Dizilim bilgisi tarandığında genin

35. pozisyonundan itibaren üç adenin nükleotidinin (AAA) belli aralıklarla tekrarlı olarak taşındığı gözlemlendi. Bu gen için de 273. pozisyonda bir adet SNP'nin varolduğu, G bazının A'ye dönüştüğü (transizyon tipi değişim) belirlendi. Bu değişimin de sadece tek bir amino asidi etkileyebileceği gözlemlendi.

FgPh1	GAGGACACAGTATCGCTACTTCTTCAACTAGGGGTAAAGACAGAAGTCAAGGATGGCGTT
FgSh14	GAGGACACAGTATCGCTACTTCTTCAACTAGGGGTAAAGACAGAAGTCAAGGATGGCGTT *****
FgPh1	GGTAGA GGACC ACTCTGGACTGCAACGGCGAACCGACACATCAATATTGTTAAGCTCCTG
FgSh14	GGTAGA GGACC ACTCTGGACTGCAACGGCGAACCGACACATCAATATTGTTAAGCTCCTG *****
FgPh1	GTTGATTACGGAGCCAATATAGAGGGCGCTGACCACTTCGGCGTCACTCCTCTGATGGTC
FgSh14	GTTGATTACGGAGCCAATATAGAGGGCGCTGACCACTTCGGCGTCACTCCTCTGATGGTC *****
FgPh1	GCTGTGAGGAATGGTGATAGGAACTAACAGAGTTCTTCCTTGAAAAGGGGTGCGAGATG
FgSh14	GCTGTGAGGAATGGTGATAGGAACTAACAGAGTTCTTCCTTGAAAAGGGGTGCGAGATG *****
FgPh1	AGACCAGAGTCGGAGCAAACTACGCGCCGTT ↓ GCTGTGCAGCTGCTAATGGCGACGAA
FgSh14	AGACCAGAGTCGGAGCAAACTACGCGCCGTTATGCTGTGCAGCTGCTAATGGCGACGAA *****
FgPh1	GGTATCGTGAATTTACTCCTTGATCAGGAGCAGACGTCAACTATTTCTCGGATGAAAAG
FgSh14	GGTATCGTGAATTTACTCCTTGATCAGGAGCAGACGTCAACTATTTCTCGGATGAAAAG *****
FgPh1	CGCACTGCACTGCATATTGCAACAATTCGAGGAAATCTCATGGTTATGAAGATGCTAATT
FgSh14	CGCACTGCACTGCATATTGCAACAATTCGAGGAAATCTCATGGTTATGAAGATGCTAATT *****
FgPh1	GAGGCTGGTGCCAACGTTGACTTGAGGGACGGTGATGGTAGAACTGCATTATCATTGGCC
FgSh14	GAGGCTGGTGCCAACGTTGACTTGAGGGACGGTGATGGTAGAACTGCATTATCATTGGCC *****
FgPh1	AAGGAAGTTCTCAGCAGCATCCATGAGATTACTATGCCGAGCTAGCAGCCTTCGGCGG
FgSh14	AAGGAAGTTCTCAGCAGCATCCATGAGATTACTATGCCGAGCTAGCAGCCTTCGGCGG *****
FgPh1	GAAAGTCATGCCAACAGAGAAAGGCTGATGAGGTGGATTCGACAAGAAAGGCTCGTAT
FgSh14	GAAAGTCATGCCAACAGAGAAAGGCTGATGAGGTGGATTCGACAAGAAAGGCTCGTAT *****
FgPh1	CATTACCGGCCCTGATGATGAAAACTCCACCCGCATCATCGAGTTATATCCAGGTGTC
FgSh14	CATTACCGGCCCTGATGATGAAAACTCCACCCGCATCATCGAGTTATATCCAGGTGTC *****
FgPh1	CCTGGGGACATATTGGAGTTGAACTGGAAGAAGTTCTCTTTTTTCTGCAACTCCATTT
FgSh14	CCTGGGGACATATTGGAGTTGAACTGGAAGAAGTTCTCTTTTTTCTGCAACTCCATTT *****
FgPh1	GAAGCCCTTTCTTACGAGTGGCAAGAAAGGTACGGGACGATACCAGTTCAATGCGACGGC
FgSh14	GAAGCCCTTTCTTACGAGTGGCAAGAAAGGTACGGGACGATACCAGTTCAATGCGACGGC *****
FgPh1	CAAAAGATCTTCATCACTCCCAACTGCAAAGCAGCCATGGAAAAGCTTCGACTACGAGAC
FgSh14	CAAAAGATCTTCATCACTCCCAACTGCAAAGCAGCCATGGAAAAGCTTCGACTACGAGAC *****
FgPh1	AAGTCAAGATATTTGTGGATAGATGCTATATGCATCAACCAGACCAACGAACAGGAACGA
FgSh14	AAGTCAAGATATTTGTGGATAGATGCTATATGCATCAACCAGACCAACGAACAGGAACGA *****
FgPh1	AATCAGCAAGTTGC
FgSh14	AATCAGCAAGTTGC *****

Şekil 4.20: Clustal W yazılımı ile Sh14 izolatına ait *FG08855.1* geninin *F.graminearum* PH-1 referans genomu dizisi ile karşılaştırılması. * identik nükleotidleri, - delesyonlu bazları, ↓ SNP'leri göstermektedir. RE kesim bölgesi kutu içine alınmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Fusarium graminearum genom projesi tamamlanmış bir bitki patojenidir. *Fusarium graminearum*'un PH-1 ve H11 ırklarının genomundan elde edilen veriler tek nukleotid polimorfizm (SNP) yoğunluklarının çeşitlilik gösterdiğini, tekrarlı ve duplikasyonlu bölgelerde meydana gelen nokta mutasyonlarının tekrar ve duplikasyon sayısını sınırladığını, türe özgü genlerin çoğunluğunun telomer bölgelerinde konumlandığını ve telomerde bulunan bu genlerin bazılarının sadece bitki infeksiyonu sürecinde anlatım yaptığını göstermiştir. Bu durum *F. graminearum*'u hifli mantarlar arasında ilgi odağı haline getirmiştir (Cuomo ve diğ., 2007). *Fusarium graminearum* morfolojik olarak ayırt edilmesi oldukça güç olan tür içi çeşitliliği yüksek bir mantardır. Morfolojik özellikleri yanıltıcı sonuçlara neden olabildiğinden, günümüzde, *Fusarium* izolatlarının tanısında moleküler yöntemler etkin biçimde kullanılmaktadır (Schilling ve diğ., 1996; Carter ve diğ., 2000). Fungal organizmaların geleneksel yöntemlerle belirlenmesi ve tanımlanması; izolasyon, kültürlenme ve ardından morfolojik karakterler ile birlikte kültür koşullarındaki karakteristik özelliklerin (renk, konidyum boyutu ve yapısı, konidyofor yapısı vs.) incelenmesine dayanmaktadır. Bu yöntemler zahmetli ve zaman alıcıdır (Wu ve diğ., 2002). Polimeraz zincir reaksiyonu tekniğinin geliştirilmesiyle birlikte organizmalara ait nükleik asit molekülleri (DNA ve RNA) kullanılarak tanı çalışmaları daha özgün ve kesin bir biçimde gerçekleştirilmiştir (Demeke ve diğ., 2005). Günümüzde DNA parmakizi veya dizileme uygulamaları ile fungal patojenlerin genom profili tayin edilmekte, elde edilen nükleik asit dizilerine göre tanımlanmış bölgeler hedef olarak kullanılarak organizmalar tanımlanmaktadır (Koncz ve diğ., 2008). Farklı coğrafik bölgelerden elde edilen *F. graminearum* izolatları evrensel SCAR markırları taranarak tür düzeyinde güvenilir ve doğru bir şekilde tanımlanmıştır (Nayaka ve diğ., 2011).

Bu tez çalışmasında FBY etmeni olan *F. graminearum* izolatlarının tür düzeyinde tanısı polimorfik RAPD markırlarının seçimine dayalı olarak geliştirilen SCAR markırları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 45 *F. graminearum* izolatının moleküler tanısı UBC85

primer çifti kullanılarak PZR ile 332 bç boyutundaki DNA markırının çoğaltılmasıyla tür düzeyinde doğrulanmıştır.

Farklı kültür koşullarının *F. graminearum*'a ait izolatların fenotipik özelliklerini (pigmentasyon, koloni morfolojisi ve sporulasyon gibi) değiştirebildiği bildirilmiştir (Miedaner ve diğ., 2001; Miedaner ve diğ., 2004). Yurdumuzun farklı yörelerinden (Sakarya, Marmara, Bilecik, Konya, Sinop ve Uşak) izole edilen *F. graminearum* izolatlarında aynı kültürlenme koşullarında bile farklı renkte (sarı, beyaz ve kahverengi) gelişen miselyum yapıları tür içindeki çeşitliliği yansıtması bakımından önemli bir bulgudur. İran'ın farklı coğrafik bölgelerinden (Mazandran, Gorgan, Moghon) izole edilen izolatların ise aynı kültürlenme koşullarında, yurdumuzdan izole edilen izolatlara göre farklı renkte (sarı, pembe ve kahverengi) miselyuma sahip oldukları, bu türün farklı coğrafik bölgelerdeki bireylerinin yüksek düzeyde çeşitliliği barındırabileceği görülmüştür.

Son yıllarda fungal patojenlerin tanımlanmasında ya da tür içi ve/veya türler arası ilişkilerin belirlenmesinde çok sayıda moleküler markır yöntemi kullanılmaktadır (Lin ve diğ., 2009; Dubey ve diğ., 2010; Dinolfo ve diğ., 2010; Nayaka ve diğ., 2011). İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde gerçekleştirilen çalışmalarda ERIC (ing. enterobacterial repetitive intergenic consensus), REP (ing. repetitive extragenic palindromic) ve BOX PZR yöntemleri kullanılarak yurdumuzda hastalığa yol açan *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatları genetik düzeyde tanımlanmıştır (Gürel ve diğ., 2010). Ayrıca bu iki türün izolatlarının tür içi ve türler arası çeşitliliği RAPD temelli olarak araştırılmış, aynı izolatlardan elde edilen RAPD markırlarının SCAR markır olarak kullanılma potansiyelleri taranmıştır (Yörük, 2009). Bununla birlikte Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilen *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarında PZR temelli kemotiplendirme çalışmaları da gerçekleştirilmiştir (Yörük ve Albayrak, 2011). Hala ISSR markırları kullanılarak yurdumuz kaynaklı izolatlar, İran kaynaklı olanlarla birlikte tanımlanmakta ve aralarındaki genetik çeşitlilik araştırılmaktadır (Yörük ve diğ., 2011). Ayrıca bu izolatlar mikrosatellit markır çeşitliliği bakımından taranarak tür içi ve türler arası polimorfizm araştırmaları da yürütülmektedir (Candar, 2011).

CAPS, genetik polimorfizmin belirlenmesinde güvenilir ve uygulanması kolay bir moleküler markır yöntemi olarak bildirilmektedir. CAPS yönteminde özgün genlerin belli bölgeleri PZR ile çoğaltıldıktan sonra restriksiyon endonükleazları ile kesilerek polimorfik parçaların eldesi amaçlanır. Kullanılacak primerler çoğunlukla genlerin ekzon bölgelerine göre tasarlanır. PZR'nun farklı türler arasında kararlı olarak taşınan bölgelerin analizini sağlaması ve yüksek doğrulukta gerçekleşmesi CAPS yönteminin önemli aşamalarından biri olarak bildirilmiştir. Bu nedenle CAPS yönteminde primer tasarımı genomik DNA dizileri ve/veya EST dizileri baz alınarak gerçekleştirilir (Kunihisa ve diğ., 2003, 2005).

Organizmalar arasındaki çeşitliliği belirlemeye yönelik olan moleküler markırlar genellikle genomda kodlama yapmayan bölgelerin taranması sonucu elde edilmektedir. Polimorfizm analizlerinde daha çok kodlama yapmayan bu bölgelerin PZR ile çoğaltımı hedeflenir. CAPS yönteminde ise genomda çoğaltımı hedeflenen bölge iki yaklaşıma göre seçilmektedir. Hedeflenen bölgelerin içinin çoğaltımının hedeflendiği ve EST kitaplıklarından, cDNA klonlarından seçilen dizilerden oluşabilir. EST dizileri, bilinen anlatımı yapılan bir genin küçük bir kısmını temsil etmektedir. İlgili genler cDNA kütüphanelerinden elde edilir ve dolayısıyla protein kodlama bölgelerine ait DNA kısımlarını taşır. Diğer yaklaşımda ise daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen, kararlı olarak çoğaltılmış, bir karakter, fenotip veya bir protein ile ilişkilendirilmiş RAPD, RFLP ve AFLP gibi moleküler markır dizilerinden seçilebilir (Tanaka ve diğ., 2010). EST bölgelerinin hedeflendiği bir çalışmada CAPS markırlarının geliştirildiği bildirilmiştir (Suga ve diğ., 2008). Bu çalışmada ise çoğaltımı hedeflenen genler EST dizileri baz alınarak seçilmiştir. Ayrıca, daha önce RAPD analizi ile türün taşıdığı belirlenen ve hipotetik protein ile ilişkili olduğu gösterilen özgün bir moleküler markır dizisi de çalışmaya dahil edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, Ülkemizin ve İran'ın çeşitli bölgelerinde hastalık oluşturmuş 45 *F. graminearum* izolatının CAPS yöntemi kullanılarak genotiplendirmesi amaçlanmıştır. Tür düzeyinde doğrulanan izolatlarda çeşitlilik evrim süresince korunmuş olan ve temel hücrel mekanizmalarda görevli histon3 (H3) aktin (act), 60S ribozomal proteini kodlayan gen ile hipotetik protein geni ve hipotetik protein ile ilişkili olduğu belirlenmiş D3G3 RAPD markırında (JN638063.1) araştırılmıştır. Restriksiyon polimorfizminin

belirlenmesinde *Ava II*, *Tfi I*, *Rsa I*, *Cla I*, *Eco RI*, *Hae III* ve *Fok I* RE kullanılarak kesim bölgesinde tek nükleotid polimorfizmlerinin varlığı taranmıştır. Ayrıca çoğaltımı gerçekleştirilen dizilim içindeki SNP'lerin varlığı da gösterilmiştir. SNP'ler bu şekilde CAPS moleküler markır yöntemi ile taranarak tür içindeki polimorfizm gösterilmiştir.

Organizma genomlarında SNP'ler yoğun olarak bulunduğu için yaygın polimorfik markırları temsil etmekte ve haritalama, markır aracılı seleksiyon ve klonlama gibi alanlara kullanışlı veriler sağlamaktadırlar (Gupta ve diğ., 2001; Rafalski, 2002; Batley ve diğ., 2003).

Histon genleri kromatin organizasyonunda görev alan, küçük molekül ağırlıklı arginin, lizin gibi bazik amino asitleri içermeleri sebebiyle bazik özellikteki proteinleri kodlar. Bu özellikleri nedeniyle asit özellikteki DNA molekülüne sıkı şekilde bağlanırlar. Histonlar evrim süresince en fazla korunmuş proteinler arasında yer alırlar. İçerdikleri bazik amino asit çeşitlerinin oranına göre H1, H2A, H2B, H3 ve H4 olmak üzere 5 gruba ayrılırlar. H1 lizince zengin bir gruptur, lizin oranı özellikle C-ucuna yakın bölgede çok yüksektir. Histonlar arasında türlere ve dokulara göre en fazla değişkenlik gösteren grup H1'dir. H2A ve H2B grupları da lizin bakımından oldukça zengindir. Bu gruptaki proteinlerin genellikle N-uçlarındaki bölgeler değişken olmakla birlikte C-uçları iyi korunmuştur. H3 ve H4 ise arginince zengindir ve bunlar evrimde en iyi korunmuş histonlardır. Birbiriyle uzak ilişkili olan farklı bitki ve hayvan türlerinde bile benzer amino asit dizilerini taşırlar. Histon proteinleri kromozomlar içindeki DNA molekülünün paketlenmesi için gereklidir. Histon proteinlerinin sentezi ve DNA replikasyonu denge içerisinde olmalıdır. Bu iki mekanizma arasında meydana gelen dengesizlik gen anlatımını önemli ölçüde etkilemektedir (Alexander ve diğ., 2012).

CAPS markır analizi kapsamında histon 3 geni çoğaltıldığında 6 izolatta primer bağlanma bölgelerinde meydana gelen olası mutasyon nedeniyle çoğaltım ürünü elde edilememiştir. Tasarlanan primerlerden ileri primer gen diziliminde intron bölge içerisine gelecek şekilde tasarlanmıştır. İntronda meydana gelen değişimler, bu nükleotid dizileri alternatif kırılma örneğinin elemanı olmadığında polipeptidde yer almamakta, bu şekilde de nesiller boyu aktarılmaktadırlar. Bu nedenle 6 izolatta intronda taşınan mutasyonların primer bağlanma bölgelerinde meydana getirdiği değişim nedeniyle PZR aracılı çoğaltımın gerçekleşmediği düşünülmektedir. 5 izolatta

ise primer molekülünün hedef dizide birden fazla bölgeye bağlanmasından dolayı özgün olmayan bölgeler elde edilmiştir. *Fusarium graminearum* tür içi polimorfizmi oldukça yüksek olan bir mantar türü olarak bildirilmiştir (Miedaner ve diğ., 2001; Saharan ve diğ., 2007; Walker ve diğ., 2001; Parry ve diğ., 1995). Bu sonuç genomlarında olası mutasyon oranının fazla olduğunu göstermektedir.

Toplamda 50 *F. graminearum* ve *F. asiaticum* izolatları ile yapılan CAPS markır analizinde histon 3 genine ait EST bölgesinin PZR ile çoğaltılması ve ardından *Sty I* restriksiyon endonükleazı ile kesime bırakılması sonucunda 2 *F. graminearum* izolatında metafor agaroz jel elektroforezi ile polimorfik kesim profili elde edilmiştir (Suga ve diğ., 2008). *Fusarium graminearum*'un PH-1 suşunda yapılan CAPS markır analizi sonucunda histon 3 geninin 3. ekzonunun 41 nükleotidi dışında kalan 3 ekzon ve 2 intron bölgesinin H3 primerleri kullanılarak PZR ile çoğaltılması ve ardından *Ava II* ve *Tfi I* restriksiyon endonükleazı ile kesimi sonucunda izolatlarda benzer kesim profili görülmüştür. Kesim reaksiyonuna tabi tutulan tüm izolatlarda monomorfik kesim profilinin meydana gelmesi PZR'nun yüksek doğrulukta gerçekleştirildiğini ve yüksek oranda korunmuş histon 3 genindeki polimorfizm oranının düşük olduğunu göstermiştir.

Ribozomal proteinler ilgili genler tarafından kodlanır. Bu genlerin kodladığı 50'den fazla ribozomal protein tüm organizmalarda protein sentezinde görev almaktadır. Ribozomal proteinlerin evrim süresince farklı türlere ait organizmalar arasında korunduğu gösterilmiştir (Korobeinikova ve diğ., 2012). Ribozomal proteini kodlayan *Fg10010.1* geninin kodlama yapan intron içermeyen bölgesi PZR ile çoğaltıldığında 4 izolatta primer bağlanma bölgelerinde meydana gelen olası mutasyon nedeniyle ürün elde edilememiştir. 8 izolatta ise etkin çoğaltım sağlanamamıştır. Ribozomal proteini kodlayan *Fg1010.1* genine ait çoğaltım ürünleri *Ava II* RE ile kesildiğinde 24 *F. graminearum* izolatında da benzer kesim profili görülmüştür. *Tfi I* restriksiyon endonükleazı ile kesim sonucunda ise F5 ve F7 izolatlarında gende taşınan SNP'ler nedeniyle nusiv agaroz jel elektroforezinde polimorfik kesim profili elde edilmiştir. Polimorfizm gösteren bu iki izolatın çift yönlü olarak dizilenmesi sonucunda F5 ve F7 izolatında SNP'lerin meydana geldiği gösterilmiştir. F5 izolatında tek baz delesyonu, F7 izolatında ise iki baz delesyonu saptanmıştır. Farklı olarak F5 izolatında nusiv agaroz jelde gözlenen 64 bç boyutundaki kesim ürününün bu izolatın gen bölgesinde meydana

gelen değişimle kazanıldığı düşünölmektedir. F7 izolatında meydana gelen 152 bç boyutundaki kesim ürününün bu izolataın gen bölgesinde meydana gelen değişimle kazanıldığı düşünölmektedir. Bu farklı kesim ürüne ikinci bir kesim noktasının yol açmış olabileceği, dizilim sırası belirlenirken uç bölgelerde meydana gelen kayıp nedeniyle bu kesim noktasının belirlenemediği düşünölmektedir. SNP'lerin *F. graminearum*'da tür içi çeşitliliğine, sonuç olarak da polimorfizme katkı sağlayabildiği görölmektedir. Diğer izolatlarda benzer kesim profilinin elde edilmesi PZR'nun yüksek doğrulukta ve kararlı ve güvenilir şekilde gerçekleştirildiğini göstermiştir. Kesim bölgelerinde meydana gelen insersiyon, delesyon ya da adisyon gibi yeniden düzenleme mekanizmaları RE tanıma bölgelerini değiştirmektedir (Hatsch ve diğ., 2002). Bu izolatlara ait dizilim bilgileri analiz edildiğinde F5 ve F7 izolatlarının genomunda 1 adet SNP'nin meydana geldiği görölmüştür. Ancak bu SNP'nin RE tanıma bölgesinde olmadığı belirlenmiştir. Çift yönlü dizileme sırasında tek ipliklerde SNP oranı daha yüksek gibi görünmekle birlikte yapılan çakıştırma çalışması SNP sayısının güvenilir ve doğru biçimde belirlenmesini sağlamış, SNP sayısının 1'e düştüğü görölmüştür. Çünkü her değişimin SNP olarak kabul edilebilmesi için iki iplikte de değişimin gözlenmesi gerekmektedir.

Aktin, ökaryotik hücrelerde en yaygın bulunan globular proteindir. Total hücre proteininin %20'sini oluşturur. Ökaryotlarda hücre membranının hareketi, hücrenin yer değiştirmesi (endositoz/ ekzositoz), hücre yüzey farklılaşması, mitoz ve insanda iskelet kasının kasılması gibi temel süreç ve hücrenel olaylarda rol alırlar. Maya hücrelerinde tek bir aktin geni ve ürünü bulunmasına rağmen diğer ökaryotik hücreler farklı aktin gen aileleri tarafından kodlanan birkaç farklı tipte aktin proteinine sahiptir. Memelilerde 4 tanesi kas hücrelerinde 2 tanesi diğer hücrelerde olmak üzere en az 6 farklı aktin geni bulunmaktadır. Fakat tüm aktin proteinlerine ait amino asit dizileri birbiriyle yüksek oranda benzerdir. Bu durum da ökaryotlarda bu genlerin evrim süresince yüksek oranda korunduğunu göstermektedir. Maya aktin proteini ile memeli aktin proteinine ait amino asit dizilerinin %90 oranında benzer olduğu da gösterilmiştir (Cooper, 2000). Bu nedenle CAPS yöntemi kapsamında çoğaltımı hedeflenen bölgelerden biri de aktin proteini kodlayan aktin geni olarak seçilmiştir.

CAPS markır analizi kapsamında aktin geninin ekzon bölgesi PZR ile çoğaltıldığında 3 izolatta primer bağlanma bölgelerinde meydana gelen olası mutasyon nedeniyle ürün elde edilemedi. 1 izolatta primer molekülün hedef DNA'da birden fazla bölgeye bağlanabilmesinden dolayı özgün olmayan ürünü elde edilmiştir. 4 izolatta yetersiz ürün elde edilmiştir. *Aktin* genine ait çoğaltım ürünlerinin *Cla* I RE ile kesilmesi sonucunda 24 izolatta benzer kesim profili elde edilmiştir. 13 izolatta etkin kesim reaksiyonu gerçekleştirilememiştir. Kesim yapılan 24 izolatın da benzer profili göstermesi PZR'nun yüksek doğrulukta olduğunu ve aktin geninin oldukça yüksek oranda korunmuş ve polimorfik diziler içermediğini göstermiştir. Seçilen RE ile restriksiyon polimorfizmini ortaya koyacak SNP belirlenememiştir.

D3G3 RAPD markırını *Fusarium* türlerinde SCAR markırlarının araştırılması sırasında geliştirilmiş ve hipotetik protein ile ilişkili olduğu bildirilmiş olan bir RAPD markırıdır (Yörük, 2009). CAPS markır yöntemi kapsamında toplam 14 izolatta D3G3 çoğaltımı primer bağlanma bölgelerinde meydana gelen olası mutasyon nedeniyle sağlanamamıştır. 3 izolatta ise primer molekülünün hedef DNA'da birden fazla bölgeye bağlanması nedeniyle özgün olmayan çoğaltım ürünleri elde edilmiştir. D3G3 çoğaltım bölgesi *Eco* RI restriksiyon endonükleazı ile kesime bırakılmıştır. 4 izolatta etkin kesim reaksiyonu sağlanamamıştır. Kesim reaksiyonuna tabi tutulan 24 izolattan 2'si (7F ve Sh15) polimorfik kesim profili göstermiştir. Dizi analizi sonucunda Sh15 izolatında 1 adet SNP görülmüştür. CAPS analizi sonucunda oluşan polimorfik profillerin enzim tanıma bölgelerinin yeniden oluşması veya yok olması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Komori ve Nitta, 2005). Ancak dizi analizi sonucunda Sh15 izolatında meydana gelen SNP'nin RE tanıma bölgesinde değişiklik meydana getirmediği görülmüştür. Kesim bölgesinin 26 nukleotid yukarı bölgesinde GCGGGG bazlarından oluşan 6 nukleotidlik delesyon bölgesi belirlenmiştir. Bu delesyonun 2 farklı amino asidi değiştirebileceği öngörülmüştür.

Organizmaların genom projeleri tamamlandıkça genomlarında herhangi bir biyokimyasal yolak veya hücresel süreçlerle ilişkili olmayan protein kodlama bölgeleri tanımlanmıştır. Bu proteinler hipotetik proteinler olarak adlandırılmaktadır ve son yıllarda büyük önem kazanmışlardır. Bu proteinlerin üç boyutlu yapıları onların biyokimyasal veya biyolojik fonksiyonları ile ilgili tahmini sonuçlar verse de yetersiz

düzyededir. Bu nedenle bu proteinler ile ilgili yapılan moleküler analizler onların görev aldıkları biyokimyasal yolları ve rollerini anlamamıza katkı sağlamaktadır (Zarembinski ve diğ., 1998). Gen ekspresyon profillerinin küme analizleri bu proteinlerin işlevlerinin tahmin edilmesinde kullanılan en yaygın yaklaşımdır (Sivashankari ve Shanmughavel, 2006). Hipotetik proteinlerin yer aldığı yolların belirlenmesi ilaç geliştirilmesi bakımından da oldukça önemlidir (Gore ve Raut, 2009).

Hipotetik proteine ait ekzon bölgeleri PZR ile çoğaltıldığında 13 izolatta bu genin çoğaltımı primer bağlanma bölgelerinde meydana gelen olası mutasyon nedeniyle sağlanamamıştır. 4 izolatta etkin kesim için yeterli düzeyde amplikon elde edilememiştir. 21 izolat ile gerçekleştirilen restriksiyon endonükleazı kesimi analizi kapsamında *Ava* II kesimi sonucunda 20 izolat benzer profil gösterirken Sh14 izolatu polimorfik kesim profili göstermiştir. Polimorfik kesim profili gösteren Sh14 izolatu dizileme analizine tabi tutulduğunda genomda SNP'lerin meydana geldiği görülmüştür. Ancak iki iplik karşılaştırıldığında SNP sayısı 1'e düşmüştür. Oluşan SNP'lerin restriksiyon tanıma bölgesini değiştirmedeği görülmüştür. *Rsa* I endonükleazı kesimi sonucunda 21 izolatta da benzer kesim profili elde edilmiştir. Monomorfik profil oluşması PZR'nun yüksek doğruluk ve kalitede gerçekleştirildiğini göstermektedir.

CAPS analizinde kullanılan primer moleküllerinin literatürden farklı olarak ilk defa bu tez çalışmasında tasarlanması, çalışmanın özgünlüğünü oluşturmaktadır. Ayrıca CAPS yönteminde ekzon bölgelerinin hedeflenmesi, elde edilen verilerin amino asit dizilerinde meydana gelen değişimin takip edilmesine yardımcı olmuştur. Dizi analizi sonucunda saptanan SNP'lerin amino asit dizilerinde değişikliğe yol açtığı, bu nedenle CAPS yönteminin karakterlerle ilişkilendirilebileceği görülmüştür.

Bir bazın değişimi aynı amino asidi şifreleyen başka bir kodona yol açıyorsa meydana gelen değişim fenotipe yansımaz. Ancak farklı bir amino asidi şifreleyen kodon ile sonuçlanırsa polipeptidde tek bir amino asit değişimi meydana gelir. SNP'lerin en etkili olduğu durum 'dur' kodonlarının meydana gelmesidir. Gerçekleştirilen tez kapsamında dizilim bilgisinin DNA'nın kodlanan ipliğine karşılık geldiği ve üç olası okunma çerçevesinde de SNP'lerin hiçbirinin dur kodonuna yol açmadığı belirlenmiştir. Genomda temsil edilen diğer değişimler delesyon ve insersiyon gibi yeniden düzenleme mekanizmalarıdır. Bu çalışma kapsamında da ribozomal proteini kodlayan

FG1010.1 geninde F5 izolatında tek baz delesyonu F7 izolatında ise iki baz delesyonu meydana gelmiştir. D3G3 markırında ise Sh15 izolatında GCGGGG nukleotidlik delesyon belirlenmiştir. Delesyonun meydana geldiği pozisyondan itibaren geri amino asit dizilimini değiştireceği öngörölmüştür.

KAYNAKLAR

- Agarwal, M., Shrivastava, N., Padh, H., 2008, Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences, *Plant Cell Reports*, 27, 617-631.
- Alexander, M.J., Rattray, Muller B., 2012, The control of histone gene expression, *Biochemical Society Transactions*.
- Aroca, A.; Raposo, R. and Lunello, P., 2008, A biomarker for the identification of four *Phaeoacremonium* species using the beta-tubulin gene as the target sequence. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1131-1140.
- Baayen, R.P., O'Donnell, K., Bonants, P.J., Cigelnik, E., Kroon, L.P.N.M., Roebroek, E.J.A., Waalwijk, C., 2000, Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non-monophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology* 90, 891–900.
- Bai, G., Shaner, G., 2004, Management and resistance in wheat and barley to fusarium head blight, *Annu. rev. phytopathol.*, 42, 135-161.
- Batley, J., Mogg, R., Edwards, D., O'Sullivan H., Edwards, KJ., 2003, A high throughput SNP assay for genotyping SNPs in the flanking regions of *Zea mays* sequence tagged simple sequence repeats, *Mol. Breed.* 11:111–120.
- Berlin K, Gut I.G., 1999, Analysis of negatively “charge tagged” DNA by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13:1739–43.
- Bernardo, A., Bai, G., Guo, P., Xiao, K., Guenzi, A.C., Ayoubi, P., 2007, *Fusarium graminearum*-induced changes in gene expression between *Fusarium* head blight-resistant and susceptible wheat cultivar, *Funct. integr. genomics*, 7, 69-77.
- Beyer, W., Hoxter, H., Miedaner, T., Sander, E., Geiger, H.H., 1993, Indirect ELISA for quantitative assesment of *Fusarium* spp. in rye, *Journal of Plant Diseases and Protection*, 100, 278-284.
- Booth, C., 1977, *Fusarium* laboratory guide to the identification of the major species. *Commonwealth Mycological Institute*, Ferry Lane, Kew Surrey, 58.
- Bosshard, P.P., Stettler, R., Bachofen, R., 2000, Seasonal and spatial community dynamics in the meromictic Lake Cadagno, *Archives of Microbiology*, 174 (3), 168-174.

- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW., 1980, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 32: 314–331.
- Buetow KH, Edmonson M, MacDonald R, Clifford R, Yip P, et al. 2001, High - throughput development and characterization of a genome-wide collection of gene-based single nucleotide polymorphism markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:581–84.
- Candar, B., 2011, *Fusarium graminearum ve Fusarium culmorum izolatlarının mikrosatellit markırları ile genetik tiplendirmesi*, Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Carter, J.P., Rezanoor, H.N., Desjardins, A.E., Nicholson, P., 2000, Variation in *Fusarium graminearum* isolates from Nepal associated with their host of origin, *Plant pathology*, 49, 452-460.
- Carter, J.P., Rezanoor, H.N., Holden, D., Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Nicholson, P., 2002, Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*, *European Journal of Plant Pathology*, 108, 573-583.
- Chambers, G.K., MacAvoy, E.S., 2000, Microsatellites: consensus and controversy, *Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)*, 126, 455-476.
- Champeil, A., Fourbet, J.F., Dore, T., Rossignol, L., 2004, Influence of cropping system on *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat, *Crop Protection*, 23, 531-537.
- Chelkowski J. ve Stephen L., 2001, Molecular markers for leaf rust resistance genes in wheat. *J Appl Genet* 42:117–126.
- Chen, X. ve Sullivan PF., 2003, Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput, *The Pharmacogenomics Journal* 3, 77–96.
- Clear, RM., Patrick, SK, Gaba, D., 2000, Prevalence of fungi and fusariotoxins on barley seed from western Canada, 1995 to 1997, *Can J Plant Pathol* 22:44–50.
- Conrad, L. Schocha, Keith A. Seifertb, Sabine H., Vincent R., John L.S., André C.L., Wen C., Fungal Barcoding Consortium, 2011, Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, *Microbiology PNAS Early Edition*, 1-6.
- Cooke, B.M., Jones, D.G., Kaye, B., 2006, *The epidemiology of plant diseases*, Springer, Hollanda, 9781402045806.

- Cooper, G.M., 2000, *The Cell 2nd Edition*, Sunderland (MA), ISBN: 0-87893-106-6.
- Cruz-Perez, P., Buttner, M.P. and Stetzenbach, L.D., 2001, Detection and quantitation of *Aspergillus fumigatus* in pure culture using polymerase chain reaction, *Molecular Cellular Probes*, 15 (2), 81-88.
- Cuomo, C.A., Guldener, U., XU, J.R., Trail, F., Turgeon, B.G., Pietro, A.D., Walton, J.D., MA, L.J., Baker, S.E., Rep, M., Adam, G., Antoniw, J., Baldwin, T., Calvo, S., Chang, Y.L., Decaprio, D., Gale, L.R., Gnerre, S., Goswami, R.S., Kosack, K.H., Harris, L.J., Hilbrun, K., Kennell, J.C., Kroken, S., Magnuson, J.K., Mannhaupt, G., Mauceli, E., Mewes, H.W., Mitterbauer, R., Muehlbauer, G., munsterkotter, M., Nelson, D., O'Donnell, K., Quellet, T., QI, W., Quesneville, H., Roncero, M.I.G., Seong, K.Y., Tetko, I.V., Urban, M., Waalwijk, C., Ward, T.J., Yao, J., Birren, B.W., Kistler, H.C., 2007, The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization, *Science*, 317, 1400-140.
- Demeke, T., Clear, R.M., Patrick, S.K., Gaba, D., 2005, Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis, *International Journal of Food Microbiology*, 103, 271-284.
- De Hoog, G.S., Garro, J., Gene, J., Figueras, M.J., 2000, Atlas of Clinical Fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Dinolfo, M.I., Stenglein, S.A., Moreno, M.V., Nicholson, P., Jennings, P. and Salerno, G.L., 2010, ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England, *European Journal of Plant Pathology*, 127 (4), 483-491.
- Doohan F.M, Parry D.W, Jenkinson P, Nicholson P, 1998. The use of species-specific PCR-based assays to analyse Fusarium ear blight of wheat. *Plant Pathology* 47, 197-205.
- Doyle JJ. Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, 1987, *PhytochemBull.* 1987:19:11-15.
- Dubey, S.C., Tripathi, A. and Singh, S.R., 2010, ITS-RFLP fingerprinting and molecular marker for detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, *Folia Microbiologica*, 55 (6), 629-634.
- Fang, D.Q.V.R.M.L., 1997, Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers, *Theor Appl Genet.*, 95, 408-417.
- Field, D. and Wills, C., 1996, Long, polymorphic microsatellites in simple organisms, *Proceedings of the Royal Society London series B*, 263, 209-215.
- Fraaije, B.A., Lovell, D.J., Coelho, J.M., Baldwin, S., Hollomon, D.W., 2001, PCR-based assays to assess wheat varietal resistance to blotch (*Septoria tritici* and

Stagonospora nodorum) and rust (*Puccinia striiformis* and *Puccinia recondita*) diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 905-917, ISSN 0929-1873.

- Gerlach, W., Nirenberg, H., 1982, *The genus Fusarium*, A pictorial atlas. Kommissionsverlag Paul Parey, Berlin-Hamburg, pp: 406.
- Gherbawy, Y. and Voigt, K., 2010, *Molecular Identification of Fungi*, 1st ed., Springer Heidelberg, London, New York, 978-3-642-05041-1.
- Goldstein, D.B., Pollock, D.D., 1997, Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference, *Journal of Heredity*, 88, 335-342.
- Gore, D. and Raut, A., 2009, Computational Function and Structural Annotations for Hypothetical Proteins of *Bacillus anthracis*. *Biofrontiers*. vol.1, Issue.1: Pg 21-23.
- Goswami, R.S., Kistler, H.C., 2004, Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops, *Molecular Plant Pathology*, 5, 515-525.
- Gunderson, K. L., Steemers, F. J., Lee, G., Mendoza, L. G., Chee, M. S., 2005, A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology, *Nat. Genet.* 37, 549-554.
- Gupta, P. K., Roy, J. K., Prasad, M., 2001, Single nucleotide polymorphisms: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants, *Curr.Sci.* 80, 524-535.
- Gurel, F., Albayrak, G., Diken O., Çepni, E., Tunalı, B., 2010, Use of Rep-PCR for Genetic Diversity Analyses in *Fusarium culmorum*, *Journal of Phytopathology*, 158, 387-389.
- Gutleb, A.C., Morrison, E., Murk, A.J., 2002, Cytotoxicity assay for mycotoxins produced by *Fusarium* strains, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11, 309-320.
- Hancock, J.M., 1996a, Simple sequences in a 'minimal' genome, *Nature Genetics*, 14, 14-15.
- Hancock, J.M., 1996b, Simple sequences and the expanding genome, *BioEssays*, 18, 421-425.
- Hatsch, D., Phalip, V., Jeltsch, J.M., 2002, Development of a bipartite method for *Fusarium* identification based on cellobiohydrolase-C: CAPS and Western blot analysis, *FEMS Microbiology Letters*, 213: 245-249.
- Hillis David, M. and Dixon Michael, T., 1991, Ribosomal DNA: Molecular evolution and Phylogenetic inference, *The Quarterly review of biology*.

- Keith A. Seifert, Robert A. Samson, Jeremy R. deWaard, Jos Houbraken, C. Andre Levesque, Jean-Marc Moncalvo, Gerry Louis-Seize, and Paul D. N. Hebert, 2007, Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:3901–3906.
- Kirk, BW., Feinsod, M., Favis, R., Kliman, RM., Barany, F., 2002, Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease, *Nucleic Acids Res*, 30: 3295–3311.
- Koncz, Z.S., Huszti, K., Naár, Z., Kiss, A. and Szécsi, A., 2008, PCR identification of *Fusarium graminearum* Isolated from Wheat Grain, *Cereal Research Communications*, 36 (4), 623–630.
- Konieczny, A. and F.M. Ausubel, 1993, A procedure for mapping Arabidopsis is mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 4: 403-410.
- Komori, T., Nitta, N., 2005, Utilization of the CAPS/dCAPS method to convert Rice SNPs into PCR-based markers, *Breeding Science*, 55: 93-98.
- Korobeinikova, A. V., Garber M. B., Gongadze, G. M., Ribosomal Proteins: Structure, Function, and Evolution, 2012, *Biochemistry*, 77 (6), 686-700.
- Kristensen, R., Torp, M., Kosiak, B. Holst-Jensen, A., 2005, Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycol Res* 109, 173–186.
- Kumar, P., Gupta, V.K., Misra, A.K., Modi, D.R., Pandey, B.K. 2009. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics Journal* 2(4):141-162.
- Kunihisa, M., Fukino, N., Matsumoto, S., 2003, Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. *Euphytica* 134, 209–215.
- Kunihisa, M., Fukino, N., Matsumoto, S., 2005, CAPS markers improved by clusterspecific amplification for identification of octoploid strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) cultivars, and their disomic inheritance. *Theor. Appl. Genet.* 110, 1410–1418.
- Knutsen, A.K., Torp, M. and Holst-Jensen, A., 2004, Phylogenetic analyses of the *Fusarium poae*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* species complex based on partial sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene. *Int J Food Microbiol* 95, 287–295.
- Larone, D.H. 1995, Medically important fungi: a guide to identification, 3rd ed. *ASM Press, Washington*, 978-1555810917.

- Leisova, L., Kucera, L., Chrpova, J., Sykorova, S., SIP, V., Ovesna, J., 2006, Quantification of *Fusarium culmorum* in wheat and barley tissues using Real-Time PCR in comparison with DON content, *J. phytopathology*, 154, 603-611.
- Leslie, J.F., Raju, N.B., 1985, Recessive mutations from natural populations of *Neurospora crassa* that are expressed in the sexual diplophase. *Genetics* 111, 759–777.
- Leslie, J.F., 1991. Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Phytopathology* 81, 1058–1060.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2006, *The Fusarium laboratory manual*, Blackwell, Manhattan, 978-0-8138-1919-8.
- Litt, M., Luty, J.M., 1989, A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene, *American Journal of Human Genetics*, 44, 397-401.
- Lin, Y.-H., Chang, J.-Y., Liu, E.-T., Chao, C.-P., Huang, J.-W. and Chang, P.-F.L., 2009, Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, *European Journal of Plant Pathology*, 123 (3), 353-365.
- Liu, BH., 1998, Statistical genomics: Linkage, mapping, and QTL analysis, *CRC Press LLC*, Boca Raton New York.
- Lodhi, M.A., 1994, Genetic mapping and genome analysis of grape (*Vitis sp.*). Cornell University, New York., 233.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold spring harbor laboratory press, NY.
- Matsumoto, A., Tsumura, Y., 2004, Evaluation of cleaved amplified polymorphic sequence markers, *Theor. Appl. Genet.* 110: 80–91.
- McDermott, JM., Brandle U., Dutly F., Haemmerli U.A., Keller S., Muller K.E., Wolf M.S., 1994, Genetic variation in powdery mildew of barley: development of RAPD, SCAR and VNTR markers, *Phytopathology* 84:1316–1321.
- McDonald, D.B., Potts, W.K., 1997, *DNA microsatellites as genetic markers for several scales*. In: Mindell D.P. (ed.), *Avian molecular evolution and systematics*, *Academic Press*, San Diego, 29-49.
- McMullen, M., Jones, R. and Gallenberg, D., 1997, Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact, *Plant Disease*, 81, 1340-1348.
- Michaels, SD., Amasino, RM., 1998, A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. *Plant J.* 14:381–385.

- Miedaner, T., Schilling, A.G., Geiger, H.H., 2001, Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries, *J. phytopathology*, 149, 641-648.
- Miedaner T, Schneider B, Geiger HH., 2003, Deoxynivalenol (DON) Content and Fusarium Head Blight Resistance in Segregating Populations of Winter Rye and Winter Wheat. *Crop Science*, 43 (2): 519-526.
- Miedaner, T., Schilling, A.G., Geiger, H.H., 2004, Competition effects of among isolates of *Fusarium culmorum* differing in aggressiveness and mycotoxin production on heads of winter rye, *European Journal of Plant Pathology*, 110, 63-70.
- Moricca, S., Ragazzi, A., Mitchelson, K.R., 1998, Detection of *Fusarium oxysporum* f.s.p. *vasinfectum* in cotton tissue by polymerase chain reaction, *Plant Pathology*, 47, 486-494.
- Mostert, L.; Groenewald, J.Z.; Summerbell, R.C.; Gams, W. & Crous, P.W., 2006, Taxonomy and pathology of *Togninia* (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. *Studies in Mycology*, (54): 1–113, ISSN 0166-0616.
- Muriuki, J.G., 2001, *Deoxynivalenol and nivalenol in pathogenesis of Fusarium head blight in wheat*, Thesis (PhD), University of Minnesota.
- Myers, R. M., Maniatis, T., Lerman, L. S., 1986, Detection and localization of single base changes by denaturing gel gradient gel electrophoresis, *Methods Enzymol.* 155, 501-527.
- Mule, G. , Susca, A. , Stea, G. , Moretti, A., 2004, A species specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. profileferatum*, *F. subglutinans*, *European Journal of Plant Pathology*, Volume 110, issue 5-6, 495-502.
- Mule, G., Jaen, M.T.G., Hornok, L., Nicholson, P., Waalwijk, C., 2005, Advances in molecular diagnosis of toxigenic *Fusarium* species, *Food additives and contaminants*, 22(4), 316-323.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986, Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction, *Cold spring harb symp. quant. biol.*, 1, 263-273.
- Narayanasamy, P., 2008, Molecular biology in plant pathogenesis and disease management, *Springer*, Coimbatore-India, 978-1-4020-8242-9.
- Nayaka, S.C., Wulff E.G., Udayashankar, A.C., Nandini, B.P., Niranjana, S.R., Mortensen, C.N., Prakash, H.S., 2011, Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90 (5), 1625-1639.

- Nguyen, H.D.T. and Seifert, K.A., 2008, Description and DNA barcoding of three new species of *Leohumicola* from South Africa and the United States. *Persoonia*, (21), 57–69, ISSN 0031-5850.
- Nicholson, P., Gosman, N., Draeger, R., Thomsett, M. Chandler, E. and Steed, A. 2007, *The Fusarium Head Blight Pathosystem Status and knowledge of its components*. In: Buck H.T. et al. (eds.), *Wheat Production in Stressed Environments*, 23-36.
- Nicholson, P., Simpson, D.R., Weston, G., Rezanoor, H.N., Lees, A.K., 1998, Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53, 17-37.
- Nirenberg, H., 1976, Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*, *Mitteilungen aus der biologischen bundesanstalt für land-und forstwirtschaft*, 169, 1–117.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H.I., 1998, Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90, 465–493.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Tacke, B.K., Casper, H.H., 1999, Gene genealogies reveal global phylogeographic structures and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum* the fungus causing wheat scab, *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 97, 7905-7910.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Geiser, D.M., Kistler, H.C., Aoki, T., 2004, Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade, *Fungal Genetics and Biology*, 41, 600-623.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Aberra, D., Kistler, H.C., Aoki, T., Orwig, N., Kimura, M., Bjørnstad, A., Klemsdal, S.S., 2008, Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia, *Fungal Genetics and Biology*, 45, 1514-1522.
- Olukolu, B. A., A. Negeri, R. Dhawan, B. P. Venkata, P. Sharma et al., 2013, A connected set of genes associated with programmed cell death implicated in controlling the hypersensitive response in maize, *Genetics* 193: 609–620.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazana, H., Hayashi, K., Sekiya, T., 1989, Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2766-2770.
- Özer, N. ve Soran, H., 1991, *Fusarium* species of Turkey, *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 6, 259-271.
- Paran, I., Michelmore, R.W., 1993, Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. appl. genet.*, 85(8):985-993.

- Parry, D.W., Jenkinson, P., Mcleod, L., 1995, Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals-a review, *Plant Pathology*, 44, 207-238.
- Rafalski, J.A.a.T., S.V., 1993, Genetic diagnostic in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.*, 93, 275-280.
- Rafalski, A., 2002, Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:94–100.
- Ross, P., Hall, L., Smirnov, I., and Haff, L. 1998. High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nature Biotechnol.* 16: 1347-1351.
- Rudd, J.C., Horsley, R.D., Mckendry, A.L., Elias, E.M., 2001, Host plant resistance genes for Fusarium head blight: sources, mechanisms, and utility in conventional breeding systems, *Crop Science*, 41, 620-627.
- Saharan, M.S., Naef, A., Kumar, J., Tiwari, R., 2007, Characterization of variability among isolates of *Fusarium graminearum* associated with head scab of wheat using DNA markers, *Current science*, 92, 230-235.
- Sanger, F., Nicklen S., Coulson A. R., 1977, Sanger F., N.S., Coulson A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-5467.
- Semagn, K., Bjornstad, A., Ndjiondjop, M. N., 2006 Dec, An overview of molecular marker methods for plants, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 5 (25) pp. 2540-2568 29.
- Schilling, A.G., Moller, E.M., Geiger, H.H., 1996, Polymerase chain reaction based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. aveneceaum*, *Molecular Plant Pathology*, 86 (5), 515-522.
- Sia, E.A., Butler, C.A., Dominska, M., Greenwell, P., Fox, T.D., Petes, T.D., 2000, Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97, 250-255.
- Singh, R., Sheoran, S., Sharma, P., Chatrath, R., 2011, Analysis of simple sequence repeats (SSRs) dynamics in fungus *Fusarium graminearum*, *Bioinformation*, 5 (10), 402-404.
- Sivashankari, S., and Shanmughavel P., Functional annotation of hypothetical proteins – A review, 2006, *Bioinformation* 1(8): 335 -338.
- Sonal, S. ve Oruç, H.H., 2000, Bursa bölgesindeki tavuk çiftliklerinden sağlanan yemlerde mikotoksin düzeyleri, *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 11(2), 1-6.

- Squirrell, J., Hollingsworth, P.M., Woodhead, M., Russell, J., Lowe, A.J., Gibby, M., Powell, W., 2003, How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants?, *Molecular Ecology*, 12, 1339-1348.
- Starkey, D.E., Ward, T.J., Aoki, T., Gale, L.R., Kistler, A.C., Oeise, A.D.M., Suga, H., Toth, B., Varga, J., O'donnell, K., 2007, Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity, *Fungal Genetics and Biology*, 44, 1191-1204.
- Staub, J.E., Kuhns, L.J., May, B., Grun, P., 1982, Stability of potato tuber isozymes under different storage regimes, *Journal of American Science*, 107, 405-408.
- Suga, H., Karugia, G.W., Ward, T., Gale, L.R., Tomimura, K., Nakajima, T., Miyasaka, A., Koizumi, S., Kageyama, K., Hyakumachi, 2008, Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan, *M.Phytopathology*, 98(2):159-66.
- Sumida, M., Kato, Y., Kurabayashi, A., 2004, Sequencing and analysis of the internal transcribed spacers (ITSs) and coding regions in the EcoRI fragment of the ribosomal DNA of the Japanese pond frog *Rana nigromaculata*, *Genes & Genetic Systems*, 79 (2), 105-118.
- Sutton, J.C., 1982, Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4, 195-209.
- Syvanen, A.C., 2001, Accessing genetic variation genotyping single nucleotide polymorphisms, *Nat Rev Genet.* 2(12):930-42.
- Talas, F., Würschum, T., Reif JC., Parzies, HK., Miedaner, T., 2012, Association of single nucleotide polymorphic sites in candidate genes with aggressiveness and deoxynivalenol production in *Fusarium graminearum* causing wheat head blight, *BMC Genetic*.
- Tanaka, M., Takahata, Y., Nakayama, H., Yashinaga, M., Kumagai, T., Nakatani, M., 2010, Development of cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS)- based markers for identification of sweetpotato cultivars, *Elsevier*, 436-442.
- Tautz, D., Trick, M., Dover, G.A., 1986, Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation, *Nature*, 322, 652-656.
- Tingey, S.V., Rafalski, J.A. and Williams, J. G. K., 1992, Genetic analysis with RAPD markers, Application of RAPD Technology to Plant Breeding. *Joint Plant Breeding Symposia Series*, 3-8.
- Tingey, S.V. ve Tufo, J.P.D., 1993, Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers, *Plant physiology*, 101, 349-352.
- Toussoun, T.A. and Nelson, P.E, 1975, Variation and speciation in the fusaria, *Annual Review of Phytopathology*, 13, 71-82.

- Troggio, M., Malacane, G., Vezzulli, S., Fae, G., Salmaso, M., Velasco, R., 2008, Comparison of different methods for SNP detection in grapevine, *Vitis*, 21-30.
- Tunalı, 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.
- Tunalı, B., Özseven, İ., Büyük, O., Erdurmuş, D. ve Demirci, A., 2006b, Fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation of wheat in Marmara region and reactions of wheat cultivars and lines to *F. graminearum* and *Fusarium culmorum*, *Plant Pathology Journal*, 5(2), 150-156.
- Twyman, R.M., 2005, Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping Techniques—An Overview, *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics* DOI: 10.1081/E-EDGP 120020761.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.V.D., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acid Research*, 23(21), 4407-4414.
- Walker, S.L., Leath, S., Hagler, W.M. and Murphy, J.P., 2001, Variation among isolates of *Fusarium graminearum* associated with Fusarium head blight in North Carolina, *Plant Disease*, 85, 404-410.
- Weber JL. ve May PE., 1989, Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet.* 44: 388–396.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic acid research*, 18 (22), 6531-6535.
- Wöstemeyer, J., Kreibich, A., 2002, Repetitive DNA elements in fungi (Mycota): impact on genomic architecture and evolution, *Current Genetics*, 41, 189-198.
- Wu, Z., Wang, X-R., Blomquist, G., 2002, Evaluation of PCR primers and PCR conditions for specific detection of common airborne fungi, *Journal of Environmental Monitoring*, 4, 377-382.
- Yörük, E., 2009, *Fusarium graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarının RAPD markırlarına dayalı genetik tiplendirmesi, Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Yörük, E., Albayrak, G., 2011, Chemotyping of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by PCR assay, *Mycopathologia*, doi: 10.1007/s11046-011-9462-2.
- Yörük, E., Albayrak, G., Sharifnabi, B., Candar, B., 2011, Molecular characterization of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates of wheat, barley and maize

- using ISSR markers, *Current opinion in biotechnology, European Biotechnology Congress*, 2011 September, İstanbul, 22 (1), 132.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T., 2002, Strategies for microsatellite isolation: a review, *Molecular Ecology*, 11, 1-16.
- Zarembinski, T.I., Hung, L.W., Joachim, H., Dieckmann, M., Kyeong, K.K., Yokota, H., Kim, R. and Kim S.G., 1998, Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: A test case of structural genomics, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 15189–15193.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, J.A., Labuda D., 1994, Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chainreaction amplification, *Genomics* 20:176–183.
- Zila, C.T., Samayoa, L.F., Santiago, R., Butron, A., Holland, J.B., 2013, A genome-wide association study reveals genes associated with *Fusarium* ear rot resistance in a maize core diversity panels, *G3*, 2095-2104.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Funda Kaya
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	02.01.1989, ELAZIĞ
Telefon	
E-mail	Funda1143@hotmail.com
Web adres	

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	2011
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2007
Lise	Elazığ Anadolu Lisesi	2002

Makaleler / Bildiriler

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