



**İSTANBUL  
ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİTKİSEL PATOJENLERİN PCR'A DAYALI  
YÖNTEMLERLE GENETİK TİPLENDİRMESİ**

**Fatma Elif ÇEPNİ**  
**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**  
**Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**Danışman**  
**Doç. Dr. Filiz Gürel**

**Ocak, 2007**

**İSTANBUL**



**İSTANBUL  
ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİTKİSEL PATOJENLERİN PCR'A DAYALI  
YÖNTEMLERLE GENETİK TİPLENDİRMESİ**

**Fatma Elif ÇEPNİ**  
**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**  
**Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**Danışman**  
**Doç. Dr. Filiz Gürel**

**Ocak, 2007**

**İSTANBUL**

Bu Yüksek Lisans çalışması İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği (T-719/30062005) tarafından desteklenmiştir.

## **ÖNSÖZ**

Bu çalışmayı gerçekleştirmemde beni cesaretlendiren ve her aşamada bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren tez danışmanım Doç. Dr. Filiz GÜREL'e çok teşekkür ederim.

Tezimde kullandığım mikroorganizma kültürleri, bitki hastalıkları ile doğrudan çalışmalar yapan araştırmacılarından sağlanmıştır. Kendi kültür koleksiyonlarından bu materyalleri göndererek katkıda bulunan Prof. Dr. Berna TUNALI'ya (19 Mayıs Üniv.), Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN'a (Ege Üniv.), Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU'na (Adnan Menderes Üniv.), Dr. Meriç ÖZAKMAN'a (Ankara Zirai Müc. Merk. Araş. Enst.) , Dr. Cemil HANTAŞ'a (Atatürk Bahçe Kült. Merk.) ve Sn. Metin TEZGELEN'e çok teşekkür ederim

Tezim kapsamında tüm deneysel çalışmalarımı Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde gerçekleştirdim. Başta Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Güler TEMİZKAN olmak üzere Bölümün değerli hocalarına; istatistiksel verilerin elde edilmesinde ve yorumlanmasındaki önemli katkılarından dolayı Yard. Doç. Dr. Gülruh ALBAYRAK'a, manevi destek ve ilgisini hissettiğim çalışma arkadaşım Özge KARAKAŞ' a teşekkürü borç bilirim.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca sevgi ve ilgilerini benden esirgemeyen kendilerini her zaman örnek aldığım Sayın Prof. Dr. Aysel GÜRSOY'a ve AİLEME çok teşekkür ederim.

**İstanbul 2007**

**F. Elif ÇEPNİ**

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	vi
SEMBOL LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY.....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR.....</b>	<b>2</b>
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM.....</b>	<b>10</b>
3. 1. PATOJEN MATERYALİ.....	10
3. 2. BİTKİ TÜMÖRLERİNDEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU.....	11
3. 3. BESİYERİ VE KÜLTÜR KOŞULLARI.....	12
3. 4. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR).....	13
3. 4. 1. Genlere Özgü Primerlerle Yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	13
3. 4. 2. <i>Fusarium</i> Miselyumlarından Genomik DNA İzolasyonu.....	15
3. 4. 3. Gen Dışı Bölgelere Özgü Primerlerle Yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	16
3. 4. 4. Agaroz Jel Elektroforezi.....	17
3. 4. 5. PCR Verilerinin Bilgisayar Programında Değerlendirilmesi...	18
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>19</b>
4. 1. SEÇİCİ BESİYERİNDE ÜRETİM.....	19
4. 2. İZOLATLARIN PCR İLE GENETİK TANISI.....	20
4. 2. 1. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> .....	20
4. 2. 2. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> .....	21
4. 2. 3. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> .....	21
4. 2. 4. <i>Fusarium culmorum</i> ve <i>Fusarium graminearum</i> .....	22

4. 3. REP, ERIC VE BOX-PCR BULGULARI.....	22
4. 3. 1. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> 'de REP-PCR'a Dayalı Genetik Tiplendirme.....	22
4. 3. 2. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i> 'de ERIC ve BOX-PCR'a Dayalı Genetik Tiplendirme.....	24
4. 3. 3. <i>Pseudomonas</i> 'ın Üç Patovarında BOX- PCR Bulguları.....	25
4. 3. 4. <i>Fusarium culmorum</i> ve <i>Fusarium graminearum</i> 'da REP-PCR'a Dayalı Genetik Tiplendirme.....	26
4. 3. 5. <i>Fusarium culmorum</i> ve <i>Fusarium graminearum</i> ' da ERIC ve BOX-PCR'a Dayalı Genetik Tiplendirme.....	28
4. 3. 6. <i>Fusarium</i> REP, ERIC ve BOX-PCR Sonuçlarına Göre Oluşturulan Dendrogram.....	29
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>32</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>37</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>43</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1	:Fusarium başak yanıklığı hastalığının buğday bitkisindeki görünümü.....	3 7
Şekil 2. 1	:REP- PCR yönteminin işleyiş mekanizması.....	11
Şekil 3. 1	:Akhisar (a) ve Orhangazi (b) den alınan dallarda zeytin dal kanseri hastalığının belirtisi olan tümörlerin genel görünümü.....	19
Şekil 4. 1	:Dallardan izole edilen bakterilerin seçici besiyerinde oluşturduğu koloniler.....	
Şekil 4. 2	: <i>P.s. pv. savastanoi</i> izolatlarına <i>ptz</i> geni orijinli Pss 1 ve Pss 2 primerleri ile yapılan PCR analizi. M: Markır, NK: Negatif kontrol, 1: Pss 14, 2: Pss 7A, 3: Pss 9A, 4: Pss 8A, 5: Pss 7D, 6: Pss 4B, 7: Pss M-9, 8: Pss M-25.....	20
Şekil 4. 3	: <i>P.s. pv. savastanoi</i> izolatlarına <i>iaaL</i> geni orijinli Pss 5 ve Pss 6 primerleri ile yapılan PCR analizi. M: Markır, NK: Negatif kontrol, 1: Pss 14, 2: Pss 7A, 3: Pss 9A, 4: Pss 8A, 5: Pss 7D, 6: Pss 4B, 7: Pss M-9, 8: Pss M-25.....	20
Şekil 4. 4	: <i>P.s. pv. phaseolicola</i> izolatlarının PCR analizi. M: Markır, NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol ( NCPPB 52 ), 1: Psp R-52, 2: Psp-3, 3: Psp-18.....	21
Şekil 4. 5	: <i>P. s. pv. tomato</i> ırklarının PCR analizi. M:Markır, NK: Negatif kontrol, 1: Pt-101, 2: Pst.....	
Şekil 4. 6	: <i>F. culmorum</i> ve <i>F. graminearum</i> 'un PCR ile genetik tanısı. M: Markır, NK: Negatif kontrol, 1: <i>F. culmorum</i> S 11 9.1, 2: <i>F. culmorum</i> 56 4.1, 3: <i>F. culmorum</i> 27K 4: <i>F. culmorum</i> S 10 41. 2, 5: <i>F. graminearum</i> (1), 6: <i>F. graminearum</i> (4), 7: <i>F. graminearum</i> (2), 8: <i>F. graminearum</i> (4W), 9: <i>F. graminearum</i> (5).....	22
Şekil 4. 7	: <i>P.s. pv. savastanoi</i> izolatlarının (a) K-1 ve K-2 (b) K-3 ve K-4 primer kombinasyonları kullanılarak yapılan REP-PCR sonucunda elde edilen genomik parmak izleri. M: Markır, 1: Pss14, 2: Pss 7A, 3: Pss 9A, 4: Pss 8A, 5: Pss 7D,6: Pss 4B, 7: Pss M-9, 8: Pss M-25.....	23
Şekil 4. 8	: <i>P.s. pv. savastanoi</i> izolatlarının K-5 primer kombinasyonu kullanılarak yapılan REP- PCR sonucunda elde edilen parmak izleri. M: Markır, 1: Pss 14, 2: Pss 7A, 3: Pss 9A, 4: Pss 8A, 5: Pss 7D, 6: Pss 4B, 7: Pss M-9, 8: Pss M-25.....	24

<b>Şekil 4. 9</b>	: <i>P.s. pv. savastanoia</i> izolatlarının ERIC ve BOX- PCR uygulamaları sonucunda oluşan genomik parmak izleri. M: Markır, 1: Pss 14, 2: Pss 7A, 3: Pss 9A, 4: Pss 8A, 5: Pss 7D, 6: Pss 4B,7: Pss M-9, 8: Pss M-25.....	<b>25</b>
<b>Şekil 4. 10</b>	: <i>Pseudomonas</i> patovarlarında (fasulye, zeytin ve domates) BOX-PCR bulguları. M: Markır, 1: Psp-52, 2: Psp R-52, 3: Psp-3, 4: Psp-18, 5: Pss-14, 6: Pt-101, 7: Pst.....	<b>26</b>
<b>Şekil 4. 11</b>	: <i>Fusarium culmorum</i> ve <i>Fusarium graminearum</i> 'un (a) K-1 ve K-2 (b) K-3 ve K-4 primer kombinasyonları ile elde edilen REP-PCR Bulguları. M: Markır, 1: FCS11, 2: FCM56, 3: FCK27K, 4: FCS10, 5: FGS1, 6: FGS4, 7: FGS2, 8: FGS4W, 9: FGS5.....	<b>27</b>
<b>Şekil 4. 12</b>	: <i>Fusarium culmorum</i> ve <i>Fusarium graminearum</i> 'un K-5 primer setleri ile elde edilen REP-PCR Bulguları. M: Markır, 1: FCS11, 2: FCM56, 3: FCK27K, 4: FCS10, 5: FGS1, 6: FGS4, 7: FGS2, 8: FGS4W, 9: FGS5.....	<b>28</b>
<b>Şekil 4. 13</b>	: <i>Fusarium culmorum</i> ve <i>Fusarium graminearum</i> 'un ERIC veBOX-PCR Bulguları. M: Markır, 1: FCS11, 2: FCM56, 3: FCK27K, 4: FCS10, 5: FGS1, 6: FGS4, 7: FGS2, 8: FGS4W, 9: FGS5.....	<b>29</b>
<b>Şekil 4. 14</b>	: <i>Fusarium graminearum</i> ve <i>Fusarium culmorum</i> izolatlarının REP, ERIC ve BOX-PCR sonuçlarına göre Jaccard benzerlik indeksi hesaplanarak UPGMA bağlantı analizi ile oluşturulan dendrogramı.....	<b>31</b>



## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 3. 1</b>	: Çalışmada kullanılan patojenler.....	<b>10</b>
<b>Tablo 3. 2</b>	: Bakteri ve mantarların üretimi için kullanılan besiyerleri ve içerikleri.....	<b>12</b>
<b>Tablo 3. 3</b>	: Genlere özgü primerlerle yapılan PCR bileşenlerinin miktarları.....	<b>13</b>
<b>Tablo 3. 4</b>	: Patojenlerin moleküler düzeyde tanısı için kullanılan primerler.....	<b>14</b>
<b>Tablo 3. 5</b>	: <i>Fusarium</i> genomik DNA izolasyonunda kullanılan lizis çözeltisinin içeriği .....	<b>15</b>
<b>Tablo 3. 6</b>	: REP, ERIC ve BOX-PCR’da kullanılan primerlerin dizileri .....	<b>16</b>
<b>Tablo 3. 7</b>	: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar.....	<b>17</b>
<b>Tablo 4. 1</b>	: Tümörlerden izole edilen ve PVF-1 besiyerinde üreyen <i>P. s.</i> pv. <i>savastanoi</i> kolonilerinin listesi.....	<b>19</b>
<b>Tablo 4. 2</b>	: <i>Fusarium</i> ırkları için kullanılan kısaltmalar.....	<b>26</b>
<b>Tablo 4. 3</b>	: <i>Fusarium</i> ırklarına ait Jaccard benzerlik indeksi.....	<b>30</b>

## SEMBOL LİSTESİ

<b>BSA</b>	: Bovin serum albumin
<b>dNTP</b>	: Deoksinükleotid trifosfat
<b>DMSO</b>	: Dimetilsülfaoksit
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetraasetik asit
<b>ELISA</b>	: Enzim bağılı immün analiz
<b>ERIC</b>	: Enterobakteriyel tekrarlı genler arası ortak diziler
<b>IAA</b>	: 3-İndol asetik asit
<b>IF</b>	: İmmünofloresan
<b>Mb</b>	: Megabaz
<b>mg</b>	: miligram
<b>ml</b>	: mililitre
<b>mM</b>	: milimolar
<b>µM</b>	: mikromolar
<b>µg</b>	: mikrogram
<b>µl</b>	: mikrolitre
<b>ng</b>	: nanogram
<b>OD</b>	: Optik densite
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RAPD</b>	: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
<b>REP</b>	: Tekrarlı gen dışı palindromik diziler
<b>TAE</b>	: Tris –Asetik asit- EDTA
<b>Taq</b>	: <i>Thermus aquaticus</i>
<b>U</b>	: Ünite
<b>v/v</b>	: hacim/ hacim
<b>w/v</b>	: ağırlık/ hacim

## ÖZET

### BİTKİSEL PATOJENLERİN PCR'A DAYALI YÖNTEMLERLE GENETİK TIPLENDİRMESİ

Bu çalışmada farklı stratejilere dayalı PCR uygulamaları ile mikroorganizmaların genetik tiplendirmesi amaçlanmıştır. Hedef organizma olarak, ülkemizde ekonomik öneme sahip bitkilerde hastalık yapan bakteri ve mantar türleri kullanılmıştır. Bunlar *Pseudomonas syringae*'nin fasulye, domates ve zeytinde hastalık yapan üç patovarı ile *Fusarium*'un buğday ve arpada hastalık yapan *Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum* ırklarıdır. Zeytin ağacında hastalık yapan *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* tümörlü dallardan izole edilmiş, diğer tüm ırklar ise araştırmacılarından sağlanmıştır.

Bu türlere ait ırkların genetik tiplendirmesi gerek özel gen dizilerine ve gerekse gen dışı tekrarlı dizilere (REP, ERIC ve BOX) özgü primerler kullanılarak yapıldı. *Pseudomonas syringae*'nin fasulye, domates ve zeytinde hastalık yapan üç patovarındaki BOX dizilerinin çoğaltımı ile her üç patovarı ayırt edici nitelikte genomik parmak izleri elde edildi. *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* bakterisinin Orhangazi ve Akhisar orijinli izolatlarında çoğaltılan tüm tekrarlı dizilerde yüksek polimorfizm gözlemlendi.

*Fusarium*'un ülkemiz kökenli ırkları ilk kez bu çalışmada genetik olarak tiplendirildi. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile bu ırklar arasındaki benzerlik/farklılıkları ortaya koymada yeterli düzeyde genomik parmak izleri elde edildi. Her üç tipteki PCR (REP, ERIC, BOX) verilerinin Jaccard benzerlik indeksine göre değerlendirilmesi sonucu, *Fusarium graminearum*'un Sakarya orijinli iki ırkı arasında %76; *F. graminearum* (Sakarya ırkı) ve *F. culmorum* (Marmara ırkı) arasında ise %27 benzerlik olduğu belirlendi.

## SUMMARY

### GENOTYPING OF PLANT PATHOGENS BY PCR-BASED METHODS

In this study, genotyping of microorganisms by PCR applications based on different strategies was aimed. Bacteria and fungus species which cause diseases on economically important plants in our country were used as target organisms. These are the pathovars of *Pseudomonas syringae* which cause disease on bean, tomato and olive; and *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* strains which are disease agents of both barley and wheat. *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* which cause disease on olive trees was isolated from branches with galls while the other strains were provided from researchers.

Genotyping of the strains belong to these species were achieved by using specific primers to genes and primers of extragenic repetitive sequences (REP, ERIC and BOX). Genomic fingerprints which can distinguish each pathovars of *Pseudomonas syringae* which cause disease on bean, tomato and olive were obtained by amplification of BOX sequences. High polymorphism were observed between the isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* originated from Orhangazi and Akhisar.

Strains of *Fusarium* which are originated from our country were genotyped for the first time. Sufficient amounts of genomic fingerprints were obtained by polymerase chain reaction (PCR) for revealing the similarity/differences between these strains. As a result of the evaluation of data from each type of PCRs (REP, ERIC and BOX), similarity between two *Fusarium graminearum* strains originated from Sakarya was 76% while the similarity of *F. graminearum* (Sakarya strain) and *F. culmorum* (Marmara strain) was 27 % according to Jaccard similarity index.

## 1. GİRİŞ

Moleküler genetikteki son gelişmeler mikroorganizmaların DNA düzeyinde tiplendirilmesine, sınıflandırılmasına ve populasyon yapılarının daha ayrıntılı analizine olanak vermiştir. Bu gelişmeler sayesinde bitkilerde enfeksiyon etmeni olan çok sayıda mikrobiyal genotipin daha hızlı şekilde tanısının yapılabilmesi yakın gelecekte hastalıkların zirai kontrolünde büyük katkı sağlayacaktır.

*Pseudomonas* ve *Fusarium* cinsleri tarımsal önemi olan bitki türlerinde hastalık yaparak ekonomik kayıplara yol açan mikroorganizma grupları arasında önemli yer tutar. Bu türlerin altgrupları ve ırkları özellikle meyve ağaçlarında, bahçe ve süs bitkilerinde çeşitli belirtileri olan hastalıklara yol açmaktadır. Bu tez çalışmasında ülkemizde de yaygın hastalık etmeni olan ve çeşitlilik gösteren *Pseudomonas* ve *Fusarium*'a ait çeşitli izolatların özgül ve evrensel primerler kullanılarak genetik tiplendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Bu türlerin neden olduğu hastalıklar arasında zeytin dal kanseri, fasulye hale yanıklığı, domates bakteriyel benek hastalığı, *Fusarium* başak yanıklığı (FHB) ve kökboğazı çürüklüğü bulunmaktadır. Tez çalışmasının amacı ekonomik kayıplara neden olan bu hastalıkların hızlı tanısının yapılabilmesi için ülkemiz orijinli patojenlerde PCR'a dayalı genetik tanımlama yöntemlerinin geliştirilmesidir.

Bu çerçevede çeşitli bölgelerdeki (Marmara, Ege, Akdeniz ve İç Anadolu) bitki populasyonlarından izole edilmiş *Pseudomonas* ve *Fusarium* patojenleri öncelikle özel seçici besiyerlerinde üretilerek, uzun süreli saklamaya alınmış ve özgül primerler kullanılarak tanımlanmıştır. Tür tanısı yapılan örneklerde gen dışı bölgelerin (REP, ERIC ve BOX) çoğaltımını sağlayan evrensel primerler kullanılarak özgül parmak izleri elde edilmiş ve tür içi genetik çeşitliliğin derecesi incelenmiştir.

## 2. GENEL KISIMLAR

Patojen mikroorganizmaların kalıtsal materyal düzeyinde tanımlanması neden oldukları hastalıkları belirlemede önem taşır ve uygun bir tedavi programına karar verilmesini hızlandırır. Bu amaçla seçilen genetik tanı yöntemlerinin mikrobiyal genotipler arasındaki farklılıkları yüksek düzeyde gösterebilmesi ve tekrarlanabilir olması gerekmektedir. Ek olarak bu moleküler yöntemler, hastalıkla ilişkili patojenleri bitki üzerindeki diğer benzer organizmaların varlığında veya yokluğunda doğru şekilde belirleyebilmelidir.

Günümüze kadar patojen tanısında kullanılan başlıca yöntemler özel besiyerlerinde üretim, biyokimyasal testler, enzim bağlı immün analiz (ELISA), immünofloresan (IF) yöntemleri ve yağ asidi analizleri olmuştur. Son yıllarda diğer organizmalarda olduğu gibi mikrobiyal organizmaların genetik tiplendirme çalışmalarında da en çok tercih edilen yöntem polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'a dayalı yöntemlerdir. 1983 yılında Kary B. Mullis tarafından geliştirilen PCR, çift zincirli kalıp DNA üzerinde özel bir bölgenin enzimatik reaksiyon ile çoğaltımına dayanır [1]. Mikroorganizmalarda kullanılan PCR'a dayalı genetik tiplendirmenin temeli ya önceden bilinen türe özgül gen dizilerinin klonlanması veya patojen genomlarında çeşitlilik gösteren bölgelerin çoğaltımı esasına dayanır [2].

*Fusarium* cinsi bitkilerde hastalık oluşturan yüksek çeşitliliğe sahip üç mantar (diğerleri *Penicillium* ve *Aspergillus*) grubundan biridir. Özellikle arpa (*Hordeum vulgare* L.), buğday (*Triticum aestivum* L.) ve mısır (*Zea mays* L.) gibi önemli tahılları içeren geniş bir konak aralığı vardır. Bu çalışmada kullanılan *Fusarium graminearum* (*Gibberella zae*) Sordariomycetidae sınıfından Netriaceae ailesinin bir üyesidir [3]. Genetik özellikleri açısından haploid (n=4) olan *Fusarium graminearum*'un genom projesi henüz tamamlanmamış olmakla birlikte tahmini DNA boyutu 40 Mb'dır [4]. *Fusarium culmorum* ise taksonomik olarak Sordariomycetidae sınıfından Mitosporik Hypocreales ailesinde yer alır [5]. *Fusarium culmorum* ile ilgili bazı genlerin

nükleotid dizileri bilinmekle birlikte genom projesi yapılmamıştır. *Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum* buğday ve arpada başak yanıklığı (FHB) hastalığına neden olurken, *Fusarium culmorum* ayrıca kökboğazı çürüklüğü etmenidir. Başak yanıklığı, ilk önce çiçek sapının kahve-mor bir renk alarak giderek solgunlaşması ile kendini gösterir ve zamanla çiçek sarımsı-kahverengi bir renk alır. Enfekte olmuş başakçıklar kararmış veya suda ıslanmış bir görünüm alır. Bu başakçıklar üzerindeki sporlar pembeden somon-turuncuya doğru renk değiştiren topluluklar şeklinde kendini gösterir (Şekil 1. 1).



**Şekil 1. 1:** *Fusarium* başak yanıklığı hastalığının buğday bitkisindeki görünümü [Jacolyn A. Morrison' un izniyle (USDA-ARS- Cereal Disease Laboratory)].

Tahıllarda önemli kayıplara neden olan *Fusarium* başak yanıklığı hastalığı ilk kez 1884 yılında İngiltere'de tanımlanmış ve 20. yüzyılın başlarında buğday ve arpada yayılarak önemli bir tehdit oluşturmuştur [3]. Bu hastalık daha sonra bazı Avrupa ülkelerinde, Asya, Kanada ve Amerika'da ortaya çıkmıştır. 1996 yılında Uluslararası Mısır ve Buğday Geliştirme Merkezi (CIMMYT) tarafından dünyanın büyük kısmında buğday üretimini kısıtlayıcı bir faktör olduğu bildirilmiştir [6]. Ülkemizin çeşitli yörelerinde yapılan çalışmalar, hastalık etmeni olan *F. culmorum* patojeninin Konya, *F. graminearum*'un ise Sakarya yöresinde daha etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır [7].

Diğer yandan *Fusarium* başak yanıklığı hastalığını taşıyan tahılların tüketimi hayvanlar ve insanlar üzerinde de çeşitli sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Bu tahıllarla beslenen hayvanlarda kusma, bulantı, diare, kontakt dermatitis gibi belirtiler görülürken [8] insanlarda ise cilt rahatsızlıkları, taşikardi, ödem, sindirim ve sinir sistemi bozuklukları meydana gelmektedir [9]. Yapılan çalışmalarda gözlenen yan etkilere *Fusarium* tarafından üretilen mikotoksinlerin neden olabileceği belirlenmiştir. *Fusarium* türlerinin erken tanısı ve kontrolü bu toksinlerin yiyecek zincirine katılmalarını engellemek açısından önemlidir. Ancak *Fusarium* cinsinde tür içi çeşitliliğin yüksek olması [10], bu patojenlerin geleneksel tanı yöntemleriyle belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Konak organizmada yoğun küf varlığında uygulanan kimyasal ve morfolojik testler zaman ve iş kaybına yol açmıştır. PCR ise karmaşık bir örnekteki hedef DNA moleküllerini yüksek duyarlılıkta saptaması nedeniyle mantar türlerinin tanısında geleneksel mikrobiyolojik yöntemlere göre iyi bir seçenek sunmaktadır. Bu nedenle *Fusarium* türlerinin bir kısmında genetik tanı için özgül primer tasarımları yapılmıştır [11, 12, 13].

*Pseudomonas* türleri Proteobacteria sınıfından Pseudomonodaceae ailesine ait gram negatif toprak bakterileridir. Düşük demir içeren ortamlarda sarımsı yeşil renkte ve ortama yayılabilir bir pigment oluşturmaları nedeniyle bazı türlerinin floresan özellik gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmada kullanılan *Pseudomonas* türleri; zeytinde dal kanseri hastalığına yol açan *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, fasulyede hale yanıklığı hastalığına neden olan *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ve domateste bakteriyel benek hastalığının etmeni olan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'dur. Bu bakterilerin ortak fenotipik özellikleri çubuksu şekilleri ve polar kamçılar içermeleridir. *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* bakterisinin genom boyutu bilinmemektedir. Ancak *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun genom boyutunun yaklaşık 6.5 Mb [14] ve *P. syringae* pv. *phaseolicola*'nın genom boyutunun ise yaklaşık 6 Mb [15] olduğu bilinmektedir. Genom boyutları bilinen bu bakteriler bir kromozom ile iki plazmid (küçük ve büyük) taşımaktadır.



*Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* ırkları zeytin (*Olea europaeae* L.) ve dişbudak (*Fraxinus excelsior* L.) ağağlarında tümörler oluştururken, zakkumda (*Nerium oleander* L.) tümörlerin yanı sıra enfekte ettiği bölgedeki dokuların ölümüyle sonuğlanan nekrozların meydana gelmesine de yol ağarlar. Zeytin ağağlarında bütün mevsimler boyunca yaşamlarını epifitik fazda sürdüren bu bakteriler, özellikle sonbahar ve kış süresince sayıca artarak gövde, dal veya herhangi bir yaralanmış organda enfeksiyonlara neden olurlar. Bakteri, krem yeşili renkteki canlı tümör ve siğillerde yoğun olarak bulunur ve kolaylıkla izole edilebilir. Tümörlerin oluşmasında bitki hücrelerindeki sitokin ve 3-indol asetik asit (IAA) bileşenlerinin sentezinin etkili olduğu daha önce yapılan ęalıřmalarda belirlenmiştir. Zeytin ve zakkum ağağlarında 3-indol-asetik asit, L-triptofan'dan iki enzim aracılığı ile üretilmektedir. Bu enzimler *iaaM* geni tarafından kodlanan triptofan mono-oksigenaz ve *iaaH* geni tarafından kodlanan indolasetamid hidrolaz'dır [16]. Bu genler bakterinin zakkumda hastalık yapan ırklarında bir plazmid üzerinde taşınmasına rağmen, zeytinde hastalık yapan ırklarda kromozomal DNA üzerinde yerleşmişlerdir. IAA'yı, indol-3-asetil-ε-L-lizin (IAA-Lys)'e ęeviren enzim ise IAA-lizin sentaz'dır ve *iaaL* geni tarafından kodlanır [17]. *Pseudomonas* trans zeatin (*ptz*) *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* 1006 ırkının pCK1 plazmidinden izole edilmiş bir genidir. Bu gen trans-zeatin ve izopenteniladenin gibi sitokinlerin sentezinden sorumludur [18]. Zeytinde hastalık yapan *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*'nin tanısı, yukarıda açıklanan genlere özgül primerler (*iaaL* ve *ptz*) kullanılarak doğrudan PCR yoluyla yapılabilir.

Fasulye bitkisinde hastalık etmeni olan *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* zellikle tohumla taşınmakta ve hale yanıklığı hastalığına neden olmaktadır. Hastalığın ilk belirtileri yaralanmış meyve kabukları ve yapraklarda suyla ıslanmış noktalardır. Daha sonra kahverengi lekeler halinde görülürler. Sulama suyu, rüzgar ve yağmurla beraber serin hava koşulları hastalığın yayılması için uygun bir ortam hazırlar. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ırklarının belirlenmesinde immünolojik yöntemler veya yarı-seçici besiyerinde üretim gibi ęalıřmalar [19] yapılmıştır. Ancak düşük hassasiyette olan bu testler zaman

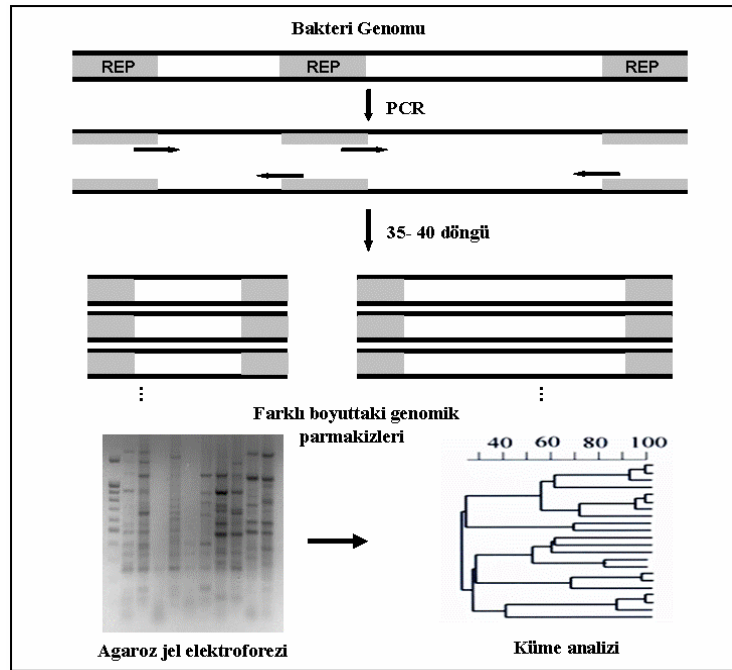
kaybı ve sık sık yanlış pozitif sonuçlar verdiklerinden rutin olarak kabul görmemiştir [20]. Bu bakteri faseolotoksin adındaki bileşeni üreterek bitkide sistemik enfeksiyonlara neden olur. Faseolotoksin'in başlıca etkisi bitkideki arginin biyosentezi için gerekli olan ornitinkarbomil transferaz (OCTaz) enzimini inhibe etmesidir [21]. Fakat *P. syringae* pv. *phaseolicola* ırkları bu enzimle beraber faseolotoksine dirençli olan OCTaz enzimini de sentezleyerek toksinin etkisinden kendilerini korurlar. Bu enzimin sentezinden sorumlu olan *argK* geni klonlanmış [20] ve dizi analizi yapılmıştır. Bu gene özgül olarak tasarlanan primerlerle *P. syringae* pv. *phaseolicola* ırklarının kesin tanısı yapılabilmektedir.

*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun neden olduğu bakteriyel benek hastalığının belirtileri yapraklarda kahverengi siyah lekeler ve meyvelerde yüzeysel koyu lekeler şeklinde kendini gösterir. Bazen olgun meyveler üzerindeki lekeler klorotik bir sınırla çevrilmiş gözenekler şeklinde olabilir. Patojen yaprak yüzeylerinde, toprakta ve enfekte olmuş bitki artıklarında saprofitik olarak canlı kalır. Tohum üzerinde taşınan bu bakteri yağmurla birlikte yayılır. Hastalık ıslak yapraklarda ve ılıman hava koşullarında (13-25<sup>0</sup>C) gelişir. Bu hastalık belirtilerinin temel nedeni bakteri tarafından üretilen koronatin toksinidir. Koronatin, *Pseudomonas syringae* bakterisinin diğer patovarlarında da (*Pseudomonas syringae* pv. *atropupurea*, *glycinea*, *maculicola* ve *morspurunorum*) üretilmektedir ve koronafasik ile koronamik asit adı verilen iki kimyasal bileşikten oluşur. Bu toksini üreten gen bölgesi *P. syringae* pv. *glycinea* PG4180 bakterisinden daha önce izole edilmiştir. Bu iki kimyasal bileşiği inaktif yapan mutasyonların koronatin biyosentezinden sorumlu gen bölgesindeki koronafasat ligaz (*cfI*) denilen tek bir açık okuma çerçevesinde olduğu bilinmektedir [22]. Böylece dizisi bilinen *cfI* bölgesine özgül primerler ile bu patovarların tanısı yapılabilmektedir.

Bu tez çalışmasında genetik tiplendirme amacıyla bazı gen dışı tekrarlı bölgelerin çoğaltımı yapılmıştır. Bu diziler “tekrarlı gen dışı palindromik” (REP), “enterobakteriyel tekrarlı genler arası ortak diziler” (ERIC) ve BOX

elementidir. İlk kez bakteri genomlarında rastlanan REP dizilerinin, operonların anlatım yapmayan kısımlarında bulunan düzenleyici bölgeler olabileceği [23] bildirilmiştir. Bu dizilerin PCR ile çoğaltımı çok sayıda genomik parmak izi oluşturduğundan başta bakteri ve mantar türlerini ayırt etmede ve filogenetik çalışmalarda yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu organizmalar arasında *Rhizobium* [24], *Frankia* [25]; *Staphylococcus* [26], *Legionella* [27], *Xhantomonas* [28], *Pseudomonas* [28], *Streptomyces* [29] ve *Clavibacter* [30] gibi bakteri cinsleri ile *Aspergillus* [31] ve *Fusarium* [32] gibi mantar grupları da bulunmaktadır. REP-PCR'nin işleyiş mekanizması temel olarak iki komşu REP dizisi arasındaki DNA'nın çoğaltımı şeklindedir (Şekil 2.1). REP elementleri arasındaki bu bölgeler türler arasında ve tür içi gruplarda farklı uzunlukta olacağından genotiplere özgül parmak izlerinin üretimi sağlanır.

ERIC dizileri [33] önceki çalışmalarda bakterilerin yanı sıra ökaryot ve bakteriyofajları ayırmada da kullanıldığından potansiyel olarak beklenenden daha geniş bir organizma grubuna uygulanabilmiştir [34]. Bu dizilerin çoğaltımında kullanılan evrensel olarak nitelendirilen primer çifti [2] çok sayıda bakteri türünde çalışılmıştır [24, 28, 30].



Şekil 2. 1: REP- PCR yönteminin işleyiş mekanizması.

BOX dizileri ise ilk kez *Streptococcus pneumoniae* bakterisinin genomunda, genler arası bölgelerde belirlenmiştir [35]. Bu diziler boxA, boxB ve boxC olmak üzere üç alt birimden oluşmaktadır. BOX-PCR’da hedef DNA dizisinin çoğaltımı için tek bir primer kullanılır. Bazı bakteriler için BOX-PCR’a dayalı genetik tiplendirme çalışması yapılmıştır [29, 30].

Günümüze kadar *Fusarium* cinsleri ile yapılan tiplendirme çalışmalarında genellikle ürettikleri mikotoksinlerin biyosentez yollarına ait gen dizileri kullanılmıştır [36]. Ayrıca *Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum*’un Avrupa ve Asya orijinli tarla populasyonlarında genetik çeşitliliği ortaya koymada RAPD yöntemi kullanılmıştır [37]. *Fusarium*’un *F. graminearum* ve *F. culmorum* dışındaki farklı iki türünü (*F. proliferatum* ve *F. fujikuroi*) ayırt etmek amacıyla yapılan bir diğer çalışmada 28S rRNA tiplendirmesinin yetersiz kaldığı görülmüş ve REP-PCR uygulanmıştır [38]. Sonuç olarak REP-PCR’ın bu mantar türlerini ayırt edici özelliğinden dolayı potansiyel olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Ülkemizde ise etkili bir patojen grubu olan *Fusarium* türleri üzerinde PCR’a dayalı herhangi bir tiplendirme çalışması bulunmamaktadır.

Domates yetiştiriciliğinde çok önemli bir patojen olan *P. syringae* pv. *tomato*’nun tanısı önceleri özgül DNA problemleri ile işaretleme ve genomda az sayıda kesim bölgesi olan restriksiyon endonükleazlarının kullanımıyla başarılmıştır [28]. Ancak bu yöntemlerin yeteri kadar hızlı olmayışı nedeniyle bunların yerine REP, ERIC ve BOX-PCR uygulandığında izolatların açık olarak ayırt edildiği görülmüştür. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ve *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* arasındaki farklılık ve yakınlıkları belirlemede sadece ERIC-PCR [39] veya ERIC ve REP-PCR birlikte kullanılarak sonuçlar değerlendirilmiş ve farklılıkların konak orijinlerine bağlı olabileceği öngörülmüştür [40]. *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*’de son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise İtalya orijinli 11 zeytin ağacı varyetesinden toplanan 360 izolat arasındaki genetik yakınlıklar REP, ERIC ve BOX-PCR yöntemleri ile ayrıntılı olarak incelenmiştir [41].

Bu tez çalışması kapsamında farklı coğrafik bölgelerde hastalık oluşturan *Pseudomonas* ve *Fusarium* türlerine ait ırk ve izolatların çoğunluğu bitki hastalıkları ile çalışan kişilerden sağlanmıştır. Zeytin ağaçlarında hastalık etmeni olan *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* izolatları ise ağaç dallarından uygun yöntemler kullanılarak izole edilmiştir. Bu mikroorganizmaların genetik tanısı literatürde belirtildiği şekilde yukarıda orijinleri açıklanan primer dizileri kullanılarak yapılmıştır. REP, ERIC ve BOX dizilerinin çoğaltımı sonucu genomik parmak izleri oluşturulmuş ve seçilen patojen ırkları arasındaki benzerlik/farklılıklar bilgisayar programı aracılığıyla analiz edilmiştir.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3. 1. PATOJEN MATERYALİ

Çalışmada zeytin, domates ve fasulye bitkilerinde hastalık yapan *Pseudomonas*'a ait ırk ve izolatlar ile arpa ve buğdayda hastalık yapan *Fusarium*'a ait ırklar kullanıldı. Bu örneklerin orijinleri, konak bitkileri ve sağlayan kuruluşlar Tablo 3. 1 de verilmiştir. Bakteri ve mantar izolatlarının bir kısmı üretilerek PCR çalışmalarında doğrudan kullanılmış, diğer bir kısmı ise hastalıklı bitki materyalinden izole edilmiştir.

**Tablo 3. 1:** Çalışmada kullanılan patojenler.

Patojenin Adı / No'su	Konak Bitki	Sağlayan Kurum	Orijin
<i>F.graminearum</i> (1)	Buğday ve Arpa	19 Mayıs Üniversitesi	Sakarya
<i>F. graminearum</i> (2)	Buğday ve Arpa	19 Mayıs Üniversitesi	Sakarya
<i>F. graminearum</i> (4)	Buğday ve Arpa	19 Mayıs Üniversitesi	Sakarya
<i>F. graminearum</i> (5)	Buğday ve Arpa	19 Mayıs Üniversitesi	Sakarya
<i>F. graminearum</i> (4W)	Buğday ve Arpa	19 Mayıs Üniversitesi	Balıkesir
<i>F. culmorum</i> S.11-9-1	Buğday ve Arpa	19 Mayıs Üniversitesi	Marmara
<i>F. culmorum</i> 27 K	Buğday ve Arpa	19 Mayıs Üniversitesi	Konya
<i>F. culmorum</i> 56.4 -1	Buğday ve Arpa	19 Mayıs Üniversitesi	Marmara
<i>F. culmorum</i> S.10 41-2	Buğday ve Arpa	19 Mayıs Üniversitesi	Marmara
<i>P. s.pv. phaseolicola</i> (Psp-3)	Fasulye	Ankara Ziraî Müc. Merk. Arş. Ens.	Ankara
<i>P. s. pv. phaseolicola</i> (Psp-18)	Fasulye	Ankara Ziraî Müc. Merk. Arş. Ens.	Ankara
<i>P. s. pv. phaseolicola</i> (Psp R-52)	Fasulye	Ege Üniversitesi	İzmir
<i>P. s. pv. tomato</i> (Pst)	Domates	Ege Üniversitesi	İzmir
<i>P. s. pv. tomato</i> (Pt-101)	Domates	Ankara Ziraî Müc. Merk. Arş. Ens.	Ankara
<i>P. s. pv. savastanoi</i> *	Zeytin	Atatürk Bahçe Kült. Mer.	Orhangazi
<i>P. s. pv. savastanoi</i> *	Zeytin	Şahıs	Erdek
<i>P. s. pv. savastanoi</i> *	Zeytin	Şahıs	Paşalimanı Adası

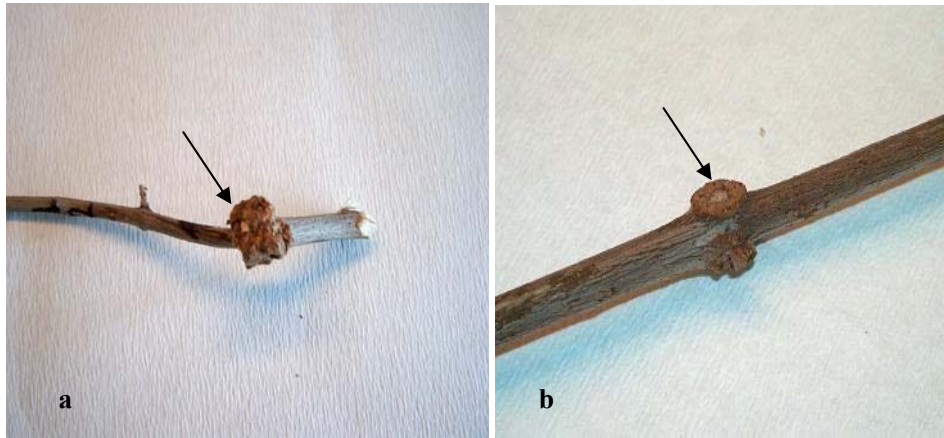
**Tablo 3. 1. devamı**

<i>P. s. pv. savastanoi</i> *	Zeytin	Şahıs	Akhisar
<i>P. s. pv. savastanoi</i> (Pss 14)	Zeytin	Adnan Menderes Üni.	Akdeniz
<i>P.s. pv. phaseolicola</i> NCPPB 52	Fasulye	Ankara Ziraî Múc. Merk. Arş. Ens.	Ankara

\*Hastalıklı bitki kısımlarından bu çalışmada izole edildi.

### 3. 2. BİTKİ TÜMÖRLERİNDEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU

Tablo 3. 1 de gösterilen *P. s. pv. savastanoi* izolatlarının bir kısmı gönderilen bitki örneklerinden laboratuvar şartlarında izole edildi. Çok sayıdaki dallar üzerinde *P. s. pv. savastanoi*'nin oluşturduğu tümörler belirgin şekilde ayırt edildi (Şekil 3.1). Bu dallardan patojen izolasyonu çalışması standart bir yöntem [42] izlenerek aşağıdaki şekilde yapıldı. Özetle, dallar üzerindeki tümörler yıkanarak, farklı yerlerinden küçük parçalar (2x2 mm) kesildi ve içerisinde 2-3 ml steril distile su bulunan tüplere konuldu. 30 dakika bekletildikten sonra bu süspansiyonlardan King B (KB) besiyerine [43] çizgi şeklinde ekim yapıldı. Bu petriyerler 28°C' de 3 gün boyunca bekletilerek kolonilerin oluşumu sağlandı. Daha sonra seçici besiyeri olan PVF-1 [44] besiyerinde üretimlerine devam edilerek izolatların saflaştırılması sağlandı. Bu petriyerlerde elde edilen tek koloniler PCR'da doğrudan kullanıldı.



**Şekil 3. 1:** Akhisar (a) ve Orhangazi (b) den alınan dallarda zeytin dal kanseri hastalığının belirtisi olan tümörlerin genel görünümü.

### 3. 3. BESİYERİ VE KÜLTÜR KOŞULLARI

*Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* için seçici besiyeri olarak PVF-1; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ve *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* için King B (KB) besiyeri; *Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum* izolatları için Sentetik Nutrient Agar (SNA) [45] ve Patates Dekstroz Agar (PDA) [46] kullanıldı. Bu besiyerlerinin bileşenleri Tablo 3. 2’de verildi. Hazırlanan besiyerleri otoklavda (121<sup>0</sup>C, 1. 2 atmosfer basınçta) 15 dakika süreyle tutularak steril edildi.

**Tablo 3. 2:** Bakteri ve mantarların üretimi için kullanılan besiyerleri ve içerikleri.

Besiyerleri	Bileşenler	Miktar (gr/ L)
PVF-1	Sukroz	20
	Gliserol	10 (ml/ L)
	Kasaminoasit ( Difco)	2.5
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.96
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.4
	Sodyum dodesil sülfat (SDS)	0.4
	Agar	16
King B (KB)	Proteaz pepton N3	20
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.5
	Gliserol	15 (ml/ L)
	Agar	15
Sentetik Nutrient Agar (SNA)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
	KNO <sub>3</sub>	1
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5
	KCl	0.5
	Glukoz	0.2
	Sukroz	0.2
	Agar	20
Potato Dekstroz Agar (PDA)	Potato Infusion Solids	4
	Dekstroz	20
	Agar	20

Tüm mikrobiyolojik ekimler laminar hava akımlı steril kabinde (Nüve LN 120 ) yapıldı. *Pseudomonas* izolatlarının 28<sup>0</sup>C etüvde 72 saat boyunca *Fusarium* ırklarının ise doğrudan güneş ışığı almadan ve oda sıcaklığında 7 gün süre ile üremeleri sağlandı.

*Pseudomonas* izolatları üredikleri besiyeri içerisinde 1:1 (v/v) oranında gliserol (%99.5) ile karıştırılıp -80<sup>0</sup>C de uzun süreli saklamaya alındı. *Fusarium* ırkları ise



1:1 (v/v) oranında %15'lik gliserol ile karıştırılarak önce 1 gece -20 °C' de bekletildikten sonra -80 °C'ye alındı.

### 3. 4. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

#### 3. 4. 1. Genlere Özgü Primerle Yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu

*Pseudomonas* izolatlarının PCR'ında tek koloniler kullanıldı. Petride üreyen bakteri kolonilerinden steril kürdan ucuyla çok az bir miktar alınarak steril bidistile su ile karıştırıldı ve doğrudan PCR karışımında kullanıldı. *Fusarium* ırklarının PCR'ında ise genomik DNA izole edilerek PCR karışımına eklendi. PCR karışımı *Pseudomonas* ve *Fusarium* için Tablo 3. 3 de açıklanan miktarlarda yapıldı. Kullanılan primerler Tablo 3. 4 de verilmiştir.

**Tablo 3. 3:** Genlere özgü primerlerle yapılan PCR bileşenlerinin miktarları.

PCR Bileşenleri	PCR Bileşenlerinin Miktarları	
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Fusarium</i>
DNA miktarı	Doğrudan bakteri (10 µl )	100 µg
Primer 1 (ileri)	50 pmol	75 pmol
Primer 2 (geri)	50 pmol	75 pmol
dNTP karışımı	2 µl (2.5 mM)	2 µl (2.5 mM)
MgCl <sub>2</sub>	2.5 µl ( 25 mM)	2.5 µl (25 mM)
10x Enzim Tamponu	2.5 µl	2.5 µl
Taq DNA polimeraz	0.5 U	0.5 U
Toplam hacim*	25 µl	25 µl

\* Karışım toplam hacime bidistile su ile tamamlanır.

PCR makinesinde (Techne Progene) ayarlanan döngülerin ısı ve süreleri *Pseudomonas* için 95°C'de 5 dakika bekletildikten sonra 95°C'de 1; 55°C'de 1 ve 72°C'de 2 dakika olmak üzere toplam 35 döngü ve son olarak 72°C'de 10 dakikadır. *Fusarium* için ise 95°C' de 5 dakika bekletildikten sonra, 95°C'de 1, 57°C'de 1, 72°C'de 1 dakika olmak üzere 40 döngüdür. Son aşamada 72°C'de 10 dakika tutularak PCR sonlandırılmıştır.

**Tablo 3. 4:** Patojenlerin moleküler düzeyde tanısı için kullanılan primerler

Hedef Organizma	Primer Adı	İlgili Gen	Primer Dizisi (5'-3')	Boyut (bp)	Kaynak
<i>F. culmorum</i>	FUSC 1 FUSC 2	-	ATG GTG AAC TCG TCG TGG C CCC TTC TTA CGC CAA TCT CG	570	[12]
<i>F. graminearum</i>	FUSG 1 FUSG 2	-	CTC CGG ATA TGT TGC GTC AA GGT AGG TAT CCG ACA TGG CAA	450	[12]
<i>P. s. pv. savastanoi</i>	Pss 1 Pss 2	<i>ptz</i> geni	TGG GTT GCT ACT TGT ACC GGA CCG TGT ACT ACG TTC AGC GAG	684	[47]
	Pss 5 Pss 6	<i>iaaL</i> geni	GGC ACC AGC GGC AAC ATC AA CGC CCT CGG AAC TGC CAT AC	454	[48]
	Psp 1 Psp 2	<i>argK</i> geni	CAA TGA AGA TTA CAA GCC TG GCT AGC TAT CAG GGG ACG AC	1000	[20]
<i>P. s. pv. phaseolicola</i>	Pst 1 Pst 2	<i>cfI</i> geni	GGC GCT CCC TCG CAC TT GGT ATT GGC GGG GGT GC	650	[22]

### 3. 4. 2. *Fusarium* Miselyumlarından Genomik DNA İzolasyonu

*Fusarium* miselyumlarından genomik DNA izolasyonu Lee ve ark.'dan değiştirilmiş SDS miniprep yöntemine [49] göre yapıldı. Bu yöntemle göre *Fusarium* izolatları % 1.5 PDA besiyerinde (Tablo 3. 2) 6 gün boyunca oda sıcaklığında üretildi. Miselyumların sardığı agarlı besiyerinden 0.5 cm<sup>3</sup> büyüklüğünde bir küp parçası kesildi ve 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Mikrosantrifüj tüpleri sıvı azot ile dolduruldu ve sıvı azotun uçması beklendi. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Hücre duvarını parçalamak için tüplere 2.5 µl proteinaz K ve 500 µl 65<sup>0</sup>C sıcaklıktaki lizis çözeltisi (Tablo 3. 5) eklenerek vorteks ile karıştırıldı. Tüpler her 30 dakikada bir vorteks ile karıştırılarak 65<sup>0</sup>C de su banyosunda 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda proteinlerin ekstraksiyonu için tüplere 500 µl fenol eklenerek 8000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüjleme yapıldı. Üst sıvıdan 450 µl alınarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 450 µl fenol eklenerek tekrar santrifüjleme yapıldı. Üst sıvıdan 400 µl alınarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 400 µl soğuk kloroform/ izoamilalkol (24:1, v/v) eklenerek tekrar santrifüjleme yapıldı. Üst sıvıdan 350 µl yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktararak üzerine 50 µl amonyum asetat (7.5 mM) eklendi ve nazikçe karıştırıldı. Daha sonra tüpe 880 µl soğuk etanol (% 95) eklendi. -20<sup>0</sup>C de 1 gece bekledikten sonra 13000 devir/ dakika'da 20 dakika santrifüjleme yapıldı. Üst sıvı atıldı ve çökelti etanol (%70) ile yıkanarak kurutuldu. Daha sonra çökelti 50 µl bidistile su içinde çözüldü. DNA konsantrasyonu spektrofotometrik yöntem ile ölçüldü ve aşağıda verilen formüle göre hesaplandı. Genomik DNA'lar kullanılıncaya kadar -20<sup>0</sup>C'de saklandı.

$$\text{DNA}(\mu\text{g/ml}): 260\text{nm}'\text{deki OD} \times \text{sulandırım katsayısı} \times \text{katsayı} (50)$$

**Tablo 3. 5:** *Fusarium* genomik DNA izolasyonunda kullanılan lizis çözeltisinin içeriği.

Çözelti	İçerik	Final konsantrasyonu
Lizis çözeltisi	Tris pH 8.0	50 mM
	EDTA	50 mM
	SDS	%3
	β-merkapto etanol	%1
	Proteinaz K	0.1 mg/ml

### 3. 4. 3. Gen Dışı Bölgelere Özgü Primerlerle Yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu

REP, ERIC ve BOX dizilerine özgü primer setleriyle genomik DNA'nın çoğaltımında tüm reaksiyonlarda PCR bileşenlerinin miktarları aynı olmakla birlikte kalıp olarak *Pseudomonas* izolatlarında doğrudan bakteri süspansiyonu (10 µl), *Fusarium* ırklarında ise 100 µg saflaştırılmış DNA kullanıldı. Buna göre diğer bileşenler 50 pmol primer (Tablo 3. 6), 2 µl 2.5 mM dNTP karışımı, 3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 µl 10X Taq DNA tamponu, 1U Taq DNA polimeraz enzimi olarak ayarlandı ve bidistile su ile 25 µl' ye tamamlandı.

REP-PCR yönteminde kullanılan tüm primer dizileri Tablo 3. 6 de verildi. Çalışmamızda Rep 2 primerinin yanısıra, aynı primerin baz dizisindeki "N" pozisyonunda bazı değişiklikler yapılarak farklı primer kombinasyonları elde edildi. Buna göre PCR karışımına eklenen 5 farklı primer kombinasyonu K-1, K-2, K-3, K-4, K-5 olarak isimlendirildi. K-1: Rep 1+Rep 2; K-2: Rep 1+Rep 2A; K-3: Rep 1+Rep 2B; K-4: Rep 1+Rep 2C ve K-5: Rep 1+Rep 2D primerlerini içermektedir. Rep 2A-D serisindeki farklar standart Rep 2 primerinde (5' NCG NCT TAT CNG GCC TAC 3') "N" olarak belirtilen kısımlarda A, T, G veya C'nin bulunmasıdır. Tüm primer dizileri BİOGEN Ltd. Şti. tarafından sentezlendi.

**Tablo 3. 6:** REP, ERIC ve BOX –PCR'da kullanılan primerlerin dizileri.

PCR Türü	Primer Adı	Primer Dizisi (5'- 3')	Kaynak
REP-PCR	Rep 1	*III ICG ICG ICA TCI GGC	[50]
	Rep 2	*NCG NCT TAT CNG GCC TAC	
	Rep 2A	ACG ACT TAT CAG GCC TAC	
	Rep 2B	TCG TCT TAT CTG GCC TAC	
	Rep 2C	GCG GCT TAT CGG GCC TAC	
	Rep 2D	CCG CCT TAT CCG GCC TAC	
ERIC-PCR	ERIC 1	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C	[50]
	ERIC 2	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	
BOX-PCR	BOXA1R	CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G	[51]

\*I: İnosin bazı, N: Rastgele seçilen baz.

PCR koşulları (Creacon T-cy) 94°C' de 5 dakika bekletildikten sonra 94°C' de 1, 34°C' de 1, 72°C' de 2 dakika olmak üzere 40 döngü ve son olarak 72°C' de 15 dakika olmak üzere düzenlendi.

Yapılan tüm PCR uygulamaları en az iki kez tekrarlandı ve özgül olmayan bantlar elenerek değerdendirmeler yapıldı.

#### 3. 4. 4. Agaroz Jel Elektrofözezi

Tanı amaçlı PCR sonucunda elde edilen çoğaltım ürünlerinin analizi için %1'lik, REP, BOX ve ERIC-PCR sonucu oluşan ürünler için %1.5'lik agaroz jeller kullanıldı. Agaroz 1X Tris-asetat (TAE) tamponunda (Tablo 3. 7) eritildi ve DNA'nın ultraviyole ışık altında görünmesini sağlayan etidyum bromür (0.6µg/ml) ilave edilerek elektroföze kasetine döküldü. Jel polimerize olduktan sonra 1x TAE içeren elektroföze tankına yerleştirildi. PCR ürünleri yükleme tamponu (Tablo 3. 7) ile karıştırılarak DNA'nın kuyulara çökmesi sağlandı. DNA'lar 80V elektrik akımında (Thermo EC 250-90) yaklaşık 90 dakika yürütüldü. Daha sonra 312 nm UV ışık altında (Dual-Intensity Transilluminatör B-689) fotoğraflandı.

**Tablo 3. 7:** Agaroz jel elektrofözezinde kullanılan tamponlar.

Tampon	İçerik	Miktar/100ml
Tris-Asetat (TAE) Tamponu	Tris Bazı Glasiyal Asetik Asit EDTA (pH 8.0)	242 gr 57.1 ml 0.5 M (100 ml)
Elektroföze Yükleme Tamponu	Bromo fenol mavisi Sukroz	% 0.25 %40

### **3. 4. 5. PCR Verilerinin Bilgisayar Programında Değerlendirilmesi**

İzolatların küme analizi Jaccard benzerlik indeksine [52] göre hesaplandı. Bu amaçla izolatların 7 set primer ile yapılan PCR analizleri sonucunda elde edilen fotoğrafları üzerinde gözlenen bantların varlığı için 1, yokluğu için 0 değerleri verildi. Dendrogram, Jaccard benzerlik indeksine göre UPGMA bağlantı analizi kullanılarak Coral Draw grafik programı ile çizildi.

## 4. BULGULAR

### 4. 1. SEÇİCİ BESİYERİNDE ÜRETİM

Akhisar, Orhangazi, Erdek ve Paşalimanı Adası'ndan alınan zeytin ağacı dallarından toplam 145 tümörlü kısım kesildi ve 3. 2 de anlatılan yöntem ile bakteri izolasyonu yapıldı. Bu tümörlü örneklerden KB besiyerine ekim yapıldığında 110 tümör örneğinde üreme gözlemlendi. Üreme görülen petrilere seçici besiyeri olan PVF-1'e öze ile azaltma yöntemiyle ekim yapıldığında 7 petride koloniler üredi (Şekil 4. 1). Bu kolonilere verilen isimler ve orijinleri Tablo 4. 1 de belirtildi. Erdek ve Paşalimanı Adası'ndan alınan dallardaki tümörlerin hiçbirinden koloni elde edilemedi.



Şekil 4. 1: Dallardan izole edilen bakterilerin seçici besiyerinde oluşturduğu koloniler.

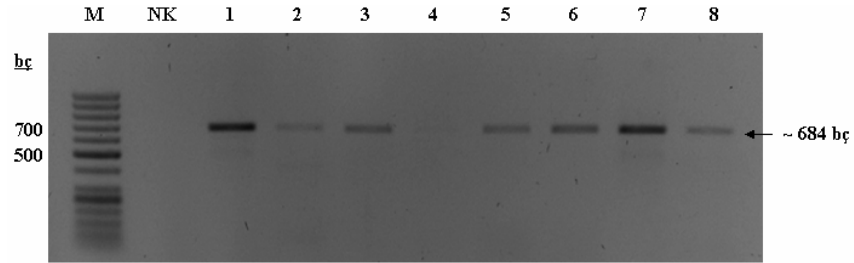
Tablo 4. 1: Tümörlerden izole edilen ve PVF-1 besiyerinde üreyen *P.s. pv. savastanoi* kolonilerinin listesi.

Patojenin Adı	Hastalık / Konak	Orijin
<i>P.s. pv. savastanoi</i> 7A	Zeytin Dal Kanseri/Zeytin	Orhangazi
<i>P.s. pv. savastanoi</i> 9A	Zeytin Dal Kanseri/Zeytin	Orhangazi
<i>P.s. pv. savastanoi</i> 7D	Zeytin Dal Kanseri/Zeytin	Orhangazi
<i>P.s. pv. savastanoi</i> 4B	Zeytin Dal Kanseri/Zeytin	Orhangazi
<i>P.s. pv. savastanoi</i> M-9	Zeytin Dal Kanseri/Zeytin	Akhisar
<i>P.s. pv. savastanoi</i> M-25	Zeytin Dal Kanseri/Zeytin	Akhisar

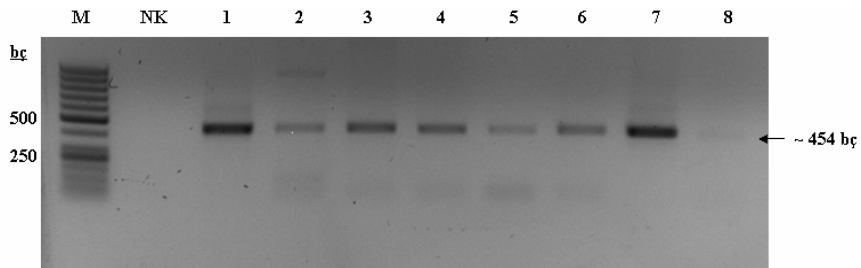
## 4. 2. İZOLATLARIN PCR İLE GENETİK TANISI

### 4. 2. 1. *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*

*P.s.* pv. *savastanoi* izolatlarının tanısında Tablo 3. 4 de belirtilen iki farklı primer seti kullanıldığında beklenen boyutlarda bantlar elde edildi. *Ptz* geni orijinli Pss 1 ve Pss 2 primerleri ile yapılan uygulamada 684 bç'lik (Şekil 4. 2); *iaaL* geni orijinli Pss 5 ve Pss 6 primerleri ile yapılan uygulamada ise 454 bç'lik DNA bantları elde edildi (Şekil 4. 3).



**Şekil 4. 2:** *P.s.* pv. *savastanoi* izolatlarına *ptz* geni orijinli Pss 1 ve Pss 2 primerleri ile yapılan PCR analizi. **M:** Markır, **NK:** Negatif kontrol, **1:** Pss 14, **2:** Pss 7A, **3:** Pss 9A, **4:** Pss 8A, **5:** Pss 7D, **6:** Pss 4B, **7:** Pss M-9, **8:** Pss M-25.

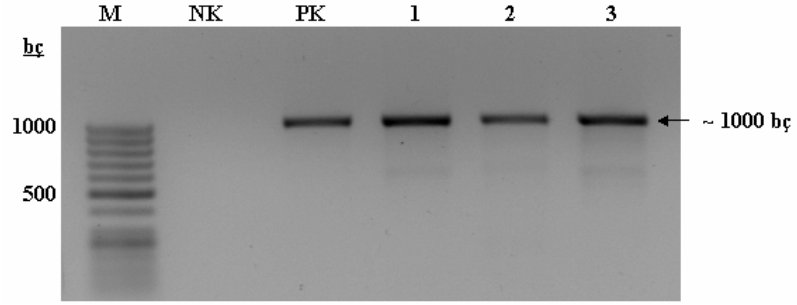


**Şekil 4. 3:** *P.s.* pv. *savastanoi* izolatlarına *iaaL* geni orijinli Pss 5 ve Pss 6 primerleri ile yapılan PCR analizi. **M:** Markır, **NK:** Negatif kontrol, **1:** Pss 14, **2:** Pss 7A, **3:** Pss 9A, **4:** Pss 8A, **5:** Pss 7D, **6:** Pss 4B, **7:** Pss M-9, **8:** Pss M-25.



#### 4. 2. 2. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

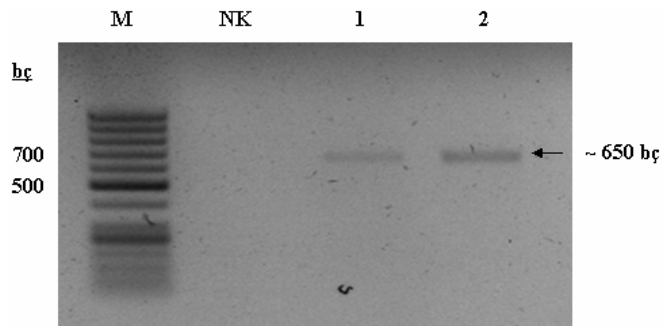
Bu ırklar için Tablo 3. 4 de belirtilen *argK* geni orijinli Psp 1 ve Psp 2 primerleri kullanılarak yapılan PCR'da 1000 bç boyutunda bir bant elde edildi (Şekil 4. 4).



Şekil 4. 4: *P. s. pv. phaseolicola* ırklarının PCR analizi. **M**: Markır, **NK**: Negatif kontrol, **PK**: Pozitif kontrol ( NCPPB 52 ), 1: Psp R-52, 2: Psp-3, 3: Psp-18.

#### 4. 2. 3. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

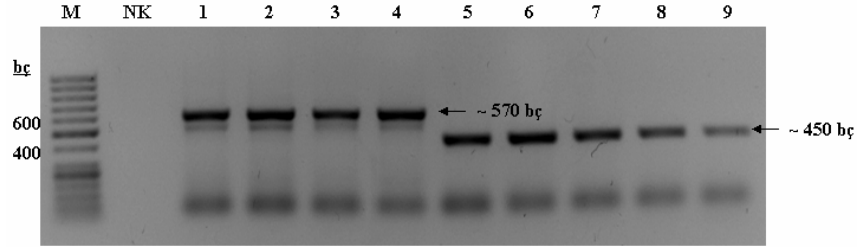
*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun iki ırkı için Tablo 3. 4 de belirtilen *cfI* geni orijinli Pst 1 ve Pst 2 primerleri kullanılarak yapılan PCR'da 650 bç boyutunda bir bant elde edildi (Şekil 4. 5).



Şekil 4. 5: *P. s. pv. tomato* ırklarının PCR analizi. **M**:Markır, **NK**: Negatif kontrol, 1: Pt-101, 2: Pst.

#### 4. 2. 4. *Fusarium culmorum* ve *Fusarium graminearum*

Bu ırkların tanısında sırasıyla Tablo 3. 4 de belirtilen FUSC 1, FUSC 2 ve FUSG 1, FUSG 2 primerleri kullanıldı. *F. culmorum* (Kuyu No: 1-4) için 570 bç ve *F. graminearum* (Kuyu No: 5-9) için 450 bç boyutunda bantlar elde edildi (Şekil 4. 6).



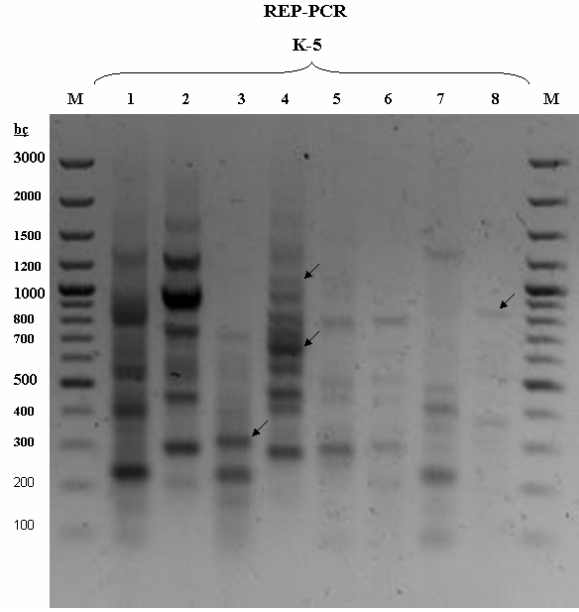
**Şekil 4. 6:** *F. culmorum* ve *F. graminearum*'un PCR ile genetik tanısı. **M:** Markır, **NK:** Negatif kontrol, **1:** *F. culmorum* S 11 9.1, **2:** *F. culmorum* 56 4.1, **3:** *F. culmorum* 27K **4:** *F. culmorum* S 10 41. 2, **5:** *F. graminearum* (1), **6:** *F. graminearum* (4), **7:** *F. graminearum* (2), **8:** *F. graminearum* (4W), **9:** *F. graminearum* (5).

#### 4. 3. REP, ERIC VE BOX-PCR BULGULARI

##### 4. 3. 1. *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*'de REP-PCR'a Dayalı Genetik Tiplendirme

Bölüm 3. 4. 3 de anlatılan primer çiftlerini içeren karışımlarla yapılan REP-PCR uygulamasının sonucu Şekil 4. 7 ve Şekil 4. 8 de görülmektedir. Buna göre, Marmara izolatları (Kuyu No: 2-6) 3000-100 bç, Ege izolatları ( Kuyu No: 7 ve 8) 1600-100 bç ve Akdeniz ırkı (Kuyu No: 1) 1300-200 bç arasında bantlar verdi. Bu izolatlar arasındaki çeşitliliği en fazla gösteren primer setleri K-1, K-2 ve K-5 oldu. Sonuç olarak kullanılan primer setleri izolatların çoğunda özgül genomik parmak izleri oluşturdu. Bu genotipleri ayırt edici bantlar oklarla gösterildi (Şekil 4. 7 ve Şekil 4. 8).

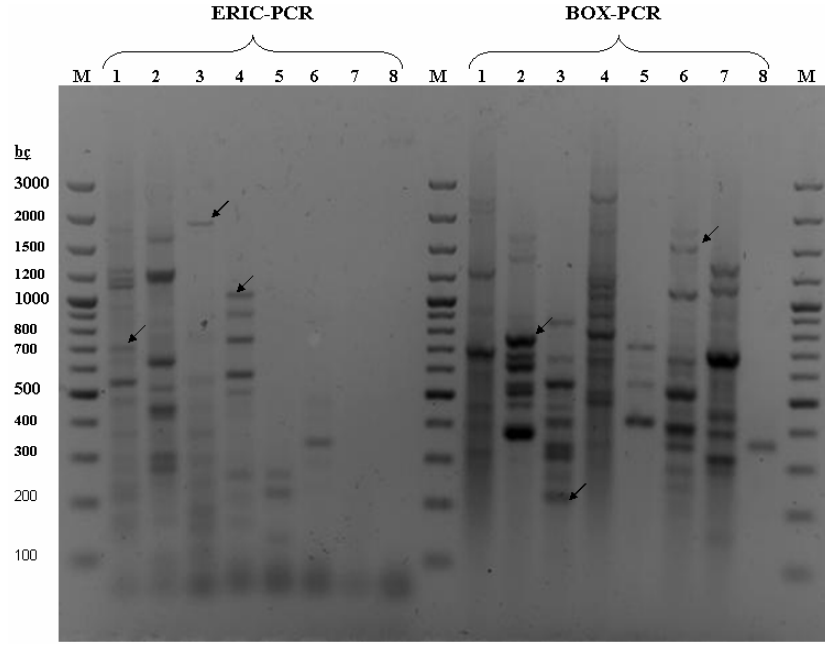




**Şekil 4. 8:** *P.s. pv. savastanoi* izolatlarının K-5 primer kombinasyonu kullanılarak yapılan REP-PCR sonucunda elde edilen parmak izleri. **M:** Markır, **1:** Pss 14, **2:** Pss 7A, **3:** Pss 9A, **4:** Pss 8A, **5:** Pss 7D, **6:** Pss 4B, **7:** Pss M-9, **8:** Pss M-25.

#### 4. 3. 2. *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*'de ERIC ve BOX-PCR'a Dayalı Genetik Tiplendirme

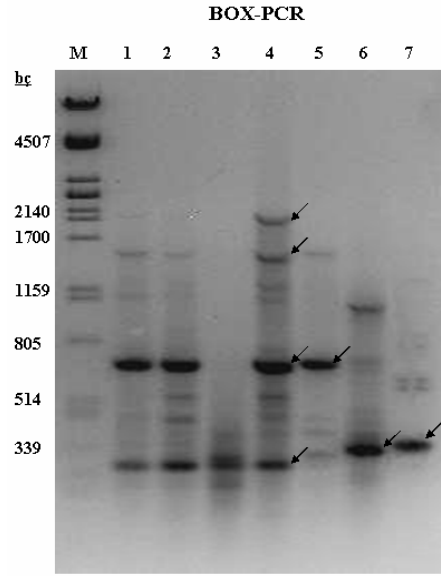
ERIC ve BOX-PCR uygulamaları sonucunda *P. s. pv. savastanoi* izolatlarında üretilen genomik parmak izleri Şekil 4. 9 da görülmektedir. BOXA1R primeri ile ERIC 1 ve ERIC 2 primerlerine göre daha fazla ve belirgin bantlar oluştu. Ayırt edici bantlar şekil üzerinde oklarla gösterilmiştir.



**Şekil 4. 9:** *P.s. pv. savastanoia* izolatlarının ERIC ve BOX- PCR uygulamaları sonucunda oluşan genomik parmak izleri. **M:** Markır, **1:** Pss 14, **2:** Pss 7A, **3:** Pss 9A, **4:** Pss 8A, **5:** Pss 7D, **6:** Pss 4B, **7:** Pss M-9, **8:** Pss M-25.

#### 4. 3. 3. *Pseudomonas*'ın Üç Patovarında BOX-PCR Bulguları

*Pseudomonas syringae*'nin fasulye, domates ve zeytinde hastalık yapan 3 patovarını (*P. syringae* pv. *pahseolicola*, *P. syringae* pv. *tomato* ve *P. syringae* pv. *savastanoi*) tiplendirmek amacıyla yapılan PCR çalışmaları sonucunda sadece BOX dizileri değerlendirilebilen parmak izleri oluşturdu. Buna göre, her üç patovar için ayırt edici DNA bantları elde edildi (Şekil 4.10). Bunlar *P. s. pv. phaseolicola*'yı diğer iki patovardan ayıran yaklaşık 700 ve 200 bç'lik bantlar (Şekil 4. 10, Kuyu No: 4); *P. s. pv. savastanoi*'ye özgü 700 bç. civarındaki tek bant (Şekil 4.10, Kuyu No:5) ve *P. s. pv. tomato*'nun ürettiği 250 bç. civarındaki iki DNA bantıdır. Ayrıca domates patovarının Ankara orijinli iki irkinden Psp-3, 700 bç'lik bantı vermeyerek (Şekil 4. 10, Kuyu No:3) diğerlerinden ayrılırken, diğeri olan Psp-18 ek olarak iki (2100 ile 1500bç arasında) bant (Kuyu No:4) vererek farklılık göstermiştir. Domates patovarına ait Ankara ve İzmir orijinli iki ırk 250 bç'ye yakın ancak farklılık gösteren DNA bantları oluşturmuştur (Şekil 4.10, Kuyu No: 6 ve 7).



**Şekil 4. 10:** *Pseudomonas* patovarlarında (fasulye, zeytin ve domates) BOX-PCR bulguları. M: Markır, 1: Psp-NCPPB 52, 2: Psp R-52, 3: Psp-3, 4: Psp-18, 5: Pss-14, 6: Pt-101, 7: Pst.

#### 4. 3. 4. *Fusarium culmorum* ve *Fusarium graminearum*'da REP-PCR'a Dayalı Genetik Tiplendirme

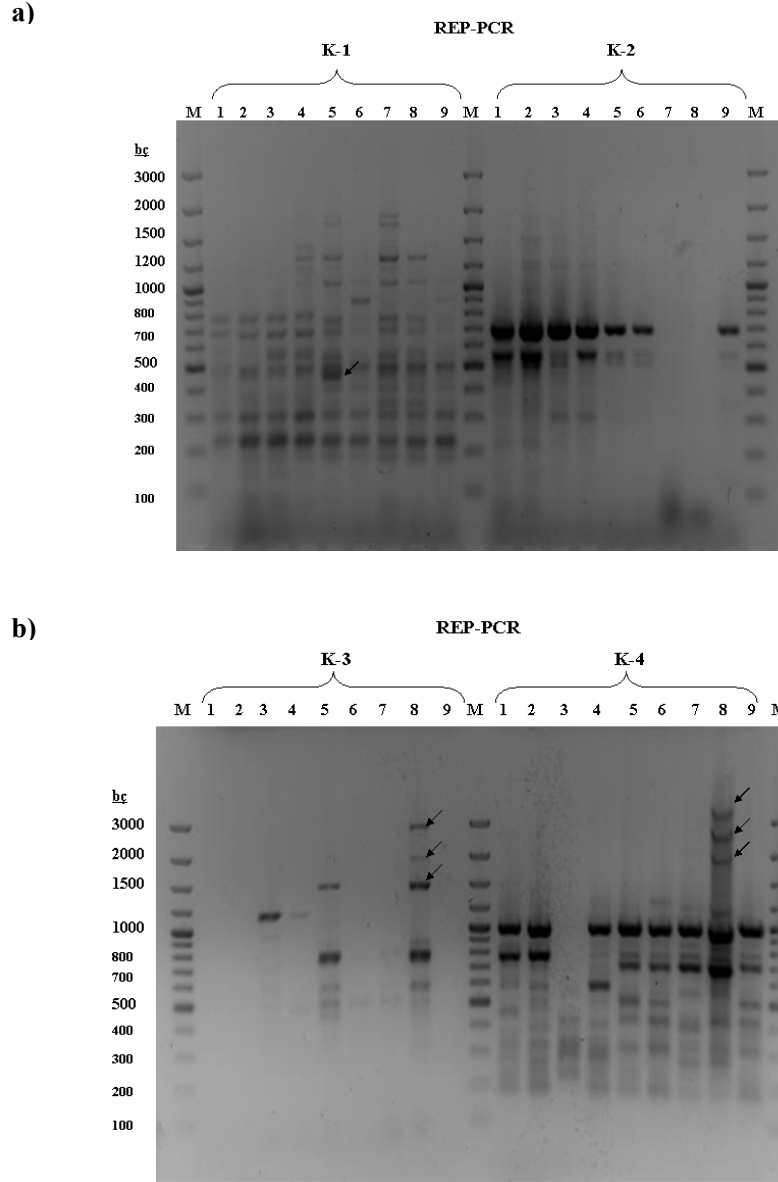
Bundan sonraki bölümlerde bulguların aktarılmasında kolaylık sağlaması açısından *Fusarium* ırkları için kullanılan kısaltmalar Tablo 4. 2 de verilmiştir.

**Tablo 4. 2:** *Fusarium* ırkları için kullanılan kısaltmalar.

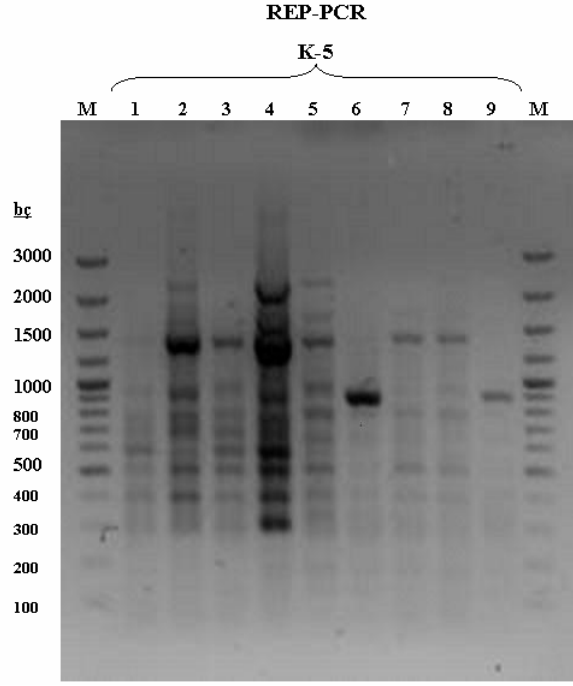
Fusarium Irklarının Adı/No'su	Çalışmada Kullanılan Kısaltmaları	Orijinleri
<i>F. culmorum</i> S-11 9.1	FCMS11	Marmara
<i>F. culmorum</i> 56.4-1	FCM56	Marmara
<i>F. culmorum</i> 27K	FCK27K	Konya
<i>F. culmorum</i> S-10	FCMS10	Marmara
<i>F. graminearum</i> (1)	FGS1	Sakarya
<i>F. graminearum</i> (4)	FGS4	Sakarya
<i>F. graminearum</i> (2)	FGS2	Sakarya
<i>F. graminearum</i> (4W)	FGB4W	Balıkesir
<i>F. graminearum</i> (5)	FGS5	Sakarya

*F. culmorum* ve *F. graminearum*'da elde edilen genomik parmak izleri Şekil 4. 11 ve Şekil 4. 12 de gösterilmiştir. Bu ırklar Tablo 3. 5'de verilen K-1, K-4 ve K-5 primer çiftleri ile fazla sayıda bant oluştururken, K-2 ve 3 primerleri ile düşük sayıda bant oluşturdukları gözlemlendi. K-1 ile PCR'da FGS1 (Şekil 4.11, Kuyu

No:5) diğ er ırklarda bulunmayan 450 bç.'lik bir bant oluşturdu. K-3 ile PCR'da FGS4W (Şekil 4.11 , Kuyu No:8), 3000, 2000 ve 1500 bç.'lik; K-4'de 3000 bç.'nin üzerinde, 2500 bç. ve 2000 bç. olmak üzere toplam altı tane özgül bant verdi ( Şekil 4.11, Kuyu No:8).



Şekil 4. 11: *Fusarium culmorum* ve *Fusarium graminearum*'un (a) K-1 ve K-2 (b) K-3 ve K-4 primer kombinasyonları ile elde edilen REP-PCR Bulguları. **M**: Markır, **1**: FCS11, **2**: FCM56, **3**: FCK27K, **4**: FCS10, **5**: FGS1, **6**: FGS4, **7**: FGS2, **8**: FGS4W, **9**: FGS5.



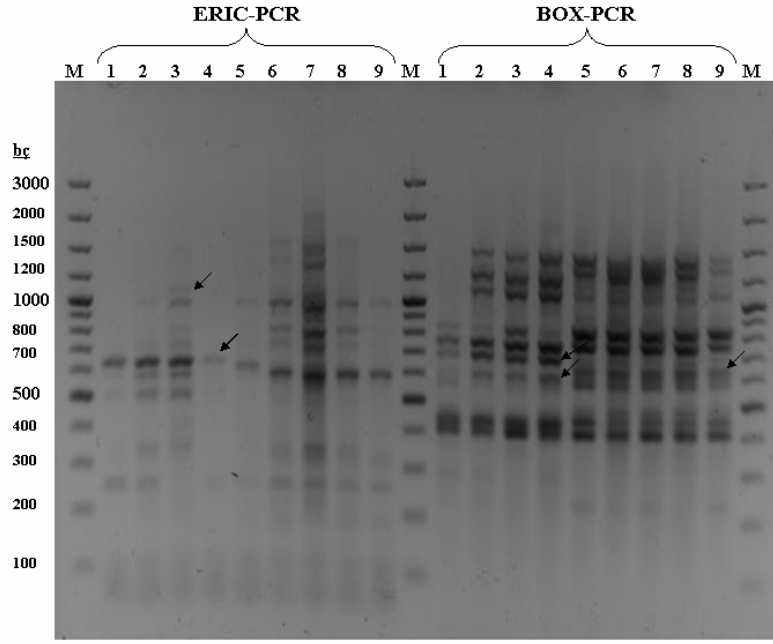
**Şekil 4. 12:** *Fusarium culmorum* ve *Fusarium graminearum*'un K-5 primer setleri ile elde edilen REP-PCR Bulguları. **M:** Markır, **1:** FCS11, **2:** FCM56, **3:** FCK27K, **4:** FCS10, **5:** FGS1, **6:** FGS4, **7:** FGS2, **8:** FGS4W, **9:** FGS5

#### **4. 3. 5. *Fusarium culmorum* ve *Fusarium graminearum*' da ERIC ve BOX-PCR'a Dayalı Genetik Tiplendirme**

*Fusarium culmorum* ve *Fusarium graminearum* ırklarında BOX primerleri ile ERIC primerlerine göre daha belirgin ve fazla sayıda bant elde edildi. ERIC-PCR ile *F. culmorum* türleri için ortak olan yaklaşık 650 bp'lik bir bant gözlendi (Şekil 4.13, Kuyu No: 4). Ayrıca *F. culmorum* 27K için yaklaşık 1100 bp.'lik ( Şekil 4.13, Kuyu No: 3) ayırt edici bantlar gözlendi .

BOX-PCR sonucunda *F. culmorum* için 700 ve 600 bp'lik iki ortak bant ( Şekil 4. 13, Kuyu No: 4), *F. graminearum* için ise yaklaşık 650 bp'lik ortak bir bant gözlendi (Şekil 4. 13, Kuyu No: 9).





**Şekil 4. 13:** *Fusarium culmorum* ve *Fusarium graminearum*'un ERIC ve BOX-PCR Bulguları. M: Markır, 1: FCS11, 2: FCM56, 3: FCK27K, 4: FCS10, 5: FGS1, 6: FGS4, 7: FGS2, 8: FGS4W, 9: FGS5.

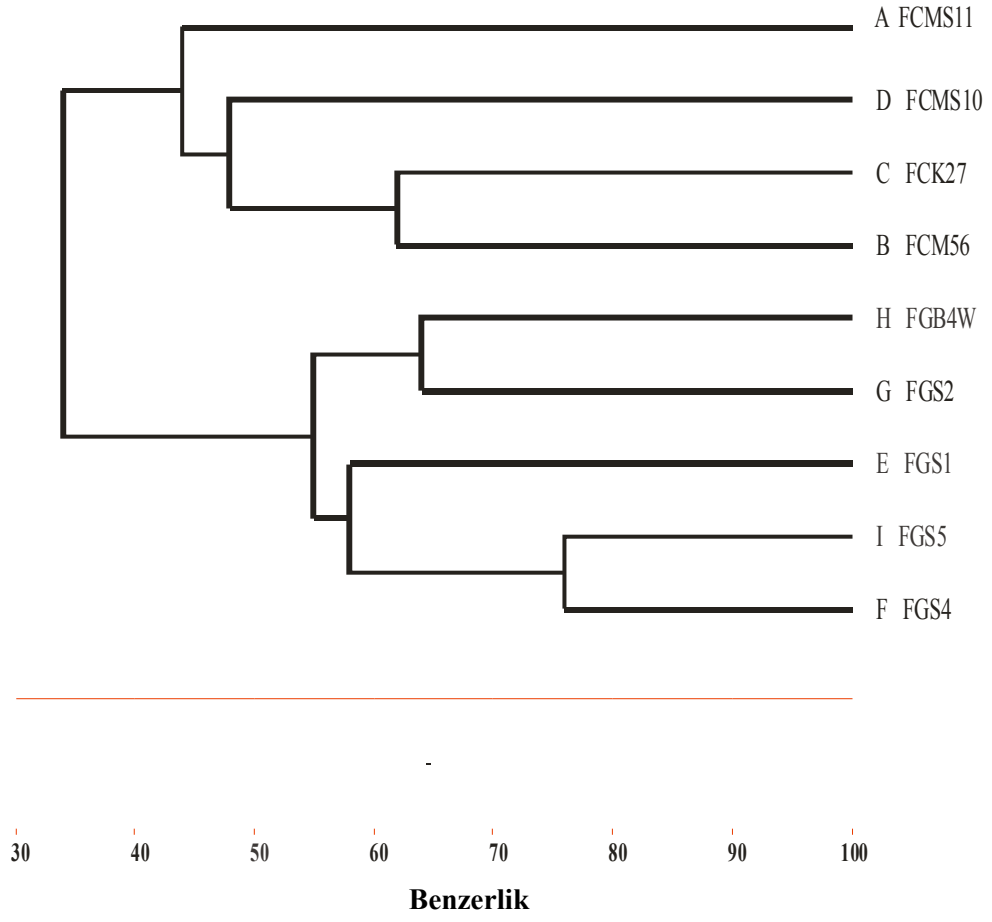
#### 4. 3. 6. *Fusarium* REP, ERIC ve BOX-PCR Sonuçlarına Göre Oluşturulan Dendrogram

Farklı bölgelerden toplanan *Fusarium*'ların REP, ERIC ve BOX-PCR sonuçları birlikte değerlendirilerek Jaccard benzerlik indeksi hesaplandı (Tablo 4.3) ve UPGMA bağlantı analizi ile dendrogram oluşturuldu (Şekil 4.14 ).

Bu dendrograma göre, Sakarya orijinli FGS4 ve FGS5 ırkları arasında %76, Marmara ırkı olan *F. culmorum* (FCMS11) ile Sakarya ırkı olan *F. graminearum* (FGS4) arasında ise %27 benzerlik olduğu belirlendi. Ayrıca *Fusarium graminearum*'un Balıkesir (FGB4W) ve Sakarya orijinli (FGS2) ırkları arasında tekrarlı diziler bazında %64 oranında benzerlik olduğu belirlenmiştir. *Fusarium culmorum*'un Konya (FCK27K) ve Marmara orijinli ırkları (FCM56) ise %62 oranında benzemektedir.

**Tablo 4. 3:** *Fusarium* ırklarına ait Jaccard benzerlik indeksi.

	<b>FCMS11</b>	<b>FCM56</b>	<b>FCK27K</b>	<b>FCMS10</b>	<b>FGS1</b>	<b>FGS4</b>	<b>FGS2</b>	<b>FGB4W</b>
<b>FCMS11</b>	100							
<b>FCM56</b>	52	100						
<b>FCK27K</b>	40	62	100					
<b>FCMS10</b>	41	46	51	100				
<b>FGS1</b>	31	30	34	48	100			
<b>FGS4</b>	27	29	31	38	56	100		
<b>FGS2</b>	29	35	33	44	57	61	100	
<b>FGB4W</b>	28	31	33	32	57	52	64	100
<b>FGS5</b>	33	32	32	40	60	76	51	54



**Şekil 4.14.** *Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum* izolatlarının REP, ERIC ve BOX-PCR sonuçlarına göre Jaccard benzerlik indeksi hesaplanarak UPGMA bağlantı analizi ile oluşturulan dendrogramı.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanındaki birçok çalışmanın temelini genetik tiplendirme oluşturmaktadır. Özellikle çok sayıda genom projesinin tamamlanmış olması genetik tiplendirme çalışmalarının önemini artırmaktadır. Genetik tiplendirme çalışmaları birçok organizmanın özellikle de mikroorganizmaların tür ve alt tür seviyesinde ayrılabilmesi ve aralarındaki çeşitliliğinin ortaya çıkarılmasını olanaklı kılmaktadır. Bu bağlamda genetik tiplendirme çalışmalarının en büyük faydalarından biri hastalık etmeni olan mikroorganizmaların kesin tanısının yapılabilmesidir. PCR yöntemi hızlı, güvenilir ve kolay olması açısından genetik tiplendirmede sıklıkla kullanılır. Ribozomal genlere dayalı olarak yapılan PCR, rastgele seçilmiş primerlerle yapılan RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) ve genomdaki tekrarlı dizilere özgül primerlerle yapılan REP-PCR yöntemi en önemli örneklerdir. Bunlar arasında REP-PCR, RAPD'den daha güvenilir sonuçlar vermesi ve tekrarlanabilirliği açısından filogenetik bağlantı çalışmalarında doğrudan kullanılmaktadır [53].

Bitkisel patojenlerin tanısı morfolojik ve biyokimyasal özelliklere göre yapılabilmektedir. Ancak bu yöntemler yanıltıcı sonuçlar verebilir ve zaman kaybına neden olur. Ayrıca bu fenotipik belirlemelerde kullanılan bazı kimyasal bileşikler çoğu zaman ticari olarak elde edilemeyebilir. PCR yöntemi ise patojenlerin ürettiği toksinlere ait genler vb gibi özgül DNA dizilerine dayalı olarak tasarlanmış primerler yardımıyla kesin sonuçlar elde etmemizi sağlar. PCR sonuçlarının bir gün içinde değerlendirilebilmesi; genomik DNA veya sulandırılmış kültür kullanılabilmesi bu yöntemin sağladığı kolaylıklardır. Ancak mikroorganizmaların PCR'da doğrudan kullanılması veya saflaştırılmış genomik DNA'larının katılmasının farklı sayıda ve boyutta parmak izleri oluşturacağı unutulmamalıdır. Bu tez çalışmasında DNA saflaştırılması yerine doğrudan kolonilerin kullanımı gerek zaman gerekse maliyet açısından üstünlük sağlamıştır

Bu çalışmada *Pseudomonas* bakterisinin zeytin, domates ve fasulyede hastalık yapan patovaryları ile iki mantar türünün (*Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum*) genetik tiplendirmesi yapıldı. Çalışmada diğer araştırmacılar tarafından sağlanan ve önceden mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlanmış ırkların yanı sıra, zeytin bahçelerinden toplanmış tümörlü dallardan patojen bakterilerin izolasyonu gerçekleştirildi. Tümörlü bitki kısımlarından alınmış *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* içeren solüsyonlardan zengin besiyerine ekim yapıldığında gözlenen yoğun üreme, seçici besiyerine transferden sonra belirgin şekilde azalmıştır (Şekil 4. 1). Benzer olarak bu besiyerinin yayınlandığı ilk çalışmada [44], PVF-1'in saprofit bakterilerin üremesini yüksek oranda (%90'dan fazla) baskıladığı ve *P.s.* pv. *savastanoi* bakterilerinin grimsi beyaz küçük koloniler halinde üremesini sağladığı bildirilmiştir. Çalışmada üretilen bu izolatların PCR ile tanısının yapılabilmesi için reaksiyon koşullarında çeşitli optimizasyonlar (MgCl<sub>2</sub>/dNTP/primer konsantrasyonları ve primer bağlanma ısısı) yapılmıştır. Pss 1 ve Pss 2 primerleri ile yapılan PCR sonucunda beklenen boyuttaki DNA bantlarının belirgin olarak saptanabildiği görülmüş, izolatlarda diğer tiplendirme çalışmalarına devam edilmiştir. Pss 1-Pss 2 primerleri daha önce Akdeniz orijinli izolatlarının tanısında [47]; Pss 5-Pss 6 ise İspanya, İtalya, Fransa ve Amerika orijinli zeytin patovarylarında başarıyla kullanılmıştır. *IaaL* geni orijinli bu primerler, *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Xanthomonas* ve *Erwinia* cinsleri ile *P. syringae* pv. *syringae* de negatif sonuçlar verirken sadece *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* ırklarında ilgili bantı vermiştir [48]. Çalışmada araştırmacılar tarafından sağlanan diğer *Pseudomonas syringae* patovarylarında da benzer olarak genlere özgü ayırt edici bantlar gösterilmiştir (Şekil 4. 2 ve Şekil 4. 3).

Tez çalışmasında *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ırkının belirlenmesi için kullanılan *cfl* genine özgü primer çifti *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Erwinia* cinsleri ile *P. syringae* pv. *phaseolicola*, toksin üretmeyen *P. syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *glycinea* ve *P. syringae* pv. *maculicola* ırklarında negatif sonuçlar verirken, koronatin toksinini üreten diğer üç patovarda (*P. syringae* pv. *artropurpurea*, *P. syringae* pv. *glycinea* ve *P. syringae* pv. *maculicola*) ilgili DNA bantını vermiştir [22]. *P. syringae* pv. *phaseolicola* için kullanılan primerler ise *Agrobacterium*, *E. coli*, *P. syringae* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *artropurpurea*,

*P. syringae* pv. *lisi*, *P. syringae* pv. *syringae* ve *P. syringae* pv. *tomato*'da 1000 bç'lik seçici bant gözlenmemiştir [20]. Bu veriler, kullanılan primer dizilerinin ırkları ayırt edilebilme düzeyini göstermesi açısından önemlidir. Diğer yandan klasik yöntemlerle belirlenerek etiketlenmiş olan ve tarafımıza gönderilen Akdeniz orijinli bir ırkın önceki çalışmalarımızda PCR ile genetik tanısı negatif sonuç vermiştir. Bu durum ülkemizde yapılmakta olan bitki koruma çalışmalarında genetik tiplendirmenin gerekliliğini göstermesi açısından önemlidir. Genetik tanı yöntemlerinin yaygınlaştırılması fenotipik testlerle tanımlanmış ırkların taksonomisini genetik düzeyde doğrularak bu tipteki karışıklıkları önleyebilir.

REP, ERIC ve BOX dizilerine özgül olarak gerçekleştirilen PCR yöntemleri bitki patojenleri arasındaki genetik çeşitliliği ortaya koymada, ürettikleri genomik parmak izlerini kullanarak ırkları tanımlamada ve birbirlerinden ayırmada son derece verimli olarak kullanılmaktadır [2]. Bu PCR uygulamaları bitki hastalıklarının yanısıra çevresel mikrobiyoloji ve tıp alanlarında da kabul görmektedir. Çalışmamızda *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* izolatlarını ayırmada REP, ERIC ve BOX dizileri kullanıldığında en fazla sayıda bant REP-PCR sonucunda elde edildi (Toplam 17 DNA bantı; Şekil 4. 7 (a), Kuyu No:4). Standart REP-PCR yönteminde ters primer dizisinde inosin veya rasgele bir baz kullanılmaktadır. Çalışmamızda bu pozisyonda dört (A, T, G ve C) bazdan birini içeren farklı primer dizileri tasarlandı. Bu primerlerin PCR ürünü oluşturma etkinliğine bakıldığında, *Pseudomonas* izolatları arasında bir fark görülmezken; *Fusarium* ırklarında sitozin ve guanin oranı yüksek olan primerlerin (Rep 2C ve Rep 2D) diğerlerine oranla daha fazla genomik parmak izi oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 4. 11 ve Şekil 4. 12). *Fusarium* genomunda G ve C içeren nükleotid tekrarlarının A ve T içeren motiflere göre daha yaygın olması [54] primerlerin bu bölgelere bağlanma sıklığını artırıyor olabilir.

*Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* izolatlarında gen dışı tekrarlı bölgelerin çoğaltımı sonucu çok sayıda polimorfik DNA bantı elde edilmiştir. Çeşitliliğin nedenlerinden biri tümörlerden izole edilen bakteri popülasyonunun *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*'nin hastalık yapmayan (epifit) ve patojen olan farklı ırklarını içeriyor olabilmesidir. Ayrıca zeytin dal kanserinin sadece Akdeniz

Ülkelerini (İsrail hariç) tehdit eden bir hastalık olması ve *P.s. pv savastanoi*'nin bu bölgelerde yüksek çeşitlilik göstermesi diğer çalışmalarda ortaya konmuştur [41]. Ülkemizde de zeytin ağağlarında görülen çeşitliliğe paralel olarak *P.s. pv. savastanoi* ırklarının da çeşitlenmesi beklenen bir durumdur. Bu konuda ne sürülen iki teoriye göre zeytin ile *P.s. pv. savastanoi* bakterisi birlikte evrim geçirmiş veya bakteri uzun süreçte bitki üzerinde kolonize olarak adaptasyon sağlamıştır [41]. Özellikle zeytin ekiminin yoğun olduğu batı bölgelerimiz bu bakterinin bulunma sıklığı ve çeşitlenmesi açısından kaynak noktası olabilir. Bu yorumu destekleyecek geniş kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır. *P.s. pv. savastanoi*'nin populasyon yapısı ve yayılımının ortaya çıkarılması, epidemiyolojisinin anlaşılması ve gerekli zirai önlemlerin alınmasını şekillendirecektir. Örneğin, genetik çeşitliliğin yüksek olduğu bir populasyonda antibiyotik kullanımının sonuç getirmeyeceği düşünülebilir.

Ülkemizdeki *Fusarium* türlerinin genetik tanısına ilişkin yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında ilk kez *F. graminearum* ve *F. culmorum*'un genetik tanıları Tablo 3. 5 de belirtilen primer dizileri ile yapılarak beklenen boyuttaki bantlar elde edilmiştir (şekil 4. 6). Kullanılan primerler daha önce İngiltere, Fransa ve Kanada gibi ülkelere ait izolatların tanısında kesin sonuçlar vermiştir [12, 46]. *Fusarium* türleri yüksek çeşitlilik göstermeleri, sistematik çalışmalarının zor olması ve ürettikleri mikotoksinlerin biyolojik silah olarak kullanım potansiyellerinin olması [55] nedeniyle hızlı tanı yöntemlerine gereksinim duyulan patojenlerdir. Bitkilerde hastalık yapan üç önemli (diğerleri *Penicillium* ve *Aspergillus*) mantar cinsinden biri olan *Fusarium*'lar konusunda dünyada genetik çalışmaların azlığı dikkat çekmektedir. Bu nedenle ülkemizde zirai açıdan ciddi bir tehdit oluşturan *Fusarium* türlerinin daha fazla sayıda ırklarında genetik tiplendirme yapılması düşünmektedir. Çalışma kapsamında gen dışı tekrarlı dizileri açısından filogenetik yakınlıkları incelenen Marmara, Balıkesir ve Konya orijinli *Fusarium culmorum* ve *graminearum* ırklarının tür içinde yaklaşık %50 benzerlik gösterdiği saptanmıştır. UPGMA'ya göre yapılan küme analizinde *Fusarium culmorum*'un ırkları arasında en yüksek benzerliği Marmara (FCM56) ve Konya (FCK27) ırkları gösterirken (%62); *Fusarium graminearum*'da en yakın iki ırk Sakarya orijinlidir ( FGS5 ve FGS4: %76

benzerlik). Türler arasında ise, *F. graminearum* (Sakarya) ve *F. culmorum* (Marmara) arasında sadece %27 benzerlik vardır.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında PCR'a dayalı yöntemler ile ülkemizde bitkisel hastalıklara yol açan çeşitli bakteri ve mantar ırkları tanımlanmıştır. Elde edilen polimorfik parmak izleri *Pseudomonas*'ın fasulye, domates ve zeytinde hastalık yapan üç patovarını ayırt etmemizi sağlamıştır. *Fusarium* ırklarında elde edilen DNA bantları ise istatistiksel açıdan değerlendirilerek farklılıkların yanı sıra benzerlik oranlarını da ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular bitki koruma programlarında doğrudan kullanılabilir. Ayrıca bu çalışmanın, bitkisel çeşitliliğe paralel olarak patojen çeşitliliğinin de yüksek olması beklenen ülkemizde, genetik tiplendirme çalışmalarının yaygınlaştırılmasında katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



## KAYNAKLAR

1. MANULIS, S., CHALUPOWICZ, L., DROR, O., KLEITMAN, F., 2002, Molecular diagnostic procedures for production of pathogen-free propagation material, *Pest Manag Sci*, 58,1126-1131.
2. LOUWS, FJ., RADEMARKER, JLW., DE BRUIJN, FJ., 1999, The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection and disease diagnosis, *Annu Rev Phytopathol*, 37, 81-125.
3. GOSWAMI, RS., KISTLER HC., 2004, Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops, *Molecular Plant Pathology*, 5 (6), 515-525.
4. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2003, [online], *Giberella zae* PH-1, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list\\_uids=9568](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=9568) [Ziyaret Tarihi: 1.1.2007]
5. NATINOL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, [online], *Fusarium culmorum*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5516> [Ziyaret Tarihi:1.1.2007]
6. STACK, RW., 1999 Return of an old problem: Fusarium Head Blight of small grain, *APSnet Features, The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, U.S.A*
7. ŞİMŞEK, Z., AKTAŞ, H., KONDUR, Y., KOÇAK, E., ÖZDEMİR, I., KARACA, V. 2005, Ülkemizde hububatın önemli zararlısı süne (*Eurygaster* spp.) ile hububatta kök ve kökboğazı çürüklüğü hastalık etmenleri ve mücadele stratejileri, *GAP IV. Tarım Kongresi Bildirileri*, 323-329.
8. BENNETT, JW., KLICH, M., 2003, Mycotoxin, *Clin Microbial Rev*, 16, 497-516.
9. JURADO, M., VÁZGUEZ, C., PATIÑO, B., BONZÀLEZ-JEÀN MT., 2005, PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*, *Systematic and Applied Microbiology*,28, 562-568.
10. O'DONNELL, K., KISTLER, HC., TACKE BK., CASPER, HH., 2000, Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab, *PNAS*, 97 (14), 7905-7910.
11. EDWARDS, SG., O'CALLAGHAN, J., DOBSON, ADW., 2002, PCR- based detection and quantification of mycotoxigenic fungi, *Mycol res* 106 (9), 1005-1025.

12. NICHOLSON, P., SIMPSON, DR., WESTON, G., REZANOOR, HN., LEES, AK., PARRY, DW., JOYCE, D., 1998, Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays, *Physiol Mol Plant Pathology*, 53, 17-37.
13. NICHOLSON P., SIMPSON, DR., WILSON, AH., E., THOMSETT CM., 2004, Detection and differentiation of trichothecene and eniantin-producing *Fusarium* species on small-grain cereals, *Eur J Plant Pathol*, 110, 503-514.
14. BUELL, CR., JOARDAR, V., LINDEBERG, M., SELENGUT, J., PAULSEN, IT., ve diğeri, 2003, The complete genome sequence of *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Proc Natl Acad Sci*, 100(18),10181-10186.
15. JORDAR, V., LINDEBERG, M., JACKSON RW., SELENGUT, J., DODSON, R., 2005, Whole-genom sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A reveals divergence among pathovars in gene involved in virulence and transposition, *J Bacteriol*, 187(18), 6488-6498.
16. COMAI, L., KOSUGE, T., 1980, Involvement of plasmid deoxyribonucleic acid in indolacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*, *J Bacteriol*, 143 (2), 950-957.
17. GLASS, NL., KOSUGE, T., 1986, Cloning of the gene for indolacetic acid-lysine synthetase from *Pseudomonas syringae* subsp, *Savastanoi* *J Bacteriol*, 166, 589-603.
18. POWELL, GK., MORRIS, RO., 1986, Nucleotide sequence and expression of a *Pseudomonas savastanoi* cytokinin biosynthetic gene: homology with *Agrobacterium tumefaciens* *tmr* and *tzs* loci, *Nucleic Acids Research*, 14 (6), 2555-2565.
19. MOHAN, SK., SHAAD, MW., 1987, An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed, *Phytopathology*, 77, 1390-1395.
20. MOSQUEDA-CANO, G., HERRERA-ESTERELLA, L., 1997, A simple and efficient PCR method for specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seeds, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, 463-467.
21. PATIL, SS, KOLATTUKUDY, PE, DIMOND, AE., 1970, Inhibition of ornithine carbomoyl transferase from bean plants by the toxin of *Pseudomonas phaseolicola*, *Plant Physiology*, 46, 752-753.

22. BERESWILL, S., BUGERT, P., VÖLKSCH, B., ULRICH, M., BENDER, CL., GEIDER, K., 1994, Identification and relatedness of coronatine producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products, *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (8), 2924-2930.
23. HIGGINS, CF., AMES, GFL., BARNES WM., CLÉMENT, SM., HOFNUNG, M., 1982, A novel intergenic regulatory element of prokaryotic operons, *Nature*, 298, 760-762.
24. DE BRUIJN, FJ., 1992, Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (7), 2180-2187.
25. MURRY, MA., , ZHANG, D., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, FJ., 1995, Use of repetitive sequence and the polymerase chain reaction (rep-PCR) to fingerprint the genomes of *Frankia* isolates, *Symbiosis*, 19, 223-240.
26. DEL VECCHIO, VG., PETROZIELLO, JM., GRESS, MJ., MCCLESKY, FK., MELCHER, GP., CROUCH, HK., LUPSKI JR., 1995, Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 33(8), 2141-2144.
27. GEORGHIOU, PR., DOGGETT, AM., KIEL, HOFFNER, MA., STOUT, JE., WATSON, DA., LUPSKI, JR., HAMILL, RJ., 1994, Molecular fingerprinting of *Legionella* species by repetitive element PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (12), 2989-2994.
28. LOUWS, FJ., FULBRIGHT, DW., STEPHENS, CT., DE BRUIJN, FJ., 1994, Specific genomic fingerprint of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (7), 2286-2295.
29. SADOWSKI, MJ., KINKEL, LL., BOWERS, JH., SCHOTTEL, JL, 1996, Use of repetitive intergenic DNA sequence to classify pathogenic and disease-suppressive *Streptomyces* strains, *Applied Environmental Microbiology*, 62 (9), 3489-3493.
30. LOUWS, FJ., BELL, J., MEDINA-MORA, CM., SMART, CD., OPGENORT, D., ve diğer, 1998, Rep-PCR mediated genomic fingerprinting: A Rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*, *Phytopathology*, 88, 862-868.
31. VAN BELKUM, A., QUINT, WG., DE PAUW, BE., MELCHERS, WJ., MEIS, JF., 1993, Typing of *Aspergillus* species and *Aspergillus funigatus* isolates by

interrepeat polymerase chain reaction, *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (9), 2502-2505.

32. EDEL, V., STEINBERG, C., AVELANGE, I., LAGUERRE, G., ALABOUVETTE, C., 1995, Comparison of the three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains, *Phytopathology*, 85, 579-585.
33. HULTON, CJS., HIGGINS, CF., SHARP, PM., 1991, ERIC sequences: a novel family of repetitive element in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria, *Molecular Microbiology*, 5 (4), 825-834.
34. GILLINGS, M., HOLLEY, M., 1997, Repetitive element PCR fingerprinting (REP-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC element, *Letters in Applied Microbiology*, 25, 17-21.
35. MARTIN, B., HUMBERT, O., CAMARA, M., GUENZI, E., WALKER, J., MITCHELL, T., Et all, 1992, A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*, *Nucleic Acid Research*, 20 (13), 3479-3483.
36. CHANDLER, EA., SIMPSON, DR., THOMSETT, MA., NICHOLSON, P., 2003, Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes and characterization of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62, 355-367.
37. MIEDANER, T., SCHILLING, AG., GEIGER, HH., 2001, Molecular Genetic Diversity and Variation for Aggressiveness in Populations of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* sampled from wheat fields in different countries, *J. Phytopathology*, 149, 641-648.
38. KANTOYIANNIS, D., REECE, K., HEALY, M., 2003, *Fusarium* discrimination using automated Rep- PCR DNA fingerprinting. *International Society for Human and Animal Mycology 50<sup>th</sup> Annual Meeting, 25-29 May 2003 San Antonio*, 290.
39. VOLKSCH, B., WEINGART, H., 1997, Comparison of ethylene-producing *Pseudomonas syringae* strains isolated from kudzu (*Pueraria lobata*) with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *European Journal of Plant Pathology*, 103, 795-802.
40. MARQUES, ASA., CORBIERE, R., GARDAN, L., TOURTE, C., MANCEAU, C., TAYLOR, JD., SAMSON, R., 2000, Multiphasic approach for the identification of the different classification levels of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*,. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 715-734.
41. SCORTICHINI, M., ROSSI, MP., SALERNO, M., 2004, Relationship of genetic structure of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations from

Italian olive trees and patterns of host genetic diversity, *Plant Pathology* 53, 491-497.

42. SAYGILI H., 1995, *Fitobakteriyoloji*, E. Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Bornova-İzmir, 9944-5822-0-2.
43. KING, EO., WARD, MK., RANEY, DE., 1954, Two simple media for the demonstration of pyocanin and flourescin, *J. Lab. Clin. Med.*, 44, 301-307.
44. SURICO, G., LAVERNICOCCA, P., 1989, A semiselective medium for the isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, *Phytopathology*, 79 (2), 185-190.
45. NIRENBERG, H., 1976, Untersuchungen über die morphologische und biologische differenzierung in der *Fusarium* - sektion *Liseola*, *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem*, 169, 1-117.
46. DEMEKE, T., CLEAR, RM., PATRICK, SK., 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.
47. BASIM, H., ERSOY, A., 2001, Identification of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, olive knot pathogen, by polymerase chain reaction, *Phytopathology Salt Lake 2001 APS. SON. MSA Joint Meeting 25-29 August, USA*, S6.
48. PENYALVER, R., GARCIA, A., FERRER, A., BERTOLINI, E., LÓPEZ, MM., 2000, Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (6), 2673-2677.
49. DUTEAU NM., LESLIE JF., *A simple and rapid procedure for the isolation of DNA for PCR from Gibberella fujikuroi (Fusarium section Liseola)*, [online], Fungal Genetics Stock Center, <http://www.fgsc.net/fgn38/duteau.html>, [Ziyaret Tarihi:13.4.2005].
50. VERSALOVIC, J., KOEUTH, T., LUPSKI, JR., 1991, Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes, *Nucleic Acids Research*, 19 (24), 6823-6831.
51. VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, FJ., LUPSKI, JR., 1994, Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based Polymerase Chain Reaction, *Method Mol Cell Biol*, 5, 25-40.
52. JACCARD, P., 1908, Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vandoise de Science Naturelle*, 44, 223-270.

53. OLIVE, DM., BEAN, P., 1999, Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms, *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (6), 1661-1669.
54. KARAOĞLU, H., LEE, CMY., MEYER, W., 2005, Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes, *Biology and Evolution*, 22 (3): 639-646.
55. RUSSELL, R., PATERSON, M., 2006, Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR, *Process Biochemistry*, 41, 1467-1474.

## **ÖZGEÇMİŞ**

08/11/1978 tarihinde İstanbul'da doğdum. 1995 yılında Fatih Kız Lisesinden mezun oldum. 1996 yılında girdiğim İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2000 yılında mezun oldum. 2003 yılında Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans eğitimime başladım.