ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

BİLECİK ŞEYH EDEBALİ ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Sürme Hastalığı Etmeni (*Tilletia foetida*)'nin Genotipik ve Fenotipik Karakterizasyonu

Ahmet UMAY
Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. İsmail POYRAZ

BİLECİK, 2015

Ref.No: 10083273

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

BİLECİK ŞEYH EDEBALİ ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Sürme Hastalığı Etmeni (*Tilletia foetida*)'nin Genotipik ve Fenotipik Karakterizasyonu

Ahmet UMAY
Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. İsmail POYRAZ

BİLECİK, 2015

Ref.No: 10083273

ANADOLU UNIVERSITY

BILECIK SEYH EDEBALI UNIVERSITY

Graduate School of Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Genotypic and Phenotypic Characterization of Common Bunt Agent (*Tilletia foetida*)

Ahmet UMAY
Doctoral Thesis

Thesis Advisor
Yrd. Doç. Dr. İsmail POYRAZ

BILECIK, 2015

Ref.No: 10083273

BİLECİK ŞEYH EDEBALİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA
JÜRİ ONAY FORMU

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 19/06/2015....tarih ve ....22..... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 09/07/2015 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Ahmet UMAY'ın, *"Sürme Hastalığı Etmeni (Tilletia foetida)'nin Genotipik ve Fenotipik Karakterizasyonu"* başlıklı tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak oy birliği/ oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Yrd. Doç. Dr. İsmail POYRAZ

ÜYE : Prof. Dr. Fahri ALTAY

ÜYE : Prof. Dr. Ali KOÇ

ÜYE : Doç. Dr. Emel SÖZEN

ÜYE : Doç. Dr. Cihan DARCAN

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI BAŞKANI:

ONAY

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun …./…./…..... tarih ve ……/…… sayılı kararı.

İMZA/ MÜHÜR

TEŞEKKÜR

Varoluşumu anlamlı kılana,

Barındıran toprağıma,

Çok sevgili aileme,

Çalışma esnasında her aşamada, bana her türlü desteği veren, değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. İsmail POYRAZ'a,

Tez önerisinden itibaren çalışmalarımızı takip eden, tecrübesi ve desteğiyle devamlı yanımızda olan hocam Prof. Dr. Fahri ALTAY'a

Laboratuar imkanlarını bizimle paylaşan, bilgi ve görüşlerini esirgemeyen hocam Doç. Dr. Emel SÖZEN'e

Çalışmamızda kullanılan izolatların ve hastalık değerlerinin elde edilmesinde, yardımlarını esirgemeyen Eskişehir Geçitkuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü ve değerli görevlileri Aysel ve Özcan YORGANCILAR'a

İsimlerinin burada geçmesini önemsemeyecek, kadim dostlarım ve değerli çalışma arkadaşlarıma,

Bana verdikleri karşılıksız sevgi, destek, emek ve müsamaha için teşekkür ediyorum.

ÖZET

Sürme, Türkiye ve dünyada yaygın olarak görülen ve önemli verim kayıplarına neden olan bir buğday hastalığıdır. Ülkemizde bu hastalığa başlıca iki mantar türü *Tilletia foetida* ve *Tilletia caries* neden olmaktadır. Hastalık etmeninin fungusit kullanımı ve çevresel faktörlere bağlı olarak zamanla direnç kazandığı rapor edilmiştir.

Bu çalışmada, hastalık etmeni *T. foetida'*nın ISSR-PCR yöntemi ile genetik çeşitliğini belirlemek amacıyla, 13 *T. foetida* ve dış grup olarak 1 *T. caries* izolatından klasik CTAB yöntemiyle DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'lar 25 farklı ISSR primeri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR ile çoğaltılan DNA parçaları % 1.2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve digital olarak fotoğraflanmıştır. PCR ürünlerinin bant analizi Phoretix1DPro programı ile gerçekleştirilmiş, binary yöntemiyle elde edilen veriler kullanılarak UPGMA metoduyla Jaccard Benzerlik Matrix'i elde edilmiş ve sürme izolatları arasındaki genetik yakınlık ve uzaklığı gösteren filogenetik ağaç oluşturulmuştur. İzolatların yüksek genetik çeşitliliğe sahip oldukları, *T. foetida*'ya ait yakın lokalitelerin birlikte gruplaştığı ve *T. caries*'in dış grup olarak ayrıldığı görülmüştür. İzolatların filogenetik analiz verileri, sürme hastalığına karşı direnç geni içermeyen hassas Heines VII buğday çeşidine karşı patojenite oranları ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan 25 ISSR primerinden 847 ve 861 numaralı primerlerin türe özgü monomorfik bantlar verdiği belirlenmiş ve bulaşık buğday tohumlarının ekim öncesi tespit edilmesinde bir markör olarak kullanılabilecekleri görülmüştür. İzolatların taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri gerçekleştirilmiş, elde edilen fenotipik karakterli morfolojik analiz verileri ile moleküler yöntemle genotipik karakterli analiz verileri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca, *T. foetida* izole edilen mRNA'lar revers transkripsiyonla cDNA'lara dönüştürülmüş ve PGEM-T Easy plazmit vektörlerine aktarılmıştır. cDNA'ları içeren rekombinant plazmit vektörler XLI-Blue konakçısına transforme edilmiş ve fenotipik karakterizasyon araştırmalarında kullanılması için *T. foetida* patojenine ait ilk kez bir cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Sürme, *Tilletia foetida*, ISSR Markörleri, SEM, cDNA Kütüphanesi.

ABSTRACT

Common bunt is a wheat disease that causes important crop losses and extensively spreads in Turkey and World. Two fungi species that *Tilletia foetida* and *Tilletia caries* primary cause this disease in our country. It has been reported that in time pathogen have become resistant according as fungicide uses and environmental factors.

In this study, for determination of genetic diversity of pathogen *T. foetida* using ISSR-PCR method, DNA isolation of 13 *T. foetida* isolates and 1 *T. caries* isolate as out-group was carried with classical CTAB method. Isolated DNAs were amplified with PCR method using 25 different ISSR primers. Amplified DNA fragments were run in 1.2% agarose gel and digitally photographed. Band analysis of PCR yields was carried using Phoretix 1d pro software, Jaccard similarity matrix was obtained with UPGMA method using data from binary method and phylogenetic tree showing genetic distance and similarity among common bunt isolates was formed. It was observed that isolates have high genetic varieties, close locations of *T. foetida* grouped together and *T. caries* departed from the other isolates as out-group. Phylogenetic analyses data of isolates were compared with pathogenicity rates against Heines VII wheat variety that haven't got resistance genes against common bunt. It was determined that 847 and 861 numbered primers among 25 ISSR primers used in study amplify species-specific bands and it was observed that this primers can use an markers for early detection of contaminated wheat seeds before sowing. Scanning electron microscope (SEM) analyses of isolates were carried and obtained phenotypic morphological data were compared with genotypic molecular analyses data. In addition, isolated mRNAs from *T. foetida* were converted to cDNAs by revers transcription and transferred to PGEM-Teasy plasmid vectors. Recombinant plasmid vectors including cDNAs were transferred to XLI-Blue hosts and at the first time a cDNA library of *T. foetida* pathogen was constructed for using in phenotypic characterization researches.

Keywords: Common bunt, *Tilletia foetida*, ISSR Markers, SEM, cDNA library.

İÇİNDEKİLER

JÜRİ ONAY SAYFASI

TEŞEKKÜR

ÖZET I

SİMGELER VE KISALTMALAR VI

ÇİZELGELER DİZİNİ VIII

ŞEKİLLER DİZİNİ IX

1. GİRİŞ 1

1.1. Sürme Etmeninin Sistematiği 4

1.2. Coğrafi Yaşayış Alanı 5

1.3. Etmenin Bulaşma Şekli ve Yaşam Döngüsü 6

1.4. Sürme Hastalığı ile Mücadele Yöntemleri 8

1.5. Fungus'un Genel Morfolojik Özellikleri 9

1.6. Genetik Çeşitliliği Belirlemede Kullanılan Belirteç Yöntemleri 9
1.6.1. Morfolojik markörler (Belirteçler) 9
1.6.2. Biyokimyasal markörler (Belirteçler) 10
1.6.3. Moleküler markörler (DNA belirteçleri) 10
1.6.3.1. ISSR-PCR yöntemi 12

2. MATERYAL VE METOT 14

2.1. Çalışma Materyali ve Ön Hazırlık: 14

2.2. *T. foetida* Sporlarından Genomik DNA İzolasyonu 15
2.2.1. DNA izolasyon yöntemi 15
2.2.2. DNA'nın spektrofotometre'de ölçümü, miktar ve kalite tayini 17
2.2.3. ISSR-PCR için kalıp DNA hazırlığı 17

2.3. ISSR-PCR Analizleri 17
2.3.1. ISSR-PCR hazırlığı ve koşulları 17

2.3.2. Agaroz jel elektroforezi ile ISSR-PCR ürünlerinin yürütülmesi.....20
2.3.3. ISSR-PCR ürünlerinin görüntülenmesi ve değerlendirilmesi 21
2.3.4. ISSR-PCR sonuçlarının biyoinformatik analizi 21

2.4. Spesifik ISSR Markör'lerinin Tespiti 22
2.4.1. ISSR markör seçimi.....22
2.4.2. Konakçı buğday DNA'sında patojene spesifik ISSR markör'lerinin test edilmesi 22
2.4.2.1. Konakçı buğday çeşitleri ve DNA izolasyonu.....22
2.4.2.2. Konakçı buğday DNA'sında spesifik ISSR markör'lerin PCR ile test edilmesi.....22

2.5. *T. foetida* cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması 23
2.5.1. *T. foetida* total RNA'sının izolasyonu 23
2.5.2. RNA'nın spektrofotometre'de ölçümü, miktar ve kalite tayini.....25
2.5.3. RT reaksiyonu ile cDNA'nın eldesi.....25
2.5.4. cDNA'ya sitozin kuyruğunun eklenmesi (dC tailing) 26
2.5.5. Oligo dG primeri ile cDNA'nın çift ipliğe dönüştürülmesi.....27
2.5.6. RT-PCR (Geri transkripsiyon-Polimeraz zincir reaksiyonu) 28
2.5.7. PCR ürününün plazmit vektöre eklenmesi (Ligasyon) 28
2.5.8. Rekombinant vektörün konakçı bakteri içine taşınması (Transformasyon).....29
2.5.8.1. Besiyeri hazırlığı.....29
2.5.8.2. Konakçı bakteri (Kompetent hücre) hazırlığı 30
2.5.8.3. Transformasyon yöntemi 32
2.5.8.4. Pozitif kolonilerin seçimi.....33
2.5.8.5. Pozitif kolonilerden plazmit izolasyonu 33
2.5.8.6. Plazmitlerde insert varlığının doğrulanması.....34
2.5.8.7. İnsert içeren plazmitlerin dizi analizi.....35
2.5.8.8. Dizi bilgierinin biyoinformatik analizi 35

2.6. *T. foetida*'nın Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi.....35

2.7. Etmenin Patojenisite Etkisinin Belirlenmesi 35

3. BULGULAR.....37

3.1. *T. foetida* Sporlarından Genomik DNA İzolasyonu 37

3.2. Genomik DNA'nın Spektrofotometre'de Ölçümü, Miktar ve Saflık Tayini 37

3.3. ISSR-PCR için Kalıp DNA Hazırlığı.....38

3.4. ISSR-PCR Sonuçları ve Polimorfizm Bilgi İçeriğinin Hesaplanması 39

3.5. Seçilen Spesifik ISSR Markör'lerinin PCR Tekrarları 51

3.6. Konakçı Buğday DNA'sında Spesifik ISSR Markör'lerin PCR ile Test Edilmesi 51

3.7. *T. foetida* cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması 52

3.7.1. *T. foetida* total RNA'sının izolasyonu, spektrofotometrik ölçümü ve görüntülenmesi 52

3.7.2. PCR ürününün plazmit vektöre eklenmesi (Ligasyon) ve rekombinant vektörün konakçı bakteri içine taşınması (Transformasyon) 53

3.7.3. Pozitif kolonilerin şeçimi ve master plate hazırlığı 55

3.7.4. Pozitif kolonilerden plazmit izolasyonu ve plazmitlerde insert varlığının doğrulanması 56

3.7.5. Plazmitlerin DNA dizilerinin belirlenmesi ve biyoinformatik analiz 57

3.8. *T. foetida*'nın Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi 61

4. TARTIŞMA SONUÇ 72

KAYNAKLAR 79

ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

A : Adenin

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)

bç (bp) : Baz çifti

C : Sitozin

CTAB : Cetil Three Metil Amonyum Bromid

DNA : Deoksiribonükleik Asit

dNTP : Deoksinükleotid tri Fosfat

EDTA : Etilendiamin-tetra Asetik Asit Di Sodyum Tuzu

G : Guanin

ISSR : Inter Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Arası Tekrarları)

M : Molar

mg. : Miligram

Mg^{+2} : Magnezyum

$MgCl_2$: Magnezyum klorur

ml : Mililitre

mm : Milimetre

mM : Milimolar

NaOH : Sodyum Hidroksit

ng : Nanogram

nm : Nanometre

PCR : Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)

RAPD : Randomly Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

RE : Restriksiyon Endonükleaz

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi)

SRAP : Sequence Related Amplified Polymorphizm (Dizi-İlişkili Amplifiye Polimorfizm)

SSR : Simple Sequence Repeats (Basit dizin tekrarları)

T : Timin

Taq : Taq polimeraz enzimi

TBE : Tris- borik asit- EDTA

UPGMA : Unweighted pair group method with arithmetic means

UV : Ultraviyole

V : Volt

µg : Mikrogram

µl : Mikrolitre

µM : Mikromolar

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. En fazla kullanılan PCR markörlerinin karşılaştırılması. 11
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan *T. foetida* izolatları, coğrafi orijinleri ve izole edildikleri konakçılar. 14
Çizelge 2.2. Kullanılan ISSR primerleri ile ilgili bilgiler. 18
Çizelge 2.3. Kullanılan ISSR-PCR bileşenleri ve miktarları. 19
Çizelge 2.4. ISSR-PCR uygulama protokolü. 20
Çizelge 2.5. Konakçı DNA ayırımında kullanılan farklı buğday çeşitleri. 23
Çizelge 2.6. Kullanılan RT- PCR bileşenleri ve miktarları. 28
Çizelge 3.1. *Tilletia sp* 'den izole edilmiş genomik DNA'ların miktar ve saflık ölçüm sonuçları. 38
Çizelge 3.2. Kullanılan ISSR primerleri sonucu *T. foetida* ve *T. caries*'te elde edilen bantlaşma sonuçları ve polimorfizm oranları. 49
Çizelge 3.3. *T. foetida* ve *T. caries*'e ait izolatlarına ait 10000X büyütmede hücre boyutları ve hastalık yapma oranları. 71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. *Tilletia* sp.'nin yaşam döngüsü. (http://www.entofito.com/hububatta-surme-hastaliklari-*Tilletia* sp.).....7
Şekil 2.1. *T. foetida* izolatlarının spor görüntüleri.....15
Şekil 2.2. A) Fermantas gene ruler 100 bp DNA ladder plus. B) Fermentas gene ruler 1 kb DNA ladder.....21
Şekil 2.3. pGEM-T Easy plazmiti.....29
Şekil 3.1. CTAB genomik DNA izolasyonu. 1, 3-14. *T. foetida,* 2. *T. caries.*.....37
Şekil 3.2. ISSR-01 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol. 39
Şekil 3.3. ISSR-02 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol. 40
Şekil 3.4. ISSR-10 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol. 40
Şekil 3.5. ISSR-25 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol. 41
Şekil 3.6. ISSR-27 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol. 41
Şekil 3.7. ISSR-28 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol. 42
Şekil 3.8. ISSR-29 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol. 42
Şekil 3.9. ISSR-301 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol. 43
Şekil 3.10. ISSR-309 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol. 43
Şekil 3.11. ISSR-310 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol. 44
Şekil 3.12. ISSR-312 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol. 44

Şekil 3.13. ISSR-324 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol. 45

Şekil 3.14. ISSR-815 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol. 45

Şekil 3.15. ISSR-829 numaralı numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol. 46

Şekil 3.16. ISSR-847 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif Kontrol. 46

Şekil 3.17. ISSR-861 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol. 47

Şekil 3.18. ISSR-862 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol. 47

Şekil 3.19. ISSR-866 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol. 48

Şekil 3.20. 13 *T. foetida* (isolate-1, 3-14) ve *T. caries* (isolate-2) için jaccard benzerlik oranları. 50

Şekil 3.21. *T. foetida* izolatlarında ISSR primerleri kullanılarak oluşturulan dendrogram. 50

Şekil 3.22. ISSR 847 no'lu primer ile *Tilletia* sp.lerde yapılan tekrar ISSR-PCR sonuçları. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: 100 bp plus DNA markör, N: Negatif kontrol. 51

Şekil 3.23. ISSR-847 no.'lu primerin sağlıklı buğdaylardaki ISSR-PCR sonuçları.M: 100 bp plus DNA markör, 1-18: Buğday çeşitleri, N: Negatif kontrol. 52

Şekil 3.24. *T. foetida* Total RNA'sının agaroz jel görüntüsü. M: Fermentas 1 kb DNA markör, 1: 3 numaralı izolat, 2: 7 numaralı izolat, 3: 11 numaralı izolat, 4: 12 numaralı izolat, N: negatif kontrol. 53

Şekil 3.25. Lig-2'nin transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin görüntüsü. 54

Şekil 3.26. Lig-3'ün transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin görüntüsü. 54

Şekil 3.27. Lig-4'ün transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin görüntüsü. 55

Şekil 3.28 Transformasyon kolonilerinin master plate görüntüleri. 56

Şekil 3.29. a-Plazmit izolasyonu sonrası insert taşıyan vektörler, M (1kb DNA leader). Lig-2 (1, 2, 3, 4), Lig-3 (5, 6, 7, 8), Lig-4 (9), b- İnsert içermeyen boş plazmit, M (1kb DNA leader), PK: Boş plazmit kontrolü. 56
Şekil 3.30. G-M13 örneğinin NCBI veri tabanında BLAST analizi sonucu 61
Şekil 3.31. İzolat-1'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.....62
Şekil 3.32. İzolat-2'ye ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.....63
Şekil 3.33. İzolat-3'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.....63
Şekil 3.34. İzolat-4'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.....64
Şekil 3.35. İzolat-5'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.....64
Şekil 3.36. İzolat-6'a ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.....65
Şekil 3.37. İzolat-7'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.....65
Şekil 3.38. İzolat-8'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.....66
Şekil 3.39. İzolat-9'a ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.....66
Şekil 3.40. İzolat-10'a ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.....67
Şekil 3.41. İzolat-11'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.....67
Şekil 3.42. İzolat-12'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.....68
Şekil 3.43. İzolat-13'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.....68
Şekil 3.44. İzolat-14'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.....69

Şekil 3.45. *T. foetida* ve *T. caries'*e ait sporların 10.000X büyütmede tek bireye ait görüntü ve ölçüleri. a: *T. caries* izolat-2, b-i*: T. foetida* izolat 3-14. izolatlar. 70

Şekil 4.1. *Tilletia* izolatlarında ISSR primerleri kullanılarak oluşturulan dendrogram ve hastalık yapma oranları. 73

Şekil 4.2. *T. foetida* ve *T. caries*'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X, 5000X ve 10.000X büyütmede görüntüleri. a:*T. foetida* izolat 1'e ait örnek, b: *T. caries*'e ait izolat 2 örneği. 77

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun artmasına bağlı olarak, açlık ve beslenme problemleri önemli bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Tarımsal ürünler dünyada olduğu gibi Türkiye'de de bütün canlıların başlıca besin kaynağı olması sebebiyle açlık sorununun çözümünün yegane kaynağıdır. Bu nedenle tarımsal ürünler içerisinde tahılların, tahılların arasında da buğdayın önemi tartışılamaz bir gerçektir.

Buğday gerek insanların gerekse hayvanların başlıca besin kaynağı olmasının yanı sıra ekonomik ve sosyal yaşantıda diğer tarım ürünlerine göre daha büyük bir paya sahiptir. Türkiye'de 2006 yılı istatistiki verileri göz önüne alındığında; her yıl işlenen toplam tarım alanlarının (23 milyon ha.) yaklaşık % 57'sinde tahıl yetiştiriciliği, tahıl yetiştiriciliği yapılan bu (13 milyon ha.) alanların % 65'inde de buğday tarımı yapılmaktadır. Türkiye sahip olduğu ekim alanı değerleriyle, yaklaşık 205 milyon hektarlık dünya buğday ekim alanının % 4.6'sını teşkil etmektedir. Üretim değerleri bakımından dünya üretiminin %3.5'i Türkiye tarafından karşılanmaktadır (Miran, 2005; Düşünceli, vd., 2008).

İnsanlık için buğdayın bu kadar önemli olması, organik tarım, yüksek verimli ve kaliteli buğday üretimi adına zararlı patojenlerle ve otlarla mücadeleyi de beraberinde getirmiştir.

Sürme ve rastık, fungal hastalıklar içerisinde başak hastalıkları olarak bilinen ülkemiz ve dünya hububat yetiştiriciliğinde önemli kayıplara neden olan hastalıklardır (Özkan ve Damgacı, 1985; Ciuca, 2011). Bu hastalıkların her ikisi de üründe başakları tahrip ederek zararlı olmaktadırlar. Tohum bulaşıklılığının yoğun ve enfeksiyonun şiddetli olduğu durumlarda üründe önemli kayıplar getirmekle birlikte, özellikle sürmeli danelerin hasat esnasında ürüne karışması sonucu ürünün niteliğini de önemli derecede bozmaktadırlar (Zouhar, vd., 2010; Borgen, 2004).

Buğdayın yetiştirildiği dönemde hastalık ve zararlıların kaliteyi etkilemesi, genel olarak iki şekilde ortaya çıkabilir. Bunlardan birincisi, hastalık ve zararlılar bitkilerin yaprak, gövde, kavuz gibi organlarının üzerini kapatması ya da bu organları tahrip etmesidir. Hem bitkinin fotosentez alanının daralması hem de bu kısımlardan bitki aşırı su kaybettiği için normal gelişememesi ve taneyi de yeterince besleyememesinden

dolayı kalite düşmektedir. İkincisi de, özellikle zararlıların beslenmek için bitki dokularını ve taneyi sokup emmeleri sonucu ya da taneleri yiyerek tahrip etmeleri sonucu ortaya çıkan kalite kayıplarıdır.

Çeşitli buğday ırkları ile en uygun koşullarda ekim ve bakım gerçekleştirilse bile, yetiştirilen ürün hastalık, zararlı ve yabancı otların olumsuz etkilerine karşı korunamazsa bundan istenen verimi elde etmek mümkün olmamaktadır. Çünkü her yıl dünyadaki bitkisel üretimin yaklaşık %35'i hastalık, zararlı ve yabancı otlardan dolayı kayba uğramaktadır (Agrios, 1997). Bu oran hastalık, zararlı ve yabancı otlara karşı mücadele yapıldığı şartlarda ortaya çıkmaktadır. Şayet her hangi bir mücadele yapılmazsa toplam ürünün yaklaşık % 65-90'ı bu tür canlı organizmaların zararıyla ziyan olmaktadır (Nagy ve Moldovan, 2007; Tuncel, 2006; Öztürk, 1997; Ataç ve Çetin, 1995).

Hastalık zararlı ve yabancı otlardan dolayı, toprak ve yer altı sularının tarımsal veya diğer kimyasallar tarafından kirletilmesi önemli bir çevresel sorundur. Pestisitlerin yarım asırdır oldukça yaygın bir şekilde tarımda kullanılması dünyadaki birçok hidrolojik sistemin etkilenmesine neden olmuştur. Pestisitlerin ve kimyasal gübrelerin kullanımıyla karasal çevreye ağır metal girişi toprak ve yer altı suyu kalitesini önemli düzeyde etkilemektedir. Bunların sonucunda toprakların kimyasal özellikleri ve biyolojik aktivitesi kirlenmeden dolayı değişikliğe uğramakta (Yılmaz ve Alagöz, 2008) ve organik tarımın yapılabilmesine engel olmaktadır.

Pestisitler, çoğunlukla tahıllarda mantar, bakteri, virüs ve nematod gibi patojenik özelliğe sahip mikro organizma ve organizmaların hastalık etkilerini minimize etmek veya ortadan kaldırmak için tercih edilmektedir. Bu patojenik etmenlerden; *Tilletia* (sürme), *Puccinia* (pas), *Ustilago* (rastık), *Erysiphe* (külleme), *Septoria* (septorya), *Alternaria* (alternarya), *Fusarium* (fuzaryum), *Helminthosporium* (helminthosporyum), *Xanthomanas, Pseudomanas* (bakteriyel yanıklıklar) ve Barley Yellow Dwarf Virus (Arpa sarı cücelik virüsü) dünyada en yaygın görülen hastalık etmenleridir (Tosun, 2008).

Bu hastalık etmenlerinin içinden buğdaylarda sürme hastalığına sebebiyet veren başlıca mantar türlerini *T. foetida, T. caries, T. contraversa, T. indica, T. intermedia, ve T. triticoides* oluşturmaktadır (Zupunski, vd., 2011; İren, vd., 1982).

Ülkemizde ise *T. foetida* Kuhn (syn. *T. levis, T. laevis* (Wallr.) Liro, *T. foetens* (Berk. & Curt.) Schoert.) ve *T. caries* (Bjerk.) Wint. (syn. *T. tiritici* (DC) Tul). sürme hastalığına neden olan başlıca iki mantar türüdür. Bu türler için yapılan teşhis çalışmaları sonucunda, Türkiye'de *T. foetida*'nın % 88.06 oranında, *T. caries*'in ise % 11.94 oranında yaygınlık gösterdiği saptanmıştır (Finci ve ark 1983; Özkan ve Damgacı 1985). Bu iki türde buğdaydaki belirtilerine göre makroskobik olarak ayırt edilemeyip adi sürme olarak adlandırılmaktadırlar (Gassner ve Göydün, 1938; Özkan, 1956; İren, 1962). Dünyada ise en yaygın olan tür *T. caries'* dir (Ingold, 1997).

Bu çalışmada, Türkiye'de yetiştirilen buğday çeşitlerinde rekolte düşüklüğüne ve kalite kaybına neden olan sürme etmeni *T. foetida* izolatlarının, ISSR-PCR (Basit Diziler Arası Tekrarlar- Polimeraz Zincir Reaksiyonları) yöntemi ile genotipik, SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) analizi ile fenotipik özelliklerinin karakterizasyonu amaçlanmıştır. *T. foetida* izolatlarının genetik çeşitliliği ISSR primerleri kullanılarak moleküler tabanlı yöntemle ortaya çıkarılmış ve bu veriler SEM ile elde edilen morfolojik verilerle karşılaştırarak analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, gelecekte sürme etmeni *T. foetida*'ya karşı geliştirilecek dayanıklı buğday çeşitlerininin ıslah çalışmalarında önemli bir veri olacaktır. Buna ilaveten, çalışmada kullanılan ISSR primerleri arasından türe özgü spesifik bantlar verenler belirlenmiş ve bu primerlerin bulaşık buğday tohumlarının ekim öncesi tespit edilmesinde bir markör olarak kullanımları test edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, fenotipik karakterizasyon araştırmalarında kullanılan cDNA kütüphane oluşturma yöntemi de *T. foetida*'nın spor formu için denenmiş, sporların total RNA'sı izole edilerek revers transkripsiyonla elde edilen cDNA'lar PGEM-T Easy plazmit vektörlerine aktarılarak, patojene ait cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur.

1.1. Sürme Etmeninin Sistematiği

Buğdaylarda sürme hastalığına neden olan sürme etmenleri *T. foetida* ve *T. caries*'in "Index Fungorum" a göre günümüzdeki sınıflandırması ve sinonimleri ise şu şekildedir (http://www.indexfungorum.org/names/names.asp).

- Alem : Fungi
- Bölüm :Basidiomycota
- Alt Bölüm :Ustilaginomycotina
- Sınıf : Exobasidiomycetes
- Takım :Tilletiales
- Familya : Tilletiaceacae
- Genus : *Tilletia*
- Tür : *T. foetida, T. caries*

T. foetida sinonimleri:

- *T. tritici* var. laevis (J.G. Kühn) Kawchuk, in Kawchuk & Nielsen, Can. J. Bot. 66(12): 2376 (1988)
- *T. foetida* (Wallr.) Liro, Maanviljelys Talondellin Koelaitos Vuoskivija 1915-1916: 27 (1920)
- *T. foetens* (Berk. & M.A. Curtis) Trel., (1884)
- *Ustilago foetens* Berk. & M.A. Curtis, in Berkeley, Grevillea 3(no. 26): 58 (1874)
- *Erysibe foetida* Wallr., Fl. crypt. Germ. (Norimbergae) 2: 213 (1833)

T. caries sinonimleri:

- *T. sitophila* (Ditmar) J. Schröt., Beitr. Biol. Pfl. 2(3): 365 (1877)
- *T. tritici* (Bjerk.) G. Winter, Die Brand des Getreide: 13 (1874) var. tritici
- *T. tritici* (Bjerk.) G. Winter, Die Brand des Getreide: 13 (1874) f. tritici
- *T. tritici* (Bjerk.) G. Winter, Die Brand des Getreide: 13 (1874) subsp. Tritici
- *T. tritici* (Bjerk.) G. Winter, Die Brand des Getreide: 13 (1874)
- *T. caries* var. agrostidis Auersw., in Rabenhorst, Fungi europ. exsicc.: no. 700 (1865)

- *T. caries* (DC.) Tul. & C. Tul., Annls Sci. Nat., Bot., sér. 3 7: 113 (1847) var. caries
- *Fusisporium inosculan*s Berk., J. hort. Soc., London 2: 114 (1847)
- *Caeoma sitophilum* (Ditmar) Link, Sp. pl., Edn 4 6(2): 2 (1825)
- *Uredo caries* DC., in de Candolle & Lamarck, Fl. franç., Edn 3 (Paris) 5/6: 78 (1815)
- *Uredo sitophila* Ditmar, in Sturm, Deutschl. Fl., 3 Abt. (Pilze Deutschl.) 3(1): 69 (1813)
- *Lycoperdon tritici* Bjerk., K. svenska Vetensk-Akad. Handl. 36: 326 (1775)

1.2. Coğrafi Yaşayış Alanı

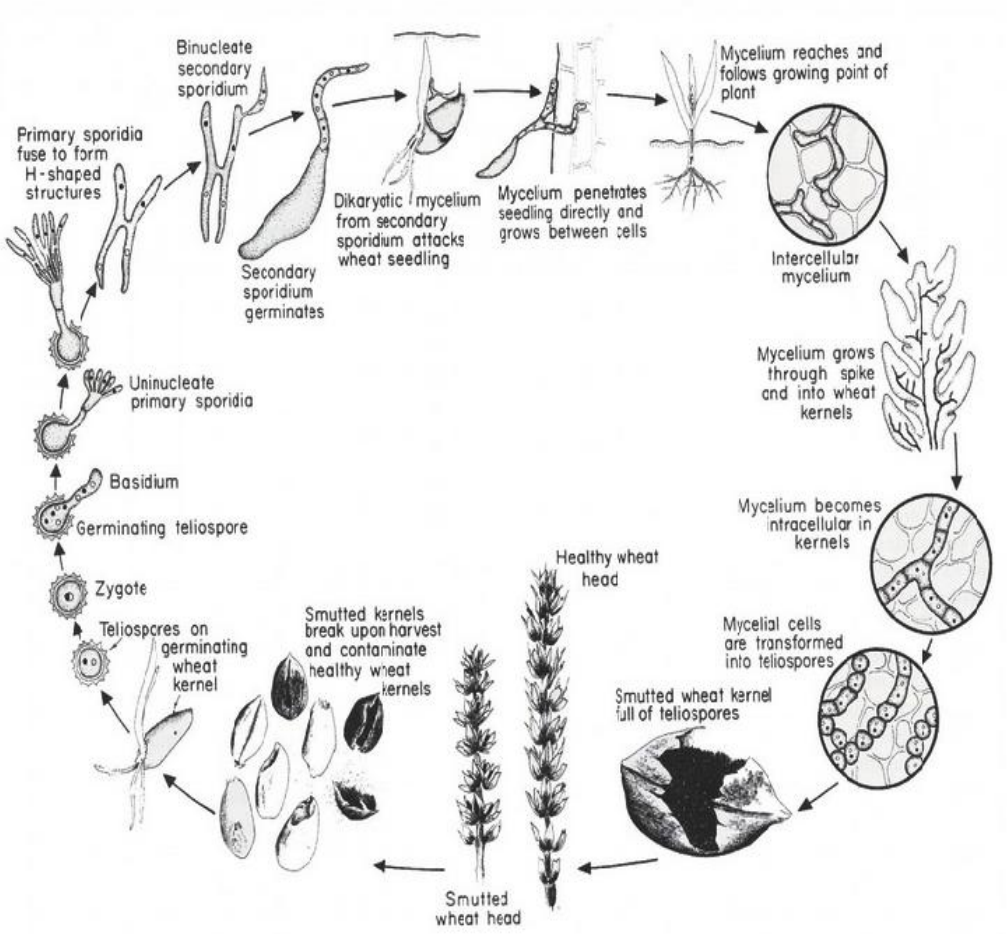
Dünya genelinde Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere, Kanada, Kuzey Afrika ve Kuzey Asya gibi ülkelerde gözlemlenen sürme hastalığına (Matanguihan ve Jones, 2011) başlıca iki mantar türü *T. foetida (laevis)* ve *T. caries (tritici)* neden olmaktadır (Matanguihan ve Jones, 2011; Koprivica, vd., 2009; Eibel, vd., 2005; Aggarwal, vd., 1998; Gang ve Weber, 1996). *T. foetida* ve *T. caries* ABD'nin kuzey eyaletlerinde eşit oranlarda bulunmasına rağmen, *T. caries* sadece Kuzey Avrupa, Almanya, Çekoslovakya ve Avusturya'da bulunur. İngiltere'de ise genel olarak *T. foetida* hiç görülmez. Buna karşılık Orta ve Güney İtalya, Kuzey Afrika ve Balkan ülkeleri, Güney Rusya özellikle Anadolu'nun yüksek yaylaları hariç Türkiye, Güney Asya ve Avustralya'da da *T. foetida* hakim durumdadır. Bu ülkelerin, soğuk ve nispi nemin hakim olduğu yüksek bölgelerinde ise her iki tür bir arada eşit oranlarda bulunmaktadır (Erarslan, 2007). Sırbistanda ise en yaygın olan sürme etmeninin *T. foetida* ve *T. caries* olduğu rapor edilmiştir (Zupunski, vd., 2011).

Türkiye'de *T. foetida* ve *T. Caries* belirli bir dağılıma sahiptir. *T. foetida* Marmara, Karadeniz, Ege ve Doğu Anadolu Bölgeleri'nde % 93-96 arasında değişen bir yaygınlığa sahip iken *T. caries* Güneydoğu Anadolu'da % 77'lik bir yaygınlığa sahiptir. Bu bölgede *T. foetida*'nın yaygınlık oranı % 22 civarındadır. Bu iki etmenin melezlenmesi sonucu meydana gelen *T. intermedia* ise çok daha az oranda olmak üzere tüm Türkiye'de yaygınlık göstermektedir. *T. foetida* ülkemizde olduğu gibi Balkan ve Akdeniz ülkelerinde de geniş bir yayılma alanı göstermektedir (Erarslan, 2007).

Ülkemizde bir çok sürme ırkının olduğu tespit edilmiştir (Özkan ve Damgacı, 1985). *Tilletia* türlerinin hastalandırma güçleri birbirinden farklı ırklara göre değişiklik göstermektedir (Finci, 1975). 1975 -1982 yılları arasında Türkiye'de yaygın ve virülent 68 *T. foetida* ve 20 *T. caries* ırkı tespit edilmiştir (Erarslan, 2007; Finci vd., 1983).

1.3. Etmenin Bulaşma Şekli ve Yaşam Döngüsü

Sürme hastalığının yayılmasındaki en önemli faktör, kör adı verilen hastalıklı tanelerdeki mantar sporlarının hasat zamanı patlayıp, hava yoluyla sağlıklı tohumlara bulaşmasıdır. Bulaşık yani enfekte olmuş tohumların ekilmesiyle hastalık yayılır (Özkan, 1974; Nagy ve Moldovan, 2007). Hastalıklı bir buğday başağında yaklaşık 150 milyon sürme sporu bulunmaktadır ve bunlar ortalama 3 milyon sağlıklı tohuma bulaşabilir. (Koprivica, vd., 2004). Bulaşık olarak ekilen hastalıklı buğday tohumlarının başaklarını süt olum dönemine gelinceye kadar sağlıklı bitkilerden ayırt edebilmek mümkün değildir (Akan, vd., 2007).



Şekil 1.1. *Tilletia* sp.'nin yaşam döngüsü (http://www.entofito.com/hububatta-surme-hastaliklari-*Tilletia* sp.).

Patojenin yayılması ve patojenitesinin ortaya çıkmasında ışık, sıcaklık ve nem gibi çevresel faktörler önemli yer tutmaktadır (Veisz, vd., 2000). Patojen için toprak sıcaklığı 5-15 C^o arasında olduğu değerler optimum enfeksiyon değerleridir (Koprivica, vd., 2009; Shi, vd., 1996), ancak toprak sıcaklığı 22 C^o ye çıktığında enfeksiyon azalır (Matanguihan ve Murphy, 2011). Topraktaki tanenin çimlenmesine paralel olarak sürme sporları da aktivite kazanırlar ve hızla çimlenerek buğday fidesini penetre ederler (Koprivica, vd., 2009).

Aktive olan sporda önce karyogami gerçekleşir, sonra mayoz ve mitoz bölünme sonucu haploid çekirdekler oluşur. Bu çekirdekler bu sırada meydana gelen basidiuma göç ederek basidiumun ucundaki çıkıntılara yerleşirler ve böylelikle basidiosporlar oluşur. Bu basidiosporlara 'primer sporidiler' adı da verilir.

Farklı eşey tiplerine (+, -) sahip basidiosporlar yan dalcıkları vasıtasıyla H biçiminde ikişerli olarak birleşirler. Bu plasmogami sayesinde dikaryotik dönem yeniden başlar. Birleşmiş basidiosporların ucunda tomurcuklanma yoluyla ‘sekonder sporidiler' veya diğer bir deyimle ‘konidiumlar' oluşur. Bunların çimlenmesiyle de penetrasyon yapma yeteneğine sahip dikaryotik hifler meydana gelir. Bu hifler yeni gelişmekte olan fideciye koleoptilden girerler. Fidecikler 2 cm den fazla boy kazanmış olsalar bile penetrasyona açıktırlar. Hif yaklaşık 8-10 gün içinde koleoptilde intraselüler (hücre içine) olarak yayılır. Sonra oluşan sap dokularına geçer ve bu kez interselüler (hücrelerarası) yayılır. Bitkinin 5 yapraklı döneminde miseller vejetasyon konisine erişmiş olurlar. Sapa kalkmış bitkilerde miseller daha çok nodiumlara yerleşir. Sap ve yaprakların işgalinden sonra başak taslakları kolonize edilir. Başaklanma sırasında çiçeklerin tümü hiflerle işgal edilmiş durumdadır. Dikaryotik misel en çok besin maddelerince zengin dokularda gelişebilir. Bu nedenle ovaryumu tercih eder. Eğer belirli bir süre içinde ovaryuma erişemezse latent enfeksiyonlar meydana gelir. Etmenin enfeksiyon başarısında fideciğin çevre koşullarına bağlı gelişmesi büyük rol oynar. Tohumun çimlenmesi ve toprak yüzeyine çıkması geciktikçe hastalığa yakalanma riski artar (Agrios,1997).

1.4. Sürme Hastalığı ile Mücadele Yöntemleri

Sürme hastalığının kontrol edilebilmesi ekimden önce tohumluk buğdayların ilaçlanması ya da etmene karşı dayanıklı hatların geliştirilmesiyle mümkün olmaktadır. Sürme etmenine karşı en etkili mücadele yöntemi kimyasal ilaç kullanmaktır (Ciuca, 2011), ancak ilaçlama yöntemi, hem organik tarım açısından hem de çevreye zarar vermesi ve ekonomik olmaması nedeniyle uygun bir yöntem değildir (Waldow ve Jahn, 2007). Hastalığa karşı kimyasal mücadele yapılmadığı durumlarda ortalama % 15-20 oranında zarar yaptığı, tohumluğunu birkaç yıl üst üste ilaçlamadan eken, bazı üretici tarlalarında hastalık oranının % 75-90 arasında saptandığı belirlenmiştir (Ataç ve Çetin, 1995).

Hastalığın kontrol edilmesinde bir diğer yöntem ise hastalığa karşı dayanıklı buğday hatlarının geliştirilmesidir. Ancak hastalık etmeninin fizyolojik ırklarındaki hastalık yapma yeteneğinin (virülens) zamanla değişiklikler gösterdiği ve dolayısıyla

hastalığa karşı uzun yıllar dayanıklı kalınmasının mümkün olmadığı görülmüştür (Aktaş, vd., 2008).

1.5. Fungus'un Genel Morfolojik Özellikleri

İki türün yaşam döngüleri, çoğalma gereksinimleri ve hastalık yapma etkileri birbirine benzemesine rağmen, mikroskopla bakıldığında teliospor şekillerinin morfolojik olarak birbirinden farklı olduğu görülmektedir. Bu iki türün sınıflandırılmasındaki en belirgin morfolojik fark; *T. foetida*'nın düz hücre duvarına sahipken, *T. caries*'in ağsı hücre duvarına sahip olmasıdır (Tuncel, 2006; Shi, vd., 1996).

Ülkemizde, Tuncel 2006 da yaptığı tez çalışmasında *Tilletia* sp. sporlarının ayrı ayrı preparatlarını hazırlayarak ışık mikroskobunda 1000X büyütmede teliospor çeperlerinin yüzey strüktürünü incelemiş ve *T. foetida'*nın sporlarının kahverengi, küremsi, elipsoidal ve çeperinin düzensiz olduğunu; *T. caries'*in ise sporlarının sarı kahverenginden koyu yeşile kadar değişen renkte olduğunu ve hücre çeperlerinin 5-6 köşeli, bal renginde olduğunu belirlemiştir (Tuncel, 2006).

1.6. Genetik Çeşitliliği Belirlemede Kullanılan Belirteç Yöntemleri

Tilletia türlerinin teliospor morfolojileri, genomik yapıları ve ITS bölgelerinin birbirlerine son derece benzer olmasından dolayı, bu türleri birbirinden ayırt etmek de oldukça güçtür (Yuan, vd., 2009). Bu organizmaları tanımlamak için aşağıda açıklanan morfolojik, biyokimyasal ve moleküler belirteç yöntemleri kullanılır.

1.6.1. Morfolojik markörler (Belirteçler)

Çalışılan organizmanın şeklen incelenerek verilerin elde edilmesi temeline dayanan, görsel olarak belirlenebilen, fenotipik kantitatif özelliklerin belirlendiği bir yöntemdir (Meglic ve Staub, 1996; Nurşen, 2012). Morfolojik belirteçler genellikle dominant olmaları, dominant bir geni resesif genden ayırmada kullanılmaları, belirlenecek karakterin sayı bakımından az olması sebebiyle analizinin kolaylıkla yapılabilmesi ve basit gözlemlerle populasyonun haritalanmasından dolayı tercih edilirler. Ancak, incelenen morfolojik karakterlerin çevre koşullarından etkilenmesi, çeşitli stres faktörlerinden dolayı genotipte meydana gelen mutasyonlar, her karakter

için morfolojik çeşitliliğin yeterli düzeyde olmayışı, heterozigot karakterlerin belirlenememesi bu yöntemin kullanılmasını olumsuz yönde etkilemiştir (Benli, 2009; Kaymak, 2010).

1.6.2. Biyokimyasal markörler (Belirteçler)

Tek hücrelilerden çok hücrelilere kadar her canlı için farklı proteinler, sekonder metabolitler veya kimyasal yapılar ve izoenzimler biyokimyasal markör olarak kullanılabilmektedir. Protein markörler, morfolojik karakterlerle kıyaslandığında çok daha etkili sonuç vermelerine karşılık sıcaklık, stres koşulları, hastalık vb. faktörlerden etkilenirler (Gülşen ve Mutlu, 2005). Kodominant markörler olmaları, analizlerinin ucuz, kolay ve güvenilir olması bu markörlerin tercih edilme sebebidir, fakat bazı izoenzimlerin özel dokularda ve belli bir gelişme periyodunda gözlemlenebilmesi, sayılarının çok az olması, epistatik ve pleotrofik etki göstermeleri bu markörlerin dezavantajlarıdır (Benli, 2009).

1.6.3. Moleküler markörler (DNA belirteçleri)

Moleküler markörlerin kaynağı hücrede bulanan DNA'dır. Moleküler belirteç, DNA'nın bir parçası diğer bir deyişle belirli bir genle beraber aktarılan bir DNA parçasıdır. Aslında tanımlanan bir gendir ama genomun belirli bir parçasını ifade ettiği için belirteç denilmektedir. Canlıların yapısını belirleyen şifre de DNA zincirlerinde olduğundan moleküler markörler, canlı populasyonlarındaki çeşitlilik ve ya o populasyon içindeki organizma genotipleri arasındaki ilişkilerin tespitinde % 100'e yakın güvenirlilikle değerlendirilirler. Bugün moleküler markörler bitki sistematiğinde tür tanımlanmasında ve ıslahında, gen kaynaklarının değerlendirilmesi ve genetik varyasyonun araştırılmasında etkin olarak kullanılmaktadır (Gülşen ve Mutlu, 2005). Son 20 yıl içerisinde hızla gelişen moleküler markör teknolojisi, çeşitlerin birbirleri arasındaki genetik farklılığın belirlenmesi, kromozom haritalamaları, gen kaynaklarının karakterize edilmesi, evrimsel gelişim analizi ve transformasyonda başarı düzeyinin belirlenmesinde yeni yöntemler ortaya koymuştur (Cheng, vd., 2015).

Bitkilerde genetik ilişkileri ortaya çıkarmak için kullanılan ilk DNA belirteci RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) olmuştur. Fakat bu yöntemin analizlerinin pahalı olması, fazla zaman, işgücü gerektirmesi ile fazla miktarda ve

yüksek kalitede DNA'ya gereksinim duyulması PCR'a dayalı moleküler belirteçlerin gelişmesine neden olmuştur (Walton, 1993). Birçok farklı PCR tabanlı teknik son 20 yılda geliştirilmiş olup çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahiptir (Gülşen ve Mutlu, 2005). Bu DNA belirteçlerinden bazıları RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), AFLP (Amplified Fragment Lenght Polymorphism) ve mikrosatellitlerdir (SSR-Simple Sequence Repeat) (Cheng, vd., 2015; Doğan, 2010; Tanksley, 1989).

Markör temelli PCR yöntemleri; polimorfizm gösterme kaliteleri, dominant veya ko-dominant markörlerin tespitine izin vermeleri, verimlilik, otomasyon ve maliyetlerinin farklı olması açısından birbirilerinden ayrılırlar. En sık kullanılan markör tekniklerinin bu özellikleri aşağıdaki Çizelge 1.1.'de verilmiştir (Özatay, 2007; Meksem ve Kahl, 2006).

Çizelge 1.1. En fazla kullanılan PCR markörlerinin karşılaştırılması.

Teknik	PCR	Polimorfizm	Dominantlık	Verimlilik	Otomasyon	Maliyet
RFLP	Hayır	Düşük/Orta	Kodominant	Yüksek	Düşük	Yüksek
AFLP	Evet	Yüksek	Dominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Orta
RAPD	Evet	Orta/Yüksek	Dominant	Düşük	Orta	Düşük
SSR	Evet	Yüksek	Kod minant	Yüksek	Orta/Yüksek	Düşük
ISSR	Evet	Yüksek	Dominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Düşük
STS	Evet	Yüksek	Kodominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Düşük
SCAR	Evet	Yüksek	Kodominant	Yüksek	Orta	Orta

(Meksem ve Kahl, 2006)

Bu yöntemler klasik yöntemlere göre büyük avantajlar sağlamaktadır. Morfolojik ve biyokimyasal markörlerin uygulamadaki yetersizlikleri moleküler markörlerin uygulanmasıyla ortadan kalkmıştır. Moleküler teknikler, diğer tekniklere göre daha fazla avantajlara sahip olmalara şu şekilde özetlenebilir.

1) Çevre faktörlerinden etkilenmezler.

2) Çekirdek ve farklı kalıtım şekline sahip kloroplast ve mitokondri gibi organel genomları ile ayrı ayrı çalışılabilirler.

3) Polimorfizm oranları yüksektir.

4) Pleiotrofik (tek bir genin birden fazla karakterden sorumlu olması) ve epistatik (bir karakterin ortaya çıkmasından sorumlu olan bir genin farklı bir gen tarafından baskılanması) etkilerden daha az etkilendiklerinden genetik değişiklikleri daha fazla yansıtırlar.

5) Her bir ebeveynden gelen farklı karakterler tespit edilebildiğinden organizmanın genetik orijini tespit edilebilir.

6) Sonuçların tekrar edilebilirliği yüksektir.

7) Sonsuz sayıda moleküler markör elde edilebilir (Gülşen ve Mutlu, 2005; Kabaoğlu, 2007; Benli, 2009).

1.6.3.1. ISSR-PCR yöntemi

ISSR markörler, RFLP, AFLP, RAPD, CAPS (cleavage amplified polymorphic sequence), SSR ve SCAR (sequence characterized amplified region) gibi çeşitli DNA markörleri ile kıyaslandığında bazı avantajlara sahip daha yeni yöntemlerdir (Gao, vd., 2010). Özellikle uygulanması kolay ve ekonomik olmalarından dolayı ISSR markörleri daha fazla tercih edilmektedir (Gao, vd., 2014; Perera, vd., 2014; Nanda vd., 2012; He vd., 2007).

Bu yöntem ilk kez Zietkiewicz ve ark. tarafından geliştirilen dominant bir belirteç tekniğidir. ISSR belirteçleri genomik DNA'yı hedef alarak genom üzerindeki ters düzenlenmiş mikrosatellit tekrar bölgeleri arasında kalan 100-3000 baz çifti büyüklüğündeki parçaların çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Genom boyunca yer alan iki tekrar bölgesi arasındaki DNA parçalarının PCR ile çok sayıda kopyaları oluşturulur. ISSR bölgeleri tek primer ve tek enzim kullanılarak PCR yapılır ve oluşan ürünler elektroforez ile agoroz jelde yürütülerek büyüklükleri bakımından DNA'ların ayrımı yapılır (Zietkiewicz, vd., 1994).

Yöntem, 5' ve 3' sonda güçlendirilen kısa, tekrarlanan DNA zincirlerinin primer olarak PCR reaksiyonunda kullanılmasını, PCR ürünlerinin elektroforez ile

büyüklüklerine göre ayrılmasını ve jel üzerinde DNA'ların tespitini içerir (Zietkiewicz, vd., 1994). Primer olarak 2 ile 4 arasında değişen farklı veya aynı nükleotidlerle sabitleştirilen, basit olarak tekrarlanan DNA zincirleri kullanılır. Bir reaksiyonda tekrarlanan zincir aynı kalmak kaydıyla, sabitleştirici DNA'ların farklı kombinasyonları primer olarak aynı reaksiyonda kullanılarak bir tek PCR reaksiyonunda güçlendirilen hedef DNA zincirlerinin sayısı arttırılır. Dolayısıyla da bir tek jel üzerinde üretilebilecek bant ya da markör sayısı arttırılır. Bu, diğer DNA markörlerinin üretebildiği sayılarla karşılaştırıldığında önemli bir avantaj sağlar (Gülşen ve Mutlu, 2005)

ISSR teknolojisi ters düzenlenmiş yakın aralıklı mikrosatelitlerin arasındaki bölgelerin (100–300 bç) amplifikasyonuna dayanmaktadır. Filogenetik analizlerde, gen tespitinde, genom haritalamalarında, melezleme ıslah çalışmalarında, tür içi akrabalık ilişkilerini ortaya çıkarmak için populasyon genetiğinde ve evrimsel biyolojide kullanışlı bir yöntemdir.

Bu yöntem RAPD'e göre oldukça güvenilir, tekrarlanabilirlik oranı yüksek ve PCR koşullarından çok etkilenmeyen bir tekniktir. Bu teknik genetik çeşitlilik, sınıflandırma, moleküler markör bulma çalışmaları, evrim ve genom haritası oluşturma çalışmalarında son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Turunç, 2010).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Çalışma Materyali ve Ön Hazırlık:

Bu çalışmada farklı lokalite ve konakçılardan elde edilen, buğdaylarda sürme hastalığı etmeni olan 13 farklı *T. foetida* izolatı ile 1 *T. caries* izolatı kullanılmıştır (Çizelge 2.1). Çalışma materyalleri Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir (Eskişehir, Türkiye).

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan *T. foetida* izolatları, coğrafi orijinleri ve izole edildikleri konakçılar.

İzolat No	Tür	Coğrafik Orijin	Konakçı Buğday Çeşidi
İzolat 1	*T. foetida*	Tozman Yaylası Düden Mevkii	Kırkambar
İzolat 2	*T. caries*	Tozman Yaylası Düden Mevkii	Kırkambar
İzolat 3	*T. foetida*	Tozman Yaylası Düden Mevkii	Kırkambar
İzolat 4	*T. foetida*	Tozman Yaylası Düden Mevkii	Kırgız
İzolat 5	*T. foetida*	Tozman Yaylası Düden Mevkii	Kırgız
İzolat 6	*T. foetida*	Tozman Yaylası Düden Mevkii	Kırgız
İzolat 7	*T. foetida*	Kavacık Köyü	Gerek-kırgız-A
İzolat 8	*T. foetida*	Kavacık Köyü	Gerek-kırgız-A
İzolat 9	*T. foetida*	Kavacık Köyü	Gerek-kırgız-A
İzolat 10	*T. foetida*	Kavacık Köyü	Gerek-kırgız-B
İzolat 11	*T. foetida*	Kavacık Köyü	Gerek-kırgız-B
İzolat 12	*T. foetida*	Kavacık Köyü	Gerek-kırgız-B
İzolat 13	*T. foetida*	Tozman Yaylası Düden Mevkii	Katea
İzolat 14	*T. foetida*	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü	Gerek

Örnekler, hastalıklı konukçıları olan ekmeklik buğday taneleri ile birlikte temin edilmiş ve çalışmalarda bu taneler kullanılmıştır. Hastalıklı tanelerden sürme sporları, her bir başağın içindeki sporlu tane ayrı ayrı kırılarak ve sadece sürme sporları kalana kadar buğdayın kavuz kısmı uzaklaştırılarak elde edilmiştir (Şekil 2.1).

Elde edilen sürme izolatlarının sporları, gDNA ve total RNA izolasyonu için yıkanmış ve % 70'lik etonolden geçirilmiş havanlarda sıvı azotla muamele edilerek izolasyon için hazır hale getirilmiştir.

Şekil 2.1. *T. foetida* izolatlarının spor görüntüleri.

2.2. *T. foetida* Sporlarından Genomik DNA İzolasyonu

2.2.1. DNA izolasyon yöntemi

Klasik DNA izolasyonu yöntemi ile *T. foetida* sporlarından genomik DNA izole etmek için CTAB tamponu kullanılmıştır.

CTAB Litik Tampon Hazırlığı:

1 gr CTAB

14 ml 1.4 M NaCl veya 4.095 g toz NaCl

5 ml 1 M Tris

2 ml 0.5 M EDTA (EtilenDiamin TetraAsetikasit)

0.5 g PVP (polyvynil pyrodine)

Solüsyonun son hali steril distile su 50 ml'ye ile tamamlanmış ve 120 ^{o}C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Steril edildikten sonra tampona 200 µl β-merkaptoetanol eklenmiştir.

Çalışmadan önce 2xCTAB (Hexadecyltrimthylammonium bromide) tamponu su banyosunda 65 ^{o}C'de 15 dk. ısıtılmış ve hazır hale getirilmiştir.

- Sıvı azotta öğütülmüş *T. foetida* 'ya ait 100 mg mantar sporu 2 ml'lik ependorf tüplerine konularak üzerine 750 µl CTAB tamponu eklenip homojen hale gelene kadar yavaşça pipetlenmiştir.

- Karışım tüpü her 5 dk.'da alt üst edilmek koşulu ile 62 ^{o}C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.

- Karışım tüpüne eşit hacimde kloroform:isoamil (750 µl) alkol eklenip 10 dakika boyunca alt üst edilerek karıştırılmıştır.

- Karışım 10 dk alt üst edildikten sonra 7500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve üstte kalan sıvı kısım yeni 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılmıştır. Aktarılan miktar µl cinsinden kayıt edilmiştir.

- Yeni ependorf tüpüne Aktarılan miktarın 2/3'ü kadar -20 ^{o}C'de bekletilen isopropanol karışıma eklenmiş, birkaç kez alt üst edildikten sonra -20 ^{o}C'de 2 saat inkübe edilmiştir. (1 gün de bekletilebilir).

- İnkübasyon sonunda karışım tüpü 10000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenip süpernatant dikkatlice dökülmüştür.

- Oluşan DNA peleti büyüklüğüne göre 200-400 µl % 70'lik soğuk etil alkol ile 2 kez yıkanmış ve çeker ocakta veya açık havada kuruyana kadar bekletilmiştir. Yıkama işlemi 1000 rpm 1-2 dk. santrifüjlenerek yapılmıştır.

- Kuruyan DNA peleti istenilen DNA konsantrasyonuna göre 50-100 µl steril deiyonize su ile veya TE buffer da çözündürülmüştür.

2.2.2. DNA'nın spektrofotometre'de ölçümü, miktar ve kalite tayini

Öncelikle izole edilen total DNA örneklerinden 5 µl alınarak % 0.8'lik 80 ml agaroz jelde 90 volt'ta 35 dk. yürütülmüş ve ilerleyen çalışmalar için DNA elde edilip edilmediği kontrol edilmiştir.

İzole edilen genomik DNA'ların sonraki basamaklarda kullanımına geçmeden önce saflık derecelerinin ve kalite miktarlarının kontrol edilmesi amacıyla genomik DNA'ların Nanodrop Spektrofotometre cihazında 260 ve 280 nm dalga boylarında okuması yapılmış, nanogram veya mikrogram cinsinden saflık ve miktarları tespit edilmiştir. Bu ölçümlerde izolatların DNA peletleri hangi tampon ile çözülmüş ise o tampon kör olarak kullanılmıştır. Ölçümlerde 260 ve 280 dalga boyundaki 1.8' den büyük ölçüm sonuçları çalışma için uygun görülmüştür. Spektrofotometre'de okunan değerler ile aşağıdaki formüller kullanılarak DNA miktarı saptanmıştır.

- DNA miktarı= OD260 x dilüsyon katsayısı x 50 µl/ml

2.2.3. ISSR-PCR için kalıp DNA hazırlığı

Genomik DNA'lardan ISSR-PCR'da kullanmak amacıyla % 2'lik çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Bunun için µl'sinde 2 ng DNA olacak şekilde genomik DNA'lar steril distile su ile seyreltilmiştir.

2.3. ISSR-PCR Analizleri

2.3.1. ISSR-PCR hazırlığı ve koşulları

ISSR-PCR analizi ile *T. foetida* izolatlarındaki polimorfizmi belirlemek için DNA dizileri British Colombia Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarından (Kanada) temin edilen 25 farklı ISSR primeri, Sentromer (İstanbul, Türkiye) firmasına ürettirilmiş ve çalışmada kullanılmıştır (Çizelge 2.2).

Basit sekans arası tekrarlar (ISSR-Inter Simple Sequence Repeat) birbirine çok yakın ve karşılıklı biçimde konumlanmış tekrar bölgeleri arasında yer alan yaklaşık

100-3000 bp uzunluğundaki DNA parçalarıdır. Bu teknik Zietkiewicz ve ark. (1994) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem, mikrosatellitler arasında tekrarlanan DNA sekanslarının PCR ile çoğaltılması temeline dayanır. ISSR belirteçleri genetik yapı, genetik çeşitlilik, filogeni, gen tespiti, genom haritalama çalışmalarında ve evrimsel biyolojide kullanılmaktadır.

Çizelge 2.2. Kullanılan ISSR primerleri ile ilgili bilgiler.

	Primer kodu	**Primerin dizisi (5'…3')**	**T_A (^oC)**	**Sonuç**
1	ISSR-01	AGA GAG AGA GAG AGA GG	52.8	Polimorfik
2	ISSR-02	GAG AGA GAG AGA GAG AT	50.4	Polimorfik
3	ISSR-10	GGG TGG GTT GGG GTG	58.8	Polimorfik
4	ISSR-25	TGT GTG TGT GTG TGT GA	50.4	Polimorfik
5	ISSR-27	GTG CGT GCG TGC GTG C	59.4	Polimorfik
6	ISSR-28	CGA TGG ATG GAT GGA T	49.2	Polimorfik
7	ISSR-29	GAG AGA GAG AGA GAG AC	52.8	Polimorfik
8	ISSR-815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	52.8	Polimorfik
9	ISSR-829	TCT CTC TCT CTC TCT CG	52.8	Polimorfik
10	ISSR-847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	53.7	Monomorfik
11	ISSR-861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC	60.5	Monomorfik
12	ISSR-862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC	60.5	Polimorfik
13	ISSR-866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC	60.5	Polimorfik
14	ISSR-301	GAG CAA CAA CAA CAA CAA	50	Polimorfik
15	ISSR-309	GAG AGA GAG AGA GAG AA	50	Polimorfik
16	ISSR-310	AGA GAG AGA GAG AGA GT	50	Polimorfik
17	ISSR-312	ACA CAC ACA CAC ACA C	52	Polimorfik
18	ISSR-324	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	52	Polimorfik
19	ISSR-03	GTG TGT GTG TGT GTG TC	52.8	Çalışmadı
20	ISSR-04	ACA CAC ACA CAC ACA CC	52.8	Çalışmadı
21	ISSR-09	GGA TGG ATG GAT GGA T	49.2	Çalışmadı
22	ISSR-814	CTC TCT CTC TCT CTC TA	50.4	Çalışmadı
23	ISSR-818	GTG TGT GTG TGT GTG TA	52.8	Çalışmadı
24	ISSR-819	CAC ACA CAC ACA CAC AG	50.4	Çalışmadı
25	ISSR-824	TGT GTG TGT GTG TGT GC	52.8	Çalışmadı

(Y= (C,T) B= (C,G,T) D= (A,G,T) V= (A,G,C))

ISSR-PCR uygulamalarının gerçekleştirilebilmesi için primerlerin bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi gerekir. Bu amaçla çalışmalarda kullanılan ISSR primerlerin bağlanma sıcaklıkları aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$(A+T \text{ baz sayıları}) \times 2\ ^{o}C + (G+C \text{ baz sayıları}) \times 4\ ^{o}C = T_A\ ^{o}C$$

ISSR-PCR reaksiyonları 25 µl ve 12.5 µl'lik hacimlerde 1X Taq Buffer, 2 µM $MgCl_2$, 2.5 µM dNTP, 2.5 µM primer, 6 ng kalıp DNA ve 1U Taq polimeraz enzimi (Fermantas, Amerika) kullanılarak hazırlanmıştır. Her bir primer için hazırlanan negatif kontrol reaksiyonlara eklenmiştir. Bu reaksiyonlarda kullanılan PCR bileşen ve miktarları Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Kullanılan ISSR-PCR bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	**Miktar**	**Miktar**
dH_2O	14.8 µl	6.4 µl
10X Taq Buffer	2.5 µl (1x)	1.25 µl (1x)
25mM MgCl2	1.5 µl (2.5 µM)	1 µl (2.5 µM)
2.5mM dNTP	2 µl (2.5 µM)	1.25 µl (2.5 µM)
2.5mM Primer	2 µl (2.5 µM)	1 µl (2.5 µM)
Kalıp DNA	2 µl (6 ng)	1.5 µl (6 ng)
Taq Polimeraz	0.2 µl	0.1 µl
Toplam	25 µl	12.5 µl

PCR reaksiyonları Çizelge 2.4'te verilen koşullarda Techne 5PrimeG termal (Prizma) ve Applied Biosystems Veriti gradient termal döngü aleti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

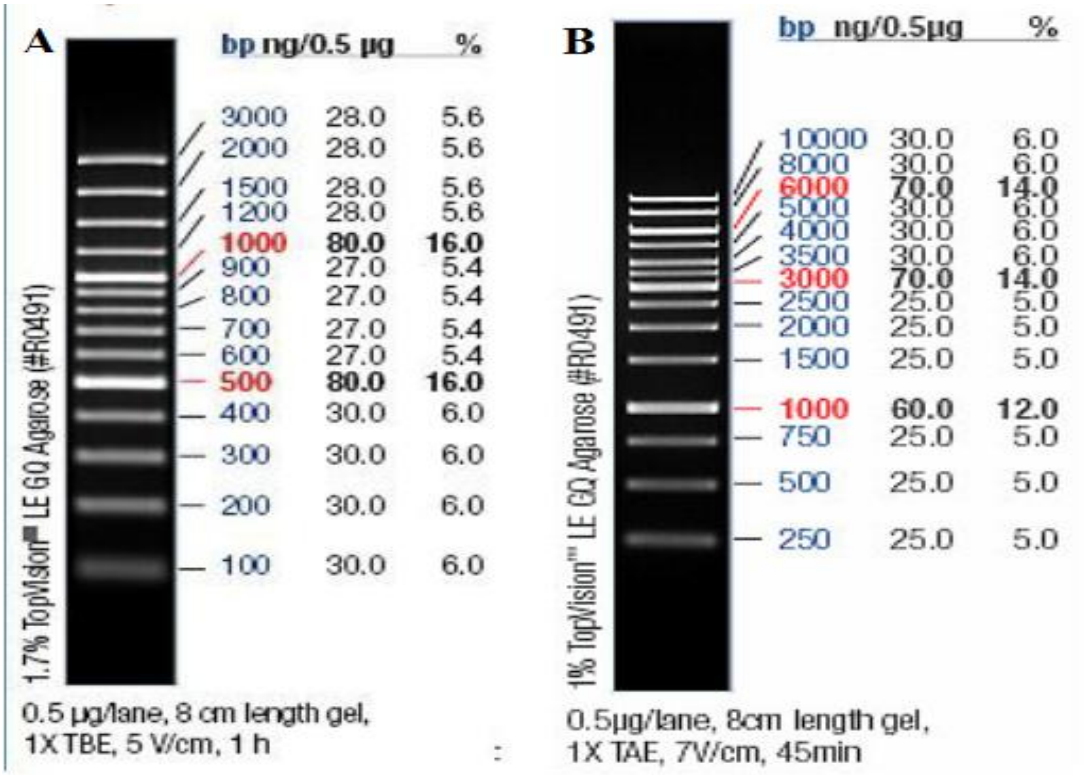
Çizelge 2.4. ISSR-PCR uygulama protokolü.

	Döngü Sayısı	Sıcaklık (˚C)	Süre
Başlangıç Denatrasyonu	1	95	4 dk.
Denatrasyon		94	45 sn.
Bağlanma	45	49.2-60.5	45 sn.
Uzama		72	90 sn.
Final Uzaması	1	72	7 dk.

2.3.2. Agaroz jel elektroforezi ile ISSR-PCR ürünlerinin yürütülmesi

Oluşan ISSR-PCR ürünleri yatay jel elektroforezi (Thermo, Midicell Promo) ile % 1.2'lik agaroz jel üzerinde ayrılmıştır. Agaroz jeller 5X TBE stok tamponunun seyreltilmesi ile elde edilen 0.5X TBE tamponu ile hazırlanmıştır. Uygun bir erlen içinde 0.5X TBE tampon ile birlikte kaynatılan % 1.2'lik agaroz katılaşmadan önce 10X'lik 7 µl etidyum bromid ilave edilerek karıştırılmış ve jel tablasına dökülmüştür.

PCR ürünleri her bir kuyucuğa 9 µl örnek 1 µl yükleme tamponu olmak üzere 10 µl yüklenmiş ve 90 V'ta 70 dk. yürütülmüştür. Bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla her jelde ilk ve son kuyucuklara 100 bp'lik DNA ladder (Fermentas) yüklenmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. A) Fermantas gene ruler 100 bp DNA ladder plus. B) Fermentas gene ruler 1 kb DNA ladder **.**

2.3.3. ISSR-PCR ürünlerinin görüntülenmesi ve değerlendirilmesi

Agaroz jel elektroforezinde yürütme işleminden sonra oluşan bant profilleri UV translimünatörü altında gözlemlenmiş ve Uvitec marka jel dökümantasyon sistemi kullanılarak fotoğraflanmıştır. Bant büyüklükleri şekil 2.2'deki 100 bp'lik DNA ladder (Fermentas) markör ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

2.3.4. ISSR-PCR sonuçlarının biyoinformatik analizi

Jel fotoğrafları üzerindeki her bir ISSR bandı için Phoretix1DPro Software (Non-linearDynamics) programı yardımıyla, var (1) ya da yok (0) ikili matrisleri oluşturulmuştur. Bu veriler kullanılarak çeşitler arasındaki genetik benzerlik değerleri Jaccard indeksi belirlenmiş ve UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) programıyla çeşitler arasındaki genetik ilişkileri gösteren dendrogram elde edilmiştir. Çalışmada kullandığımız primerlerin polimorfizm bilgi içerikleri (PBİ) Riek ve ark. (2001) dominant markörler için kullandığı aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanmıştır :

$$\mathbf{PB\dot{I}} = 1 - [f^2 + (1-f)^2]$$

Bu formülde f, veri setindeki markörün frekansıdır.

2.4. Spesifik ISSR Markör'lerinin Tespiti

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), bitki hastalıklarını teşhis ve tespit edilmesinde kullanılan önemli bir araçtır (Koprivica ve ark, 2004). Sürme sporları ile kontamine olmuş tohumları gözle ayırt edilmesi ya da tohumların tek tek mikroskopta incelenmesi mümkün olmayıp, etkin yöntemler değildir. Bu çalışmada, kontamine olmuş buğday tohumlarının ekim öncesinde erken tespit edilebilmesi için PCR tabanlı yönteme uygun bir ISSR moleküler markörünün geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2.4.1. ISSR markör seçimi

Sürme etmeni *T. foetida ve T. caries*'in ekim öncesi teşhis edilebilmesi için Çizelge.2'de verilen 25 farklı ISSR pirimeri taranmış ve bu primerlerden ISSR-847 no.'lu 5' CAC ACA CAC ACA CAC ARC 3' dizilimine sahip ISSR primeri ve ISSR-861 no.'lu 5' ACC ACC ACC ACC ACC ACC 3' dizilime sahip ISSR primerin markör olabileceğine karar verilmiştir.

2.4.2. Konakçı buğday DNA'sında patojene spesifik ISSR markörlerinin test edilmesi

2.4.2.1. Konakçı buğday çeşitleri ve DNA izolasyonu

Çalışmada Eskişehir Geçitkuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsünden temin edilen (Eskişehir, Türkiye) sürmeye karşı dayanıklı ve ya hassas olduğu bilinen 18 farklı ekmeklik buğday çeşiti (Çizelge 2.5) kullanılmıştır. Buğday çeşitlerinden total DNA izolasyonu Doyle ve Doyle tafından kullanılan klasik DNA izolasyonu yönteminin modifiye edilmesiyle, CTAB tamponu kullanılarak yapılmıştır (Doyle ve Doyle, 1987)

2.4.2.2. Konakçı buğday DNA'sında spesifik ISSR markör'lerin PCR ile test edilmesi

Tilletia sp. izolatlarında monomorfik bantlar veren 847 numaralı ISSR spesifik markör'ün buğdaylarda farklı polimorfik bantlar verdiğini göstermek için Çizelge.3'te verilen miktarlar ve Çizelge.4'te verilen koşullarda PCR'ları yapılmıştır.

Çizelge 2.5. Konakçı DNA ayırımında kullanılan farklı buğday çeşitleri.

Örnek No	Buğday Çeşidi
1	Heines VII
2	SEL 2092
3	SEL1102
4	Ridit
5	Turkey 1558
6	Hohenheimer
7	Rio
8	SEL 50077
9	M82-2161
10	M82-2098
11	R63-6968
12	M82-2102
13	M82-2123
14	P.I.178383
15	M73-2154
16	P.I.173438
17	P.I.119333 (M82-2141), BW
18	ThuleIII; P.I. 181463, BW

2.5. *T. foetida* cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması

2.5.1. *T. foetida* total RNA'sının izolasyonu

Günümüzde büyük oranda TRIzol solüsyonu kullanılarak yapılan izolasyon yöntemi yaygındır. Bitki, hayvan ve mikroorganizmalar için farklı RNA izolasyon yöntem ve basamakları mevcut olup, her organizma grubu için ayrı ayrı modifiye edilmiş RNA izolasyon yöntemleri uygulanmaktadır. *T. foetida* izolatlarından 3, 7, 11 ve 12 no.lu örneklerin toplam RNA'ları farklı yöntemlerle izole edilmeye çalışılmış ve sadece 7 numaralı izolat dan (*T. foetida*) TRIzol (Sigma, Amerika) solüsyonu ile istenen kalitede toplam RNA izole edilebilmiştir.

Toplam RNA izolasyon protokolü:

- Sıvı azotla öğütülmüş mantar sporlarından 50-100 mg örnek alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüplerine konulmuş ve 1 ml TRIzol ile muamele edilmiştir. Nükleoproteinlerin tam olarak ayrılmasını kesinleştirmek için örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. TRIzol ile homojenize veya lize edilen örnekler –70 ^{o}C'de 1 ay saklanabilmektedir.

- TRIzol eklenen sıvı karışım 4 ^{o}C'de 12000 g'de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Bu aşamada süpernatant yani üstte kalan sıvı kısım RNA ve protein içermektedir.

- Süpernatant kısmı alınıp başka bir ependorf tüpüne aktarılarak oda sıcaklığında tekrar 5 dakika bekletilmiştir.

- Daha sonra her 1 ml TRIzol için 0.2 ml olacak şekilde kloroform eklenmiş ve örnek sıkıca kapatılarak 15 sn. güçlü bir şekilde çalkalanmıştır.

- Çalkalanan karışım oda sıcaklığında 10-15 dk. bekletildikten sonra 4 ^{o}C'de 12000 g'de 15 dk. santrifüjlenmiştir.

- Altta bulunan kırmızı organik faz proteinleri, ince bir tabaka şeklinde ara faz (interfaz) DNA'yı ve üstte berrak sulu faz ise RNA'yı içermektedir.

- Renksiz olan üst sıvı faz dikkatlice orta faza dokunmadan alınmış ve yeni bir 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılmıştır. Her 1 ml TRIzol için 0.5 ml izopropanol eklenmiş ve 5-10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.

- Tüpler 4 ^{o}C'de 12000 g'de 8-10 dk. santrifüjlenmiş ve santrifüj işleminin sonunda RNA peleti tüpün dibinde bir kenarda görülmüştür.

- Dikkatli bir şekilde süpernatant kısmı dökülmüş ve pelet her 1 ml TRIzol için 1 ml % 75'lik etanol ile vortekslenerek ya da 4 °C'de 5 dk. 7500 g'de santrifüjlenerek yıkanmıştır. Pelet yüzer şekildeyse 4 ^{o}C'de 12000 g'de yine

santrifüjlenip çökmesi sağlanmıştır. Örnekler etanolde 4 ^{o}C'de 1 hafta, –20 ^{o}C'de 1 yıl süreyle saklanabilmektedir.

- Etanol uzaklaştırılmış ve pelet çeker ocakta 15-20 dk. kurutulmuş ve 80 µl dH_2O ile çözdürülmüştür (Chomczynski, vd., 1995).

2.5.2. RNA'nın spektrofotometre'de ölçümü, miktar ve kalite tayini

İzole edilen toplam RNA'dan 10 µl alınarak % 1.4'lük 80 ml agaroz jelde 90 volt'ta 35 dk. yürütülmüş ve ilerleyen çalışmalar için toplam RNA elde edilip edilmediği kontrol edilmiştir. Ayrıca izole edilen toplam RNA'nın Nanodrop Spektrofotometre'de 260 ve 280 nm (nanometre) dalga boylarında ölçümü yapılmış ve istenen kalitede olup olmadığı kontrol edilmiştir. Ölçümlerde 260 ve 280 oranı 1.8' den büyük olmalıdır. Spektrofotometre'de okunan değerler ile aşağıdaki formüller kullanılarak toplam RNA miktarı saptanmıştır.

- RNA miktarı= OD260 x dilüsyon katsayısı x 40 µl/ml

2.5.3. RT reaksiyonu ile cDNA'nın eldesi

Toplam mRNA' nın poli A kuyruğuna oligo dT primeri ekleyerek mRNA'ya komplementer cDNA'nın ilk ipliğini sentezlemek için RT reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için yaygın olarak kullanılan iki tip ticari reverse transkriptaz enzimi vardır. Bunlardan biri Avian Myeloblastosis Virus (AMV) RT diğeri Moloney Murine Leukemia Virus tarafından kodlanan MMLV Reverse Transkriptaz (MMLV RT) enzimidir. Enzim biri polimeraz diğeri de RNaz H aktivitesi olmak üzere iki görevi yerine getirir. AMV reverse transkriptaz biri polimeraz diğeri RNaz H aktivitesi olan iki alt birimden; MMLV RT ise polimeraz aktivitesi olan ve RNaz aktivitesi düşük olan bir birimden oluşur. Yüksek Rnaz aktivitesi oluşacak cDNA nın verimini düşürür, örneğin uzun mRNA kalıplarında, kalıbın henüz cDNA sentezlenmemiş kısmı RNaz H tarafından parçalanabilir, bu istenilen ürünün elde edilememesine neden olur. MMLV RT cDNA'nın ikinci ipliğinin sentezini, ilave DNA polimeraza gerek kalmaksızın başarılabilmektedir ve yüksek sıcaklıklarda da çalışabilmesinden dolayı çoğunlukla tercih edilir (Roth, vd., 1985).

Bu reaksiyon için RevertAid First Stand cDNA Synthesis (#K1622 Fermantas) kiti kullanılmıştır. Tüm basamaklar kit prosedürüne göre yapılmıştır.

- Reaksiyona 3 µg girecek şekilde RNA izolasyonunda elde edilen RNA örneğinden 0.5'lik PCR tüplerine konulmuştur. Üzerine 2 µl Oligo (dT)18 primer (0.5 µg/µl) eklenmiş ve son hacim steril distile su ile 24 µl ye tamamlanmıştır.

- Karışım su banyosunda 70 ºC'de 5 dk inkübe edildikten sonra tekrar buza alınmıştır.

- Buz içinde reaksiyon tüpüne sırasıyla aşağıdaki bileşenler eklenmiştir.

  - 5x reaksiyon tamponu 8 µl
  - Ribolock Ribonükleaz inhibitör (20 u/µl) 2 µl
  - 10 mM dNTP mix 4 µl

- Karışım 37 ºC'de 5 dk su banyosunda inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon sonunda karışıma 2 µl M-MuLV reverse transkriptaz (200 u/µl) enzimi eklenerek 42 ºC'de 60 dk bekletilmiştir.

- Son olarak reaksiyon 70 ºC'de 10 dk inkübe edilerek enzimin inhibe edilmesi ile sonlandırılmıştır. (Daha sonra kullanılması planlanan reaksiyon -20 ^{o}C'de bekletilebilir).

2.5.4. cDNA'ya sitozin kuyruğunun eklenmesi (dC tailing)

RT yaparak elde ettiğimiz tek iplikli cDNA'nın 5' ucunda poliT kuyruğu oluşmuştur (mRNA'nın 3' ucuna komplementer). Fakat mRNA'nın 5' ucunda, 3' ucundaki gibi bir poliA kuyruğu bulunmadığı için oluşan tek iplikli cDNA'nın 3' ucunda herhangi bir primer bağlanma noktası oluşmamaktadır. Bu nedenle ede edilen cDNA ların ikinci ipliğini sentezleyebilmek adına cDNA'nın 3' ucuna terminal transferaz

enzimiyle (TdT) bir poliC kuyruğu eklenmiştir. Bu yönteme dC Tailing adı verilmektedir.

Promega marka terminal transferaz enzimi ile hazırlanan reaksiyon;

- 5x TdT tamponu 4 µl
- cDNA kalıbı (RT reaksiyon) 14 µl
- 2 mM dCTP (sitozin tri fosfast) 1 µl

0.5'lik PCR tüpündeki karışım 3 dk. 95 ^{o}C'de tutulmuş ve ardından buza alınmıştır. Tüp kısaca spin attırılmış ve 1 µl TdT enzimi eklenmiştir. 37 ^{o}C'de 20 dakika inkübe edilmiş ve ardından 70 ^{o}C'de 10 dakika bekletilmiştir.

2.5.5. Oligo dG primeri ile cDNA'nın çift ipliğe dönüştürülmesi

mRNA kalıbının 5'ucu cDNA'nın 3'ucuna karşılık gelmektedir. RT reaksiyonu ile üretilen cDNA populasyonunun 3' uçlarına terminal transferaz enzimi (Promega) aracılığıyla poliC kuyruğu (dC tailing) takılmıştır (Matz, vd., 1989). Bu sayede cDNA'nın ikinci ipliğinin sentezlenebilmesi için Oligo-dG20 primerinin oturma bölgesi oluşturulmuştur. Oligo-dG20 primeri ile PCR reaksiyonu kurularak koplemeter cDNA ipliği elde edilmiştir. Elde edilen cDNA'lar ligasyon işleminde insert olarak kullanılmış ve pGEM-T Easy plazmiti ile klonlanarak dizi analizleri yapılmıştır.

- Steril deiyonize H2O 8.8 µl
- 10x PCR Tamponu ((NH4)2SO4'lü) 2.5 µl
- MgCl2 (2.5 mM) 1.5 µl
- dNTP Mix (2.5 mM) 1 µl
- dG20 Primer (2.5 µM) 1 µl
- dC tailing 10 µl
- Taq Polimeraz (5u/µl) 0.2 µl

Toplam: 25 µl

PCR için ısı şartları "94 ^{o}C 3dakika 60 ^{o}C 1 dakika 72 ^{o}C 7 dakika" şeklindedir.

2.5.6. RT-PCR (Geri transkripsiyon-Polimeraz zincir reaksiyonu)

Daha sonraki aşamalarda kullanabilmek adına çalışmada elde ettiğimiz cDNA'ların pozitif olup olmadığını teyit etmek için, 861 ve 866 numaralı primerler kullanılarak RT-PCR (GeriTranskripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) kurulmuştur. Reaksiyon bileşenleri aşağıda gösterildiği şekilde (Çizelge 2.6) olup, RT-PCR koşulları Çizelge 2. 4' te gösterilmiştir.

Çizelge 2.6. Kullanılan RT- PCR bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	**Miktar**	**Miktar**
dH_2O	16.55 µl	16.3 µl
10X Taq Buffer	2.5 µl (1x)	2.5 µl (1x)
25mM MgCl2	1.5 µl (2.5 µM)	1.5 µl (2.5 µM)
2.5mM dNTP	2 µl (2.5 µM)	2 µl (2.5 µM)
2.5mM Primer	2 µl (2.5 µM)	2 µl (2.5 µM)
Kalıp cDNA	0.25 µl	0.5 µl
Taq Polimeraz	0.2 µl	0.2 µl
Toplam	25 µl	25 µl

2.5.7. PCR ürününün plazmit vektöre eklenmesi (Ligasyon)

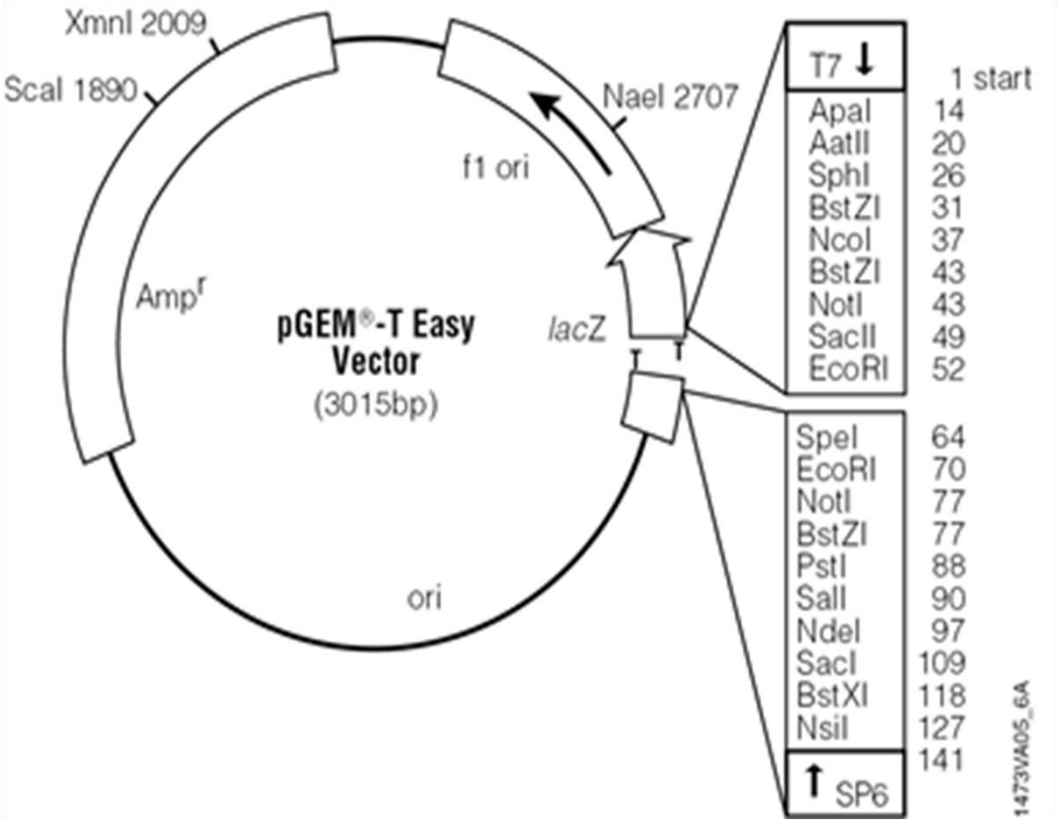
PCR ürününü taşıyıcı plazmite eklemesi T-A klonlanması yöntemiyle yapılmıştır. cDNA parçasının klonlanması için pGEM-T Easy Vector System (Promega) kullanılmıştır. Vektör sistemi klonlama için klonlanacak parçaların uç kısımlarında A bazına ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle klonlanacak parçaların uç kısımlarına A bazı eklenmesi gereklidir. Thermus cinsine ait birçok polimeraz enziminin 3' ucuna polimerizasyon sonrasında ekstradan bir baz ekleme (genellikle adenin) özelliği vardır. Burada polimeraz enzimini bu özelliği kullanılarak vektör DNA'ya klonlanacak parça yerleştirilir.

Kullanılması gereken insert miktarı hesaplandıktan sonra, izolat 7'ye ait 3 farklı insert kullanılarak ligasyon-2, ligasyon-3 ve ligasyon-4 reaksiyonları kurulmuştur. Ligasyon reaksiyonu sonucu elde edilen rekombinant plazmitler transformasyon

işleminde kullanılmıştır. pGEM-T Easy plazmiti 3015 bp (Şekil 2.3) büyüklükte olup ligasyon reaksiyonları aşağıdaki gibi kurulmuştur:

- 2X Rapid Ligation Bufer 5 µl
- pGEM-T Easy Vektör (50ng/µl) 0.5 µl
- PCR ürünü (50 ng) insert 3 µl
- T4 DNA Ligase (5u/µl) 1 µl

Karışım deiyonize su 10µl'ye tamamlanarak 16 °C'de 12-24 saat inkübe edilmiştir.



Şekil 2.3. pGEM-T Easy plazmiti.

2.5.8. Rekombinant vektörün konakçı bakteri içine taşınması (Transformasyon)

2.5.8.1. Besiyeri hazırlığı

Kullandığımız bakterilerin çoğaltılması için LB-Agar, LB Broth ve bu iki besi yerinin Amfisilin antibiyotigi katılmış formları tercih edilmiştir.

1000 ml LB (Luria-Bertani) Agar (Katı) Besiyeri:

20 gram LB ve 15-20 gram agar erlene konularak 600 ml distile su ile iyice karıştırıldıktan sonra 1 lt'ye tamamlanmıştır. Erlendeki besiyeri 120 ºC'de 15 dakika otoklav ile steril edilmiş ve yarısına kadar dolacak şekilde petrilere aktarılmıştır. Petriler steril bir ortamda 4 ^{o}C'de 1 ay muhafaza edilir.

1000 ml LB (Luria-Bertani) Broth (Sıvı) Besiyeri:

20 gram LB erlene konularak final konsantrasyonu 1 lt olacak şekilde tamamen çözülmüş ve 120 ºC'de 15 dakika otoklav ile steril edilmiştir.

Amfisilin hazırlığı:

Final konsantrasyonu 100 µg/ml olacak sekilde 100x'lik amfisilin stoğu hazırlanmıştır. Her 1 litre LB broth veya agar için için 10 ml 100x'lik amfisilin kullanılmıştır. Hazırlanan amfisilin 0.45 µm por çaplı steril filtrelerden (Orange Scientific Gyrodisc CA) şırınga yardımıyla geçirilerek steril edilmiş ve besiyerlerine otoklavdan sonra yaklaşık 60 ^{o}C'ye geldikten sonra eklenmiştir. Stok amfisilin 100 - 500 µl'lik hacimlere bölünerek -20 ^{o}C'de saklanır.

X-Gal Hazırlıgı (50 mg/ml):

pGEM-T Easy kitinine göre 100 mg X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktosit), 2 ml N-N'-dimetil formamid son hacim 50 mg/ml olacak şekilde çözülerek alüminyum folyo ile kaplanmış ependorflarda -20 ^{o}C'de saklanmıştır.

2.5.8.2. Konakçı bakteri (Kompetent hücre) hazırlığı

Kompetent Hücre Seçimi:

Bu çalışmada kompetent (hücre duvarı zayıflatılmış, plazmit geçirgenliğine sahip) hücre olarak *Escherichia coli*'nin XLI-Blue ırkı kullanılmıştır. Bu ırkın özelliği uygun plazmitler ile pozitif kolonilerin seçilmesi için mavi/beyaz tarama yapılabilmesine olanak sağlamasıdır. Bu sayede klonlama verimi ve pozitif klon sayısına rahatça ulaşılabilir.

Çalışmalarda kullandığımız XLI-Blue bakteri suşu için $CaCl_2$ yöntemi uygulanarak, hücre membranı genetik materyalin aktarılabilmesi için geçirgen hale getirilmiştir. Bu sayede hücrelere kompetent özellik kazandırarak, plazmit'in hücre içine girmesine olanak tanınmıştır. Bu işlem için aşağıdaki protokol takip edilmiştir.

- Kompetent yapılmak istenen hücre tipi LB agar besiyerine ekilmiş ve LB agarda gelişim gösteren kolonilerden, tek bir koloni seçilerek 10 ml LB Broth içeren erlene ekilerek gece boyu 37 ^{o}C'de çalkalamalı etüvde 120 rpm'de inkübe edilmiştir.

- Ertesi gün üreme olan erlenlerden 0.3 ml (300µl) örnek alınarak 100 ml'lik taze LB Broth besiyerine ekilmiş ve çalkalamalı etüvde 120 rpm, 37 °C'de inkübasyona devam edilmiştir.

- İnkübasyon halindeki kültürün istenilen yoğunluğa (erken lag faza) ulaşıp ulaşmadığını gözlemlemek için her 30-40 dk.'da bir spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. OD 0.4 ila 0.6 arasında olmalıdır. Spektrofotometri ölçümleri için kör olarak dH_2O kullanılmıştır.

- Bu dalga boyunda ölçüm değeri 0.4-0.6 aralığına geldiğinde kültür 50 ml'lik falkon tüpüne aktarılmış ve 5000 g'de (veya 4000 rpm) 4 ^{o}C'de 5 dk. santrifüjlenmiştir. Geriye kalan 50 ml'lik kültür tekrar aynı falkon tüpünde kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

- Santrifüj sonunda oluşan süpernatant uzaklaştırılmış ve diğer falkon tüpünün üzerine bekletilen 50 ml'lik kültür boşaltılmıştır. Aynı koşullarda bir kez daha santrifüj edilmiştir.

- Santrifüj sonunda süpernatant tamamen uzaklaştırıldıktan sonra oluşan pelet orijinal kültür hacminin yarısı kadar (50 ml) -20'deki soğuk 50 mM'lık $CaCl_2$ ile yavaş bir şekilde çözülmüştür. Tüpteki karışım homojen hale gelince tüp buza konulmuş ve 15 dakika bekletilmiştir.

- Sürenin sonunda karışım 4 °C'de 5000 g'de 10 dk. tekrar santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Pelet orijinal kültür hacminin % 2.5 kadar (4 ml) soğuk 50 mM $CaCl_2$ ile ikinci kez çözündürülmüştür.

- 4 ml $CaCl_2$'de çözünen pelet homojen hale gelince karışıma 600 µl % 80'lik soğuk gliserol eklenmiş ve daha önce soğutulmuş steril karyojenik tüplere 200'er µl halinde paylaştırılmıştır. Karyojenik tüpler buzda 5 dk. bekletildikten sonra -86 ^{o}C'ye kaldırılmıştır.

2.5.8.3. Transformasyon yöntemi

Ligasyon reaksiyonu ile oluşturulan rekombinant plazmit'in çoğaltılması için kompetent hücrelere plazmitin aktarılması gereklidir. Çalışmada konakçı hücre olarak *E. coli* XLI-Blue suşundan hazırlanan kompetent hücreler kullanılmıştır.

Transformasyon protokolünde aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.

- -80 ^{o}C'de saklanan kompetent hücreler buza alınarak 5-6 dk. bekletilmiştir.

- Karyojenik tüp içindeki kompetent hücre kültürünün tam ortasına 10 µl pGEM-T Easy plazmitiyle yapılmış ligasyon reaksiyonu eklenmiş ve kuru buzda 30 dakika süre ile bekletilmiştir. Bu aşamada plazmit DNA ortama salınmakta ve hücrelere giriş için hazır hale gelmektedir.

- Buzdan alınan karyojenik tüp 42 ^{o}C'deki su banyosuna konularak 2 dk. bekletilmiş ve sonrasında hemen buza alınarak 3 dakika da buzda bekletilmiştir. Burada 42 ºC ve buzda bekletilme süreleri önemlidir ve aşılmamalıdır.

- Sürenin bitiminde karyojenik tüpteki örneklerin üzerine 500 µl amfisilinsiz LB-Broth eklenmiş ve etüvde 37 ºC'de 30 dakika süre ile inkübe edilmiştir. (Burada 30 dakikalık süre çok fazla aşılmamalıdır. Aksi takdirde hücreler katı besiyerine ekildiklerinde çok fazla üremeye bağlı petri yüzeyini kaplayarak, halı oluşturabilir ve bu nedenle tek koloniler seçilemez).

- Bu süre içinde ekim yapılacak amfisilinli LB-Agar petrilerine 20 µl (veya 2 kat dilüe edilmiş solüsyondan 40 µl) X-Gal dragaski spatülü yardımıyla petri yüzeyine eklenmiş ve besiyerinin çözeltiyi çekmesi beklenmiştir.

- İnkübasyon sonunda karyojenik tüp 5000 rpm'de 1 dk. santrifüjlenmiş ve bu işlem sonunda tüpte 40-70 µl kalacak şekilde süpernatant yavaşça dökülmüştür.

- Pelet kalan sıvı içerisinde çözülür, sonra LB-agar-amfisilin-Xgal petrisinin yüzeyine yayılmış ve petri 5-10 dk. oda ısısında bekletildikten sonra ters çevrilerek gece boyu 37 ºC'lik etüvde inkübe edilmiştir.

2.5.8.4. Pozitif kolonilerin seçimi

Transformasyon sonrasında oluşan mavi beyaz kolonilerden beyaz renkli olan tek koloniler seçilerek numaralandırılmıştır. Bek alevinin yanında öze yardımıyla alınan koloniler önceden hazırlanmış olan 40 µl X-Gal içeren LB Agar Amfisilin (100µg/µl) petrilerine çizgi ekimleri yapılarak master plate oluşturulmuştur. Bu işlemi takiben, özede kalan artık ile 10 ml'lik 100 µg/µl amfisilinli LB medium besiyerine ekim yapılır. X-Gal içeren LB Agar amfisilin tabakları ve LB Broth besiyerleri 37 °C'de bir gece inkübe edilir.

Çalkalamalı etüvde inkübe edilen koloniler eğer saklamak isteniyorsa 10 ml'in 5 ml'i alınır ve % 80'lik gliserolden 800 µl eklenerek -86 ^{o}C'ye kaldırılır.

2.5.8.5. Pozitif kolonilerden plazmit izolasyonu

Wizard Plus SV Minipreps DNA Saflaştırma Sistemi (Promega) Kiti ile Plazmit İzolasyonu:

- 25 ml'lik erlenlere 10 ml steril LB-Broth hazırlanmış ve her 10 ml LB-Broth için 100 µl 100x'lik amfisilin eklenmiştir. Pozitif sonuç olan beyaz koloniler steril bir öze yardımıyla petri yüzeyinden alınarak 10 ml'lik besi yerlerine ekilmiş ve çalkalamalı etüvde (100-120 rpm/dk.) 37 ^{o}C'de gece boyunca inkübe edilmişdir. (özede kalan beyaz pozitif koloniler)

- Sabah besiyeri yoğunluğuna göre erlendeki hücrelerden ependorf ya da falkon tüplerine 1-5 ml alınarak 8000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.

- Oluşan pelet 250 µl hücreleri yeniden çözme tamponu (resüspanse solution) ile çözdürülmüştür. Karışıma 250 µl hücre lizis solüsyonu eklenmiş ve 4 kere alt üst yapılmıştır. Daha sonra 10 µl alkalin proteaz solüsyonu eklemiş ve tekrar 4 defa alt üst edilerek 5 dk. oda ısısında bekletilmiştir.

- Süre sonunda karışsıma 350 µl nötralizasyon solüsyonu eklenmiş ve 4 defa alt üst edilerek oda ısısında 12000 rpm'de 5-10 dk. santrifüjlenmiştir.

- Kitin içindeki toplama tüpüne spin kolonu yerleştirilmiş ve kolonun içine santrifüj sonunda üst kısımda oluşan sıvı faz eklenerek oda ısısında 12000 rpm'de 1 dk. santrifüjlenmiştir.

- Santrifüj sonunda toplama tüpündeki sıvı boşaltılmış ve spin kolonuna 750 µl yıkama solüsyonu eklenmiştir. Oda ısısında 12000 rpm'de 1 dk. santrifüjlenmiş ve toplama tüpündeki sıvı dökülerek aynı işlem bir kez daha 250 µl yıkama solüsyonu eklenerek oda ısısında 12000 rpm'de 2 dk. santrifüjlenerek tekrarlanılmıştır.

- Spin kolonu alınarak altına yeni steril -20 ^{o}C'de soğutulmuş 1.5 ml'lik ependorf tüpü konulmuştur. Spin kolonuna 80-100 µl nükleazsız su eklenerek oda ısısında 12000 rpm'de 1 dk. santrifüjlenmiştir (Kobs, 1997).

2.5.8.6. Plazmitlerde insert varlığının doğrulanması

Plazmit izolasyonu işleminin sonunda başarılı klonlama yapabildiğimiz plazmitlerin teyidi için spektrofotometrik ölçümler yapılmış ve jel eloktroforezinde yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. pGEM-T Easy plazmiti 3015 bp büyüklüğünde olup klonlamayı gerçekleştirdiğimiz vektörlerin büyüklüklerinin 3015 bp den büyük olması beklenmektedir. Plazmit miktar ölçümleri ve jel görüntüleri dikkate alınarak uygun görülen klonlar dizi analizine gönderilmiştir.

2.5.8.7. İnsert içeren plazmitlerin dizi analizi

Dizi analizi için sentromer firmasıyla anlaşılmış olup plazmitlerin çift yönlü okuması yapılmış ve listenin sonundaki sonuçlar elde edilmiştir.

2.5.8.8. Dizi bilgierinin biyoinformatik analizi

Rekombinant plazmitlerden elde edilen dizi bilgileri, NCBI veri tabanında Vector Screen programı kullanılarak analiz edilmiş ve insert dizi bilgisi vektör dizilerinden temizlenmiştir. İnsert'lere ait dizi bilgileri yine NCBI veri tabanında bulunan BLAST (blastn) programı kullanılarak taranmış ve en yakın dizi bilgileri tespit edilmiştir.

2.6. *T. foetida*'nın Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Bugüne kadar sürme hastalığı ile ilgili birçok çalışmada *Tilletia* sp.'nin teşhisi için türün teliospor morfolojisi, sorus rengi ve şekli, teliosporun çimlenme koşulları, ve patojenite değerleri gibi fenotipik özellikler belirteç olarak kullanılmıştır (Shi, Y., vd., 1996). Günümüze kadar farklı *T. foetida* izolat veya popülasyonları ile ilgili detaylı bir elektron mikroskobu çalışması bulunmamaktadır. Bu çalışmada, ülkemizde sürme hastalığına sebep olan *T. foetida*'ın Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope) ile morfolojik olarak incelemesi yapılmış ve farklı izolatlara ait spor boyutlarının hastalık yapma dereceleri ile bağlantılı olup olmadığı araştırılmıştır.

SEM Analizi

T. foetida ve *T. caries*'e ait tüm örneklerin SEM görüntüleri, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarlar'ında (MARAL) fotoğraflanmıştır. Sürme sporlarına ait her bir izolatın ayrı ayrı 100X, 1000X, 2500X, 5000X ve 10.000X büyütmede görüntüleri elde edilmiş ve bu görüntüler kullanılarak sporların morfolojik analizleri gerçekleştirilmiştir. Sporlara ait hücresel boyut ölçümleri, her büyütme oranı için büyütme oranına bağlı cihaza ait ölçeklendirme sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiş.

2.7. Etmenin Patojenisite Etkisinin Belirlenmesi

Heines VII buğday çeşidinin sürme hastalık oranlarının belirlenmesi için yapılan denemeler 2011-2012 yıllarında Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü

tarlalarında yapılmıştır. Heines VII buğday çeşidi 1m X 1m boyutlarındaki parsellere, sıra arası 30 cm ve bloklar arasında 50 cm mesafe kalacak şekilde ekilmiştir.

Verilerin İstatistik Analizi

Her bir izolattan 50 spor hücresinin ölçümü yapılmıştır. Hücre ebatlarına ait ölçüm değerlerin aritmetik ortalamaları alınmıştır. Örneklerin ebatlarını birebir karşılaştırmak amacıyla 10000X büyütmede cihazın ölçüm programı kullanılmıştır. Elde edilen veriler, her bir izolata ait hastalık yapma oranları ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalardaki hesaplamalar SAS (1987) paket programı kullanılarak yapılmıştır.

Ele alınan iki değişkenden hangi değişkenin bağımsız hangisinin bağımlı olduğuna bakılmaksızın, iki değişkenin birlikte artmaları, azalmaları veya ters ilişki göstermeleri birlikte değişim olarak ifade edilmektedir. İstatistikte değişkenler arasındaki birlikte değişimin ölçüsü korelasyon katsayısı ile ortaya konmaktadır. Korelasyon iki değişken arasındaki ilişkinin değerini ölçer.

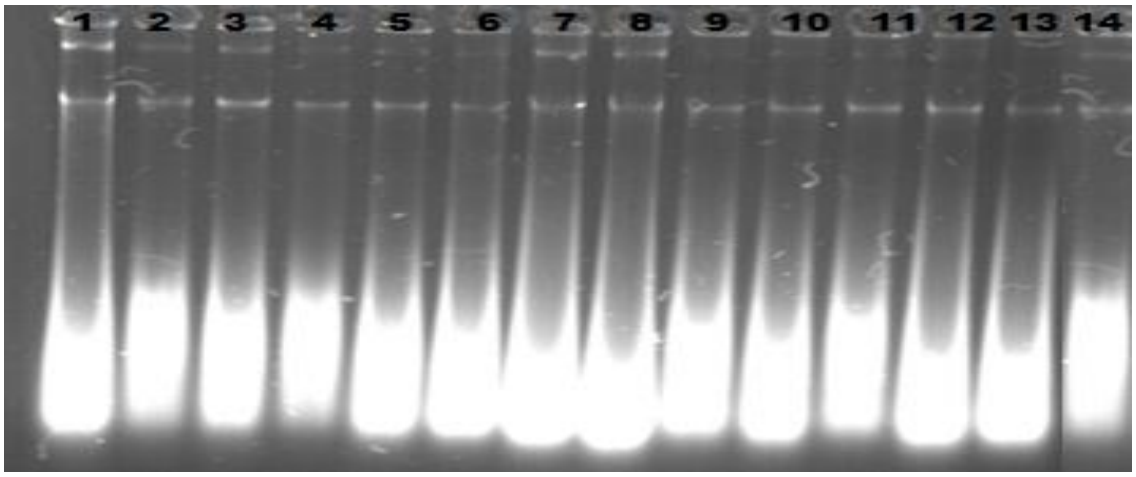
Çalışmalarda, incelenen değişkenler (hastalık yapma oranları (x), ortalama hücre boyutları (y)) normal dağılış gösterdiğinde iki değişken arasındaki ilişkinin derecesini ve yönünü göstermek amacıyla en yaygın kullanılan katsayı Pearson korelasyon katsayısıdır.

Pearson korelasyon katsayısı $-1 \leq r_{xy} \leq +1$ değerleri arasında değişim göstermektedir.r_{xy}'nin –1 olması, X ile Y değişkenleri arasında negatif tam bir ilişki , +1 olması durumu ise X ve Y değişkenleri arasında pozitif tam bir ilişki olduğunu göstermektedir. r_{xy} değerinin 0 olması durumu ise, iki değişken arasında ilişkinin olmadığını göstermektedir (Kayaalp ve Çankaya, 2003)

3. BULGULAR

3.1. *T. foetida* Sporlarından Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmamızda moleküler biyoloji tekniklerinin uygulanabilmesi için öncelikle yüksek molekül ağırlıklı DNA molekülünün saf bir şekilde elde edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla çalışmamızın genelinde kullanmak için 1 adet *T. caries* ve 13 adet *T. foetida* ırkına ait sporlar özenli bir şekilde buğday kavuzlarından ayrıldıktan sonra, uygun liziz tamponla parçalanmıştır. Parçalanan mantar sporlarından 100-200 mg alınarak 2X CTAB yöntemi ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Doyle ve Doyle, 1987). İzolasyon sonunda elde ettiğimiz genomik DNA'lardan 5 µl alınarak % 0.8'lik 100 ml agoroz jelde 90 V'ta 35 dk. yürütülmüş ve ilerleyen çalışmalar için DNA elde edilip edilmediği kontrol edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. CTAB genomik DNA izolasyonu. 1, 3-14. *T. foetida,* 2. *T. caries.*

3.2. Genomik DNA'nın Spektrofotometre'de Ölçümü, Miktar ve Saflık Tayini

Çalışmamızda bir sonraki aşamaya geçmeden önce Şekil 3.1'de jelde parlak tek bir bant olarak görülen *T. foetida'*ya ait DNA'ların Nanodrop Spektrofotometre'de saflık ve miktar tayinleri yapılmıştır. Nükleik asitler ışığı en iyi 260-280 nm boyunda absorbe ettiklerinden, ölçümler bu dalga boyunda yapılmıştır. Bu dalga boydaki ölçümler DNA'nın saflığını yani kalitesini göstermektedir. Ölçüm sonucunda 1.8-2.0 arasındaki değerler saf olarak kabul edilmiştir. Çalışmada DNA örneklerinin saflık değerleri 1.8-2.6 arasında bulunmuştur, 2.0'ın üzerinde olan saflık değerleri DNA örneklerinde fenol ve kloroform varlığını işaret etmektedir, fakat saflık değerleri 2.0'nin üzerinde olan

DNA örnekleri PCR reaksiyonlarında başarılı sonuçlar verdiklerinden tekrar izolasyon yapılmamıştır. Elde edilen DNA saflık ve miktar değerleri çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *Tilletia sp* 'den izole edilmiş genomik DNA'ların miktar ve saflık ölçüm sonuçları.

İzolat no	Tür	Saflık (260/280 nm)	DNA miktarı (Ng/µl)
İzolat 1	*T. foetida*	2,18	460
İzolat 2	*T. caries*	2,23	194,2
İzolat 3	*T. foetida*	2,26	258,3
İzolat 4	*T. foetida*	2,26	173,5
İzolat 5	*T. foetida*	2,17	335
İzolat 6	*T. foetida*	2,16	431,4
İzolat 7	*T. foetida*	2,12	1038,8
İzolat 8	*T. foetida*	2,07	1051,1
İzolat 9	*T. foetida*	2,22	304
İzolat 10	*T. foetida*	2,17	374,9
İzolat 11	*T. foetida*	2,18	341,4
İzolat 12	*T. foetida*	2,03	1201,7
İzolat 13	*T. foetida*	2,15	566,1
İzolat 14	*T. foetida*	1,80	166,1

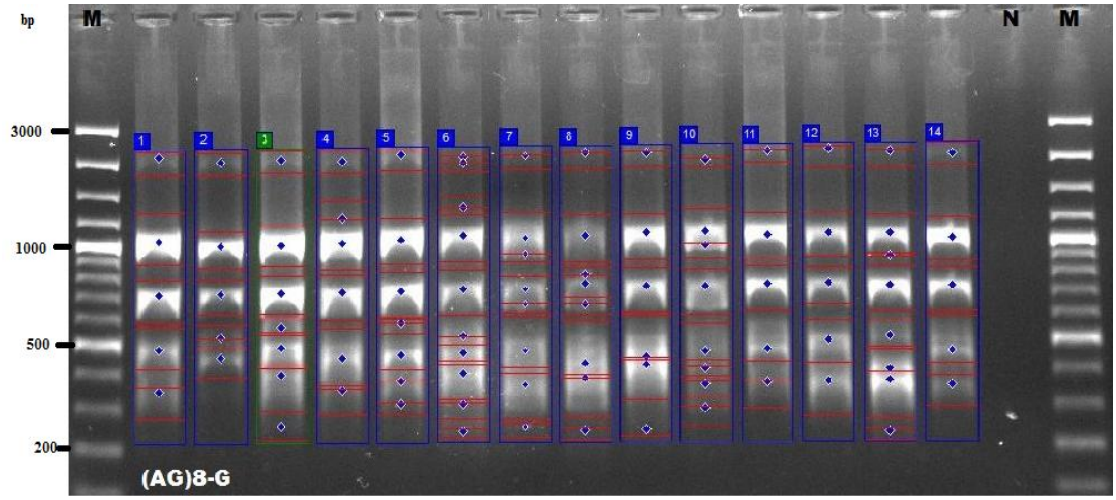
3.3. ISSR-PCR için Kalıp DNA Hazırlığı

İstenilen saflık ve miktarda genomik DNA'lar elde edildikten sonra, polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılabilmesi için seyreltilmesi yapılmıştır. Çünkü hazırlayacağımız kalıp solüsyonda total DNA miktarının yoğun olması ISSR-PCR'da kullanılan primerlerin hedef DNA'ya bağlanamamasına neden olur ve dolayısıyla ürün oluşmaz. Hazırlanacak kalıp solüsyondaki genomik DNA miktarının az olması ise yetersiz miktarda ürün oluşması ile sonuçlanır. Bundan dolayı İzole ettiğimiz DNA'lardan µl'de 2 ng olacak şekilde kalıp DNA çalışma solüsyonları hazırlanmıştır. Ayrıca reaksiyon içindeki kalıp DNA'nın azlığı ya da fazlalığı da elde edilen PCR ürün sayısını ve netliğini etkilemektedir. Bu çalışmada en iyi PCR sonucu çalışma

solüsyonundan; 25 µl'lik kurulan reaksiyonlara 2 µl (4ng) kalıp DNA, 12.5 µl'lik kurulan reaksiyonlara ise 1.5 µl (3ng) kalıp DNA kullanılarak elde edilmiştir.

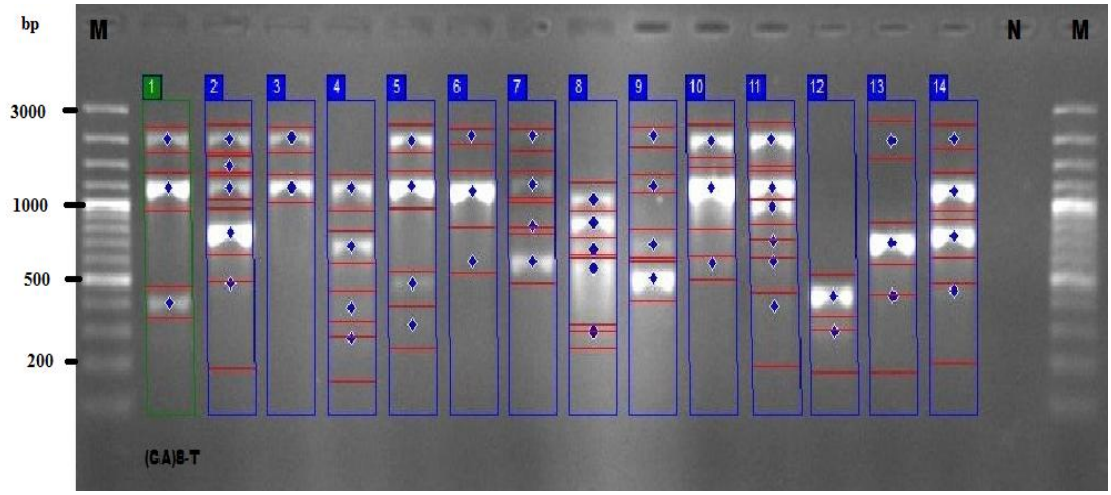
3.4. ISSR-PCR Sonuçları ve Polimorfizm Bilgi İçeriğinin Hesaplanması

Aşağıdaki şekillerde *T. foetida* izolatlarında oluşan çeşitliliği görebilmek adına yapılan ISSR-PCR deneylerinin jel görüntüleri mevcut olup, bu şekillerde M: markör'ü (Fermantas Gene Ruler 100 bp DNA ladder Plus), 1, 3-14: *T. foetida* izolatlarını, 2: *T. caries* izolatını (Çizelge 2.1), N ise negatif kontrolü ifade etmektedir. Şekillerde (Şekil 3.2-3.19) ISSR primerileri kullanılarak oluşan bant profilleri büyüklüklerinin belirlenmesi ve çeşitliliği tanımlayabilmek adına tanımlayıcı bir markörle karşılaştırılmıştır.



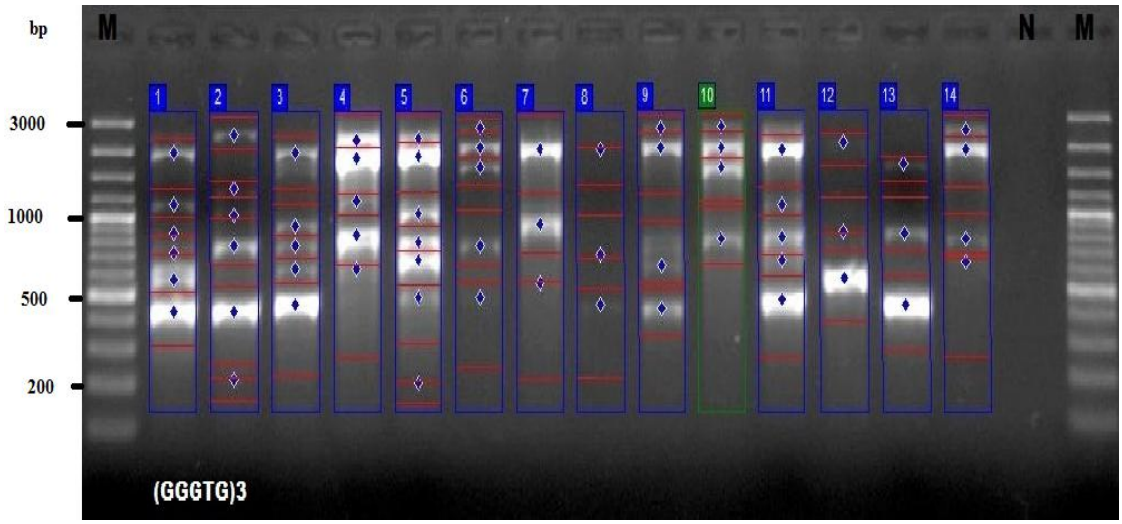
Şekil 3.2. ISSR-01 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida*, 2: *T. caries*, M: Markör, N: Negatif kontrol.

$(AG)_8$-G dizilimli ISSR primeri ile yapılan PCR sonucunda 12'si polimorfik 1'i monomorfik olmak üzere toplam da 13 bant elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 92.3 bulunmuştur.



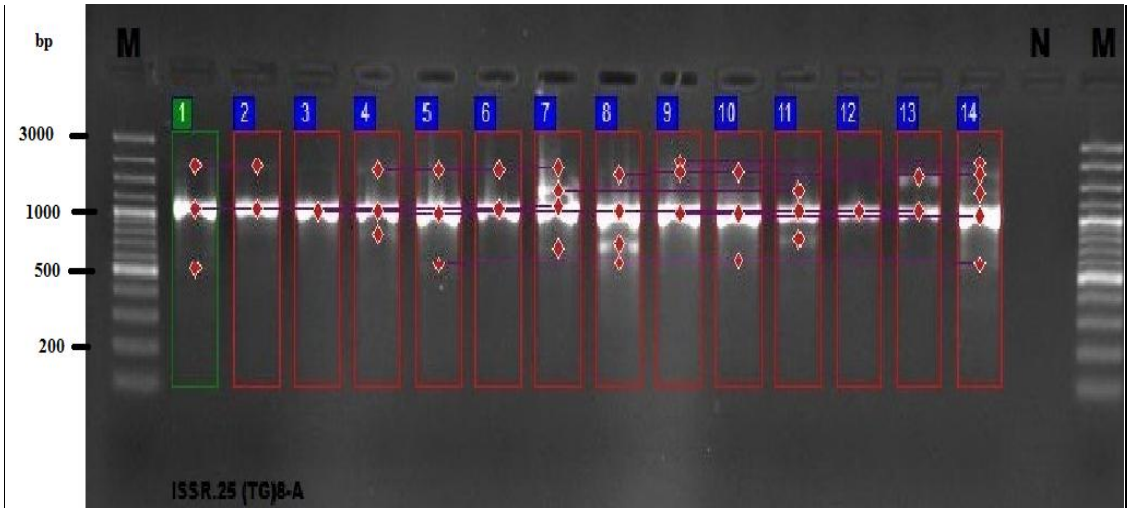
Şekil 3.3. ISSR-02 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida*, 2: *T. caries*, M: Markör, N: Negatif kontrol.

$(GA)_8$-T dizilimli ISSR primeri ile yapılan PCR sonucunda 9 polimorfik bant elde edilmiş olup, polimorfizm oranı % 100'dür.



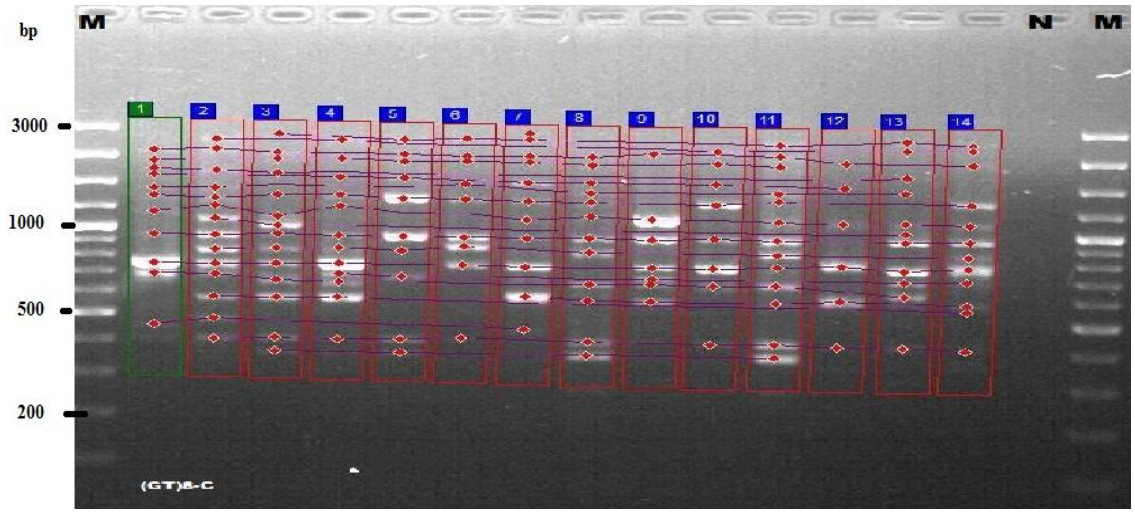
Şekil 3.4. ISSR-10 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida*, 2: *T. caries*, M: Markör, N: Negatif kontrol.

$(GGGTG)_3$ dizilimli ISSR primeri ile yapılan PCR sonucunda 9 polimorfik bant elde edilmiş olup, polimorfizm oranı % 100'dür.



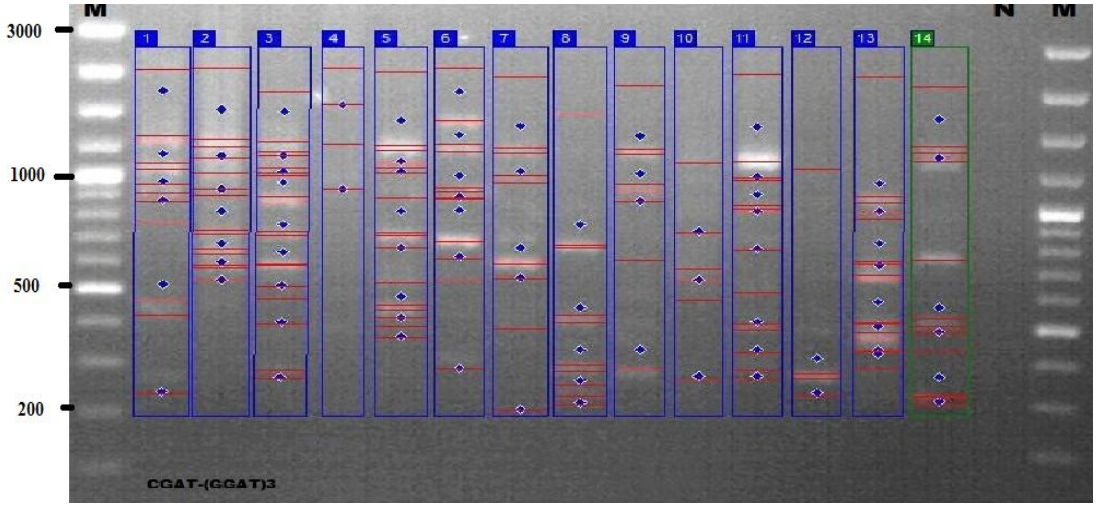
Şekil 3.5. ISSR-25 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol.

$(TG)_8$-A dizilimli primeri ile yapılan PCR sonucunda 17 polimorfik bant elde edilmiş olup, polimorfizm oranı % 100'dür.



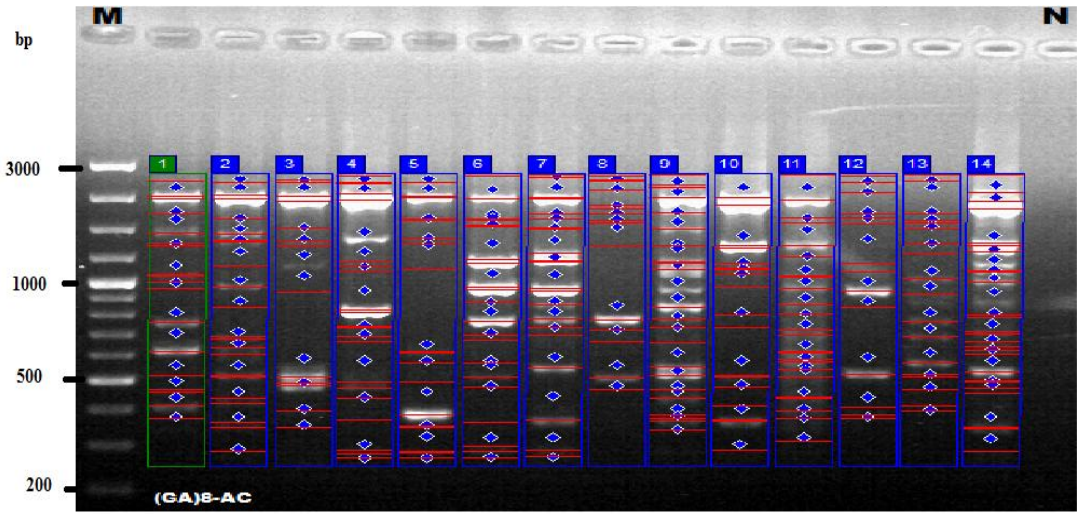
Şekil 3.6. ISSR-27 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol.

$(GT)_8$-C dizilimli ISSR primeri ile yapılan PCR sonucunda 20'si polimorfik 1'i monomorfik olmak üzere toplam da 21 bant elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 96 bulunmuştur.



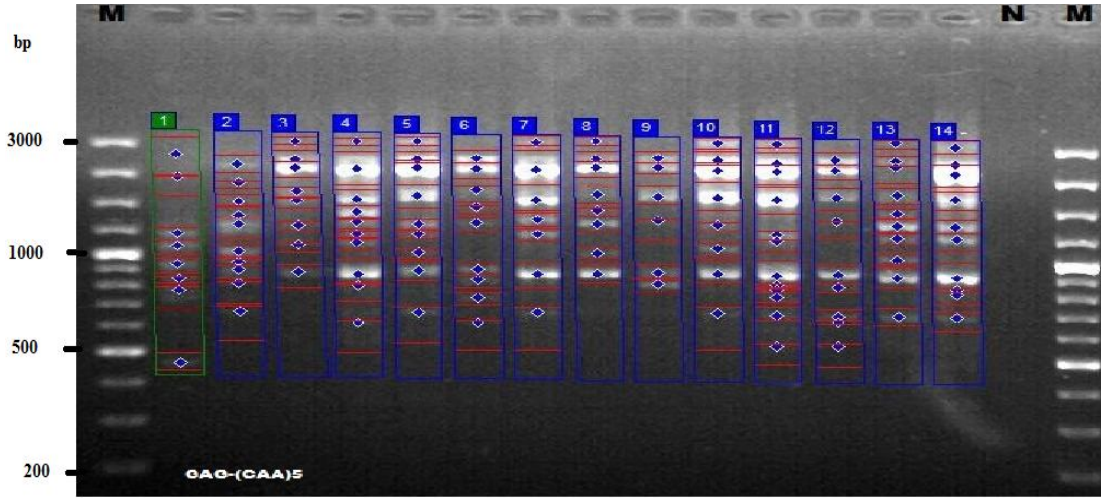
Şekil 3.7. ISSR-28 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida*, 2: *T. caries*, M: Markör, N: Negatif kontrol.

CGAT-$(GGAT)_3$-C dizilimli ISSR primeri ile yapılan PCR sonucunda 38'i polimorfik 2'si monomorfik olmak üzere toplam da 40 bant elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 95 bulunmuştur.



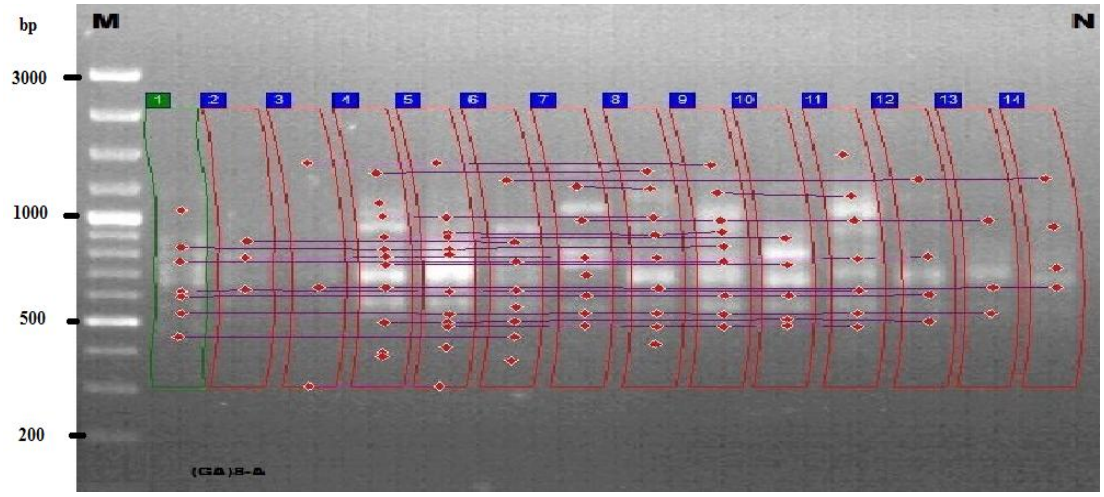
Şekil 3.8. ISSR-29 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida*, 2: *T. caries*, M: Markör, N: Negatif kontrol.

$(GA)_8$-AC dizilimli ISSR primeri ile yapılan PCR sonucunda 49'u polimorfik 3'ü monomorfik olmak üzere toplam da 52 bant elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 94.2 bulunmuştur.



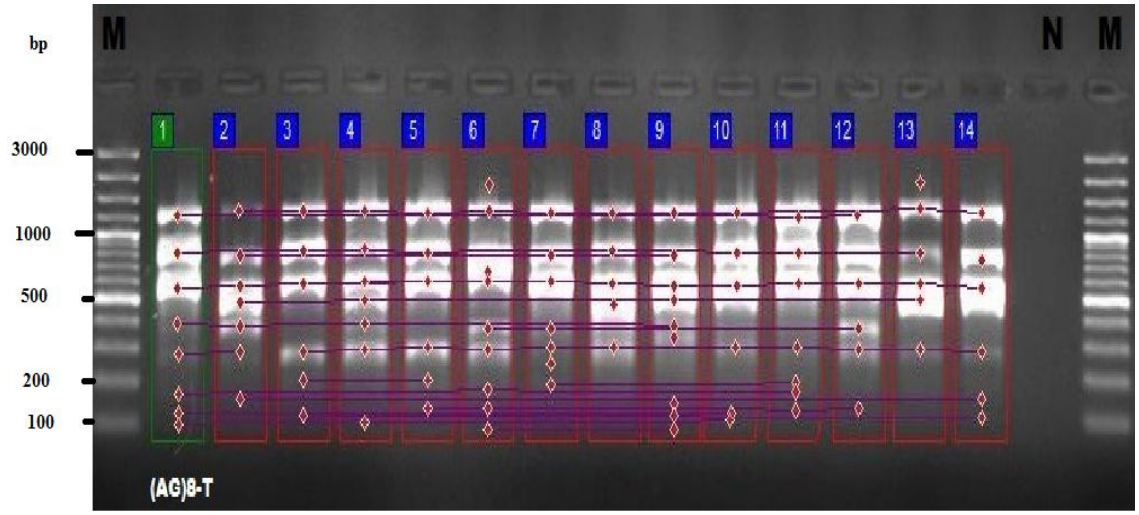
Şekil 3.9. ISSR-301 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol.

GAC-$(CAA)_5$ dizilimli ISSR primeri ile yapılan PCR sonucunda 18'i polimorfik 2'si monomorfik olmak üzere toplam da 20 bant elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 90 bulunmuştur.



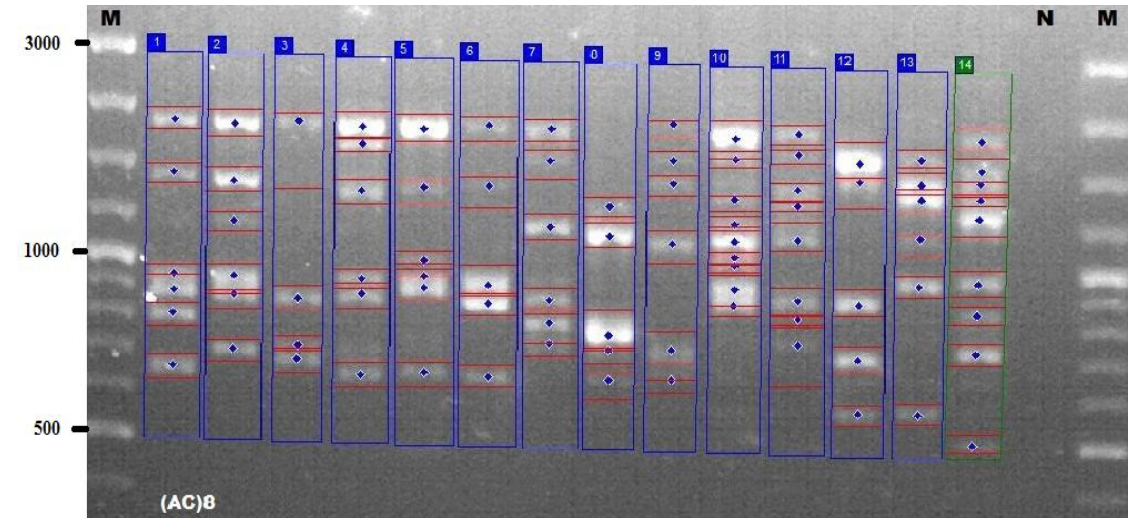
Şekil 3.10. ISSR-309 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol.

$(GA)_8$-A dizilimli ISSR primeri ile yapılan PCR sonucunda 33'ü polimorfik 2'si monomorfik olmak üzere toplam da 35 bant elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 94.3 bulunmuştur.



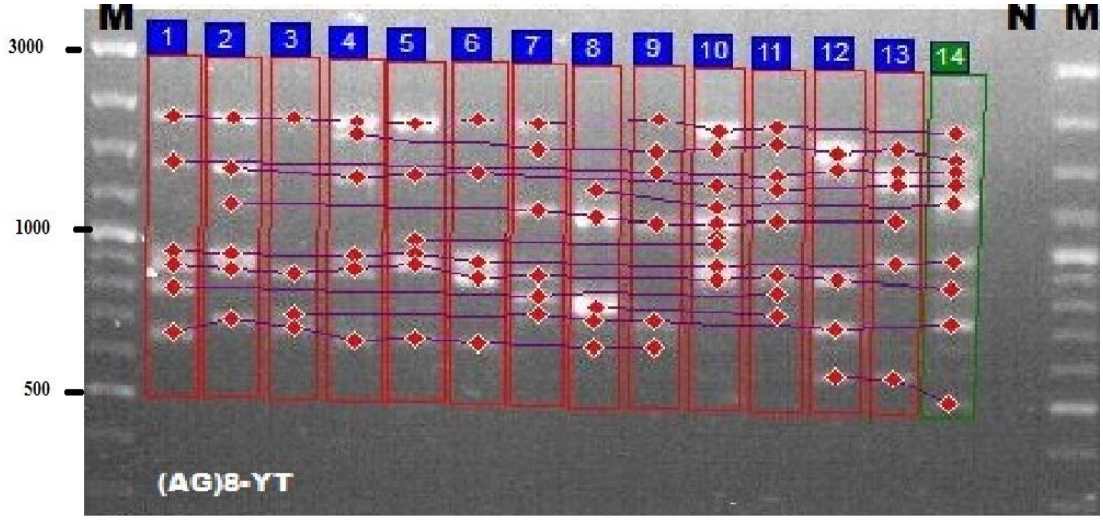
Şekil 3.11. ISSR-310 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol.

$(AG)_8$-T dizilimli ISSR primeri ile yapılan PCR sonucunda 28'i polimorfik 1'i monomorfik olmak üzere toplam da 29 bant elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 96.6 bulunmuştur.



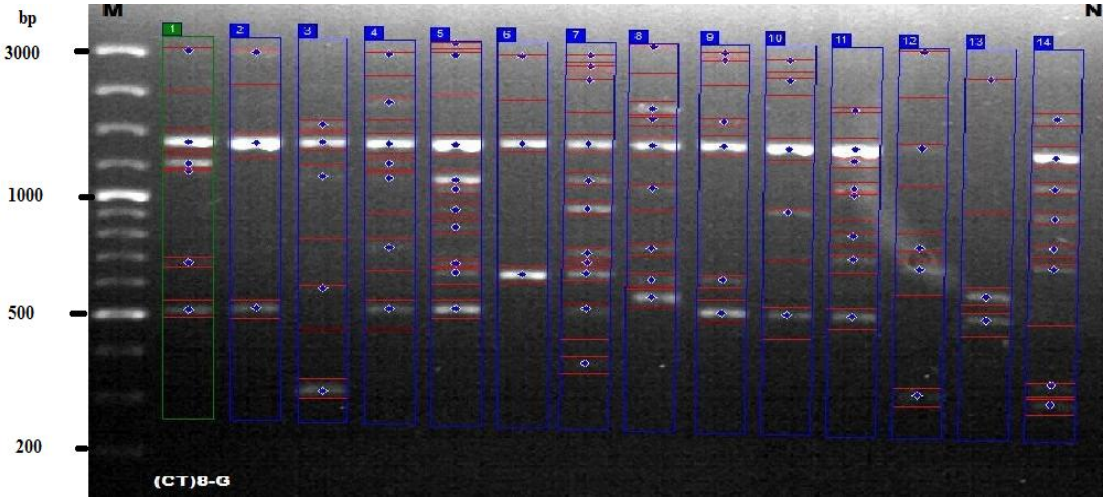
Şekil 3.12. ISSR-312 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol.

$(AC)_8$ dizilimli ISSR primeri ile yapılan PCR sonucunda 15 polimorfik bant elde edilmiş olup, polimorfizm oranı % 100'dür.



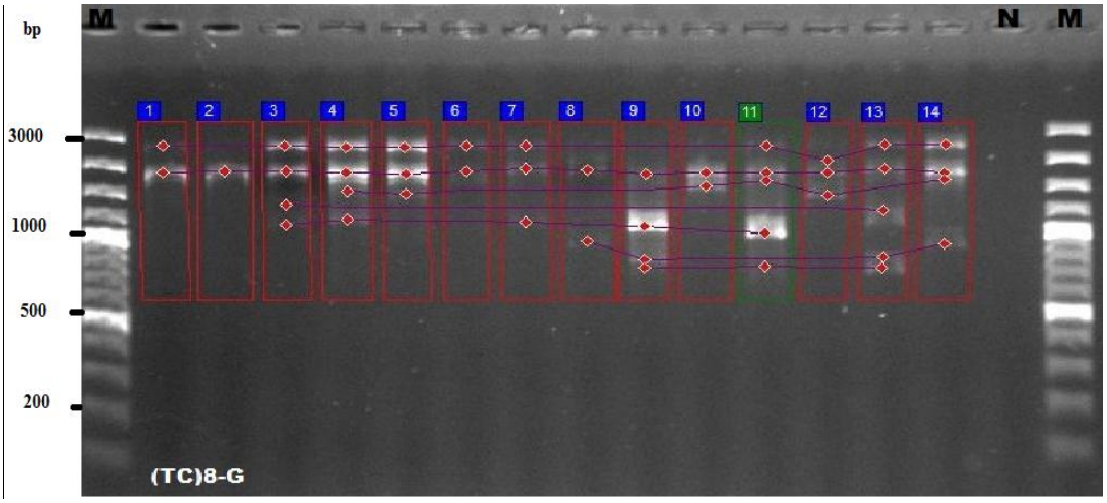
Şekil 3.13. ISSR-324 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol.

$(AG)_8$-YT dizilimli ISSR primeri ile yapılan PCR sonucunda 12'si polimorfik 1'i monomorfik olmak üzere toplam da 13 bant elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 92.3 bulunmuştur.



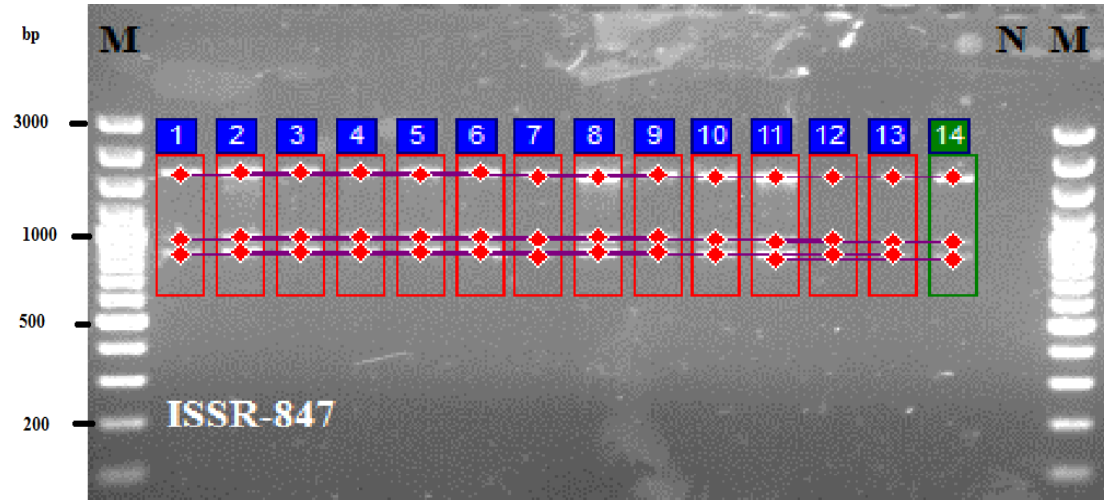
Şekil 3.14. ISSR-815 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol.

$(CT)_8$-G dizilimli ISSR primeri ile yapılan PCR sonucunda 17'si polimorfik 1'i monomorfik olmak üzere toplam da 18 bant elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 94.4 bulunmuştur.



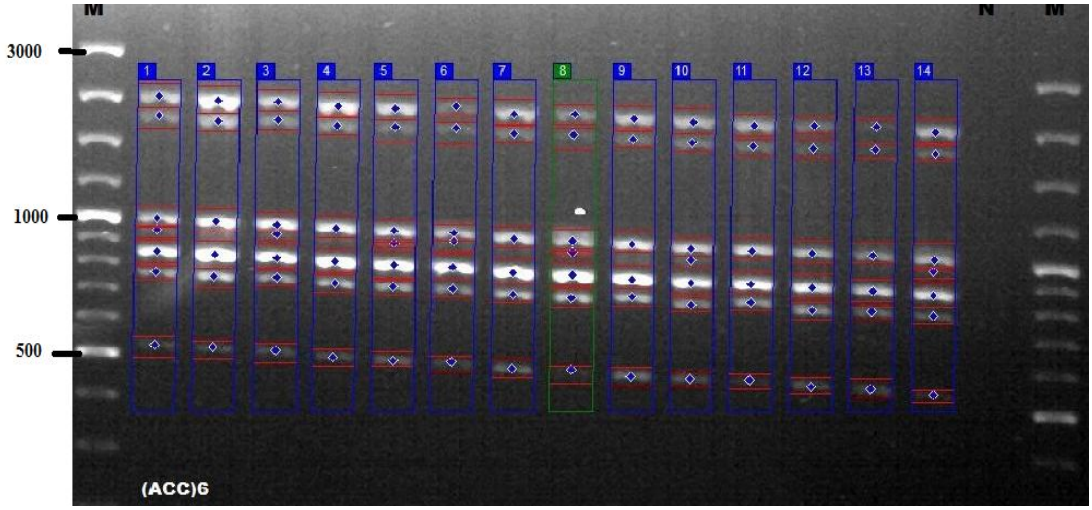
Şekil 3.15. ISSR-829 numaralı numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol.

$(TC)_8$-G dizilimli ISSR primeri ile yapılan PCR sonucunda 6'sı polimorfik 1'i monomorfik olmak üzere toplam da 7 bant elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 85.7 bulunmuştur.



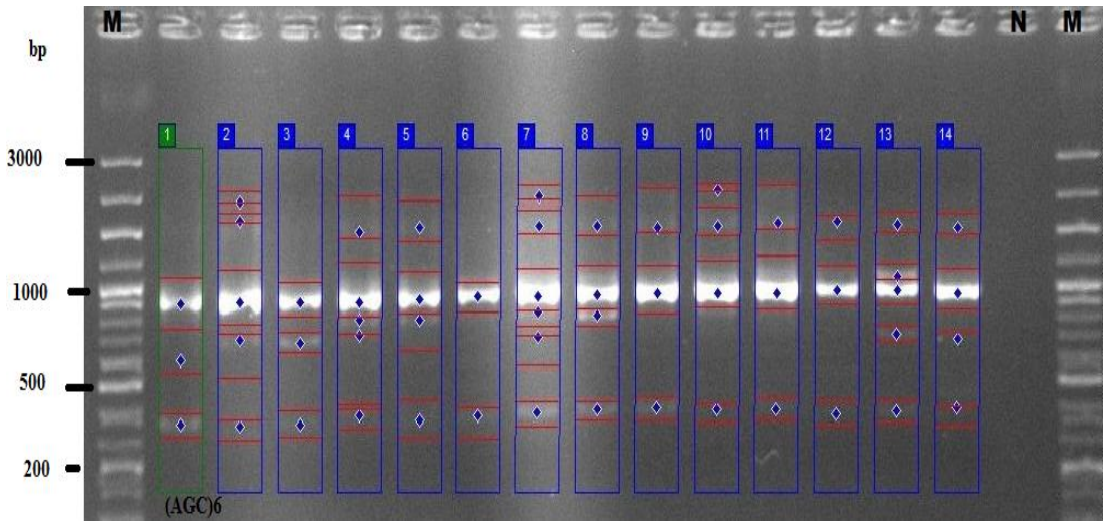
Şekil 3.16. ISSR-847 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif Kontrol.

$(CA)_8$-RCdizilimli ISSR primeri ile yapılan PCR sonucunda monomorfik 3 bant elde edilmiş olup, polimorfizm görülmemiştir.



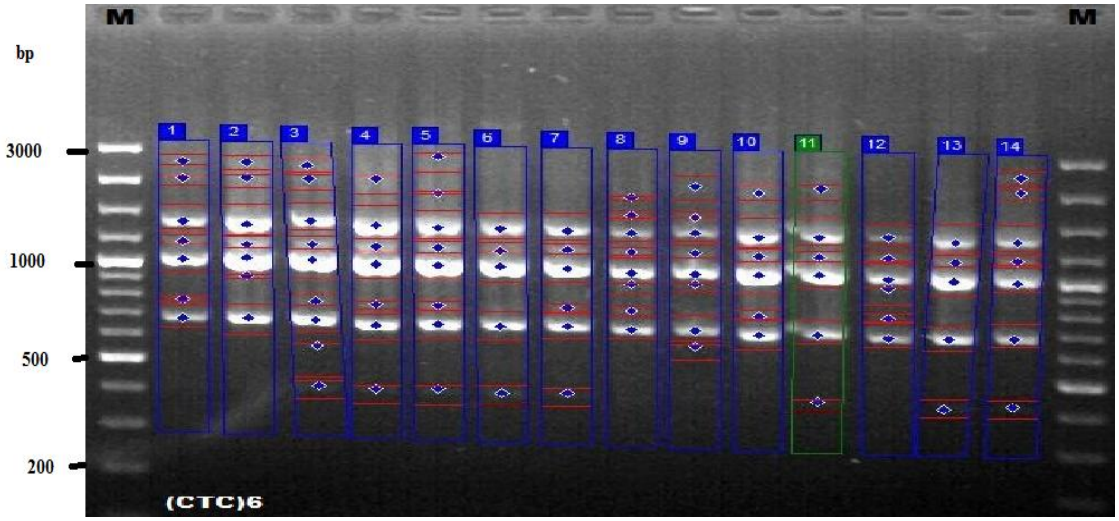
Şekil 3.17. ISSR-861 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol.

$(ACC)_6$ dizilimli ISSR primeri ile yapılan PCR sonucunda monomorfik 6 bant elde edilmiş olup, polimorfizm görülmemiştir.



Şekil 3.18. ISSR-862 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol.

$(AGC)_6$ dizilimli ISSR primeri ile yapılan PCR sonucunda 20'si polimorfik 1'i monomorfik olmak üzere 21 bant elde edilmiş olup, polimorfizm oranı % 96'dır.



Şekil 3.19. ISSR-866 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. 1, 3-14: *T. foetida,* 2: *T. caries,* M: Markör, N: Negatif kontrol.

$(CTC)_6$ dizilimli ISSR primeri ile yapılan PCR sonucunda 7'si polimorfik 4'ü monomorfik olmak üzere toplam da 11 bant elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 63.6 bulunmuştur.

Polimorfizm Bilgi İçeriği:

T. foetida izolatlarının evrimsel genetik çeşitliliğinin belirlenmesi ve tanımlanması için 25 ISSR primeri taranmış (Çizelge 2.2) ve bu primerlerden 18'i ISSR-PCR yönteminde kullanılmıştır.

PCR sonuçlarına göre toplamda 340 bant elde edilmiş olup bu bantlardan 310'u polimorfik, 30'u ise monoforfik yapıda görüntülenmiştir (Çizelge 3.2). Kullanılan primerlerden en fazla bantlaşma oranı 52 bant ile ISSR-29 no.'lu primerde görülürken, en düşük bantlaşma ise ISSR 847 numaralı primerde görülmüştür. Çizelge 3.2' deki polimorfizm bilgi içeriği değerlerine bakıldığında primerlerinin PBİ değerlerin 0.274 ile 0.374 arasında değiştiği görülebilir. PBİ değerinin ortalaması ise 0.329'dur. ISSR markörleri dominant karakterli olduğundan çalışmamızdaki markörlerin PBİ değeri beklenildiği gibi 0.5 'in altında çıkmıştır.

Oluşan bant profilleri Phoretix1DPro programına göre var (1) ya da yok (0) şeklinde değerlendirildikten sonra genetik benzerlik indeksi Jaccard eşitliği hesaplanmıştır (Şekil 3.20).

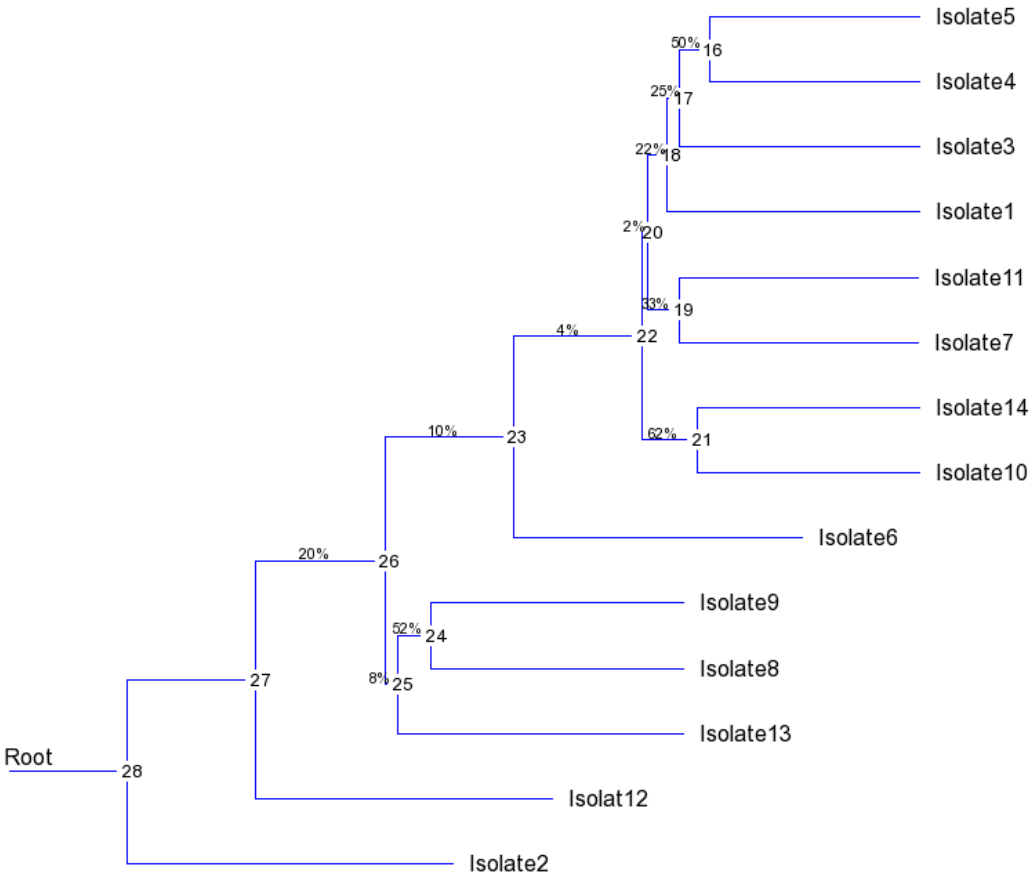
Jaccard benzerlik değerlerinden yola çıkarak bir dendrogram elde edilmiştir. Soyağacının (filogenetik Ağaç) elde edilmesinde UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) yöntemi kullanılmıştır (Şekil 3.21).

Çizelge 3.2. Kullanılan ISSR primerleri sonucu *T. foetida* ve *T. caries*'te elde edilen bantlaşma sonuçları ve polimorfizm oranları.

Primer no	Primer dizilimi (5'-3')	Polimorfizm bilgi içeriği	Polimorfik bant sayısı	Monomorfik bant sayısı	Polimorfizm oranı (%)
ISSR-01	AGAGAGAGAGAGAGAGG	0,373	12	1	92,3
ISSR-02	GAGAGAGAGAGAGAGAT	0,346	9	-	100
ISSR-10	GGGTGGGTTGGGGTG	0,370	9	-	100
ISSR-25	TGTGTGTGTGTGTGTGA	0,361	17	-	100
ISSR-27	GTGCGTGCGTGCGTGC	0,345	20	1	96
ISSR-28	CGATGGATGGATGGAT	0,325	38	2	95
ISSR-29	GAGAGAGAGAGAGAGAC	0,352	49	3	94,2
ISSR-815	CTCTCTCTCTCTCTCTG	0,318	17	1	94,4
ISSR-829	TCTCTCTCTCTCTCTCG	0,307	6	1	85,7
ISSR-847	CACACACACACACACARC	0,303	-	3	0
ISSR-861	ACCACCACCACCACCACC	0,326	-	6	0
ISSR-862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC	0,321	20	1	96
ISSR-866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	0,274	7	4	63,6
ISSR-301	GAGCAACAACAACAACAA	0,288	18	2	90
ISSR-309	GAGAGAGAGAGAGAGAA	0,300	33	2	94,3
ISSR-310	AGAGAGAGAGAGAGAGT	0,311	28	1	96,6
ISSR-312	ACACACACACACACAC	0,335	15	-	100
ISSR-324	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	0,280	12	1	92,3

	Isolate1	Isolate2	Isolate3	Isolate4	Isolate5	Isolate6	Isolate7	Isolate8	Isolate9	Isolate10	Isolate11	Isolat12	Isolate13	Isolate14
Isolate1	0	0.703	0.616	0.619	0.616	0.652	0.680	0.727	0.646	0.658	0.614	0.676	0.679	0.686
Isolate2		0	0.697	0.704	0.707	0.671	0.723	0.769	0.737	0.739	0.716	0.725	0.708	0.728
Isolate3			0	0.637	0.564	0.696	0.634	0.633	0.681	0.651	0.624	0.705	0.629	0.640
Isolate4				0	0.561	0.671	0.682	0.690	0.709	0.608	0.656	0.695	0.656	0.634
Isolate5					0	0.635	0.632	0.655	0.683	0.614	0.608	0.698	0.684	0.638
Isolate6						0	0.651	0.706	0.673	0.624	0.648	0.687	0.681	0.680
Isolate7							0	0.655	0.676	0.639	0.599	0.656	0.692	0.669
Isolate8								0	0.612	0.665	0.637	0.699	0.644	0.691
Isolate9									0	0.654	0.628	0.671	0.667	0.659
Isolate10										0	0.653	0.704	0.635	0.575
Isolate11											0	0.669	0.626	0.621
Isolat12												0	0.662	0.671
Isolate13													0	0.667
Isolate14														0

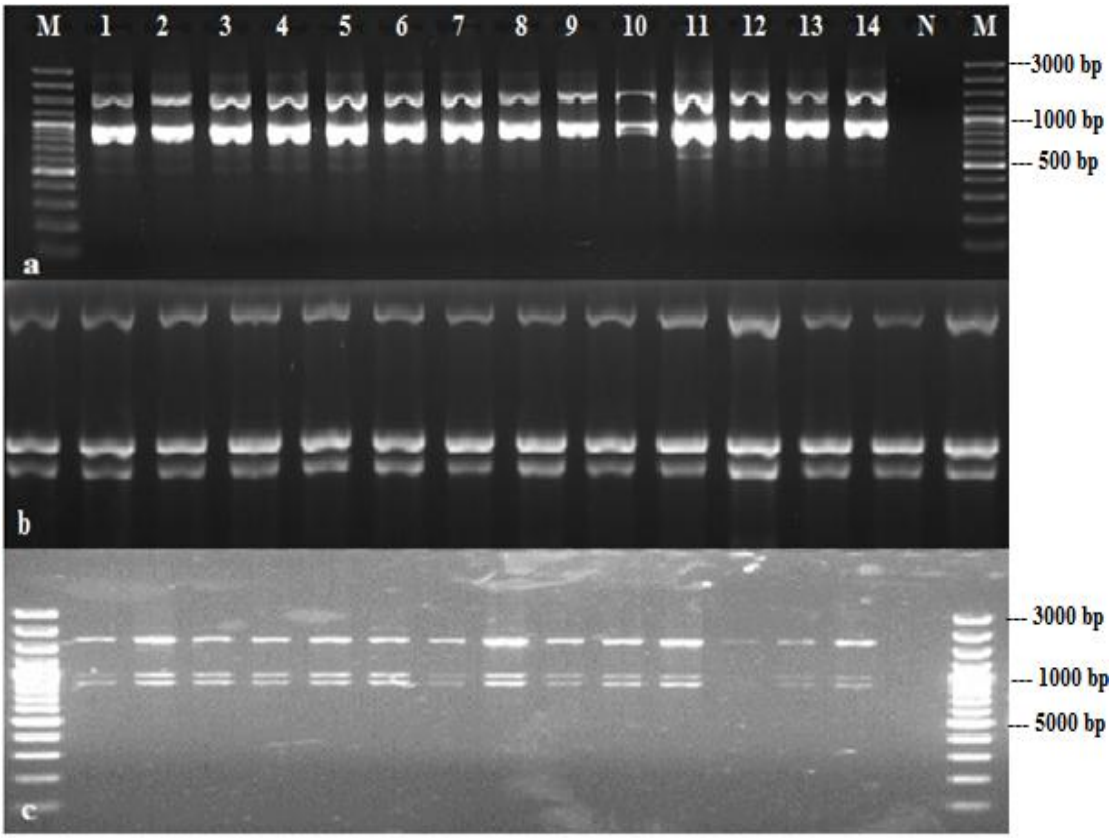
Şekil 3.20. 13 *T. foetida* (isolate-1, 3-14) ve *T. caries* (isolate-2) için jaccard benzerlik oranları.



Şekil 3.21. *T. foetida* izolatlarında ISSR primerleri kullanılarak oluşturulan dendrogram.

3.5. Seçilen Spesifik ISSR Markör'lerinin PCR Tekrarları

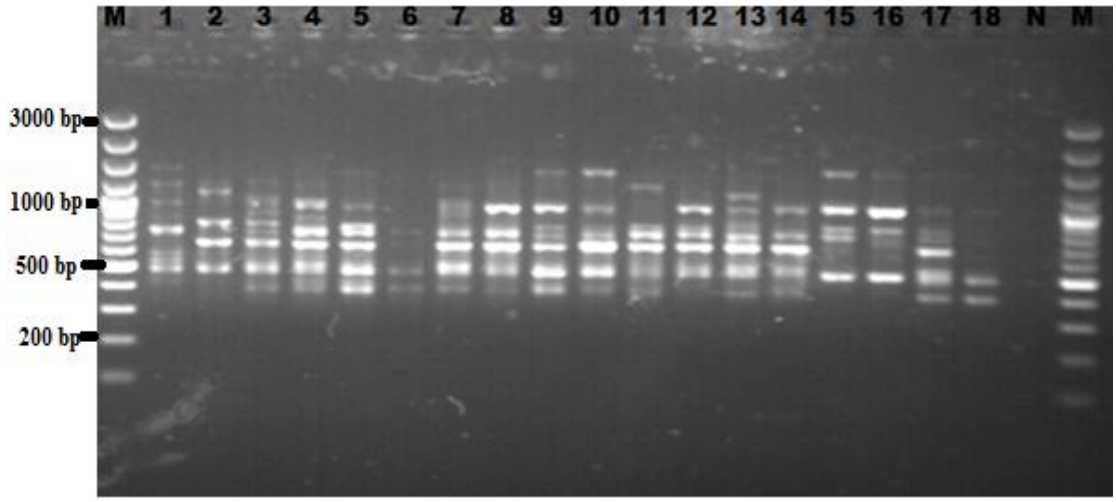
Tilletia sp.'yi teşhis amaçlı düşündüğümüz 847 numaralı primer ile yapılan üç ISSR-PCR sonucunun görüntüleri Şekil 3.22'de gösterilmiştir.



Şekil 3.22. ISSR 847 no'lu primer ile *Tilletia* sp.lerde yapılan tekrar ISSR-PCR sonuçları. 1, 3-14: *T. foetida*, 2: *T. caries*, M: 100 bp plus DNA markör, N: Negatif kontrol.

3.6. Konakçı Buğday DNA'sında Spesifik ISSR Markör'lerin PCR ile Test Edilmesi

Çizelge 2.5.'de verilen buğday çeşitlerinde 847 numaralı primer ile yapılan ISSR-PCR sonucundan Şekil 3.23'de gösterilen polimorfik bantlar elde edilirken, *Tilletia'*ya ait izolatlarda aynı primer ile yapılan PCR'lar sonucunda Şekil 3.22'de gösterilen monomorfik bant sonuçlarına ulaşılmıştır.

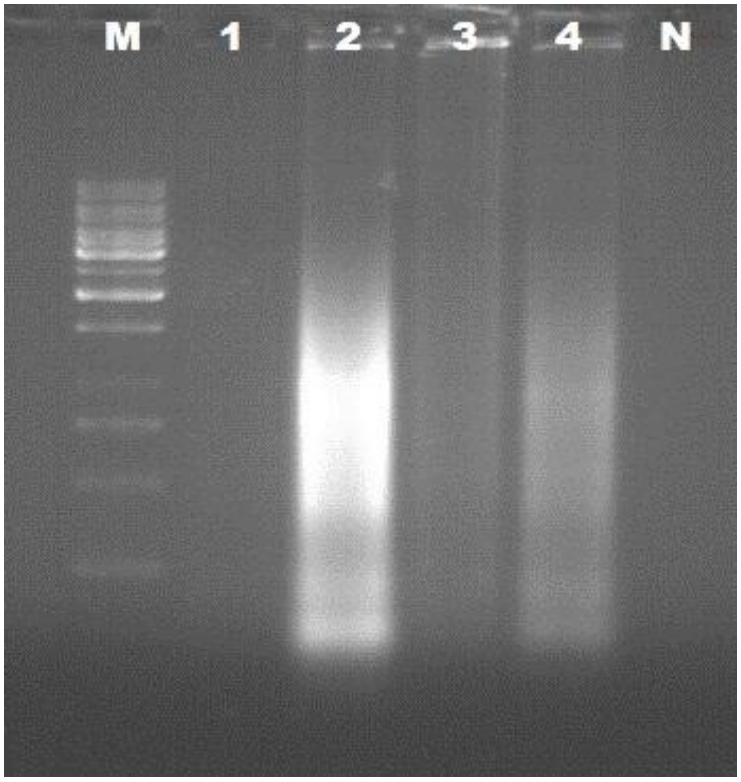


Şekil 3.23. ISSR-847 no.'lu primerin sağlıklı buğdaylardaki ISSR-PCR sonuçları.M: 100 bp plus DNA markör, 1-18: Buğday çeşitleri, N: Negatif kontrol.

3.7. *T. foetida* cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması

3.7.1. *T. foetida* total RNA'sının izolasyonu, spektrofotometrik ölçümü ve görüntülenmesi

Klasik yöntemle toplam RNA elde etmek için TRIzol ayracı kullanılmıştır. Çünkü TRIzol RNA'nın bütünlüğünü korur ve diğer hücresel yapıların parçalanmasını sağlar. Kloroform ile oluşan faz oluşumu sonrası TRIzol RNA'ya bağlanarak RNA'nın sulu fazda kalmasını sağlar (Chomczynski, 1987). Çalışmamızda 3, 7, 11 ve 12 numaralı izolatlar kullanılarak TRIzol ile izolasyon yapılmaya çalışılmıştır. İzolasyon sonunda Şekil 3.24.'de gösterilen 7 numaralı izolat'dan istenilen kalitede toplam RNA elde edilmiş olup, *T. foetida*'nın cDNA havuzu oluşturmak amacıyla yapılacak işlemlerde kullanılmıştır. 7 numaralı izolat'dan elde ettiğimiz total RNA'nın spektrofotometrik ölçüm sonuçları göre ise 260-280 nm dalga boyundaki saflık derecesi 1.97 nm olup miktarı 900 ng/µl dir.

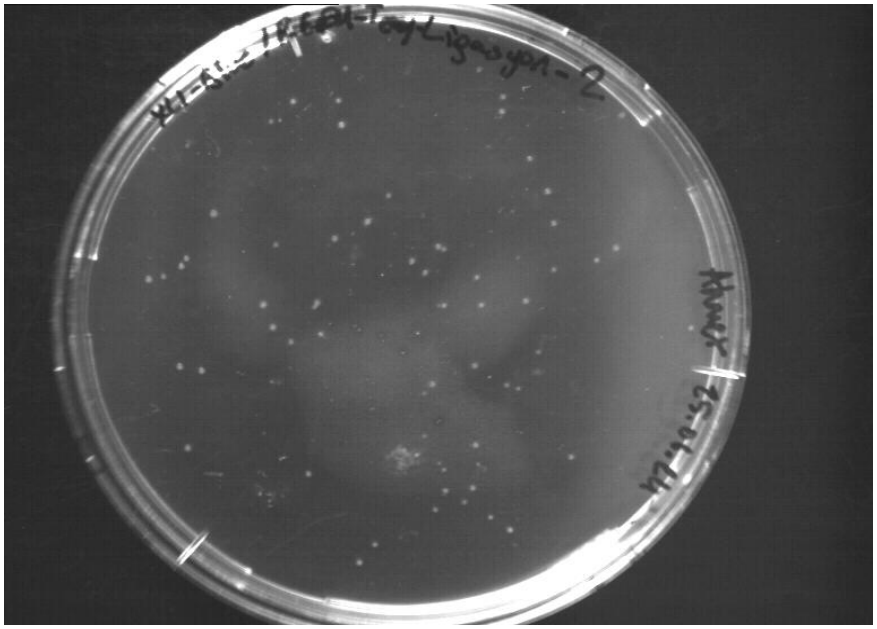


Şekil 3.24. *T. foetida* Total RNA'sının agaroz jel görüntüsü. M: Fermentas 1 kb DNA markör, 1: 3 numaralı izolat, 2: 7 numaralı izolat, 3: 11 numaralı izolat, 4: 12 numaralı izolat, N: negatif kontrol.

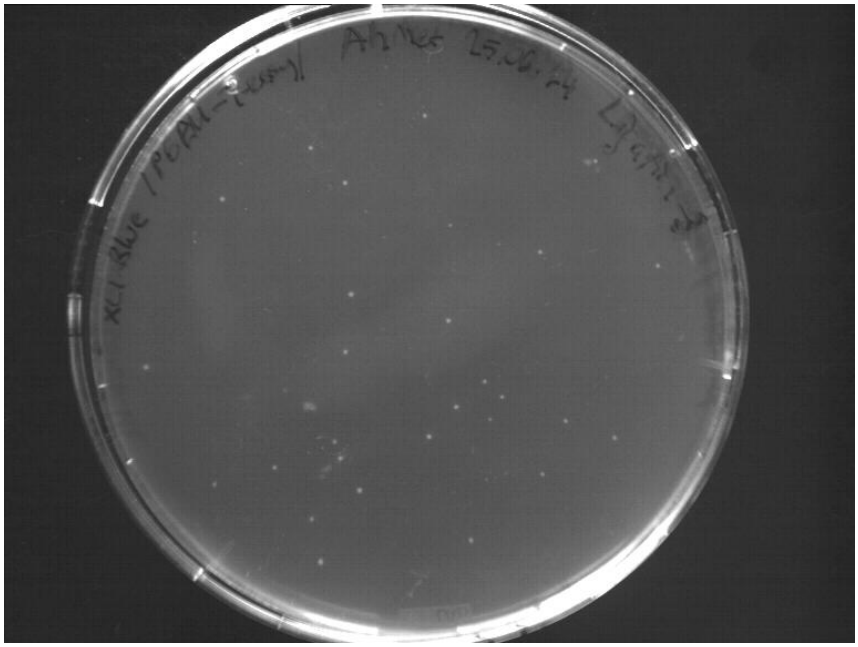
RNA izolasyonundan elde edilen toplam RNA'da (900 ng/µl, OD260/280= 1.97 saflıkta) bulunan mRNA'ların DNA kopyaları (cDNA), RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Fermentas) kitiyle yaptığımız RT reaksiyonu ile elde edilmiştir. RT reaksiyonu ile tek iplikli cDNA havuzu elde edilmiştir.

3.7.2. PCR ürününün plazmit vektöre eklenmesi (Ligasyon) ve rekombinant vektörün konakçı bakteri içine taşınması (Transformasyon)

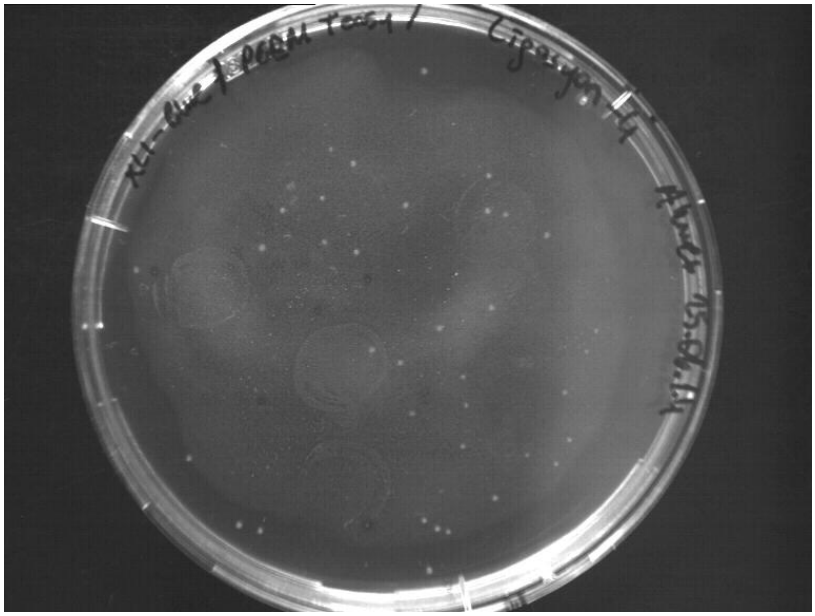
T. foetida'nın 7. İzolatına ait cDNA'ları içeren rekombinant plazmitleri taşıyan konukçu bakteri kolonileri; ligasyon-2 için Şekil 3.25, ligasyon-3 için Şekil 3.26. ve ligasyon-4 için Şekil 3.27'de petri üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 3.25. Lig-2'nin transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin görüntüsü.



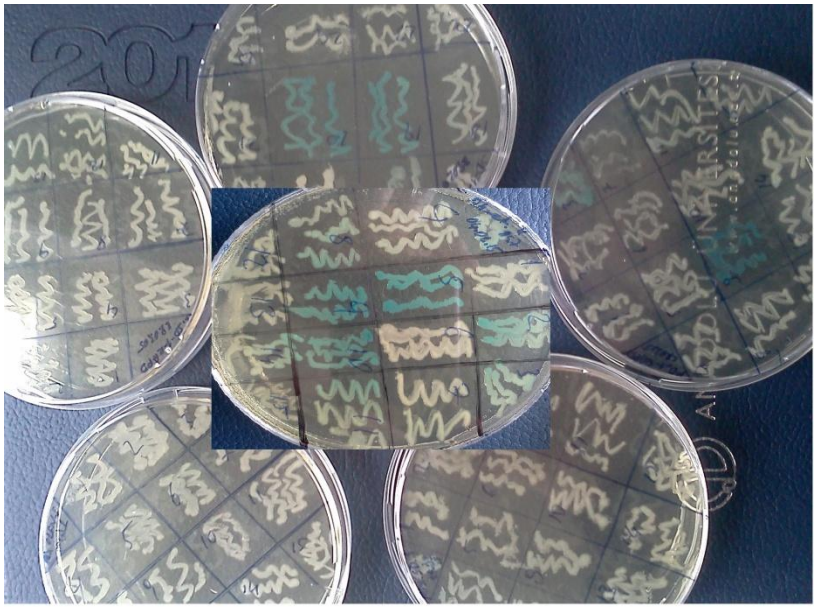
Şekil 3.26. Lig-3'ün transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin görüntüsü.



Şekil 3.27. Lig-4'ün transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin görüntüsü.

3.7.3. Pozitif kolonilerin şeçimi ve master plate hazırlığı

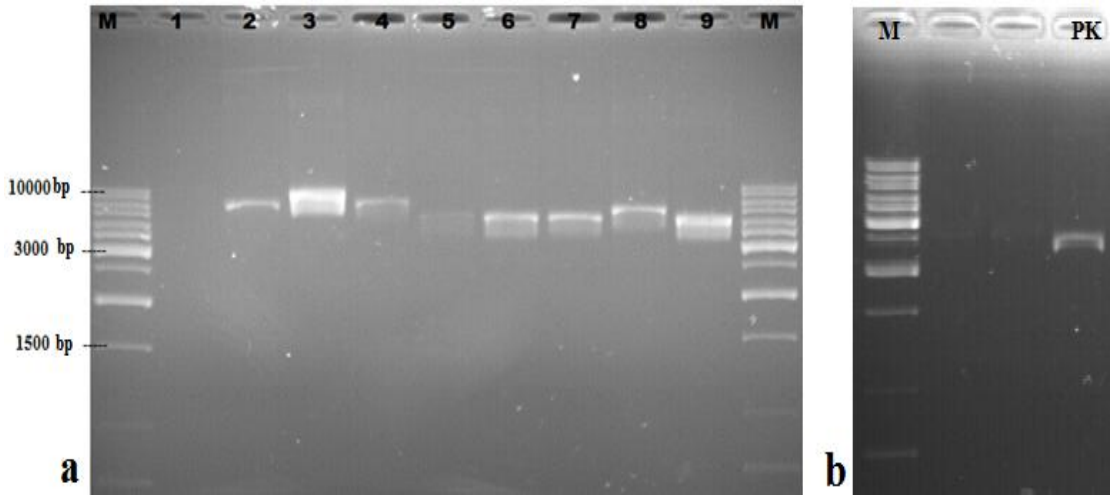
Toplam üç transformasyon petrisinde gözlenen tüm beyaz kolonilerin master plate görüntülerinin bir kısmı Şekil 3.28'de verilmiştir. Master plate'lerden çekilen kolonilerin 15 ml'lik falkon tüplerinde 10 ml LB Broth ve Amfisilin (100 µg/µl)içeren besiyerinde, çalkalamalı etüvde 120 rpm'de 37 ^{o}C'de 1 gece inkübe edildikten sonra promega kit protokolüne göre plazmit izolasyonları yapılmıştır.



Şekil 3.28 Transformasyon kolonilerinin master plate görüntüleri.

3.7.4. Pozitif kolonilerden plazmit izolasyonu ve plazmitlerde insert varlığının doğrulanması

Pozitif kolonilerden izole edilen rekombinant plazmitlerin % 1.2' lik agaroz jel görüntüsü Şekil 3.29' da gösterimiştir.



Şekil 3.29. a-Plazmit izolasyonu sonrası insert taşıyan vektörler, M (1kb DNA leader). Lig-2 (1, 2, 3, 4), Lig-3 (5, 6, 7, 8), Lig-4 (9), b- İnsert içermeyen boş plazmit, M (1kb DNA leader), PK: Boş plazmit kontrolü.

3.7.5. Plazmitlerin DNA dizilerinin belirlenmesi ve biyoinformatik analiz

Plazmit miktar ölçümleri ve Şekil 3.29'daki jel görüntüleri dikkate alınarak lig-3'e ait 6 (E-M13), 7 (F-M13), 8 (G-M13) ve lig-4'e ait 9 (H-M13) no.lu klonların dizi bilgileri aşağıdadır

>E-M13F

ACTWRAAATRGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCG
GGAATTCGATTATCACTAKTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCT
CCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTA
ATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACAT
ACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATT
AATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTA
ATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTC
GCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAA
GGCKGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACKCAGGAAGAACATGTGAKCAAAA
GGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGYCKCGTTGCTGGGCGTTTTTCCATAGGCT
CCGCCCCCCTGACGAGCATCACARAWATCGACKCTCAGTCAGAAGTGGYGAAACCCCRAC
ARGAC

>E-M13R

GKKTYCCMWKGWWWWMMGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAAATAACTCAAGCTATG
CATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACTA
GTGATAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAAT
TCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGG
GAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGG
CGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGC
GAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCG
TGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTC
TCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCC
GATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTA
GTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTA
ATAGTGGACTCKTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTG
ATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTAKTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAA

ATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTYCSTGGATGCGGTATTTTT
CTCCTTACGCCATCTGTGCGRTAATTCACACCGGCATCAGGTGGCAYCTTTTCGGGCAAA
TGTGCGCSGAACCCYCTATTTTTGTWTATTTTTCCTAAATMM

>F-M13F

AMTMYKKWTAGGGGCGAWTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGC
GGGAATTCGATAATCACTAKTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGC
TCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGT
AATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACA
TACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACAT
TAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATT
AATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCT
CGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAA
AGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAA
AAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGC
TCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCCG
ACAGGACTAWAAAGATACCAGGCGTTTYCCCCCTGGAAAGCTCCCCTCGTGCGCTCTCCT
GTTCCGACCCTGCCCGCTTTACCGRGATACCTGTCCGCCTTTTCTCCCCTTCGGGGAAGC
CGTGGCGCCTTTCTCATASCTCACGCCTGTAAGGTATCTCAAAGGGASAGACAGMGCRMR
CGSTTCCGCTCCAARCTKGGGGCCTGGTGGKGCCACSAAACTCCCCCCKGTTCAGCCCCS
GACCSGCTTGCGCCCCTTTATMCCGGGWTAACTATTCGGTCTTTGRASTTCCAACCCCGG
GTAARAACAACRGACCTTTATWYCGCCCACYTKGGCCAGCACAGCCCACMTGGGGTAAMA
CARGGRGAATTCATCASAASAACCGRTGRGKTMATRKSWTARGSCTCGGGGTGTRCYTAY
TMGARAAAGATTTTCTTCWTATGGRTA

>F-M13R

AKGKACCCTKTWWTAMKCCMAGCTWWTTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGCA
TCCAAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGSGAATTCACTAG
TGATTATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATT
CGSCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGG
AAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGC
GTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCG
AATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGT
GACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCT

CGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCC
GATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTA
GTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCSCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTT
AATARGTGGRAACTTTCTYTTTTTGKKTTTTTTCCCCCCMCMCAMAAARASCCGTTGGGG
GGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAYCCACCTA

>G-M13F
ACMYWRKKGGGGCCGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGG
GAATTCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGACGGATGAAAGGACGGAGAAGGAAAGAAGG
AAAGAGAGGAACCCAACCSCGGATGAACGAGGCCATCCMCTCGGGATTCTCTATCGCCGC
TTCRRAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCACTAGTGAATTCSCGGCCGCCTGCAGGTCSACCAT
ATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAAT
AGCTTGGCGTAATCRTGGTCATAGCTGTTTCCTGKGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATT
CCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGC
TAACTCACATTAATTGCRTTGCGCTCACTGCCCCGSTTTCCAGTGGGGGAYAACCCAGGG
CCCGGGCCCGCCTGCCTTTAAGGAACCCGGCCCAWCGCGCGAGG

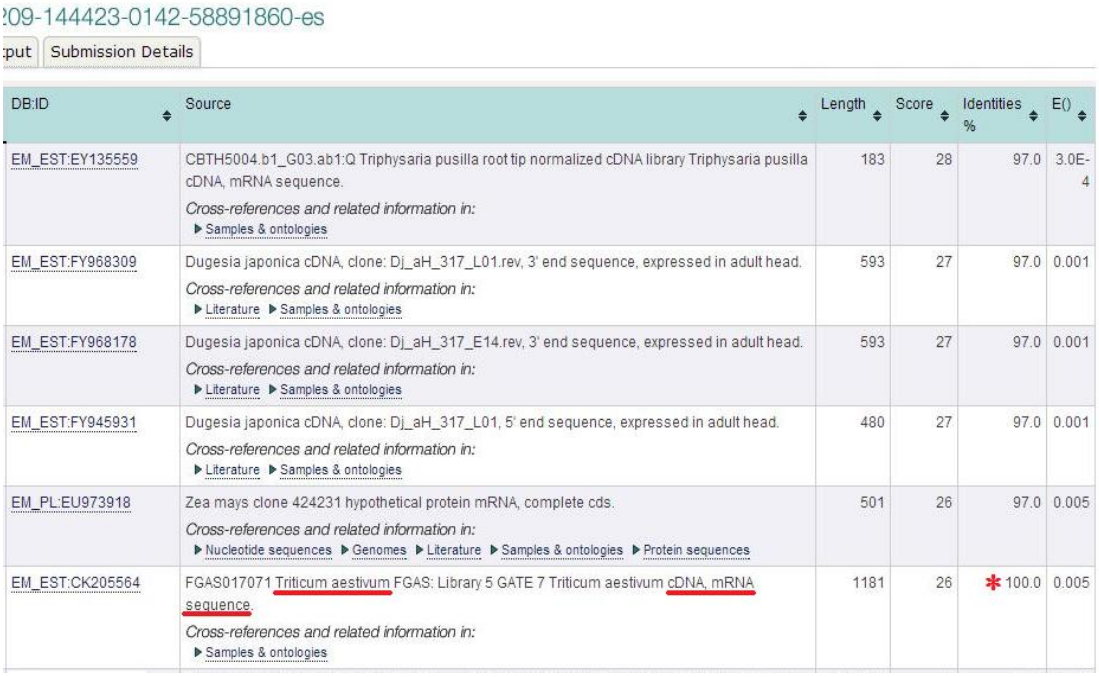
>G-M13R
CKKTWMMSAKKAWWTMMGCMAAGYTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGCA
TCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACTAGT
GATTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAGCGGCGATARARAATCCCGAGTGGATGGCCYCSTT
CATCCGCGGKTGGGTTCCTCTCTTTCCTTCTTTCCTTCTCCGTCCTTTCATCCGTCMAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAWCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGSGGCCGGGARCATGCGACGT
CGGGCCCAATTCSCCCTATARKGRGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACG
KCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCSCCTTGCARCACATCCCCCTTT
CGCCAGCTGGSGTAATARCRAAAARGCCCGCACCGATCSCCCTTCCCAACAGTTGCGCAS
CCTGAATGGCRAATGGACSCSCCCTGKAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGKGGKGGTT
ACSCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTC
CCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCCGTCAAGCTCWAAATCGGGGGCTCCC
TTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCSACCCCAAAAAAACTTGATTAGGGTG
ATGGTTCACGTAGKGGGCCATCSCCCTGATAGAACGGTTTTTYCGCCCTTTGACGTTRGA
GTCCMCGTTYYTWTAATAGKGGGACWTCTTTGTTCCAAAMCTGGAACCAACACTCMACCC
TATCTCGGTCTATTCTTTTGSATTTAWAAGGGGATTTTKGCCGAATTTCGGCCTWATGKG
TTAAAAAATKGAGCTGAWTTTAACMAAAACATTWTRAMCGSSSAAATYTTTWA

>H-M13F

AMWWWWWWRGGCGAWTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGA
ATTCGATATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCA
ACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCA
TGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGA
GCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATT
GCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGA
ATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTTCCGCTTCCTCGCT
CACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAGGCG
GTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAKGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGY
CARCAAAAGGCCARGAACCGTAAAAAAGGCCGCGTTTGCTGGCGTTTTTYCATAGGGCTC
CGCCCCCCCTGACGAKCATCACAAAAA

>H-M13R

CKKTMCCRWTAWTWYMGCCMAGCCTATTTAGGTGACACTATAGAAATACTCAAGCTATGC
ATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCYYATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACTAG
TGATATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTC
GSCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCRCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGA
AAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCG
TAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGA
ATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTG
ACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTC
GCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGA
TTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAG
TGGGCCATCSCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCMCGTTCTTTT
AATAGTGGACTCKTGTTCCAAACTGGAAACAACACTCAMCCCCTATCTCGGTCTATYTCT
TTTGATTTAAAAAGGGAWTTTTGCCGATTTCSGCCTATTGGTTAAAAAAYGATCTGRAWT
TTAAMCAAAAWTTTTAAMGCGAAATTTTTAACMAAATWATAAACSSCYTTACCAWTTTCC
ATGGAATGCCGGGAATWTTTTCTCCCTTACGRMCWTCTGTGACGGATAWWTTKCMACWAY
CMGWCAATTCAAGGGTGGMCACTTT



209-144423-0142-58891860-es

put | Submission Details

DB:ID	Source	Length	Score	Identities %	E()
EM_EST:EY135559	CBTH5004.b1_G03.ab1:Q Triphysaria pusilla root tip normalized cDNA library Triphysaria pusilla cDNA, mRNA sequence. *Cross-references and related information in:* ▶ Samples & ontologies	183	28	97.0	3.0E-4
EM_EST:FY968309	Dugesia japonica cDNA, clone: Dj_aH_317_L01.rev, 3' end sequence, expressed in adult head. *Cross-references and related information in:* ▶ Literature ▶ Samples & ontologies	593	27	97.0	0.001
EM_EST:FY968178	Dugesia japonica cDNA, clone: Dj_aH_317_E14.rev, 3' end sequence, expressed in adult head. *Cross-references and related information in:* ▶ Literature ▶ Samples & ontologies	593	27	97.0	0.001
EM_EST:FY945931	Dugesia japonica cDNA, clone: Dj_aH_317_L01, 5' end sequence, expressed in adult head. *Cross-references and related information in:* ▶ Literature ▶ Samples & ontologies	480	27	97.0	0.001
EM_PL:EU973918	Zea mays clone 424231 hypothetical protein mRNA, complete cds. *Cross-references and related information in:* ▶ Nucleotide sequences ▶ Genomes ▶ Literature ▶ Samples & ontologies ▶ Protein sequences	501	26	97.0	0.005
EM_EST:CK205564	FGAS017071 Triticum aestivum FGAS: Library 5 GATE 7 Triticum aestivum cDNA, mRNA sequence. *Cross-references and related information in:* ▶ Samples & ontologies	1181	26	* 100.0	0.005

Şekil 3.30. G-M13 örneğinin NCBI veri tabanında BLAST analizi sonucu.

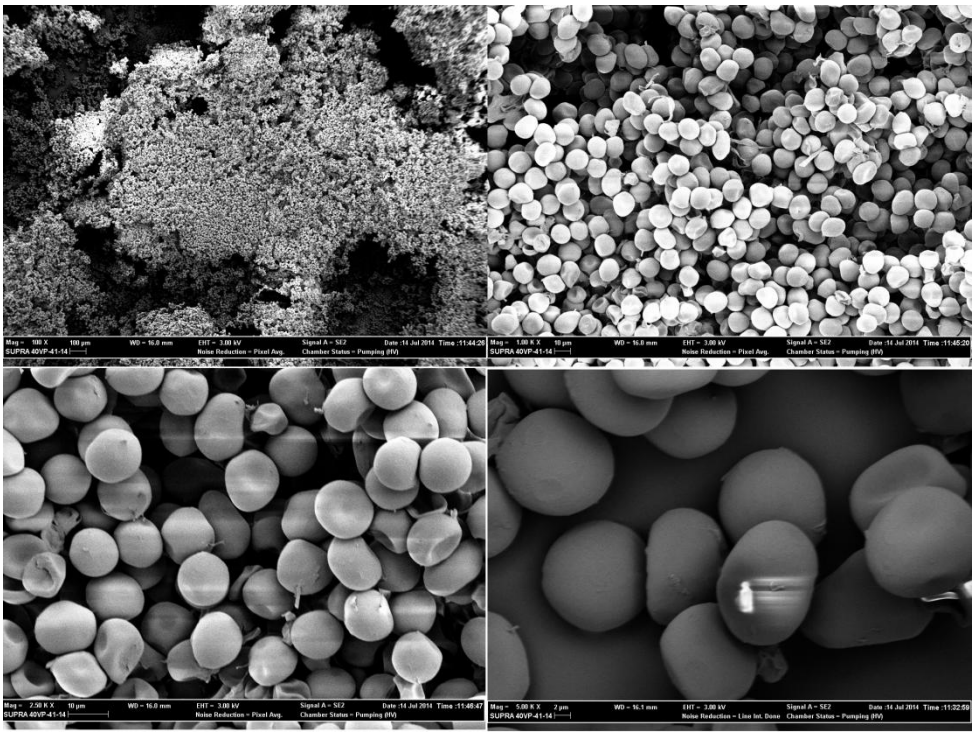
3.8. *T. foetida*'nın Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

A. SEM Analizi

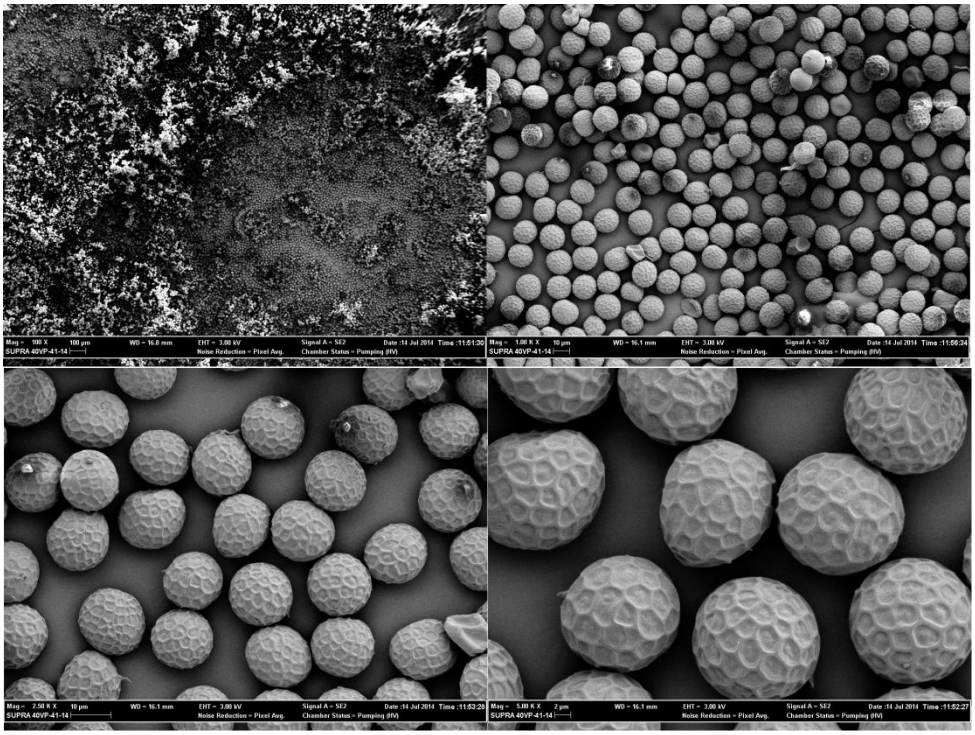
Bu çalışmada, *T. foetida*'ya ait farklı lokalitelerden elde edilmiş 13 izolatın taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri gerçekleştirilmiştir. *T. foetida* numunelerinin her birinden 100X, 1000X, 2500X, 5000X ve 10.000X büyütmede görüntüler alınmıştır (Şekil 3.31-3.44). Her izolata ait SEM görüntüleri ayrı ayrı incelenerek, *T. foetida*'ya ait ortalama hücre boyutları ve fiziksel karakteristik özellikleri kaydedilmiştir (Çizelge 3.3). Aynı zamanda karşılaştırma amacıyla bir *T. caries* örneği de çalışmaya dahil edilmiş ve SEM analizi yapılmıştır. Ölçüm analizleri sonucu, farklı lokalitelere ait izolat örneklerinin hücresel boyutları arasında da farklılıklar gözlenmiştir, *T. foetida* izolatlarının tamamının düz hücre duvarına sahip oldukları, küre ve oval şeklinde olmasına karşın *T. caries*'e ait örneğin daha çok küremsi ve golf topu şeklinde karakteristik ağsı bir görünüme sahip olduğu görülmüştür.

T. foetida izolatlarının 100X'lik büyütmede ayrımın mümkün olmadığı, ancak 10000X'lik büyütmede belirgin olarak farklılığın gözlemlenebildiği tespit edilmiştir 10000X büyütmede Her bir izolattan 50 spor hücresinin ölçümü yapılmıştır. Hücre ebatlarına ait ölçüm değerlerinin aritmetik ortalamaları alınmıştır. Elde edilen verilerin

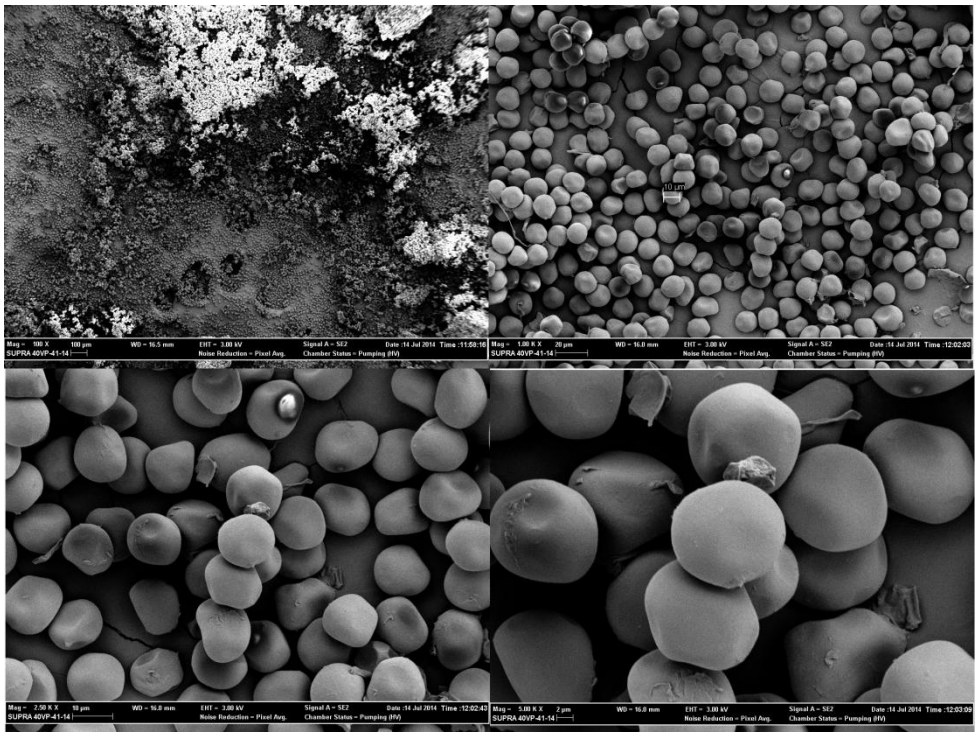
izolatlara ait patojenite oranları ile karşılaştırmalı analizi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.3).



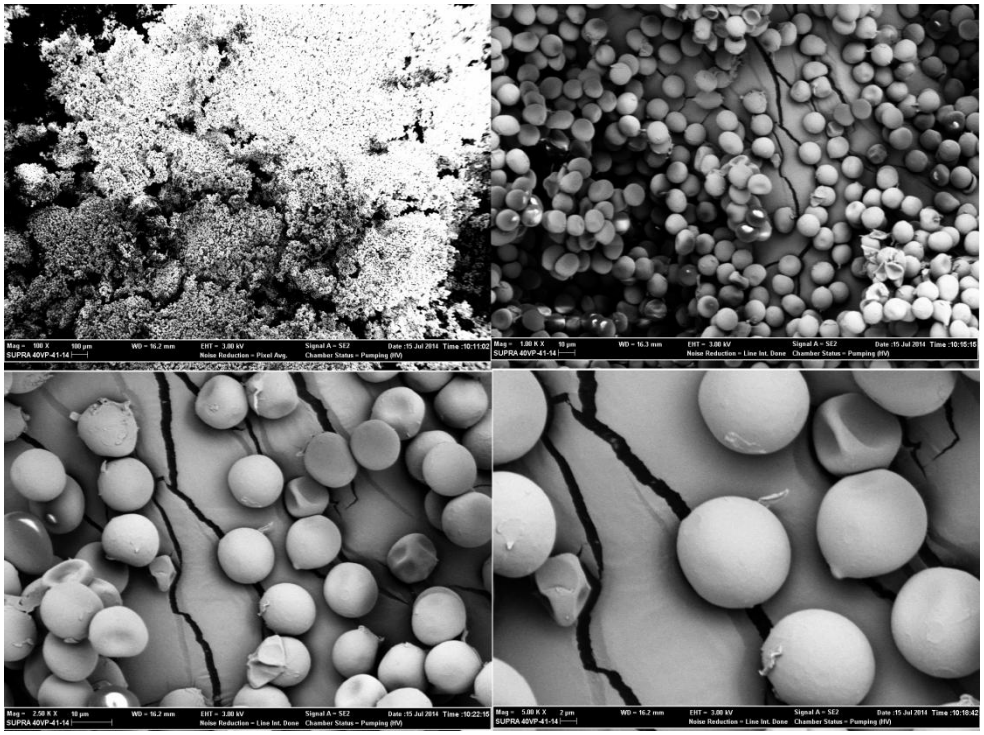
Şekil 3.31. İzolat-1'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.



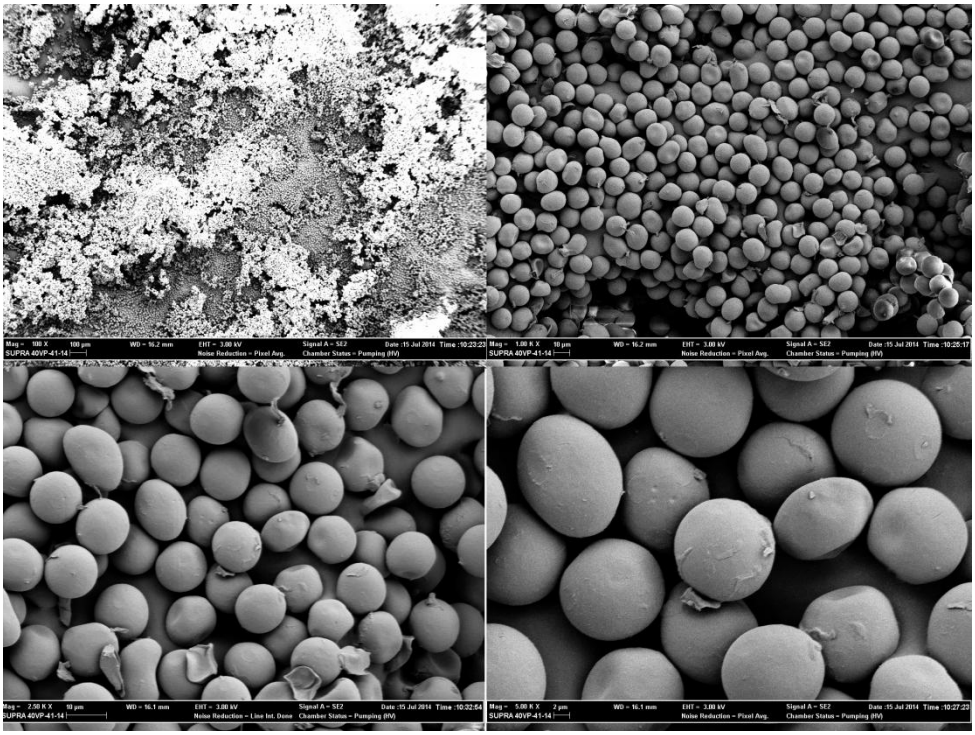
Şekil 3.32. İzolat-2'ye ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.



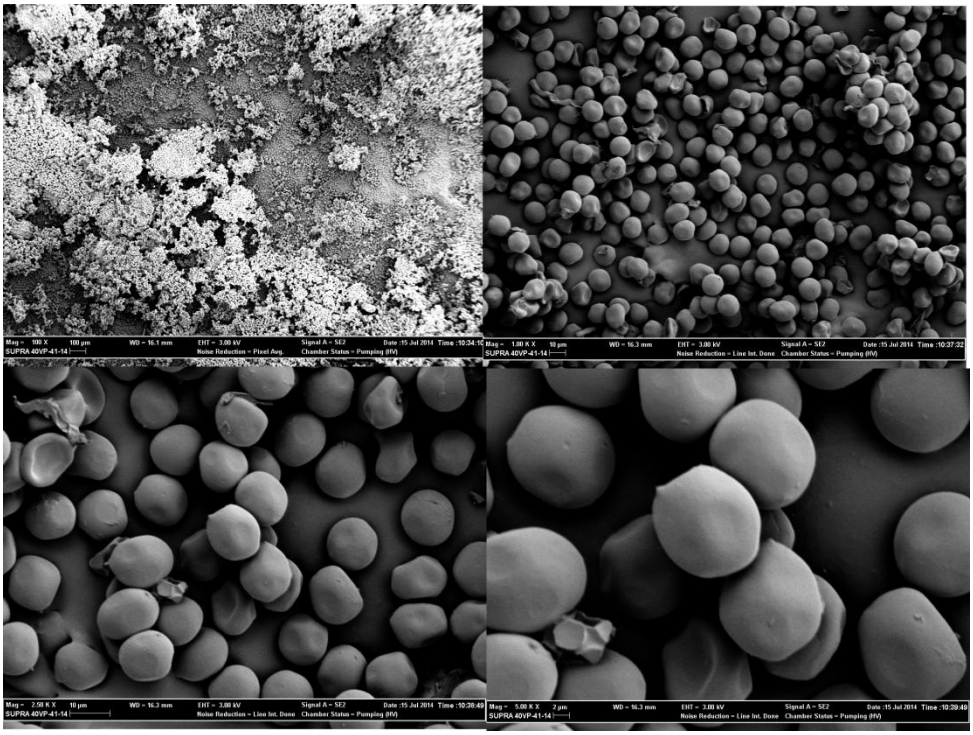
Şekil 3.33. İzolat-3'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.



Şekil 3.34. İzolat-4'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.

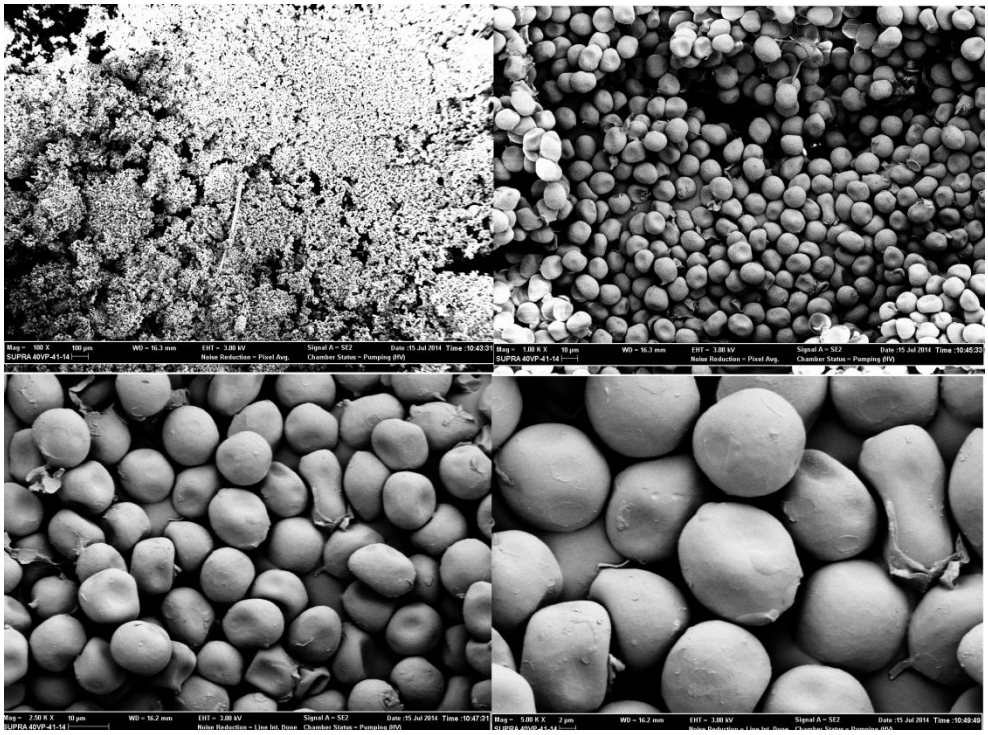


Şekil 3.35. İzolat-5'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.

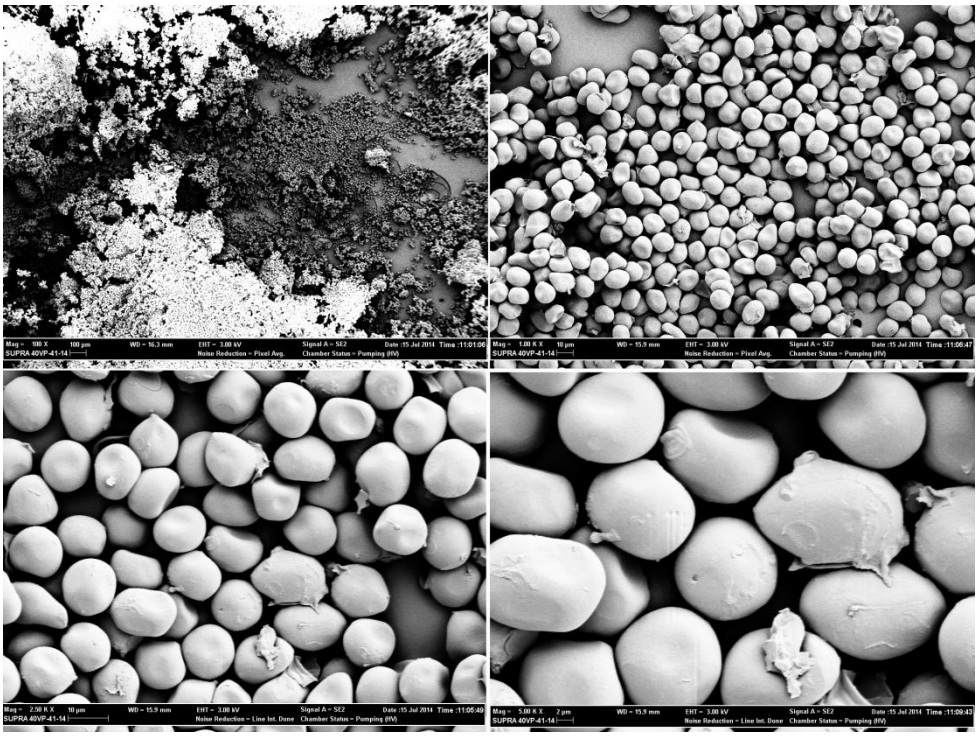


Şekil 3.36. İzolat-6'a ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri

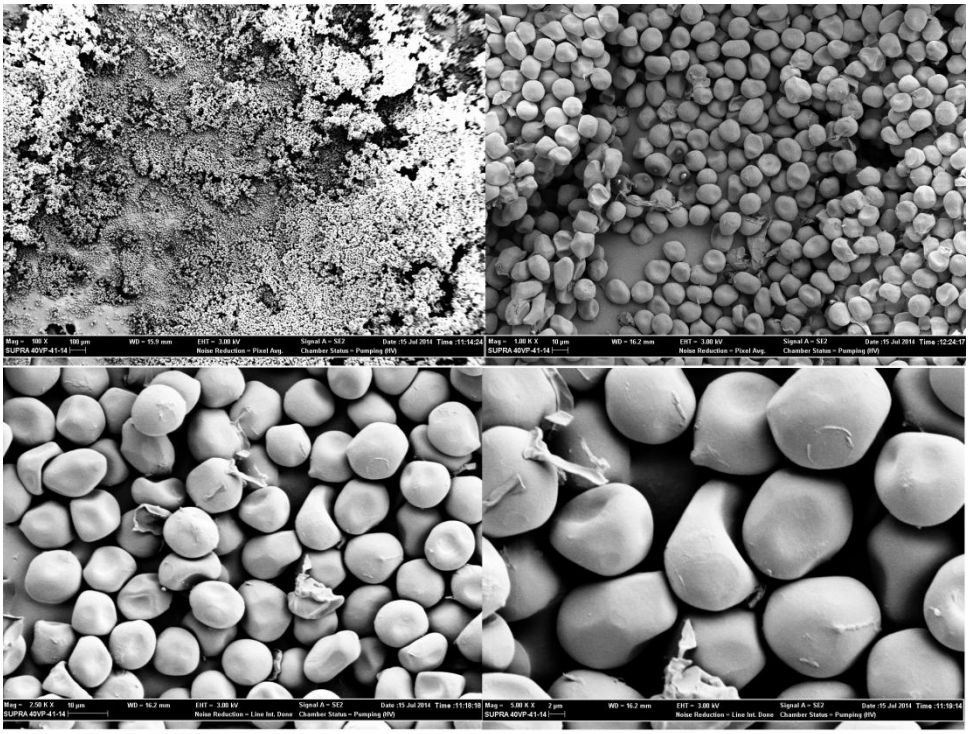
.



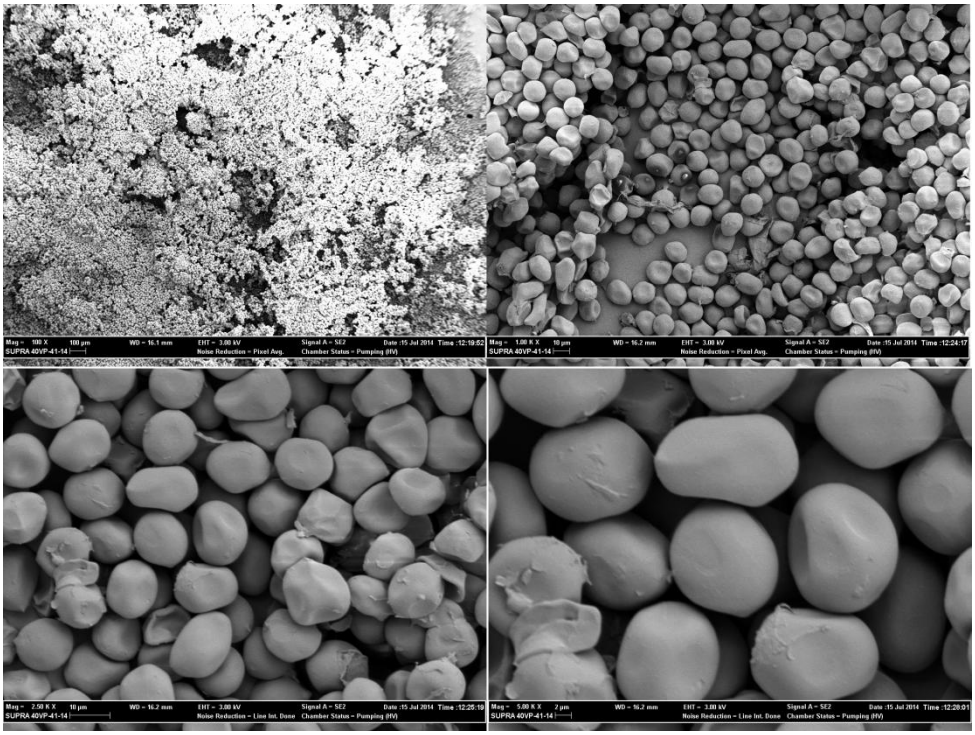
Şekil 3.37. İzolat-7'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.



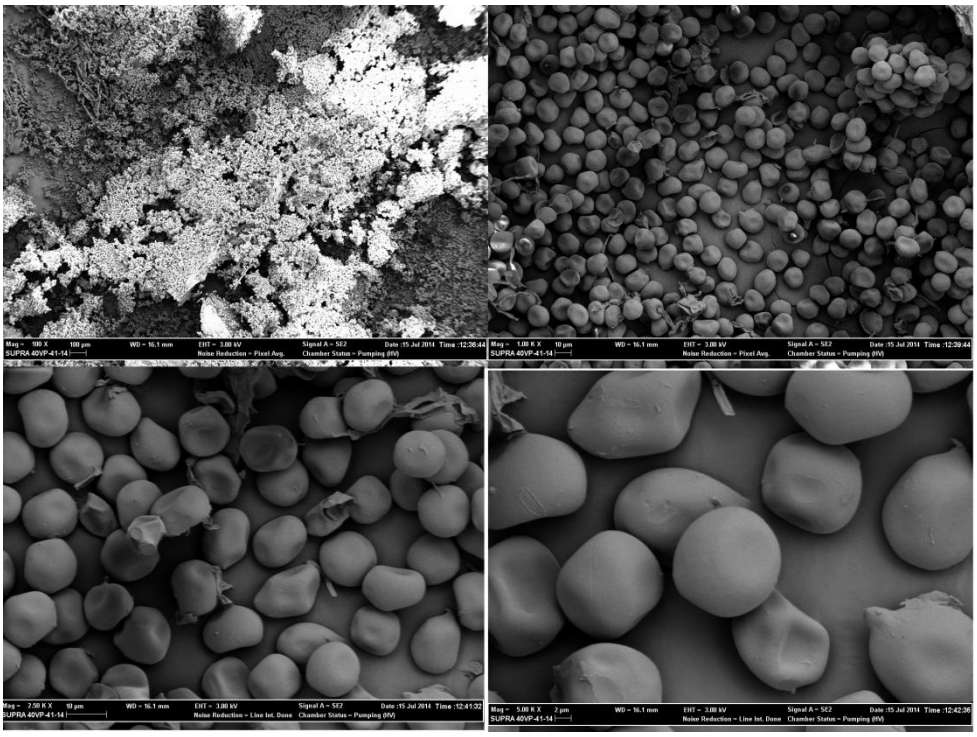
Şekil 3.38. İzolat-8'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.



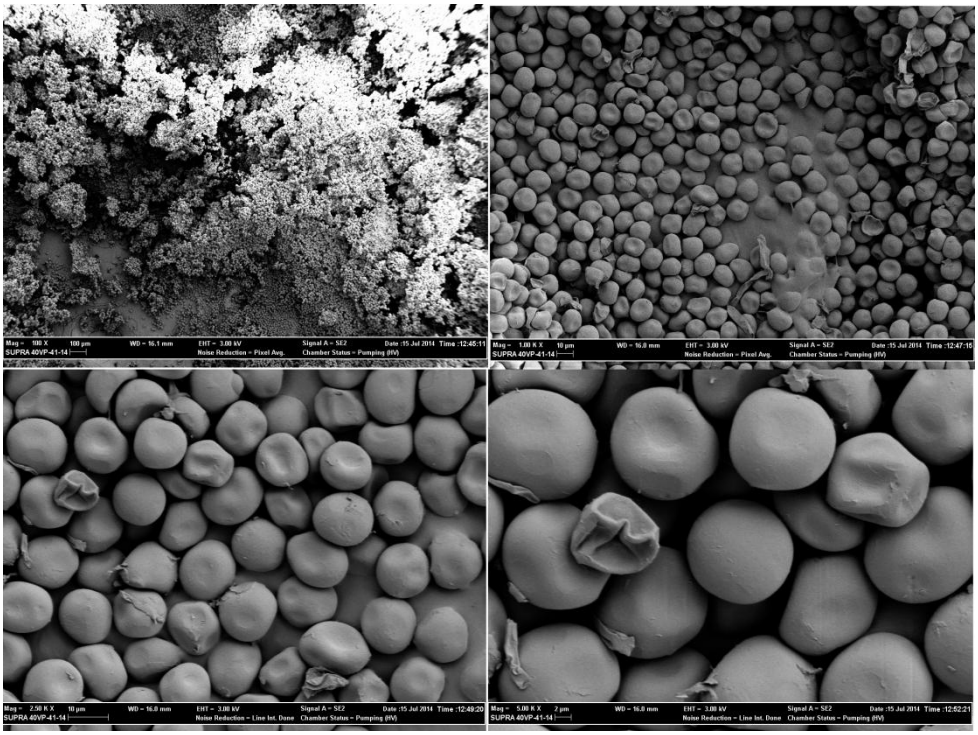
Şekil 3.39. İzolat-9'a ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.



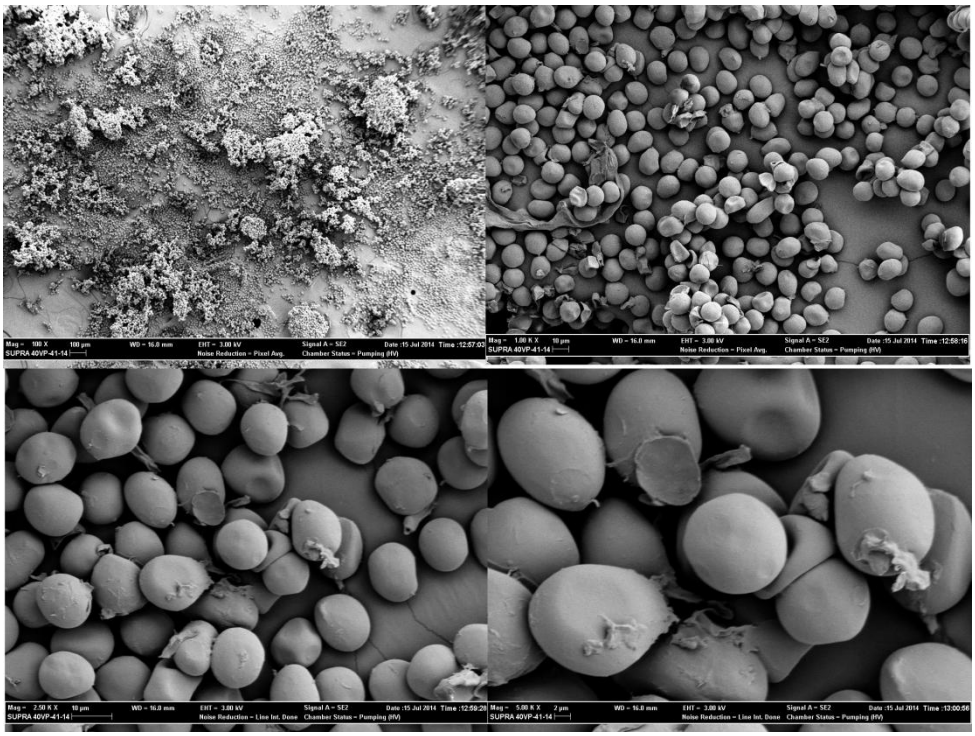
Şekil 3.40. İzolat-10'a ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.



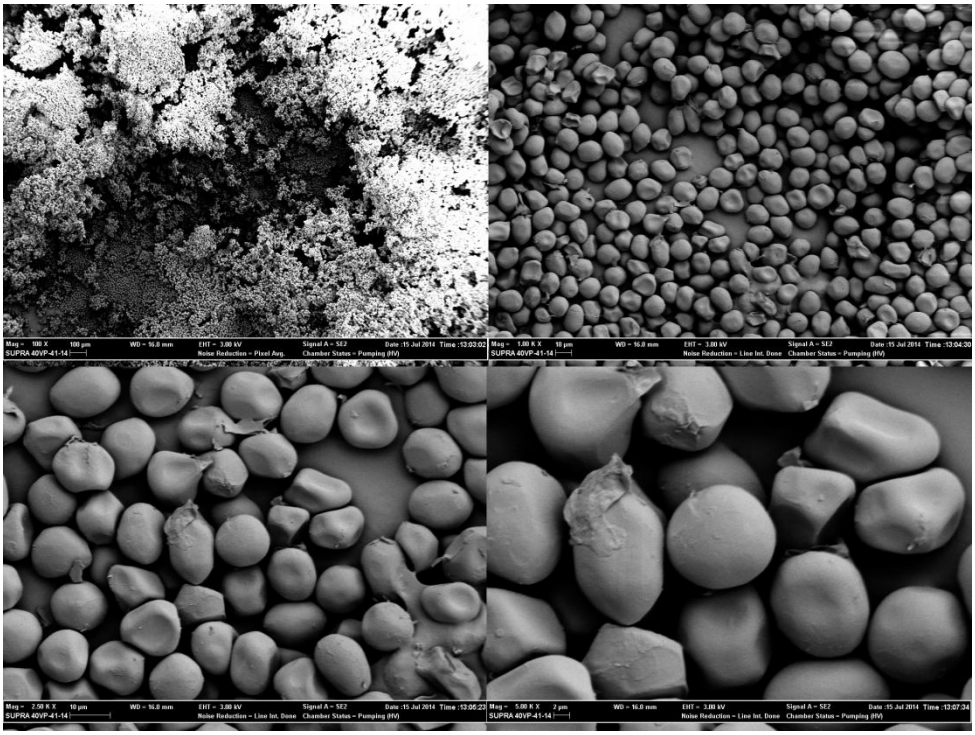
Şekil 3.41. İzolat-11'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.



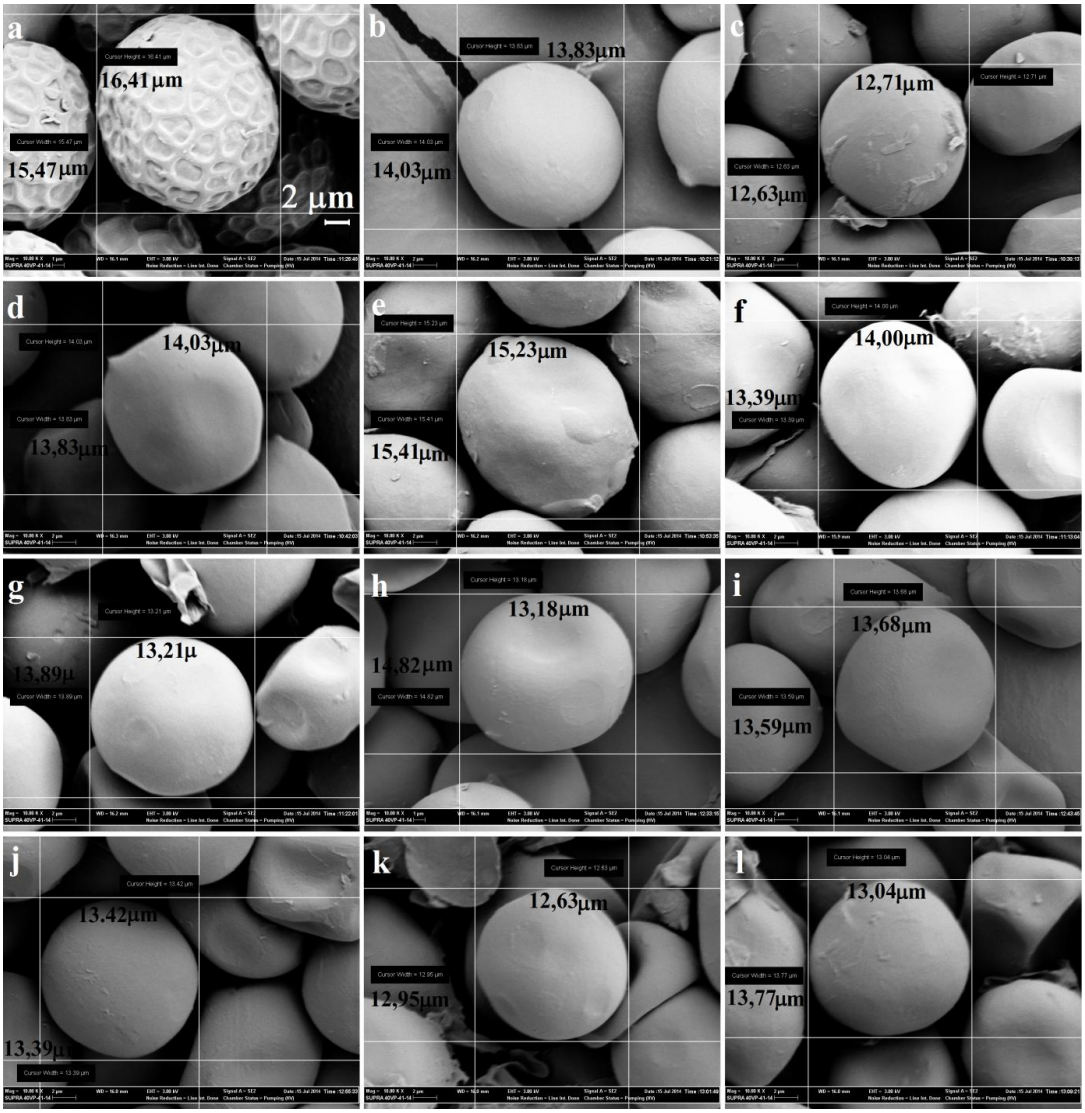
Şekil 3.42. İzolat-12'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.



Şekil 3.43. İzolat-13'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.



Şekil 3.44. İzolat-14'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X ve 5000X büyütmede SEM görüntüleri.



Şekil 3.45. *T. foetida* ve *T. caries'*e ait sporların 10.000X büyütmede tek bireye ait görüntü ve ölçüleri. a: *T. caries* izolat-2, b-i*: T. foetida* izolat 3-14. izolatlar.

Şekil 3.45'de gösterildiği gibi *T. foetida* ve *T. caries'*e ait sporların 10.000X büyütmede herbir izolattandan 50 örnegin ortalama hücre boyutları hesaplanmış ve Çizelge 3.3'deki sonuçlar elde edilmiştir.

Bu sonuçlar göz önüne alınarak yapılan pearson korelasyon analiz sonucunda, Ortalama Hücre Boyutları (µm) değişkeni ile Hastalık Yapma Oranı (%) değişkeni arasında pozitif doğrusal bir ilişki söz konusudur ($P<0.05$). Yani yukarda sözü geçen iki değişken arasındaki P değeri 0.0114 olarak bulunmuştur. Iki değişken arasındaki korelasyon katsayısı (r) ise 0.67452 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 3.3. *T. foetida* ve *T. caries*'e ait izolatlarına ait 10000X büyütmede hücre boyutları ve hastalık yapma oranları.

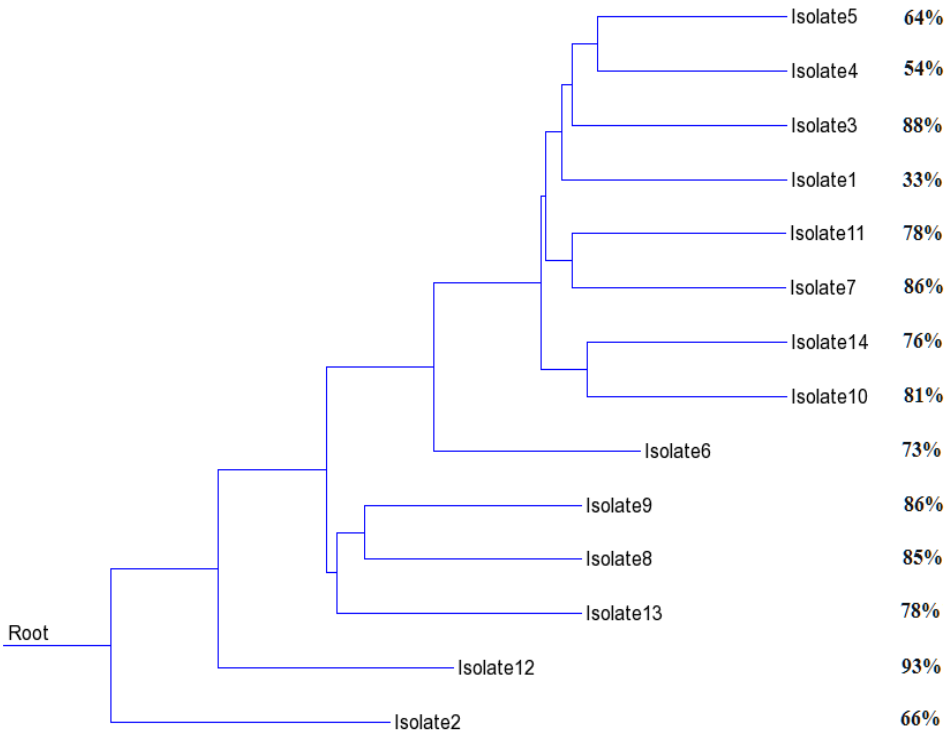
İzolat No	Tür	Ortalama Hücre Boyutları (µm)	Hastalık Yapma Oranı (%)
İzolat 1	*T. foetida*	13,470	33
İzolat 2	*T. caries*	15,955	66
İzolat 3	*T. foetida*	14,205	88
İzolat 4	*T. foetida*	13,514	54
İzolat 5	*T. foetida*	13,235	64
İzolat 6	*T. foetida*	14,411	73
İzolat 7	*T. foetida*	14,882	86
İzolat 8	*T. foetida*	14,514	85
İzolat 9	*T. foetida*	14,088	86
İzolat 10	*T. foetida*	14,338	81
İzolat 11	*T. foetida*	13,264	78
İzolat 12	*T. foetida*	14,764	93
İzolat 13	*T. foetida*	14,441	78
İzolat 14	*T. foetida*	14,117	76

4. TARTIŞMA SONUÇ

Buğday tohumlarının ekim öncesi ilaçlanması sürmeye karşı mücadelede etkili bir yöntem olmasına rağmen, kullanılan bu ilaçların çevreye zarar vermesi ve maliyetinin yüksek olması ciddi bir dezavantajdır. Bu nedenle hastalığa karşı dirençli buğday çeşitlerinin geliştirilmesi dünya genelinde tercih edilen bir durumdur (El-Naimi vd., 2000; Goates, 2012). Buğdaylarda sürme hastalığına karşı dayanıklılık *bt* (*bt1, bt2, bt3, bt4, bt5, bt6, bt7, bt8, bt9, bt10, bt11, bt12, bt13, bt14, bt15*) genleriyle kontrol edilmektedir (Matanguihan ve Murphy, 2011). Buğday ile patojen arasındaki etkileşim oldukça önemlidir ve aralarında gen için gen etkileşimi görülmektedir (Datta ve ark, 1999). *Tilletia* spp.'nin patojenik ırkları aynı türün genetik varyantlarıdır (Albughobeish ve Jorf, 2015) ve bu genetik varyantlar, farklı direnç genlerine sahip olan konakçı buğdaylarda hastalık yapma yeteneklerine göre birbirinden ayrılabilir (Matanguihan ve Jones 2011). Bir buğday çeşidinin *Tilletia* sp.'ye dayanıklılığı veya hassasiyeti, patojen ırklarının genetik çeşitliliğine doğrudan bağlıdır (Albughobeish ve Jorf, 2015). Bu çalışmada, 18 ISSR primerleri kullanarak 13 farklı *T. foetida* izolatı ile 1 adet *T. caries* izolatının genomik karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın verileri, *T. foetida*'ya ait farklı izolatların genetik çeşitliliklerinin belirlenmesi ve buna bağlı olarak bu izolatların hastalık yapma yetenekleri kullanılarak, gelecekte sürmeye dayanıklı buğday çeşitlerinin ıslah çalışmalarında kullanılabilecektir. PCR yöntemiyle elde edilen verilerden biyoinformatik analizler ile filogenetik ağaç oluşturulmuş ve sonuç olarak izolatların arasında hastalık sporlarının toplandığı bölgelere bağlı olarak belirgin gruplanmaların oluştuğu görülmüştür. Genetik yakınlık ve uzaklığı gösteren bu filogenetik ağaç analiz edildiğinde; 1, 3, 4, 5. izolatlar ile 7, 11 ve 10, 14. izolatlarının oluşturduğu alt gurupların bir arada ana grup olarak ayrıldıkları gözlenmiştir. Bu ana gruptan ayrı olarak 8, 9 ve 10. izolatların ayrı bir grupta toplandıkları görülmüştür. Bu grupların yakın lokaliteler halinde oluştuğu görülmüştür. Dayanıklı buğday çeşitlerinin ıslah çalışmaları için, genetik olarak benzer ve aynı patojeniteye sahip izolatların şekil üzerinde gösterimi yapılmıştır (Şekil 4.1).

İzolatların genetik çeşitliliği ile bt geni içermediği ve hassas olduğu bilinen Heines VII buğday çeşidi (Qing, vd., 2009) üzerindeki virulens oranları kullanılmıştır (Şekil 4.1). Şekil üzerinde yakın lokalitelerdeki (Çizelge 2.1.) benzer patojenite

oranlarına sahip izolatların (4, 5; 11, 7; 14, 10 ve 8, 9, 13) genetik çeşitliliği gösteren ağaçta kendi içlerinde bir grup oluşturduklarını görülmüştür. 4 ve 5. izolatlar ile aynı alt grupta yer almasına rağmen 1. izolatın düşük, 3. izolatın ise yüksek patojenite değerine sahip olduğu görülmüştür. İzolatlar arasında en yüksek patojeniteye sahip olan 12. izolatın her iki gruptan da ayrıldığı gözlenmektedir. Yarullina ve ark. (2014), patojenle mücadele için yüksek dozda kimyasal ilaç kullanılması ve çevresel koşullarında etkisiyle birlikte patojeninin de direncinin gelişebileceğini ve yeni formların oluşabileceğini öne sürmüştür (Yarullina vd., 2014).



Şekil 4.1. *Tilletia* izolatlarında ISSR primerleri kullanılarak oluşturulan dendrogram ve hastalık yapma oranları.

Benzer bir çalışma, Thirumalaisamy ve Singh (2012) tarafından rDNA-ITS ve RAPD moleküler yöntemlerini kullanarak yapılmış; Kuzey ve Kuzey Batı Hindistan'dan topladıkları buğdaylardan izole ettikleri 20 adet *T. indika* izolatı çalışılmıştır. Çalışma sonunda, *T. İndika* izolatları arasında rDNA-ITS yöntemine göre sonuç alınamazken, RAPD-PCR sonucu elde edilen filogenetik ağaçta kümelenmeler, hastalık oranları ile oluşturulan kümelenmelerle örtüşmediği görülmüştür. Gang ve Weber (1996) yaptıkları çalışmada, 13 RAPD primeri kullanarak *T. caries*, *T foetida* ve *T. controversa*'nın

genetik çeşitliliği üzerine yaptıkları çalışmada, yüksek oranda polimorfizm gözlemlemiş ve oluşturdukları filogenetik ağaçta birkaç birey dışında her türün kendi içinde gruplanma oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Bugüne kadar *Tilletia* sp. ile ilgili birçok genetik çeşitlilik çalışması gerçekleştirilmesine rağmen, yapılan literatür taramalarında, patojenin genetik çeşitliliği ile ilgili ISSR PCR yöntemi ile yapılan herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Yüksek oranda pestisit/fungisit kullanımı ve çevresel koşullar gibi etmenlerin, patojen organizmada genetik farklılaşma ve buna bağlı olarak farklı virulans oranlarına neden olduğu bilimsel çalışmalar ile rapor edilmektedir (Yarullina vd., 2014). Ayrıca, son zamanlarda dayanıklı buğday çeşitleri veya hekzaklorobenzen gibi fungusit ilaçlarının kullanımının, sürme hastalığının kontrol edilebilmesinde yeterli olmadığı bildirilmiştir (Yarullina vd., 2014).

Bu çalışmada, genetik çeşitlilik analizlerinde kullanılmak üzere toplam 25 ISSR primerleri test edilmiş ve 14 izolatın tamamında sonuç veren 18 primer kullanılmıştır. Sonuç veren primerlerden ISSR-847 ve ISSR-861'in tüm izolatlar için spesifik monomorfik bantlar verdiği, üç tekrar yapılan PCR ile teyit edilmiştir. Bu sonuç, hem *T. foetida* türünün izolatları hem de *T. caries* izolatı için aynı bant profilini işaret ettiğinden, bu iki primerin *Tilletia* sp. için bir moleküler markör olarak kullanılabileceği görülmüştür. Günümüze kadar morfoloji temelli yöntemler kullanılarak bitki patojenlerini tam anlamıyla teşhis ve tespit etmenin, yeterli olmadığı görülmüştür (Majumder, 2003). Sürme sporları ile bulaşık tohumların gözle ayırt edilmesi ya da tohumların tek tek mikroskopta incelenmesi mümkün olmayıp, etkin yöntemler olmadıkları görülmektedir. Hastalıkla mücadelede genişleyen çevre bilinci, hastalıklara karşı dayanıklı çeşit geliştirme ve organik tarıma karşı artan ilgi, kimyasal tarım ilaçlarının kullanımının azalmasına ve alternatif mücadele yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır (Josefsen ve Christiansen, 2002). Günümüzde patojenlerin teşhis edilmesinde ve tanımlanmasında RFLP, RAPD, ISSR, SCAR ve ITS gibi moleküler yöntemler başı çekmektedir (Cheng, J., 2015). Koprivica ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada, *Tilletia*'nın NCBI'da bilinen ITS 1 DNA bölgesine tasarladıkları TILf ve TILr primerleri ile, *T. caries* ve *T. controversa*'yı tanımlamaya yardımcı olacak 361 bp büyüklüğünde bant elde etmişlerdir. Gao ve ark. (2010) ise yaptıkları çalışmada,

ISSR-818 no.'lu primeri kullanarak elde ettikleri polimorfik bantlardan, *T. controversa'*yı teşhis edecek SCAR markör (TCKSF3 ve TCKSR3) geliştirmişlerdir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar tüm izolatlar için spesifik bant ürünü veren ISSR-847 ve ISSR-861 numaralı iki primerin, sürmeyle enfekte buğdayların ekimden önce tespitinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu sayede kontamine buğday ekiminin önüne geçilmesi ve tarlaların patojenle bulaşmasının önlenmesi mümkün olabilecektir. Patojen istilalarının erken safhada önlenmesi, aynı zamanda tarımında kimyasal ilaç kullanımının azalması gibi hem organik tarım açısından, hem de ekonomik açıdan önemli kazanç sağlayacağı bir gerçektir. Patojene özgü spesifik bantların *Tilletia* sp.'ye özgü olduğunu ve konukçu DNA bulaşma riskini ortadan kaldırmak amacıyla, aynı primerler kullanılarak sürmeye kaşı dayanıklı ve hassas farklı 18 buğday çeşidinde de aynı koşullarda PCR işlemi yapılmıştır. Sonuç olarak, *Tilletia sp*'de elde edilen bu spesifik bantlar ile konukçu DNA'sına ait bant profilinin çok farklı ve kesinlikle benzer olmadıkları teyit edilmiştir (Şekil 3.22. ve 3.23.).

T. foetida'nın genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde, çalışmamızda kullanılan ve genotipik karakterizasyonu sağlayan moleküler markörlerin yanı sıra, fenotipik karakterizasyonu sağlayan morfolojik analiz için SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Bu sayede hem genotipik ve hem de fenotipik karakterizasyon yöntem verilerinin karşılaştırılması mümkün olmuştur. *Tilletia* sp. örneklerinin ayrımı için yapılan birçok çalışmada türün çimlenme koşulları, teliospor morfolojisi ve patojenite değerleri gibi fenotipik özellikler belirteç olarak kullanılmıştır. İki türün yaşam döngüleri, çoğalma gereksinimleri ve hastalık yapma etkileri birbirine oldukça benzemesine rağmen elektron mikroskobuyla bakıldıklarında teliospor şekilleri morfolojik olarak birbirinden farklılık göstermiştir (Matanguihan ve Jones, 2011).

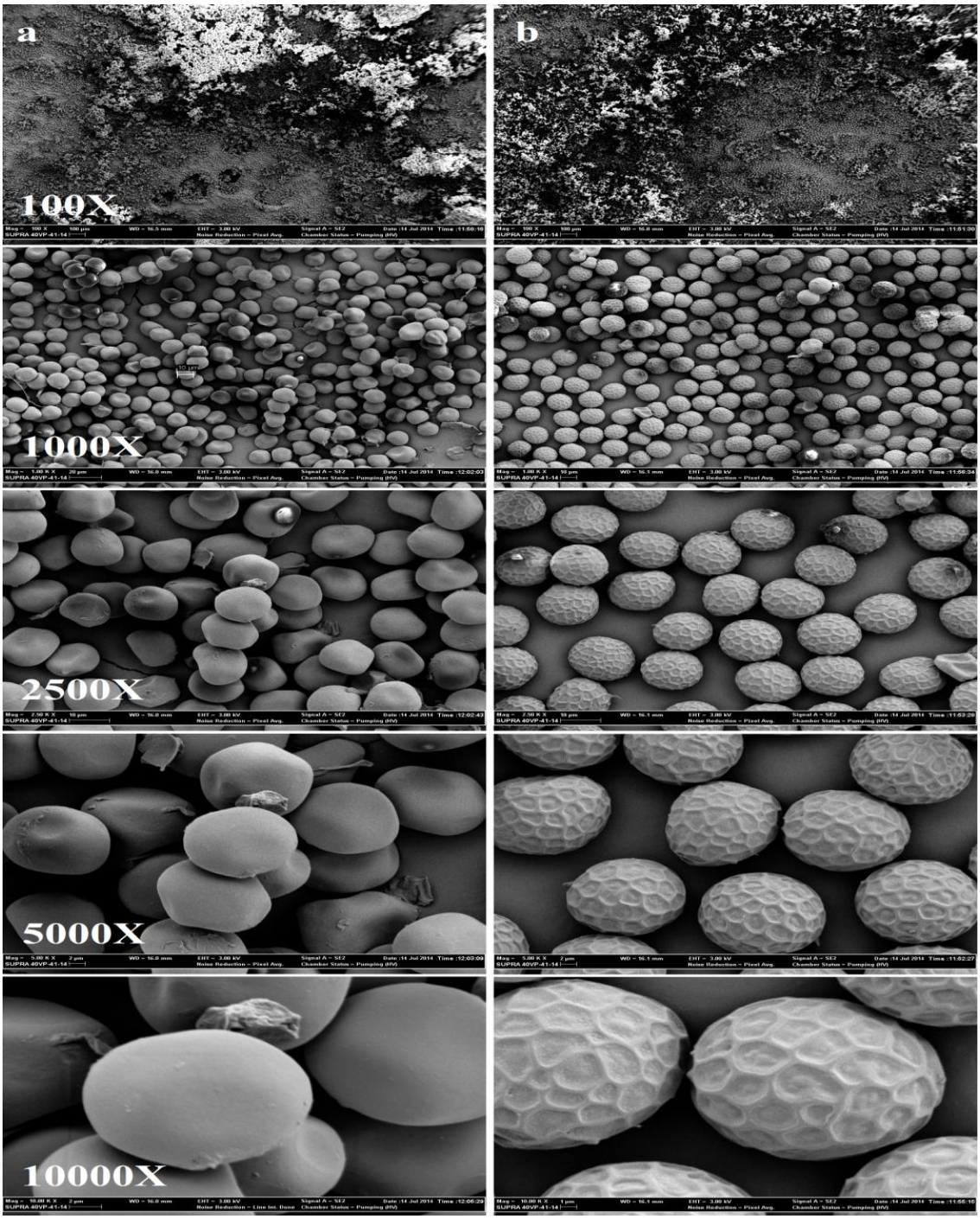
Tilletia sp'ye ait ilk SEM analizleri Mosse ve Jones (1968) tarafından mantar yüzeyi hakkında bilgi edinmek amacıyla *T. caries*'e ait sporlarının yüzey yapılarını inceleyerek başlamıştır. Sürme patojenlerinin tespiti amacıyla Aggarwal ve ark. (1998) tarafından yapılan ışık mikroskobu ve SEM analizleri içinde *T. foetida*'ya ait bir SEM görüntüsüne yer verilmiştir.

Günümüze kadar dünyanın birçok yerinde farklı *Tilletia* türlerinin ışık mikroskobu ve SEM kullanılarak; hem karakterizasyon hem de spor çimlenme özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Ülkemizde, Tuncel (2006) yaptığı tez çalımasında, ışık mikroskobu ile *Tilletia* sp. sporlarının 1000x büyütmede teliospor çeperlerinin yüzey strüktürünü incelemiş ve *T. foetida'*nın sporlarının kahverengi, küremsi, elipsoidal ve çeperinin düzensiz olduğunu bildirmiştir. *T. caries'* in ise sporlarının sarı kahverenginden koyu yeşile kadar değişen renkte olduğunu ve bal renginde hücre çeperlerinin 5-6 köşeli olduğunu belirlemiştir. Trione ve Krygier (1977) tarafından *T. controversa*, Ingold (1995) tarafından *T. hyalospora* yine Ingold (1997) tarafından *T. opaca, T. sumati*, ve *T. caries*, Boyd ve ark. (1998) tarafından *Tilletia goloskokovii, T separata, T menieri* ve *T sphaerococc*, Castlebury ve ark. (1999) ile *T. walkei T. indica T. eragrostidis T. horrida* ve *T. lolii* türleri, Carris ve ark (2006) ile *T. indica* ve *T. borrida*, ve yine Carris ve ark. (2007) tarafından *T. vankyi*, Piatek (2009) tarafından *T. mauritiana*, Shivas ve McTaggart (2009) ile *T. pseudoraphidis, T. majuscule* ve *T. sehimicola*, ve Li ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmalarda, *T. mactaggartii, T. geeringii* ve *T. marjaniae* mantar türlerinin morfolojik analizleri ve çimlenme şekilleri üzerine çalışmaların olduğu görülmektedir.

Albughobeish ve ark. (2015) tarafından İran'da yapılan bir çalışmada *T. foetida* ve *T. caries*'den sadece birer izolata ait sporların SEM görüntüsü yayınlanmış, fakat hücresel boyutları hakkında bilgi verilmemiştir. *T. foetida*'ya ait ilk SEM bilgisi ise 1998 yılında yayınlanan ve tek bir izolata ait olan 22.5 µm ölçülerindeki mantar spor verilerdir (Aggarwal, 1998).

Bu çalışmada ilk kez *T. foetida*'ya ait 13 farklı izolatın sporlarının SEM görüntüleri elde edilmiş ve hücresel boyutlarının ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca karşılaştırma amacıyla *T. caries*'e ait bir izolatın da SEM analizi yapılmıştır. *T. caries*'e ait örneğin morfolojik olarak çok net bir şekilde *T. foetida*'dan ayrıldığı, ancak bu ayrımın sadece 1000x ve üzeri büyütmelerde gözlemlenebildiği, her iki türü ait bulgular karşılaştırılarak gösterilmiştir (Şekil 4.2). Her bir izolata ait 50 sporun hücresel boyutlarının 10000X büyütmede aritmetik ortalama değerleri hesaplanmış ve bu izolatların hastalık yapma (patojenite) dereceleri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 3.45). *T. foetida* sporlarının hücresel boyutlarının büyüklüğü ile patojenite oranları arasında

anlamlı bir korelasyon olduğu (P=0.0114, r=0.67452) tespit edilmiştir. *T. foetida'*nın hücre büyüklüğü arttıkça buna paralel olarak virülans değerinin yükseldiği görülmüştür (Çizelge 3.3).



Şekil 4.2. *T. foetida* ve *T. caries*'e ait sporların 100X, 1000X, 2500X, 5000X ve 10.000X büyütmede görüntüleri. a:*T. foetida* izolat 1'e ait örnek, b: *T. caries*'e ait izolat 2 örneği.

Bu çalışmada, *T. foetida*'nın genetik çeşitlilik analizlerinin yanında, ilk kez patojene ait bir cDNA kütüphanesinin oluşturulması amaçlanmıştır. Çalışma sonunda cDNA kütüphanesine ait plazmit vektörleri 200 kadar koloni çoğaltılarak -80 ^{o}C'de arşivlenmiştir. İlk kez bir *T. foetida* sporuna ait cDNA kütüphanesi oluşturularak, gelecekte moleküler tabanlı fenotipik karakterizasyon ve gen klonlama çalışmaları için önemli bir adım atılmıştır. Kaydedilen bu aşama ile, gelecekte yapılacak çalışmalarda patojenin spor formu dışında diğer yaşam formlarına ait cDNA kütüphanelerinin oluşturulabileceği ve genetik çalışmalarda kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada, cDNA kütüphanesini temsilen 4 örneğin kısmi DNA dizi bilgisi elde edilmiştir ve biyoinformatik analizi yapılmıştır. Analiz sonucu G -M13 örneğinin NCBI veri tabanında *Triticum aestivum'* a benzer bir dizi içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.30). Bu bulguyu destekleyen bir literatür bilgisine ulaşılamamıştır. Konunun; yapılacak çalışmalarla ayrıntılı bir şekilde incelenmesine ihtiyaç vardır. Bu dizi benzerliğinin, konukçu ile patojen arasındaki özgüllüğü ve genetik etkileşimi destekleyen bir bulgu olduğu görülmektedir. Oluşturulan cDNA kütüphanesi ile, gelecekte yapılacak çalışmalar sonucu, patojene ait daha fazla gen dizi ve fonksiyon bilgisi elde edilebilecektir. Bu nedenle, arşivlenen *T. foetida* cDNA kütüphanesi örnekleri, gelecekte yapılacak araştırmalar için önemli bir kaynak teşkil etmektedir.

Özetle çalışmada *T. foetida*'ya ait 13 izolatın moleküler markörler ile genetik çeşitliği belirlenirken, SEM analizi yapılarak da morfolojik karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Morfolojik veriler ile hastalık yapma oranları arasında anlamlı bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

T. foetida izolatlarının genotipik ve fenotipik karakterizasyonundan elde edilen bu veriler ve izolatların patojenisite oranları ile birlikte değerlendirilerek kullanılması, sürmeye dayanıklı buğday çeşitlerinin ıslah çalışmalarında, hem zaman hem de iş gücü ve ekonomik anlamda önemli bir katkı sağlayacaktır. Genetik çeşitliği belirlemede kullanılan ISSR primerlerinin arasından iki tanesinin türün erken tespitinde kullanılabileceği görülmüştür. Günümüze kadar ilk kez bir *T. foetida* sporunun cDNA kütüphanesi oluşturulmuş ve gelecekte yapılacak çalışmalarda kullanılmak amacıyla arşivlenmiştir.

KAYNAKLAR

Aggarwal, R., Srivastava, K. D., Sing, D. V., "Detection of bunt and smut pathogens of wheat through scanning electron microscopy", ***Indian Phytopathology***, 51(2): 190-193 (1998).

Agrios, G. N., "Plant Pathology", **Academic Pres,** New York, U.S.A. (1997).

Ainsworth, G. C., James, P.W. Hawskworth, D.L., "Dictionary of the Fungi 6th ed.", ***Commonwealth Mycological Institute,*** Ainsworth & Bisby, Kew-İngiltere (1971).

Akan, K., Çetin, L., Albostan. S., Düşünceli, F., Mert. Z., "İç Anadolu'da Görülen Önemli Tahıl ve Nohut Hastalıkları", ***Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü***, Bitki Hastalıkları ve Dayanıklılık Islahı Bölümü, 29-38 (2007).

Aktaş, H., Katırcıoğlu, Y. Z., "Bazı Buğday ve Arpa Çeşit ve Hatlarının Önemli Bazı Fungal Patojenlere Karşı Reaksiyonları", ***Tarım Bilimleri Dergisi***, 14(4): 381-385 (2008).

Albughobeishand, N., ve Jorf, S. A. M., "New races of *Tilletialaevis* and *T. caries*, the causal agents of wheat common bunt in Khuzestan province", ***Journal of Crop Protection***, 59-68 (2015).

Ataç, A., Çetin, V., "Türkiye'de Tanılanmış Sürme [*Tilletia foetıda* (Wallr.) Lıro ve *T. carıes* (D,C.) Tul.] Irklarına Karşı Akdeniz Bölgesinde Bazı Buğday Çeşit ve Hatlarının Reaksiyonlarının Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar", ***Bitki Koruma Bülteni***, 35(3-4): 177-189 (1995).

Benli, İ., "Türkiye Doğal Florasında Yetişen *Papaver* Cinsi *Oxytona Seksiyonuna Ait* Gen Havuzunun SSR Tekniği İle Genetik Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, ***T.C. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Biyoloji Anabilim Dalı, Tokat (2009).

Borgen, A., "Organic seed treatment to control common bunt *(Tilletia tritici)* in wheat", ***Seed Testing International,*** 128: 8-10 (2004).

Boyd, M. L., Carris, L. M., and Gray, P. M., "Characterization of *Tilletia goloskokovii* and Allied Species", ***Mycologia***, vol. 90(2): 310-322 (1998).

Carris, L. M., Castlebury, L. A., and Goates, B. J., "Nonsystemic Bunt Fungi *Tilletia indica* and *T. horrida*: A Review of History, Systematics, and Biology", ***Annual Review of Phytopathology***, 44(1): 13-33 (2006).

Carris, L. M., Castlebury, L. A., Huang, G., Steve, C., Aldermand, Y., Luoc, J., Baoa, X., "*Tilletia vankyi*, "a new species of reticulate spored bunt fungus with non conjugating basidiospores infecting species of Festuca and Lolium", ***Mycological Research***, 1386 –1398 (2007).

Castlebury, L. A., and Carris, L. M., *"Tilletia walkeri*, a new species on *Lolium multiflorum and L. perenn*", ***Mycologia***, 91(1): 121-131 (1999).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

Cheng, J., Long, Y., Khan, A., Wei, A., Fu, F., Fu, J., "Development and significance of RAPD-SCAR markers for the identification of Litchi chinensis Sonn. by improved RAPD amplification and molecular cloning", ***Electronic Journal of Biotechnology***, 18: 35–39 (2015).

Chomczynski, P., Mackey, K., "Modification of the TRI Reagent™ procedure for isolation of RNA from polysaccharide - and proteoglycanrich sources", ***Biotechniques,*** 19: 942-945 (1995).

Chomczynski, P., ve Sacchi, N., "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction", ***Analytical Biochemistry***, 162(1): 156-159 (1987).

Ciuca, M., "A Preliminary Report on the Identification of SSR Markers for Bunt (*Tilletia* sp.) Resistance in Wheat", ***Czech Journal of Genetics and Plant Breeding***, 47: 142–145 (2011).

Datta, R, Singh, H., Gupta, V. S., Ranjekar, P. K. and Dhaliwal, H. S., "Gene-for-gene relationship for resistance in wheat to isolates of Karnal bunt", ***Neovossiaindica. Plant Breeding***, 118: 362-364 (1999).

De Riek, J., Calsyn, E., Everaert, I., Van Bockstaele, E., De Loose, M., "AFLP based alternatives for the assessment of Distinctness, Uniformity and Stability of sugar beet varieties," ***Theor Appl Genet***, 103:1254–1265 (2001).

Doğan, E., "Makarnalık Buğdayda (*Triticum durum* desf.) Farklı 2,4-D ve Picloram Dozlarının Kallus Oluşumuna Ve Kromozom Yapısına Etkisi", Yüksek Lisans Tezi, ***Ankara üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü***, Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara (2010).

Doyle, J. J. ve Doyle, J. L., "Isolation of plant DNA from fresh tissue", ***Focus,*** 12: 13-15 (1987).

Düşünceli, F., Çetin, L., Mert, Z., Albostan, S., Akan, K., "Ug 99'a Karşı Küresel Yaklaşımlar ve Türkiye Çalışmalarına Genel Bakış", ***Ülkesel Tahıl Sempozyumu*** , Konya, 322-328 (2008).

Eibel, P., Wolf, G. A., Koch, E., "Detection of *Tilletia caries*, Causal Agent of Common Bunt of Wheat, by ELISA and PCR", ***Journal of Phytopathology,*** 153: 297–306 (2005).

El-Naimi, M., Toubia-Rahme, H., Mamluk, O. F., "Organic seed-treatment as a substitute for chemical seed-treatment to control common bunt of wheat", ***European Journal of Plant Pathology***, 106: 433-437 (2000).

Entofito "Bitki Koruma Hububatta Sürme hastalıkları (*Tilleta spp*.)", http://www.entofito.com/hububattasurme hastaliklaritilleti.aspp (Ziyaret Edilme Tarihi: 16.04.2015).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

Erarslan, A., "Konya İlinde Buğday Tohumlarıyla Taşınan Sürme (*Tilletia* Spp.) Ve Açık Rastık (*Ustilago nuda* Var. *Tritici* Schaffn.) Hastalıklarının Bulaşıklılığı Üzerine Araştırmalar", Yüksek Lisans Tezi, ***Selçuk Ünüversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Konya (2007).

Finci, S., "Türkiye'de Saptanmış Bulunan Bazı *Tilletia foetida* (Wallr.) Liro. Irklarının Halen Memleketimizde Yetiştirilmekte Olan Yerli Ve Yabancı Kaynaklı Başlıca Buğday Varyetelerine Karşı Patojeniteleri Üzerinde Çalışmalar", ***Tarım bakanlığı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü, Teknik Bülten,*** 10 (1975).

Finci, S., Parlak, Y., Bilgin, O., Gümüştekin, H., Aktuna, İ., Tuçdemir, M., "Buğday Sürme Etmenleri (*Tilletia foetida* (Wallr.) Liro ve *Tilletia caries* (D.C) Tull)'nin Yayılmış Olan Irklarının Saptanması Üzerinde Araştırmalar", ***Bitki Koruma Bülteni,*** 23(3): 124-147 (1983).

Gang, D. R., Weber, D. J., "Using random amplified polymorphic DNA to anakyze the genetic relationship and variability among three species of wheat smut (*Tilletia*)", ***Botanical Bulletin of Academia Sinica***, 37: 173-180 (1996).

Gao, L., Chen, W. Q., Liu, T. G., "Development of a SCAR Marker by Inter-Simple Sequence Repeat for Diagnosis of Dwarf Bunt of Wheat and Detection of *Tilletia controversa* KÜHN", ***Folia Microbiologyca***, 55(3): 258–264 (2010).

Gao, L., Yu, H., Han, W., Gao, F., Liu, T., Liu, B., Kang, X., Gao, J., Chen, W., "Development of a SCAR marker for molecular detection and diagnosis of *Tilletia controversa* Kuhn, the causal fungus of wheat dwarf bunt", ***World Journal of Microbiology and Biotechnology***. 30: 3185–3195 (2014).

Gassner, G., Göydün, A. "Sürme hastalığının Türkiye'de yayılışı, Sürme hastalığı ve bulaşma kabiliyeti, Türkiye'de tohum ilaçlama işleri", ***Birinci Köy ve Ziraat Kalkınma Kongresi Yayını***, 3-13 (1938).

Goates, B. J., "Identification of new pathogenic races of common bunt and dwarf bunt fungi, and evaluation of known races using an expanded set of differential wheat lines", ***Plant Disease***, 96: 361-369 (2012).

Gülşen, O., Mutlu, M., "Bitki biliminde kullanılan genetik markerlar ve kullanım alanları", ***Alatarım***, 4(2): 27-37 (2005).

He, L., Wang, S., Miao X., Wu, H., Huang Y., "Identification of necrophagous fly species using ISSR and SCAR markers", ***Forensic Science International*** 168: 148–153 (2007).

Index Fungorum, http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp (Ziyaret Edilme Tarihi: 20.04.2015).

Ingold, C. T., "Products of teliospore germination in *Tilletia hyalospora*", ***Mycological Research***, 99(10): 1247-1248 (1995).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

Ingold, C. T., "Teliospore germination in *Tilletia opaca* and *T. sumati*i and the nature of the tilletiaceous basidium", ***Mycological Research***, 101(3): 281-284 (1997).

Ingold, C. T., "The Basidium Of *Tilletia* And Its Evolution", ***Mycologist***, 12: 98-100 (1997).

İren, S., "Tarla bitkileri hastalıkları", ***Türk Ziraat Yüksek Mühendisleri Birliği Yayını***, 27: 64 (1962).

İren, S., Maden, S., Coşkun, H., "Türkiye'de 1980 Yılında Buğdaylarda Görülen Sürme Hastalığı (*Tilletia Spp*.) Türleri, Bunların Geçmiş Yıllarla Karşılaştırılması ve Hastalık Çıkışına Tohum İlaçlarının Etkinliği", ***Bitki Koruma Bülteni***, 22(2): 61-71 (1982).

Josefsen, L., Christiansen, K. S., "PCR as a tool for the early detection and diagnosis of common bunt in wheat, caused by *Tilletia tritici*", ***Mycological Research,*** 106:1287–1292 (2002).

Kabaoğlu, A., "Türkiye'de Bulunan *Hypogymnia* (Nyl.) Nyl. Türlerinde rDNA ITS Bölgesi Dizi Analizi İle Çeşitliliğin Tanımlanması", ***Ankara üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara (2007).

Kaymak, E., "Türkiye Doğal Florasında Yetişen *Papaver* Cinsi *Oxytona* Seleksiyonuna Ait Gen Havuzunun SRAP Tekniği İle Genetik Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, ***T.C. Gaziosmanpaşa üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Biyoloji Anabilim Dalı, Tokat (2010).

Kobs, G., "Cloning Blunt-End DNA Fragments Into the pGEM-T Vector systems", ***Promega Notes Magazine***, Promega. 15-19 (1997).

Koprivica, M., Jevtic, R., Markovic, I.D., "The Influence of *Tilletia spp*. Inoculum Source and Enviromental Conditions on the Frequency of Infected Wheat Spikes", ***Pesticidi i fitomedicina,*** 24: 185-196 (2009).

Koprivica, M., Zouhar, M., Prokinova, E., Rysanek, P., "Detection of *Tilletia controversa* and *Tilletia caries* in wheat by PCR method", ***Plant Soil Environ***, 50: 75–77 (2004).

Li, Y. M., Shivas, R. G., and Cai, L., "Three new species of *Tilletia* on Eriachne from North-Western Australia", ***Mycoscience***, 55: 361-366 (2014).

Majumder, D., Rajesh, T., Suting, E. G., Debbarma, A.," Detection of seed borne pathogens in wheat: recent trends", ***Australian journal of Crop Science***, 7: 500-507 (2003).

Matanguihan, J. B. and Jones, S. S., "A New Pathogenic Race of *Tilletia caries* possessing the broadest virulence spectrum of known races", ***Online Plant Health Progress***, (2011).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

Matanguihan, J. B., Murphy, K. M., "Control of Common Bunt In Organic Wheat", ***Plant Disease***, 95: 92-103 (2011).

Matz, M., Shagin, D., Bogdanova, E., Britanova, O., Lukyanov, S., Diatchenko, L. and Chenchik, A "Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR.", ***Nucleic Acids Research***, 27: 1558-1560 (1999).

Meglic, V., Staub, J. E., "Inheritance and linkage relationships of isozyme andmorphological loci in cucumber (*Cucumis sativus* L.)", ***Theoretical and Applied Genetics***, 92: 865-872 (1996).

Meksem, K., Kahl, G., "The Handbook of Plant Genome Mapping: Genetic and Physical Mapping", ***John Wiley & Sons Yayınevi***, 24 (2006).

Miran, B., "Tarımsal Yapı Ve Üretim", Türkiye'de Tarım, Prof. Dr. Fahri Yavuz, ***Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı,*** Erzurum, 43-66 (2005).

Mosse, B., Jones, G. W., "Surface Features of Fungal Spores as Revealed in A Scanning Electron Microscope", ***Transactions of the British Mycological Society***, 51: 3-4 (1968).

Nagy, E., Moldovan, V., "The Effect Of Fungıcıde Treatments On Wheat Common Bunt (*Tilletia spp*.) In Transylvanıa", ***Agricultural Research and Development Station Turda,*** 33-38 (2007).

Nanda, S., Kar, B., Nayak, S., Jha, S., Joshi, K. R., "Development of an ISSR based STS marker for sex identification in pointed gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.)", ***Scientia Horticulturae.*** 150: 11–15 (2013).

Nurşen, A., "SSR ve ISSR Moleküler Belirteçlerinin Bazı Doğu Ve Güneydoğu Anadolu Kavun Genotipleri Arasındaki Genetik İlişkilerin Belirlenmesinde Fenolojik Belirteçler İle Birlikte Kullanımı", Yüksek Lisans Tezi, ***Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Van (2012).

Özatay, Ş., "Mercimek Genomunun AFLP, RAPD, ISSR Ve Bazı Morfolojik Markörler Kullanarak Haritalanması", Doktora Tezi, ***Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, İzmir (2007).

Özkan, M., Damagacı, E., "Türkiye'de Buğdayın Sürme Türleri (*Tilletia foetida* (Wallr.) Liro ve *T. caries* (D.C.) Tull.)'nin 1949-1964 ve 1983 76 Yıllarında Coğrafik Yayılışı Üzerinde Araştırmalar", ***Bitki Koruma Bülteni***, 4: 38- 44 (1985).

Özkan, M., Finci, S., "Buğday Sürmesi (*Tilletia foetida* Wallr. Liro)'ne Karşı Kullanılan Kuru Tohum İlâçlarının, Sonradan Bulaşmalardaki Koruyucu Etkisi Üzerinde Çalışmalar", ***Bitki Koruma Bülteni***, 1: 3 (1974).

Öztürk, S., Tarım ilaçları, ***Ak Basımevi***, 2: 127-132, İstanbul (1997).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

Perera, D., Barnes, D. J., Baldwin B, S., Reichert, N, A., "Mutagenesis of in vitro cultures of *Miscanthus giganteus* cultivar Freedom and detecting polymorphisms of regenerated plants using ISSR markers", ***Industrial Crops and Products.*** 65: 110–116 (2014).

Piatek, M., "Sporisorium Themedae, New to Mauritius, and *Tilletia Mauritiana*, New To Madagascar", ***Polish Botanical Journal***, 54(1): 21-26 (2009).

Poyraz, İ., " *Origanum onites* L.'de Mitojenler Tarafından Aktive Edilen Protein Kinaz Kinaz (MAPKK) Enzim Ailesi Üyelerinden Birinin Klonlanması ve Enzimatik Olarak Tanımlanması", Doktora Tezi, ***Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir (2007).

Promega, "*Abstract for pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems*" http//www.promega.com/tbs/tm042/tm042.html (2009).

Qing, Y., Siji, N., Youping, Y., Minhui, L., Jun, C., Zhongkang, W., "Development of a PCR-based diagnostic tool specific to wheat dwarf bunt, caused by *Tilletia controversa*", ***European Journal of Plant Pathology***, 124: 585–594 (2009).

Roth, M. J., Tanese, N. Goff, S. P., "Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in *Escherichia coli*", ***The Journal of Biological Chemistry***, 260(16): 9326-9335 (1985).

SAS, 1987. SAS User's Guide: Statistics, ***SAS institute*** Inc., Carry, NC,USA, (1987).

Shi, Y. L., Loomis, P., Christian, D., Carris, L. M., Leung, H., "Analysis of the Genetic Relationship Among the Wheat Bunt Fungi Using RAPD and Ribosomal DNA Markers", ***Phytopathology***, 86: 311-318 (1996).

Shivas, R. G., and McTaggart, A. R., "Three new species of *Tilletia* on native grasses from northern Australia", ***Australasian Plant Pathology***, 38: 128-131 (2009).

Tanksley, S. D., Young, N. D., Paterson, A. H., "Bonierbale, M.W., "RFLP mapping in plant breeding: New tools for old science", ***Biotechnology,*** 7: 257 (1989).

Thirumalaisamy P. P., Singh D. V., "Variability of indian isolates of *Tilletia indica* assessed by pathogenicity and molecular markers", ***Journal of Phytopathology,*** 160: 525-531 (2012).

Tosun, M., "Tahıllarda Hastalığa Dayanıklılığın Temelleri", ***Ülkesel Tahıl Sempozyumu***, Konya, 290-295 (2008).

Trione, E. J. and Krygier, B. B., "New Tests to Distinguish Teliospores of *Tilletia controversa*, tha Dwarf Bunt Fungus, from Spores of Other *Tilletia* Spesies", ***The American Phytopathological Society***, 66: 1166-1172 (1977).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

Tuncel, M., "Konya Yöresinde Hasat Edilen Buğday Ürünündeki Sürme Hastalığı *(Tilletia spp*.) Ve Hastalığın Patojenitesini Etkileyen Bazı Faktörler Üzerine Bir Araştırma", Yüksek Lisans Tezi, ***Selçuk Ünüversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Konya, Türkiye (2006).

Turunç, A., "Klemantin Mandarininde (*Citrus clementina blanco*) SSR markörleri İle Genetik Haritalama", Yüksek Lisans Tezi, ***Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana (2010).

Veisz, O., Szunics, L., Szunics, L., "Effect of common bunt on the frost resistance and winter hardiness of wheat (*Triticum aestivum* L.) lines containing Bt genes", ***Euphytica***, 114: 159–164 (2000).

Waldow, F., Jahn, M., "Investigations in the regulation of common bunt (*Tilletia tritici*) of winter wheat with regard to threshold values, cultivar susceptibility and non-chemical protection measures", ***Journal of Plant Diseases and Protection***, 114(6): 269-275 (2007).

Walton, M., "Molecular Markers: Which ones to use?", ***Seed World***, 23-29 (1993).

Yarullina, L. G., Kasimova, R. I., Kuluev, B. R., Surina, O. B., Yarullina, L. M., Ibragimov, R. I., "Comparative Study of bunt pathogen resistance to the effects of fungicides in callus co-cultures *Triticum aestivum* with *Tilletia caries"*, ***Agricultural Sciences***, 5: 906-912 (2014).

Yılmaz, E., Alagöz, Z., "Topraklarda Kolloid Pestisit ilişkisi", ***GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi,*** 25 (2), 69-78, (2008).

Yuan, Q., Nian, S., Yin, Y., Li, M., Cai, J., Wang, Z., "Development of a PCR-based diagnostic tool specific to wheat dwarf bunt, caused by *Tilletia controversa*", ***European Journal of Plant Pathology***, 124: 585–594 (2009).

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D., "Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification", ***Genomics***, 20: 176–183 (1994).

Zouhar, M., Mazakova, J., Prokinova, E., Vanova, M., Rysanek, P., "Quantification of *Tilletia caries* and *Tilletia controversa* Mycelium in Wheat Apical Meristem by Real-time PCR", ***Plant Protection Science***, 46: 107–115 (2010).

Zupunski, V., İgnjtovic-micic, D., Nikolic, A., Stankovic, S., Jevtic, R., Levic, J., İvanovic, D., "Identıfıcatıon Of *Tilletia* Specıes Usıng Rep-Pcr Fıngerprıntıng Technıque", ***Genetıka***, 43(1): 183-195 (2011).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Ahmet UMAY

Doğum Yeri ve Tarihi : Eskişehir 1982

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : Celal Bayar Üniversitesi Fen Edb. Fak. Biyoloji Böl.

Yüksek Lisans :Celal Bayar Üniversitesi Fen Bil. Enst. Biyoloji ABD

İş Deneyimi

Projeler :

Çalıştığı Kurumlar : Anadolu Üniversitesi Test Araştırma Birimi

İletişim

Adres : Kırmızı Toprak Mah. Basın Şehitleri Cad. 1/3
Merkez/ ESKİŞEHİR

Tel : 5446659964

E-Posta Adresi : ahmetumays@hotmail.com

Akademik Çalışmaları

1. A. Umay, İ. Poyraz, G. A. Palabıyık, F. Altay, "Buğdaylardaki Sürme Hastalığı Etmeni *Tilletia foetida*'nın Spesifik ISSR Markörler ile Erken Tespiti" Bartın Üniversitesi Mühendislik ve Teknoloji Bilimleri Dergisi, Cilt 3 Sayı 1, 13-17, 2015.
2. G. A. Palabıyık, İ. Poyraz, A. Umay, "Sürme Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Hassas Ekmeklik Buğdayların Genetik Çeşitliliğinin ISSR Markörleriyle Belirlenmesi" Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi, 2015.
3. A. Umay, E. Uğurlu, "Beylikova (Eskişehir) İlçesinin Florasına katkılar", Ot Sistematik, 133-150 pp., 2011.
4. A. Umay, İ. Poyraz, G.A. Palabıyık, A. Yorgancılar, "Ekmeklik buğdaydalardaki sürme etmeni *Tilletia foetida* ve *Tilletia caries*'in genetik çeşitliliğinin ISSR tekniği ile belirlenmesi" 2. İç Anadolu Bölgesi Tarım ve Gıda Kongresi, Nevşehir, 2015.

Yabancı Dil Bilgisi

İngilizce

Tarih:…../……/……