

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ KÜTÜPHANESİ

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*FUSARIUM OXYSPORUM F.SP. MELONIS İRKLARININ
DAF (DNA AMPLIFICATION FINGERPRINTING) METODUYLA
BELİRLENMESİ*

T 767/1-1

Kader YAĞIZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

1995

767

*FUSARIUM OXYSPORUM F.SP. MELONIS IRKLARININ
DAF (DNA AMPLIFICATION FINGREPRINTING) METODUYLA
BELİRLENMESİ*

Kader YAĞIZ

*YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI*

1995

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FUSARIUM OXYSPORUM F.SP. MELONIS IRKLARININ
DAF (DNA AMPLIFICATION FINGREPRINTING) METODUYLA
BELİRLENMESİ

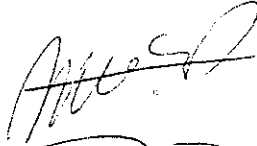
Kader YAĞIZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez .../.../1995 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından(.....) not takdir edilerek
Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.


Dr. Süheyla İNAN (Danışman)



Yrd. Doç. Dr. O. Nidai ÖZEŞ



Yrd. Doç. Dr. Mahmut TÖR



ÖZ

FUSARIUM OXYSPORUM F.SP. MELONIS İRKLARININ DAF (DNA AMPLIFICATION FINGERPRINTING) METODUYLA BELİRLENMESİ

Kader YAĞIZ

Yüksek Lisans Tezi , Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran 1995 , 44 Sayfa

Fusarium oxysporum f.sp.melonis'in kavunlarda neden olduğu solgunluk ve sararma hastalıkları, dünya kavun üretiminin önemli sorunlarıdır. Bu patojenin dört farklı ırkı (0,1,2 ve 1.2) taşıyıcılarında oluşturdukları hastalıklar temel alınarak tanımlanmasına rağmen, moleküler işaretleyiciler halen ırkların ayırımında güvenilir olarak imkan sağlayacak kadar elverişli değildir. Bu çalışmanın amaçları ırka özel olan PCR'a bağlı DAF işaretleyicilerini tanımlamak ve ırklar arasındaki genetik ilişkiyi belirlemektir. İki set olan ırkların (bir set Fransa'dan ve diğeri Amerika Birleşik Devletleri'nden) spor kültürlerinden elde edilen genomik DNA, özel bir sekansa sahip olmayan 8-mer ya da 10-mer'lik primerlerle çoğaltıldı. Bazı çoğaltma ürünleri restriksiyon enzimleriyle de kesildi. DAF sonucu oluşan bantlar poliakrilamid jel elektroforez ve gümüş boyama ile belirlendi. Test edilen 40 primerden 14 tanesi özel DAF bantları meydana getirdi. İrklar arasındaki Jaccard' ın benzerlik katsayısı 0,38 (İrk 2- İrk 1.2) ile 0,64 (İrk 0- İrk1) arasındaydı. Seçilen 14 primerin meydana getirdiği bantların kullanılmasıyla oluşan sınıf analizi, iki farklı sınıf oluşturdu (İrk 2 ve diğeri). Elde ettiğimiz sonuçlar DAF metodunun, *Fusarium oxysporum* f.sp.melonis ırklarının ayırımında olduğu gibi ırklar arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesinde de kullanılabilir kadar basit, hızlı ve güvenilir olduğunu gösterdi.

ANAHTAR KELİMELEER: *Fusarium oxysporum*, solgunluk, kavun, DAF (DNA Amplification Fingerprinting) işaretleyicileri.

JÜRİ: Dr. Süheyla İNAN
Yrd. Doç. Dr. O. Nidai ÖZEŞ
Yrd. Doç. Dr. Mahmut TÖR

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF FUSARIUM OXYSPORUM F.SP. MELONIS RACES USING DAF (DNA AMPLIFICATION FINGERPRINTING) METHOD

Kader YAĞIZ

M. S. in Biology

Advisor: Dr. Süheyla İNAN

June, 1995, 44 pages

Wilt and yellowing disease of muskmelon, caused by Fusarium oxysporum f.sp. melonis, are serious problems of muskmelon production worldwide. Although four different races of the pathogen (0,1,2 and 1.2) have been identified based on their disease reactions to the host, molecular markers are currently not available that permit reliable distinction of the races. The objectives of this research were to identify PCR (Polymerase Chain Reaction) - based DAF markers for race-specific detection and to determine the genetic relatedness among the races. Genomic DNA extracted from single spor cultures of two sets of races (one from France and the other from the USA) was PCR-amplified using a single 8-mer or 10-mer primer of arbitrary sequences. Partial amplification products were also subjected to restriction digest analysis. DAF banding patterns were revealed by polyacrilamide gel electrophoresis followed by silver staining. Of 40 tested primers, 14 revealed specific DAF profiles. Jaccard's similarity coefficients (r) between paired races ranged from 0.38 (Race 2-Race 1.2) to 0.64 (Race 0- Race 1). Cluster analysis using total all bands generated from 14 selective primers showed two distinct clusters (Race 2 vs. others). Our results indicate that DAF procedure is a simple, rapid and reliable technique that can be used to distinguish different races of Fusarium oxysporum f.sp. melonis as well as to determine genetic relationship among the races.

KEY WORDS: Fusarium oxysporum, wilt, muskmelon, DAF (DNA Amplification Fingerprinting) markers.

COMMITTEE: Dr Süheyla İNAN
Asst. Prof. Dr. Nidai ÖZEŞ
Asst. Prof. Dr. Mahmut TÖR

ÖNSÖZ

Kavunlardaki solgunluk ve sararma, tüm dünyada olduğu gibi yurdumuzda da önemli ölçüde zarara neden olan fungal bir hastalıktır. Bu nedenle kavun üreticilerimiz ve milli ekonomimiz büyük zarara uğramaktadır.

Bu çalışma, kavunlardaki solgunluk ve sararmaya neden olan fungal hastalığın önlenmesine yeni bir katkı sağlaması amacıyla yapılmıştır. Çalışma sonucunda ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarının üreticilere faydalı olacağı ümit edilmektedir.

Böyle bir çalışma konusunu belirleyen ve çalışmanın başlatılmasına yardım eden ve her türlü desteği sağlayan hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Esengül MOMOL'a, çalışmam sırasındaki desteğinden dolayı danışman hocam Dr. Süheyla İNAN'a, yine çalışma ortamını sağlayan Yrd.Doç.Dr. Sadık TÜZÜN'e, çalışmam süresince kullandığım teknik ve metodları öğrenmemi sağlayan Dr. J. QIU'ya ve Fransa'dan gelen ırkları temin eden Prof.Dr. Salih MADEN'e ayrı ayrı teşekkür ederim.

Yine, tüm çalışmam sırasında sık sık yardımları dokunan Auburn Üniversitesi Plant Pathology Bölümü'nde Yrd. Dr. Sadık TÜZÜN'ün laboratuvarında çalışanlara ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım.

Tüm çalışmalarım sırasında bana en büyük desteği sağlayan aileme de ayrıca çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Irk Ayrımında Kullanılan Yöntemler	6
1.1.1. Morfolojik Yöntemler	6
1.1.2. Vegetative Compatibility Grouping (VCG)	6
1.1.3. Moleküler Yöntemler	7
1.1.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	8
1.2. Moleküler İşaretleyiciler ve Özellikleri	8
1.2.1. İzoenzimler	8
1.2.2. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Metodu	9
1.2.3. Mitokondryial DNA (mtDNA) ve Plazmidler	9
1.2.4. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Metodu	10
1.2.4.1. RAPD 'in Uygulama Alanları	10
2. MATERYAL VE METOT	13
2.1. Materyal	13
2.1.1. Kültürlerin Hazırlanması	13
2.1.2. Primerlerin Sentezi	13
2.2. Metot	13
2.2.1. DNA Elde Edilmesi	13
2.2.2. DNA'nın Çoğaltılması	14
2.2.3. DNA Elektroforezi	15
2.2.4. Silver Staining (Gümüş Boyama)	15
2.2.5. Restriksiyon Enzimlerle Kesme	16
2.2.6. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Analizi	16
3. BULGULAR	17
4. TARTIŞMA	31
5. SONUÇ	34
6. ÖZET	35
7. SUMMARY	36
8. KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

bp	Base pair (baz çifti)
dATP	Deoksiadenozintrifosfat
dGTP	Deoksiguanozintrifosfat
dCTP	Deoksisitozintrifosfat
dTTP	Deoksitimintrifosfat
8-mer ve 10-mer	8 ve 10 bazlık primer
ng	Nanogram
µM	Mikromolar
µl	Mikrolitre
xg	Santrifüjün devir sayısı

Kısaltmalar

AP-PCR	Arbitrary Primed PCR
AU	Auburn Üniversitesi
DAF	DNA Amplification Fingerprinting
f.sp	Formea türleri (speciales)
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NSTYS	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System
PCR	Polymerase Zincir Reaksiyonu
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SIMQUAL	Similarity for Qualitative Data
TE	Tris-EDTA
UPGMA	Unweighed Pairgroup Method with Arithmetic Average
UV	Ultra viyole
VCG	Vegetative Compatibility Grouping

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	<u>Cucumis melo</u> Ayırıcı Çeşitlerine Göre <u>Fusarium oxysporum</u> f.sp. <u>melonis</u> Irklarının İsimlendirilmesi	5
Çizelge 2.2.2.	Kullanılan Primerlerin Kodları, Sekansları, % G+C Miktarı ve Oluşturdukları Bant Sayısı	15
Çizelge 3.1.	<u>Fusarium oxysporum</u> f.sp. <u>melonis</u> Irklarının 14 Rastgele Sentenlenen Primerle Oluşturduğu DAF Analiz Sonuçları	21
Çizelge 3.2.	<u>Fusarium oxysporum</u> f.sp. <u>melonis</u> Irklarının DAF Analizi Sonucu Elde Edilen Genetik Benzerlikler	29
Çizelge 3.3.	<u>Fusarium oxysporum</u> f.sp. <u>melonis</u> Irklarının DAF Analizi Sonucu Elde Edilen Dendrogram	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Farklı DNA Konsantrasyonlarının (5 - 200 ng) <u>Fusarium oxysporum</u> f.sp. <u>melonis</u> 'in DAF Bantlarına Olan Etkisi. Irk-2 DNA'sının 5'-ACGGGTGC-3' Primeriyle Oluşturduğu Çoğalma	18
Şekil 3.2.	Farklı MgCl ₂ Konsantrasyonlarının (1 - 6 mM) <u>Fusarium oxysporum</u> f.sp. <u>melonis</u> 'in DAF Bantlarına Etkisi. A-15 DNA'sının 5'-GCGGACAG-3' Primeriyle Oluşturduğu Çoğalma	19
Şekil 3.3.	Irk - 1 DNA'sının Farklı Primerlerle Oluşturduğu DAF Çoğalması	22
Şekil 3.4.	Irk - 0 DNA'sının Farklı Primerlerle Oluşturduğu DAF Çoğalması	23
Şekil 3.5.	AU-8S (5'-ACGGGTGC-3') Primerinin <u>Fusarium oxysporum</u> f.sp. <u>melonis</u> Irklarıyla Oluşturduğu Çoğalmada Belirlenen Polimorfik Bantlar	24
Şekil 3.6.	OPF-10 (5'-GGAAGCTTGG-3') Primerinin <u>Fusarium oxysporum</u> f.sp. <u>melonis</u> Irklarıyla Oluşturduğu Çoğalmada Belirlenen Polimorfik Bantlar	25
Şekil 3.7.	AU-8S (5'-ACGGGTGC-3') Primerinin <u>Fusarium oxysporum</u> f.sp. <u>melonis</u> Irklarıyla Oluşturduğu PCR Ürünlerinin EcoR I Restriksiyon Enzimiyle Kesiminden Sonra Görülen Bantlar	26
Şekil 3.8.	AU-8S (5'-ACGGGTGC-3') Primerinin <u>Fusarium oxysporum</u> f.sp. <u>melonis</u> Irklarıyla Oluşturduğu PCR Ürünlerinin Hind III Restriksiyon Enzimiyle Kesiminden Sonra Görülen Bantlar	26
Şekil 3.9.	AU-8S (5'-ACGGGTGC-3') Primerinin <u>Fusarium oxysporum</u> f.sp. <u>melonis</u> Irklarıyla Oluşturduğu Çoğalmada Belirlenen Genel Bantlar	27
Şekil 3.10.	AU-10S (5'-ATACGGGIGC-3') Primerinin <u>Fusarium oxysporum</u> f.sp. <u>melonis</u> Irklarıyla Oluşturduğu Çoğalmada Belirlenen Genel Bantlar	28
Şekil 3.11.	OPF-10 (5'-GGAAGCTTGG-3') Primerinin <u>Fusarium oxysporum</u> f.sp. <u>melonis</u> Irklarıyla Oluşturduğu Çoğalmada Belirlenen Genel Bantlar	28

1. GİRİŞ

Funguslar insan hayatını etkileyen önemli canlı gruplarından biri olarak kabul edilmektedirler. İnsan, hayvan ve bitkilerde hastalık yapabilen çok çeşitli türlerinin olduğu bilinmektedir. Toprakta yaşayan bazı fungus türlerinin organik maddeleri parçalayarak toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik yapısına önemli katkılarda bulunduğu da bilinmektedir. Diğer taraftan bazı fungus türleri fermantasyon işlemlerinde, ilaç etkili maddelerin üretiminde ve endüstriyel mikrobiyolojide kullanılarak, insanlara faydalı olmaktadır.

Funguslar dış görünüş olarak dallanabilen, iplikli bir yapıya sahiptir. Morfolojik görünüşlerindeki farklılık, türlere bağlıdır. Hücreleri genelde bitki hücresi yapısında olmakla birlikte, klorofilden yoksundurlar. Işık gereksinimleri yoktur. Ökaryotik organizmalardır; çekirdekleri genellikle nükleer bir membran tarafından çevrelenmektedir. Spor oluşturabilirler. Hem eşeyli hem de eşeysiz üreyebilirler. Heterotrofik organizmalardır; beslenmeleri için organik bileşiklere ihtiyaç duyarlar. Genellikle aerobik organizmalar olan funguslar, diğer mikroorganizmalara göre ekstrem şartlara daha iyi uyum sağlayabilirler. Örneğin; bakterilerin öldüğü yüksek konsantrasyonlu şeker ortamında rahatlıkla üreyebilirler.

Tallus ya da bir fungusun vücudu tek bir hücreden oluşabilir. Talluslar, gerçek bir hücre duvarıyla çevrili olan filamentlerden meydana gelir. Tallus **miselyum** ve **spor** olmak üzere iki kısımdan oluşur. Birkaç filamentten oluşan iplikli kompleks yapıya **hif** denir ve kalınlıkları fungus türlerine göre değişmektedir. Sınıflara göre bu hifler bölmeli ya da bölmesiz olabilmektedir. Hiflerin oluşturduğu topluluğa **misel**, bölmeli hiflerdeki bölmelere ise **septum** denir. Her türün karakteristik bir morfolojisi olmasına rağmen saf kültür ortamlarında bile yaşa ve çevre şartlarına bağlı olarak değişebilen çeşitlilik gözlenmektedir (Cooke 1979). Funguslar ökaryotik organizmaların temel özelliklerini taşımalarına rağmen, tallus organizasyonunun kendine özgü belirleyici tarafları bulunmaktadır. Karbohidratların, yağların, proteinlerin ve nükleik asitlerin temel yapısı aynıdır. Fakat diğer organizmalara göre kompozisyon farklılığına sahiptirler. Funguslardaki DNA konsantrasyonu çok düşüktür. Bu değer bakteriler ve yüksek organizasyonlu ökaryotlardan on defa daha az olduğu belirtilmiştir (1 pikogram). Fungal proteinlerin çoğu asidik özellik taşır, enzim ve yapısal olarak fonksiyon gösterirler. DNA ve RNA'dan oluşan nükleik asitler temel polimerik yapıya sahiptir. Karbohidratlar,

polisakkaritler olarak bulunur. Özellikle kitin ve selüloz fungusların tanımlanmasında önemlidir (Griffi ve Wiley 1981).

Fusarium, tropik bölgeleri de kapsayan çok geniş alana yayılmış bir fungus cinsidir. Fusarium cinsleri **mikrokonidia** ve **makrokonidia** olmak üzere iki eşeysiz spora sahiptir. Tek hücreden oluşan mikrokonidiada tek çekirdek bulunur. Makrokonidialar ise çok hücrelidir. Fakat her hücre sadece bir çekirdeğe sahiptir. Makrokonidialar türlerin doğru olarak tanımlanmasında gereklidir. Aynı atanın çekirdeğinin mitoz bölünmesiyle oluşmalarına rağmen, mayoz rekombinasyonlarıyla genetik kompozisyon değişebilir. Eşeyli evresi ise Askomycetes sınıfına girer. Hemen hemen bütün hif hücreleri sadece bir çekirdeğe sahiptir. Ayrıca her hücredeki çekirdek sayısının türlere bağlı olduğu bulunmuştur. Örneğin; Fusarium oxysporum ve Fusarium solani tek çekirdekli hücrelere sahipken, Fusarium culmorum ve Fusarium graminearum çok çekirdeğe sahiptir. Yapılan bir çok çalışma genç hücrelerin çok çekirdekli, daha yaşlı hücrelerin ise tek çekirdekli olduğunu göstermiştir. Hücrelerdeki çekirdekler eş zamanlı olarak bölünür. Hızlı olan bölünmeyi septum oluşumu izlemektedir (Gordon 1960).

Doğal ortamdan taze olarak izole edilen Fusarium kültürü agarlı ortamda değişmeden kalabilir, morfolojisinde zamanla değişiklik meydana gelebilir ya da anne ve babadan tamamıyla farklı olarak gelişebilir. Morfolojide meydana gelen bu çeşitlilik Fusarium türlerinin ayırt edilmesinde karışıklıklara neden olmaktadır. Bir türün varyantı bazı zamanlarda diğer türün üyelerinden ayırt edilemeyebilir. Meydana gelen bu çeşitliliğin nedenleri şu şekilde açıklanmaktadır:

1. Bütün izolatlar değişken olmamakla birlikte, bazı izolatlar diğerlerinden daha değişkendir.
2. Değişiklikler sürekli değildir; farklı basamaklarda meydana gelir.
3. Morfolojik değişiklikler genellikle miselyum kaybı, makrokonidiada üretimin artması ve bazen pigment oluşumundaki artış şeklindedir.

Fusarium'un belirli bitki-patojeni türlerinin doğal izolatları, patojenitide önemli farklılıklar göstermektedir. Bu grupta yer alan izolatlar sadece belli bitki türlerine zarar verirler. Bu gruplara **formae türleri (speciales)** (f.sp.) denir. Formae türleri genellikle belirli bir bitki türünün bir kültürüne zarar veren fizyolojik ırklara ayrılabilir. Genellikle farklı formae türlerinin izolatları morfolojik olarak ayırt edilememiştir (Brown 1928). Türlerin belirlenmesinde, orjinal izolatlarda morfolojik olarak meydana gelen değişikliklerin olduğu kültürler temel alınmıştır (Puhala 1980).

Fusarium türleri ekonomik önemi olan bitkilerde hastalıklara neden olmaktadır. Toprak, su, hava ve organik maddelerin de olduğu çeşitli yaşam ortamlarına adapte olmuşlardır. Bitkilerde kök çürümeleri, kurumalar, yapraklarda beneklenmeler, kanser ve damarlarda solgunluk gibi hastalıklara neden olmaktadır. Fusarium cinsi içinde yer alan Fusarium oxysporum türü de domates, biber, lahana, muz, bezelye, tütün, kavun, karpuz ve birçok süs bitkisinde önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Bu tür, hastalık yaptığı konukçunun familyasına, cinsine ve türüne göre alt gruplara ayrılmıştır. Sadece belli bitki türüne zarar veren formae türlerinin bazı grupları konukçuya özel olup, sadece o konukçuda hastalığa neden olmaktadır. Bazı formae türleri ise birden fazla sayıda konukçuya sahiptir (Armstrong 1950). Örneğin; Fusarium oxysporum f.sp. conglutinans, Cucurbitaceae familyasındaki bitkileri hastalandırırken, Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici sadece domates bitkisinde hastalığa neden olur. Fusarium oxysporum f.sp. melonis Türkiye'de (özellikle Akdeniz bölgesinde) kavunlar üzerinde önemli derecede zarara neden olmaktadır. Fusarium'un kavunlarda meydana getirdiği solgunluk hastalığı Kuzey Amerika, Hindistan, Doğu Asya ve Orta Doğu'da bulunmuştur. Ancak ırkların dağılımı her bölgede aynı değildir (Jacobson ve Gordon 1991). Hastalık belirli zaman aralıklarında ortaya çıkmasına rağmen, oldukça etkili olabilmektedir.

Bitkiler bu patojenden gelişimlerinin her döneminde etkilenebilirler. Tohumlar oldukça ağır zarara uğramış topraklarda ve düşük sıcaklıklarda çimlenmeden önce ölebilirler. Çok genç filizlerde meydana gelen belirtiler, diğer funguslar tarafından oluşturulan çürümeyle karıştırılabilir. Ergin filizlerin kökleri özellikle serin topraklarda çürür. Bazen hipokotilde meydana gelen yaralanmalar sonucu da çürükler görülmektedir. Diğer durumlarda ise, fideler hiçbir belirti olmaksızın solar. Ergin fidelerdeki ilk belirti solgunluk ya da yan dallardan başlamak üzere yaprakların sararmasıdır. Solgunluk çok çabuk meydana gelebilir. Bitki tamamen solmadan önce, gövdenin toprağa yakın kısmında uzun, dar ve kahverengi renkli damarlar görülür. Bitkiler bodur kalabilmektedir. Nemli ortamlarda bitkide oluşan ve ölüme neden olan yaralar, Fusarium sporlarının sarımsı- pembe kültürleri ile kaplanmasına neden olmaktadır. Enfekte olmuş bitkilerdeki meyveler ise olgun dönemlerinde zarar görmekteyler (Synder ve Hansen 1940).

Yetiştirme ortamındaki mevcut hastalık etkenlerini belirlemek için fungus izolasyonu ve patojenite testi yapılır. Bu test için, hastalıklı bitkinin kök ile gövde arasındaki bölgeden konidia ve misel parçalarını içeren örnek alınır. Bu örnekler patates dekstroza agar (PDA) içeren petrilere 27°C'de karanlık odada 7 gün inkübe edilir. Sürenin sonunda her petri 50-100ml distile suda süspanse edilir ve sporların suya karışması sağlanır. Spor yoğunluğu heamocytomer kullanılarak belirlenir. Test için

kullanılan fidelerin kökleri yaklaşık 10^5 konidia/ml'lik süspansiyona batırılır ve steril toprak bulunan ortamlara ekilir. Fideler 22-30°C'lik günlük sıcaklıkta tutulur. Solgunlukla ilgili ilk belirtiler 6-8 gün sonra görülmeye başlar (Wensley ve McKeen 1962). Belirtiler 0-9 arasında belirlenmiş bir skalayla, 24-28 gün boyunca kaydedilir. Bu skalaya göre 0= belirti yok; 1= köklerde kararma başlamış, gövdede belirti yok; 3= köklerdeki kararma ilerlemiş, kotiledonlarda sararma (klorozis) başlangıcı; 5=kökler kararmış, kotiledonlarda ise klorozis belirgin; 7= kökler kararmış ve kotiledonlarda klorozis ve 9= kanser (nekroz) ve bitkinin ölümü (Momol ve Kistler 1992). Kontrol olarak ise spor süspansiyonuna daldırılmamış fideler kullanılmaktadır. Hastalığı indüklemeyen izolatlar iki defadan fazla test edilir ve hastalık oluşturmayan izolatlar avirulant olarak saptanır. Patojenite testi oldukça uzun süren bir testtir. Sonuçların değerlendirilmesi ise kişisel gözlemlere dayanmaktadır.

Melonis ırklarını tesbit etmek için de patojenite testi yapılmıştır. *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*'in dört ırkı bilinmektedir. İrkların isimlendirilmesinde iki farklı metodun kullanılması literatürde karışıklığa neden olmuştur. Fizyolojik ırklar üzerindeki ayrıntılı çalışmalar Fransa'da yürütülmüş ve bugüne kadar dört fizyolojik ırk belirlenmiştir. Bunlar sırasıyla etmenin 1, 2, 3 ve 4 nolu ırkları olarak adlandırılmıştır. Etmenin 1, 2 ve 4 nolu ırklarının önce yapraklarda bir kloroza neden olduğu ve bunu hipokotillerde bir nekrozun izlediği bildirilmiştir. Fungusun 3 nolu ırkı ise bir lezyona neden olmaksızın kesin bir solgunluk oluşturmaktadır (Risser vd 1969).

Fusarium oxysporum f.sp. *melonis*'in kavunlarda neden olduğu solgunluk hastalığı bütün kavun yetiştirilen alanlarda önemli sorun yaratmaktadır. Özellikle bu fungusun taşıyıcıya ulaştıktan sonra oluşturduğu zararın kimyasallarla önlenememesi, hastalığın önemini artırmaktadır. Çünkü patojen bitkinin iletim demetine yerleşmekte ve besinlerin alışverişini önlemektedir. Bu süre içinde de bitki bodur kalıp, kısa süre içinde ölmektedir (Synder ve Hansen 1940). Kimyasallar dışında diğer korunma yöntemleri de denenmiş ancak tam anlamıyla başarı sağlanamamış, hastalığa dayanıklı kavun çeşitlerini yetiştirmenin en etkili kontrol yöntemi olduğu görülmüştür. Dayanıklılık, baskın ve birbirinden bağımsız olarak kalıtılanabilen iki gen tarafından kontrol edilmektedir. Risser ve Mas 1965 yılında *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*'in Fransa'dan elde edilen izolatlarını üç kavun çeşidine karşı gösterdiği reaksiyona göre sınıflandırmıştır. Bu amaçla Charentais I, Doublon ve CM 17187 olmak üzere üç kavun çeşidi kullanılmıştır. Fransız kültürlerinde ırk-1'e dayanıklılığın baskın bir genle sağlandığı bulunmuş ve Risser bu geni Fom1 olarak adlandırmıştır. CM 17187'nin ırk-1 ve ırk-2'ye karşı gösterdiği dayanıklılık dikkate alınarak Fom2 geni tanımlanmıştır.

(Çizelge 1.1). Irk-0, dayanıklılık geni taşımayan Charentais T 'de, ırk-1 Fom1 genine sahip Doublon ve ırk-2 ise Fom2 genini taşıyan CM 17187'de hastalık meydana getirir. Irk-1.2 ise her iki gene sahip kavun çeşitlerinde hastalık oluşturur. Bu nedenle "ırk 1.2 solgunluk" ve " ırk 1.2 sararma " olmak üzere iki suşa ayrılmıştır (Risser vd 1976).

Çizelge 1.1. *Cucumis melo* Ayırıcı Çeşitlerine Göre *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* Irklarının Isimlendirilmesi (Synder and Hansen 1940)

Ayırdedici Çeşitler ve Dayanıklılık Genleri			
F.o.f.sp.melonis Irkları	Charentais	Doublon (Fom 1)	CM 17187 (Fom 2)
Irk-0 (1)	S	R	R
Irk-1 (2)	S	S	R
Irk-2 (3)	S	R	S
Irk-1.2 (4)	S	S	S

S: Duyarlı
R: Dayanıklı

Toprakta mevcut olan bu ırklar çalışanlar, rüzgar ve araçlar aracılığıyla kolaylıkla taşınabilmektedirler. Hem taşıyıcı hem de taşıyıcı olmayan dokularda yaşayabilir, koloni oluşturabilir ve diğer toprak funguslarıyla başarılı bir şekilde yarışabilirler. Hastalıklı bitki yakınındaki toprak yüzeyinde popülasyon seviyesi oldukça fazladır. Etmen kök uçlarından ve korteksteki yarıklardan girmektedir. Belirtiler duyarlı çeşitler için 3-5 günde, dayanıklı çeşitler için 11-16 günde görülebilmektedir. Hastalığın gelişimi düşük Ca (Kalsiyum) ve K (Potasyum), yüksek N (Azot) ile artırılabilir. Yüksek N seviyesi meyvenin duyarlılığını ve yüksek K seviyesi ise bitki kökleri etrafındaki fungusların rekabet aktivitesini arttırmaktadır.

Kontrol için hastaliksız bitkilerden elde edilen tohumları kullanmak, iki yıl hiç kavun yetiştirmemek, fungusid kullanmak denenmiş, ancak dayanıklılığın en önemli faktör olduğu bulunmuştur (Synder ve Hansen 1940). Çeşit-ırk ilişkisiyle ilgili sorunlar kontrol, epidemiyoloji ve kavun ıslahı açısından önem kazanmaktadır. Dayanıklı kavun türlerinin seçilmesi için de topraktaki mevcut ırkın tesbit edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla günümüzde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

1.1. Irk Ayırımında Kullanılan Yöntemler

1.1.1. Morfolojik yöntemler

Morfolojik belirleyicilerin birkaçı yaygın olarak kullanılmasına rağmen, funguslardaki kullanımı nadirdir. Morfolojik belirleyiciler laboratuvar çalışmalarında faydalı olmalarına karşın, doğal populasyonlarda kullanılmaları yaygın değildir. Sınırlı sayıda allele ve genellikle zıt fenotipik etkilere sahiptirler. Örneğin; Cochliobolus heterostrophus (Fry vd 1984) ve Magnaporthe grisea (Chumbley vd 1986)'nın renginde meydana gelen mutasyonlar, patojeniteyi azaltmıştır. Bu nedenle morfolojik belirleyicilerin patojenite üzerine olan etkileri, doğal ortamlardan elde edilen izolatları tanımlamada kullanmadan önce dikkatle denenmelidir (Michelmore ve Hulbert 1987)

1.1.2. Vegetative Compatibility Grouping (VCG)

Fusarium türlerinin bir kısmında eşeyli üreme evresi bilinmemektedir. Genetik alışverişteki bu eksiklik paraseksüel döngü ile giderilmiştir (Leslie 1992). Bu cins içinde yer alan türlerin doğal izolatlarındaki heterokaryon oluşumunun önemi ve taksonomik sınıflamada heterokaryotik kültürlerin etkisi tam olarak belirgin değildir (Buxton 1962). Eşeysiz olarak genetik değişikliğin meydana gelmesi heterokaryon oluşumuna bağlıdır. Heterokaryon oluşturmayan lokuslar (yaygın olarak het., tol., vc. ya da vic) ve mekanizmalar da fungus biyolojisinin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır (Perkins 1975). Belirtilen lokusların hepsinde farklılığa sahip olan bazı türlerin suşları heterokaryon oluşturamazlar. Bu tip uyumsuzluk **heterojenik uyumsuzluk** olarak adlandırılmaktadır.

Heterokaryon oluşumu Fusarium türlerinde çalışılmış ve aynı formae specialis yada irka ait olan izolatların genetik ilişkilerini belirlemek için kullanılmıştır (Katan ve Katan 1988). Genetiksel olarak ayrımı yapılmış eşeysiz populasyonlarda tanımlanan bu ilişki **vegetatif compatibility grouping (VCG)** olarak adlandırılmıştır. Aynı VCG'a ait olan izolatlar vejetatif olarak birbirlerine uygundur, heterokaryon oluşturabilirler (Corell vd 1987). Bosland ve Williams Fusarium oxysporum izolatlarında izoenzim bantları, VCG ve patojenite arasında ilişki olduğunu göstermiştir (Bosland ve Williams 1987). VCG tanımlanmasındaki en büyük engel, izolatlar arasındaki uygunluğun belirlenmesidir. Çünkü mikroskopik çalışmalar hifler arasında kaynaşmayla meydana gelen anastomosisin belirlenmesinde tek başına yeterli olmamaktadır. Bu çalışmalarda protoplast kaynaşmasından çok, hiflerin anostomosisini takip ederek oluşan heterokaryonları kullanmak daha faydalı olmaktadır.

VCG gruplarından yararlanılarak Fusarium oxysporum f.sp lycopersici ırklarının orijininin belirlenmesi (Elias ve Schneider 1991), Fusarium oxysporum f.sp apii'nin tanımlanması (Corell vd 1986), Fusarium oxysporum f.sp melonis (Jacobson ve Gordon 1988) ve Fusarium oxysporum f.sp cubense izolatlarının ırk analizi (Ploetz 1988) yapılmıştır. VCG tanımlanması için geliştirilen modellerden yararlanılarak, formae türleri yada ırklar arasındaki genetik yakınlık belirlenmiştir (Kistler ve Momol 1992). Genellikle her ırk yada forma türleri bir yada birkaç VCG'a dahil olabilir (Leslie 1992). Bu nedenle vejetatif uyumsuzluk, gruplar arasındaki farklılığı açıklayan fakat farklılığın mesafesini ölçemeyen, tam anlamıyla nitel bir özelliktir (Michelmore ve Hulbert 1987)

1.1.3. Moleküler yöntemler

Genomdaki bazı bölgeleri işaretlemek için kullanılan DNA segmentlerine **işaretleyici (marker)** denir. İşaretleyiciler populasyondaki çeşitliliği belirlemek, evrimsel açıdan benzerlik ve farklılıkları ortaya çıkarmak amacıyla kullanılmaktadır.

Moleküler işaretleyicilerin avantajları şunlardır :

- a) Çok sayıda işaretleyici tanımlanabilir (Örneğin; İzoenzimler, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism , RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), mtDNA (Mitokondriyal DNA), plazmidler).
- b) Çoğu kodominanttır (heterozigot homozigottan ayrılabilir); mümkün olan bütün genotiplerin belirlenmesine izin verirler.
- c) Genellikle sağlığa zararlı değildirler yada güçlü epistatik etkileri yoktur.
- d) Moleküler lokusların genotipleri her dokudan elde edilebilir.
- e) Bazı işaretleyiciler için sayısız alleller bulunabilir.

Moleküler genetik işaretleyiciler son yıllarda genetik akrabalığın ve çeşitliliğin analizi için güçlü bir araç olarak gelişmiş ve gerek davranış ekolojisinde, gerek populasyon biyolojisindeki çalışmalar için ortak bir öneme sahip olmaya başlamıştır. Örneğin; DNA fingerprinting tekniği akrabalık ilişkilerinde onaylanan özelliklerin bir çoğunu tamamen değiştirmeye başlamıştır (Michelmore ve Hulbert 1987).

Bu teknolojik gelişmeler iki önemli olguyu belirlemiştir:

1. Her çalışmada harcanan emektteki artışı,
2. Kolay, pratik ve az masraflı çalışmaların yapılması (Hadrys vd 1992).

Son zamanlarda ise Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR)'a dayalı genetik işaretleyiciler kullanılmaya başlanmıştır. Bu işaretleyicilerin özelliğine geçmeden önce PCR'ın çalışma ilkesine bakmak gerekir.

1.1.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR)

In vitro koşullarda nükleik asitlerin enzimatik olarak çoğaltılmasıdır (amplifikasyon). Reaksiyonun özelliğini kullanan sentetik primerler belirlemektedir. Çoğaltma için kalıp DNA, primer yada primerler, *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq polimeraz enzimi, dNTP'ler (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), tampon, Mg^{+2} ve PCR makinası gereklidir. Reaksiyon çift iplikli DNA'nın ayrılması (denatürasyon), sentetik oligonükleotidlerinin her bir DNA ipliğine bağlanması (annealing) ve bağlanan primerlerin DNA polimeraz enzimi ile ikinci DNA ipliğini sentezlemeleri (extension) prensiplerine dayanmaktadır. Üç basamak (denatürasyon, annealing ve extension) tek bir PCR döngüsünü belirlemektedir. Her basamak ise farklı sıcaklıklarda meydana gelmektedir. DNA ipliklerinin ayrılması 94-98°C arasında, primerlerin DNA ipliğine bağlanması 37-65°C arasında ve ikinci DNA ipliğinin sentezlenmesi 72°C'de gerçekleşmektedir. PCR çift yada tek iplik DNA'nın çoğaltmasında kullanabildiği gibi, RNA'nın çoğaltılmasında da kullanılmaktadır (Erlie vd 1991).

1.2. Moleküler İşaretleyiciler ve Özellikleri

1.2.1. İzoenzimler

Son yıllarda geliştirilen işaretleyicilerden birisi de, bitki ve hayvan dokularındaki çeşitli özel enzimlerin çahşılması için geliştirilen izoenzim analizidir. Protein ekstraktları nişasta yada poliakrilamid jel elektroforezinde ayrılır. Jelde özel enzim aktivitesine sahip zonların ayrıldığı gözlenir. Aminoasit kompozisyonundaki değişiklikler ve yükündeki etki, enzimin elektroforetik alandaki hareketini değiştirebilir. Özel substratlara sahip olan enzimler için verilerin genetik yorumu basittir. Birçok banta sahip olan enzimlerin genetik yorumu çok kompleks olabilir. Ayrıca ekstraksiyon ve tampon sistemleri için ihtiyaç duyulan optimal şartların belirlenmesi her enzim için sağlanamayabilir. Fungal çalışmalarda ise diğer ökaryotlara göre daha az enzim sistemi kullanılmıştır (Michelmore 1987).

1.2.2. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) metodu

1970'lerde bakterilerden DNA restriksiyon enzimlerinin saflaştırılarak, DNA'nın *in vitro* olarak modifikasyonunda kullanılması, RFLP teknolojisinin ilk adımı sayılmaktadır. Restriksiyon enzimleri DNA'yı 4-8 bazlık bir bölgeden tanıyarak kesmektedir. Kesim bölgesinin dizisi değişik restriksiyon enzimlerine göre farklılık göstermektedir. Ancak bu dizi herhangi bir şekilde değişime uğradığında restriksiyon enzimi daha önce kesim yaptığı bu noktayı tanıyamamakta ve bunun sonucunda da kesilen segmentlerin uzunluğunda farklılıklar meydana gelmektedir. Segmentlerdeki uzunluk farklılığı genellikle yakın taksonomik birimlerde daha az, uzak birimlerde daha fazla olmaktadır (Beckman vd 1983, Jacobson ve Gordon 1991). Elde edilen DNA fragmentleri agaroz jelde birbirinden ayrılır, Dna iplikçikleri ayrılır ve işaretli DNA hareketsiz bir filtreye aktarılır. İşaretli DNA probu ile hibrit oluşturulur, otoradyografi yapılır. Elde edilen bantların sayısı proba homolog bölgelerin sayısına bağlı olmaktadır. Çok sayıda bölge meydana çıkarıldığında, bunların ayırımını yapmak izoenzimlerle yapılan ayırmadan daha güç olmaktadır. RFLP tekniğiyle *Fusarium* formae türlerinin ayırımı yapılmıştır (Manicom vd 1987)

RFLP ve izoenzim analizleri farklı teknik sınırlamaya sahiptir. RFLP tekniğinin uygulanması oldukça zaman almaktadır. Buna karşın izoenzim analizi için ihtiyaç duyulan protein izolasyonu daha güçtür. Bir defa izole edilen DNA sabittir ve birçok defa kullanılabilir. Ancak DNA'nın çok fazla miktarda eldesi ve kontamine olmaması gerekmektedir (Waugh ve Powell 1992). İzoenzim analizinde ise her çalışma için yeni protein izolasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır.

1.2.3. Mitokondriyal DNA (mtDNA) ve Plazmidler

Funguslarda anostomosisi ortaya çıkarmak, eşeyliği çalışmak, sitoplazmik kalıtım ya da formae türlerini karakterize etmek için kullanılmaktadır. mtDNA'sının saflaştırılması kolay olduğu gibi, oldukça fazla sayıda kopyası vardır (Michelmore 1987). Küçük ve dairesel olan mtDNA'sı restriksiyon enzimleriyle kesildiğinde basit bantlar oluşmaktadır. Bu bantlar formae türleri arasında oldukça iyi korunmuştur. Fakat farklı formae türleri arasında oldukça farklıdır (Kistler vd 1987). Bu özellik de mtDNA'sının, hem suşların sitoplazmik genomu için genetik işaretleyici olarak hem de formae türleri arasındaki ilişkinin çalışılmasında bir araç olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Ayrıca populasyonlar arasındaki genetik değişikliği belirlemek için de mtDNA'sı kullanılmıştır (Avisé ve Lansman 1983).

Bazı fungus türlerinin izolatları mitokondryial plazmid taşımaktadır. Funguslar arası farklılık bu tür plazmidlerin varlığı ile saptanabilmektedir. Bu plazmidlerin ise mitokondri genomuna homolojisi yoktur veya azdır (Devos 1992). Ayrıca patojenitenin çekirdek tarafından şifrelenen bir özellik olduğu ve plazmidlerin ise patojeniteyi ya da konukçuyu belirlemede etkili olmadıkları belirtilmiştir (Momol ve Kistler 1992).

1.2.4. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) metodu

RAPD teknolojisi 1990'lı yılların başında gelişmeye başlamış ve kısa sürede oldukça geniş bir kullanım alanı bulmuştur (Welsh vd 1990, Tingey vd 1992). Bu teknik rastgele (random) sentezlenen primerlerle, DNA'nın çoğaltılmasına bağlı deneylerde nükleotit dizisindeki çeşitliliği (polimorfizmi) belirlemektedir. Kullanılan tek primer kalıp DNA'nın karşı ipliğindeki farklı iki bölgeye bağlanmaktadır. Eğer bağlanma bölgeleri birbirlerinin çoğaltma aralığında bulunuyorlarsa, farklı DNA ürünleri meydana gelmektedir. Her çoğaltma ürünü genomik DNA ve primer arasındaki tam yada kısmi sekans homolojisini belirlemektedir.

RAPD analizi kavramsal olarak basittir. Total genomik DNA'nın ng (nanogram) olarak miktarı, rastgele sentezlenen kısa oligonükleotidlerle, PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Çoğaltma şartları standart PCR şartlarından farklıdır. Çünkü sadece bir tane primer kullanılmaktadır. Genomun analizi için sekans bilgisine ihtiyaç yoktur, uygulanması oldukça kolay ve çabuktur (Williams vd 1992).

1.2.4.1. RAPD'in uygulama alanları

1. Populasyon genetiği: RAPD işaretleyicileri hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmalarda sınıflandırmaya dayalı ilişkilerin ve bireylerin teşhisinde kullanılmaktadır. Analiz, bireyler arasındaki eşit moleküler ağırlıklı RAPD bantlarının varlığına bakılarak yapılmaktadır.

Moleküler karakterlerin farklı taksonomik düzeylerde teşhisi, farklı oligonükleotidlerin kullanılmasıyla yapılmaktadır. Kullanılan her primer için RAPD çoğaltma ürünleri iki grup içinde incelenmektedir: Değişken olanlar (polimorfik) ve değişken olmayanlar (nonpolimorfik). RAPD'in değişkenliği ya primerin bağlanma bölgesini değiştiren nükleotit değişikliğinden ya da çoğalan bölge içindeki delesyon ve insersiyondan dolayıdır. Polimorfizm ise tek bir lokusun amplifikasyon ürününün varlığı ya da yokluğuna bakılarak belirlenmektedir. Bu durum RAPD işaretleyicilerinin sadece

başkan (dominant) işaretleyicileri ortaya çıkardığını göstermektedir. Örneğin, bir tür içindeki birkaç bireyin ve bir cins içindeki birkaç türün RAPD analizini göz önünde bulunduralım. Tür içindeki bireyler arasında polimorfik olan bantlar teşhis edilebildiği gibi, değişmeyen özellikteki bantlar da tanımlanabilir. Tür düzeyinde değişken özellikte olan bantlar (bant türün bütün üyeleri arasında değişmezse) bu türdeki bireyleri tanımlamada kullanılmaktadır (Tingey vd1992).

2. Genetik haritalama: Genetik haritalar canlıların kromozom yapıları, genlerin işlevleri ve o bireyin genel karakterleri arasındaki ilişkinin daha iyi bilinmesine olanak sağlamaktadır. Pratikte RAPD işaretleyicileri ilk olarak bu alanda kullanılmıştır. Carlson vd (1991) ve Chaparro vd (1992) coniferler için gerçekleştirdikleri genetik haritalamada, RAPD işaretleyicilerinin hızlı ve güvenilir olduğunu göstermişlerdir.

3. Genetik çeşitliliğin belirlenmesi: Genetik işaretleyiciler bir populasyondaki bireyler arasındaki farklılık düzeylerini yada değişik populasyonlar arasındaki farklılıkları daha güvenilir biçimde ortaya çıkarmaktadır. Morfolojik karakterleri benzer olan organizmalar aynı gruba konmakla birlikte, bunlar arasında bir yada birkaç gen bakımından farklılıklar bulunabilmektedir. Küçük gibi görünen bu farklılıklar önemli bir hastalığa karşı dayanıklılığı belirleyen bir gen olması halinde önem kazanmaktadır.

Moleküler işaretleyicilerle yapılan çalışmalarda, DNA polimorfizminin PCR yardımıyla ortaya çıkarılması esnasında karşılaşılan güçlükleri ortadan kaldırmak için, 5-mer ile 10-mer arasında değişen, belli bir amaca yönelik olmayan primerler kullanılmaktadır. Elde edilen bantlar poliakrilamid yada agaroz jel elektroforezi yardımıyla saptanmaktadır. Bu kriterler yardımıyla RAPD işaretleyicilerinin belirlenmesi için iki modifikasyon tanımlanmıştır: DNA Amplification Fingerprinting (DAF) ve Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) AP-PCR'da 20-34 oligonükleotid uzunluğunda primerler kullanılır, çoğaltma ürünleri radyoaktif olarak işaretlenmekte ve poliakrilamid jel ile ayrılmaktadır. DAF'de ise 5-8 oligonükleotidlik kısa rastgele primerler kullanılmaktadır. PCR ürünleri poliakrilamid jel elektroforezi ve gümüş boyama yardımıyla belirlenmektedir. Kullanılan kısa rastgele primerler DNA ipliğindeki özel birçok bölgeye bağlanmaktadır. DAF ile oluşturulan çoğaltma sadece belli bir amaca yöneliktir, fakat rastgele değildir.

DAF fingerprint ile oluşturulan bantlar iki kategoriye ayrılmaktadır: Filogenetik olarak korunmuş bantlar ve bireye özel bantlar. Primerin bağlandığı bölgeler kalıp DNA boyunca rastgele dağılmıştır (Caetano-Anolles vd 1991). Çoğaltma süresince birçok

faktör kısmi DNA bölgelerinin yeterli olarak artırılmasına izin vermektedir. Bu faktörler primer-kalıp eşleşmesinin lokalizasyonunu, sayısını, çeşitli bağlanma ve uzama sıcaklıklarının stabilizasyonunu ve polimerazın primer-kalıp eşleşmelerini tanıyabilmesindeki etkinliği kapsamaktadır. Primer uzunluğu, primer ve kalıp yapısı, reaksiyon koşulları gibi diğer faktörler primer-kalıp oluşumunu etkileyebilmektedir. Bu nedenle çoğaltma şartlarının optimize edilmesi önemlidir. Fusarium'un tür, formae türleri ve ırk seviyesinde ayrımı zordur (Manicom vd 1990). Birçok özelliğin göz önünde bulundurulması gerekmektedir (Windels 1991). Bu amaçla protein ve DNA (Kistler vd 1987, Manicom vd 1990, Peterson, 1991, Kim vd 1992) düzeyinde birçok farklı metot kullanılmıştır. Yukarıda da belirtildiği gibi en etkili işaretleyiciler moleküler düzeyde elde edilenlerdir. Özellikle son yıllarda ırk düzeyinde yapılan çalışmalarda mitokondri, ribosomal ve genomik DNA ile yapılan RFLP analizlerinin yanında, rastgele sentezlenen primerlerinin kullanıldığı PCR'a bağlı RAPD analizinden de yararlanılmaya başlanmıştır. Fungusların ırk ayrımı için yapılan çalışmalarda daha güvenilir, ucuz, hassas ve çabuk olan sonuçlar alınmaya başlanmıştır. Fusarium solani f.sp. cucurbitae'nin iki ırkı arasındaki ayrımı yapmak için RAPD işaretleyicilerinden yararlanılmış türe ve ırka özel problemlerin elde edilebileceği gösterilmiştir (Crowhurst vd 1991). Fusarium oxysporum f.sp. pisi'nin ırkları arasındaki genetik ilişkinin rastgele sentezlenen primerler kullanılarak açıklanabileceği ve bir ırkın diğerlerinden ayırt edilebileceği gösterilmiştir (Grajal-Martin vd 1993). Patojen ve patojen olmayan izolatların ayrılmasında, patojenite testinin çok zaman alması nedeniyle son yıllarda moleküler işaretleyiciler kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla Fusarium oxysporum f.sp. dianthi izolatlarının ayrımında rastgele sentezlenen primerlerin yardımıyla elde edilen işaretleyicilerden yararlanılmıştır (Manulis vd 1994). Aynı amaçla Fusarium oxysporum f.sp. ciceris izolatlarının patojenite özelliklerinin belirlenmesinde de moleküler işaretleyicilerden yararlanılmıştır (Kelly vd 1994). Özellikle son yıllarda izolatlar arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesinde, moleküler işaretleyicilerin verdiği sonuçlardan yararlanılarak dendrogram analizleri gerçekleştirilmektedir. Dendrogramlar aynı moleküler büyüklükte olmayan grupların aritmetik ortalamasının kullanılmasıyla elde edilmektedir (Li 1981). Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum izolatlarının ırk ayrımının yapılmasında rastgele elde edilen işaretleyicilerin verdiği sonuçlarının yardımıyla sınıf analizi yapılmıştır (Assigberse vd 1994).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

Çalışmada kullanılan *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*'in dört ırkı; ırk-0, ırk-1, ırk-2, ırk-1.2 Fransa'dan (S Maden) ve Amerika Birleşik Devletleri'nden; A-12(ırk-0), Q-1(ırk-1), B-2(ırk-2), A-15(ırk-1.2) (J. Gordon, University of California, Berkeley) sağlandı.

2.1.1. Kültürlerin hazırlanması

Kültürler yaklaşık 10 gün boyunca 24°C'de gün ışığında patates dekstroz agar (PDA) da kültüre alındı. Tek spor kolonilerinden elde edilen spor süspansiyonu, 50ml patates dekstroz broth (PDB) içeren erlen mayerlere aşıl原因arak, 27°C'ye ayarlanmış yüksek hızdaki çalkalayıcıda (170 rpm) 6 gün üretildi.

2.1.2. Primerlerin sentezi

8-mer ve 10-mer'den oluşan 14 adet primer rastgele düzenlenerek (Çizelge 2.2) DNA sentezleyici aracılığıyla (Cyclone plus DNA Synthesizer, Millipore Co., Marlborough, MA) sentez edildi. Elde edilen primerlerin miktarını tayin etmek için UV spektrofotometre kullanıldı.

2.2. Metot

2.2.1. DNA eldesi

PDB'da çoğaltılan kültürler 50ml'lik steril santrifüj tüplerine aktararak 13000xg'de 5dk santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı faz uzaklaştırıldı. Çökelti, 2ml'lik eritici tampona (50mM EDTA, 5 mM Tris-HCl, % 2 SDS) ilave edilerek 65°C'de 1saat bekletildi. (1:1) oranında hazırlanan fenol:kloroformdan eşit miktarda tüplere ilave edilerek 13000xg'de 5dk santrifüj edildi. Üst faz temiz ependorf tüplerine aktararak (24:1) oranında hazırlanan kloroform:izoamilalkol eklendi. Tüpler iyice karıştırıldı ve yeniden 13000xg'de 5dk santrifüj edildi. DNA'yı içeren üst faz alınarak temiz ependorf tüplerine aktarıldı ve hacmin üç katı kadar %100'lük etil alkol eklendi. Oda sıcaklığında 20dk'lık beklemeyle DNA'nın çökmesi sağlandı. Çökme sonunda örnekler 13000xg'de 20dk. santrifüj edildi. Santrifüjden sonra oluşan çökelek %70'lik soğuk etil alkol ile

yıkılarak, oda sıcaklığında kurutuldu. Çökelek TE'de (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH.8) çözüldü ve araştırmada kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi. Spektrofotometreyle DNA'nın miktarı belirlendi (Raeder ve Broda 1985).

Yararlanılan diğer izolasyon tekniği ise aşağıda açıklanmıştır: Katı ortamda (PDA) yetiştirilen kültürlerin miselyumları spatula yardımıyla toplandı ve soğuk havanda toz haline getirildi. Tartılan miselyuma her gram için %2'lik (ağırlık/hacim) hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB; 100mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20mM EDTA) izolasyon tamponu eklenmiştir. İyi karıştırılan örnekler 55°C'de 20dk bekletildi ve sonra 15000xg'de 5dk santrifüj edildi. Oluşan üst faz alınarak 1 hacim kloroform:izoamilalkol (24:1) eklendi ve 2dk yavaşça karıştırıldı. 15000xg'de 5 dk santrifüjden sonra tekrar üst kısım toplandı ve 1/10 hacim 7.5M amonyum asetat, 2 hacim soğuk %100'lük etanol eklendi. Örnekler -20°C'de 1saat DNA'nın çökmesi için bekletildi. 15000xg'de 5dk santrifüjden sonra elde edilen çökelek en az iki defa %70'lik etanolle yıkandı ve oda sıcaklığında kurutularak yaklaşık 200 µl TE 'de çözüldü (Graham vd 1994).

2.2.2. DNA'nın çoğaltılması

Her çoğaltma reaksiyonu kalıp DNA (25 ng), bir primer (15µM), MgCl₂ (4mM), 5 unite Stoffel Taq polimeraz (Perkin Elmer Cetus, Norwalle, CT), 2.5µl dNTP karışımı (dATP, dCTP, dGTP, dTTP' den 200mM) ve 2.5µl 10x Stoffel reaksiyon tamponundan (10mM KCl ve 10mM Tris-HCl) oluşmak üzere toplam 25µl' den oluştu. Karışıma, buharlaşmayı önlemek için 25µl mineral yağ eklendi. Amplifikasyon Hybaid ısı reaktör (National Labret Co., Woodbridge, NJ) kullanılarak 4°C'de gerçekleştirildi. Amplifikasyon şartları ise şöyledi: 96°C'de 10dk, bundan sonraki 35 döngü ise 96°C'de 5 sn., 45°C'de 20 sn., 72°C'de 30 sn ve 72°C' de 1 dk

Çizelge 2.2.2. Kullanılan Primerlerin Kodları, Sekansları, %G+C Miktarı ve Oluşturdukları Bant Sayısı

Kod	Sekans (5'-3')	%G+C Miktarı	Oluşan Bant Sayısı
AU-8B	GTAACGCG	63	9
AU-8C	CGCACACG	75	10
AU-8E	ATGGATGC	50	11
AU-8H	CAGGAATT	75	14
AU-8L	GCCGAGCT	75	15
AU-8N	GCGGACAG	75	16
AU-8O	GACCACCA	63	17
AU-8S	ACGGGTGC	75	15
Op-2	CCGAGCTG	75	15
Op-3	TCAGCCAC	63	12
Op-5	GGGTCTTG	63	18
AU-10S	ATACGGGTGC	60	14
OPF-05	CCGAATCCC	60	13
OPF-10	GGAAGCTTGG	60	20

2.2.3. DNA elektroforezi

DAF çoğaltma ürünleri 0.5mm kalınlığında %5'lik poliakrilamid jel kullanılarak ayrıldı. Toplam 2.5ml olan jel 2gr üre, 350µl 10x TBE (100mM Tris-HCl, 83mM Borik asit, 1mM Na₂EDTA, pH 8.0), 500µl %40'lık poliakrilamid çözeltisi ve 1.5µl steril sudan oluştu. 4µl'lik amplifikasyon ürünü 3.5µl'lik yürütme çözeltisi (%0.25 bromfenol mavisi, %0.25 xylene cyanol FF ve %40 sukroz) ile karıştırıldı ve jele yüklendi. Elektroforez yürütme tamponu olarak 1xTBE kullanıldı. Elektroforez, öndeki boya (xylene cyanol) jelden ayrılıncaya kadar 105 voltta gerçekleştirildi.

2.2.4. Gümüş boyama (Silver Staining)

Bassam vd (1991) tarafından geliştirilen gümüş boyama metodu kullanıldı. Tek fark olarak bantların belirginliği için 10 defa fazla Na₂S₂O₃ (% 0.4) kullanıldı. Jeller %7.5'lik asetik asitte 10dk sabitleştirildi, 3 defa distile su ile yıkanarak gümüş çözeltisinde (% 0.1 AgNO₃ ve % 0.056 HCOOH) 20dk tutuldu. Tekrar distile su ile yıkanan jel, bantların belirginliğini sağlayan solüsyonda (%3 Na₂CO₃, %0.056

HCOOH ve %0.4Na₂S₂O₃) bantlar görülmeye başlayıncaya kadar tutuldu. Bantlar belirgenleşince %7.5'luk asetik asit ile reaksiyon durduruldu. Boyanan jeller, elektroforez filmleri üzerinde kurutulularak bantların sayısı saptandı.

2.2.5. Restriksiyon enzimlerle kesme

PCR reaksiyonundan sonra elde edilen çoğaltma ürünleri restriksiyon enzimleriyle kesildi. Reaksiyon 7µl PCR ürünü, 2µl enzim ve 1µl tampon olmak üzere 10µl'den oluştu ve 37°C'de 4 saat bekletildi. Oluşan ürünler tekrar poliakrilamid jel ve gümüş boyama ile kontrol edildi

2.2.6. Sonuçların değerlendirilmesi ve analizi

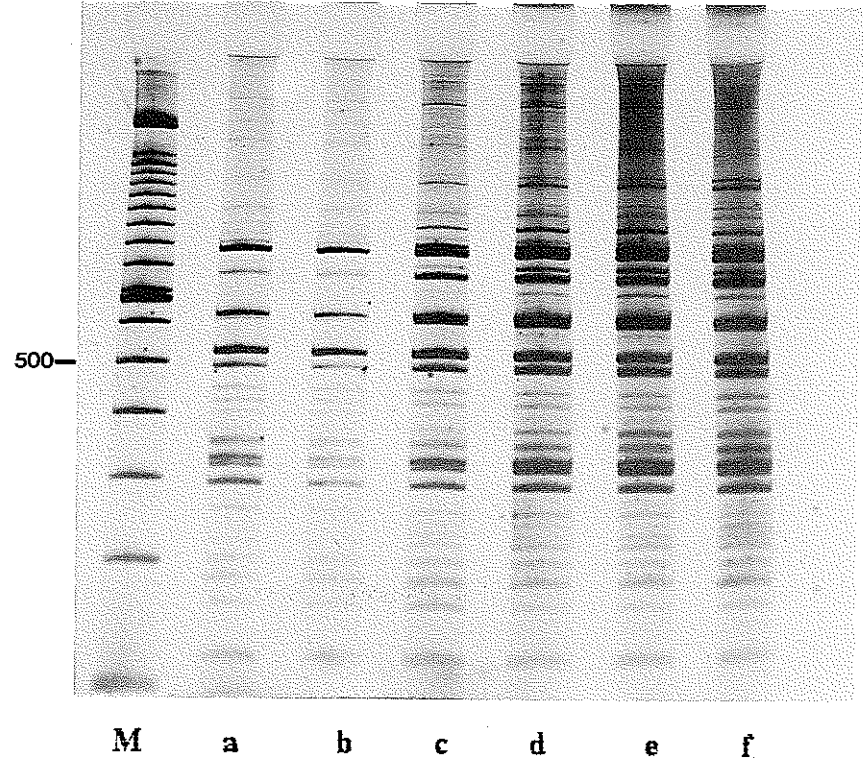
Her primer tarafından oluşturulan, belirli moleküler ağırlığa sahip bantların olması 1, olmaması ise 0 olarak gösterildi. Bütün ırklar için denenen 14 rastgele sentezlenen primer (yeniden üretilebilen ve polimorfik bantlar veren) tarafından oluşturulan bantlar biraraya getirildi ve NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) bilgisayar programının 1.70 uygulamasına (Applied Biostatistics) aktarıldı (Rohlf 1988). Veriler Jaccard'ın benzerlik katsayısını elde etmek için, SIMQUAL (Similarity for Qualitative Data) kullanılarak analiz edildi. Elde edilen benzerlik katsayısı ve UPGMA (Unweighed Pairgroup Method with Arithmetic Average) yardımıyla dendrogram oluşturuldu.

3. BULGULAR

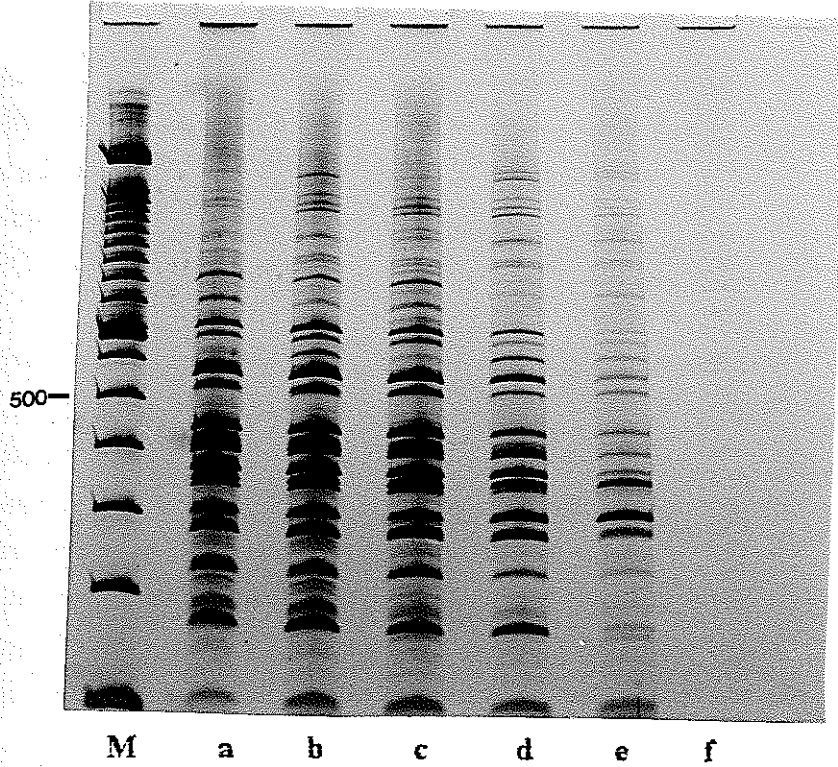
DAF (DNA Amplification Fingerprinting) virüsler, bakteriler, funguslar, bitkiler ve hayvanlar arasında bireylerin tanımlanması, haritalama, bireyler ya da gruplar arasındaki ilişkilerin belirlenmesi, genetik çeşitlilik ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan moleküler yöntemlerden birisidir. PCR'a bağlı olup, her reaksiyonda sadece bir tane 8-mer ya da 10-merlik rastgele sentezlenmiş primerle çoğaltma oluşturulmaktadır. Çoğaltma ürünleri ise poliakrilamid jelde ayrılır ve gümüş boyama ile bantlar görülür. PCR'a bağlı diğer tekniklere göre basit, hızlı, duyarlı olup; DNA sekansının bilinmesine gerek yoktur. DAF protokolünde belirli bantların tekrarlanabilirliği ve bantların ayırımı önemli iki faktördür. Sözü geçen bu iki faktör, kullanılan DNA'nın saflığı ve miktarından büyük ölçüde etkilenmektedir. Ayrıca reaksiyonda kullanılan solüsyon ve enzim konsantrasyonu, PCR programı da çoğaltmayı etkilediğinden, reaksiyondan önce optimizasyonun sağlanması gerekmektedir.

Bu çalışmada Fusarium oxysporum f.sp. melonis ırkları moleküler yöntemle analiz edildi. İlk olarak DAF parametrelerinin optimizasyonu sağlandı ve ırklar arasındaki genetik benzerlik NSTYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) bilgisayar programı kullanılarak belirlendi. Çalışmada kullanılan DNA'nın saflığını karşılaştırmak ve jelde gözlenen bantların tekrarlanabilirliğe olan etkisini göstermek amacıyla, katı ve sıvı ortamlarda yetiştirilen kültürlerden iki farklı metodla DNA izolasyonu yapıldı. Her iki ortamın DNA izolasyonu için uygun olduğu, ancak miselyum-spor karışımının elde edilmesinin katı ortam kullanıldığında daha kolay olduğu gözlemlendi. Yaklaşık 200mg miselyum-spor karışımından, 10µg DNA elde edildi. Optimum DNA miktarının belirlenmesi amacıyla değişik konsantrasyonlardaki ırk-2 DNA'sı AU-8S (5'-ACGGGTGC-3') primeriyle çoğaltıldı (Şekil 3.1). Oluşan çoğaltma ürünlerine göre 25ng DNA'nın, diğer konsantrasyondaki DNA'lara göre daha iyi amplifikasyon oluşturduğu gözlemlendi. Şekil 3.1'de görüldüğü gibi DNA konsantrasyonunun artması özel olmayan amplifikasyona neden oldu ve sadece genel bantlar gözlemlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda amplifikasyon için 25ng DNA konsantrasyonu kullanılmasına karar verildi. Her izolasyondan sonra DNA konsantrasyonu spektrofotometrik olarak ölçüldü ve 25 ng/µl olarak seyreltildi. İki izolasyondan elde edilen DNA ile ayrı PCR şartlarında gerçekleştirilen çoğaltma sonunda, aynı DAF bantları elde edildi. Denemeler sırasında diğer parametreler sabit tutuldu.

Bunların yanısıra primer ve $MgCl_2$ konsantrasyonu, kullanılan primerler de önemli olmakla birlikte, kontrol edilmesi kolaydır. Uygun $MgCl_2$ konsantrasyonunu belirlemek için 1-6mM arasındaki altı farklı $MgCl_2$ konsantrasyonu denendi. Amplifikasyon için A-15 ve AU-8N (5'-GCGGACAG-3') primerlerinden yararlanıldı. $MgCl_2$ konsantrasyonunun artması yada azalması yavaş artan bantların yok olmasıyla sonuçlandı. Oluşan çoğalma ürünlerine göre 25 μ l reaksiyon için, 4mM $MgCl_2$ konsantrasyonunun uygun olduğuna karar verildi (Şekil 3 2;c).



Şekil 3.1. Farklı DNA Konsantrasyonlarının (5-200ng) *Fusarium oxysporum* f.sp.melonis' in DAF Bantlarına Olan Etkisi. Irk-2 DNA'sının 5'-ACGGGTGC-3' Primeriyle Oluşturduğu Çoğalma
M: 100bp Marker, a: 200ng, b: 150ng, c: 100ng, d: 50ng, e: 25ng, f: 5ng Irk-2 DNA'sı.



Şekil 3.2. Farklı $MgCl_2$ Konsantrasyonlarının (1-6 mM) *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*'in DAF Bantlarına Etkisi. A-15 DNA'sının 5'-GCGGACAG-3' Primeriyle Oluşturduğu Çoğalma
M: 100bp Marker, a: 6mM $MgCl_2$, b: 5mM $MgCl_2$, c: 4mM $MgCl_2$, d: 3mM $MgCl_2$, e: 2mM $MgCl_2$, f: 1mM $MgCl_2$

Çalışmada kullanılacak primerleri belirlemek amacıyla primer koleksiyonundan 6-mer,8-mer ve 10-merlik 40 tane rastgele sentezlenmiş primer seçilerek iki ırk (ırk-1.2 ve A-12) için DAF gerçekleştirildi. 6-merlik olan primerler çoğalma ürünü vermedi. 10-merlik primerlerden, tekrarlanabilen özellikte bant oluşturan üç primer ve 8-mer olan primerlerden ise onbir tane seçildi. Bu sonuçlara göre fazla sayıda, tekrarlanabilir özellikte bant oluşturan ve G+C içeriği %50-75 arasında olan 14 primer seçildi. Çalışmada kullanılan primerlerin kodları ve sekansları Çizelge 2.2.2'de görülmektedir. Diğer primerler ise ya çoğalma oluşturmadi ya da çok zayıf ürünler meydana getirdi. Aynı zamanda reaksiyonda kullanılan primer/DNA oranının da önemli olduğu ve en uygun oranun 5/10 olduğu belirlendi. Bu sonuca bağlı olarak primerlerin konsantrasyonları spektrofotometrik olarak saptandı ve kullanılan DNA konsantrasyonuna bağlı olarak da 25µl PCR reaksiyonu için kullanılacak primer miktarları da belirlendi.

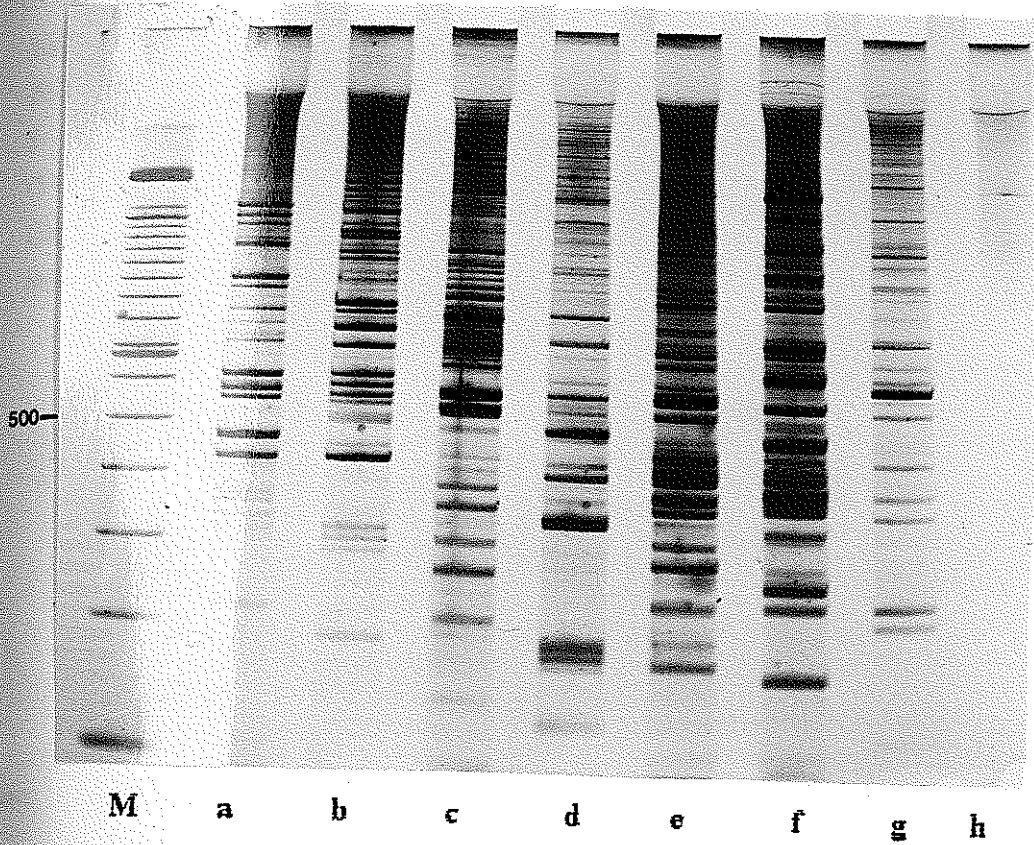
PCR programı değişik iki PCR makinasında denendiğinde aynı PCR bantları elde edildi. Bu sonuçlar elde edilen bantların PCR makinesine değil, programa bağlı olduğunu gösterdi. Taq polimeraz enzimi 3 ve 4 ünite olarak denendiğinde çoğalma sonucu oluşan bantlarda değişiklik gözlenmedi. Optimizasyon denemelerinden sonra standart PCR şartlarıyla DAF analizi gerçekleştirildi.

Amerika Birleşik Devletleri ve Fransa' dan gelen ırklarla 40 rastgele sentezlenmiş primer arasından seçilen 14 tane 8-mer ve 10-merden oluşan primerlerle DAF analizi yapıldı. Bütün reaksiyonlar en az iki defa tekrarlandı. Bu sonuçlara göre her tekrarda görülen bantların sayısı esas alındı. Seçilen primerlerden bazıları, test amacıyla seçilen ırk için çoğalma oluşturmalarına rağmen, diğer ırkların bazısında çoğalma meydana gelmedi. Bu nedenle analizler boyunca her tekrarda bant oluşturan primer için "+", bant oluşturmayan primer için "-" işaretleri kullanıldı (Çizelge 3.1). Analiz sonuçlarına göre primer AU- 8B (5'-GTAACGCG-3') diğer ırklar için çoğalma oluşturmalarına rağmen, ırk-1 için çoğalma oluşturmadı (Şekil 3.3). Aynı şekilde primer AU- 8O ırk-2, primer AU-8E (5'-ATGGATGC-3') ırk-1.2 için çoğalma meydana getirmedi. Primer AU-8L (5'-GCCGAGCT-3') ise Amerika Birleşik Devletlerinden gelen ırklar için çoğalma oluşturmadı (Bkz. Çizelge 3.1). Her primerin oluşturduğu bant sayısı ve çoğalma özelliğinin birbirinden farklı olduğu saptandı (Şekil 3.4). Şekil 3.4'de görüldüğü gibi seçilen primerlerin her biri farklı bantlar oluşturdu. Ayrıca primerlerin bazıları diğerlerine göre daha fazla DNA bantı meydana getirdi (Bkz. Çizelge 2.2.2). PCR ürünlerinin büyüklüğünün ise 100-1500bp (baz çifti) arasında olduğu saptandı. Genelde her primerin oluşturduğu bant sayısının 100-1000 bp arasında yoğun olduğu gözlemlendi ve verilerin değerlendirilmesinde de bu aralıktaki bantlar esas alındı.

Çizelge 3.1. *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* Irklarının 14 Rastgele Primerle Oluşturduğu DAF Analiz Sonuçları

Primerler	Irk-0	Irk-1	Irk-2	Irk-1.2	A-12	Q-1	B-2	A-15
AU-8B	+	-	+	+	+	+	-	+
AU-8C	+	+	+	+	+	+	+	+
AU-8E	+	+	+	-	+	+	+	+
AU-8H	+	+	+	+	+	+	+	+
AU-8L	+	+	+	+	-	-	-	-
AU-8N	+	+	+	+	+	+	+	+
AU-8O	+	+	-	+	+	+	+	+
AU-8S	+	+	+	+	+	+	+	+
Op-2	+	+	+	+	+	+	+	+
Op-3	+	+	+	+	+	+	+	+
Op-5	+	+	+	+	+	+	+	+
AU-10S	+	+	+	+	+	+	+	+
OPF-05	+	+	+	+	+	+	+	+
OPF-10	+	+	+	+	+	+	+	+

-: Çoğalma oluşmadı
+: Çoğalma oluştu



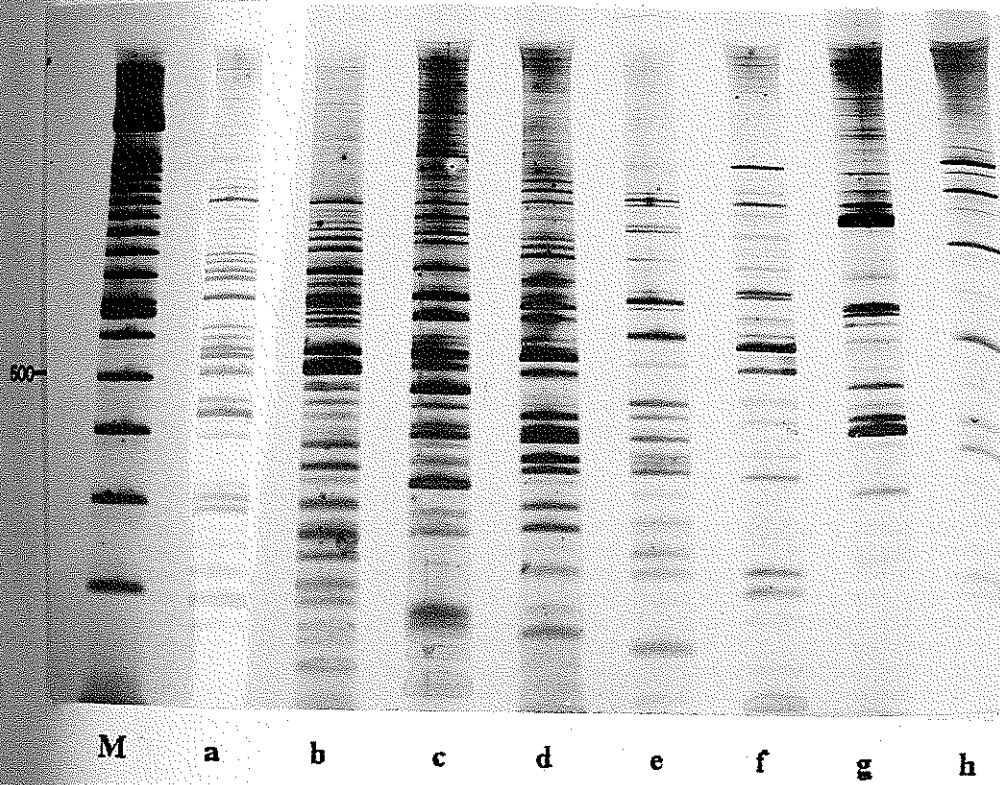
Şekil 3.3. Irk-1 DNA'sının Farklı Primerlerle Oluşturduğu DAF Çoğalması

M: 100 bp Marker

- a: OPF-05 (5'-CCGAATTCC-3'); b: Op-2 (5'-CCGAGCTG-3')
 c: AU-8L (5'-GCCGAGCT-3') ; d: AU-8O (5'-GACCACCA-3')
 e: AU-8N (5'-GCGGACAG-3') ; f: AU-8H (5'-CAGGAATT-3')
 g: AU-8E (5'-ATGGATGC-3') ; h: AU-8B (5'-GATACGCG-3')

Kullanılan 14 rastgele primerden AU-8B (5'-GATTCGCG-3') primeri ırk-1 için çoğalma ürünü vermedi. Bu sonuç primerin ırk-1' in genomunda bağlanabilecek özel bölgeleri taşımadığını ya da bu şartlar altında çoğalma oluşturmadığını gösterdi (Şekil 3.3:h). Primerlerin oluşturduğu ürünlerden moleküler ağırlığı 100-1500bp arasında, tekrarlanabilen ve sayılabilen özellikte olanlar esas alındı. Bu şartlar doğrultusunda primer AU-8C (5'-CAGGCCTT-3') ırk-0 DNA'sıyla 100-1400bp moleküler ağırlığındaki çoğalma ürünlerini meydana getirdi (Şekil 3.4:g). Primer AU-8E (5'-ATGGATGC-3') ise ırk-1.2 için çoğalma oluşturmadı (Bkz. Çizelge 3.1) Yukarıda ırk-1 için belirttiğimiz durumu ırk-1.2 için de söyleyebiliriz. Bu primer ise 100-1100bp arasında bantlar verdi. Primer AU-8O (5'-GACCACCA-3') ise ırk-2 için çoğalma ürünü vermedi ve primer AU-8E gibi 100-1300bp arasında ürünler oluşturdu (Şekil 3.4:e). Primer AU-8L (5'-GCCGAGCT-3') ise Amerika Birleşik Devletlerinden gelen ırklar için çoğalma ürünü oluşturmadı (Bkz. Çizelge 3.1). AU-8N (5'-GCGGACAG-3') primeri 100-1400bp arasında çoğalma ürünleri oluşturdu (Şekil 3.4:d). Primer AU-8H (5'-CAGGAATT-3')

100-1400bp (Şekil 3.4;e) , AU-8O (5'-GACCACCA-3')100-1300bp, AU-8S (5'-ACGGGTGC-3') 100-1400bp (Şekil 3.5), Op-2 (5'-CCGAGCTG-3') (Şekil 3.3;b) ve Op-5 (5'-TCAGCCAC-3') 100-1300bp, AU-10S (5'-ATACGGGTGC-3') ve OPF-10 (5'-GGAAGCTTGG-3') 100-1000bp arasındaki çoğalma ürünlerini meydana getirdiler (Şekil 3.10, Şekil 3.11). Op-3 ise çok sayıda çoğalma oluşturmasına rağmen sadece temel bantlar esas alındığı için 100-900 pb arasındaki bantlar sayıldı.



Şekil 3.4. Irk-0 DNA' sının Farklı Primerlerle Oluşturduğu DAF Çoğalması

M: 100 bp Marker

a: AU-8S (5'-ACGGGIGC-3') ; b: AU-8L (5'-GCCGAGCT-3')

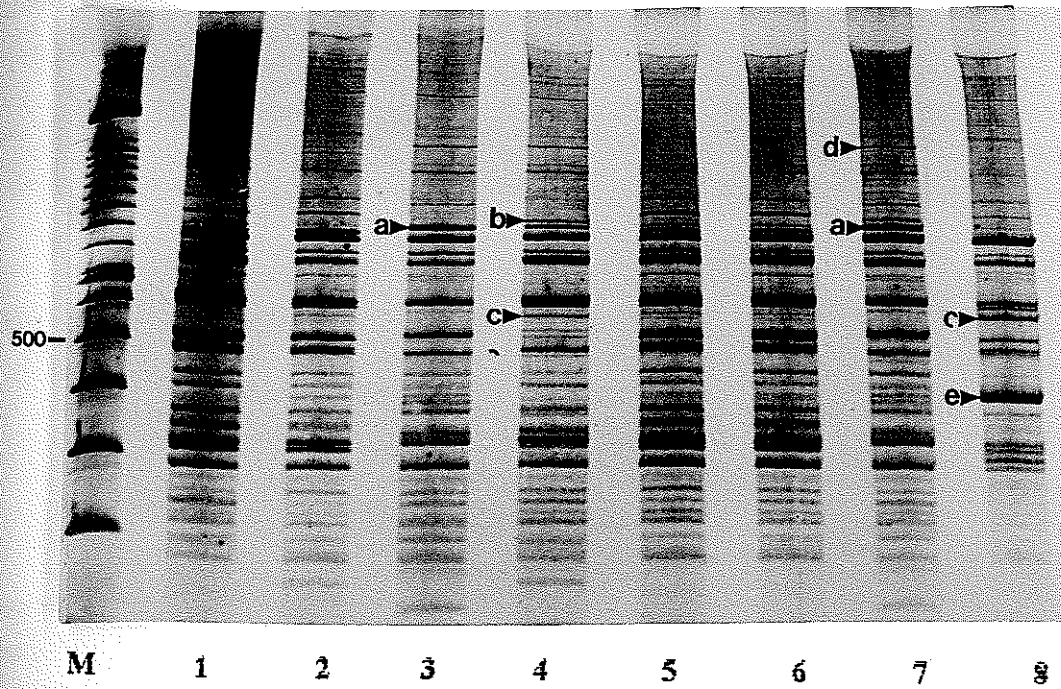
c: AU-8O (5'-GACCACCA-3') ; d: AU-8N (5'-GCGGACAG-3')

e: AU-8H (5'-CAGGAATT-3') ; f: AU-8E (5'-ATGGATGC-3')

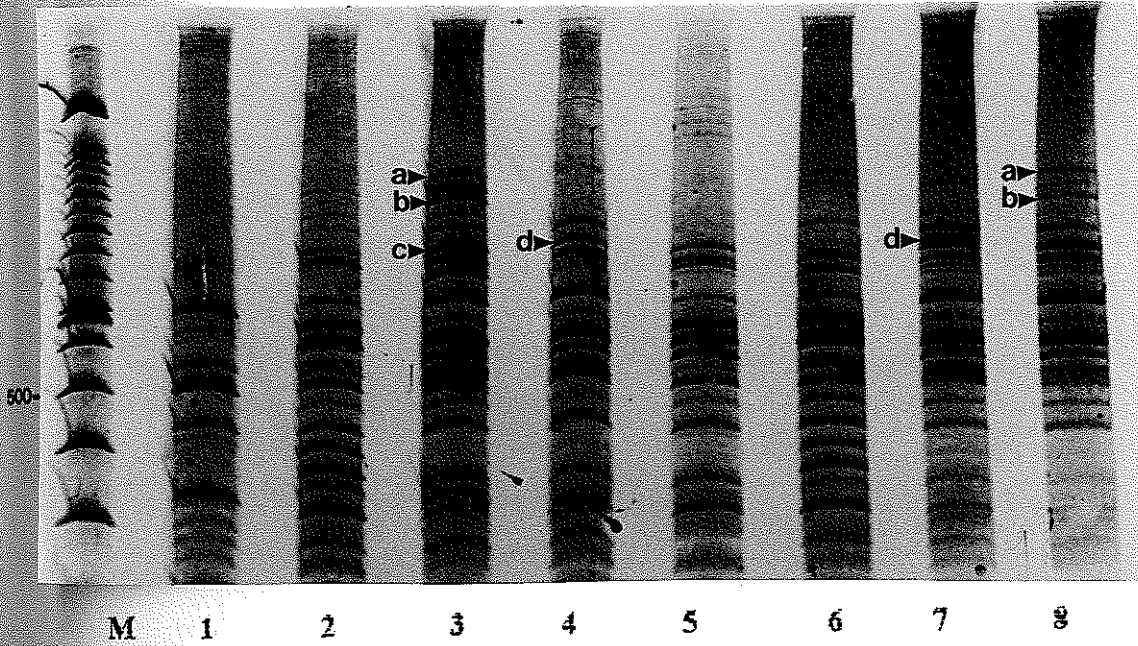
g: AU-8C (5'-CAGGCCTT-3') ; h: AU-8B (5'-GATTTCGCG-3')

İrka özel bantların tesbitinde ise, daha önce *Fusarium* cinsi için denenmiş olan AU-8S (5'-ACGGGTGC-3') ve OPF-10 (5'-GGAAGCTTGG-3') primerlerinden yararlanıldı. Diğer primerlerin çok az polimorfik bant oluşturduğu gözlemlendi AU-8S primerinin oluşturduğu çoğalma sonuçlarına göre ırk-2 (Şekil 3.5;a: 900bp), ırk-1.2 (Şekil 3.5;b:910bp,c:580bp), B-2 (Şekil 3.5;a ve d:1500bp'den büyük) ve A-15 (Şekil

3.5;c ve e:400) için polimorfik olan bantlar tesbit edildi. Şekil 3.5'de belirtildiği gibi iki koleksiyondaki aynı ırkların paylaştıkları polimorfik bantların yanısıra, sadece belirli ırk için de polimorfik bantların olduğu görüldü (Şekil 3.5;d ve e). Bu primerin ırk-0, ırk-1, A-12 ve Q-1 için oluşturduğu çoğalmada, polimorfik özellik taşıyan bantların tesbiti kesin bir sonuç vermedi. Bu nedenle OPF-10 primerinin oluşturduğu bantlardan yararlanıldı. A-12 ve ırk-0 için yaklaşık 1200 ve 1400bp olarak saptanan iki tane bantın yanısıra (Şekil 3.6;a:1200bp,b:1400bp), A-12 için yaklaşık 800bp olan polimorfik bant belirlenmiştir. Belirtilen bantların ırka özel bantlar olduğu tesbit edildi (Şekil 3.6;c:800bp). Q-1 ve ırk-1 için yaklaşık 950bp olan polimorfik bant belirlendi (Şekil 3.6;d:950bp).

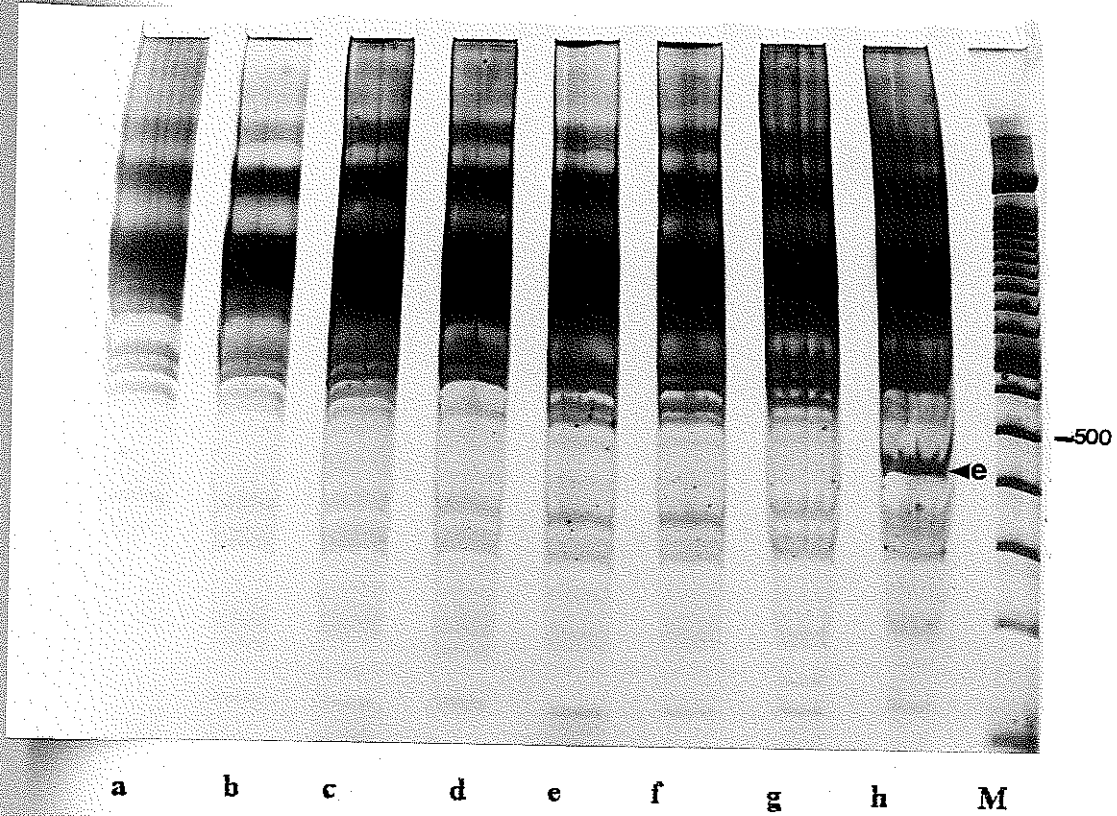


Şekil 3.5. AU-8S (5'-ACGGGTGC-3') Primerinin *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Irklarıyla Oluşturduğu Çoğalmada Belirlenen Polimorfik Bantlar
M: 100bp Marker, 1: Irk-0, 2: Irk-1, 3: Irk-2, 4: Irk-1.2, 5: A-12, 6: Q-1, 7: B-2, 8: A-15DNA'sı
a:900bp, b:910bp, c:580bp, d:1500bp'den büyük, e:400bp



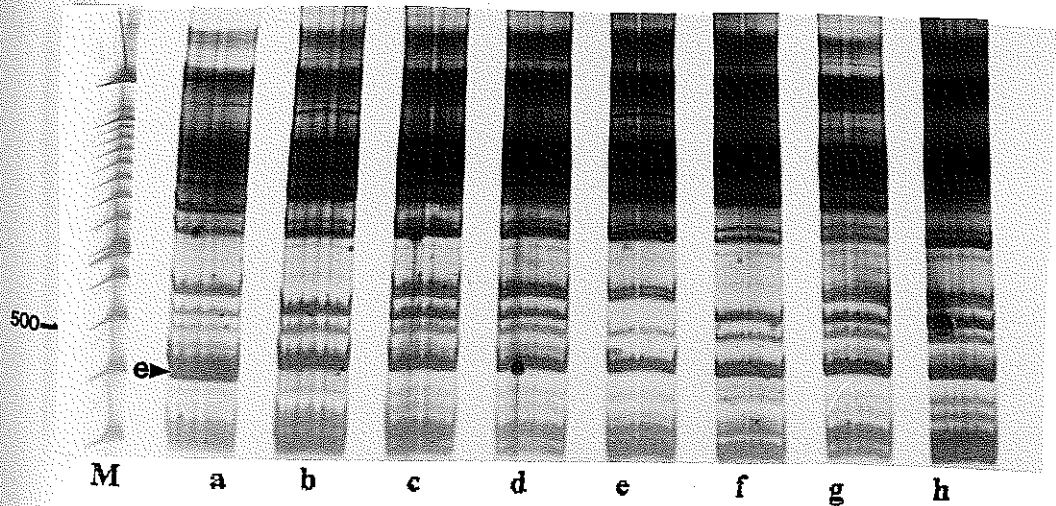
Şekil 3.6. OPF-10 (5'-GGAAGCTTGG-3') Primerinin *Fusarium oxysporum* f.sp.melonis Irklarıyla Oluşturduğu Çoğalmanda Belirlenen Polimorfik Bantlar
M: 100bp Marker, 1: *Fusarium moniliforme*, 2: A-15, 3: Q-1, 4: A-12, 5: ırk-1.2, 6: ırk-2, 7: rk-1, 8: ırk-0 DNA'sı
a: 1400bp, b: 1200bp, c: 800bp, d: 950b

AU-8S primerinin oluşturduğu çoğalma ürünlerinin detaylı analizini yapmak amacıyla, çoğalma ürünleri EcoR I (12000 u/ml) (Şekil 7) ve Hind III (12000 u/ml) (Şekil 3.8) enzimleriyle kesilerek poliakrilamid jelde analiz edildi. Her iki enzimle yapılan kesimde de bantlarda değişiklik gözlenmedi. Özellikle iki koleksiyon arasındaki aynı ırkların, ırk-1.2 ve A-15 dışında, aynı temel bantları paylaştıkları belirlendi. Bu primerin A-15 için oluşturduğu çoğalmanda yaklaşık 400bp olan bandın, restriksiyon enzimleriyle olan kesimden sonra da değişmemesi (Şekil 3.5;e, Şekil 3.7, Şekil 3.8), bantların aynı baz kompozisyonuna da sahip olduklarını gösterdi.



Şekil 3.7. AU-8S (5'-ACGGGTGC-3') Primerinin *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* Irklarıyla Oluşturduğu PCR Ürünlerinin EcoR I Restriksiyon Enzimiyle Kesiminden Sonra Görülen Bantlar

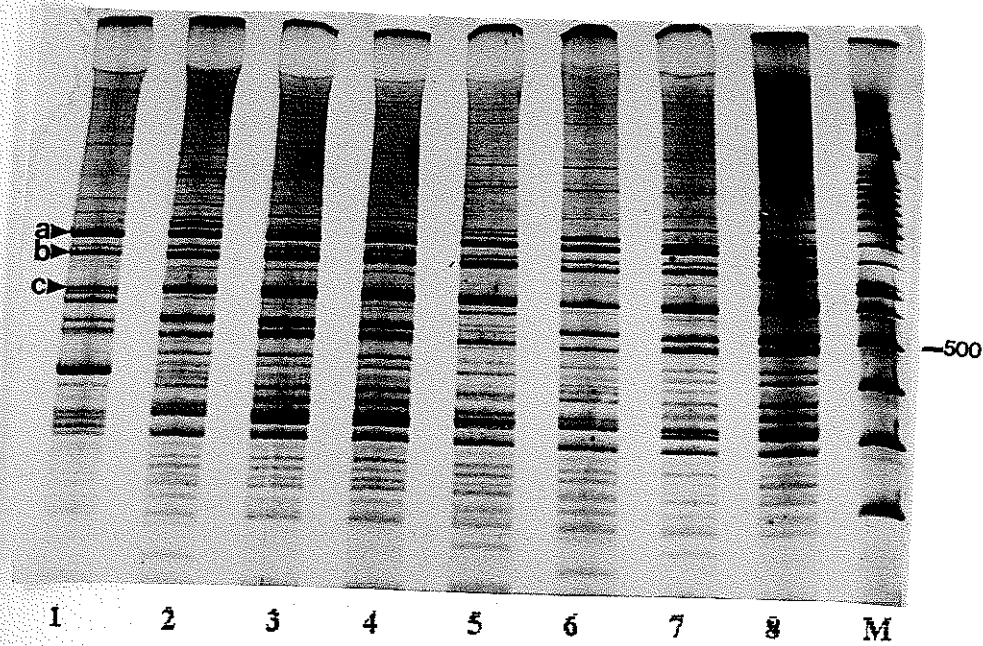
a: Irk-0 ; b: Irk-1; c: Irk-2 ; d: Irk-1.2 ; e: A-12 ; f: Q-1 ;
g: B-2 ; h: A-15 M: 100bp Marker



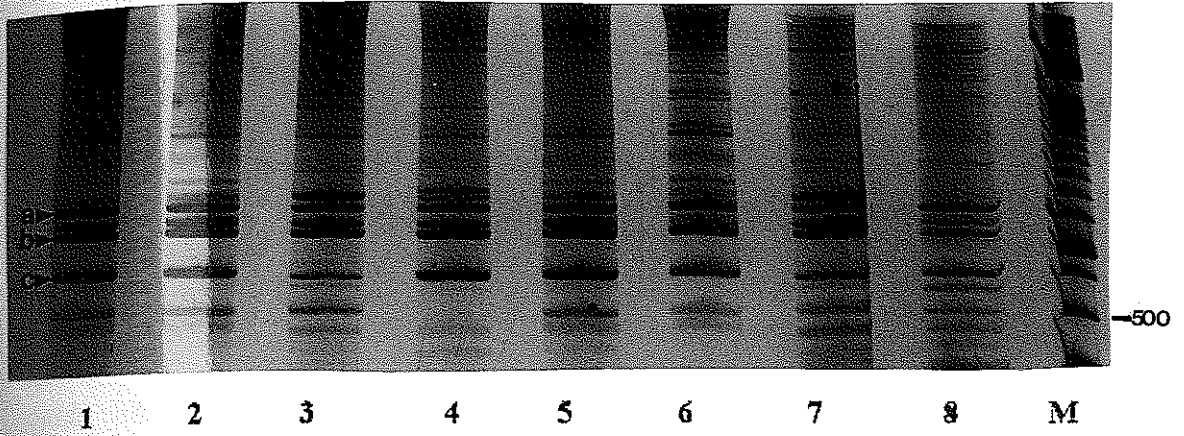
Şekil 3.8. AU-8S (5'-ACGGGTGC-3') Primerinin *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* Irklarıyla Oluşturduğu PCR Ürünlerinin Hind III Restriksiyon Enzimiyle Kesiminden Sonra Görülen Bantlar

a: A-15 ; b: B-2 ; c: Q-1 ; d: A-12 ; e: Irk-1.2 ; f: Irk-2 ;
g: Irk-1 ; h: Irk-0 ; M: 100bp Marker

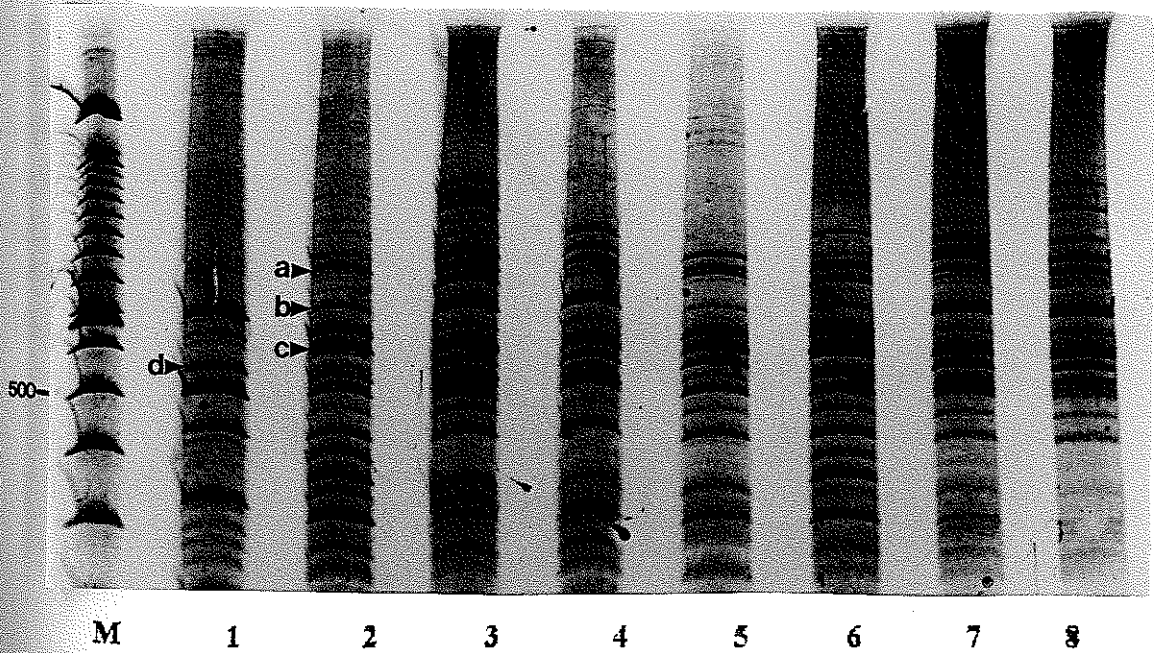
İrka özel bantların tesbitinin yanısıra bütün ırklarda gözlenen genel bantlar da belirlendi. Bu bantların bütün ırklarda çoğalması, restriksiyon enzimiyle kesimden sonra bile görülmesi, bu türün ırklarına özel olabileceğini kanutlar gözükte (Şekil 3.9; a:850bp, b:750bp, c:600bp) AU-8S (5'-ACGGGTGC-3') primerinin oluşturduğu çoğalmada belirtilen ve yaklaşık 850,600 ve 750bp olan bantlar AU-10S (5'-ATACGGGTGC-3') primerinin oluşturduğu çoğalmada görüldü (Şekil 3.10; a:850bp,b:750bp,c:600bp). Belirtilen bantların diğer primerlerle oluşturulan çoğalmada da varlığını tesbit etmek için OPF-10 (5'-GGAAGCTTGG-3') primeriyle elde edilen çoğalma ürünleri, aynı primerle çoğaltılan *Fusarium moniliforme* türü ile karşılaştırıldı. *Fusarium oxysporum* için türe özel olarak belirlenen bantlar *Fusarium moniliforme*'de görülmedi (Şekil 3.11; a:850bp, b:750bp, c:600). Bunun yanısıra yaklaşık 450bp olarak belirlenen bantın hem *Fusarium oxysporum* hem de *Fusarium moniliforme*'de görülmesi bu bantın *Fusarium* cinsini tanımlayabileceği fikrini verdi (Şekil 3.11; d:450bp).



Şekil 3.9. AU-8S (5'-ACGGGTGC-3') Primerinin *Fusarium oxysporum* f.sp.melonis Irklarıyla Oluşturduğu Çoğalmada Belirlenen Genel Bantlar
 1: A-15 , 2: B-2 , 3: Q-1 , 4: A-12 , 5: Irk-1.2 , 6: Irk-2 , 7: Irk-1,
 8: Irk-0 M: 100bp Marker
 a: 850bp, b: 750bp, c: 600bp



Şekil 3.10. AU-10S (5'-ATACGGGTGC-3') Primerinin *Fusarium oxysporum* f.sp.melonis Irklarıyla Oluşturduğu Çoğalmada Belirlenen Genel Bantlar
 1:Irk-0, 2:Irk-1, 3:Irk-2, 4:Irk-1.2, 5: A-12, 6:Q-1, 7:B-2, 8: A-15
 M: 100bp Marker
 a: 850bp, b: 750bp, c: 600bp



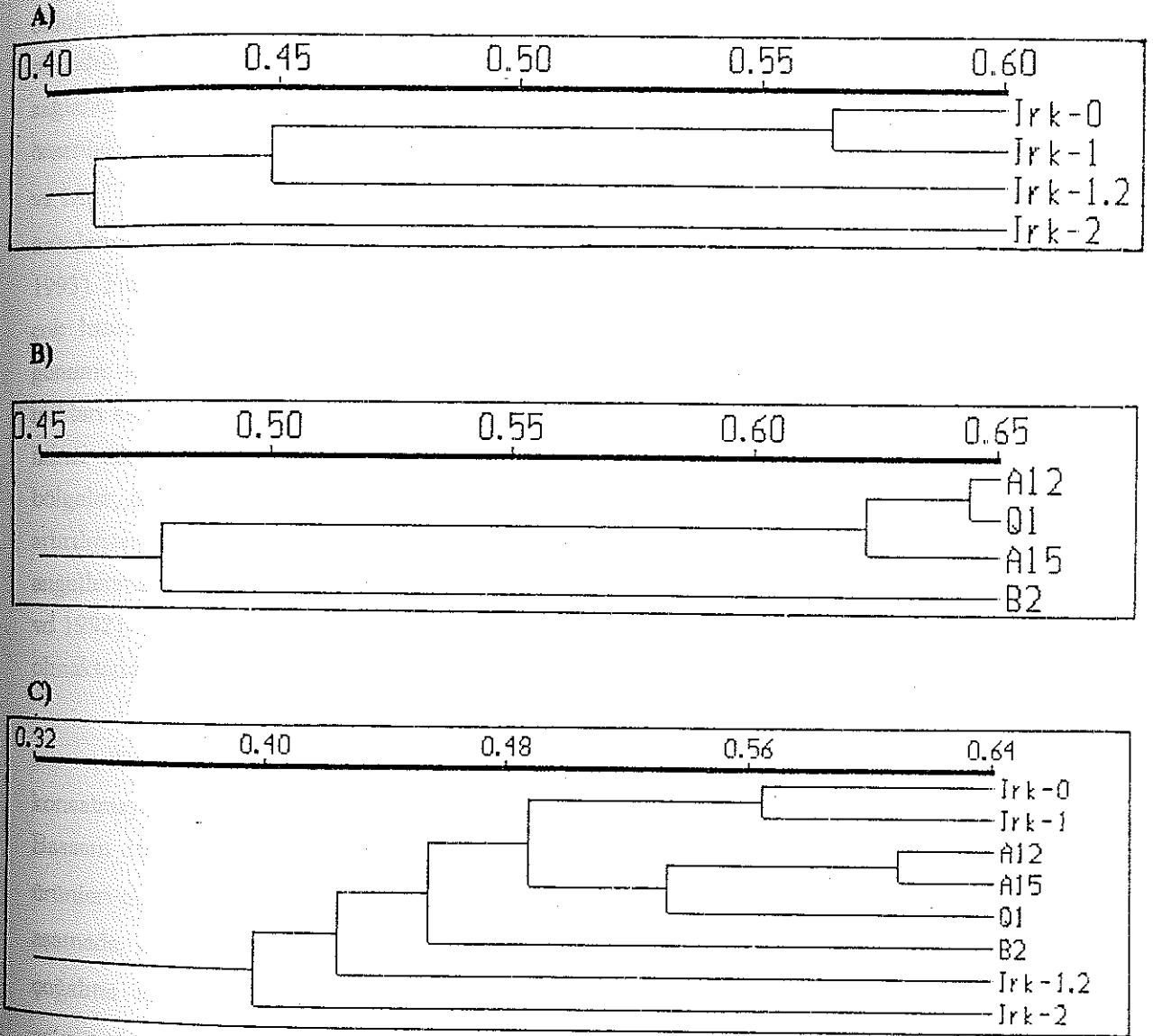
Şekil 3.11. OPF-10 (5'-GGAAGCTTGG-3') Primerinin Oluşturduğu Çoğalmada Belirlenen Genel Bantlar
 M: 100bp Marker, 1: *Fusarium moniliforme*, 2: A-15, 3: Q-1, 4: A-12, 5: rk-1.2, 6: Irk-2, 7: rk-1, 8: Irk-0 DNA'sı
 a: 850bp, b: 750bp, c: 600bp, d: 450bp

Irklar arasındaki filogenetik ilişkiyi belirlemek amacıyla, seçilen primerlerin 100-1000 bp arasında oluşturduğu bantlar değerlendirildi. Elde edilen veriler SIMQUAL (Similarity for Qualitative Data) seçimiyle Jaccard'ın benzerlik indeksini hesaplamada kullanıldı (Çizelge 3.2). Her iki set için gerçekleştirilen benzerlik katsayıları (r) 0.38 (ırk-2;ırk-1.2) ile 0.64 (A-12;Q-1) arasındaydı. UPGMA (Unweighted Paired Group Method with Arithmetic Averages) fenogramın oluşturduğu gruplara göre, ırk-2 diğer irklardan çok ayrı bir sınıf oluşturdu. İki set için oluşan sınıflandırma analizleri aynı sonuçları verdi (Çizelge 3.3). İki grubun sonuçları beraber incelendiğinde ise benzerlik indeksinde meydana gelen değişikliğe bağlı olarak, sınıflarda da değişiklik meydana geldi. Irkların eşleşmesi ile oluşan benzerlik katsayısı 0.34 (ırk2-B2) ile 0.60 (A15-A12) arasındaydı.

Çizelge 3.2 *Fusarium oxysporum* f.sp.melonis Irklarının DAF Analizi Sonucu Elde Edilen Genetik Benzerlikleri

	Irk-0	Irk-1	Irk-2	Irk-1.2	A-12	Q-1	B-2	A-15
Irk-0	1							
Irk-1	0.56	1						
Irk-2	0.43	0.41	1					
Irk-1.2	0.45	0.44	0.38	1				
A-12	0.52	0.53	0.39	0.41	1			
Q-1	0.47	0.45	0.41	0.43	0.54	1		
B-2	0.38	0.44	0.34	0.38	0.48	0.47	1	
A-15	0.45	0.48	0.38	0.41	0.6	0.52	0.48	1

Çizelge 3.3. *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* Irklarının DAF Analizi Sonucu Oluşturduğu Dendrogram



A: *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*'in Fransa'dan gelen irklarının oluşturduğu dendrogram

B: *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*'in Amerike Birleşik Devletleri'nden gelen irklarının oluşturduğu dendrogram

C: İki koleksiyonda yer alan irkların aralarında oluşturduğu dendrogram Üstte yer alan scala Jaccard' in benzerlik katsayısıyla oluşturulan benzerlik yüzdesini vermektedir.

4. TARTIŞMA

Elde edilen sonuçlar, kavunlarda solgunluk ve sararmaya neden olan *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* ırklarının belirlenmesinde DAF tekniğinin kolay ve güvenilir olduğunu gösteriyor. Belirttiğimiz patojen ve teknikle daha önceden yapılmış bir çalışma olmadığı için, bu araştırma orjinal olup öncelikle metodun patojen için optimizasyonu sağlandı. DAF tekniği PCR'a bağlı olduğu için, çoğalma şartlarının kararlılığı çok önemlidir. Optimizasyon denemeleri sırasında DAF tekniği için DNA miktarının, primer ve Mg^{++} konsantrasyonunun önemli olduğu görüldü. Kullanılan DNA'nın miktarı PCR ürünlerinin oluşmasında ve bantların ayırımında büyük bir etkiye sahiptir (Weeden vd 1993). Farklı konsantrasyonlardaki DNA ile yapılan çoğaltma reaksiyonlarında miktarın çok hassas olduğu görüldü (Bkz. Şekil 3.1). Bu sonuç kompleks olmayan fungus genomu için şaşırtıcı olmadı (Bassam vd 1992). Çok düşük konsantrasyondaki DNA miktarı kararsız bantların oluşmasına neden olduğu görülmüştür. Çoğaltmanın bir ya da ikinci döngüsü sırasında çok az ya da nadir olarak bulunan DNA üzerindeki hedef bölgeler, daha sonraki döngüler için sayısal olarak yeterli olmayabilir. DNA miktarının artırılmasıyla hedef bölgelerinin sayısı artmakta ve sonuçta sayısal eşitsizlik engellenmektedir. Ayrıca bantlardaki tutarsızlık ortadan kalkmaktadır (Caetano-Anollés vd 1992). Daha fazla DNA konsantrasyonu ise sadece temel bantların çoğaltmasına neden olmaktadır.

Elde edilen sonuçlar başarılı ve tekrarlanabilir PCR reaksiyonları için Mg^{++} konsantrasyonunun kritik olduğunu doğruladı (Devos ve Gale 1992, Caetano-Anollés ve Bassam 1993, Kazan vd 1993). Primerlerin DNA'ya bağlanması ve dNTP'lerin yeni ürünleri oluşturması için Mg^{++} konsantrasyonu önemlidir (Mullis vd 1994). Çünkü bu aşamada kofaktör olarak görev yapmaktadır. Başarılı ve tekrarlanabilir özellikteki çoğalma için Mg^{++} konsantrasyonu tam olarak belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada en uygun Mg^{++} konsantrasyonu 4mM olarak bulundu (Bkz. Şekil 3.2;c). Elde edilen değer, RAPD analizleri için belirlenen Mg^{++} konsantrasyonu aralığında (2mM- 7mM) yer almaktadır (Tingey vd 1992).

DAF için çok kısa (5mer-10mer) ve rastgele primerler kullanılır, kalıp DNA'nın nükleotit dizisinin bilinmesine gerek yoktur. Bu nedenle test edilecek primerlerin DNA'daki özel bölgelere bağlanma özelliğinin test edilmesi gerekmektedir. Çalışmada

kullanılacak primerler bu sonuca bağılı olarak önceden test edilmiştir. Bazı primerlerin çoğalma meydana getirmemesi bu primerlerin Fusarium oxysporum f.sp. melonis'in genomik DNA'sında uygun bağlanma bölgelerinden yoksun olduğunu ya da deney şartları altında bağlanmanın olmadığını göstermektedir.

Diğer önemli faktör ise test edilecek primerlerin konsantrasyonudur. Çünkü çoğalma ürünleri primer-kalıp DNA oranından da etkilenmektedir. Bu nedenle, kullanılacak primerlerin konsantrasyonu en uygun DNA konsantrasyonuna göre belirlendi. Çünkü primer konsantrasyonunun artırılması DNA'da bağlanma bölgelerinin kaybına neden olmaktadır. Düşük konsantrasyonda primer kullanıldığında daha büyük bantlar elde edilmektedir. Primer konsantrasyonu artırıldığında ise bu bantlar kaybolmakta, daha küçük bantlar görülmektedir (Weeden vd 1992).

Çoğalma şartları primerlerin bağlanma sıcaklığından ve zamanından da etkilenmektedir. Bunların yanı sıra enzim konsantrasyonu (3-10 unite), DNA ipliğinin ayrılma sıcaklığı (94-96°C), yeni DNA'nın sentezlenme zamanı (30-60 sn.), döngü sayısı (30-45) ve farklı PCR makinası kullanılması DAF bantlarının oluşmasında az etkili olmaktadır (Caetano-Anollés ve Bassam, 1993).

AU-8S ve OPF-10 primerlerinin çoğalması sonucunda ırka özel bantlar teşhis edildi (Şekil 3.5, Şekil 3.6). Daha önce Fusarium cinsi için bu primerlerden yararlanılmış ve bu tür bir çalışma için uygun primerler olduğu saptanmıştır (Zhang vd 1994). Irka özel bantların yanısıra Fusarium oxysporum türünde genel olarak çoğalan bantlar da belirlendi (Bkz. Şekil 3.9, Şekil 3.10). Belirlenen bantların diğer bir Fusarium türünde olmaması sonucu destekler gözüküyor. Ayrıca iki Fusarium türünde de aynı bantın bulunması bu cinse özel olabileceği fikrini ortaya çıkarıyor (Bkz. Şekil 3.11;d). Ancak kesin bir sonuca ulaşılabilmesi için diğer türlerin de aynı koşullarda denenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada PCR ürünlerinin EcoR I (Bkz. Şekil 3.6) ve Hind III (Bkz. Şekil 3.7) restriksiyon enzimleriyle kesilmesi, bantlar arasındaki farklılığı tam olarak ayırt edemedi. Bu sonuç korunmuş (konservatif) bantların aynı moleküler ağırlık yanında, aynı baz kompozisyonuna da sahip olduğunu gösterdi. Ancak kullanılan enzimler altı bazlık olup, PCR ürünlerinin dört bazlık bir enzimle kesimi yapılmadı. Bu teknik Fusarium graminearum'un genetik çeşitliliğini saptamak için de kullanılmıştır (Quellet vd 1993).

Amerika Birleşik Devletleri ve Fransa'dan elde edilen ırkların kendi aralarında oluşturduğu sınıf analizleri arasında ilişki bulunmasına rağmen, benzerlik indeksleri arasında farklılık olduğu gözlemlendi (Bkz. Çizelge 3.2). Buna bağılı olarak da ırklar

arasındaki benzerlik yüzdesinde farklılıklar ortaya çıktı. Örneğin, ırk-0 ile ırk-1 ve A-12 ile Q-1 diğer ırklara göre birbirlerine en yakın ırklardı. Ancak benzerlik yüzdesi ırk-0 ile ırk-1 arasında 0.56 iken, A-12 ile Q-1 arasında 0.64 olarak belirlendi. Her iki grup birleştirip yeni bir sınıf oluşturulduğunda ise ırk-2'nin yine diğer ırklardan ayrı bir grup oluşturduğu görüldü (Bkz. Çizelge 3.3). Bu sonuç, ırkların bitkide gösterdiği simptonlarla ilişkili bulunmuştur. Daha önce açıklandığı gibi ırk-2 lezyon göstermeksizin kesin bir solgunluk oluşturmaktadır. Diğer ırklar ise önce yapraklarda bir kloroza neden olmakta, bunu hipokotillerde görülen bir nekroz oluşumu izlemektedir. İrk-1.2 ise iki farklı suşa sahip olup, dayanıklılık genini taşıyan kavun çeşitlerine dayanıklılık göstermektedir (Risser vd 1976). Bu nedenle ırk-0 ve ırk-1'den ayrı bir sınıf oluşturdu. İki koleksiyondaki ırk-1.2 arasında gözlenen farklılık bunların ayrı suşlar olabileceğini ortaya koydu. AU-SS primeriyle yapılan analizlerle NSTYS programından elde edilen sonuçları karşılaştırıldığında, sadece bir primerden elde edilen sonuçlarla iki farklı bölgeden gelen ırklar arasındaki ayırımın fazla olmadığı, ancak diğer primerlerden elde edilen sonuçların dendrogram analizinde belirtilen grupların oluştuğu gözlemlendi (Bkz. Çizelge 3.3). Her ırkın her primer ile oluşturduğu çoğalmanın farklı olması, primerin DNA'ya bağlanabileceği özel bağlanma bölgesindeki değişiklikten ve baz sekansındaki insersiyon, delesyon, değişimden ya da inversiyondan dolayı meydana gelmiş olabileceğini ifade etmektedir. Caetano-Anollés vd (1991)'in belirttiği gibi baz dizisinde yukarıda belirttiğimiz nedenlerden dolayı meydana gelen değişiklikler, farklı moleküler ağırlıkta bantların oluşmasına neden oldu.

5. SONUÇ

Teknik açısından DAF analizi fungus çalışmaları için hızlı, hassas ve diğer tekniklere göre ucuzdur. Özellikle kullanılan DNA izolasyon teknikleri, poliakrilamid jel elektroforezi ve bantların hassaslığını arttıran gümüş boyama DAF verilerinin doğruluğunu arttırdı. Elde edilen sonuçlara göre DAF analizi fungus ırklarının tanımlanması ve ırklara özel moleküler işaretleyicilerinin elde edilmesi için önerilebilir. Bunun için ilk olarak iyi çoğalma oluşturan ve kullanılacak özellikte polimorfizm veren primerlerin seçilmesi büyük önem taşır. Çalışmada kullandığımız AU-8S ve OPF-10 primerleri patojenin ırklarının ayırımında kullanılabilir. Daha sonra yapılacak olan çalışmalarda bu primerlerden elde edilen bant jelden izole edilerek klonlanıp, dizi analizi yapılarak ırka özgün primerler hazırlanabilir. Seçilen diğer primerlerle de restriksiyon enzim analizi izlenirse, daha fazla genetik bilgi elde edilebilir. Bu çalışma ırka özgün genom bölgelerinin saptanması ve ırka özel proplar haline getirilmesi için başlangıç oldu.

Radyoaktif veya antibadi ile işaretlenebilen proplar mikroorganizma populasyonu içinde ırkların belirlenmesinde kullanılmaktadır. ırka özgün elde edilecek primerler epidemiyolojik markerlar olarak kullanılarak, ekim öncesi topraktaki ırkların tesbiti ve dayanıklı kavun çeşitlerinin yetiştirilmesi ile patojenin etkisi önenebilir. Bu çalışmada DAF yöntemiyle Fusarium oxysporum f.sp.melonis ırkları arasındaki genetik çeşitlilik saptanmış oldu. Böyle bir çalışma ile ekonomiye ve özellikle doğanın korunmasına yardımcı olunması amaçlanmıştır.

6.ÖZET

FUSARIUM OXYSPORUM F.SP. MELONIS İRKLARININ DAF (DNA AMPLIFICATION FINGREPRINTING) METODUYLA BELİRLENMESİ

Fusarium oxysporum f.sp.melonis'in kavunlarda neden olduğu solgunluk ve sararma, başta Antalya çevresi olmak üzere Türkiye'deki kavun üretiminde önemli sorunlara neden olmaktadır. Bu nedenle hastalığın kontrolü için toprakta mevcut olan patojenin farklı belirtilere sahip ırklarının tesbiti ve dayanıklı kavun çeşidinin seçimi büyük önem taşımaktadır. Moleküler işaretleyicilerin kullanılması her türlü canlıda tür altı düzeyde yapılabilecek ırk tesbitine olanak sağlamış, patojenik özellik gösteren grupların tanımlanmasında büyük kolaylıklar getirmiştir. Bu çalışmada moleküler işaretleyicilerin belirlenmesinde kullanılan en yaygın metodlardan biri olan DNA Amplification Fingerprinting (DAF) metodu kullanılarak Fusarium oxysporum f.sp.melonis'in moleküler düzeyde analizi yapılmıştır.

Öncelikle DAF metodunun patojen için optimize edilmesi denenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre optimum DAF koşulları için Mg^{++} , DNA ve primer konsantrasyonunun önemli olduğu bulunmuştur. Optimize şartlarda, seçilen primerlerle çoğalma gerçekleştirilmiştir. AU-8S ve OPF-10 primerlerinin bütün ırklarda oluşturduğu bantlardan, ırka özgü olanlar saptanmıştır. Buna ilave olarak AU-8S primerinin oluşturduğu PCR ürünleri EcoR I ve Hind III restriksiyon enzimleriyle kesildi. PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi farklı bantlar oluşturmadı. İrklar arasındaki filogenetik ilişki, seçilen 14 primerle oluşturulan DAF reaksiyonları sonucu ortaya çıkan bantlara göre NSTYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) ile saptanmıştır. Bu sonuçlara göre ırk-2 diğer ırklardan ayrı bir sınıf oluşturmuştur.

Yapılan çalışmayla optimize edilen DAF metodundan yararlanılarak Fusarium oxysporum f.sp.melonis ırkları arasındaki genetik benzerlik belirlenmiş ve ırka özgü problemler elde etmek için başlangıç yapılmıştır.

7.SUMMARY

IDENTIFICATION OF FUSARIUM OXYSPORUM F.SP. MELONIS RACES USING DAF (DNA AMPLIFICATION FINGERPRINTING) METHOD

Wilt and yellowing diseases of muskmelon caused by Fusarium oxysporum f.sp. melonis are serious problems of muskmelon production in Turkey, especially in Antalya region. For this reason, it is imperative to identify the races causing the disease and to select the resistant cultivar to control the diseases. Use of molecular markers made identification of races for all types of life forms at the subspecies level possible and introduced great ease in identification of groups that exhibit special pathogenic properties. In this work, DNA Amplification Fingerprinting (DAF), one of the most widely used methods to determine the molecular markers, was used to analyze Fusarium oxysporum f.sp.melonis at the molecular level.

At first, DAF was optimized for the specific pathogen by using different concentrations of template DNA, Mg⁺⁺ and primers. For the optimized DAF conditions, it has been shown that the above parameters were of importance. The subsequent experiments were conducted using these optimized conditions. Two primers, AU-8S and OPF-10, gave race specific bands. In addition to this, the PCR products of these two primers were digested with EcoR I and Hind III. The restriction enzyme digestion of PCR products did not differentiate different banding patterns. Phylogenetic relatedness among the races was determined based on the DAF products amplified with 14 primers which then was analyzed by using NSTYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) According to these results, Race-2 constituted different clusters compared to others.

In short, by means of the optimized DAF method, genetic relatedness among the races was determined and a start towards developing a race-specific probe was made

8.KAYNAKLAR

- ARMSTRONG, G. M. and J. KARMSTRONG . 1950. Biological Races of the Fusarium Causing Wilt of Cowpeas and Soybeans. Phytopathology, 40: 181-193
- ASSIGBETSE, K. B., FERNANDEZ, D., DUBOIS, M. P. and GEIGER, J. P. 1994. Differentiation of Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum Races on Cotton by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. Phytopathology, 84:622-626
- AVISE, J. C. and LANSMANN, R. A. 1983. Polymorphism of Mitochondrial DNA in Populations of Higher Animals. Pg: 147-164 in: Evolution of Genes and Proteins, M. Nei and R. K. Koehn. Sinauer Associates Inc., Sunderland
- BASSAM, B. J., G. CAETANO-ANOLLES and P. M. GRESSHOFF. 1991. Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrilamide Gels. Anal. Biochem. 196:80-83
- BASSAM, B. J., G. CAETANO-ANOLLES and P.M. GRESSHOFF 1992. DNA Amplification Fingerprinting of Bacteria. Appl. Microbiol. Biotech. 38: 70-76
- BECKMANN, J. S. , SOLLER, M. 1983. Restriction Fragment Length Polymorphism and Genetic Improvement: Methodologies, mapping and costs. Theor. Appl. Genet 67: 35-43
- BOSLAND, P. W. and WILLIAMS, P. H. 1987. An Evaluation of Fusarium oxysporum from Crucifers Based on Pathogenicity, Isoenzyme Polymorphism, Vegetative Compatibility and Geographic Origin. Can. J. Bot. , 65: 2067- 2073
- BROWN, W. 1928. Studies in the Genus Fusarium .VI. General Descriptions of Strains, Together With A Discussion of the Principles At Present Adopted in the Classification of Fusarium. Ann. Bot. 42: 285-304
- BUXTON, E. W. 1962. Heterokaryosis and Parasexual Recombination in Pathogenic

Strains of Fusarium oxysporum J Gen. Microbiol. 15:133-139

- CAETANO-ANOLLES, G., G. J., BASSAM and P. M., GRESSHOFF. 1991. High Resolution DNA Amplification Fingerprinting Using Very Short Arbitrary Oligonucleotide Primers. Bio/Technology 9:553-557
- CAETANO-ANOLLES, G., G. J., BASSAM and P. M., GRESSHOFF. 1992. Primer-template Interactions During DNA Amplification Fingerprinting with Single Arbitrary Oligonucleotides. Mol. Gen. Genet. 235:157-162
- CAETANO-ANOLLES, G., G. J., BASSAM and P. M., GRESSHOFF. 1993. DNA Amplification Fingerprinting Using Arbitrary Oligonucleotides Primers. Appl. Biochem. Biotech. 42: 189-200
- CARLSON, J. E., TULSIERAM, L. K., GLAUBITZ, V. L., KAUFFELDT, C. and RUTLEDGE, R. 1991. Segregation of Random Amplified Polymorphic DNA Markers in F1 Progeny of Conifers. Theor. Appl. Genet. 83:194-200
- CHAPARRO, J., P. WILCOX, D. GRATTAPAGAGLIA, D. O' MALLEY, S. McCORD, R. SEDERROF, L. McINTYRE and R. WHETTEN. 1992. Genetic Mapping of Pine Using RAPD markers. Miami Winter Symp, Miami, FL
- CHUMBLEY, F. G., PARSONS, K., VALENT, B. 1986. Genetic Determinants of Pathogenicity and Host Specificity in *Pyricularia*. J. Cell Biochem. Suppl. 10C, p 4 Cooke W. Bridge. 1979. The Ecology of Fungi. Press, Inc. pg: 11-17
- CORELL, J. C., PUHALLA, J. E. and SCHNEIDER, R.W. 1986. Identification of Fusarium oxysporum f. sp. apii on the Basis of Colony Size, Virulence and Vegetative Compatibility. Phytopathology, 76:396-400
- CORELL, J. C., PUHALLA, J. E. and SCHNEIDER, R.W. 1987. Nitrate Nonutilizing Mutants of Fusarium oxysporum and Their Use in Vegetative Compatibility Tests. Phytopathology, 77:1640-1646

- CROWHURST N. ROSS, HAWTHORNE T. BRAIN, RIKKERINK H. A. ERIK and TEMPLETON D. MATTHEW 1991. Differentiation of Fusarium solani f.sp. cucurbitae Races 1 and 2 by Random Amplification of Polymorphic DNA. Curr. Gen., 20: 391-396
- DEVOS, K. M and GALE, M. D. 1992. The Use of Random Amplified Polymorphic DNA Markers in Wheat. Theor. Appl. Genet. 84: 567-572
- ELIAS, K. S. and SCHNEIDER, R. W. 1991. Vegetative Compatibility Groups in Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici. Phytopathology, 81:159-162
- ERLIC, A. H., GELFAND, D. and SNINSKY, J. J. 1991. Recent Advances in The Polymerase Chain Reaction. Science, 252: 1643-1650
- FRY, W.E., YODER, O.C., APPLE, A. E. 1984. Influence of Naturally Occuring Marker Genes on the Ability of Cochliobolus Herostrophus to Induce Field Epidemics of Southern Corn Leaf Blight. Phytopathology, 74:175-178
- GORDON, W. L. 1960 The Taksonomy and Habitats of Fusarium Species From Tropical and Temperate Regions. Can. J. Bot., 38: 643-658
- GRAHAM, C. G., MAYERS P. and HENRY J. H. 1994. A Simplified Method for the Preperation of Fungal Genomic DNA for PCR and RAPD Analysis. Bio. Tech. Vol.16. No 1
- GRAJAL-MARTIN, M., SIMON, C. J. and MUEHLBAUER, F. J. 1993. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to Characterize Race 2 of Fusarium oxysporum f.sp. lisi. Phytopathology, 83:612-614
- GRIFFINI, H. DAWID and WILEY JOHN. 1981. Chemistry of the Fungal Cell and Molecular Architecture. Fungal Physiology, Inc, NY pg:18-68
- HADRYS, H., BALICK, M. and SCHIERWATER, B. 1992. Applications of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Molecular Ecology. Molecular Ecology, 1:55-63

- JACOBSON, D. J. and GORDON, T. R. 1988. Vegetative Compatibility and Self Incompatibility within Fusarium oxysporum f.sp. melonis. Phytopathology, 78:668-672
- JACOBSON, D. J. and GORDON, T. R. 1991. Fusarium oxysporum f.sp. melonis: A Case Study of Diversity Within A Formae Speciales. Phytopathology, Vol. 81, No 9:1064-1067
- KATAN, T. and KATAN, J. 1988. Vegetative-compatibilty Grouping of Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum from Tissue and the Rhizosphere of Cotton Plants. Phytopathology 78:852-855
- KAZAN, K., J. M. MANNERS and D. F. CAMERON. 1993. Genetic Variation in Agronomically Important Species of Stylosanthes Determined Using Random Amplified Pymorphic DNA. Ther. Appl. Genet. 85:882-888
- KELLEY, A., A. R. ALCALA-JIMENEZ , B. W. BAINDBRIDGE, J. B.HEAL, E.PEREZ-ARTES and R. M. JIMENEZ-DIAZ. 1994. Use of Genetic Fingerprinting and Random Amplified Pymorphic DNA to Cahacterize Pathotypes of Fusarium oxysporum f.sp. ciceris Infecting Chickpea Phytopathology, 84:1293-1298
- KIM, D. H.,MARTYN, R. D. and MAGILL, C. W. 1992. Restriction Fragment Length Polymorphism Groups and Physical Map of Mitochondrial and Ribosomal DNA from Fusarium oxysporum f.sp. niveum. Phytopathology, 82:346-353
- KISTLER, H. C. and MOMOL, A. E. 1992. Molecular Genetics of Plant Pathogenic Fusarium oxysporum. Fusarium Wilt of Banana, p. 49
- KISTLER, H. C., BOSLAND, P. W., BENNY U. LEONG, S. and WILLIAMS, P. H. 1987. Relatedness of Strains of Fusarium oxysporum from Crucifers Measured by Examination of Mitochondrial and Ribosomal DNA. Phytopathology, 77: 1289-1293
- LESLIE F. JOHN. 1992. Genetic Exchange Within Sexual and Asexual Populations of The Genus Fusarium. Fusarium Wilt of Banana, pg. 37

- LI, W. H. 1981. Simple Method for Constructing Phylogenetic Trees from Distance Matrices Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1085-1090
- MANICOM, B. Q., BAR-JOSEPH, M., ROSNER, A., VIGODOSKY-HAAS, H. and KOTZE, J. M. 1987. Potential Applications of Random DNA and Restriction Fragment Length Polymorphism in the Taxonomy of the *Fusaria*. Phytopathology, 77:669-672
- MANICOM, B. Q., BAR-JOSEPH, M. and BECKER, M. M. 1990. A Restriction Fragment Length Polymorphism Probe Relating Vegetative Compatibility Groups and Pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f.sp.*dianthi*. Phytopathology, 80: 336-339
- MANULIS, S., KOGAN, N., REUVEN, M. and BEN-YEPHET, Y. 1994. The Use of the RAPD Technique for Identification of *Fusarium oxysporum* f.sp.*dianthi* from Carnation. Phytopathology, 84:98-101
- MICHELMORE, R. W. and HULBERT, S. H. 1987. Molecular Markers for Genetic Analysis of Phytopathogenic Fungi. Ann. Rev. Phytopathology, 25:383-404
- MOMOL, E. A. and KISTLER, H. C. 1992. Mitochondrial Plasmids do not determine Host Range in Crucifer-Infecting Strains of *Fusarium oxysporum*. Plant Pathology, 41:103-112
- MULLIS, B. K., FERRE, F. and GIBBS, A. RICHARD. 1994. The Polymerase Chain Reaction (PCR). N.Y.
- PERKINS, D. D. 1975. The Use of Duplication-Generating Rearrangements for Studying Heterokaryon Incompatibility Genes in *Neurospora*. Genetics, 80:87-105
- PETERSON, S. W. 1991. Phylogenetic Analysis of *Fusarium* Species Using Ribosomal RNA Sequence Comparisons. Phytopathology, 81:1051-1054
- PLOETZ, R. C. 1988. Vegetative Compatibility Among Races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Plant Disease, 72:325-328

- PUHALA, E. John. 1980. Genetic Consideration of the Genus Fusarium Genetics and Cytology: General. pg. 291-305
- QUELLET, I. and K. A. SEIFERT. 1993. Genetic Characterization of Fusarium graminearum Strains Using RAPD and PCR Amplification. Phytopathology, 83:1003-1007
- RAEDER, U., BRODA, P. 1985. Rapid Preparation of DNA From Filamentous Fungi. Letters in Applied Microbiology, 1:17-20
- RISSE, G. and MAS P. 1965. Mise en Evidence de Plusieurs Races de Fusarium oxysporum f.sp. melonis. Ann. Amélior. Plantes, 15: 405-408
- RISSE, G., MAS P. and RODE, J.C. 1969. Mise en évidence et caractérisation d'une quatrième race de Fusarium oxysporum f.sp. melonis. Duxième Congrès de l'Union phytopathologique Méditerranéenne. Ann. Phytopathol. no hors série, 1: 217-229
- RISSE, G., BANIHASHEMI Z. and DAVIS D.W. 1976. A Proposed Nomenclature of Fusarium oxysporum f.sp. melonis Races and Resistance Genes in Cucumis melo. Phytopathology, 66: 1105-1106
- ROHLF, F. J. 1988. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NSTYS) Version 1.70. Department of Ecology and Evolution. State University of New York. NY 11794-5245
- SYNDER, W. C. and HANSEN, H. N. 1940. The Species Concept in Fusarium. Ann. J. Bot., 27:64-67
- TINGEY, V. SCOTT, J. ANTONI RAFALSKI, JOHN G. and K. WILLIAMS. 1992. Genetic Analysis with RAPD Markers. Joint Plant Breeding Symposia Series.
- WAUGH, R. and POWELL, W. 1992. Using RAPD Markers for Crop Improvement. Tibtech 10:186-191

- WEEDEN, N. F. and H. HAMMET 1992. *Malus domestica*, Apple. In: S. J. O'Brien. Genetic maps. 6 th ed. Cold Spring Harbor Lab. N.Y.
- WELSH, J. and McCELLAND, M. 1990. Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers. Nucleic Acid Research , 18: 7213-7218
- WENSLEY, R.N., and McKEEN, C.D. 1962. Rapid Test for Pathogenicity of Soil Isolates of Fusarium oxysporum fsp melonis. Can. Jour Microbiol., 8:818-819
- WILLIAMS, J. G. K, RAFALSKI, J.A. and TINGEY, S.V. 1992. Genetic Analysis Using RAPD Markers. Methods in Enzymology, 155:335-350
- WINDELS, C. E. 1991. Current Status of Fusarium Taxonomy. Phytopathology, 81:1048- 1051
- ZHANG, D., QIU, J., SHELBY, R.A. and TUZUN, S 1994. DNA Amplification Fingerprinting of Isolates from Different Vegetative Compatibility Groups of Fusarium moniliforme (Abstract) APS Annual Meeting

ÖZGEÇMİŞ

Kader YAGIZ 1971 yılında Adana'nın Ceyhan ilçesinde doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Ceyhan'da tamamladı. 1988 yılında girdiği Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden 1992 yılında Biyolog olarak mezun oldu. Aynı yıl, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. 1993-1994 öğretim yılında Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. Eylül 1993-Haziran 1995 yılları arasında, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı.