T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ASPİR BİTKİSİNDE *PUCCINIA CARTHAMI*'NİN TEŞHİSİ İÇİN MOLEKÜLER YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

MUTLU ŞEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. SEMRA HASANÇEBİ

EDİRNE-2023

MUTLU ŞEN'in hazırladığı "ASPİR BİTKİSİNDE *PUCCINIA CARTHAMI*'NİN TEŞHİSİ İÇİN MOLEKÜLER YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir **Yüksek lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri İmza

Prof. Dr. Semra HASANÇEBİ

Prof. Dr. Neslihan TURGUT KARA

Dr. Öğr. Üyesi Şebnem BUKAVAZ

Tez Savunma Tarihi: 19/01/2023

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Semra HASANÇEBİ İmza

Tez Danışmanı ……

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

……

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

19/01/2023

Mutlu ŞEN

Yüksek Lisans Tezi

Aspir Bitkisinde *Puccinia carthami*'nin Teşhisi İçin Moleküler Yöntem Geliştirilmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Bu araştırma, ülkemizde üretilen önemli yağ bitkilerinden biri olan aspirde (*Carthamus tinctorius* L.) pas hastalığına neden olan *Puccinia carthami* fungusunun teşhisi için PCR'a dayalı moleküler yöntemlerin geliştirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında fungusların moleküler tanısında yaygın olarak kullanılan ITS bölgesi ve *β-tubulin* geni hedef alınmıştır. Bunun için NCBI da bulunan Puccinia türlerinin ITS bölgesi ve *β-tubulin* gen dizileri kullanılmış, diziler bioedit programı aracılığı ile hizalanarak türe spesifik varyasyonun en fazla olduğu bölgeler tespit edilmiştir. Ardından varyasyon bölgesini çoğaltacak biçimde ortak dizilere özgü primerler tasarlanmıştır. Tez kapsamında 2 ITS (Pc.ITS-1 ve Pc.ITS-2) ve 1 *β*-tubulin (Pc.β-tub) primer çifti tasarlanıp kullanılmıştır. Bunlara ek olarak daha önce bölümümüzde yürütülen TÜBİTAK 2209A-Lisans projesi kapsamında *P.tiriticina* için tasarlanan ITS (Pt.ITS) ve β-tubulin (Pt.β-tub) primer çifti ile literatürde ayırıcı olduğu rapor edilen RA68 primeri de çalışmaya dahil edilmiştir. İncelenen primer çiftlerinin *P.carthami*'nin teşhisi için kullanılabilir olup olmadıkları bölgemizde gözlenen farklı fungal bitki patojenlerinde tarama yapılarak tespit edilmiştir. Tarama için *Puccinia triticina, Ustilago, Phoma spp., Fusarium graminearum, Fusarium culmorum, Plasmaphora halstedi, Pyrenophora f. teres*, *Cochliobolus sativus*, *Macrophomina phaseolina fungusları kullanılmıştır*.

Sunulan tez çalışması kapsamında *P.carthami*'ye özgü tasarlanan primerlerden *P*c.β-tub primeri *P.carthami* ve *P.triticina*'da aynı büyüklükte bantlar verirken çalışılan diğer patojenlerden ayrımı sağlanmıştır. Pt.β-tub primeri ise *P.carthami*'de herhangi bir

DNA fragmenti çoğaltmamıştır. ITS bölgesine özgü tasarlanan primerlerden Pc.ITS-1 primer çiftinin birden fazla DNA fragmenti çoğaltımı ile hedef dışı genom bölgelerine de bağlanabildiği ancak *P.carthami'*ye özgü çoğalttığı 302 bç'lik DNA fragmenti ile de moleküler teşhis için kullanılabileceği görüşüne varılmıştır. Pc.ITS-2 primer çiftinde ise *P.carthami'*de çoğaltılan 364 bç ve 445 bç uzunluklarında 2 DNA fragmentinin teşhis için kullanılabileceği tespit edilmiştir. Bir diğer ITS bölgesi primeri olan Pt.ITS ise belirgin bir şekilde *P.carthami* ve *P.triticina*'yı kendi aralarında ve diğer patojenlerden ayırmıştır. Kullanılan tüm primerler arasında moleküler teşhis için en umut verici olan Pt.ITS primer çifti olmuştur. Ön bulgular bu primer çiftinin *Puccina* türlerine özgü ve türleri birbirinden ayırıcı nitelikte olabileceğini göstermektedir. Bunu doğrulamak için daha fazla *Puccinia* türü ile çalışmanın genişletilmesi gerekmektedir. Liretaürde *P.triticina* için rapor edilmiş RA68 primer çifti ile elde edilen sonuçlar ise RA68'in *P.triticina* için moleküler teşhiste kullanılabilirliği doğrulanmıştır. Bunun yanında *P.carthami*'de elde edilen 388 ve 452 bç uzunluğunda 2 DNA fragmentinin, *P.carthami*'de moleküler teşhis için alternatif olabileceği görüşüne varılmıştır.

Sonuç olarak tez çalışmasında test edilen 6 primerden Pc.ITS-1 ve Pc.ITS-2, sadece *P.carthami* için ayırıcı iken Pt.ITS ve RA68 her iki Puccinia türü için de spesifik DNA fragmentleri üretmiştir. Böylece *P.carthami*'nin klasik yöntemlere göre hızlı ve tam teşhisini mümkün kılacak moleküler yöntem geliştirilmiştir.

Yıl : 2023

Sayfa Sayısı : 67

Anahtar Kelimeler : *Puccinia carthami*, aspir, yağlık bitkiler, pas hastalığı, DNA, Moleküler tanılama, Markır, Mantar

Master Degree Thesis

Development of Molecular Method for Diognosis of *Puccinia carthami* in Safflower Plant

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

This research was carried out in order to develop PCR-based molecular methods for the diagnosis of *Puccinia carthami* fungus, which causes rust disease in safflower (Carthamus tinctorius L.), one of the important oil plants grown in our country. Within the scope of the thesis, the ITS region and *β-tubulin* gene, which are widely used in the molecular diagnosis of fungi, were targeted. For this, the ITS region and β-tubulin gene sequences of *Puccinia* species found in NCBI were used, and the regions with the highest species-specific variation were determined by aligning the sequences via the bioedit program. Then, primers specific to common sequences were designed to amplify the region of variation. Within the scope of the thesis, 2 ITS (Pc.ITS-1 and Pc.ITS-2) and 1 *β-tubulin* (Pc.β-tub) primer pairs were designed and used. In addition to these, ITS (Pt.ITS) and *β-tubulin* (Pt.β-tub) primer pair designed for *P.tiriticina* within the scope of the TÜBİTAK 2209A-License project previously carried out in our department, and the RA68 primer, which was reported to be distinctive in the literature, were also included in the study. Whether the examined primer pairs can be used for the diagnosis of *P.carthami* was determined by screening different fungal plant pathogens observed in our region. For screening, *Puccinia triticina*, *Ustilago*, *Phoma* spp., *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Plasmaphora halstedi*, *Pyrenophora* f. *teres*, *Cochliobolus sativus*, *Macrophomina phaseolina* fungi were used.

Within the scope of the presented thesis, Pc.β-tub primer, one of the primers designed specifically for *P.carthami*, gave bands of the same size in *P.carthami* and P.triticina, while distinguishing them from other pathogens studied. Pt.β-tub primer did

not amplify any DNA fragments in *P.carthami*. It was concluded that Pc.ITS-1 primer pair, one of the primers designed specifically for ITS region, can bind to non-target genome regions by amplifying more than one DNA fragment, but it can also be used for molecular diagnosis with a 302 bp DNA fragment amplified specifically for *P.carthami*. In the Pc.ITS-2 primer pair, it was determined that 2 DNA fragments of 364 bp and 445 bp lengths amplified in *P.carthami* could be used for diagnosis. Another ITS region primer, Pt.ITS, distinctly separated *P.carthami* and *P.triticina* among themselves and from other pathogens. Of all the primers used, the Pt.ITS primer pair was the most promising for molecular diagnostics. Preliminary findings suggest that this primer pair may be specific to *Puccina* species and may be species discriminating. To confirm this, the study needs to be expanded with more *Puccinia* species. The results obtained with the RA68 primer pair reported for *P. triticina* in the literature confirmed the usability of RA68 in molecular diagnosis for *P. triticina*. In addition, it was concluded that 2 DNA fragments with a length of 388 and 452 bp obtained in *P.carthami* could be an alternative for molecular diagnosis in *P.carthami*.

As a result, Pc.ITS-1 and Pc.ITS-2 of the 6 primers tested in the thesis study were distinctive only for *P.carthami*, while Pt.ITS and RA68 produced specific DNA fragments for both Puccinia species. Thus, a molecular method has been developed that will enable rapid and complete diagnosis of *P.carthami* according to classical methods.

Year : 2023

Number of Pages :67

Keywords : *Puccinia carthami*, safflower, oil seeds, rust, DNA, Molecular Diognosis, Marker, Fungi

ÖNSÖZ

Ulu Önder Mustafa Kemal ATATÜRK' ün de dediği gibi "Milli ekonominin temeli tarımdır".

Aspir bitkisi, dikenli yapısından dolayı ülkemizde üretimi çok fazla artış göstermemiş bir bitki olmasına karşın, ithal edilen yağ bitkilerinin azaltılması, yağlık bitki ihtiyacımızın karşılanması için önemli bir alternatif olmaya adaydır. Yağ kalitesi zeytin yağıyla neredeyse eş değer olan bu bitkinin ülkemiz yağ ihtiyacının karşılanması için çok önemlidir.

Tarımda, çeşit geliştirmenin yanında hastalık ve zararlılarla mücadele etmek gerekliliktir. Bu çalışma ile aspir bitkisinde önemli verim kayıplarına yol açan *P.carthami*'nin moleküler teşhisi için çalışmalar yapılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Tez çalışmam boyunca, öncelikle her türlü konuda yardımını esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren Prof. Dr. Semra HASANÇEBİ' ye, patojenlerin tedariği için her türlü yardımı sağlayan Önder Baytekin'e (Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü), çalışmalarımızda her türlü imkânı sağlayan Yalçın KAYA'ya emekleri için teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans dönemim boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen babam Keramettin ŞEN ve annem Hidayet ŞEN'e, her türlü desteği ile yanımda olan Didem KURTUL'a ve laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemen Emrah AKPINAR, Alperen DİLEKLİ, Metin Burak TATLISES, Elifgül AKSU ve İlayda KÜÇÜK'e teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TÜBAP 2021/157 numaralı proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBAP Birimi'ne teşekkür ederim.

Mutlu ŞEN, 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv
ABSTRACT vi
ÖNSÖZ viii
İÇİNDEKİLER ix
SİMGELER VE KISALTMALAR xi
ÇİZELGELER DİZİNİ xiv
BÖLÜM 1 1
GİRİŞ 1
BÖLÜM 2 5
2.1. Kuramsal Temeller ve Kaynak Araştırması 5
2.2. Fungal Patojenlerin Teşhisi 8
2.3. Fungal Patojenlerin Geleneksel Teşhisinde Kullanılan Araçların Gelişimi 9
2.4. Moleküler Teşhis Araçlarının Gelişimi 10
2.5. Fungal Fitopatojenlerin PCR'a Dayalı Moleküler Teşhis İçin Hedef Bölgeler 11
2.6. Puccinia Türlerinin Moleküler Teşhisi 13
BÖLÜM 3 18
MATERYAL VE METOT 18
3.1.Patojen Kaynaklarının Elde Edilmesi 18
3.1.1.Puccinia carthami'nin Eldesi 18
3.1.2.Tarama Amaçlı Fungal Bitki Patojenlerinin Eldesi 19
3.2.Moleküler Teşhis Yönteminin Geliştirilmesi 20
3.2.1. DNA Ekstraksiyonu İçin Doku Parçalama 20
3.2.2.Etüv'de Kurutularak Sporların Parçalanması 20

3.2.3. Havanda Dövülerek Sporların Parçalanması 20
3.2.4. Homojenizasyon Cihazı ile Hücrelerin Parçalanması 20
3.2.5. Beat Beating Yöntemi ile Hücrelerin Parçalanması 21
3.3. Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu 21
3.3.1.Kit1 ile DNA Ekstraksiyonu 21
3.3.2.Kit2 ile DNA Ekstraksiyonu 23
3.4. *P. carthami*'nin Teşhisi İçin Kullanılan Primerler 24
3.4.1. Pc.ITS Primerlerinin Tasarımı 24
3.4.2. Pc.β-tub Primerinin Tasarımı 24
3.4.3. Diğer Primerler 28
BÖLÜM 4 33
BULGULAR 33
4.1. Etkin Parçalama Yönteminin Belirlenmesi 33
4.2. Farklı Ekstraksiyon Kitlerinin Karşılaştırılması 35
4.3. *P.* carthami'nin Moleküler Teşhisi 36
4.3.1. *β-tubulin* genine özgü primerle PCR 36
4.3.2. ITS bölgesine özgü primerle PCR 38
4.3.3. RA68 primeri ile PCR 42
BÖLÜM 5 44
TARTIŞMA ve ÖNERİLER 44
KAYNAKLAR 48
ÖZGEÇMİŞ 52

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

bç(bp) : Baz çifti

kbç(kbp) : Kilobaz çifti

mg : Miligram

ha : Hektar

mm : Milimetre

µm : Mikrometre

ml : Mililitre

µl : Mikrolitre

mM : Milimolar

µM : Mikromolar

rpm : Rounds Per Minute (Dakikadaki devir sayısı)

°C : Santrigrat derece

V : Volt

% : Yüzde

Kısaltmalar

DNA : Deoksiribonükleik asit

FISH : Floresan in-situ hibridizasyon

gDNA : Genomik DNA

LAMB : Döngü aracılı izotermal amplifikasyon

NASBA : Nükleik asit sekansı tabanlı amplifikasyon

PCR : Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)

RCA : Rolling Circle Amphilication (Yuvarlak daire amplifikasyonu)

RNA : Ribonükleik Asit

SSR : Basit Tekrar Dizileri

TTAE : Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. 2001-2021 yılları aspir üretiminde öncü ülkeler (FAOSTAT 2023).....2
Şekil 1.2. White ark. (1990) Saccharomyces cerevisiae'dan yapmış oldukları çalışmada tanılama için kullandıkları gen bölgeleri ve primer tasarımları.....3
Şekil 2.1. Aspir bitkisinin fizyolojik evrelerine göre zararlılara karşı hassasiyeti (Kaffa & Kearney, 1998).....6
Şekil 2.2. P.arthami'nin yaşam döngüsü.....8
Şekil 2.3. Moleküler teşhis araçları.....11
Şekil 2.4. Fitopatojen funguslarda ITS ve IGS bölgeleri (Kuzdraliński ve ark. 2017).....13
Şekil 3.1. Aspir yaprağından Puccinia carthami'nin elde edilmesi.....18
Şekil 3.2. Petrilere ekimi yapılan patojenler, besi yerlerinde gelişim göstererek hifler oluşturmuştur. Hifler spatül yardımıyla 2 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Arpa Beyaz Kök Çürüklüğü hifleri Fusarium spp. (sol) ve F. culmarum hifleri (sağ).....19
Şekil 3.3. Puccinia türlerine ait ITS dizilerinin hizalanması, tasarlanan Pc.ITS-1, Pc.ITS-2 ve Pt.ITS primerlerinin bağlanacağı bölgeler 26
Şekil 3.4. Puccinia türlerine ait β-tubulin gen dizilerinin hizalanması, tasarlanan Pc.β-tub forward ve reverse primerlerinin bağlanacağı bölgeler 27
Şekil 4.1. Etüvde kurutma ve sıvı azotla havanda dövme yöntemi sonuçları (orta), havanda ve RETSCHEZ MM300 yönteminde elde edilen gDNA (sol), Beat Beating yönteminden elde edilen gDNA (sağ).....34
Şekil 4.2. *P.carthami* sporları, Beat Beating ile parçalama öncesi (sol) sonrası (sağ) ..34
Şekil 4.3. Farklı PCR yöntemleri ve farklı primerler ile 2 ticari kitin karşılaştırılması .35
Şekil 4.4. *β-tubulin* genine tasarlanan Pc.β-tub primer çifti ile yapılan PCR ürünleri ...36
Şekil 4.5. Pc.β-tub primerile yapılan PCR ürünlerinin kapiller elektroforez sonucu 37
Şekil 4.6. Pt.β-tub primeri ile elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 38
Şekil 4.7. Pc.ITS-1 primeri ile elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....39
Şekil 4.8. Pc.ITS-1 primeri ile yapılan PCR ürünlerinin kapiller elektroforez sonucu ..39
Şekil 4.9. Pc.ITS-2 primeri ile elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....40
Şekil 4.10. Pc.ITS-2 primeri ile yapılan PCR ürünlerinin kapiller elektroforez sonucu 40
Şekil 4.11. Pt.ITS primeri ile elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....41

Şekil 4.12. Pt.ITS primeri ile yapılan PCR ürünlerinin kapiller elektroforez sonucu 42
Şekil 4.13. RA68 primeri ile elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüsü 43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Aspir ve diğer bitki tohumlarının yağ asidi miktarları (Gilbert ve ark. 2008) 2
Çizelge 3.1. P.carthami'nin moleküler teşhisi için kullanılan primerler 28
Çizelge 3.2. Pc.ITS-1 için PCR içerik ve koşulları.....29
Çizelge 3.3. Pc.ITS-2 için PCR içerik ve koşulları.....29
Çizelge 3.4. Pc.β-tub için PCR içerik ve koşulları 30
Çizelge 3.5. Pt.β-tub için PCR içerik ve koşulları 30
Çizelge 3.6. Pt.ITS için PCR içerik ve koşulları.....31
Çizelge 3.7. RA68F için PCR içerik ve koşulları 31

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Aspir bitkisi kapalı tohumlar bölümü, çift çenekliler takımı, *Asteraceae* (papatyagiller familyasına) ailesinin *Carthamus* L. (deve dikeni) cinsine bağlı *Carthamus tinctorius L.* isimli bir türüdür (National Plant Data Center USDA 2000). Aspir bitkisinin fenotipik özelliklerine bakacak olursak ülkemizde genellikle yerden yüksekliği 80-100 cm'dir. Yabani ve kültürel formlarında farklı renklere sahip çiçekleri vardır (kırmızı, turuncu, sarı, beyaz vb.). Aspir bitkisi iklim ekiliş tarihi ve toprak yapısına bağlı olarak 20-180 dal oluşturabilen ve her dalın ucunda içerisinde 30-50 adet tohum üretebilen çiçek tablasına sahiptir. Kök sistemi olarak kazık köklere ve onu destekleyen kılcal köklere sahiptir. Ayrıca bitkinin dikenli ve dikensiz çeşitleri mevcuttur (Kaffka & Kearney, 1998).

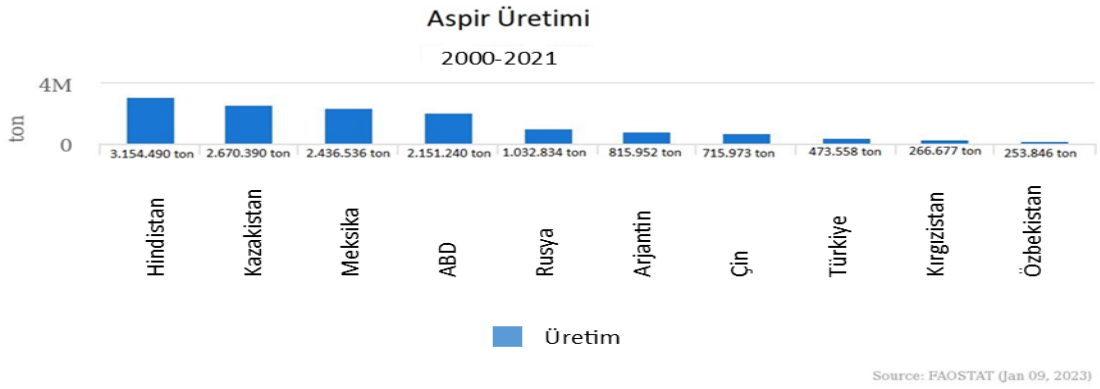
Aspir bitkisi dünya üzerinde 2021 yılında 850.431 ha alana ekimi yapılan 631.051,6 ton üretimi ile önemli bir endüstriyel bitkisidir (FAOSTAT 2021). Aspir bitkisinin çiçeğinden faydalanarak boya sanayinde kullanımı söz konusu iken tohumundaki yağ miktarı %35- %48 (Geçit, Çiftçi, Emeklier, İkincikarakaya, Adak, Kolsarıcı & Sevimay, 2009) ve kalitesi sofralık ve gündelik olarak tüketimi son derece sağlıklıdır. Olgunluk süresi 110-140 gün arasındadır. Yazlık ekim olarak kullanılır yani uzun gün bitkisidir. Su stresine mukavemetli yüksek bir bitki olduğundan dolayı ve mikro ve makro element istekleri düşük olduğundan dolayı kıraç bölgelerde kara nadas yerine alternatif olarak kullanılabilir bir üründür (Babaoğlu, 2017). Çiçeklerinde bulunan carthamin ve carthamidin maddesi sayesinde tekstil ve gıda sanayisinde boya maddesi olarak kullanılır. Daha sonradan sentetik boyaların üretiminin artmasıyla birlikte aspir çiçeklerinin kullanımı boya sanayisinde azalmıştır (Babaoğlu, 2013).

Doymamış yağ asitleri yağdaki kaliteyi belirlerken aspirin yağ kalitesi oranını bazı emsal tek yıllık ve çok yıllık yağ bitkilerle kıyaslamamız mümkündür. Bu bitkilere verebileceğimiz örneklerden birisi gündelik hayatımızda en çok kullandığımız ayçiçeği yağı ve zeytin yağıdır. Üretim yılları çevresel faktörlere göre ve yetiştirildiği bölgeye değişebildiği gibi 2008'de yapılan bir çalışmaya göre, Çizelge 1.1'de de görülebileceği gibi aspir bitkisindeki doymamış yağ asitleri (linoik ve oleik yağ asitleri) karşılaştırıldığında belirgin fark görülmektedir (Gilbert, Knights, & Potter, 2008).

Çizelge 1.1. Aspir ve diğer bitki tohumlarının yağ asidi miktarları Gilbert vd. (2008)

Yağ asitleri		Aspir		Kanola	Soya	Mısır	Ayçiçeği	Fıstık	Zeytin
Çeşit	İsim	Oleik	Linoleik						
14:0	—	—	—	0.75	0.1	—	—	0.1	—
16:0	Palmitik	5	5–7	4.0	10.8	11.4	6.0–7.0	10.0	11.0
18:0	Stearik	<1	2	1.6	4.0	1.9	4.0–5.0	2.3	2.2
20:0	—	—	—	0.5	—	—	—	—	—
22:0	—	—	—	0.4	—	—	—	—	—
Toplam doymuş	—	7.0	10.4	6.0–9.0	15.1	13.3	10.8	17.8	13.5
16:1	—	—	—	0.25	0.2	—	—	0.1	0.8
18:1	Oleik	77	15	61.0	23.8	25.3	17.0–20.0	47.1	75.8
20:1	—	—	—	1.5	0.2	—	—	1.4	0.3
22:1	—	—	—	0.2	—	—	—	—	—
Toplam tekli doymamış		77	15	61.0–64.0	24.3	25.3	20.4	48.6	77.1
18:2	Linoleik	15	77	19.0–26.0	53.3	60.7	68.8	33.6	8.3
18:3	Linolenik	—	—	8.0–13.0	7.1	0.7	—	—	0.6
Toplam çoklu doymamış		15	77	27.0–35.0	60.6	61.4	68.8	33.6	8.8

Türkiye aspir üretimi konusunda dünya üzerinde önemli bir yere sahiptir (Şekil 1.1). Dünya aspir üreticileri arasındaki yerini 2001-2021 yılları arasında toplam 473540 ton ile 8. sırada yer almıştır. Türkiye aspir üretimi konusunda potansiyeli yüksektir.

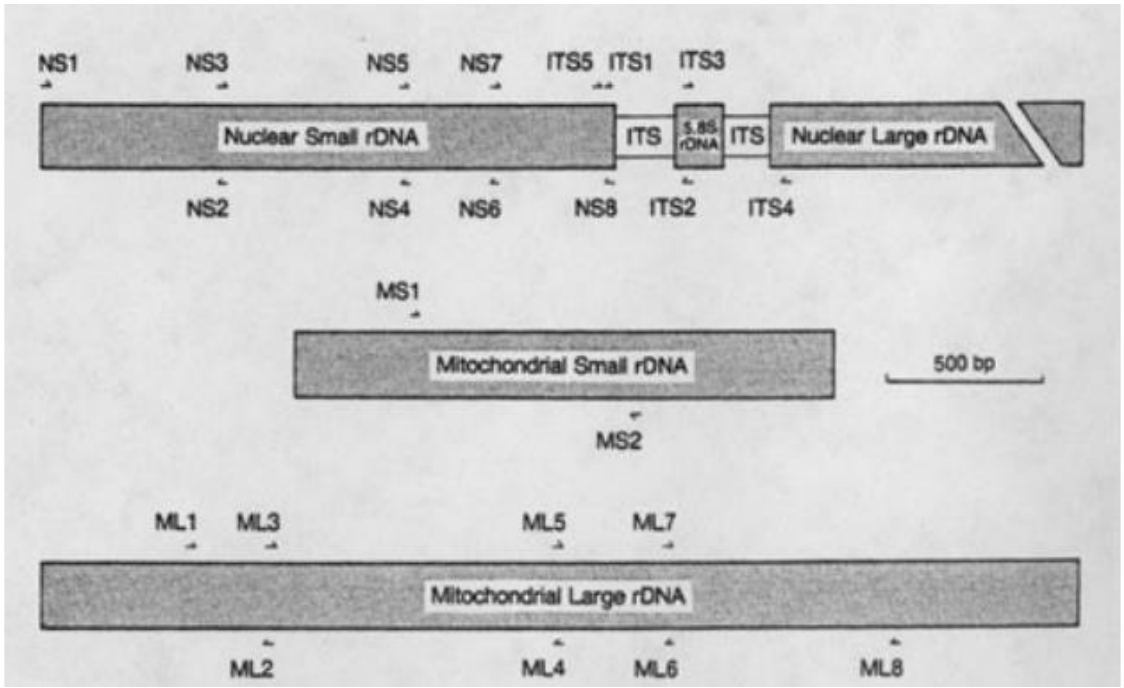


Şekil 1.1. 2001-2021 yılları aspir üretiminde öncü ülkeler (FAOSTAT 2023)

Ülkemizde ve dünyada ıslah edilmesi verim kapasitesinin arttırılmasıyla ayçiçeği üretimine alternatif olarak kullanılabilecek önemli bir endüstri bitkisidir. Bununla birlikte verim kapasitesinin yükseltilmesi hedeflenirken verim kapasitesini düşüren zararlılarla da mücadele edilmesi gerekmektedir. Bu zararlıların başında da aspir pası olan *Puccinia carthami* gelmektedir. Türkiye'de *P. carthami* üzerine yapılan çalışmalar, yüzeysel kalmış ve moleküler düzeyde incelenmesi yapılmamıştır.

Klasik yöntemlerle yapılan çalışmalar genellikle aldatıcı olabildiği gibi kesin yargılarla doğrulamak bazen mümkün olmayabilmektedir. Bunun temel sebebi gözlemlenen patojenin ya da canlının benzer morfolojik özelliklere sahip farklı türlerden ayırt edilmesindeki zorluklar veya çevresel koşullarla morfolojik özelliklerin farklılık gösterebilme olasılığıdır. Bununla birlikte moleküler düzeyde incelenme, daha hassas ve doğru sonuçların elde edilmesini sağlamaktadır (Koch, Kellerhals, & Gessler, 2000)**.**

Moleküler teşhis ve tanılama DNA sekanslamalarıyla birlikte önemli bir ivme kazanmıştır. Bu ivme ile patojenlerin hangi türe mensup oldukları hangi aileden oldukları hatta ırk düzeyinde moleküler olarak incelenmesine olanak tanımıştır. Bununla birlikte fungusların moleküler teşhisine yönelik yapılan ilk çalışmalardan bir olan (White, Bruns,



Şekil 1.2. White ark. (1990) *Saccharomyces cerevisiae*'dan yapmış oldukları çalışmada tanılama için kullandıkları gen bölgeleri ve primer tasarımları

Lee, & Taylor, (1990) funguslarda ribozomal RNA (rRNA)'yı kodlayan genlerin analizini yapmıştır. Bu çalışmayla birlikte rRNA'nın (16S gibi) daha yavaş evrildiği için uzak akrabalık teşhisinde, nispeten daha hızlı gelişen mitokondriyal rRNA (mrRNA) takım veya aile teşhisi ve sınıflandırılmasını keşfetmiştir. Aynı zamanda ITS bölgesinin de cins ve türler arasında farklılığı ortaya koymada kullanılabileceğini keşfetmiştir (White ve ark. 1990) **(**Şekil 1.2.).

Moleküler teşhiste bu gelişmeyle birlikte filogenetikte önemli bir adım atmışlar ve yapılan çalışmalarda doğruluk payını moleküler düzeyde yükseltmişlerdir. Dayanıklılık ve popülasyonda farklılık gösteren patojenlerin ayrımı kolaylaşmıştır. Dayanıklılık gösteren patojenlere özgü direnç ve savunma mekanizmalarının geliştirilmesinde olanak sağlamıştır.

Bu tez çalışmasında aspir bitkisinde önemli verim kaybına yol açan *P. carthami*'ye özgü ayrımını sağlayacak genom bölgeleri olarak seçilen ITS ve Beta-tubulin genine özgü primer tasarlanmıştır. Bu sayede aspir bitkisinde *P. carthami'nin* hızlı ve kolay teşhisini sağlayacak moleküler yöntemin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

BÖLÜM 2

2.1. Kuramsal Temeller ve Kaynak Araştırması

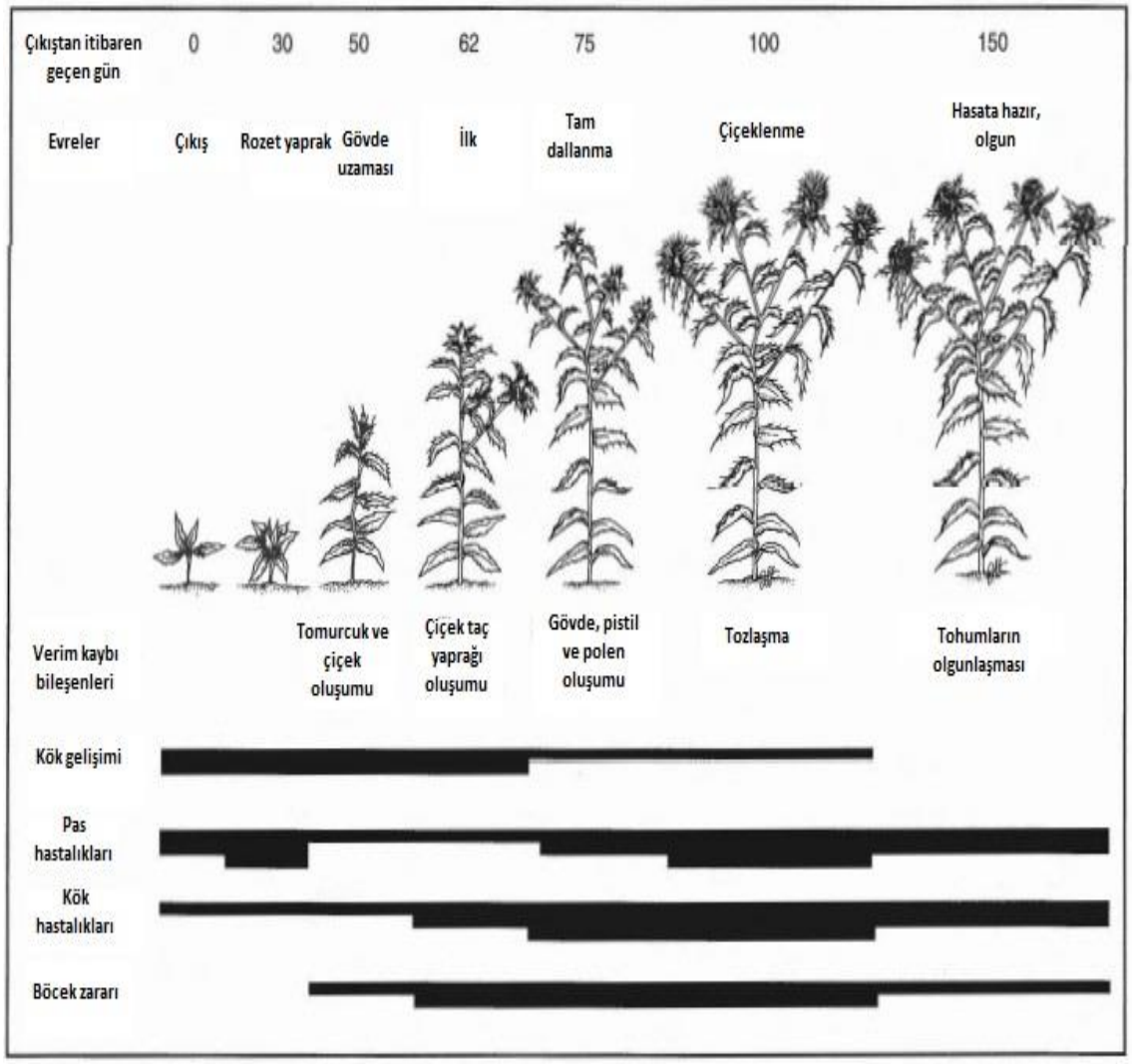
Güney Asya orjinli olan aspir bitkisi tarih öncesi zamanlarda İran, Hindistan, Çin Mısır, Akdeniz'e kıyısı olan bölgelerde ekimi yapılmıştır. Ortaçağda ise Avrupa kıtasında üretimine başlanmış, Amerika kıtasının keşfedilmesi ile birlikte Amerika'ya taşınmıştır (Babaoğlu, 2017). Doğada kolayca uyum sağlayabilmesi, kıraç yerlerde yetişebilmesi, su ihtiyacının çok olmaması, dikenli formaları sayesinde diğer canlılara karşı korunmuş ve neslini devam ettirmiştir.

Aspir bitkisinin Türkiye'ye gelişi Türk boylarının orta Asya'dan göç etmesiyle yanlarında getirmesiyle başlamış daha sonra yakın tarihe geldiğimizde ise 1940-1945 yılları sırasında Bulgaristan'dan gelen göçmenlerle dikenli varyasyonlarının geldiği bilinmektedir. Bununla birlikte 1930 yılında ilk aspir çeşidi tescillenmiş 1977 yılına kadar yeni çeşit geliştirilmemiştir. (Babaoğlu, 2017) Ekonomik ve diğer sebeplerden dolayı aspir çeşitlerine gereken değer ve önem verilmemiştir.

Ülkemizdeki bitkisel kaynaklı yağlık bitkilerin üretimi, ülke içindeki tüketim ihtiyacını karşılayamamaktadır. Ülkemizdeki bitkisel yağ üretim ile tüketim farkı %75'lere kadar çıkmıştır. Ve bunun sonucunda yıllık ortalama 2-3 milyar dolarlık yağlık ayçiçeği ithal etmekteyiz (Erzin, 2018). Bununla birlikte yağ üretiminin çoğunluğunu ülkemizde yetiştirilen ayçiçeğinden elde etmekteyiz. Ayçiçeği üretiminin yaygınlaşması beraberinde zararlılarının ve hastalıklarının da çoğalmasında beraberinde getirmekte ve üretim alanlarında rotasyona gidilmesi gerekmektedir.

Aspir bitkisinden verim kapasitesinin yükseltilmesini hedeflenirken var olan verim kapasitesinin önemli bir kısmını fide döneminden itibaren çeşitli faktörler tarafından kısıtlanmasıdır. Şekil 2.1.'te gözlemlediğimiz gibi farklı koşullara göre hassas olduğu dönemler ve belirtilmiştir. Bu dönemlerde girilen stres faktörlerinin bitkinin

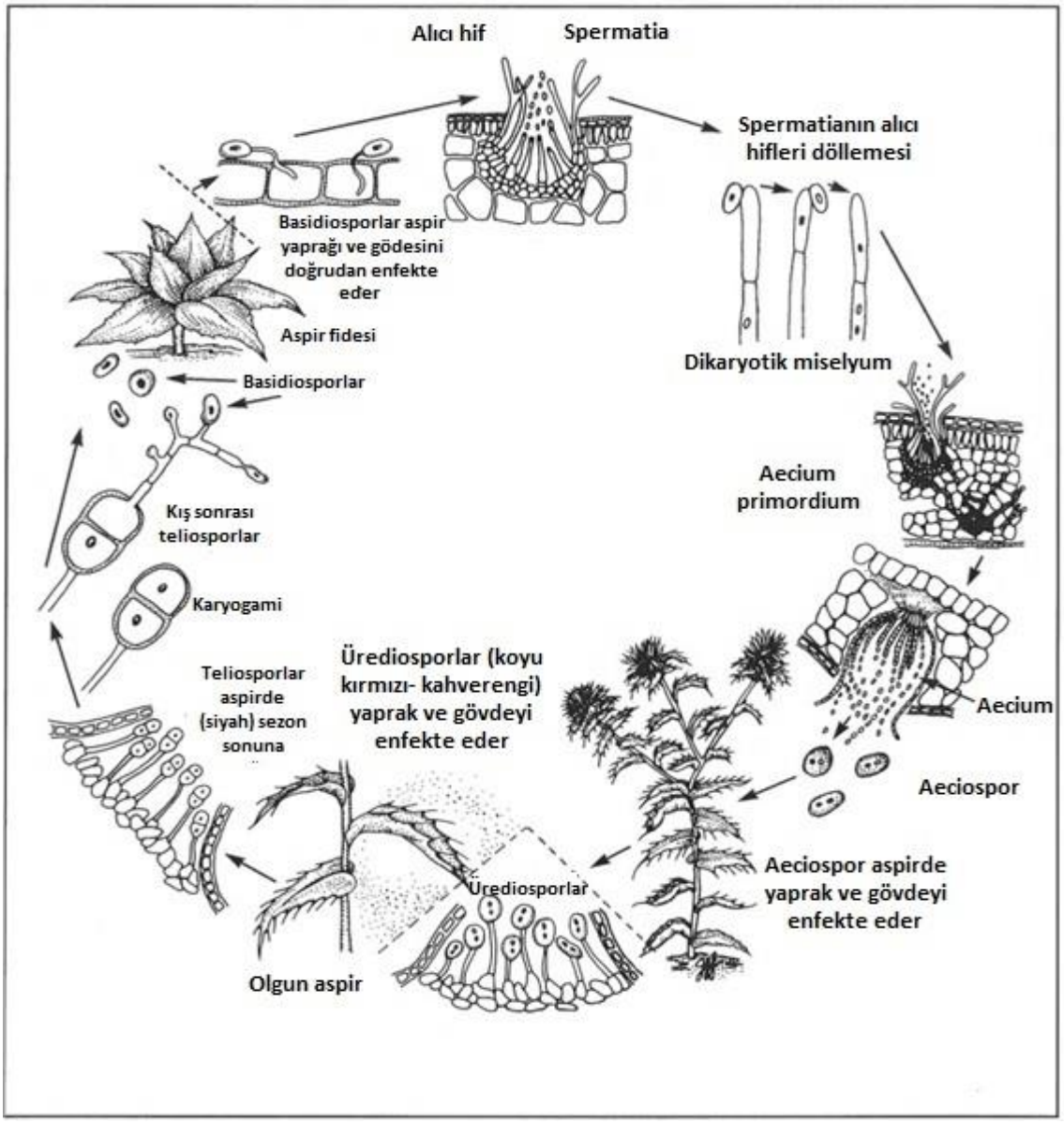
vejetatif ve generatif gelişiminde gerilemesine verim kapasitesi ve verim kalitesinde düşmelere sebep olmuştur. Şekil 2.1'e göre bitkinin gelişim evreleriyle birlikte gelişimini kısıtlayan 3 faktör belirtilmiştir. Bu faktörler incelendiğinde pas hastalığı, kök çürüklüğü ve son olarak tripsler ve lygus cinsi böcekler oluşturmaktadır. Pas hastalığı yıl boyunca belirli evrelerde hastalık şiddetini arttırarak yaşam döngüsünü devam ettirir. Bununla birlikte kök çürüklüğü ise yılda bir kez bitki gelişim evrelerinden tam dallanma ve çiçeklenme döneminde maksimum etki göstererek verim kapasitesini azaltmaktadır. Tripsler ve böcekler nispeten diğer hastalıklara göre zararı daha az olmaktadır (Kaffka & Kearney, 1998).



Şekil 2.1. Aspir bitkisinin fizyolojik evrelerine göre zararlılara karşı hassasiyeti (Kaffa & Kearney, 1998)

Pas hastalığı etmeni olan *P.carthami,* enfeksiyonun ilk evrelerinde yapraklarda alt veya üst kısımlarda nokta nokta sarı lekeler veya beyaz kabarcıklar şeklinde gözlemlenir. Yaklaşık 3mm'lik bu noktalar gelişerek kırmızımsı ve kahverengi şeklini alır. Bu püstüllerin etrafını sarı bir çizgi çevreleyebilir. Sporlar püstüllerden kolayca dökülebilir ve el ile dokunulduğunda pudramsı bir his bırakır. Morfolojik olarak tanılaması bu şekilde yapılmaktadır. Aspir pası bitkide dönemde gelişme gösterdiğinde alt yapraklarda kayıplara sebep verebilmektedir. Aspir bitkisinin hassasiyetine göre ve uygulama hatalarıyla birlikte kontrol altına alınmaz ise %100'e kadar bitki kaybına sebebiyet vermektedir (Schwartz & Gent David, 2005).

P.carthami'nin yaşam döngüsüne bakıldığında (Şekil 2.2.) birden fazla aşaması vardır. Enfeksiyon, toprakta veya tohumlar tarafından taşınan teliosporların uyanması ile başlar. Bu aşamada teliosporların uç kısmındaki basidiosporlar fide döneminde bitkiyi enfekte etmeye başlar. Enfeksiyonda spermogonium denilen yapılar meydana getirerek burada spermatium'u oluştururlar. Spermatium diğer spermogoniumları dölleyerek eşeyli üremeyle genetik çeşitliliğin artmasını ve yeni ırklar oluşmasını sağlarlar. Dikaryonlar daha sonra genişleyerek aecium yani spor yuvalarını oluştururlar. Bu keseciklerde aeciosporlar üretir. Aesciosporlar bu keseciklerden çıkarak bir başka bitki yaprağı gövdesi veya tomurcuğunu enfekte eder. Bu enfeksiyonda üretiosporlar oluşturur. Enfekte edilen bitki genç ise üretiospor üretimi devam eder. Fakat yaprak kart, kurumaya başlamış veya ortam sıcaklığı düşmeye başlamış ise üretiosporlar, kışı rahat geçirebilecekleri teliospor formuna geçerler. Böylelikle çevresel faktörlerden hava ısınana kadar zarar görmeden kendini muhafaza edebileceği bir forma dönüşür. *P. carthami*'nin de diğer birçok bitki patojeni gibi teşhis ve tanımlanması için morfolojik özelliklerinden yararlanılır.



Şekil 2.2. *P.carthami*'nin yaşam döngüsü

2.2. Fungal Patojenlerin Teşhisi

Funguslar dünya üzerine yayılmış ve saprofit, endofit ve patojen olarak bulunan ökaryot canlılar arasında yerini almaktadırlar. Bitki patojeni olarak tanımladığımız mantarlar hücre duvarlarında kitin içermezler ve fotosentetik pigmentleri yoktur. Dünya üzerinde yaklaşık 19.000 türünün bulunduğu tahmin edilmektedir (Jain, Sarsaiya, Wu, Lu, & Shi, 2019). Toplam bitki hastalıklarının %70-80'i bu patojenlerden meydana

gelmektedir. Dolayısıyla ürün kalitesinde ve ürün verimlerinde çok ciddi düşüşlere sebebiyet vermektedirler. Yıllık ürün kayıpları dünya üzerinde 200 milyar avroyu aşmaktadır (Dayarathne, Mridha, & Wang, 2020). Bu sebepten dolayı fungal patojenleri doğru bir şekilde teşhis edilmesi, mücadele yönteminin belirlenmesinde çok önemli bir adımdır.

2.3.Fungal Patojenlerin Geleneksel Teşhisinde Kullanılan Araçların Gelişimi

Fungal patojenlerin teşhisi ışık mikroskobuyla birlikte başlamış ve 1840 yılında *Pytophthora infestans*'ın neden olduğu mildyö bitki hastalığı olarak ilk kez rapor edilmiştir (Berkeley, 1846). 1950'li yıllara geldiğimizde ise farklı bitki cinslerinde yetişen benzer mantarların morfolojik olarak ayrımı ve tanımlanması yapılmıştır. Ayrıca tanımlamada verilen isim *Cercospora* olarak literatüre geçmiştir (Chupp, 1954).

1960'lı yıllara gelindiğinde ise taramalı elektron mikroskobunun gelişmesi ile birlikte bir birine çok benzeyen patojenlerin ayrımının yapılmasında ve konidiogenez modellerinin açıklamasında yardımcı olmuştur (Cole & Samson, 1979). 1970'lere gelindiğinde ise ince tabakalı kromatografi kullanılarak izozim profilleri ve kromozom sayıları teşhis için araştırılmıştır (Wieloch, 2006). Aynı zamanda bu yıllarda morfolojik, kültürel ve fizyolojik özelliklerin birlikte hesaplanmasını sağlayan güçlü bilgisayarların geliştirilmesinin yanı sıra DNA tabanlı metotların kullanımı da yaygınlaşmaya başlamıştır (Schloss, Westcott, Ryabin, Hall, Hartmann, Hollister & Robinson, 2009).

Günümüzde bitki patojenlerinin teşhisinde kullanılan pek çok tanı yöntemi mevcuttur. Bunlar, klasik tanı yöntemleri ve moleküler tanı yöntemleri başlıkları altında incelenmektedir. Klasik tanı yöntemlerinin uygulanabilmesi için fungal patojenin bitkide neden olduğu hastalığın semptomlarının fizyolojik olarak gözlemlenebilmesi gerekmektedir. Bahsedilen tanı yönteminin maliyetinin düşük olması gibi bir avantajı olsa da gözlemlerin yorumlanabilmesi için taksonomik açıdan uzman personel ve uzun zaman gerektirmesi, patojenlerin yerinde tanısına olanak sağlamaması gibi dezavantajları mevcuttur (Gorman, Fuller & Dyer, 2009).

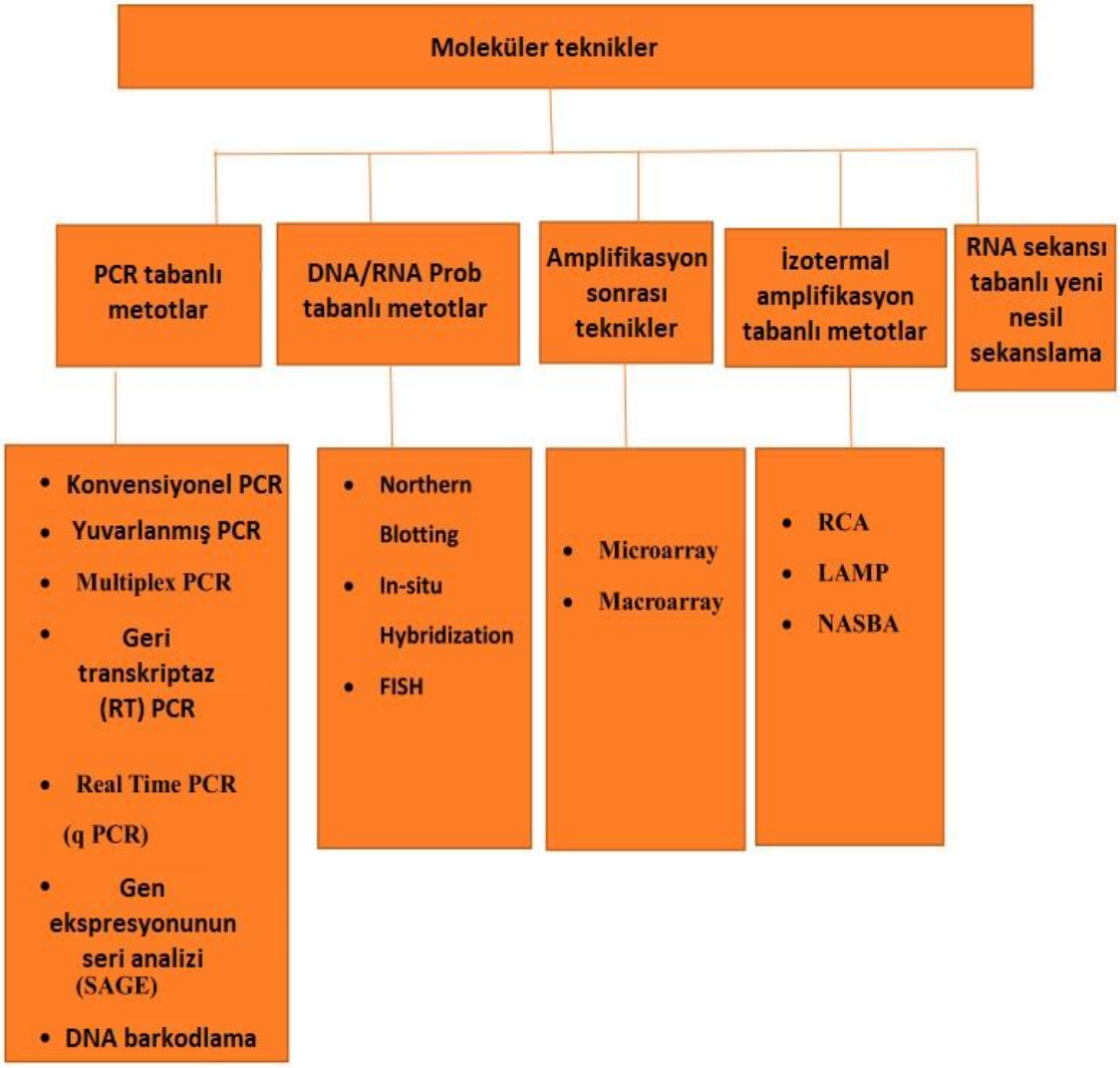
2.4.Moleküler Teşhis Araçlarının Gelişimi

Moleküler patojen tanısında, bitkide henüz fizyolojik belirtiler ortaya çıkmadan önce bitki dokusu üzerindeki patojene ait DNA kullanılarak patojenlerin tespiti gerçekleştirilebilmektedir. Klasik yöntemlere göre daha kısa sürede ve yüksek doğrulukta sonuca ulaşabilmek mümkündür. Moleküler tanı yöntemleri, morfolojileri aynı olmasına rağmen son derece benzer olan fungus türlerini de ayırt edebilmektedir. Dünya genelinde teknolojinin de gelişmesiyle birlikte bitkilerin toprak altı ve toprak üstü enfekte kısımlarından, bitki üreme organlarından, patojen miktarı ve tanımlaması da moleküler yöntemlerle kolayca yapılabilir hale gelmiştir.

1993 yılında patojen genom dizilerinin açıklanmaya başlaması ile teşhis için özgül genom bölgelerinin tespiti yapılmaya başlanmış ve hızlı, hassas, güvenilebilir ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesiyle tanı için PCR tercih edilir hale gelmiştir (Narayanasamy, 2011).

Sonraki yıllarda PCR amplifikasyonuna dayalı yöntemlerle birlikte DNA/RNA prob teknolojileri gibi bitki patojeni teşhisinde yeni metotlar kullanılmaya başlanmıştır (Martin, James, & Lévesque, 2000). Bununla birlikte patojenlerin tam genom dizi analizleri yapılarak eskiden korunmuş ve saklanmış olan patojenlerle mukayese edilebilmesini ve aradaki farklılığın ölçülebilmesi de mümkün hale gelmiştir. Bu durum patojenlerin yıllar içindeki evriminin ispatlanmasında önemli bir adım olarak ortaya çıkmıştır (Gibbons, 2013) .

Günümüzde moleküler biyoloji alanındaki hızlı gelişmeler, tanı ve teşhis yöntemlerinin de gelişmesine önemli katkılar yapmıştır. Halen PCR tabanlı teşhis yöntemleri hızlı sonuç vermesi nedeniyle daha çok tercih edilse de teşhis metotlarının çeşitliliği oldukça artmıştır. Her yöntemin hem teknik hem de analiz edilen genom bölgesine bağlı olarak kendine özgü avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle her yöntem her patojenin tanısı için aynı ölçüde elverişli olmayabilmektedir. Dolayısıyla hedef patojenin özelliklerine uygun yöntemin seçilmesi gerekmektedir. Günümüzde patojen tanısında kullanılmak üzere geliştirilen moleküler teknikler aşağıda Şekil 2.3.'te sunulmuştur.



Şekil 2.3. Moleküler teşhis araçları

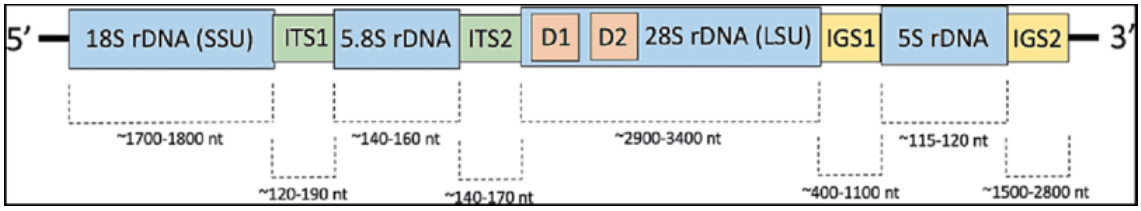
2.5.Fungal Fitopatojenlerin PCR'a Dayalı Moleküler Teşhis İçin Hedef Bölgeler

Fungusların saptanması ve tanımlanmasında temel olarak fungal genomlarda varyasyonun en yüksek olduğu genler veya genler arası özel diziler tercih edilir. PCR ile teşhis, bu özel genom bölgelerinin etrafında bulunan korunmuş dizilere özgün olarak tasarlanan oligonükleotidler (primerler) ile gerçekleştirilmektedir. Primerler fungus genomunda hedef bölgeyi çoğaltmak üzere sınırları belirler. PCR'da primerlerden başlanarak varyasyonun yüksek olduğu hedef bölgelerin çoğaltılması sağlanır. Sonuç olarak fungusların moleküler tanısı, çoğaltılan hedef bölgeye özgü DNA fragmentlerinin varlığına veya elde edilen amplikonların DNA dizilimine dayanmaktadır.

Tanı için hedef lokusun seçimi yapılırken özellikle korunmuş bölgelerin ve bu korunmuş bölgelerin arasında kalan değişken bölgelerin yer aldığı DNA bölgeleri tercih edilmektedir. Bu özelliklere sahip genom bölgeleri arasında ribosomal RNA genleri yüksek kopya sayısına sahip oldukları için sık çalışılan bir bölgedir (Atkins ve Clark, 2004). PCR işlemi tek kopyalı genlere göre çok kopyalı genlerin kullanımında daha hassas sonuç vermektedir. Tek kopyalı genler de türe spesifik sonuç verebilmektedir fakat nested-PCR gerektirdiğinden çapraz kontaminasyon riski taşımaktadır (Kuzdralińsk, Szczerba, Nowak & Muszyńska, 2017). Fungal genomlarda PCR ile teşhis için genellikle rRNA gen lokuslarının içinde yer alan Inter transcribed spacers (ITS), intergenic spacer (IGS), bazı özel protein kodlayan genler (*β-tubulin*, *EEF1A1* geni), mitokondriyal DNA (mtDNA) da yer alan bazı genler sıklıkla tercih edilir. Bunlar dışında genomda rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) gibi markır kullanımı ile de PCR metodu geliştirilmiştir (Edwards, O'callaghan, & Dobson, 2002).

Bir rRNA gen motifinde, 3 adet gen bölgesi vardır bunlar sırası ile 18S, 5.8S ve 28S rRNA genleridir. ITS bölgesi ökaryoktik organizmalarda ITS-1 ve ITS-2 olarak isimlendirilmiş 2 adettir. ITS-1, 18S ve 5.8S rRNA genleri arasında yer alırken ITS-2 ise 5.8S ve 28S rRNA gen bölgesince çevrelemiştir (Şekil 2.4.). Bu tip DNA, türe özgü primer tasarımı için değerli olan değişken ve korunmuş bölgelere sahiptir (Mulè, Susca, Stea, & Moretti, 2004). rRNA genleri oldukça korunmuş stabildir ve tür ayrımını sağlayacak primerlerin geliştirilmesi için benzersiz bölgelerdir (Smith, Douhan, & Rizzo, 2007). Buna karşı bu genlerin arasında yer alan ITS bölgeleri mutasyon frekansının yüksek olduğu genom bölgelerinden biridir. Bu sebepten dolayı ITS'ler moleküler teşhis için uygun bölgelerdir (Edel, Steinberg, Gautheron, & Alabouvette, 1997). Analiz edilen funguslarda ITS sekansları %3'ten az farklılık gösteriyor ise aynı türden geldikleri kabul edilmektedir (Hughes, Petersen, & Lickey, 2009).

IGS dizileri 28S ve 5S genleri arasında bulunur (Şekil 2.4.). ITS bölgeleri düşük genetik varyasyon verdiklerinde alternatif olarak kullanılabilecek bölgelerdir. IGS bölgeleri yüksek sekans varyasyonu gösterir (Nazar, Hu, Schmidt, Culham, & Robb, 1991). 2-4 kbp' lık uzunluğa sahiptir. Başarılı bir primer tasarımı için oldukça uzun bir bölgedir (Pramateftaki, Antoniou, & Typas, 2000).



Şekil 2.4. Fitopatojen funguslarda ITS ve IGS bölgeleri (Kuzdralińsk ve ark. 2017**)**

Funguslarda sıklıkla kullanılan bir diğer teşhis bölgesi ise yapısal proteinleri kodlayan *β-tubulin*, *EF-la* ve *kalmodulin* kodlayan gen bölgeleridir. β-tubulin gen sekansı içerisinde türe özgü varyasyonların bulunması, PCR ile elde edilecek DNA fragmentlerinin tür teşhisi yapmasına olanak sağlamaktadır. Bununla birlikte evrensel primerler bağlandığı genin korunmuş dizileri sayesinde yakından ilişkili türlerin ayrımın yapılmasına olanak sağlamaktadır (Ma, Yoshimura, Holtz, & Michailides, 2005). Çoğu PCR metodu mikotoksinlerin sentezinde ya da düzenlenmesinde görev alan genler üzerinden geliştirilmiştir. Bunun sebebi ise bunlar cins veya türe özgü toksinlerdir ve bu toksinleri kodlayan genlere özgü tasarlanan evrensel primerler ile PCR'a dayalı teşhis sağlamasıdır. Bu sebeple türe veya cinse ait ayrımda daha güvenilir bir biçimde gerçekleştirmiştir (Gaffoor & Trail, 2006).

Tek gen yaklaşımına dayalı tespit yöntemleri, rDNA'ya kıyasla DNA dizileri ve türler arasında varyasyonu en yüksek gen bölgelerini kullanımı ile daha nettir. Ancak bu gen bölgesi genomda 1 kopya halinde bulunduğu için hassasiyeti çok düşüktür. Bu yüzden farklı yöntemlerle hassasiyetinin arttırılması gerekmektedir (Wang, Tang, Chen, Buchenauer, Zhao, Han & Kang, 2009).

2.6.Puccinia Türlerinin Moleküler Teşhisi

Fungal patojenlerin teşhis edilmesi iki döneme ayrılmaktadır. İlki moleküler öncesi dönem ve günümüzde kullanılan moleküler dönem olarak. Moleküler öncesi yöntemleri çoğunlukla mikroskobik, morfolojik ve kültürel yaklaşımlardı. Kültüre dayalı yöntem zaman alıcı ve pratik bir yöntem olmadığından dolayı hızlı teşhis gerektiren patojenlerin tespitinde uygun değildi. Morfolojik yöntemle ise türler arası benzerliklerden kaynaklı hatalara sebebiyet verebilmekteydi (Capote, Pastrana, Aguado, & Sánchez-Torres, 2012).

Moleküler yöntemlerin gelişmesi ile fitopatojenik mantarların tanımlanması hızlanmış ve farklı taksonomik organizmaların ayırt edilmesinde yüksek derecede özgüllüğü nedeniyle güvenilir hale gelmiştir. Moleküler yöntemlerde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tabanlı metotlar öncü olmuştur. Bununla birlikte DNA/RNA barkodlama yöntemi, amplifikasyon sonrası yöntemler, izotermal amplifikasyon temelli metotlar ve RNA sekansı bazlı gelecek nesil sekanslamalar olarak ayrılmaktadır (Aslam, Tahir, Aslam, Alam, Shedayi & Sadia, 2017).

Bitki fungal hastalıklarının doğru ve hızlı teşhisi ile birlikte, bitkilerde hastalığın ilerlemesinin başarılı bir şekilde azaltılmasında ve önlenmesinde son derece önemlidir. Bitki hastalıklarının yanı sıra farklı fungal türlerin hızlı bir şekilde filogenetik analizlerde kullanılmasını sağlamıştır. DNA tabanlı yöntemlerin doğruluğunun ve güvenirliğinin büyük ölçüde tanı koyan kişinin becerilerine ve deneyimlerine bağlı olsa da moleküler öncesi yönteme göre kendisini ispatlamış bir yöntemdir.

Xi ve ark. (2011) yılında *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* tespit edebilen gen kütüphanesi kullanılarak FIASCO (tekrar dizileri içeren AFLP ile hızlı izolasyon) metodunu uygulayarak Pgtfss1-F/R primer setini geliştirmiştir. Primerler hastalıklı buğday dokularında ve diğer (sarı pas, külleme, rastık) patojenler ile test edilmiştir. Geliştirilen Pgtfss-F/R ssr markırı P.triticina'ya özgü 395 bç'lik DNA fragment sentezlerken diğer patojenlerde yani 24 izolatta ise DNA fragmenti gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte buğdayda *P.triticina* inokulasyonu yapıldıktan 30 saat sonra alınan örneklerde Pgtfss-F/R SSR markırı ile PCR'ı sonucu DNA amplikasyonu meydana getirmiştir. Bu yöntem ile buğdayda Pgtfss-F/R SSR markırı sayesinde erken moleküler tanısı ve teşhisi için önemli bir yöntem geliştirilmiştir (Xi, Taiguo, & Wensheng, 2011).

Liu ve ark. (2014) yılında FIASCO yöntemi kullanılmak üzere *P.graminis* f. sp. *tiritici*'ye özgü Pgtw (f)/ Pgtw (r) primer setini tasarlamışlardır FIASCO yöntemi kullanılarak 330-bç'lik DNA fragmenti üretmeyi başarmışlardır. Bu deneyde taranan diğer patojenlerde (*Puccinia triticina, Puccinia striiformis, Tilletia controversa Khün, Tilletia caries, Tilletia foetida, Ustilago tritici, Sporisorium reilianum, Gibberella zeae ve Blumeria graminis f. sp. tiritici*) amplifikasyon gözlemlenmemiştir (LIU, Xi, Li, Bo, CHEN & XIANG, 2014).

Berlin ve ark. (2012) yaptığı bir başka çalışmada DNA dizileme ve PCR yöntemlerini kullanarak *P.graminis*'in İsveç'teki konukçu bitkilerinde (çavdar, yulaf ve berberi bitkisinde*) P. graminis*'e ait iki alt türe (*P.graminis* f.sp. *secalis*, *P.graminis* f. sp. *avenae* vb.) bakılmıştır. Barnes ve Szabo (2007)'nun *P.graminis*'in alt türlerine özgü, ITS bölgesine özgü tasarladığı ITS1RustF10d primerden yola çıkarak 11 adet SSR markırı (Pgestssr021, PgtSSR21, Pgestssr024, Pgestssr109, Pgestssr171, Pgestssr225, Pgestssr279, Pgestssr280, Pgestssr368, PtgCAA53, PgtCAA93) kullanılmıştır. Sonuçlar moleküler varyans analizi (AMOVA) ve ana koordinat analizi (PCA) ile değerlendirilmiştir. Bu çalışma ile 3 AMOVA çalışması yapılmış yapılan bu testlerde *formae speciales*'lerin aralarındaki farkın %34 ve çeşitliliğin %66 olduğu gözlemlenmiştir. İkinci AMOVA çalışmasında ise tarla popülasyonlarında *P.graminis* f. sp. *avenae* arasındaki farklığa bakılmış buradaki değer de %10 olarak hesaplanmıştır. Üçüncü AMOVA çalışmasında ise *P.graminis* f. sp. *secalis* tarla popülasyonları arasındaki fark %12 olarak gözlemlenmiştir. AMOVA çalışması ile iki özel form arasındaki net bir ayrım olduğu gözlemlenmiştir. PCA çalışması ile yapılan analizde ise yulaf, çavdar ve berberi bitkisinden toplanan örnekler geniş bir grup oluşturmuştur. İlk PCA çalışması bireyler arası farklılığın %41'ini açıklamıştır. İkinci PCA çalışmasında ise %19'unu açıklamıştır. Bu çalışmasıyla birlikte SSR markırlarla birlikte bölgesel ve konukçu faktörlerinin istatistiksel olarak *P.graminis formae speciales* genetik çeşitliliği açıklanmıştır (Berlin, Djurle, Samils, & Yuen, 2012).

Park K.-S. ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada Kore'nin Euisong-gun eyaletinde 2001 yılında yapılan çalışmada aspir tarlalarında *P.carthami*'ye rastlanmış bitkiye bulaşıklık oranı %15 olarak belirlenmiştir. Hastalığın ilk belirtileri beyaz küçük benekler şeklinde başlamış daha sonradan kahverengi- koyu kahverengi şeklinde saptanmıştır. Üretiosporları açık kahverenginde, elips ve küre şeklinde 21-23 x 21-25 µm olarak ölçülmüştür. Kış dönemini geçirmek için oluşturduğu teliosporlar koyu kahverengi-kahverengi, elips ve oval şeklinde 35-40 x 27-33 µm boyutlarında ölçülerek morfolojik karakterizasyonları ve tanımlanmaları yapılmıştır. Morfolojik özellikleri ile tanımlanan bu vaka Kore'de ilk *P. carthami* raporu olarak tanımlamıştır (Park & Lee, 2003).

Zhao S. ve ark. (2007) *P.carthami*'yi Çin'de Sincan'ın deniz seviyesinden 2.100 m yüksekliğinde Tianshan dağlık bölgesinde ticari olarak üretilen kar nilüferlerinde tespit

edilmiştir. Hastalık insidansı bitkilerin %15'inde gözlemlenmiş yapraklar üzerinde 1-2 mm turuncu kahverengi noktalar gözlemlenmiştir. Sezonun ilerleyen dönemlerinde bu noktalar koyu kahverengine dönmüştür. Üredіosporlar ve teliosporlar teşhis için ışık mikroskobunda morfolojik olarak gözlemlenmiştir. Üredіosporlar küresel ve elips şeklinde 22-28 x 22-25 µm, teliosporlar ise küresel ve geniş elips şeklinde koyu kahverenginde 31.5-41.5 x 21.5-26.5 µm olarak gözlemlenmiştir. Mantarların patojenite testi sera koşullarında 25℃'de ve %70 bağıl nemde sağlıklı aspir ve kar nilüferi fidelerinden yapılmıştır. Yapılan testlerde aspir bitkisinde ve kar nilüferi bitkisinde de hastalık gözlemlenmiştir. Daha sonra patojen Morfolojik ve patojenite testlerinden sonra *P.carthami* Corda olarak tanımlanmıştır (Zhao, Xie, Li, & Li, 2007).

Başalma ve ark. (2004) tarafından yapılan bir başka çalışmada Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasına, tarla koşullarında 10 adet farklı genotipe sahip aspir bitkisi ekilmiş ve *P.carthami*'nin hastalık oluşturma derecesi ölçülmek istenmiştir. Yapılan bu çalışmada *P.carthami* aspir bitkisinde %50'nin altında enfeksiyon gözlemlenmiş ve bu yapraklar arasında ölçüldüğünde en hassas çeşit Suriye genotipi en az etkilenen ise afyon genotipi aspir bitkisi olmuştur (Başalma, Karakaya, & Uranbey, 2004). Ancak *P.carthami*'nin teşhisine yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Berthier ve ark. (1996) yılında yaptığı bir çalışmada *Puccinia carduorum'un* ITS gen bölgesinin moleküler düzeyde incelenerek Puccinia türlerinden ayrımı incelenmiştir. *Puccinia graminis* ITS bölgesi kesim protokolü baz alınarak *P.carduorum* enzimlerle ITS bölgesi kesilmiştir. Daha sonra *P.carduorum*, *Puccinia jaceae*, *P. carthami* ve *Puccinia chondrillina* da kullanılmak üzere primerler tasarlanmıştır. Tasarlanan primeler öncelikle izole edilen konukçu bitkiden gelebilecek kontaminasyona karşı bitki ve patojen önce test edilmiştir. ITS primeri ile konukçu izolatı ve *P.carduorum* test edilmiş bunun sonucunda *P.carduorum* 'da 665 bp'lık nükleotid sayısı çıkarken konukçu bitkinin sonucu ise 730-740 bp arası çıkmıştır. Bununla birlikte bir sonraki adım olan Puccinia türleri içerisinde denemeye sıra gelmiştir. ITS primeri bu denemede *P.carduorum*' da 663 bp, *P. jaceae* ve *P.carthami'* de 670 bp ve son olarak *P.condrillina* 721 bp olarak belirlenmiş ve *P. carduorum*'un denemesi yapılan *Puccinia* spp. türleri arasında önemli bir farkı olduğu ortaya çıkmıştır. Bu çalışmanın sonunda *P.carduorum*'un gen dizilenmesi yapılmış ve

NCBI'da U57351 erişim numarası ile kayıt almıştır. (Berthier, Bruckart, Chaboudez, & Luster, 1996).

Emsal çalışmalar ve literatür taramasından sonra elde edilen sonuçlara baktığımızda *P.carthami* ile elde edilen bulguların morfolojik özelliklerine bakılarak ayrımının sağlandığı mikroskop ve deneme parsellerinde patojenite testi gibi zaman alan ve iş gücü gerektiren çalışmalar kullanılmıştır. Aynı zamanda mikroskobik bir canlının morfolojik benzerlik gösterebilecek birden fazla varyetesi olabilmekle birlikte en doğru ayrımın moleküler düzeyde yapılması gerekmelidir. Morfolojik yöntemlerde çevresel faktörlerin etkisi ile hata payı yükselmekte, teşhis için patojenin çoğaltılması günler alabilmektedir. Moleküler yöntemlerle yapılan yöntemlerde ise tüm bir türün bireylerinde ortak olan genom baz alınmakta ve genomda gerek nükleotid dizilimi gerekse baz sayısına dayalı varyasyonlar tespit edilerek hızlı ve yüksek doğrulukta teşhis yapılabilmektedir. Hatta bazı türlerde ırk seviyesinde teşhis mümkün olmaktadır. Ayrıca moleküler yöntemler ile az miktarda spor ve enfekte bitki dokusu ile saatler süren teşhis iş, para ve zamandan tasarruf sağlamaktadır.

P.carthami'nin moleküler teşhisine yönelik çalışmalara ülkemizde rastlanmazken uluslararası düzeyde de çalışmalar kısıtlı kalmıştır. Yapılan çalışmaların çoğunluğu *P. carthami'nin* morfolojik özelliklerine bakılarak tespit edilmiş ve literatüre işlenmiştir. Bu nedenlerle *P.carthami*'nin moleküler düzeyde tespit edilmesi, diğer yakın türlerden ayrımının sağlanması, hedef genom bölgesinin belirlenmesine ve teşhis için gerekli koşulların optimize edilmesi gereksinim vardır.

Bu tez çalışmasında aspir bitkisinde (*Carthamus tinctorius* L.) pas hastalığı etmeni olan *Puccinia carthami'nin* teşhisi için moleküler yöntem geliştirilmesi hedeflenmektedir. Böylece önemli bir yağ bitkisi olan ve ülkemizde bitkisel yağ çeşitliliğinin ve gereksiniminin karşılanması amacıyla ekiminin yaygınlaştırılmasına çalışılan aspirde verim kayıplarının nedenlerinden birinin izlenebilirliği sağlanmış olacaktır. Ayrıca, geliştirilen teşhis yönteminin, olası bir epideminin önüne geçmek veya ıslah çalışmalarında yetiştirilen yeni hatların dayanıklı veya ne kadar toleranslı olduğunun tespit edilmesi ve ıslah süresinin kısaltılmasında öncü bir tanılama ve tespit yöntemi olması öngörülmektedir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1.Patojen Kaynaklarının Elde Edilmesi

3.1.1.Puccinia carthami'nin Eldesi

Puccinia carthami popülasyonunda olası farklılıkların olabileceği öngörülerek 1 Yabani ve 2 farklı aspir çeşidinden örnek alınmıştır. Bunlar Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından üretimi yapılan Dinçer çeşidi ve deneme çeşitlerdir. Bu çeşitlerin yapraklarından temiz bir fırça ile süpürülerek toplanan (Şekil 3.1.) *P.carthami* sporları 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak DNA izolasyonu için -20 ^{o}C'de depolanmıştır. Sporlar, toplandığı bitki kaynağına dayalı olarak yabani aspirden toplanan



Şekil 3.1. Aspir yaprağından *Puccinia carthami*'nin elde edilmesi

P. carthami-1, TTAE deneme çeşidinden toplanmış sporlar *P. carthami-2* ve Dinçer çeşidinden alınmış sporlar da *P. carthami-3* olarak isimlendirilmiş.

3.1.2.Tarama Amaçlı Fungal Bitki Patojenlerinin Eldesi

Türe özgü olarak tasarlanan primerler, teorik olarak teşhis için uygun olsa da bazı durumlarda istenildiği gibi sonuçlar vermemekte, yakın türlerde ayırt edici olmama ya da uzak akrabalarda benzer sonuçlar verebilmektedir. Bu yüzden tasarlanan primerlerin *P. carthami*'ye spesifik ve teşhis için kullanılabilir olduğunu tespit etmek için Trakya Bölgesinde sıklıkla görülen patojenler seçilmiştir (Paça, 2000). Bu patojenler sırası ile *Puccinia triticina*, *Fusarium* spp., *Fusarium culmarum, Fusarium graminearum, Pyrenophora teres* Drechs. f. *teres, Plasmopora halstedi, Makrophomina phaseolina, Phoma* spp*, Chocliobolus sativus, Ustilago* kullanılmıştır (Alpaslan & Özer, 2017). *F.graminearum 1* ise Çukurova Üniversitesi'nden gönderilmiş olup *F.graminearum* çeşitleri arasında fark gözlemlenme ihtimaline karşı bu şekilde isimlendirilmiştir. Bu patojenlerin bir kısmı Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Bitki Patolojisi Laboratuvarında in vitro çoğaltılmış (Şekil 3.2.) olarak temin edilmiştir.



Şekil 3.2. Petrilere ekimi yapılan patojenler, besi yerlerinde gelişim göstererek hifler oluşturmuştur. Hifler spatül yardımıyla 2 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Arpa Beyaz Kök Çürüklüğü hifleri Fusarium spp. (sol) ve *F. culmarum* hifleri (sağ)

3.2.Moleküler Teşhis Yönteminin Geliştirilmesi

3.2.1. DNA Ekstraksiyonu İçin Doku Parçalama

DNA ekstraksiyonu için hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın başlangıçta doku ve hücrelerin parçalanması son derece önemlidir. Tez kapsamında kullanılacak fungal materyaller spor, misel veya enfekte bitki dokuları olmak üzere farklı kaynaklardan oluşmaktadır. Dolayısıyla uygun hücre parçalama yönteminin belirlenmesi elde edilen genomik gDNA'nın kalitesini ve miktarını belirlemek için önemlidir. Bu nedenle farklı hücre parçalama yöntemleri kullanılarak genomik DNA (gDNA) elde edilmiş (Villaréal, Lannou, de Vallavieille-Pope, & Neema, 2002) ve en efektif yöntem belirlenmeye çalışılmıştır.

3.2.2.Etüv'de Kurutularak Sporların Parçalanması

Hassas terazide tartımı yapılan 0,03 mg *P. carthami* spor örnekleri etüve yerleştirilmiş ve 60°C' de bir gece boyunca kurumaya bırakılmıştır. Ertesi gün örnekler havanda dövülerek toz haline getirilmiş ve DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

3.2.3. Havanda Dövülerek Sporların Parçalanması

Fungus sporları tartılarak 0,03 mg sıvı azota (-196°C) daldırılıp dondurulmuştur. Daha sonra sporlar soğuk havanda sıvı azot eşliğinde dövülerek 5-10 dakika boyunca öğütülmüştür. Daha sonra öğütülmüş örnekler DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

3.2.4. Homojenizasyon Cihazı ile Hücrelerin Parçalanması

Fungus sporları 0,03 mg tartılarak 2 mL'lik tüplere konmuş ve üzerlerine 12 mm'lik çelik bilyeler eklenmiştir. Tüpler sıvı azota (-196°C) daldırılıp sporlar dondurulmuştur. Daha sonra tüpler Retsch MM400 vibrasyonlu öğütücü cihazına yerleştirilmiştir. Örnekler sıvı azot eşliğinde 2 dk boyunca 30 devir/saniye hızla öğütülerek sporların parçalanması sağlanmıştır. İşlem ardışık olarak 3 kez tekrarlanmış ve parçalanan sporlar DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

3.2.5. Beat Beating Yöntemi ile Hücrelerin Parçalanması

Beat beating cihazı küçük ölçekli bir homojenizatördür. DNA ekstraksiyonu için fungal sporların parçalanmasında etkili olduğu literatürde rapor edilmiştir. Bu nedenle sporların parçalanmasında bu yöntem de denenmiştir. Diğer yöntemlerde olduğu gibi fungus sporları 0,03 mg tartılarak 2 mL'lik tüplere konmuş ve tüplerin yarısına 1.5mm'lik ve diğer yarısına ise 3 mm'lik cam boncuklar eklenmiştir. Tüpler sıvı azota daldırılıp sporlar dondurulmuş ve ardından Beat beating (BeadBug D1030 Microtube Homogenizer) cihazına yerleştirilmiştir. Daha sonra sıvı azotta bekletilen örnekler cihazda 4000 devir/dakika hızda 1 dakika öğütülmüştür. İşlem 5 kez tekrar edilerek örnekler toz haline gelmiştir. Parçalanan sporlar gDNA izolasyonu için kullanılmıştır.

3.3. Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu

Hücre/doku parçalama yöntemlerinin yanında kullanılan izolasyon metotları veya kullanılan ticari kitlerin de önemi büyüktür. Kaliteli, saflığı yüksek ve yeterli miktarda gDNA izolasyonuna olanak sağlayacak uygun kitin belirlenmesi için de çalışma yapılmıştır. Bu yüzden laboratuvarımızda yer alan biri ithal diğeri yerli 2 ticari kit kullanılarak gDNA ekstraksiyonu yapılmış ve en iyi parçalama yöntemi-ekstraksiyon kiti kombinasyonu tespit edilmeye çalışılmıştır.

Kullanılan kitlerden biri ithal bitki-fungus kiti diğeri ise yerli bitki-fungus genomik DNA ekstraksiyon kitidir. Genomik DNA izolasyonu için kitleri üreten firmaların önerdiği protokoller takip edilerek aşağıdaki gibi yapılmıştır. Elde edilen sonuca göre en iyi sonucu veren kit ile çalışmaya devam edilmiştir.

3.3.1.Kit1 ile DNA Ekstraksiyonu

İlk deneme için (Kit1) ithal Plant-Fungi total genomik DNA ekstraksiyon kiti (Norgen, Cat no: **26200**) kullanılmıştır. Bunun için farklı parçalama yöntemleri sonucu toz haline getirilmiş 0,03mg'lık fungal spor ve lif örnekleri DNA izolasyonu için kullanılmıştır. gDNA ekstraksiyonu aşağıdaki adımlar kullanılarak yapılmıştır;

1. Öğütülen örneklere 500µl Lysis Buffer L ve 1µl RNAse A eklenerek homojenizasyon için 20 sn vortex edilmiştir.

2. 65°C'de 10 dakika boyunca inkübe edilmiş, bu sırada 2-3 defa belirli aralıklarla tüpler ters düz edilerek buffer ve RNAse A'nın örnekte homojen olarak karışması sağlanmıştır.

3. İnkübasyon cihazından sonra 100µl Binding Buffer I eklenerek 5 dakika boyunca buzda bekletilmiştir.

4. Daha sonra örneklere ait lizat, Clear o ring'e pipetle aktarılmıştır. 2 dakika boyunca 14000 rpm'de (20000xg) santrifuj edilerek Clear O-ring'ten (beyaz filtre) geçerek toplama kabına lizattaki artıkların inmesi engellenir.

5. Santrifuj işleminin ardından %70'lik ethanolden 100µl eklenerek vortex ile homojenize edilmiştir.

6. Önceden birleştirdiğimiz Grey O-ring ve toplama kabı üzerine 650µl lizat ethonol karışımı pipetlenir. Daha sonra 1 dk boyunca 10.000 rpm'de santrifuj edilmiştir.

7. Bir sonraki işlem Solution WN'den 500µl kolona eklenerek 14000 rpm'de (20000xg) 1 dakika boyunca santrifuj edilir ve toplama kabına inen yıkıma solüsyonu boşaltılırmıştır.

8. Toplama kabı yeniden Grey O-ring ile birleştirilmiştir. Sonrasında kolona Wash Solution A'dan 500µl eklenerek 14000 rpm'de (20000xg) 1 dk boyunca santrifuj edilerek toplama kabına biriken sıvı atılarak yeniden kolon ile birleştirilmiştir.

9. Kolonun kuruması için 2 dakika boyunca 14000 rpm'de santrifuj edilmiştir.

10. Grey O-rind'e Elution Buffer-I 'den 100µl ekleyerek 5 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.

11. Beklemenin ardından 1 dakika boyunca 10000 rpm'de (10000xg) santrifuj edilerek 100µl'lik DNA örneklerimiz elde edilmiştir.

12**.** Kısa süreli saklamalar için +4°C' daha uzun süreçte kullanılacak örnekler için -20°C sıcaklık tercih edilmiştir.

3.3.2.Kit2 ile DNA Ekstraksiyonu

İkinci olarak (Kit2) yerli Fungi Genomik DNA Ekstraksiyon Kiti (HİBRİGEN, Cat: MG-MDNA-01) kullanılmıştır. Bu yöntemle DNA izolasyonu için farklı parçalama yöntemleri sonucu toz haline getirilmiş 0,03 mg fungal spor örnekleri kullanılmıştır. Örneklerin izolasyonları aşağıdaki adımlar kullanılarak yapılmıştır.

1. 2 ml'lik santrifuj tüpleri içindeki örneklerin üzerine 600µl ML Tamponu ve 20µl Proteinaz K ve 10µl RNaz A eklenerek örnekler 15 saniye vortexlenmiştir.

2. Etkin bir lizis aşaması için homojen bir karışım elde edilmesi önemlidir. Daha sonra örnekler 60°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sırasında örnekler tüpleri 2-3 dakikada yavaşça ters düz edilerek inkübasyon tamamlanmıştır.

3. İnkübasyondan sonra örneklerin üzerine 220µl MB Tamponu eklenip ve örnek tüpleri yavaşça 10-15 kez alt üst edilmiştir.

4. Karışımın üzerine 220µl önceden soğutulmuş EtOH (%100-96) eklenmiştir.

5. Hazırlanan karışımın 750 µl alınıp kolonlara aktarılır. 12000 rpm'de 3 dakika oda sıcaklığında santrifuj edilmiştir. Toplama tüpüne sızan sıvı atılır. 750 µl'den sonra kalan karışımda kolona yüklenerek 12000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifuj edilir ve toplama kabına sızan sıvı atılmıştır.

6. Kolona 500 µl MY Tamponu eklenir ve 12000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifuj edildikten sonra toplama kabına sızan sıvı yeniden atılmıştır. Bu işlem bir kez daha tekrarlanarak yıkama işlemi tamamlanmıştır.

7. Filtreli tüpün membranının kuruması için hiçbir sıvı ilave edilmeden 12000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifujlanarak kurutulur ve santrifujlama sırasında toplama kabında biriken sıvı kap ile atılmıştır.

8. Filtreli tüp (kolon) 1.5 ml mikro santrifuj tüpüne yerleştirilerek membran üzerine 50-100µl ME Tamponu eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilir ve ardından 12000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifuj edilerek DNA kolondan izole edilmiştir.

9. İzole edilen DNA kısa sürede kullanılacak ise +4 ℃'de, uzun süreli kullanım için -20 ℃'de muhafaza edilmiştir.

3.4. *P. carthami*'nin Teşhisi İçin Kullanılan Primerler

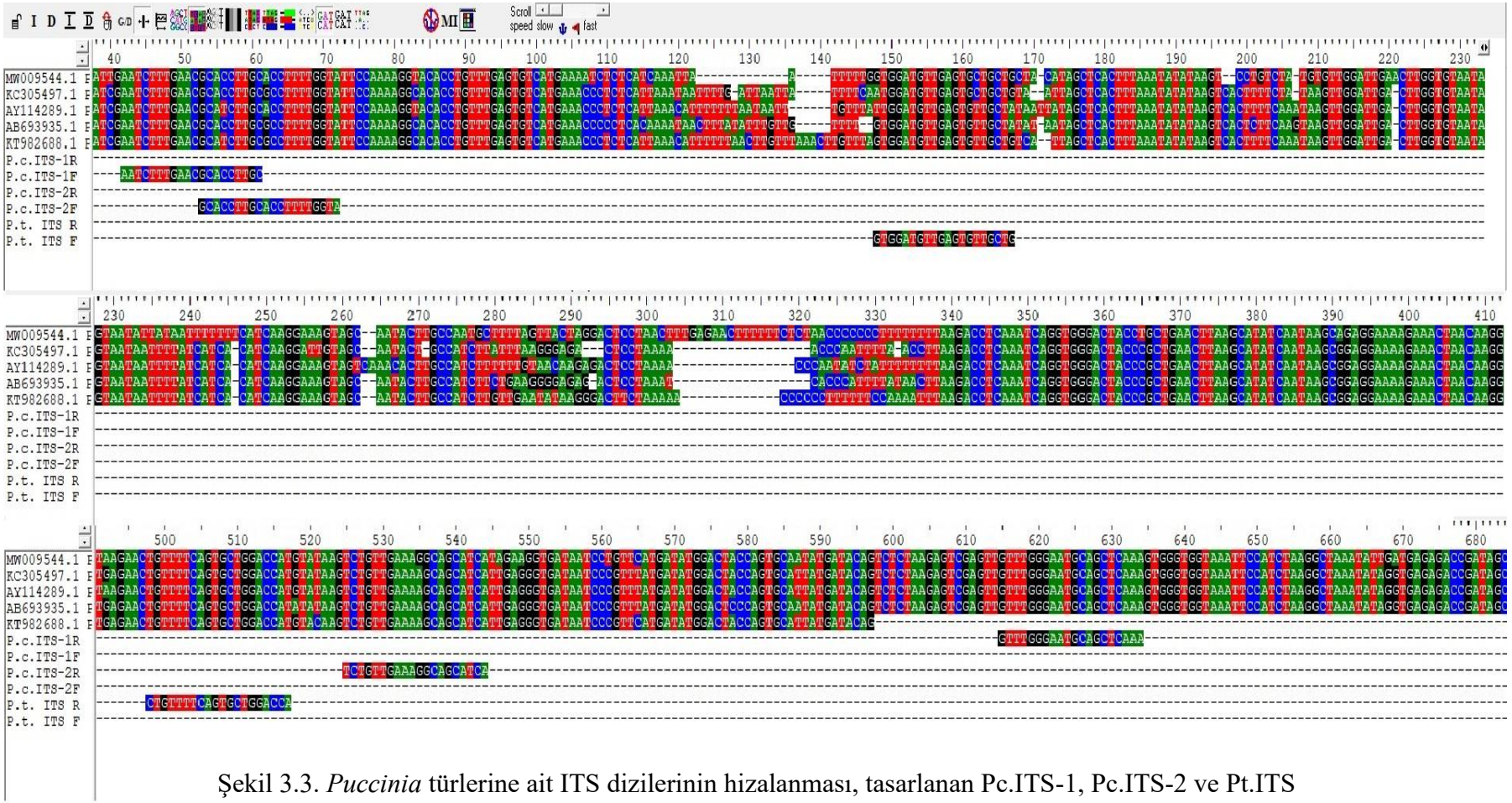
3.4.1. Pc.ITS Primerlerinin Tasarımı

Yapılan benzer çalışmalar ve PCR tabanlı fungal tanı konusunda önerilen genom bölgeleri (Asan, Tuney, & Şen, 2017) göz önüne alındığında en iyi sonucu verebilecek adayların rRNA genleri arasında yer alan ITS bölgesi ile *β-tubulin* geni olduğu görüşüne varılmıştır. Genom bölgelerinin tespitinin ardından NCBI veri bankasından farklı Puccinia türlerine ait ITS dizileri indirilmiştir. NCBI erişim numarasına göre *P.carthami* için MW009544.1, *Puccinia striiformis* için KC305497.1, *Puccinia graminis* için AY114289.1, *P.coronata* AB693935.1 ve *P.tricina* için KT982688.1 erişim numaraları ile ulaşılan ITS nükleotid dizileri Bioedit programında aligment edilmiştir. Böylece *P. carthami*'ye özgün olan ve diğer türlerden ayrımını sağlayacak varyasyonun olduğu bölgeler tespit edilmiştir. *P.carthami* ITS dizisi *(*MW009544.1) kullanılarak Bioedit (Şekil 3.3.) programı ile tespit edilen özgün diziyi içine alacak şekilde Primer3plus programında primer tasarımı yapılmıştır. Tasarlanan primerler Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

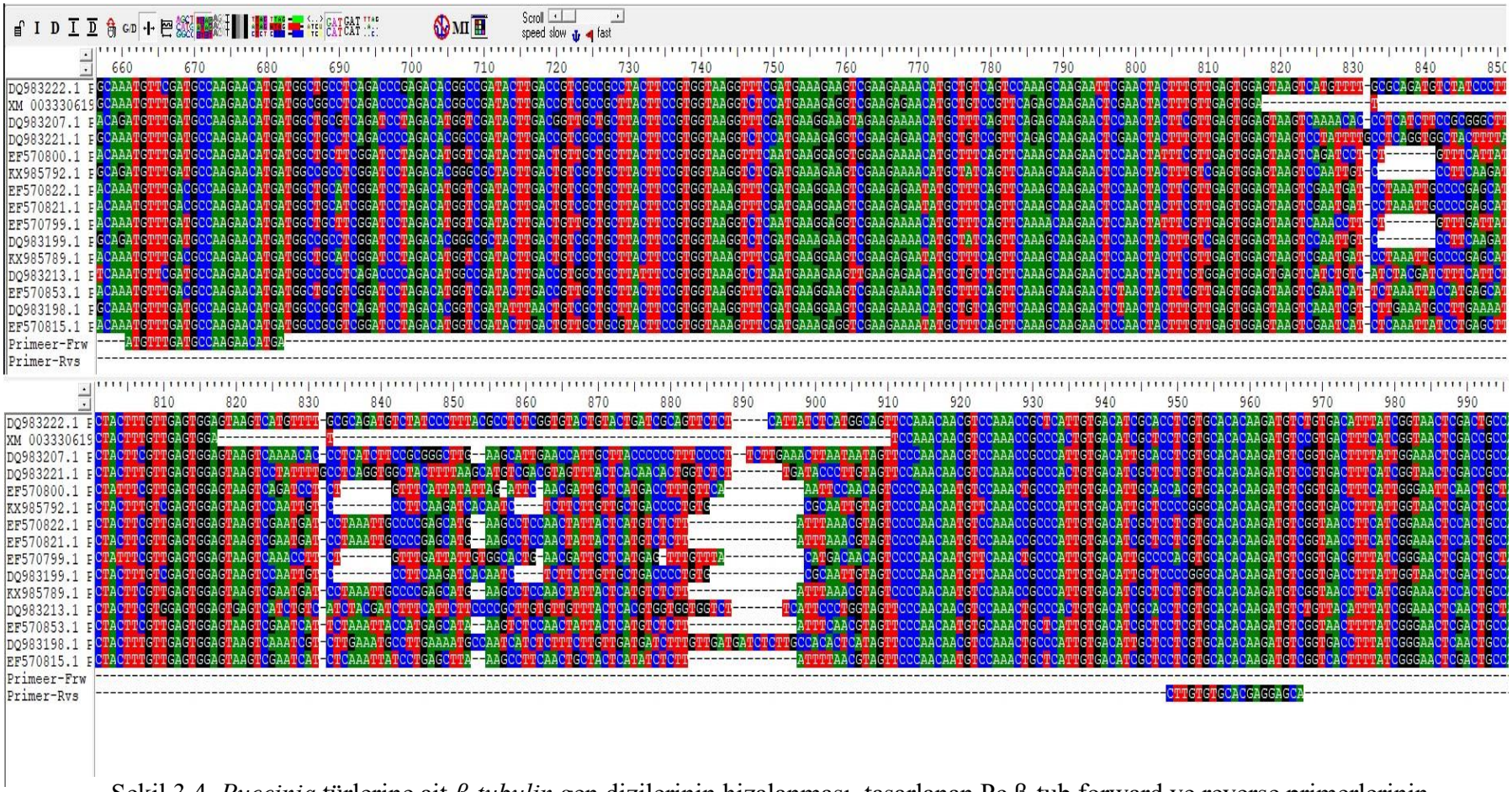
3.4.2. Pc.β-tub Primerinin Tasarımı

NCBI veri bankasından farklı Puccinia türlerine ait *β-tubulin* gen dizileri indirilmiştir. *P.carthamiye* ait *β-tubulin* gen dizilimi bulunamamıştır bu yüzden NCBI erişim numarasına göre *P.carthami* için DQ983222.1 *Puccinia actaeae-agropyri,* XM_003330619.*2 Puccinia graminis f. sp. tritici,* DQ983207.1 *Puccinia rupestris,* DQ983221.1 *Puccinia graminis f. tritici,* EF570800.1 *Puccinia paludosa,* KX985792.1

Puccinia malvacearum, EF570822.1 *Puccinia menthae,* EF570821.1 *Puccinia menthae,* EF570799.1 *Puccinia caricina*, DQ983199.1 *Puccinia malvacearum,* KX985789.1 *Puccinia menthae,* DQ983213.1 *Puccinia poarum,* EF570853.1 *Puccinia aff. geranii,* DQ983198.1 *Puccinia alpina,* EF570815.1 *Puccinia hydrocotyles β-tubulin* erişim numaraları ile ulaşılan nükleotid dizileri Bioedit programında hizalanmıştır. Böylece *P. carthami*'nin diğer türlerden ayrımını sağlayacak, gende varyasyonun en yüksek olduğu bölgeler tespit edilmiştir. Daha sonra Primer3Plus programı ile tespit edilen değişken diziyi içine alacak şekilde primer tasarımı yapılmıştır (Şekil 3.4.). Tasarlanan primerler Çizelge 3.1.'de sunulmuştur.



Şekil 3.3. *Puccinia* türlerine ait ITS dizilerinin hizalanması, tasarlanan Pc.ITS-1, Pc.ITS-2 ve Pt.ITS primerlerinin bağlanacağı bölgeler



Şekil 3.4. *Puccinia* türlerine ait *β-tubulin* gen dizilerinin hizalanması, tasarlanan Pc.β-tub forward ve reverse primerlerinin bağlanacağı bölgeler

3.4.3. Diğer Primerler

Ayrıca bölümümüzde yürütülen TÜBİTAK 2209A-Lisans Projesi (proje no:19/9B012109989) kapsamında *Puccinia tricina'*nın moleküler teşhisine yönelik Pt.ITS ve Pt.β-tub olmak üzere 2 adet primer çifti ile literatürde *Puccinia tricina'*nın tespitinde kullanılabileceği önerilen RA68 primeri de (Manjunatha, Sharma, Kulshreshtha, Gupta, Singh, Bhardwaj & Aggwal, 2018) çalışmaya dahil edilmiştir (Çizelge 3.1) ve toplamda 6 primer çifti ile çalışma yürütülmüştür.

Çizelge 3.1. *P.carthami*'nin moleküler teşhisi için kullanılan primerler

Locus	**Primer Adı**	**Dizi 5'-3'**	**Kaynak**
ITS	Pc.ITS-1.F	5'- AATCTTTGAACGCACCTTGC-3'	Tasarlanan
	Pc.ITS-1.R	5'- GTTTGGGAATGCAGCTCAAA-3'	
	Pc. ITS-2.F	5'- GCACCTTGCACCTTTTGGTA-3'	
	Pc. ITS-2.R	5'- TCTGTTGAAAGGCAGCATCA-3'	
	Pt. ITS-F	5'- GTGGATGTTGAGTGTTGCTG-3'	TÜBİTAK 2209A Projesi
	Pt.ITS-R	5'-TG GTCCAGCACTGAAAACAG-3'	
β-tubulin	Pc.β-tub.F	5'-ATGTTTGATGCCAAGAACATGA-3'	Tasarlanan
	Pc.β-tub.R	5'- CTTGTGTGCACGAGGAGCA-3'	
	Pt.β-tub.F	5'- TCGGATTTGCTCCACTTACC-3'	TÜBİTAK 2209A Projesi
	Pt.β-tub.R	5'- GAGAGGACCGCGATCAGTAG-3'	
PST68 SSR	RA68-F	5'- CTACTCAGCCAGAAGCACCTC-3'	Manjunatha vd. 2018
	RA68-R	5'- TACTGACCACCAGCGTCTTG-3'	

Çizelge 3.2. Pc.ITS-1 için PCR içerik ve koşulları

Reaksiyon Bileşenleri	**Hacim**	**PCR Koşulları**	**Tekrar**
Pc.ITS-1.F Primeri (10 µM)	1 µl	94°C → 5 dakika	1
Pc.ITS-1.R Primeri (10 µM)	1 µl	94°C → 45 saniye	35
2x Master Mix	10 µl	53°C → 1 dakika	
gDNA (25 ng/µL)	2 µl	72°C → 45 saniye	
NF su	6 µl	12°C → ∞	1
Toplam Hacim	20 µl		

Çizelge 3.3. Pc.ITS-2 için PCR içerik ve koşulları

Reaksiyon Bileşenleri	**Hacim**	**PCR Koşulları**	**Tekrar**
Pc.ITS-2.F Primeri (10 µM)	1 µl	94°C → 5 dakika	1
Pc.ITS-2.R Primeri (10 µM)	1 µl	94°C → 45 saniye	35
2x Master Mix	10 µl	53°C → 1 dakika	
gDNA (25 ng/µL)	2 µl	72°C → 45 saniye	
NF su	6 µl	12°C → ∞	1
Toplam Hacim	20 µl		

Çizelge 3.4. Pc.β-tub için PCR içerik ve koşulları

Reaksiyon Bileşenleri	**Hacim**	**PCR Koşulları**	**Tekrar**
Pc.B-tub.F Primeri (10 µM)	1 µL	94°C → 5 dakika	1
Pc.B-tub.R Primeri (10 µM)	1 µL	94°C → 45 saniye	35
2x Master Mix	10 µL	52°C → 1 dakika	
gDNA (25 ng/µL)	2 µL	72°C → 45 saniye	
NF su	6 µL	12°C → ∞	1
Toplam Hacim	20 µl		

Çizelge 3.5. Pt.β-tub için PCR içerik ve koşulları

Reaksiyon Bileşenleri	**Hacim**	**PCR Koşulları**	**Tekrar**
Pt.B-tub.F Primeri (10 µM)	1 µl	94°C → 5 dakika	1
Pt.B-tub.R Primeri (10 µM)	1 µl	94°C → 45 saniye	35
2x Master Mix	10 µl	59°C → 1 dakika	
gDNA (25 ng/µL)	2 µl	72°C → 45 saniye	
NF su	6 µl	12°C → ∞	1
Toplam Hacim	20 µl		

Çizelge 3.6. Pt.ITS için PCR içerik ve koşulları

Reaksiyon Bileşenleri	**Hacim**	**PCR Koşulları**	**Tekrar**
P.t. ITSF Primeri (10 µM)	1 µl	94°C → 5 dakika	1
P.t. ITSR Primeri (10 µM)	1 µl	94°C → 45 saniye	35
2x Master Mix	10 µl	54°C → 1 dakika	
gDNA (25 ng/µL)	2 µl	72°C → 45 saniye	
NF su	6 µl	12°C → ∞	1
Toplam Hacim	20 µl		

Çizelge 3.7. RA68F için PCR içerik ve koşulları

Reaksiyon Bileşenleri	**Hacim**	**PCR Koşulları**	**Tekrar**
P.t.RA68F Primeri (10 µM)	1 µl	94°C → 5 dakika	1
P.t.RA68R Primeri (10 µM)	1 µl	94°C → 45 saniye	35
2x Master Mix	10 µl	60°C → 1 dakika	
gDNA (25 ng/µL)	2 µl	72°C → 2 dakika	
NF su	6 µl	12°C → ∞	1
Toplam Hacim	20 µl		

PCR işlemi BIO-RAD T-100 Thermal Cycler cihazında yapılmıştır. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi için %1,5 konsantrasyonlu agaroz jel hazırlanmıştır. 10 µl PCR ürününe 2 µl loading dye eklenerek total hacim 12 µl olarak jel kuyucuklarına yüklenmiştir. PCR ürünlerinin boyutunu belirlemek üzere her jelin ilk kuyusuna DNA ladder yüklendikten sonra 90V'da 45 dakika elektroforez yapılarak jel görüntüleme sisteminde UV ışık altında DNA bantları görüntülenmiştir. Elde edilen verilerden sonra birbirine yakın boyutta olan DNA bantları arasındaki farklılıkların net olarak tespiti için aynı örnekler AATI kapiller elektroforez cihazında tekrar analiz edilmiştir.

BÖLÜM 4

BULGULAR

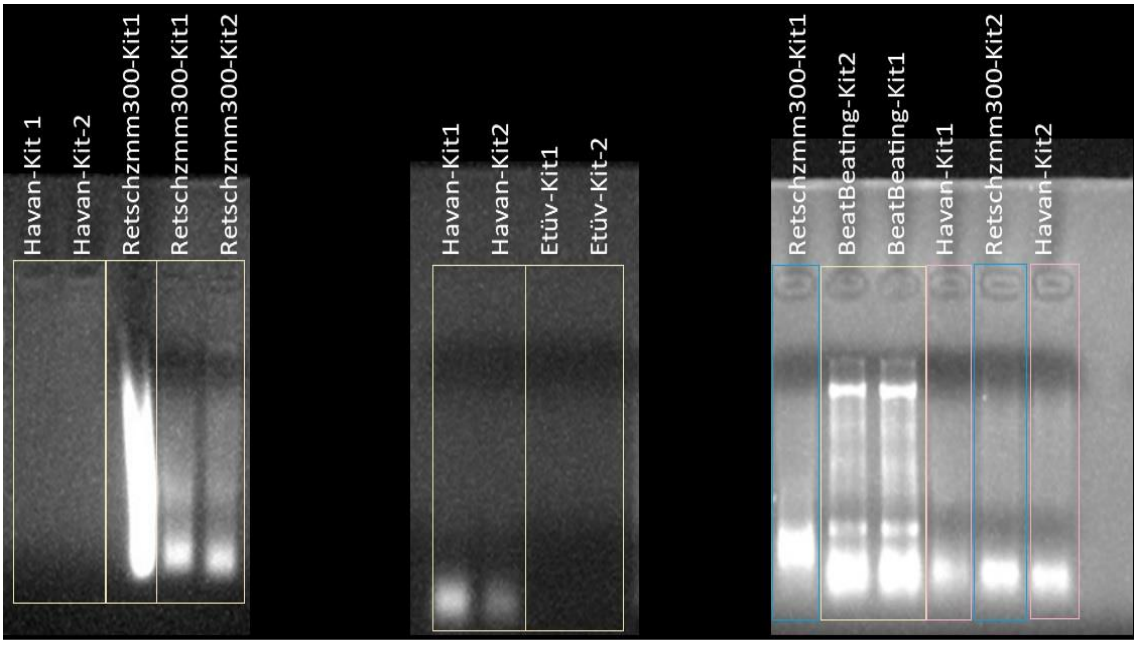
4.1. Etkin Parçalama Yönteminin Belirlenmesi

gDNA ekstraksiyonu için en etkin spor parçalama yöntemi tespit edilmiştir. Parçalama işlemi için ilk olarak havanda sıvı azot ile muamele edilen P.carthami'nin 5 dakika boyunca dövme işlemi yapılarak yapılmıştır (Şekil 4.1. (sol). İzolasyon için ticari kit kullanılmıştır. Yapılan parçalama işlemlerinin karşılaştırılması amacıyla daha sonra sıvı azotla dondurulan sporların parçalanması için RETSCHZ MM300 vibrasyonlu öğütücü kullanılmıştır. Parçalamanın ardından ticari kit ile sporlardan gDNA ekstraksiyonu yapılmıştır ancak bu yöntemin de başarılı olmadığı gözlenmiştir .

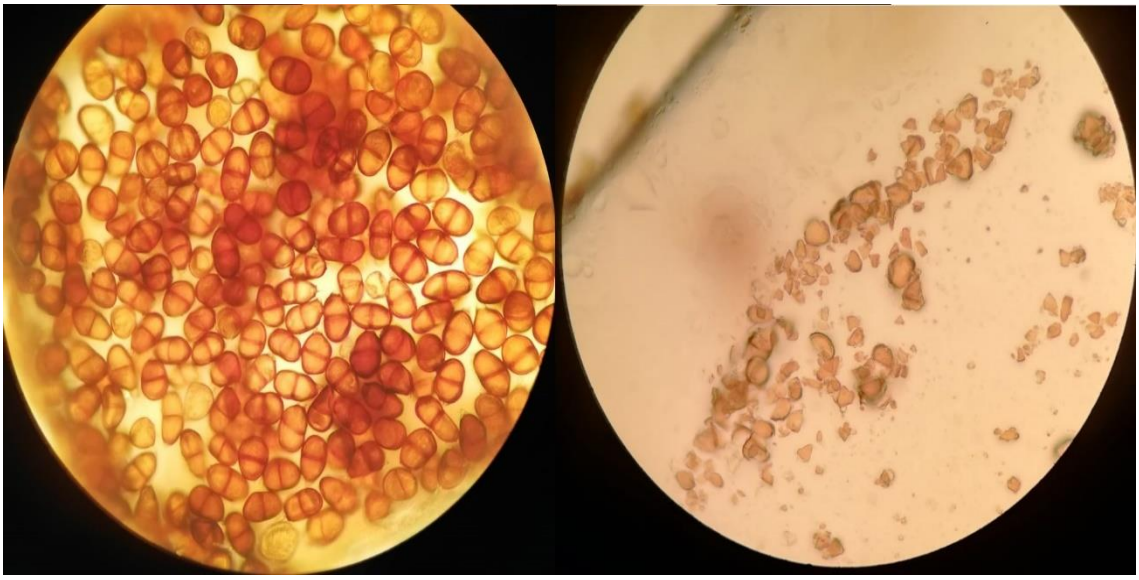
Bir sonraki işlemde ise sporlar etüvde O/N kurutularak havanda dövülmüştür. İkinci olarak sporlar sıvı azotla muamele edilerek havanda 10 dakika dövme işlemi ile parçalanmaya çalışılmıştır. Ticari kitlerle yapılan gDNA ekstraksiyonu, her iki yönteminde başarılı olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1. (orta)).

Son olarak sporlar sıvı azotla dondurulup Beat beating yöntemi ile parçalanmıştır. Daha sonra parçalanan sporlardan ticari kit kullanılarak gDNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Beat-Beating yöntemi ile belirgin gDNA'lar gözlemlenmiş ve bu yöntemin fungal sporlardan gDNA ekstraksiyonu için en başarılı parçalama yöntemi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kullanılan 1.5mm'lik cam boncuklar ile 3mm'lik cam boncukların

etkinliğinde herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir. Her iki boncukla da bantların görüntü kalitesi aynı olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.1.(sol)). Ayrıca parçalama işleminin ardından mikroskopta parçalama öncesi ve sonrası görüntülenmiştir (Şekil 4.2.). Tez çalışmasının tamamında Beat Beating yöntemi kullanılmıştır.



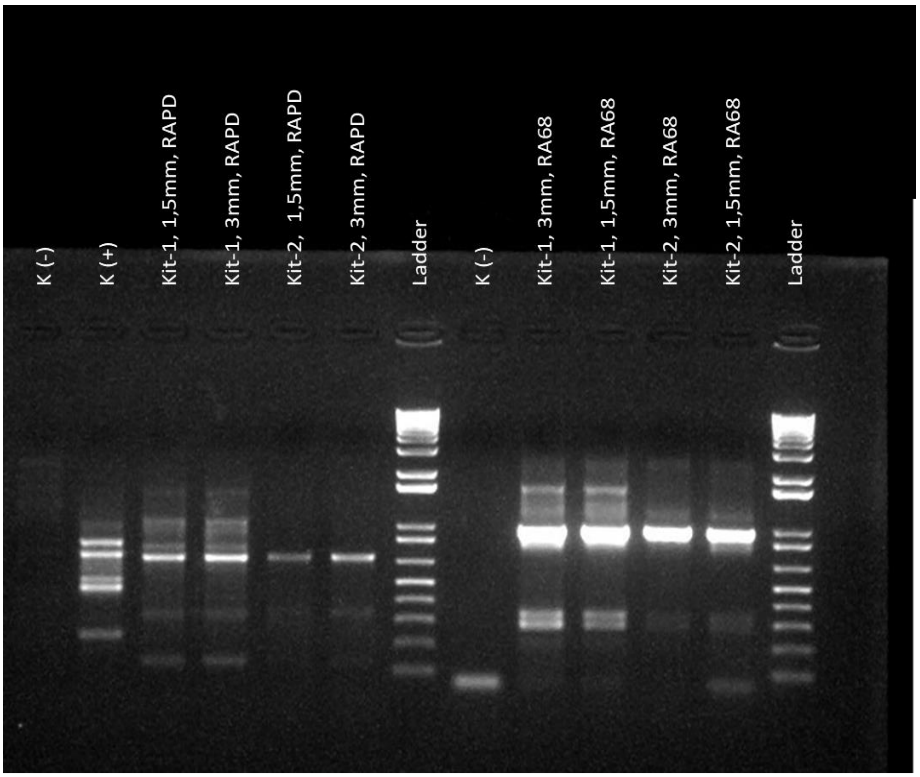
Şekil 4.1. Etüvde kurutma ve sıvı azotla havanda dövme yöntemi sonuçları (orta), havanda ve RETSCHZ MM300 yönteminden elde edilen gDNA (sol), Beat Beating yönteminden elde elde edilen gDNA (sağ)



Şekil 4.2. P.carthami sporları, Beat Beating ile parçalama öncesi (sol) sonrası (sağ)

4.2. Farklı Ekstraksiyon Kitlerinin Karşılaştırılması

Uygun parçalama yönteminin tespit edilmesinin ardından başarılı bir gDNA ekstraksiyonu için laboratuvarımızda bulunan biri ithal (Kit1) diğeri yerli (Kit2) 2 ticari kit kullanılarak en fungal sporlarda en başarılı olan tespit edilmeye çalışılmıştır. Bunun için 0.03 mg *Puccinia carthami* sporları beat beating ile parçalamak üzere cam boncuklu tüplere konmuş ve parçalama işlemi yapılmıştır. Daha sonra parçalanan örneklerden ticari kitlerde belirtilen protokoller uygulanarak gDNA izole edilmiştir. İzolasyon sonucunda elde edilen gDNA'nın PCR başarısını test etmek için bir RAPD markırı ve RA68 primerleri kullanılarak PCR yapılmış ve PCR ürünleri jel elektroforezinde analiz edilerek kitlerin verimliliği değerlendirilmiştir**.** Şekil 4.3.'te görüldüğü gibi her iki primeri ile başarılı biçimde PCR ürünü elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre (*P.carthami*, *P.triticina*, *Fusarium* spp., *Fusarium culmarum, Fusarium graminearum, Pyrenophora teres* Drechs. f. *teres, Plasmopora halstedi, Makrophomina phaseolina, Phoma* spp*, Chocliobolus sativus, Ustilago)* gDNA ekstarksiyonu için Kit-1 (Norgen Plant/Fungi isolation kit) tercih edilmiştir (Şekil 4.3.)



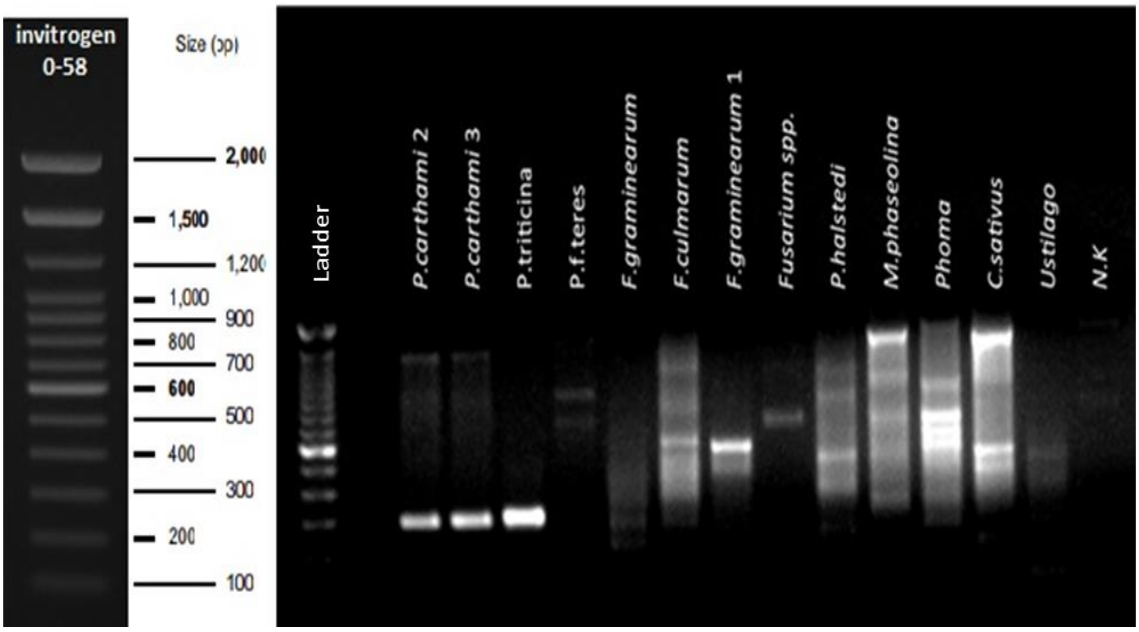
Şekil 4.3. Farklı PCR yöntemleri ve farklı primerler ile 2 ticari kitin karşılaştırılması

4.3. *P.* carthami'nin Moleküler Teşhisi

Bu aşamada Çizelge 2'de sunulan primerlerin *P.carthami*'nin moleküler teşhisinde ne kadar başarılı olduğu test edilmiştir. *P.carthami* ve tarama için temin edilen diğer fungal patojenlere (*P.triticina*, *Fusarium* spp., *F.culmarum, F. graminearum, F.graminearum, Pyrenophora teres* Drechs. f. *teres, P.halstedi, M.phaseolina, Phoma* spp*, C. sativus, Ustilago)* ait gDNA'lar kullanılarak Bölüm 3.4.3.'te sunulduğu biçimde PCR işlemi yapılmıştır.

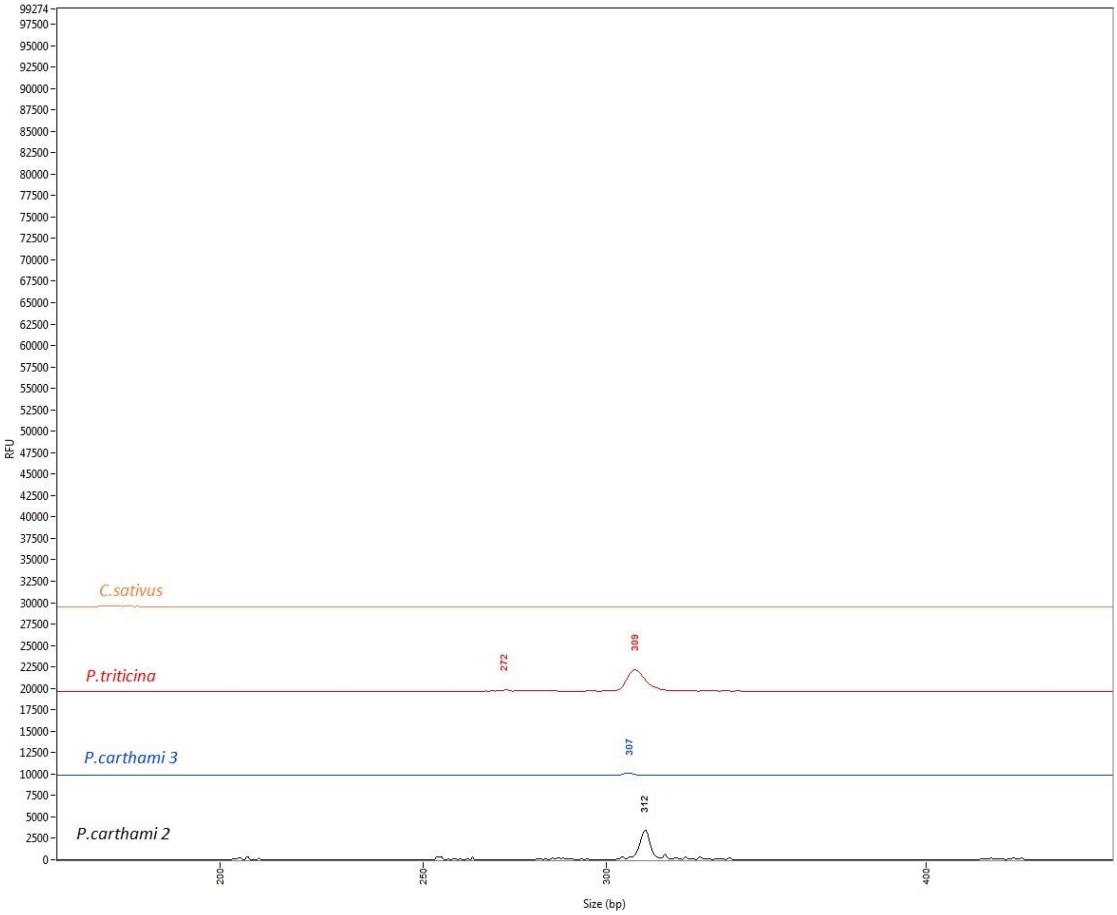
4.3.1. *β-tubulin* genine özgü primerle PCR

Puccinia türlerinin *β-tubulin* geninde varyasyonun en fazla olduğu bölgeye spesifik tasarlanan Pc.β-tub primeri ile yapılan PCR sonucunda *P.carthami* ve *P.tiriticina* da hemen hemen aynı büyüklükte (~300 bç) tek bir DNA fragmenti elde edilmiştir (Şekil 4.4). Bu iki tür için, PCR ürünlerinin aynı boyutta olup olmadığının belirlenmesi için aynı PCR ürünleri kapiller elektroforezde de analiz edilmiştir (Şekil 4.5). Taranan diğer patojenlerde ise daha büyük boyutta (500 bç) ve birbirinden farklı profillerde PCR ürünü elde edilmiştir (Şekil 4.4).



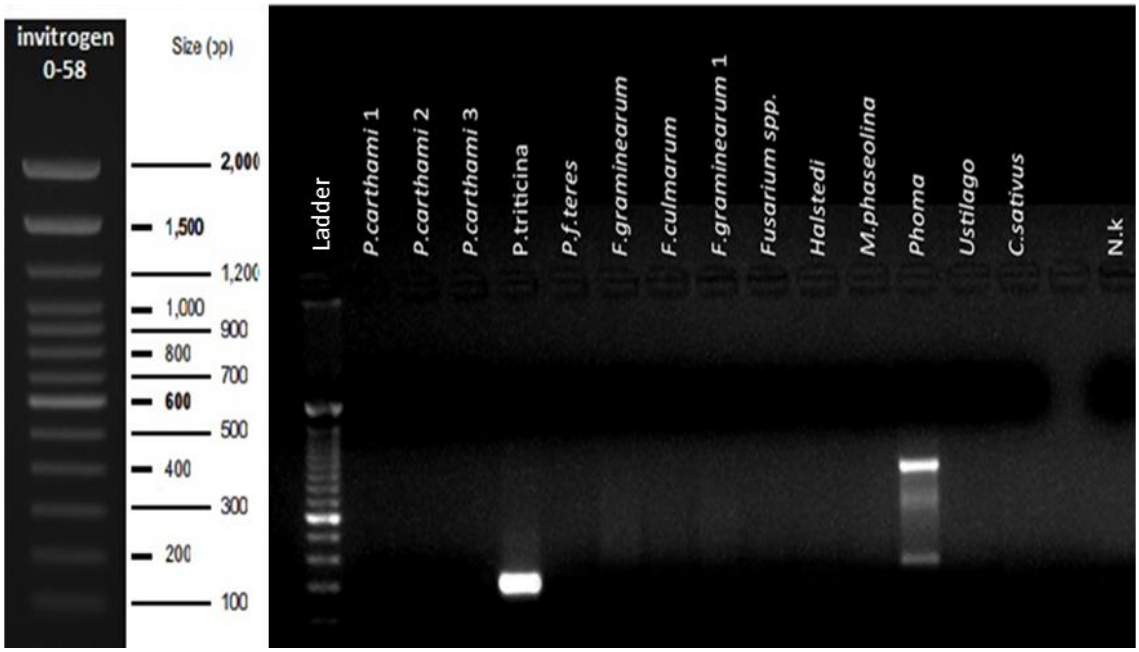
Şekil 4.4. *β-tubulin* genine tasarlanan Pc.β-tub primer çifti ile yapılan PCR ürünleri

Kapiller elektroforez analizi sonucu Pc.β-tub primer çifti ile aynı cinse mensup olan *P.carthami* ve *P.tiriticina* da aynı büyüklükte DNA fragmentlerinin (310 bç) çoğaltıldığı gözlenmiştir (*Şekil 4.5*). Dolayısıyla Pc.β-tub primer çiftinin *P.carthami*'nin moleküler teşhisi için yeterli ayrıcı özellik göstermediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. Pc.β-tub primerile yapılan PCR ürünlerinin kapiller elektroforez sonucu

Tez kapsamında kullanılan bir diğer *β-tubulin* genine özgü primer çifti *P.triticina* için tasarlanan Pt.β-tub primeridir. Bu primer çifti ile yapılan PCR sonucunda, tüm patojenler arasında sadece iki örnekte, DNA fragmenti elde edilmiştir. Bu iki örnekten biri doğal olarak *P.triticina* olmuştur *ve* üretilen DNA fragmentinin boyu 300 bç'dir. Diğer örnek ise *Phoma* ssp'dir çoğaltılan DNA fragmentinin boyu 1200 bç'dir. Elde edilen bulgular sonucunda bu primer çiftinin, *P.triticina* için moleküler teşhiste kullanılabileceği ancak *P. carthami* için uygun olmadığı tespit edilmiştir *(*Şekil 4.6*)*.



Şekil 4.6. Pt.β-tub primeri ile elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

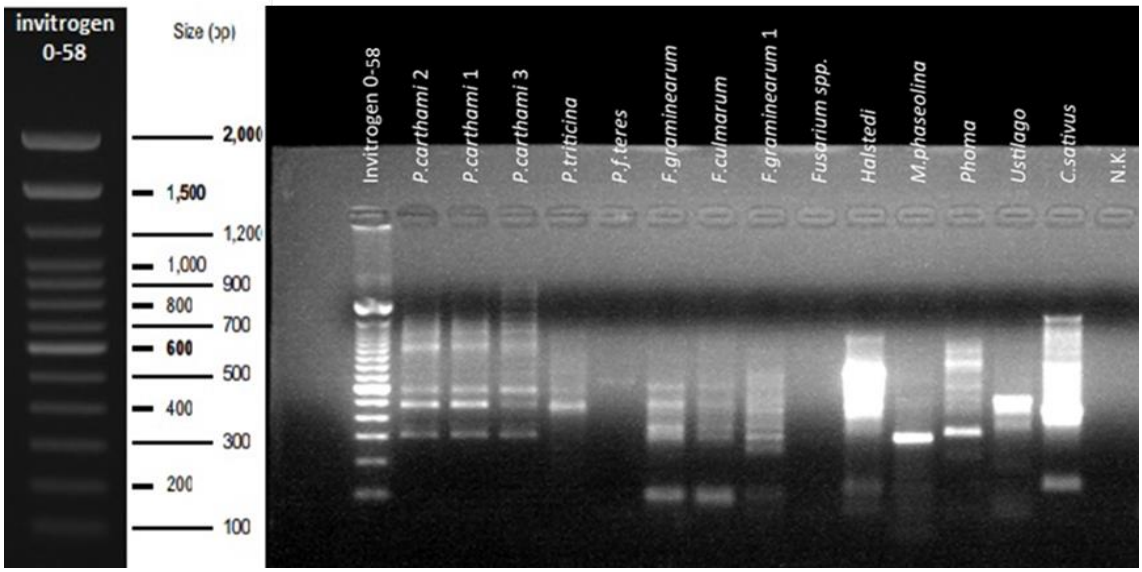
4.3.2. ITS bölgesine özgü primerle PCR

Tez çalışmasında ITS bölgesi için *P. carthami* özgü tasarlanan 2 primer çifti (Pc.ITS-1 ve Pc.ITS-2) ile daha önceki TÜBİTAK 2209A projesinde *P.tricina* için tasarlanan Pt.ITS primeri olmak üzere, 3 primer çifti kullanılmıştır.

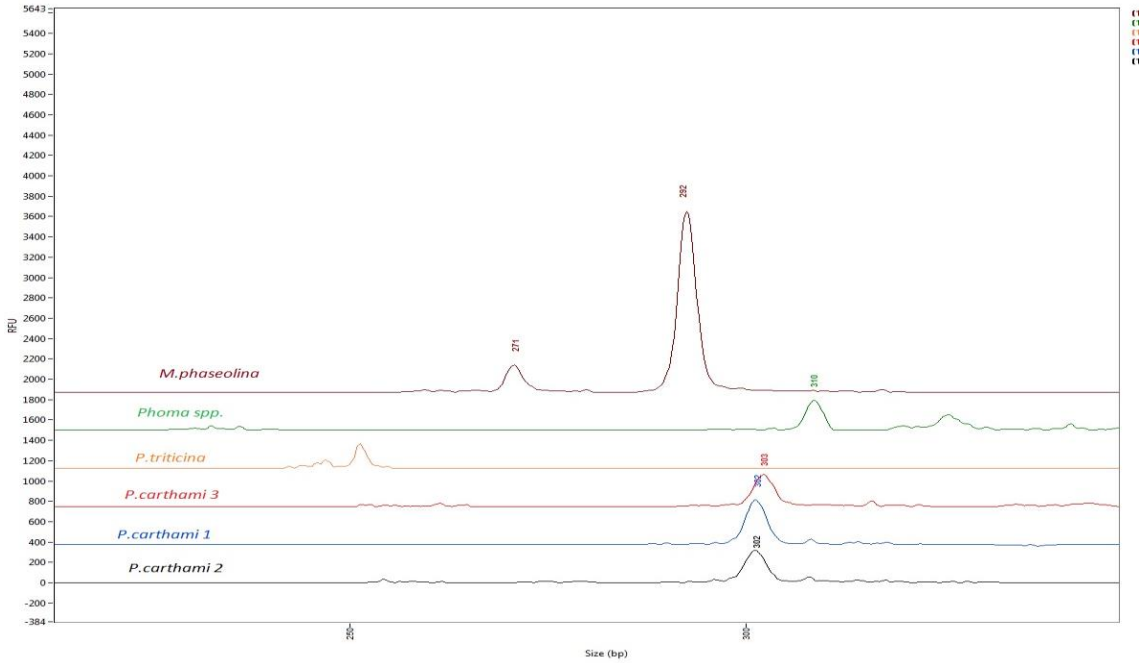
Pc.ITS-1 primer çifti ile yapılan PCR sonucunda her patojen için birden fazla DNA fragmentinin olduğu farklı bir profil elde edilmiştir (Şekil 4.7). *P.carthami'de* yaklaşık olarak 300 bç, 500 bç, 600 bç ve 900 bç boyutlarında belirgin DNA bantları gözlenmiştir. Bunlardan 500 bç, 600 bç boyutundaki DNA fragmentlerinin *P.tricina*'da olduğu ancak özellikle 300 bç boyutundaki fragmentin sadece *P.carthami* örneklerinden çoğaltıldığı gözlenmiştir. Ancak *M. phaseolina* ve *Phoma* spp. de aynı olmamakla birlikte benzer boyuttaki DNA fragmentlerinin bulunduğu (Şekil 4.7) ve daha net bir analiz gerekliliği ne deniyle bu örneklere ait PCR ürünleri kapiller elektroforezle de analiz edilmiştir.

Kapiller elektroforez analiz sonuçlarında özellikle 200-400 bç aralığına odaklanılmış ve bu aralıkta *P.carthami* örneklerinde çoğaltılan DNA fragmentlerinin 302

bç boyutunda olduğu, *P.tricina*'da bu aralıkta hiç DNA fragmentinin çoğaltılmadığı ve *M. phaseolina* ve *Phoma* spp. de ise benzer boyutta çoğaltılan DNA fragmentlerinin boyunun sırasıyla 292 bç ve 310 bç olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Sonuç olarak Pc.ITS-1 primer çiftinin birden fazla DNA fragmenti çoğaltımı ile hedef dışı genom bölgelerine de bağlanabildiği ancak *P.carthami'*ye özgü çoğalttığı 302 bç'lik DNA fragmenti ile de moleküler teşhis için alternatif olabileceği görüşüne varılmıştır .

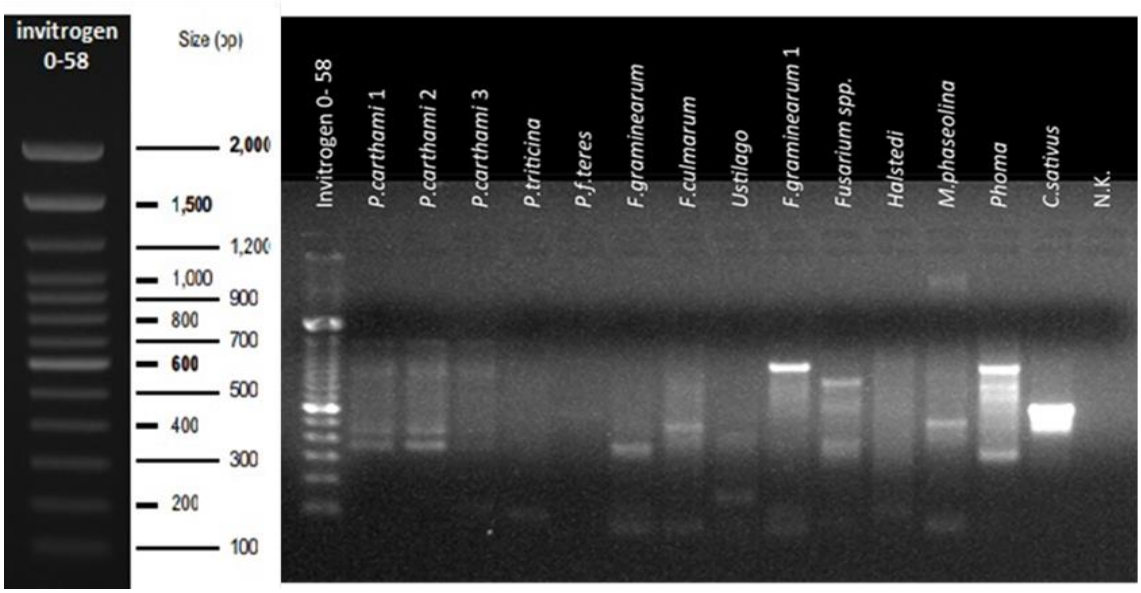


Şekil 4.7. Pc.ITS-1 primeri ile elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü



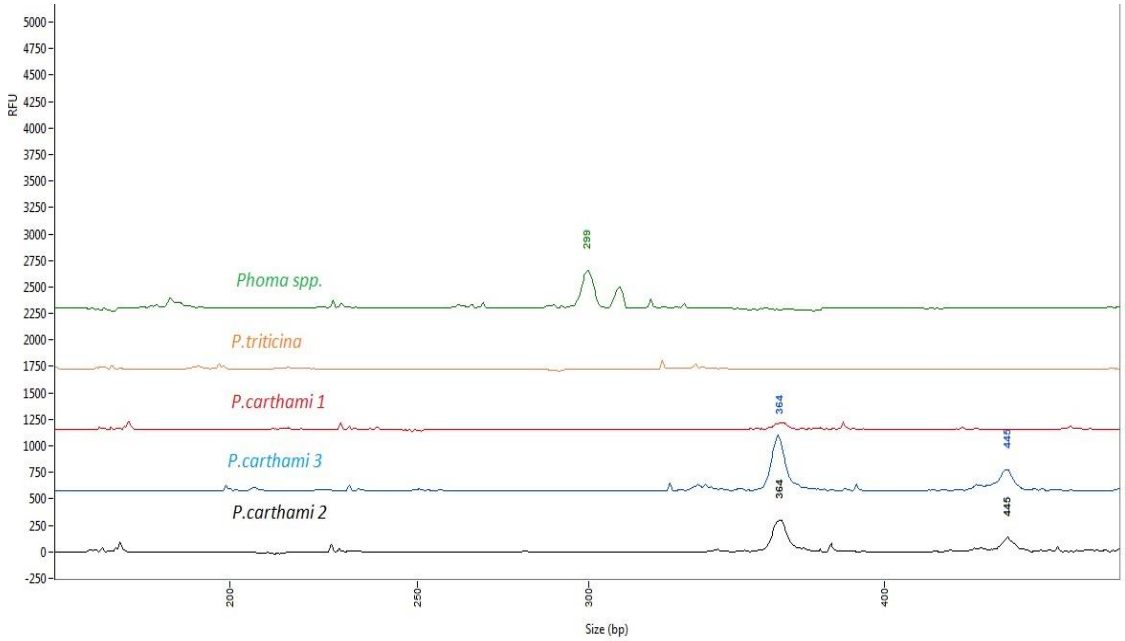
Şekil 4.8. Pc.ITS-1 primeri ile yapılan PCR ürünlerinin kapiller elektroforez sonucu

Pc.ITS-2 primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunda Pc.ITS-1'e benzer şekilde, *P.triticina* hariç diğer her patojen için birden fazla DNA fragmentinin olduğu farklı bir profil elde edilmiştir (Şekil 4.9). Özellikle *P.carthami* de gözlenen ~350-450 bç



Şekil 4.9. Pc.ITS-2 primeri ile elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

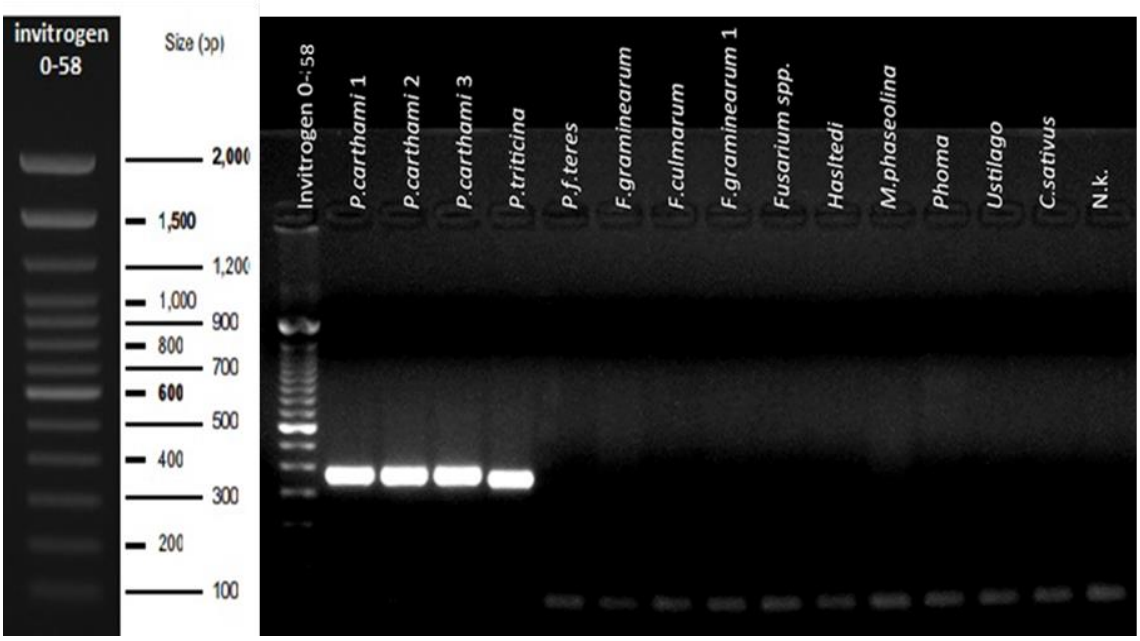
aralığındaki 2 DNA fragmentinin, teşhis için kullanılabilir olma ihtimali değerlendirilerek *P.triticina* ve yakın boyutta DNA fragmenti gözlenen *Phoma* spp.'ye ait PCR ürünleri kapiller elektroforezde tekrar analiz edilmiştir. Kapiller elektroforez sonuçları, *P.triticina*



Şekil 4.10. Pc.ITS-2 primeri ile yapılan PCR ürünlerinin kapiller elektroforez sonucu

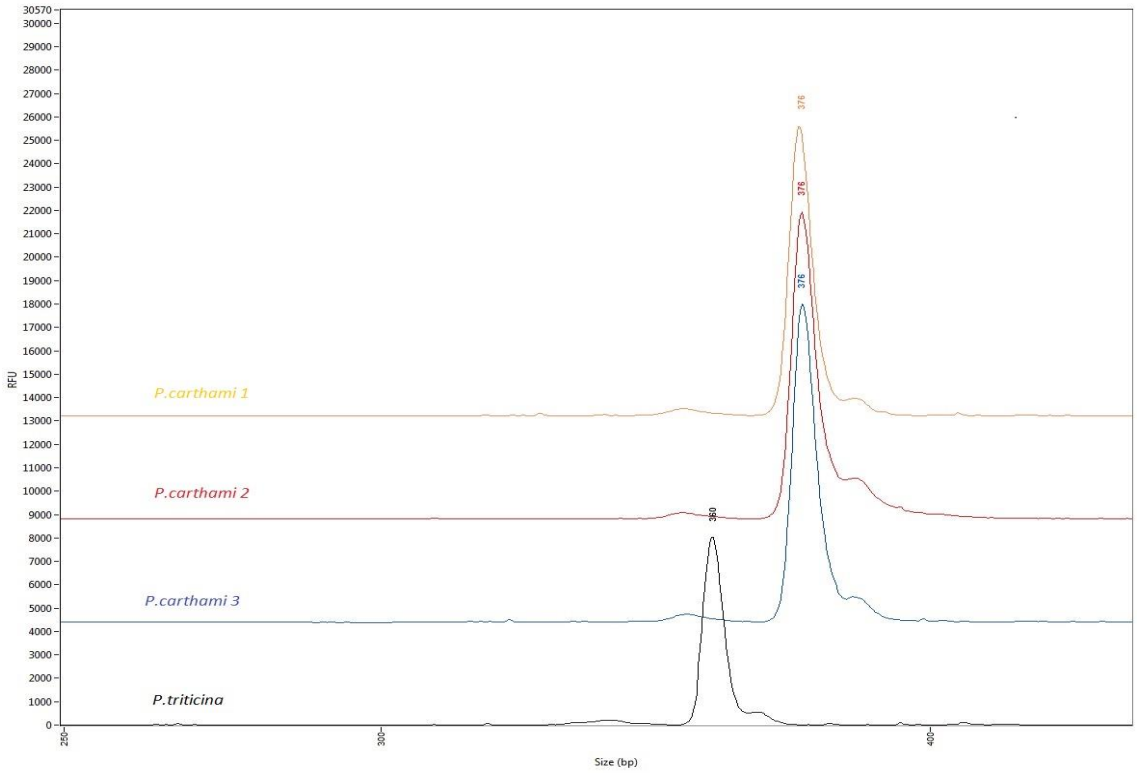
da hiç PCR ürünü elde edilmediğini, *P.carthami'*de 364 bç ve 445 bç uzunluklarında 2 DNA fragmenti çoğaltıldığını ve *Phoma* spp.'de çoğaltılan DNA fragmentlerinin ise 299 bç ve 310 bç olduğunu göstermiştir (Şekil 4.10). *P.carthami'*de çoğaltılan 364 bç ve 445 bç uzunluklarında 2 DNA fragmentinin teşhis için kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

ITS bölgesi için son olarak Pt.ITS primerde tez kapsamında test edildi. Bu primer çifti ile yapılan PCR sonucunda, sadece *P. carthami* ve *P.tiriticina* örneklerinde teşhis için kullanılabilir nitelikte, farklı büyüklükte, tek ve net bir DNA fragmenti elde edilmiştir. Buna karşın diğer patojenlerde herhangi bir amplifikasyon gözlemlenmemiştir (Şekil 4.11). *P. carthami* ve *P.tiriticina* örneklerinde çoğaltılan DNA fragmentlerinin



Şekil 4.11. Pt.ITS primeri ile elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

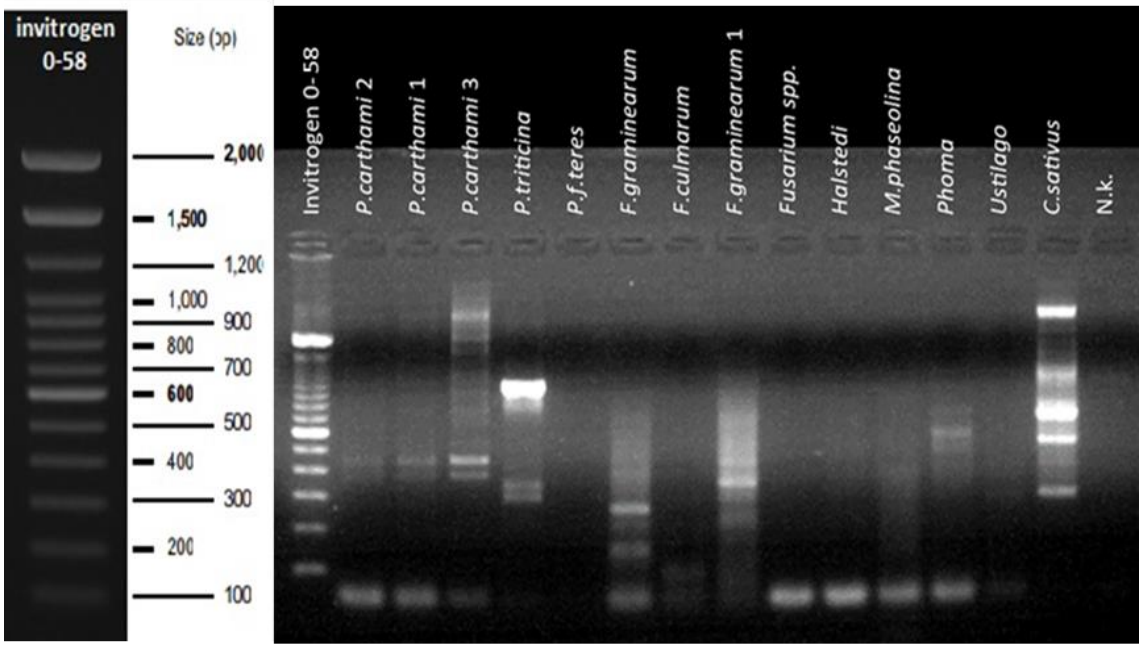
tam büyüklüğünü tespit için PCR ürünleri kapiller elektroforezde tekrar analiz edilmiştir. Kapiller elektroforez sonuçları, Pt.ITS primeri ile çoğaltılan DNA fragmentlerinin *P. carthami* de 376 bç, *P.tiriticina* da ise 360 bç büyüklüğünde olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.12.). Elde edilen sonuçlar Pt.ITS primer çiftinin Puccinia cinsine özgü olabileceğini ve hatta aynı cinste yer alan türleri ayırt edebilir nitelikte PCR ürünü veriyor olabileceğini düşündürmüştür. Bunu test etmek için daha fazla Puccinia türü ile Pt.ITS primer çiftinin test edilmesi gerekmektedir. Ancak mevcut sonuçlar moleküler teşhis için umut vericidir.



Şekil 4.12. Pt.ITS primeri ile yapılan PCR ürünlerinin kapiller elektroforez sonucu

4.3.3. RA68 primeri ile PCR

Tez kapsamında son olarak litertürde *P.triticina'*nın moleküler teşhisi için uygun olduğu rapor edilen RA68 primeri test edilmiştir. Bu primer çifti ile yapılan PCR sonucunda *P.carthami*'de 388 ve 452 bç uzunluğunda 2 DNA fragmenti elde edilirken *P. triticina*'da 250-350 bç aralığında 2 ve literatürde teşhis için kullanılabileceği ifade dilen 919 bç boyutunda (Manjunatha vd. 2018) net ve yoğun bir DNA fragmenti elde edilmiştir. Aynı primerle *F. graminearum*, *Phoma* spp.'de net olmayan farklı uzunlukta DNA bantları gözlenirken, *C.sativus*'da ise diğer patojenlerden farklı büyüklükte (~200 - >2000 bç aralığında) 4 farklı DNA bandı gözlemlenmiştir. Özet olarak RA68 primer çifti ile elde edilen PCR ürünleri, literatürde sunulan bilgilerle uyumlu sonuç vermiş ve RA689'in *P.triticina* için moleküler teşhiste kullanılabilirliği doğrulanmıştır (Şekil 4.13). Bunun yanında *P.carthami*'de elde edilen 388 ve 452 bç uzunluğunda 2 DNA fragmentinin, *P.carthami*'de moleküler teşhis için alternatif olabileceği görüşüne varılmıştır.



Şekil 4.13. RA68 primeri ile elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüsü

.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Aspir bitkisi gerek dikenli yapısı ile gerekse verim potansiyelinden dolayı tarımda mekanizasyon yetersizliklerinden dolayı üretimde yeterli düzeyde yerini bulamamıştır. Gerek yağ sanayii olsun gerek boya sanayii olsun yeni hammaddelerin sanayii kuruluşlarına sunulmasında aspir gelecek vaat eden bir bitkidir. Bununla birlikte ülkemizde ve dünyada yağ ihtiyacının artmasıyla birlikte alternatif bir bitki olmaktadır. Islah çalışmaları ile verim kapasitesinin arttırılması kaliteli yağ üretiminin artması gerekmektedir. Bununla birlikte üretimde monokültür üretimin azalmasını sağlayan önemli bir alternatif niteliğindedir. Monokültürden kaynaklık hastalık etmenlerinin popülasyonun kontrol edilmesinde, salgınlara neden artmaması açısından da önemli bir yere sahiptir. Monokültür üretimle birlikte hastalıkların artmasıyla beraber mücadele yöntemleri de gelişmiştir. Bu yöntemlerin başında kimyasal mücadele gelmektedir. Kimyasal mücadele ile patojenler ile mücadele ederken kıt olan üretim alanlarımızın ve su kaynaklarımızın da aynı zamanda kirlenmesini kolaylaştırıyoruz, kullanılamaz hale getiriyoruz.

Tarım alanlarında üretimin artması ile mikrobiyal kaynaklı hastalıkları da doğru orantılı olarak artış göstermiştir. Bu hastalıkların başında *Puccinia spp.* (Pas) funguslarının neden olduğu pas hastalıkları gelmektedir. Aspirde etkili olan pas hastalığı etmeni, *P.carthami*'nin mücadele edilmediği takdirde %100'e kadar verim kaybına sebebiyet verdiği bilinmektedir (Schwartz & Gent David, 2005). Dünya üzerinde hem mücadelesi hem de verimde oluşturduğu kayıplar ile pek çok araştırmacının ilgisini çekmiş farklı mücadele ve tanılama yöntemleri geliştirmişlerdir. Patojenin doğru şekilde

tanılanması mücadele yönteminin başarısını doğrudan etkilediğinden dolayı başarılı tanılama yöntemlerine ihtiyaç doğmuştur. Tanılama yöntemleri teknolojinin önemli ivme kazanmasıyla birlikte geleneksel yöntemlerden gelişerek modern moleküler düzeyde tanılamaya kadar ulaşmıştır.

Geleneksel yöntemler için araç gereç zaman ve materyalin yanında gerekli donanıma sahip tanılamayı yapacak kişilere de ihtiyaç duyulmaktadır. Aynı zamanda doğruluğunda ve tekrarlanabilirliğinde oluşan problemler yeni yöntemlerin gelişmesine sebebiyet vermiş geleneksel yöntemden modern moleküler yöntemlere geçilmiştir. Moleküler yöntemler geleneksel yöntemlerin aksine hızlı, hassas, bulaşıklığın hangi aşamasında olursa olsun çok az bir bitkisel materyalde bile tespite olanak sağlayan, doğruluğu ve tekrarlanabilirliği yüksek, çevreden etkilenmeyen DNA tabanlı yöntemlerdir. Zamandan önemli ölçüde tasarruf sağlamış ve tanılamanın çok kısa sürede yapılmasına ve uygun mücadele yöntemlerinin belirlenmesinde katkı sağlamıştır.

Gelişen bu tanıma yöntemleriyle birlikte *P.carthami*'de moleküler düzeyde yapılan çalışmalar sınırlı kalmış ve yakın tarihte yapılan bir çalışmada Zhao ve ark. (2007) tarafından geleneksel yöntemler kullanılarak teşhisi yapılmıştır. Diğer *Puccinia* türlerinde moleküler düzeyde çalışmalar hız kazanırken *P.carthami*' de ise bu yöntemler sınırlı kalmıştır. Bu çalışmayla, moleküler düzeyde tanılamasını yaygınlaştırmak ve aynı zamanda aspir bitkisinin ıslah edilmesine katkı sağlamak için farklı genom bölgelerini hedefleyen moleküler yöntemler geliştirilmeye çalışılmıştır.

Literatür incelendiğinde Yapılan bazı PCR tabanlı çalışmalarda farklı Puccina türleri için teşhis yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmalarda rDNA'nın ITS bölgesi, bazı temel fonksiyonları olan proteinleri kodlayan genler ve mtDNA gibi korunmuş bölgelerin çoğu mantarda taksonomik ve tür düzeyinde tanılama amacıyla kullanıldığından yola çıkarak. *β-tubulin* geni (Hirsch, Mauchline, Mendum, & Kerry, 2000), *elongation factor* (*EF*) genleri (Li & Hartman, 2003) teşhis için spesifik primerlerin tasarımında kullanılmıştır. Bununla birlikte (Aggarwal et al., 2017)*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* için *Sequalene monooxygenase*, *Ketopantoate reductase* (geleneksel PCR yöntemi ile) ve *Ketopantoate reductase* (qPCR ile) genlerini kullanarak primerler tasarlayarak PCR'a dayalı tanılama yöntemleri geliştirmişlerdir. Bunun

sonucunda *Ketopantoate reductase* gen bölgesine tasarlanan primerler başarılı sonuçlar vermiş ve *β-tubulin* geni için tasarlanan primer ise kısıtlı kalmıştır.

Başka bir çalışmada ise Manjunatha ve ark. (2018) yaptığı bir çalışmada *Puccinia triticina*'ya ait PTS68 gen bölgesinden 6 farklı primer geliştirerek tanılamada geleneksel PCR yöntemleriyle beraber LAMP (loop mediated isothermal amplification) yöntemini kuıllanmışlardır. Bu çalışmadaki amaç termal döngü cihazlarındaki pahalılıktan dolayı Tm'si 60-65°C olan primerler kullanılarak basit bir su banyosu ile amplifikasyonun izotermal koşullar altında tamamlanmasına dayanır. Bununla birlikte türe özgü tasarlanan primerler *P.triticina* DNA'sına bağlanarak, solüsyonda bulanıklık veya farklı boyama yöntemleriyle (Etidyum Bromür) ışık altında daha parlak renk yaratmasıyla gözlemlenmiştir. İlgili genin ve hedef patojenin saptanması daha fazla laboratuvar araç ve gerecine gerek kalmadan tamamlanabilmiştir. Yapılan bu çalışma *P. triticina* ile birlikte *Fusarium graminearum*, *P.striformis,* bazı *Bipolaris* türlerine ve *Blumeria graminis tritici* patojenleriyle kıyaslanmış ve teşhis için başarılı sonuç vermiştir.

Bir başka çalışmada ise *P. striiformis'*in *β-tubulin* gen bölgesi kullanılarak moleküler tanılama ve teşhis yöntemi geliştirilmiştir (Lihua, Shichang, Ruiming, Taiguo, & Wanquan, 2008). Bu yöntem ile *β-tubulin* gen bölgesine spesifik primer dizayn edilmiş ve *P.triticina*, *P.graminis* ve *Erysiphe graminis* patojenleriyle karşılaştırılmıştır. Yapılan bu çalışma ile *P.striformis*'e özgü tasarlanan primerler *P.striformis'*i ayırarak teşhis ve tanılamada kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Yapılan benzer çalışmalarda gen bölgeleri ve gen bölgelerine özgü primerler tasarlanmış ve elde edilen sonuçlarla birlikte moleküler teşhis için yeni tasarlanan primerler açığa çıkarmıştır. Yapılan bu çalışmalar genellikle buğday pas türlerine ağırlıklı olmuş ve *P.carthami*'ye ait benzer çalışmalara rastlanılmamıştır. ITS bölgesinin ve *β-tubulin* bölgelerinin patojen tanılamasında ve teşhisinde kullanılabilecek yeterli varyasyonu taşıyan gen bölgeleri olduğu ortaya konmuş, tez çalışmasından bu veriden yola çıkılarak *P.carthami*'ye özgü primerler tasarlanarak tanılama ve teşhisi amaçlanmıştır.

Sunulan tez çalışması kapsamında *P.carthami*'ye özgü tasarlanan primerlerden *P*c.β-tub primeri *P.carthami* ve *P.triticina* aynı büyüklükte bantlar verirken çalışılan diğer patojenlerden ayrımı sağlanmıştır. P*t*.β-tub primeri ise *P.carthami*'de herhangi bir DNA fragmenti çoğaltmamıştır. ITS bölgesine özgü tasarlanan primerlerden Pc.ITS-1 primer çiftinin birden fazla DNA fragmenti çoğaltımı ile hedef dışı genom bölgelerine de bağlanabildiği ancak *P.carthami'*ye özgü çoğalttığı 302 bç'lik DNA fragmentinin moleküler teşhis için alternatif olabileceği görüşüne varılmıştır. Pc.ITS-2 primer çifti ile *P.carthami'*de çoğaltılan 364 bç ve 445 bç uzunluklarında 2 DNA fragmentinin teşhis için kullanılabileceği öngörülmüştür. Bir diğer ITS bölgesi primeri olan Pt.ITS ise belirgin bir şekilde *P.carthami* ve *P.triticina*'yı kendi aralarında ve diğer patojenlerden ayırmıştır. Kullanılan tüm primerler arasında moleküler teşhis için en umut verici olan Pt.ITS primer çifti olmuştur. Ön bulgular bu primer çiftinin *Puccina* türlerine özgü ve türleri birbirinden ayırıcı nitelikte olabileceğini göstermektedir. Bunu doğrulamak için daha fazla *Puccinia* türü ile çalışmanın genişletilmesi gerekmektedir. Liretaürde *P.triticina* için rapor edilmiş RA68 primer çifti ile elde edilen sonuçlar ise RA68'in *P.triticina* için moleküler teşhiste kullanılabilirliği doğrulanmıştır. Bunun yanında *P.carthami*'de elde edilen 388 ve 452 bç uzunluğundaki 2 DNA fragmentinin, *P.carthami*'de moleküler teşhis için alternatif olabileceği görüşüne varılmıştır.

Yapılan bu çalışmayla birlikte *P.carthami*'de geleneksel tanılama yerine modern tanılama yöntemine geçilmesi hedeflenmiştir. Morfolojik olarak tanılama yöntemi için patojen miktarı, patojenlerin büyüme evrelerinin gözlemlenmesi, patojenin gelişebilmesi için bitki veya tohum temini gibi zaman alan geleneksel yöntem yerine moleküler düzeyde incelenmesi için bir adım olmuştur. Gelişen teknolojilerden birisi olan LAMP yöntemi bunlardan bir tanesidir. Tasarlanan primerlerle birlikte tarla koşullarında uygun solüsyonlar kullanılarak aspir bitkisinde *P.carthami* varlığı enfeksiyon gelişmeden moleküler olarak teşhis edilmesini mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

.

Aggarwal, R., Sharma, S., Gupta, S., Manjunatha, C., Singh, V. K., & Kulshreshtha, D. (2017). Gene-based analysis of Puccinia species and development of PCR-based marker to detect Puccinia striiformis f. sp. tritici causing yellow rust of wheat. *Journal of General Plant Pathology, 83*, 205-215.

Alpaslan, D., & Özer, N. (2017). Trakya Bölgesi'nde hasat edilmiş kanola (Brassica napus L.) tohumlarında tohum kökenli fungal etmenlerin tespiti. *Bitki Koruma Bülteni, 57*(3), 263-277. doi:10.16955/bitkorb.340045

Asan, A., Tuney, E., & Şen, B. (2017). Saf kültür olarak stoklanmış bazı mikrofungusların ITS, β-tubulin ve Aktin gen dizilerine göre moleküler tanısı. *Mantar Dergisi, 9*(1), 1-17. doi:10.30708/mantar.295146

Aslam, S., Tahir, A., Aslam, M. F., Alam, M. W., Shedayi, A. A., & Sadia, S. (2017). Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi–a mini review. *Journal of Plant Interactions, 12*(1), 493-504.

Babaoğlu, M. (2013). Ülkemiz Tarımında Aspir Bitkisinin Geleceği. *TURKTOB, Türkiye tohumcular Birliği Dergisi, Vol.1*(4), 51-52.

Babaoğlu, M. (2017). Dünya'da ve Türkiye'de Aapir Bitkisinin Tarihi, Kullanım Alanları ve Önemi. *6*, 98-102.

Başalma, S., Karakaya, A., & Uranbey, D. (2004). Response of Safftower (Carthamus tinctorius L.) Genotypes to Rust Disease. *TARIM BİLiMLERi DERGiSi, 10*(1), 93-95.

Berkeley, M. (1846). Observations, botanical and physiological, on the potato murrain.[Reprinted as Phytopathological Classics 8. Saint Paul, MN, USA: APS Press.

Berlin, A., Djurle, A., Samils, B., & Yuen, J. (2012). Genetic variation in Puccinia graminis collected from oats, rye, and barberry. *Phytopathology, 102*(10), 1006-1012.

Berthier, Y. T., Bruckart, W. L., Chaboudez, P., & Luster, D. G. (1996). Polymorphic restriction patterns of ribosomal internal transcribed spacers in the biocontrol fungus Puccinia carduorum correlate with weed host origin. *Applied and Environmental Microbiology, 62*(8), 3037-3041.

Capote, N., Pastrana, A. M., Aguado, A., & Sánchez-Torres, P. (2012). Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. *Plant pathology, 374*.

Chupp, C. (1954). A monograph of the fungus genus Cercospoia. *A monograph of the fungus genus Cercospoia.*

Cole, G. T., & Samson, R. A. (1979). *Patterns of development in conidial fungi*: Pitman Publishing Ltd.

Dayarathne, M. C., Mridha, A. U., & Wang, Y. (2020). Diagnosis of Fungal Plant Pathogens Using Conventional and Molecular Approaches *Diagnostics of Plant Diseases*: IntechOpen.

Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N., & Alabouvette, C. (1997). Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified ribosomal

DNA for the identification of Fusarium species. *Mycological Research, 101*(2), 179-187.

Edwards, S. G., O'callaghan, J., & Dobson, A. D. (2002). PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological Research, 106*(9), 1005-1025.

Erzin, N. (2018). *Türkiye Bitkisel Yağ Üretim Sektörü Sorunları ve Çözüm Önerileri.* İstanbul Kültür Üniversitesi/Sosyal Bilimler Enstitüsü/İşletme Anabilim Dalı.

FAOSTAT, 2022 https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=CATI (Erişim Tarihi 10.09.2022)

Gaffoor, I., & Trail, F. (2006). Characterization of two polyketide synthase genes involved in zearalenone biosynthesis in Gibberella zeae. *Applied and Environmental Microbiology, 72*(3), 1793-1799.

Geçit, H., Çiftçi, C., Emeklier, H., İkincikarakaya, S., Adak, M., Kolsarıcı, Ö., . . . Sevimay, C. (2009). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: Ankara.

Gibbons, A. (2013). On the trail of ancient killers: American Association for the Advancement of Science.

Gilbert, J., Knights, S., & Potter, T. (2008). *International safflower production-an overview.* Paper presented at the International Safflower Conference. Australian Oilseeds Federation. Wagga Wagga, Australia.

Hirsch, P. R., Mauchline, T. H., Mendum, T. A., & Kerry, B. R. (2000). Detection of the nematophagous fungus Verticillium chlamydosporium in nematode-infested plant roots using PCR. *Mycological Research, 104*(4), 435-439.

Hughes, K. W., Petersen, R. H., & Lickey, E. B. (2009). Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi. *New Phytologist*, 795-798.

Jain, A., Sarsaiya, S., Wu, Q., Lu, Y., & Shi, J. (2019). A review of plant leaf fungal diseases and its environment speciation. *Bioengineered, 10*(1), 409-424.

Kaffka, S. R., & Kearney, T. E. (1998). *Safflower production in California* (Vol. 21565): UCANR Publications.

Koch, T., Kellerhals, M., & Gessler, C. (2000). Virulence pattern of Venturia inaequalis field isolates and corresponding differential resistance in Malus x domestica. *Journal of Phytopathology, 148*(6), 357-364.

Kuzdraliński, A., Kot, A., Szczerba, H., Nowak, M., & Muszyńska, M. (2017). A review of conventional PCR assays for the detection of selected phytopathogens of wheat. *Microbial Physiology*, *27*(3), 175-189.

Li, S., & Hartman, G. (2003). Molecular detection of Fusarium solani f. sp. glycines in soybean roots and soil. *Plant pathology, 52*(1), 74-83.

Lihua, C., Shichang, X., Ruiming, L., Taiguo, L., & Wanquan, C. (2008). Early molecular diagnosis and detection of Puccinia striiformis f. sp. tritici in China. *Letters in Applied Microbiology, 46*(5), 501-506.

LIU, T.-g., Xi, W., Li, G., Bo, L., CHEN, W.-q., & XIANG, W.-s. (2014). A FIASCO-Based Approach for Detection and Diagnosis of Puccinia graminis f. sp. tritici in China. *Journal of Integrative Agriculture, 13*(11), 2438-2444.

Ma, Z., Yoshimura, M. A., Holtz, B. A., & Michailides, T. J. (2005). Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of Monilinia laxa in California. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science, 61*(5), 449-457.

Manjunatha, C., Sharma, S., Kulshreshtha, D., Gupta, S., Singh, K., Bhardwaj, S. C., & Aggarwal, R. (2018). Rapid detection of Puccinia triticina causing leaf rust of wheat by PCR and loop mediated isothermal amplification. *PloS one, 13*(4), e0196409.

Martin, R. R., James, D., & Lévesque, C. A. (2000). Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annual review of phytopathology, 38*(1), 207-239.

Mulè, G., Susca, A., Stea, G., & Moretti, A. (2004). A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of Fusarium verticillioides, F. proliferatum and F. subglutinans. *European Journal of Plant Pathology, 110*(5), 495-502.

Narayanasamy, P. (2011). Detection of fungal pathogens in plants *Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis:* (pp. 5-199): Springer.

Nazar, R., Hu, X., Schmidt, J., Culham, D., & Robb, J. (1991). Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of Verticillium wilt pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology, 39*(1), 1-11.

O'Gorman, C. M., Fuller, H. T., & Dyer, P. S. (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen Aspergillus fumigatus. *Nature*, *457*(7228), 471-474.

Paça, İ. (2000). *Trakya bölgesi çeltik alanlarında görülen hastalıkların saptanması, etmenlerinin tanılanması ve yaygınlık oranlarının belirlenmesi.* Fen Bilimleri Enstitüsü.

Park, K.-S., & Lee, S.-G. (2003). Rust of safflower (Carthamus thinctorius) caused by Puccinia carthammi. *Research in Plant Disease, 9*(3), 128-130.

Pramateftaki, P. V., Antoniou, P. P., & Typas, M. A. (2000). The complete DNA sequence of the nuclear ribosomal RNA gene complex of Verticillium dahliae: intraspecific heterogeneity within the intergenic spacer region. *Fungal Genetics and Biology, 29*(1), 19-27.

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., . . . Robinson, C. J. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology, 75*(23), 7537-7541.

Schwartz, H. F., & Gent David, H. (2005). Safflower. *High Plains IPM Guide, a cooperative effort of the University of Wyoming, University of Nebraska, Colorado State University and Montana State University*.

Smith, M. E., Douhan, G. W., & Rizzo, D. M. (2007). Intra-specific and intra-sporocarp ITS variation of ectomycorrhizal fungi as assessed by rDNA sequencing of sporocarps and pooled ectomycorrhizal roots from a Quercus woodland. *Mycorrhiza, 18*(1), 15-22.

Villaréal, L. M., Lannou, C., de Vallavieille-Pope, C., & Neema, C. (2002). Genetic variability in Puccinia striiformis f. sp. tritici populations sampled on a local scale during natural epidemics. *Applied and Environmental Microbiology, 68*(12), 6138-6145.

Wang, X., Tang, C., Chen, J., Buchenauer, H., Zhao, J., Han, Q., . . . Kang, Z. (2009). Detection of Puccinia striiformis in latently infected wheat leaves by nested polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology, 157*(7-8), 490-493.

White, Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. 315-322.

Wieloch, W. (2006). Chromosome visualisation in filamentous fungi. *Journal of microbiological methods, 67*(1), 1-8.

Xi, W., Taiguo, L., & Wensheng, X. (2011). Development of a ssr molecular marker for puccinia graminis f. sp. tritici. *China Agriculture Science*.

Zhao, S., Xie, G.-L., Li, H., & Li, C. (2007). Occurrence of Rust Caused by Puccinia carthami on Snow Lotus in China. *Plant Disease, 91*(6), 772-772.

ÖZGEÇMİŞ

Mutlu ŞEN Kırklareli'nde doğdu. İlköğretim ve ortaöğretimini Kırklareli'nin Kofçaz ilçesinde tamamladı. Lise eğitimimi Kırklareli Atatürk Anadolu Lisesinde 2012 yılında tamamladı ve ardından aynı yıl üniversite eğitimimi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünü kazandı. 2017 yılında mezun olarak 2019 yılında Trakya Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisan eğitimine başladı.