

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2015-YL-060

AYDIN İLİNDE ÇİLEKTEKİ FUNGAL
KONTAMİNASYONUN MOLEKÜLER TANISI ve
Botrytis cinerea **TÜRÜNÜN GENETİK YAPISI**

Zeynep ÜN

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. H. Halil BIYIK

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Zeynep ÜN tarafından hazırlanan **Aydın İlinde Çilekteki Fungal Kontaminasyonun Moleküler Tanısı ve *Botrytis cinerea* Türünün Genetik Yapısı** başlıklı tez, 02.10.2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	: Prof.Dr. İsim SOYİSİM	ADÜ	
Üye	: Prof.Dr. İsim SOYİSİM	ADÜ	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu **YÜKSEK LİSANS** tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY
Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

02/10/2015

Zeynep ÜN

ÖZET

AYDIN İLİNDE ÇİLEKTEKİ FUNGAL KONTAMİNASYONUN MOLEKÜLER TANISI ve *Botrytis cinerea* TÜRÜNÜN GENETİK YAPISI

Zeynep ÜN

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. H. Halil BIYIK

2015, 67 sayfa

Çilek hem sanayiye elverişli hem de taze olarak tüketilebilen çok lezzetli ve hoş kokulu bir meyve türüdür. Ayrıca bol miktarda A,B,C vitaminleri, kalsiyum, demir ve fosfor gibi mineral maddeler içerir. Son verilere göre ülkemiz 353,173 ton ile dünya çilek üretiminde üçüncü sırada yer almaktadır. Çilek bitkisi çok fazla fungal hastalığa maruz kalmaktadır. Bu fungal hastalıklar başlıca yaprak, meyve gibi kısımları hastalandıran toprak üstü hastalıklar ve kök ile kök boğazını hastalandıran toprak kaynaklı hastalıklar olarak sınıflandırılmaktadır. Aydın ilinde çilek bitkisinde fungal kontaminasyonun moleküler olarak tanımlanması ve *Botrytis cinerea* türünün popülasyonlarının yapısını belirlenmesine yönelik bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle beş (Umurlu, Köşk, Sultanhisar, Atça ve Yenipazar) lokaliteden toplanan hastalıklı bitkilerden 347 küf şuşu elde edilmiştir. Bu küf şuşlarından morfolojik olarak 11 farklı cins tanımlanmıştır. Moleküler tanımlama için 78 örneğin rDNA ITS gen bölgesi çoğaltılmış ve GENE BANK verileri ile kıyaslanması sonucunda da 11 cinse ait 20 farklı tür tanımlanmıştır. *Botrytis cinerea* türünün popülasyonlarının yapısını belirlenmesi içinde dokuz mikrosatellit bölgesi çalışılmıştır. Çalışılan beş lokalite de yapılan analizler sonucunda genetik bir yapılanma olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak çilekte kontamine olan fungusların hem morfolojik hem de moleküler tanımlanması bir birini desteklemiştir. Beş *Botrytis cinerea* popülasyonunun iki gruba ayrıldığı tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Çilek, Moleküler Tanımlama, rDNA ITS, *Botrytis cinerea*, Mikrosatellit, Aydın

ABSTRACT**GENETIC STRUCTURE OF THE POPULATION OF *Botrytis cinerea*
AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF THE FUNGAL
CONTAMINATION IN STRAWBERRY IN AYDIN PROVINCE**

Zeynep ÜN

M.Sc. Thesis, Department of Biology

Supervisors: Doç. Dr. H. Halil BIYIK

2015, 67 pages

Strawberry is a kind of delicious and aromatic fruit which can be consumed as fresh and also is suitable for industry. Besides, it contains A, B, C vitamins, calcium, iron and phosphorus in rich amounts. According to last data, our country is in the third place of strawberry production with 353.173 tons. However, strawberry is exposed to many fungal diseases. These fungal diseases are mainly classified as the diseases over the soil which is affective to parts like leaves and fruits and the diseases under the soil which makes the roots and the neck rots sick. In Aydın province, there isn't a study for molecular identification of fungal contamination in strawberry and for determination of population structure of *Botrytis cinerea*. For this reason, 347 strains are obtained from the sick plants which are collected from five different areas. From these strains, 11 morfologically different kinds are identified. For molecular identification, rDNA ITS gene part of 78 examples are multiplied and as a result of the compare with GENE BANK data, 20 different kind that belong to 11 species are determined. Nine microsatellite area are studied to determine the population structure of *Botrytis cinerea* species. As a result of analysis in five areas, it is determined that there is a genetical structure. As a consequence of this study, both molecular and morfological identification results of the contaminated fungus in strawberry supported each other. It is determined that five *Botrytis cinerea* populations are separated to two groups.

Keywords: Strawberry, Molecular Identification, rDNA ITS, *Botrytis cinerea*, Microsatellite, Aydın

ÖNSÖZ

Bu çalışmam süresince her türlü yardım ve fedakârlığı esirgemeyen, bilgi, tecrübe ve güler yüzü ile çalışmama ışık tutan, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, öğrencisi olduğum için onur duyduğum, ayrıca bana bu çalışmayı vererek kendimi geliştirmeye yönelik de birkaç adım ileride olmamı sağlayan tez danışmanım sayın Doç. Dr. H. Halil BIYIK'a içtenlikle sonsuz teşekkür ederim.

Değerli Hocalarım Doç. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL ve Dr. Esin POYRAZOĞLU'na lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca verdikleri her türlü destek ve moral için teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin hazırlanması sırasında beni cesaretlendiren, yardımlarını ve zamanını esirgemeyen, her zaman destek olan değerli arkadaşlarım Ayşe ALKIŞ, Yusuf GEROĞLU ve Bahadır TÖRÜN'e çok teşekkür ederim. Tezimin en zorlu zamanında benden desteğini ve sabrını esirgemeyen Nilay Ezgi ÇAKAR, Gülşah ÖZÇELİK, Gülay AKÇA, Emin BOZKURT ve Mehmet TURAL'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca en başından beri tüm çalışmalarımda gerek manevi gerekse fikirleri ile benden yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, moleküler çalışmalarım sırasında bana yol gösteren, sabrını ve sevgisini kaybetmeyen Dr. Can YILMAZ'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için maddi kaynak sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne (Proje no: ADÜ-BAP-FEF- 14019)'a teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan, sevgisini ve sonsuz emeklerini benden esirgemeyen çok kıymetli Annem Filiz ÜN ve Babam Ergün ÜN'e sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca bana güç veren ve desteklerini hiç eksik etmeyen kardeşlerim Zuhal ÜN ve Ayşegül ÜN'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELERDİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1. MATERYAL.....	13
3.1.1. Çilek Örneği Toplanan Lokaliteler	13
3.1.2. Kullanılan Besiyerler ve Çözeltiler	14
3.2. YÖNTEM.....	17
3.2.1. Çileklerden Toplam Küf İzolasyonu	17
3.2.2. İzole Edilen Küflerin Morfolojik Tanılanması.....	18
3.2.3. Toplam Genomik DNA İzolasyonu	19
3.2.3.1. Toplam Genomik DNA'nın Kalite ve Miktarının Belirlenmesi	20
3.2.4. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	21
3.2.4.1. rDNA ITS Gen Bölgesi Reaksiyon Koşulları	21
3.2.4.2. ITS Gen Bölgesi Dizi Analizi ve Veri Analizi.....	23
3.2.4.3. <i>B.cinerea</i> Mikrosatellit Reaksiyon Koşulları	26
3.2.4.4. <i>B.cinerea</i> Mikrosatellit Veri Analizi	28
4. BULGULAR	30

4.1. Kf Florasının Belirlenmesi	30
4.1.1. Morfolojik Tanımlama	30
4.1.2. Moleküler Tanımlama	33
4.2. <i>B.cinerea</i> Populasyonlarının Genetik Yapısı.....	37
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	52
5.1.Morfolojik ve Moleküler Tanımlama	53
5.2. <i>B.cinerea</i> Populasyonlarının Genetik Yapısı.....	55
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	65

SİMGELER DİZİNİ

µl	Mikrolitre
AFTOL	Assembling the Fungal Tree of Life
bç	Baz Çifti
DNA	Deoksiribonukleik Asit
dNTP	Deoxyribonucleotide Triphosphate
EDTA	Etilen DiaminTetra Asetik Asit
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Ziraat Örgütü
FTS	Fizyolojik Su
F_{st}	Genetik Uzaklık
H_B	Beklenen Heterozigotluk (gen çeşitliliği)
H_G	Gözlenen Heterozigotluk
k	Alel Sayısı
MEA	Malt Ekstrat Agar
Nm	Nanometre
OD	Optik dansite
Ort	Ortalama
P	Olasılık Değerleri
PCI	Fenol Kloroform İzoamilalkol
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	Patates Dekstroza Agar
RAPD	Rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA
RBCA	Rose Bengal Kloramfenikol Agar
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SH	Standart Hata
SS	Standart Sapma

STE	Sodyum Tris EDTA
TE	Tris EDTA
TPM	İki fazlı mutasyon modeli
UPGMA	Unweighted pair Group Method with Arithmetic Mean
UV	Ultraviyole ışını

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünya çilek üretimi.....	2
Şekil 1.2. Türkiye’deki çilek üretimi	2
Şekil 3.1. <i>Botrytis cinerea</i> tarafından enfekte olmuş örnekler	13
Şekil 3.2. Çilek örneklerinin toplandığı lokaliteler	14
Şekil 3.3. Saflaştırılan küf kolonileri	18
Şekil 3.4. Laktofenol Pamuk Mavisi ile hazırlanan fungus örnekleri	19
Şekil 3.5. Total DNA izolasyonu örnekleri.....	21
Şekil 3.6. rDNA gen bölgesi	22
Şekil 3.7. ITS gen bölgesi PCR ürünleri	23
Şekil 3.8. BioEdit 7.0.9 programı tarafından bir ITS gen bölgesi dizisinin görüntüsü	23
Şekil 3.9. ITS gen bölgesi blast sonucu	25
Şekil 3.10. ITS gen bölgesi karşılaştırma sonucu	26
Şekil 3.11. Bc 1 ve Bc 3 lokusları PCR ürünleri.....	28
Şekil 3.12. <i>Bc 10</i> lokus görüntüsü.....	28
Şekil 4.1. Laktofenol Pamuk mavisi solüsyonu kullanılarak boyanan fungusların spor ve hif yapıları	32
Şekil 4.2. Çilekten izole edilen bazı fungus cinslerinin binoküler mikroskop altındaki görüntüleri.....	33
Şekil 4.3. NETWORK analizine dayalı ITS gen bölgesi haplotiplerinin tahmini kladogramı	36
Şekil 4.4. ITS gen bölgesi haplotiplerinin UPGMA uzaklık ağacı	37
Şekil 4.5. <i>Bc1</i> lokusu alel ve alel sıklıkları	45
Şekil 4.6. <i>Bc2</i> lokusu alel ve alel sıklıkları	45
Şekil 4.7. <i>Bc3</i> lokusu alel ve alel sıklıkları	46
Şekil 4.8. <i>Bc4</i> lokusu alel ve alel sıklıkları	46

Şekil 4.9. <i>Bc5</i> lokusu alel ve alel sıklıkları.....	47
Şekil 4.10. <i>Bc6</i> lokusu alel ve alel sıklıkları.....	47
Şekil 4.11. <i>Bc7</i> lokusu alel ve alel sıklıkları.....	48
Şekil 4.12. <i>Bc9</i> lokusu alel ve alel sıklıkları.....	48
Şekil 4.13. <i>Bc10</i> lokusu alel ve alel sıklıkları.....	49
Şekil 4.14. <i>B.cinerea</i> lokalitelerinin UPGMA uzaklık ağacı.....	50
Şekil 4.15. <i>B.cinerea</i> lokalitelerinin Structure analizi sonuçları	51
Şekil 4.16. <i>B.cinerea</i> lokalitelerinin Structure analizi K değeri	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çilek örneği toplanan lokaliteler.....	13
Çizelge 3.2. <i>B.cinerea</i> için mikrosatellit analizinde kullanılan oligonükleotid dizi, boya ve uzunlukları.	27
Çizelge 4.1. Morfolojik olarak tanımlanan fungus suşları	30
Çizelge 4.2. Genebak verileri ile kıyaslanan fungus izolatları.....	34
Çizelge 4.3. Lokalitelere göre mikrosatellit alellerinin dağılımı.....	37
Çizelge 4.4. <i>B.cinerea</i> örneklerinin <i>Bc 1</i> lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (<i>k</i>) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri	39
Çizelge 4.5. <i>B.cinerea</i> örneklerinin <i>Bc 2</i> lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (<i>k</i>) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri	40
Çizelge 4.6. <i>B.cinerea</i> örneklerinin <i>Bc 3</i> lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (<i>k</i>) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri	41
Çizelge 4.7. <i>B.cinerea</i> örneklerinin <i>Bc 4</i> lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (<i>k</i>) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri	41
Çizelge 4.8. <i>B.cinerea</i> örneklerinin <i>Bc 5</i> lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (<i>k</i>) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri	42
Çizelge 4.9. <i>B.cinerea</i> örneklerinin <i>Bc 6</i> lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (<i>k</i>) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri	42
Çizelge 4.10. <i>B.cinerea</i> örneklerinin <i>Bc 7</i> lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (<i>k</i>) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri	43
Çizelge 4.11. <i>B.cinerea</i> örneklerinin <i>Bc 9</i> lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (<i>k</i>) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri	43

- Çizelge 4.12. *B.cinerea* örneklerinin *Bc 10* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (*k*) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.....44
- Çizelge 4.13. *B.cinerea* örneklerinin incelenen lokusların toplamında istatistiksel olarak tamamlayıcı değerleri..... 44
- Çizelge 4.14. *B.cinerea* populasyonlarının Hardy-Weinberg dengesine dayalı alel sıklığı anlamlılığı 49
- Çizelge 4.15. *B.cinerea* populasyonlarının nDNA bakımından genetik yapı olarak ikiye karşılaştırılması 50
- Çizelge 5.1. Lokalitelerde tespit edilen küf türleri 53
- Çizelge 5.2. Bu çalışma ve dünya genelinde yapılan bazı *B. cinerea* populasyonlarının gen çeşitliliği 55

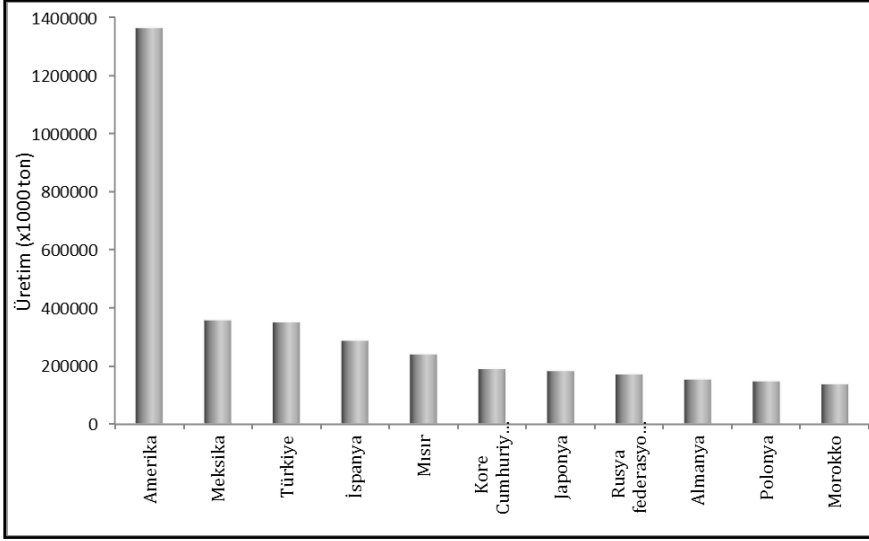
1. GİRİŞ

Çilek üzüksü meyveler grubuna giren, çok yıllık, otsu bir bitkidir. İlkbaharda hiçbir meyvenin bulunmadığı bir zamanda olgunlaşması nedeniyle, tüketici tarafından tercih edilen bir meyvedir. Hem sanayiye elverişli hem de taze olarak tüketilebilen çok lezzetli ve hoş kokulu bir meyve türüdür. Bol miktarda A,B,C vitaminleri, kalsiyum, demir ve fosfor gibi mineral maddeler içerir. Taze olarak kullanılması yanında çileğin pastası, reçeli, kompostosu ve likörü de yapılmaktadır. Ayrıca derin dondurucu sayesinde uzun süre saklanarak da tüketilebilir.

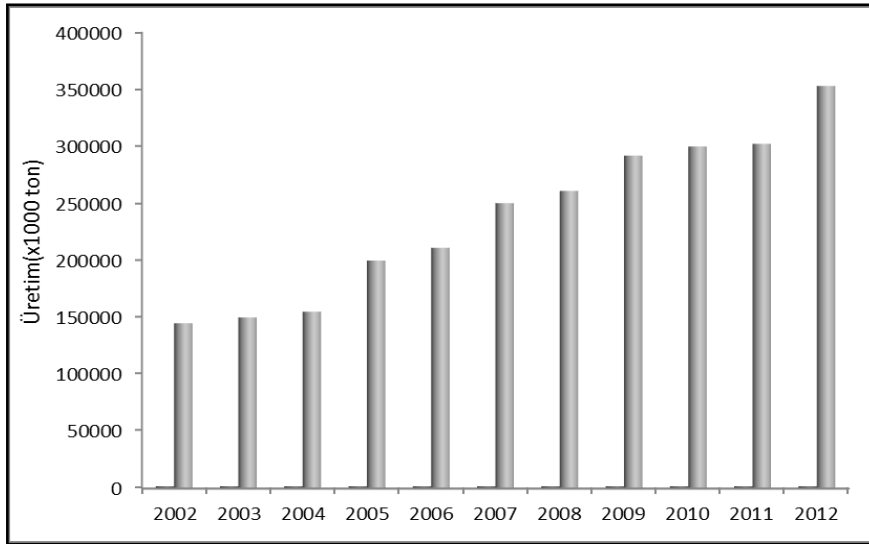
İlk olarak kültüre alınan çilek türü “Orman Çileği” veya “Yabani Çilek” olarak adlandırılan, meyveleri küçük fakat kokulu *Fragaria silvestris*'dir (Aybak, 2000). Günümüzde yetiştiriciliği yapılan kültür çeşitlerinin büyük çoğunluğu, 1750' li yıllarda Avrupa'da *Fragaria chiloensis* ve *Fragaria virginiana* isimli iki türün hibritlenmesi ile elde edilen *Fragaria x ananassa*'dan elde edilmiştir. Bu türe ismi meyvelerinin kokusu ananasa benzediğinden dolayı verilmiştir (Maas, 1998). Dünyada yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan çeşit California Üniversitesi'nde geliştirilen Camarosa çeşididir. Bu çeşit kısa gün çeşidi olup erkenci ve iri meyvelidir. Meyveleri parlak, kırmızı, sert ve yola dayanıklıdır (Hancock, 1999). Ülkemizde de en çok üretimi yapılan çilek çeşitlerinden birisi Camarosa'dır. Bu çeşit sera ve açıkta yaz dikimi çilek yetiştiriciliğine uygundur (Aybak, 2000)

Dünya'da çilek üretimi 52 ülke tarafından yapılmaktadır. FAO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü)'nun 2005 verilerine göre ülkemiz dünya çilek üretiminde beşinci sırada yer almaktadır. 2012 verilerine göre ise ülkemiz dünya çilek üretiminde 353,173 ton ile üçüncü sıraya yükselmiştir (Şekil 1.1). Son on yıl dikkate alındığında ülkemizde çilek üretimi yaklaşık olarak iki buçuk kat artmıştır (Şekil 1.2).

Çilek üretimi başta Akdeniz bölgesi olmak üzere, Ege ve Marmara bölgesinde önemli bir tarım ürünüdür. En fazla çilek üretimi Silifke (Mersin) başta olmak üzere, Sultanhisar (Aydın), Antalya, Bursa ve Manisa illerinde yapılmaktadır. Ülkemizde 2012 yılında 351.814 ton çilek üretimi yapılmıştır (Şekil 1.2). Aydın İli bu üretimin 46.757 (%13,2) tonunu sağlamıştır.



Şekil 1.1. Dünya çilek üretimi.



Şekil 1.2. Türkiye'deki çilek üretimi.

Çilek gelişimini çevresel, genetik ve biyolojik faktörler etkilemektedir. Üretimde verimi etkileyen en önemli faktörlerden biri bitki koruma problemleridir. Çilek bitkisi çok fazla fungal hastalığa maruz kalmaktadır. Bu fungal hastalıklar başlıca yaprak, meyve gibi kısımları hastalandıran toprak üstü hastalıklar ve kök ile kök boğazını hastalandıran toprak kaynaklı hastalıklar olarak sınıflandırılmaktadır.

Yeşil aksamda görülen hastalıklar kurşuni küf (*Botrytis cinerea* (Pers.:Fr.) başta olmak üzere, külleme (*Sphaerotheca macularis* (Wallr.:Fr.Jacz.), yaprak leke hastalığı (*Mycosphaerella fragariae* (Tul. Lindau) ve antraknoz (*Collectotrichum spp.*) olarak sayılabilir. Toprak kaynaklı fungal hastalıklardan en yıkıcı olanları rhizoctonia çürüklüğü (*Rhizoctonia solani* (Kühn), yumuşak kabuk çürüklüğü (*Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) (J. Schröt), kırmızı kök çürüklüğü (*Phytophthora fragaria* (C. J. Hickman), verticillium solgunluğu (*Verticillium alboatrum* (Kleb), *Pythium spp.* ve *Fusarium spp.* dur (Maas, 1998; De los Santos vd., 2003). Bu hastalıklar zarar ve yayılımları açısından geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Bu hastalıklarla başa çıkmanın en iyi yolu koruyucu önlemlerle onları kontrol altında tutmaya çalışmaktır.

Dünyada yaklaşık 110.000 türü tanımlanmasına rağmen mantarların tahmin edilen tür sayısının yaklaşık 1,5 milyon olduğu düşünülmektedir ve yüksek adaptasyon yeteneklerinden dolayı günlük yaşantımızda hemen her yerde üreyebilmektedirler (Hawksworth,2001). Bu kadar türün tanımlanamamasının sebepleri habitatlarının yeterli araştırılmaması, kültürlerinin zor olması veya yapılamaması ve kataloglanmış örneklerin tanılanmalarının doğru olmaması olarak belirtilebilir.

Küfler, Robert Whittaker'ın 1969 yılında yaptığı sınıflandırmaya göre bitkiler, hayvanlar, protistler ve Monera'dan sonra ayrı bir alem olarak kabul edilen mantarlar aleminde olan mikromantarlar (filamentli funguslar/hifli küfler) olarak bilinmektedir. Filamentli küfler yıllardan beri çoğunlukla morfolojik olarak sınıflandırılmaktadır. 2004 yılında başlatılan ve şu anda da devam eden AFTOL (Assembling the Fungal Tree of Life) adı verilen ortak bir çalışma ile fungusların tüm gruplarının en yüksek seviyede filogenetik sınıflandırılması hedeflenmiştir (Lutzoni vd.,2004). Bu çalışmada toplam 195 taksonu içeren bir fungus grubuyla çalışılmış ve sonuçta 7 filum [*Chytridiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Blastocladiomycota*, *Microsporidia*, *Glomeromycota* Dikarya: *Ascomycota*, *Basidiomycota*) 10 subfilum, 35 sınıf, 129 ordo şeklinde bir sınıflandırma elde edilmiştir (Hibbet vd., 2007). 01.8.2015 tarihinde IndexFungorum'da tanılanmış kayıtlı olan mantar sayısı 517.511' dir (Index Fungorum 2015).

Fungi alemi içinde yer alan organizmaların yaşam döngülerinde hem eşeyli hem de eşeysiz üreme safhaları yer alır. Fungusların sınıflandırılmasında kullanılan temel kriterler, yaşam döngülerinin eşeyli safhasında oluşturdukları bu üreme yapılarıdır (Moore-Landecker, 1996). Ancak eşeyli üreme yapıları özel koşullar altında

oluşturulduğu için bazı fungusların eşeyli safhası ya henüz belirlenememiş ya da bazı funguslarda bu safha tamamen ortadan kalkmış olabilir. Bundan dolayı günümüzde funguslar iki şekilde sınıflandırılmaktadır. Bunlardan, birincisi fungusların yaşam döngülerinin eşeyli safhalarında oluşturdukları fruktifikasyon yapıları, eşeyli sporları ve tallus yapıları kriter alınarak gerçekleştirilen teleomorfik sınıflandırmadır. İkincisi ise eşeyli üreme yapıları tespit edilemediği için, bazı funguslar tallus yapıları ve eşeysiz sporları göz önüne alınarak sınıflandırılırlar, bu sınıflandırma biçimi ise anamorfik sınıflandırma olarak adlandırılır (Sneh vd., 1991). Anamorfik sınıflandırmada kullanılan yöntemlerin ortak özelliği gözlemlere dayalı olması, fazla zaman alması ve hata yapma olasılığının fazla olmasıdır. Bazı fungusların sınıflandırılmasındaki bu belirsizlik çoğu zaman aynı taksona iki farklı isim verilmesine hatta farklı organizmalara da aynı ismin verilmesine neden olabilmektedir. Bu tür karışıklıkların önlenmesi için günümüzde güvenilirliğinden dolayı moleküler yöntemler sıklıkla kullanılmaya başlamıştır. Moleküler yöntemlerde ağırlıklı olarak kullanılan molekül DNA'dır. Evrimsel değişikliğin ilk olarak yansıdığı moleküller olan DNA ile yapılan araştırmalar daha güvenilir ve hızlı sonuçlara ulaşmamızı sağlayabilir (Taylor vd., 2000).

Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) keşfiyle organizmaların genlerinin klonlanması ve bunların birbirleriyle karşılaştırılması sistematik alanda büyük bir kolaylık yaratmıştır. Özgüllük ve duyarlılığından dolayı, PCR temelli yöntemler fungusların teşhisi için kullanışlı olmakta ve fungal suşların, türlerin ya da daha üst takson gruplarının belirlenmesi amacıyla kullanılabilir. PCR aracılığıyla elde edilen bilgiler sayesinde mevcut taksonlar için spesifik oligonükleotid primerlerin tasarlanması mümkün hale gelmiştir (Dieffenbach vd., 1993). Fungal türler arasındaki polimorfik DNA dizilerinden biri olan ITS bölgesi, günümüzde bir türün doğru olarak tespiti açısından iyi bir aday olarak görülmekte ve bu uygulama ile diğer tüm türlerden büyük ölçüde ayrılabilirler. Bununla birlikte, ITS dizilerindeki varyasyon ve bu varyasyonu doğrudan değerlendirebilen PCR temelli teknikler sayesinde fungusun izolasyonuna gerek duyulmaksızın konukçu bitkiler içindeki ve çevresindeki bir çok fitopatogenik fungal türün belirlenmesi mümkün hale gelmiştir (Maukhamedov vd., 1994).

Günümüzde genetik yöntemlerin populasyon varyasyonunun belirlenmesinde morfolojik veya diğer fenotipik yöntemlerden daha yararlı olduğu açıktır. PCR amplifikasyonu için seçilecek ideal bölgenin özellikleri (Bruns ve Gardes, 1993)

dikkate alındığında, ribozomal RNA'ların kodlandığı genler (rRNA) bu kriterlerin çoğunu içerir ve kapsamlı bir şekilde analiz edilebilirler. rDNA bölgelerinin çoğaltılması için primerlerin dizayn edilmesi, fungusların taksonomik çalışmalarını oldukça kolaylaştırmıştır (White vd., 1990). rRNA genlerinin kodlandığı DNA dizilerin funguslarda taksonomik ilişkilerin ve genetik varyasyonun belirlenmesi çalışmalarında geniş oranda kullanılmaktadır. Funguslarda çekirdek rDNA (rRNA gen kümesi) ardışık tekrarlanan rDNA birimleri olarak organize olmuştur (Salazar vd., 2000). rRNA gen kümesi hem çekirdek hem de mitokondrilerde bulunur ve oldukça korunmuş ve değişken bölgelerden meydana gelir (White vd.,1990). Fungal çekirdek rRNA genleri her genomda birkaç yüz kopyası olan, ardışık tekrarlanan yapılar olarak düzenlenmiştir. Bu tekrarlanan birim sayısının *Rhizoctonia solani* AG4 izolatlarında her bir haploid genomda 59 olduğu belirlenmiştir (Vilgays ve Gonzales, 1990). Her bir birimde üç rRNA geni bulunmaktadır. Bunlar; küçük rRNA geni (18S vb.), 5.8S rRNA geni ve büyük rRNA geni (28S vb.) dir. Gen kümesinin sonunda yer alan 5S rRNA geni ise fungal taksona bağlı olarak tekrarlayan birim içinde olabilir veya olmayabilir. 5.8S rRNA geni ise funguslarda mitokondriyal genomda bulunmaz. Korunmuş diziler büyük alt birim (LSU) ve küçük alt birim (SSU) genlerinde bulunur. LSU ve SSU genleri funguslarda birçok taksonomik çalışmada kullanılmaktadır. *Cantharellus*'un birçok türüyle ilgili taksonomik karışıklık vardır. Birçok izolat morfolojik karakterleri dikkate alınarak ne *Cantharellus* ne de *Craterellus* olarak sınıflandırılabilir. LSU genlerinin dizi analizine dayanan son filogenetik çalışmalar, şu anda *Cantharellus* cinsi içinde sınıflandırılan bazı türlerin moleküler kanıtlarla *Craterellus* olduğunu doğrulamıştır (Dahlman vd., 2000). *Tilletia*'ya ait izolatlarla yapılan LSU rDNA dizi analizlerinden elde edilen verilerin, filogenetik olarak morfolojik karakterlerden daha fazla bilgi verici (informatif) olabileceği gösterilmiştir (Castlebury ve Carris, 2005).

Funguslarda moleküler karakterizasyon çalışmalarında ITS bölgesi 3 temel nedenden dolayı kullanılmaktadır (White vd., 1990, Bruns vd., 1991, Lee ve Taylor, 1992). Bu nedenler;

1. ITS bölgesi nisbeten küçüktür (500-800 bp) ve evrensel tek bir primer çifti (rRNA alt birimleri içindeki korunmuş bölgelerin komplementeri) kullanılarak PCR ile kolaylıkla çoğaltılabilir,

2. rDNA birimlerinin çok sayıda tekrarlarının olması nedeniyle, seyreltik ya da oldukça degrade olmuş DNA örneklerinden bile ITS bölgesi kolaylıkla çoğaltılabilir,

3. ITS bölgesi farklı türler arasında yeterince değişken olabilir ve bundan dolayı nükleotit dizi verileri genetik uzaklığı tahmin etmek için kullanılabilir ve bu yüzden filogenetik ve sistematik analizler için kullanışlıdır.

Mikrosatellitler ise, populasyon yapısını yani populasyon ve bireyler arasındaki farklılıkların tespiti için kullanılan popüler belirteçlerdir (Bruford and Wayne, 1993). Mikrosatellitler veya basit dizi tekrarları (SSRs=simple sequence repeats) hem kodlama yapan hem de kodlama yapmayan bölgelerde bulunan, bireyden bireye farklılık gösteren, 2-6 bazdan oluşmuş, tekrar sayısı değişken tekrarlı DNA dizileridir (Tautz, 1989) ve yüksek derecede polimorfiktir. Türler göre yüksek seviyede polimorfizm gösteren mikrosatellitler, doğal populasyonların genetik yapısını incelemek için kullanışlıdır (Balloux ve Lugon-Moulin, 2002). Populasyonların genetik yapısının belirlenmesi ile populasyonların evrimsel geçmişini ve evrim geçirme potansiyelini tespit etmiş oluruz (Mcdonald, 1997). Bireylerin tanımlanması için yararlı olan çok değişken mikrosatellit belirteçleri tek bir teknik ile çok benzer genotipleri bile ayırt edebilmeyi sağlar (Taylor vd., 1999). Mikrosatellitler gibi kodominant belirteçler belli lokus için bireylerin genotiplerini saptayabilmeye olanak sağladığı için fungal populasyon genetik çalışmalarında önemlidir (Mcdonald, 1997).

Son yıllarda populasyon çeşitliliğinin belirlenmesinde yüksek seviyede polimorfik diziler olan mikrosatellit belirteçleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bu belirteçler gıda veya toprak kökenli fungus populasyonlarının genetik yapısının belirlenmesinde çok kullanışlıdır. Mikrosatellit belirteçlerinin kullanılması populasyonlardaki türlerin genetik çeşitliliğinin belirlenmesine ve evrimsel geçmişleri hakkında bilgi verici olmasına olanak sağlayacaktır. Mikrosatellitler tipik olarak doğal seleksiyona maruz kalmış lokuslar için genetik varyasyonun tespitinde kullanılır. Çünkü arka arkaya olan tekrarlar genellikle DNA'nın kodlama yapmayan bölgelerinde yer almaktadır (Frankham vd., 2004).

Besin kaynağı olarak ve sanayide kullandığımız çilekte hastalık yapan fungusların mevcut doğal populasyonlarının durumunda hangi ekolojik nedenlerin sebep

olduğu ve buna bağlı olarak hangi genetik etkenlere maruz kaldığını tespit etmek önemlidir. Fungus populasyonları zaman içinde kazandıkları genetik yapılarıyla değişen evre koşullarına uyum sağlayabilirler. Bu yüzden onlara karşı koruma çalışmalarında genetik yapılarını tespit etmek oldukça önemlidir.

Botrytis cinerea birçok karakteristik özelliğinden dolayı önemli fungal patojenlerden biridir. Bunlar; patojen olmasına rağmen aynı zamanda saprofitik olarak yaşayabilir, bazı ürünlerde çok yıkıcı olabilir, bütün dünyada bulunabilir ve hemen hemen bütün bitkileri enfekte edebilir, meyve olgunlaşmadan önce erken enfeksiyonlara sebep olabilir (Rosslenbroich ve Stuebler, 2000).

Ülkemizin ilek üretiminde nc sıraya yükselmesi çilekte hastalığa sebep olan fungusların belirlenmesi, *Botrytis cinerea* türünün populasyonunun genetik çeşitliliğinin tespit edilmesi, ekonomik açıdan zararlara sebep olan funguslara karşı koruma tedbirlerinin alınması için oldukça önemlidir. Ülkemizde ilekte hastalığa sebep funguslarla ilgili kapsamlı bir çalışma mevcut değil ve özellikle *Botrytis cinerea* türünün populasyonunun genetik yapısının karşılaştırılması bakımından bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada çilekte hastalık yapan fungusların morfolojik ve moleküler yöntemlerle tespiti yapılacaktır. *Botrytis cinerea* türü populasyonlarının genetik yapıları mikrosatellit belirteçleri kullanılarak ortaya konulacaktır. Çalışma sonucunda elde edilecek veriler çilekte hastalık yapan funguslarla mücadele için önemli veriler sağlayacaktır. Çalışmada mikrosatellit belirteçlerinin kullanılması populasyonlardaki türlerin genetik çeşitliliğinin belirlenmesine ve evrimsel geçmişleri hakkında bilgi verici olmasına olanak sağlayacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ / KURUMSAL TEMELLER

Mikolojideki PCR uygulamalarının ilklerinden biri de, White ve arkadaşlarının (1990) çalışmasıdır. Bu çalışma fungusların filogenetik ve taksonomik ilişkilerini ortaya koymak amacıyla rDNA'nın direk çoğaltılması ve nükleotid dizilerinin belirlenmesini içermektedir. Bu diziler hem değişken hem de korunmuş bölgeleri içerdiği için, farklı taksonomik seviyedeki organizmaların karşılaştırma ve ayrılmasına olanak sağlamıştır. Birçok araştırmacı dizilerin tekrarlayan birimler şeklinde olması ve türler arasında değişken, tür içinde benzer olma eğiliminde olmasından dolayı, türe özgü problemleri geliştirmek için dizileri ITS bölgesinden seçmektedir.

Spesifik fungal primerlerle gerçekleştirilen PCR amplifikasyon yöntemleri sadece teşhisde değil, simbiyont ve zorunlu parazitler konusundaki çalışmaları da büyük oranda kolaylaştırmıştır. Örneğin normal izolasyon yöntemleriyle izolasyonu mümkün olmayan mikorizal fungus DNA'sının spesifik amplifikasyonu bitki köklerinden yapılabilmektedir (Di Bonita vd., 1995).

Groppe ve arkadaşları (1995) endofitik bir fungus türü olan *Epichloe spp*'nin ekolojisi ve çeşitliliğini araştırmak için mikrosatellit belirteçlerini kullanmışlar ve bu belirteçlerin fungal populasyon çalışmalarında RAPD'den daha bilgi verici olduğunu vurgulamışlardır.

Urena-Padilla ve arkadaşları (2002) yılında çilek meyvesi ve taçlarında hastalığa sebep olan *Colletotrichum spp.* izolatlarının RAPD ve mikrosatellit belirteçleri kullanarak genetik çeşitliliğini tespit etmeye çalışmışlar. Çalışmanın sonucunda hastalıklı meyvelerden sadece *C. acutatum* elde ederlerken, taçlardan elde edilen hemen hemen bütün izolatlarından *C. gloeosporioides* elde etmişlerdir. Meyveden elde edilen *C. acutatum* izolatlarının düşük genetik çeşitliliğe sahip olduğunu ve taçtan elde edilen *Colletotrichum spp.* izolatlarının yüksek derecede polimorfik olduğunu belirtmişlerdir.

Kasiamdari ve arkadaşları (2002) yılında toprakta yetişen lahanalardan *R. solani*'nin CFM1 izolatını izole ederek, Nested-PCR yöntemiyle ITS gen

bölgesinden iki primer dizisi dizayn etmişler ve moleküler yöntemlerin mikroskobik yöntemlerden daha fazla avantaj sağlayacağını belirtmişlerdir.

Munoz ve arkadaşları (2002) yılında yapmış oldukları çalışmada Şili'deki *B. cinerea* izolatlarının genetik çeşitliliğini tespit etmeye çalışmışlardır. Şili 'de üzüm, domates, kivi ve yaban mersininden toplanan izolatları moleküler belirteçler kullanılarak analiz etmişlerdir. Şili'deki izolatların Fransa'da daha önceki çalışmalarda tespit edilen 2 grupta (*vacuma* ve *transposa*) simpatrik olduklarını belirterek, bazı izolatların sadece boty elementi içerdiğini tespit etmişlerdir. *Transposa*, *vacuma* ve boty izolatlarının sıklıklarının üzüm, domates ve yaban mersinine göre kivide anlamlı olarak farklı olduğunu belirtmişlerdir. PCR-RFLP analizleri sonucunda da üzüm ve domatesden elde edilen izolatların genetik olarak birbirinden farklı olduğunu belirtmişlerdir.

Nagarajan ve arkadaşları (2004) yılında yapmış oldukları çalışmada Güney Kore'de 22 *Fusarium oxysporum* izolatu elde ederek, RAPD ve rDNA IGS gen bölgesinin 2600 bp'lik bölgesini restriksiyon enzimleriyle keserek genetik yapısını değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, RAPD ve RFLP ile elde edilen bant parametrelerine göre UPGMA uzaklık ağacı elde ederek, izolatların genetik olarak birbirinden farklı olduğunu belirtmişlerdir.

Staats ve arkadaşları (2004) yılında *Botrytis* türlerinin sınıflandırmak için 3 nükleer protein-coding geninin (RPB2, G3PDH ve HSP60) DNA dizisini kullanmışlar ve geleneksel sınıflandırılmayla karşılaştırmışlar. *Botrytis* cinsi 22 tür ve bir hibrit (*B.allii*; *B. byssoidea* X *B. aclada*) içermektedir. Filogenetik analizler sonucu *Botrytis* türlerinin *Sclerotiniaceae* cinsinden ayrıldıktan sonra 2 soy hattına ayrıldığını ve soy hattı 1'in yalnızca 4, soy hattı 2'nin ise 18 tür içerdiğini tespit etmişlerdir.

Sharon ve arkadaşları (2006) yılında yaptıkları çalışmada telemorfik sınıflandırmaya ek olarak, moleküler biyoloji teknolojilerinin hızla gelişmesiyle genetik ve evrimsel süreçlere göre organizmaların sınıflandırılmasını desteklemek için modern araçlar kullanılmaya başlandığını belirterek, *Rhizoctonia spp.*'nin anastomoz gruplarının sınıflandırılması için rDNA-ITS gen bölgesi dizilerinin karşılaştırılması gerektiğini söylemişlerdir.

Manici ve Bonora (2007) yılında İtalya'da 6 yıl boyunca kontamine olmuş çilek bitkisinin köklerinden çift çekirdekli *Rhiztochnia* izolatları toplayarak, 51 *Rhiztochnia* izolatının ITS gen bölgesi dizisi ile daha önceki çalışmalarda tespit edilen 8 anastomoz grubuna ait (AG) ITS gen bölgesi dizilerini karşılaştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda filogenetik uzaklık ağacı (neighbour-joining) analiziyle İtalya'daki *Rhiztochina* izolatlarının AG-A ve AG-G anastomoz gruplarında olduğu belirtmişlerdir.

Çebi Kılıçoğlu ve Özkoç (2008) yılında yapmış oldukları çalışmada fasulye bitkisinden elde ettikleri *R. solani* AG 4 izolatlarını rDNA-ITS gen bölgesi dizilerini kullanarak MseI, HincII, AvaII ve MfeI restriksiyon enzimleri ile RFLP yöntemi kullanarak değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda filogenetik uzaklık ağacı (UPGMA) analizi ile AG 4 anastomoz grubunun HG I ve HG II olmak üzere iki alt gruba ayrılmış olduğunu ve Karadeniz Bölgesi sahil şeridinde fasulye bitkisinin daha yaygın olarak HGI alt grubu tarafından enfekte edildiğini belirtmişlerdir.

Gonzales ve arkadaşları (2009) yılında yaptıkları çalışmada *B. cinerea*'nın dünyada 220'den fazla kültür bitkisini kontamine ettiğini belirterek, filogenetik tür veya kriptik tür kompleksi olarak iki grupta sınıflandırmışlardır (grup I: *B. pseudocinerea*; grup II: *B. cinerea* sensu stricto). Ayrıca *B. cinera*'nın ekonomik olarak büyük kayıplara yol açan bir nekrotropik patojen olduğunu belirtmişlerdir.

Anees ve arkadaşları (2010) yılında yaptıkları çalışmada *R. solani*'nin birçok farklı anastomoz grubunun bulunduğunu ve yaygın spektrumunu ile birçok konukçuda hastalığa sebep olan saprofit olarak büyüme yeteneğine sahip patojen bir tür olduğunu belirtmişlerdir.

Fekete ve arkadaşları (2012) yılında Macaristan'da enfekte olan çilek ve ahdudu bitkisinden elde ettikleri *B. cinerea*'nın grup I ve grup II tür kompleksini incelemişlerdir. *B.cinerea*'nın grup I'inde boty ve filiper transpozonu bulunmamaktadır. Yapılan analizler sonucunda Macaristan'da grup I bütün örneklerinde boty transpozonu ve bir izolatta da filiper transpozonu tespit etmişlerdir. *B.cinerea*'nın 2 grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılaşmalara sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Haratian ve arkadaşları (2012) yılında yapmış oldukları çalışmada *R. solani* grup IV'ün kültür bitkilerinde kök çürüklüklerine neden olan önemli bir patojen olduğunu belirtmişler ve İran'ın beş ilinde 190 izolatla yedi mikrosatellit belirteci kullanarak coğrafik yapısını değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda *R. solani* grup IV popülasyonları arasında orta düzeyde bir gen akışı olduğunu belirtmişlerdir.

Leroch ve arkadaşları (2013) yılında Almanya'nın çilek yetiştirilen bölgelerinden topladıkları *B. cinerea* izolatlarının funguside karşı duyarlılığını tespit etmek için analizler yapmışlardır. Çalışmanın sonucunda, fungusid direnci genel olarak birçok izolatta gözlenmiş ve daha önceki yapılan çalışmalarda MDR1h olarak tespit edilmiş izolatın geniş bir yayılıma sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Mrr 1 (factor-encoding gene) genindeki 3 bç'lik mutasyonu MDR1h izolatı ile ilişkili olarak bulmuşlar ve MDR1h ve funguside dayanıklı izolatların çoğunun genetik olarak farklı olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada tespit edilen izolatların çoklu sekans analizleri sonucunda *B. cinerea* ile yakın akraba olduğunu ve Grup S olarak adlandırılan yeni bir soy hattı olduğunu tespit etmişlerdir.

Assadollahi (2013) yılında yapmış çalışmada Macaristan'ın kuzey doğusunda çilek ve ahududu bitkisinde hastalığa sebep olan *B. cinerea* popülasyonlarının genetik yapısını incelemiştir. İncelenen popülasyonlar benzer gen ve haplotip çeşitliliği göstermiştir. Ancak *Fst* (genetik uzaklık) ve gen akışının simpatrik popülasyonlar içinde devam eden bir farklılaşma gösterdiğini belirtmiştir.

Çalış ve Çekiç, (2013) yapmış oldukları çalışmada Erbaa Gökal (Tokat) yaylasında kültür çilekleri yanında doğal olarak gelişen yabancı çilek bitkileri toplanmış ve morfolojik özelliklerini incelemiştir. Morfolojik özellikleri farklı yabancı çilek genotiplerinin külleme hastalığına farklı reaksiyonlar gösterdiği bulunmuşlardır. Klasik mikroskop teknikleri ve moleküler yöntemlerle yapılan çalışmalarda yabancı çilek bitkilerinde gelişen külleme hastalığı etmeninin *Podosphaera aphanis* (Aphanis Braun & Takamatsu) olduğu belirlenmiştir. Patojenisite testleri yaparak dişi kısır 2 yabancı çilek genotipinin sırasıyla çok hassas ve orta hassas ve diğer 2 genotipin ise küllemeye çok dayanıklı olduğunu bulunmuşlardır.

Kumari ve arkadaşları (2014) Nepal ve Hindistan'ın değişik bölgelerinden enfekte olmuş bitkilerden 79 *B. cinerea* izolatı elde ederek izolatları morfolojik,

biyokimyasal ve genetik yapılarına göre değerlendirmişlerdir. Tüm izolatlar morfolojik özelliklere dayanarak *B.cinerea* olarak tespit edilmiş ve bu sonuçlar spesifik primerlerle doğrulanmıştır. Genetik yapıyı RAPD analizi dayanarak transpozonların varlığı ya da yokluğuna göre değerlendirmişlerdir. Transpozonların varlığını patojenite ile ilişkilendirmişlerdir. Biyokimyasal olarak ise izolatlarda litik enzimlerin aktivitesinde ve oxolik asit konsantrasyonlarında farklılıklar olduğunu belirtmişlerdir.

Yukarıda belirtildiği üzere ülkemizde çilekte hastalığa sebep olan fungusların moleküler olarak tanımlanması ve *B. cinerea* populasyonunun genetik yapılarını ortaya koymayı amaçlayan hiçbir çalışma mevcut değildir. Ülkemizde sadece fasulye bitkisinden elde edilen *R. solani* AG 4 anastomoz izolatlarının alt gruplarını tespit etmeye yönelik bir çalışma mevcuttur. (Çebi Kılıçoğlu ve özkoç 2008)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Çilek Örneği Toplanan Lokaliteler

Çalışmada çilek örnekleri (2014-2015) yılı Aralık, Şubat ve Nisan aylarında özellikle çilek üretiminin en fazla yapıldığı Umurlu, Köşk, Sultanhisar, Atça ve Yenipazar ilçelerinden toplanmıştır. Bu lokalitelerden fungusların tespiti için yaprak, gövde ve meyvelerden örnekler alınmıştır. Toprak kaynaklı fungal hastalıkları tespit etmek için ise hastalıklı bitkilerin kök ve gövdelerinden örnekler alınmıştır. Ayrıca lokalitelerden *Botrytis cinerea* (Kürşünü küf) tarafından enfekte olmuş meyve, yaprak ve gövdelerden türünün popülasyonlarını temsil edecek kadar örnek toplanmıştır (tespit edilen lokalitelerden en az 15'er örnek, Şekil 3.1). Toplanan çilek örnekleri Adnan Menderes Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na getirilerek +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Örneklerin alındığı lokaliteler Çizelge 3.1 ve Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. *Botrytis cinerea* tarafından enfekte olmuş örnekler.

Çizelge 3.1. Çilek örneği toplanan lokaliteler.

Lokalite No	Lokalite Adı
1.	Atça
2.	Köşk
3.	Sultanhisar
4.	Umurlu
5.	Yenipazar



Şekil 3.2. Çilek örneklerinin toplandığı lokaliteler

3.1.2. Kullanılan Besiyerler ve Çözeltiler

Rose-Bengal Kloramfenikol Agar (RBCA) (Oxoid, CM549)

Mikolojik Pepton	5,0 g/L
Glukoz	10,0 g/L
Potasyum dihidrojen fosfat	1,0 g/L
Magnezum sülfat	0,5 g/L
Dikloran	0,002 g/L
Rose-bengal	0,05 g/L
Agar	15,5 g/L
pH	5,6 ± 0,2

15,75 g hazır besiyeri 500 ml distile suda ısıtılarak çözülmüştür. Otoklavda 121°C’de 10 dakika sterilize edilen besiyeri steril petrilere dökülerek çilekten küf izolasyonu için kullanılmıştır.

Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck 1.10130)

Potato infusion	4,0 g/L
D(+) glucose	20,0 g/L
Agar-agar	15,0 g/L
pH	3,5 ± 0,2

39,0 g/L olacak şekilde distile su içerisinde ısıtılarak eritilir, 121°C’de otoklavda 15 dakika sterilize edilip, steril petrilere dağıtılır. In vitro yapılan standart

mikrobiyolojik analizlerde maya ve küfler için selektif katı besiyeri olarak kullanılır.

Malt Ekstrat Agar (MEA) (Oxoid CM59)

Malt ekstrat	30,0 g/L
Mikolojik pepton	5,0 g/L
Agar-agar	15,0 g/L
pH	5,4 ± 0,2

48 g/L olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak eritilir, otoklavda 115°C’de 10 dakika sterilize edilmiştir. Standart mikrobiyolojik analizlerde maya ve küflerin geliştirilmesi, izolasyonu ve sayımı için selektif katı besiyeri olarak kullanılır.

Yatık Malt Agar (MEA)

Küflerin stok kültür yapılarak +4 °C’de uzun süre saklanması için kullanılır. Normal MEA hazırlanıp 5 ml’lik kreyotüplere dağıtılmış ve otoklavda 121° C’de 10 dakika sterilize edilmiştir. Tüpler yatık pozisyonda konularak, agarın yatık şekilde donması sağlanmıştır.

Fizyolojik Tuzlu Su Çözeltisi (FTS)

NaCl	85 g
Distile su	1000 ml

Çileklerden küf izolasyonu sırasında seyreltme sıvısı olarak kullanılmıştır.

Laktofenol Mavisi Solüsyonu (Merck, M1137410100)

Pamuk Mavisi Stok Solüsyonu	
%85 Laktik Asit	99 ml
Anilin mavisi kristalleri	1,0 g

Lakto-Pamuk Mavisi	
%85 Laktik Asit	100 ml

Gliserol	250 ml
Pamuk Mavisi Solüsyonu	3 ml
Distile Su	50 ml

Küflerin morfolojik olarak tanımlanması için hazırlanan preparatlarda küf sporlarını boyamak için kullanılmıştır. (Sime vd., 2002)

STE (Sodyum-Tris_EDTA) Tamponu

0,1 M NaCl	5,844 g
0,05 M Tris (pH:7,5)	6,057 g
0,001 M EDTA	0,372 g

Bu üç madde tartılıp 1000 ml distile su içerisinde çözdürülmüştür. Son pH 7.5 olarak ayarlanmıştır. Örneklerin DNA izolasyonu sırasında hücrelerinin lizis işlemi için kullanılmıştır.

%10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)

10 g SDS tartılarak 100 ml distile suda çözdürülür. DNA izolasyonunda yağların parçalanması için kullanılmıştır.

Proteinaz K (20mg/ml)

20 mg Proteinaz K tartılarak 1 ml STE de çözdürülür. DNA izolasyonunda proteinlerin parçalanması için kullanılmıştır.

10X TBE (Tris-Borik asit_EDTA)

0,89 M Tris-Baz	108 g
0,88 M Borik asit	55 g
0,02 M EDTA.2H ₂ O	9,3 g

Maddeler tartılıp, distile su ile 1 L'ye tamamlanır. pH 8.13-8.30 arasında ayarlanır. Elektoroforezde kullanılan bir tampondur. İyonik güçlü ile jel üzerinde PCR ürünlerinin ilerlemesini kolaylaştırır.

% 1'lik Agaroz Jel Hazırlanması

1 g agaroz üzerine 100 ml 1XTBE tamponu ve 5 µl SafeView™ Classic (Applied Biological Materials, Inc.) eklenerek hazırlanır. Elektroforez aşamasında genomik DNA kalitesinin belirlenmesi ve PCR ürünlerinin kontrol edilmesi sırasında kullanılmıştır.

6X Loading Dye Hazırlanması

%0,015 Bromfenol Mavisi
%0,015 Xylene Cyanol FF
%30 Gliserol

Maddeler tartılarak, 100 ml distile su ile çözündürülür. Genomik DNA ve PCR ürünlerinin elektroforez aşamasında hazırlanan jelin kuyucuklarına çökmesi için kullanılmıştır.

TE (Tris-EDTA) Tamponu (pH:8)

0,01 M Tris-HCl	1,211 g
0,001 M EDTA	0,372 g

1 L içinde tartılan maddeler iyice çözüldükten sonra pH 8'e ayarlanır ve otoklavda sterilize edilerek buzdolabında saklanır. Total DNA izolasyonunun son aşamasında elde edilen DNA ların çözünmesinde kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

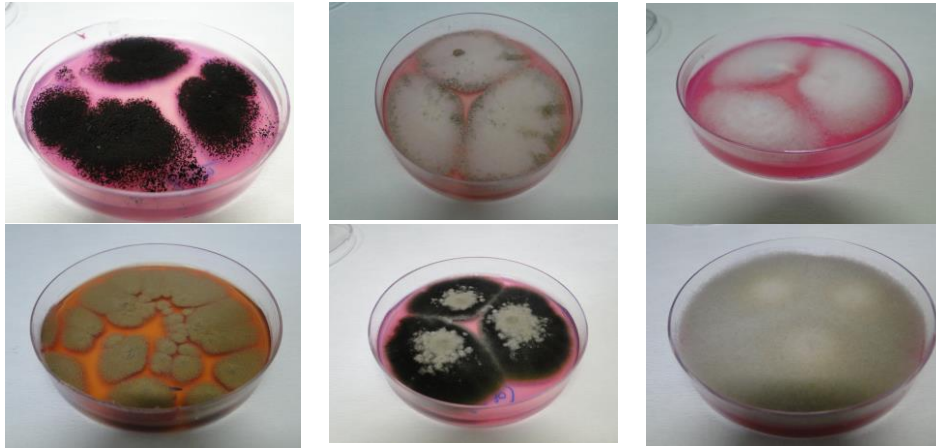
3.2.1. Çileklerden Toplam Küf İzolasyonu

Toplanan çilek örneklerini homojenize etmek için steril bistüri ile 25 gr olacak şekilde her bir çilek örneğinden ayrı ayrı parçalar kesilmiştir. Steril petrielerde tartımları gerçekleştirilmiştir. 225 ml steril FTS içinde blender ile parçalanmıştır. Bu seyreltmeden alınan 1 ml hacim önceden hazırlanmış 9 ml'lik steril FTS içeren tüplere aktararak 10^{-2} dilüsyon elde edilmiştir. Daha sonra uygun seri dilüsyonları hazırlanmıştır.

Çilek örneklerinden toplam küf izolasyonu için dökme plaka yöntemi ve yayma ekim yöntemi kullanılmıştır. Dökme plaka yönteminde hazırlanan dilüsyonlardan 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} olanlardan steril boş petrilere 1 ml inoküle edilerek üzerlerine 25 ml RBCA (Rose- Bengal Kloramfenikol Agar) dökülmüştür. Kültürler 20°C ' de 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır.

Yayma yönteminde ise; hazırlanan dilüsyonlardan 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} olanlardan 0,1 ml inoküle edilerek, Drigalski spatül ile besiyeri üzerine yayılmıştır. Kültürler 20°C ' de 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır.

Üreyen farklı küf kolonileri saflaştırılarak yine 20°C de 5-7 gün inkübe edilmiştir (Şekil 3.3). İnkübasyon sonunda üreyen saf koloniler kreyotüplerde hazırlanmış steril yatık MEA'ya inoküle edilerek 20°C 'de 5-7 gün inkübasyondan sonra üzerlerine steril mineral yağ eklenmiş ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.



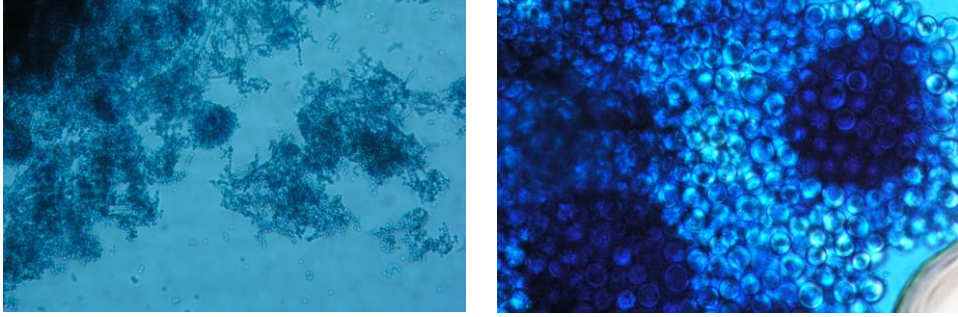
Şekil 3.3. Saflaştırılan küf kolonileri.

3.2.2. İzole Edilen Küflerin Morfolojik Tanılanması

Petrilerde üretilen saf küf kolonilerinden öze yardımıyla örnekler alınmış, üzerlerine bir damla LPM Çözeltisi damlatılmış, lam üzerine dağıtılarak lamel ile kapatılmıştır.

Küflerin tanılanması için binoküler altında kültürel özellikleri incelenmiş ve mikroskop da Laktofenol Pamuk Mavisi Çözeltisi kullanılarak hazırlanan

preparatlarla mikroskopik özellikleri saptanmıştır (Şekil 3.4). İzole edilen tüm küf kolonilerinin morfolojik tanısı Samson (2004)'den yararlanılarak yapılmıştır. Tanısı yapılan izolatlar çalışmanın moleküler kısmı için kaydedilmiş ve ayrılmıştır.



Şekil 3.4. Laktofenol Pamuk Mavisi ile hazırlanan fungus örnekleri.

3.2.3. Toplam Genomik DNA İzolasyonu

Toplam genomik DNA, çalışmada izole edilen morfolojik tanısı gerçekleştirilen tüm küf izolatlarında Hillis ve Moritz'in (1990) standart fenol-kloroform DNA izolasyon protokolünde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir.

1. Küf izolatlarından 0.05 g miselleri tartılarak etiket numaraları yazılmış steril eppendorf tüplerine konulmuş, kapakları açılarak parafilmle kaplanmıştır.
2. Örnekler -20°C 'de 4-5 saat bekletilmiş, daha sonra 1 gece liyofilizatöre bırakılmıştır.
3. Liyofilizatörden alınan örneklerin üzerine 600 μl STE tamponu eklenerek resuspanse edilmiştir. Üzerine 75 μl SDS ve 25 μl Proteinaz K eklenerek 2 saat 55°C 'de sıcak su banyosunda inkubasyona bırakılmıştır.
4. İnkubasyon sonrasında v/v (eşit hacimde) Fenol-Kloroform İzomil Alkol (25:24:1) eklenerek, tüpler 5 dakika alt üst edilmiştir.
5. Daha sonra 13.200 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Oluşan üst faz yine etiket numaraları yazılmış steril eppendorf tüplerine aktarılmıştır.

6. Üzerine 1 ml %96'lık soğuk etanol eklenerek tüpler alt üst edilmiştir.
7. Tüpler 20 dakika buzda bekletilerek, 13.200 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmış ve tüplerdeki alkol dikkatli bir şekilde dökülmüştür.
8. Örnekler 37°C'lik etüvde birkaç dakika bekletilerek etanolün tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Alkolün uzaklaşan örneklerle 100µl TE tamponu eklenerek, bir gece oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tamamen çözünen DNA örnekleri PCR çalışmaları için -20°C'de saklanmıştır.

3.2.3.1. Toplam Genomik DNA'nın Kalite ve Miktarının Belirlenmesi

İzole edilerek TE tamponu içerisinde çözdürülen DNA örnekleri Nanodrop Spektrofotometre (Thermo) yardımıyla 260 nm dalga boyunda ölçümlerine bağlı olarak çift zincirli DNA derişimi hesaplandı.

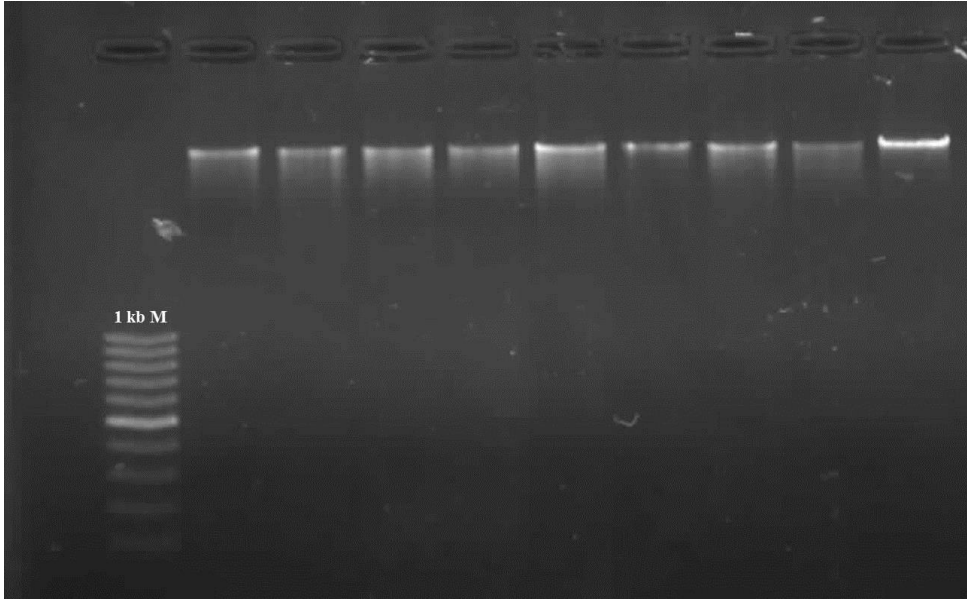
$$CDNA = OD_{260\text{ nm}} \times SK \times 50$$

OD - Optik Dansite (260 nm'de okunan absorbans değeri).

SK - Sulandırma katsayısı.

50 - 260 nm'de 1 optik dansitenin içerdiği DNA miktarı.

Derişimleri belirlenen DNA örnekleri daha sonra % 1'lik agaroz jelde yürütülerek UV görüntüleme sistemi (UVP- UVGL-58) yardımıyla kalitesi belirlendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Total DNA izolasyonu örnekleri.

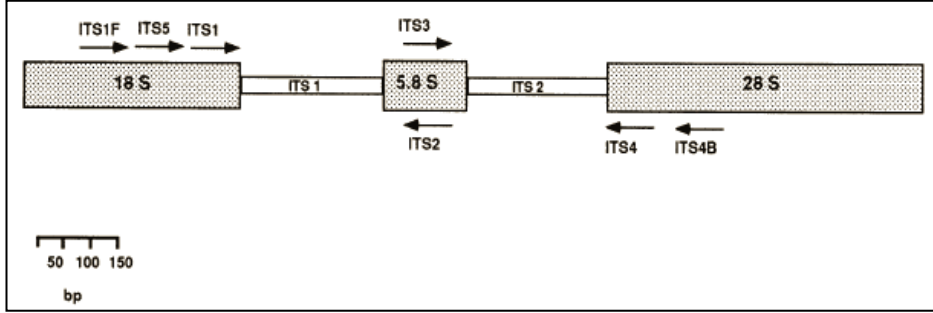
3.2.4. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

3.2.4.1. rDNA ITS Gen Bölgesi Reaksiyon Koşulları

Tespit edilen fungusların moleküler tanısı için yaklaşık 700 bp uzunluğundaki ITS gen bölgesi parçası çalışıldı. Bunun için;

ITS-1	5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG'3
ITS-4	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC'3

oligonükleotidleri kullanılarak PCR ile rDNA ITS gen bölgesi çoğaltıldı (Şekil 3.6)



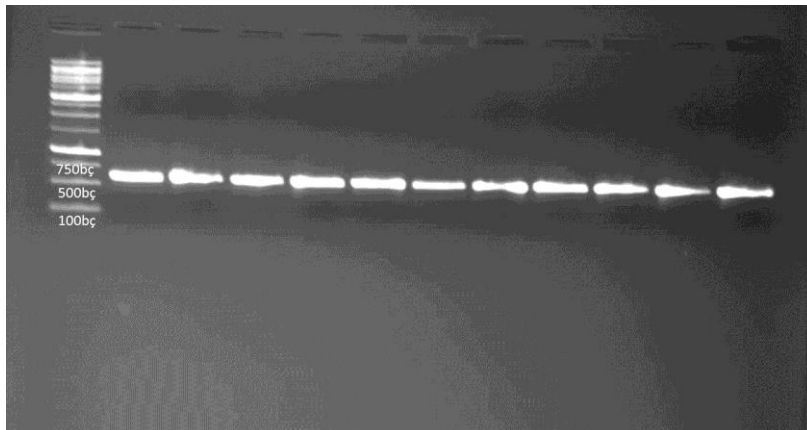
Şekil 3.6. rDNA gen bölgesi (Boysen vd., 1996)

ITS gen bölgesi, son hacimde 4 ng/µl kalıp DNA (100 ng/µl), 1x Taq tamponu [10x Taq Buffer; 100 mM Tris-HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, % 0.8 Nonidet P40; Fermentas, MBI], 1.5 mM MgCl₂ (25 mM; Fermentas, MBI), 0.1 mM dNTP karışımı (herbir dATP, dTTP, dCTP, dGTP 0.5 mM; Fermentas, MBI), 0.02 U/µl Taq polimeraz (5 U/µl; Fermentas, MBI), 0.2 pmol/µl ITS 1 ve ITS 4 oligonükleotidleri (her biri 25 pmol/µl) 25 µl reaksiyon hacminde steril distile su ile tamamlanarak PZR ile çoğaltıldı. Amplifikasyon için;

95 °C	5 dk
95 °C	1 dk
55 °C	1 dk
72 °C	1 dk
72 °C	1 dk

PCR (BIOER Life Express, TC/96/G/H) sıcaklık profili 35 döngü (95 °C 1 dk, 55 °C 1 dk, 72 °C 1 dk) boyunca uygulandı.

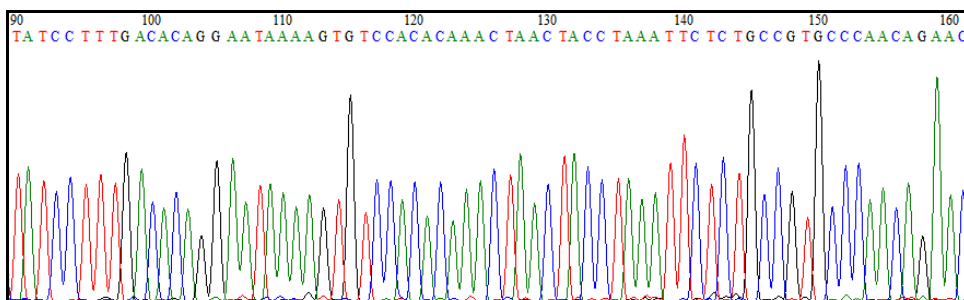
PCR ürünleri % 1'lik agaroz jele yüklenerek kontrol edildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. ITS gen bölgesi PCR ürünleri.

3.2.4.2. ITS Gen Bölgesi Dizi Analizi ve Veri Analizi

Agaroz jelle kontrol edilen PZR ürünlerine, temizleme işlemi ve enzimatik sentez yöntemi (Sanger ve Coulson, 1975) kullanılarak geliştirilmiş bir kapiller sistemle (Automatic Sequencer 3730xl) otomatik DNA dizi analizi yaptırıldı (Macrogen Inc., Netherlands). DNA dizi analiz sonuçları BioEdit ver 7.0.9 (Hall,1999) programı (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) kullanılarak görüntüledi (Şekil 3.8). DNA dizi verileri, Clustal W çoklu dizi hizalama programı (Clustal W multiple sequence alignment program) (<http://www.clustalw.genome.jp/>) ile hizalandı. Çalışmada tespit edilen ITS gen bölgesi dizileri daha önceki çalışmalarda tanımlanmış olan ITS gen bölgeleri (GenBank; <http://ncbi.nlm.nih.gov>) ile kıyaslanarak fungus türlerinin moleküler olarak tanınması sağlanmıştır (Şekil 3.9 ve 3.10).



Şekil 3.8. BioEdit 7.0.9 programı tarafından bir ITS gen bölgesi dizisinin görüntüsü

Çalışmada ITS gen bölgesi dizileri ile tespit edilen farklı funguslara ait farklı haplotiplerin istatistiksel “köksüz tutumluluk ağı” (Unrooted parsimony network) TCS v1.02 (Clement vd., 2000) adlı bilgisayar programı kullanılarak oluşturuldu. Ayrıca MEGA 3.1 programı kullanılarak filogenetik uzaklık UPGMA ağacı yapılmıştır.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Rhizopus sp. BAB-4277 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA g	1072	1072	100%	0.0	100%	KM401403.1
<input type="checkbox"/>	Rhizopus oryzae isolate VPCI 64/P/11 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and inte	1072	1072	100%	0.0	100%	KJ417550.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured fungus clone CMH004 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosom	1072	1072	100%	0.0	100%	KF800095.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured organism clone ciidir1005_H08 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA,	1072	1072	100%	0.0	100%	JN660593.1
<input type="checkbox"/>	Rhizopus oryzae strain UWFP 846 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S riboso	1072	1072	100%	0.0	100%	AY213685.1
<input type="checkbox"/>	Rhizopus oryzae strain KSU-312 host Phoenix dactylifera internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal	1070	1070	99%	0.0	100%	HM753609.1
<input type="checkbox"/>	Rhizopus oryzae strain 783018 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, intern	1070	1070	99%	0.0	100%	GU594768.1
<input type="checkbox"/>	Rhizopus oryzae strain PWQ2218 isolate ISHAM-ITS_ID MITS2195 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal	1066	1066	100%	0.0	99%	KP132575.1
<input type="checkbox"/>	Rhizopus oryzae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, ar	1066	1066	100%	0.0	99%	KM491890.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured basal lineage fungus clone 273 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8	1066	1066	100%	0.0	99%	HM240107.1
<input type="checkbox"/>	Rhizopus oryzae isolate VPCI 146/P/10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and in	1066	1066	100%	0.0	99%	KJ417559.1
<input type="checkbox"/>	Rhizopus oryzae isolate VPCI 66/P/11 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and inte	1066	1066	100%	0.0	99%	KJ417552.1

Şekil 3.9. ITS gen bölgesi blast sonucu.

Range 1: 76 to 655		GenBank	Graphics	▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1072 bits(580)	0.0	580/580(100%)	0/580(0%)	Plus/Plus	
Query	1	AAGCGCCTTACCTTAGGGTTTCCTCTGGGGTAAGTGATTGCTTCTACACTGTGAAAATT			60
Sbjct	76	AAGCGCCTTACCTTAGGGTTTCCTCTGGGGTAAGTGATTGCTTCTACACTGTGAAAATT			135
Query	61	GGCTGAGAGACTCAGACTGGTCATGGGTAGACCTATCTGGGGTTTGATCGATGCCACTCC			120
Sbjct	136	GGCTGAGAGACTCAGACTGGTCATGGGTAGACCTATCTGGGGTTTGATCGATGCCACTCC			195
Query	121	TGGTTTCAGGAGCACCCCTTCATAATAAACCTAGAAAATTCAGTATTATAAAGTTTAAATAA			180
Sbjct	196	TGGTTTCAGGAGCACCCCTTCATAATAAACCTAGAAAATTCAGTATTATAAAGTTTAAATAA			255
Query	181	AAACAACCTTTTAAACAATGGATCTCTTGGTCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGC			240
Sbjct	256	AAACAACCTTTTAAACAATGGATCTCTTGGTCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGC			315
Query	241	GATAACTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACCT			300
Sbjct	316	GATAACTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACCT			375
Query	301	CTATGGTTTTTCTATAGAGTACGCCTGCTTCAGTATCATCACAAACCCACACATAACATT			360
Sbjct	376	CTATGGTTTTTCTATAGAGTACGCCTGCTTCAGTATCATCACAAACCCACACATAACATT			435
Query	361	TGTTTATGTGGTGATGGGTCGCATCGCTGTTTTATTACAGTGAGCACCTAAAATGTGTGT			420
Sbjct	436	TGTTTATGTGGTGATGGGTCGCATCGCTGTTTTATTACAGTGAGCACCTAAAATGTGTGT			495
Query	421	GATTTTCTGCTGGCTTGCTAGGCAGGAATATTACGCTGGTCTCAGGATCtttttttttttG			480
Sbjct	496	GATTTTCTGCTGGCTTGCTAGGCAGGAATATTACGCTGGTCTCAGGATCTTTTTTTTGG			555
Query	481	GTTCCGCCAGGAAGTAAAGTACAAGAGTATAATCCAGTAACTTTCAAACCTATGATCTGAA			540
Sbjct	556	GTTCCGCCAGGAAGTAAAGTACAAGAGTATAATCCAGTAACTTTCAAACCTATGATCTGAA			615
Query	541	GTCAGGTGGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA 580			
Sbjct	616	GTCAGGTGGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA 655			

Şekil 3.10. ITS gen bölgesi karşılaştırma sonucu.

3.2.4.3. *B.cinerea* Mikrosatellit Reaksiyon Koşulları

Daha önceki çalışmalarda *B.cinerea* için tanımlanmış dokuz mikrosatellit lokusu çalışıldı (Çizelge 3.2). Mikrosatellit lokusları HEX, 5-FAM ve TET floresans boya ile 5' ucu etiketlenmiş oligonükleotidler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Amplifikasyonda kullanılan oligonükleotidlerin dizi ve floresans etiket bilgileri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. *B.cinerea* için mikrosatellit analizinde kullanılan oligonükleotid dizi, boya ve uzunlukları.

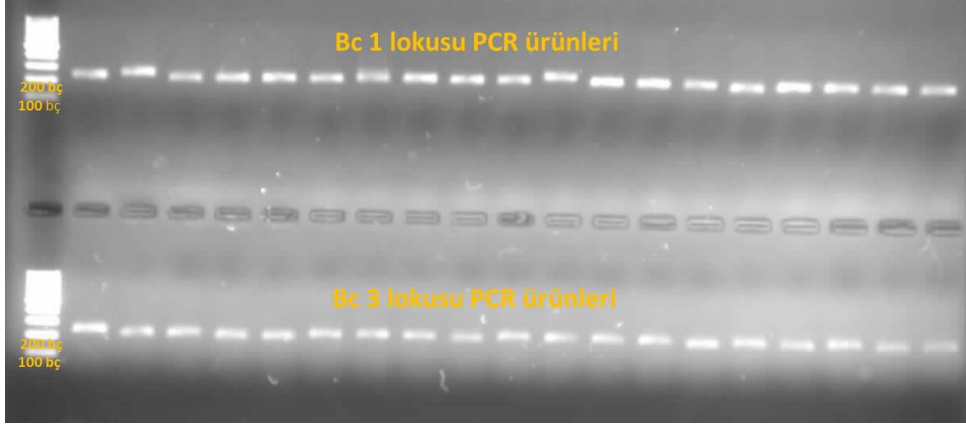
Lokus	Floresans Boya	Oligonükleotid Dizisi	Aralık (bp)
<i>Bc 1</i>	5-Fam	5'-AGGGAGGGTATGAGTGTGTA-3' 5'-TTGAGGAGGTGGAAGTTGTA-3'	220-281
<i>Bc 2</i>	Tet	5'-CATACACGTATTTCTTCCAA-3' 5'-TTTACGAGTGTTTTTGTTAG-3'	180-250
<i>Bc 3</i>	Hex	5'-GGATGAATCAGTTGTTTGTG-3' 5'-CACCTAGGTATTTCTGGTA-3'	200-230
<i>Bc 4</i>	5-Fam	5'-CATCTTCTGGGAACGCACAT-3' 5'-ATCCACCCCAAACGATTGT-3'	98-130
<i>Bc 5</i>	Tet	5'-CGTTTTCCAGCATTTCAGT-3' 5'-CATCTCATATTCGTTCCCTCA-3'	150-170
<i>Bc 6</i>	Hex	5'-ACTAGATTTCGAGATTCAGTT-3' 5'-AAGGTGGTATGAGCGGTTTA-3'	80-260
<i>Bc 7</i>	5-Fam	5'-CCAGTTTCGAGGAGGTCCAC-3' 5'-GCCTTAGCGGATGTGAGGTA-3'	115-140
<i>Bc 9</i>	Tet	5'-CTCGTCATAACCACGCAGAT-3' 5'-GCAAGGTCTCGATGTCGATC-3'	150-180
<i>Bc 10</i>	Hex	5'-TCCTCTTCCCTCCCATCAAC-3' 5'-GGATCTGCGTGGTTATGACG-3'	160-210

Her bir mikrosatellit lokusu, son hacimde 4 ng/μl kalıp DNA (100 ng/μl), 1x Taq tamponu [10x Taq Buffer; 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, % 0.01 jelatin; Sigma], 1.5 mM MgCl₂ (25 mM; Fermentas, MBI), 0.1 mM dNTP karışımı (herbir dATP, dTTP, dCTP, dGTP 0.5 mM; Fermentas, MBI), 0.5 U/μl Taq polimeraz (5 U/μl; Fermentas, MBI), oligonükleotid çiftinin herbirinden 0.24 pmol/μl (her biri 20 pmol/μl) 25 μl reaksiyon hacminde steril distile su ile tamamlanarak PCR ile çoğaltıldı. Çoğaltmak için;

94 °C	3 dk
94 °C	30 sn
50/53/59 °C	30 sn
72 °C	30 sn
72 °C	3 dk

94 °C 30 sn, 50/53/59 °C 30 sn (Bc1, Bc3, Bc6, Bc9=50; Bc2, Bc5=53; Bc4, Bc7, Bc10=59) ve 72 °C 30 sn PCR sıcaklık profili 35 döngü boyunca uygulandı.

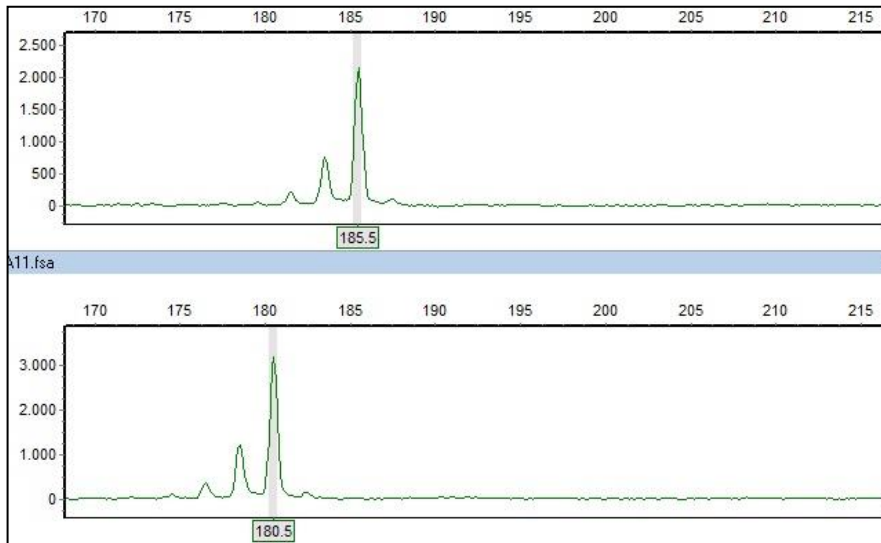
PZR ürünleri % 2'lik agaroz jele yüklenerek kontrol edildi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Bc 1 ve Bc 3 lokusları PCR ürünleri.

3.2.4.4. *B.cinerea* Mikrosatellit Veri Analizi

Mikrosatellit alel büyüklükleri ABI 3730 Automated DNA Analyzer (Applied Biosystems) ile belirlendi (Macrogen Inc., Güney Kore). Alel büyüklükleri Genemarker v1.8 (SoftGenetics LLC™) programı kullanılarak hesaplandı (Şekil 3.12)



Şekil 3.12. *Bc 10* lokus görüntüsü.

Populasyonlara göre lokusların alel sayısı (k), beklenen heterozigotluk (H_B ; gen çeşitliliği) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri hesaplandı. Populasyon çiftleri arasındaki genetik uzaklık (F_{st}) belirlendi ve populasyonların Hardy-Weinberg dengesinde (Hardy-Weinberg dengesi: bir populasyonda her bir alel sıklığının nesiller boyu sabit kalması gerektiğini gösteren dengedir) olup olmadığı ile lokuslar arasında bağlantı dengesizliğinin varlığı test edildi. Populasyon çiftleri arasındaki farklılığını belirlemek için p (olasılık) değerleri, Markov chain randomization (Guo ve Thompson, 1992) ile hesaplandı. Bütün bu istatistiksel analizler Genepop v 7.0 (Rousset, 2008) kullanılarak yapıldı.

B. cinerea populasyonları arasında genetik ilişkiyi ortaya koyabilmek için genetik uzaklık verilerine dayalı olan UPGMA uzaklık ağacı TFPGA (Tools for Population Genetic Analyses) (Version 1.3) (Miller, 1997) bilgisayar programı ile oluşturuldu.

Yakın tarihlerde populasyonlarda meydana gelmiş olası darboğazları tespit etmek için iki fazlı mutasyon modeli (TPM) kullanılarak, Wilcoxon testi uygulandı (Bottleneck ver. 1.2; Cornuet ve Luikart, 1996).

B. cinerea populasyonlarının yapısı Bayesian kümeleme metodunu ile populasyon sayısının en doğru tahmin edebilen STRUCTURE ver. 3.2 programı ile incelendi (Pritchard vd., 2000).

4. BULGULAR

4.1. Kf Florasının Belirlenmesi

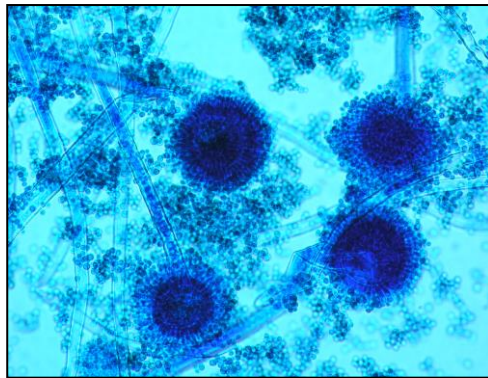
4.1.1. Morfolojik Tanımlama

Toplanan ilek örneklerinden saflaştırma sonunda 347 kf suşu elde edilmiştir. Saf kolonilerin Samson (2004)'a göre morfolojik tanısı yapılması ile 11 farklı cins (*Botrytis*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Syncephalastrum*, *Talaromyces*, *Lichtheimia*) tespit edilmiştir (izelge 4.1).

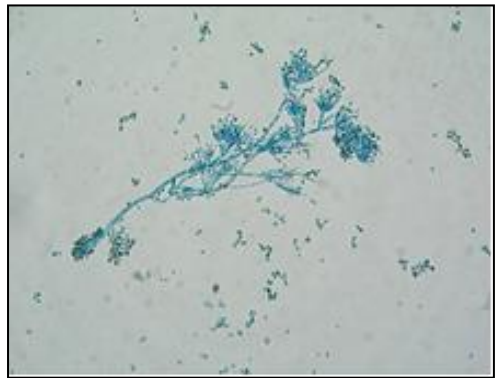
Çizelge 4.1. Morfolojik olarak tanımlanan fungus suşları.

No	Cins İsmi	Lokalte
1	<i>Rhizopus</i>	Yenipazar, Atça
2	<i>Lichtheimia</i>	Yenipazar
3	<i>Alternaria</i>	Yenipazar, Atça, Sultanhisar, Umurlu, Köşk
4	<i>Fusarium</i>	Yenipazar, Atça, Umurlu
5	<i>Penicillium</i>	Yenipazar
6	<i>Aspergillus</i>	Yenipazar, Atça, Sultanhisar
7	<i>Cladosporium</i>	Sultanhisar
8	<i>Trichoderma</i>	Yenipazar, Atça
9	<i>Talaromyces</i>	Atça
10	<i>Syncephalastrum</i>	Yenipazar, Atça
11	<i>Botrytis</i>	Yenipazar, Atça, Sultanhisar, Umurlu, Köşk

İzole edilen küflerin mikroskop altında 40X'lik ve 100X'lik büyütmede Laktofenol Pamuk mavisi solüsyonu kullanılarak spor ve hif yapıları belirlenmiştir. Morfolojik olarak tespit edilen 10 farklı fungus cinsine ait spor ve hif yapıları şekil 4.1 ve 4.2'de verilmiştir.



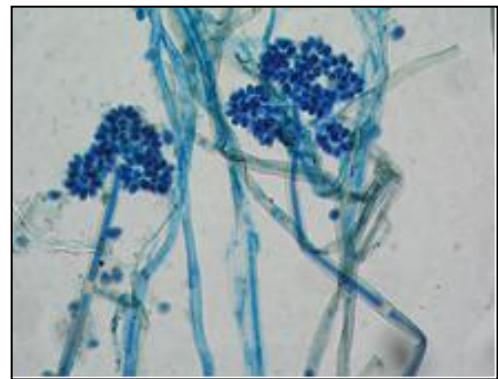
A



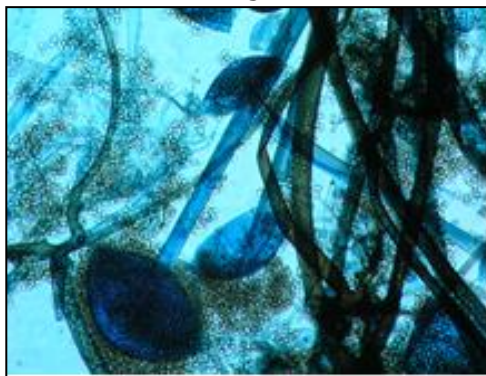
B



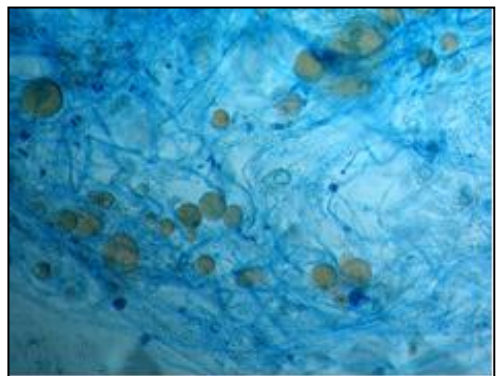
C



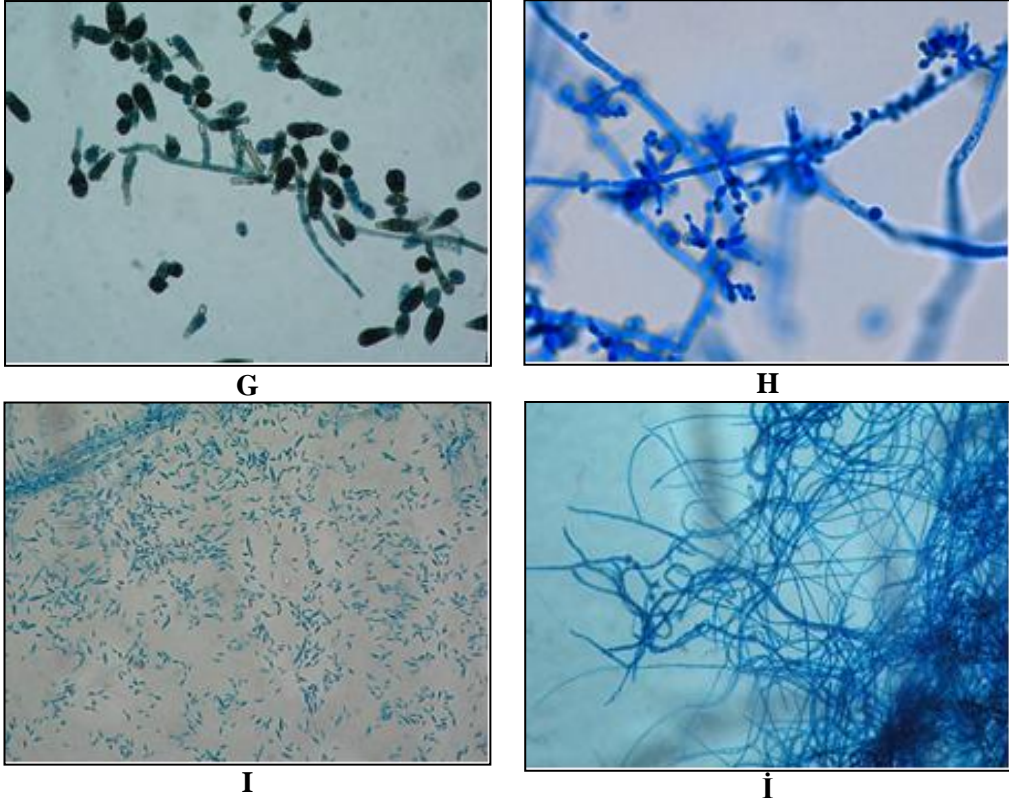
D



E

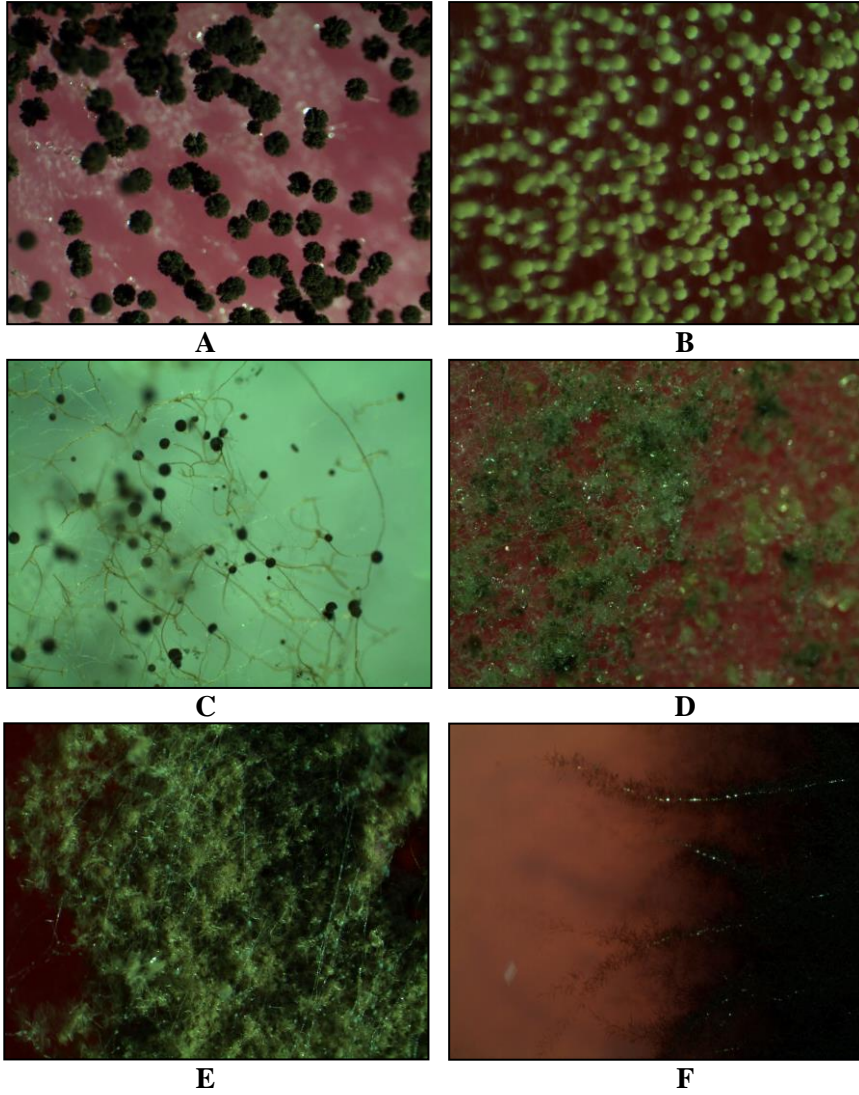


F



Şekil 4.1. Laktofenol Pamuk mavisi solüsyonu kullanılarak boyanan fungusların spor ve hif yapıları (A: *Aspergillus sp.*, B: *Penicilium sp.*, C: *Syncephalastrum sp.*, D: *Botrytis cinera.*, E: *Rhizopus sp.*, F: *Lichtheimia sp.*, G: *Alternaria sp.*, H: *Trichoderma sp.*, I: *Fusarium sp.*, İ: *Cladosporium sp.*).

İzole edilen funguslar binoküler mikroskop altında incelenerek koloni ve üreme yapıları tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Çilekten izole edilen bazı izolatların binoküler mikroskop altındaki görüntüleri (A: *Aspergillus niger*., B: *Aspergillus flavus*., C: *Rhizopus oryzae*., D: *Penicillium citrium*., E: *Aspergillus fumigatus*., F: *Alternaria alternata*.).

4.1.2. Moleküler Tanımlama

Çalışmada beş farklı lokaliteden hastalıklı çilek bitkisinden izole edilen ve morfolojik olarak tanımlanan 78 fungus örneğinin PCR yardımıyla rDNA ITS gen bölgesi dizileri çoğaltılmıştır. Daha önceki çalışmalarda tanımlanmış olan ITS gen bölgesi dizileri (GenBank; <http://ncbi.nlm.nih.gov>) ile kıyaslanarak küf izolatlarının moleküler olarak tanımlanması gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.2. Genebak verileri ile kıyaslanan küf izolatları.

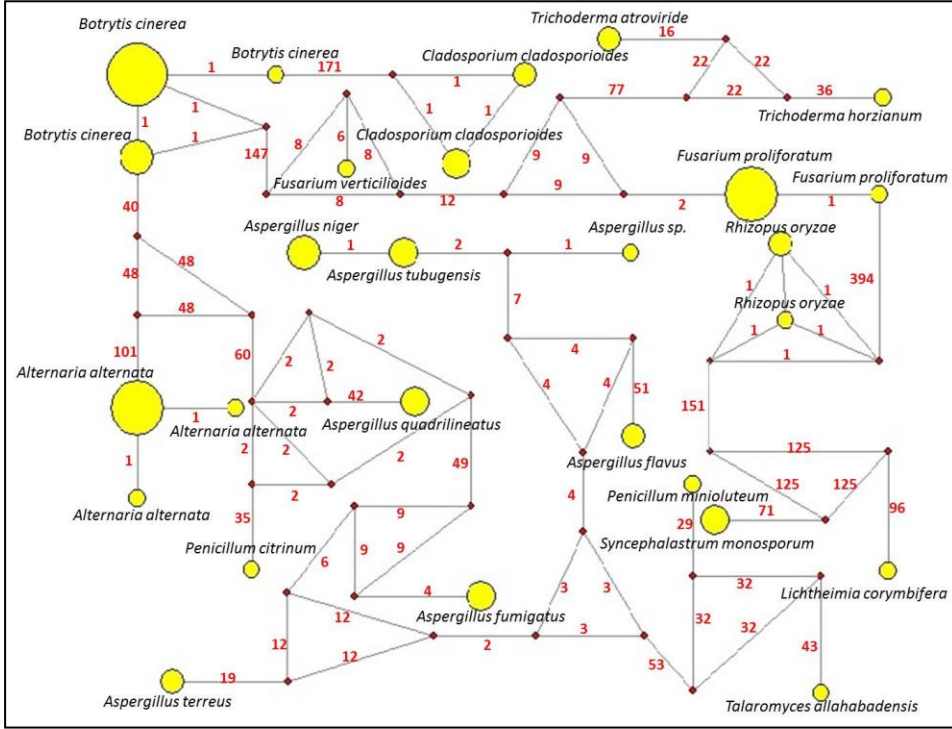
İzolat No	Tür İsmi	Genebank Eşleşmesi (%)	Lokalite
Z1	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	Yenipazar
Z2	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	100	Umurlu
Z3	<i>Aspergillus flavus</i>	100	Yenipazar
Z4	<i>Trichoderma horzianum</i>	100	Yenipazar
Z5	<i>Alternaria alternata</i>	100	Yenipazar
Z6	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	Yenipazar
Z7	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	Yenipazar
Z8	<i>Fusarium verticillioides</i>	100	Yenipazar
Z9	<i>Alternaria alternata</i>	100	Sultanhisar
Z10	<i>Syncephalastrum monosporum</i>	100	Yenipazar
Z11	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100	Sultanhisar
Z12	<i>Alternaria alternata</i>	100	Yenipazar
Z13	<i>Aspergillus niger</i>	100	Yenipazar
Z14	<i>Aspergillus niger</i>	100	Yenipazar
Z15	<i>Alternaria alternata</i>	100	Umurlu
Z16	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	Yenipazar
Z17	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	Yenipazar
Z18	<i>Aspergillus niger</i>	100	Köşk
Z19	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	Yenipazar
Z20	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	Yenipazar
Z21	<i>Aspergillus tubugensis</i>	100	Yenipazar
Z22	<i>Penicilium minioluteum</i>	100	Yenipazar
Z23	<i>Penicilium citrinum</i>	100	Yenipazar
Z24	<i>Alternaria alternata</i>	100	Yenipazar
Z25	<i>Aspergillus quadrilineatus</i>	100	Sultanhisar
Z26	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100	Sultanhisar
Z27	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100	Sultanhisar
Z28	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100	Sultanhisar
Z29	<i>Alternaria alternata</i>	100	Atça
Z30	<i>Alternaria alternata</i>	100	Köşk
Z31	<i>Trichoderma atroviride</i>	100	Atça
Z32	<i>Aspergillus niger</i>	100	Atça
Z33	<i>Alternaria alternata</i>	100	Atça
Z34	<i>Aspergillus tubugensis</i>	100	Atça
Z35	<i>Talaromyces allahabadensis</i>	100	Atça
Z36	<i>Alternaria alternata</i>	100	Atça
Z37	<i>Syncephalastrum monosporum</i>	100	Atça
Z38	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	Atça
Z39	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100	Sultanhisar
Z40	<i>Syncephalastrum monosporum</i>	100	Atça
Z41	<i>Aspergillus terreus</i>	100	Atça
Z42	<i>Aspergillus quadrilineatus</i>	100	Atça

Çizelge 4.2 devamı

Z43	<i>Trichoderma atroviride</i>	100	Atça
Z44	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	Atça
Z45	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	Atça
Z46	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	Atça
Z47	<i>Aspergillus quadrilineatus</i>	100	Atça
Z48	<i>Aspergillus terreus</i>	100	Yenipazar
Z49	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	Yenipazar
Z50	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	Yenipazar
Z51	<i>Botrytis cinerea</i>	100	Umurlu
Z52	<i>Botrytis cinerea</i>	100	Umurlu
Z53	<i>Botrytis cinerea</i>	100	Umurlu
Z54	<i>Botrytis cinerea</i>	100	Sultanhisar
Z55	<i>Botrytis cinerea</i>	100	Sultanhisar
Z56	<i>Botrytis cinerea</i>	100	Sultanhisar
Z57	<i>Botrytis cinerea</i>	100	Köşk
Z58	<i>Botrytis cinerea</i>	100	Köşk
Z59	<i>Botrytis cinerea</i>	100	Köşk
Z60	<i>Botrytis cinerea</i>	100	Yenipazar
Z61	<i>Botrytis cinerea</i>	100	Yenipazar
Z62	<i>Botrytis cinerea</i>	100	Yenipazar
Z63	<i>Botrytis cinerea</i>	100	Yenipazar
Z64	<i>Botrytis cinerea</i>	100	Atça
Z65	<i>Botrytis cinerea</i>	100	Atça
Z66	<i>Botrytis cinerea</i>	100	Atça
Z67	<i>Botrytis cinerea</i>	100	Atça
Z68	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	Umurlu
Z69	<i>Botrytis cinerea</i>	100	Umurlu
Z70	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	Umurlu
Z71	<i>Aspergillus flavus</i>	100	Atça
Z72	<i>Alternaria alternata</i>	100	Atça
Z73	<i>Alternaria alternata</i>	100	Atça
Z74	<i>Aspergillus sp.</i>	96	Atça
Z75	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	Sultanhisar
Z76	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	Yenipazar
Z77	<i>Alternaria alternata</i>	100	Sultanhisar
Z78	<i>Aspergillus tubugensis</i>	100	Yenipazar

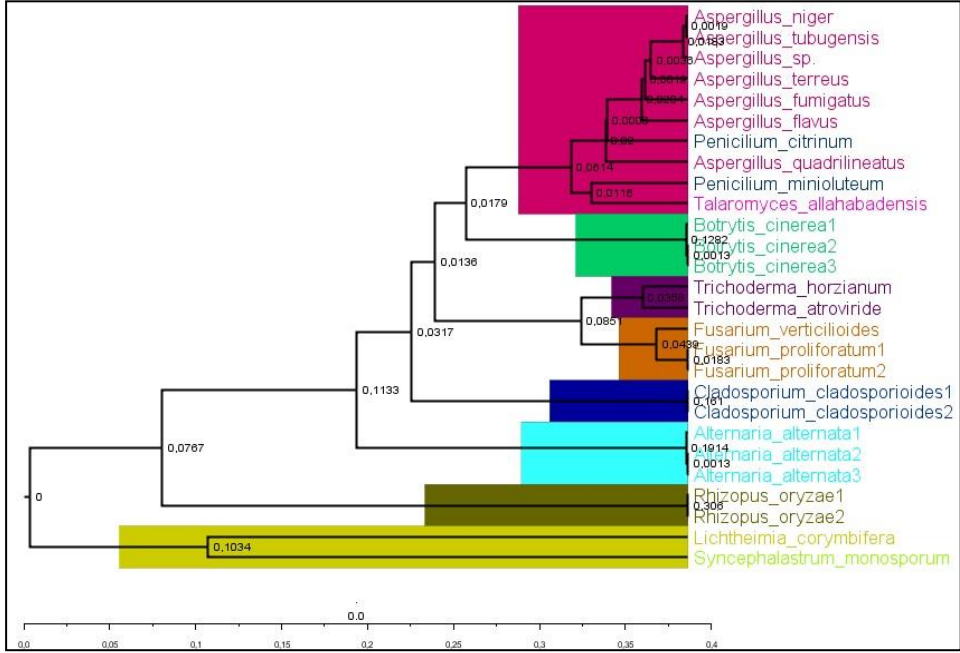
rDNA ITS gen bölgesine göre 11 cinse ait 20 farklı küf elde edilmiştir.

rDNA ITS gen bölgesiyle tespit edilen funguslarda 27 farklı haplotip gözlenmiştir. Bu haplotiplerin “köksüz tutumluluk ağı” oluşturuldu (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. NETWORK analizine dayalı ITS gen bölgesi haplotiplerinin tahmini kladogramı (her pay grafiği haplotip sıklığını temsil etmekte ve kırmızı ile yazılı sayılar haplotipler arasındaki baz farklılığını göstermekte).

ITS gen bölgesi ile tespit edilen türlerin farklı haplotiplerinin UPGM uzaklık ağacı *Jukes-Cantor* modeli kullanılarak oluşturuldu (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. ITS gen bölgesi haplotiplerinin UPGMA uzaklık ağacı.

4.2. *B.cinerea* Populasyonlarının Genetik Yapısı

Aydın ilinde 5 farklı lokaliteden elde edilen 96 *B. cinerea* izolatında 9 farklı mikrosatellit lokusu çalışıldı. Lokusların her biri polimorfik olup alel sayıları 6 (*Bc 4*) ile 18 (*Bc 1*) arasında değişmektedir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.3. Lokalitelere göre mikrosatellit alellerinin dağılımı (Ort: ortalama)

Lokalite	N	<i>Bc 1</i>	<i>Bc 2</i>	<i>Bc 3</i>	<i>Bc 4</i>	<i>Bc 5</i>	<i>Bc 6</i>	<i>Bc 7</i>	<i>Bc 9</i>	<i>Bc 10</i>
Atça	19	5	7	5	3	3	5	4	5	6
Köşk	19	8	9	6	2	5	6	5	2	4
Sultanhisar	19	5	7	3	4	9	7	9	7	8
Umurlu	20	14	7	5	3	3	5	5	2	3
Yenipazar	19	6	9	3	3	7	7	8	5	8
Toplam	96	18	16	10	6	10	11	11	9	13
Ort.		7.6	7.8	4.4	3	5.4	6	6.2	4.2	5.8

Dokuz lokus için toplamda ortalama alel sayısı 11.56 dır. Polimorfik lokuslar içinde ortalama en az alel *Bc 4* (3) ve en yüksek alel ise *Bc 2* (7.80) lokusunda saptandı.

Lokalitelerde gözlenen ortalama heterozigotluk değerleri en düşük Atça ve Köşk ($H_G=0.22$) ve en yüksek Umurlu ($H_G=0.35$) lokalitesinde saptanmıştır (Çizelge 4.12). En yüksek alel sayısı *Bc 1* lokusunda Umurlu (14 alel), *Bc 2* lokusunda Köşk ve Yenipazar (9 alel), *Bc 3* lokusunda Köşk (6 alel), *Bc 4* lokusunda Sultanhisar (4 alel), *Bc 5* lokusunda Sultanhisar (9 alel), *Bc 6* lokusunda Sultanhisar ve Yenipazar (7 alel), *Bc 7* lokusunda Sultanhisar (9 alel), *Bc 9* lokusunda Atça ve Yenipazar (5 alel), *Bc 10* lokunda Sultanhisar ve Yenipazar (8 alel) lokalitelerinde belirlendi (Çizelge 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12).

Mikrosatellit lokuslarının toplam alel sıklıkları belirlendi (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13

Çizelge 4.4. *B.cinerea* örneklerinin *Bc 1* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (*k*) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.

	Atça	Köşk	Sultanhisar	Umurlu	Yenipazar	
<i>Bc 1</i>	N	38	32	32	40	24
	k	5	8	5	14	6
	H_G	0.2105	0.4375	0.1250	0.3500	0.5000
	H_B	0.7354	0.8708	0.7146	0.9118	0.7652
Alel Büyüklüğü	213	0	0	0.031	0	0
	218	0	0	0	0.050	0
	221	0.079	0.094	0.031	0.050	0
	223	0	0	0	0.050	0.042
	225	0	0	0	0.050	0
	226	0	0	0	0.025	0
	227	0	0	0	0.100	0
	228	0	0	0	0.050	0
	229	0	0.094	0	0	0.083
	230	0	0	0	0.050	0
	231	0.158	0.188	0.188	0.250	0.125
	232	0	0.031	0	0.025	0
	233	0.474	0.281	0.438	0.175	0.333
	234	0.158	0.094	0	0	0
	235	0	0.156	0.313	0.025	0.375
	237	0	0.063	0	0.	0.042
259	0	0	0	0.050	0	
263	0.132	0	0	0.050	0	

Çizelge 4.5. *B.cinerea* örneklerinin *Bc 2* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (*k*) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.

	Atça	Köşk	Sultanhisar	Umurlu	Yenipazar	
<i>Bc 2</i>	N	38	38	38	40	38
	k	7	9	7	7	9
	H_G	0.3684	0.8421	0.5789	0.7500	0.7368
	H_B	0.7412	0.7836	0.7675	0.7395	0.7354
Alel Büyüklüğü	145	0	0	0.053	0	0
	149	0.053	0.053	0	0	0.053
	153	0	0	0	0.050	0
	154	0	0	0	0	0.026
	155	0.237	0.237	0.342	0.450	0.474
	156	0	0.026	0	0	0
	157	0	0.026	0	0.100	0.132
	158	0	0.053	0	0	0
	159	0	0.105	0.105	0.050	0.026
	160	0.026	0	0	0	0
	161	0.447	0.395	0.342	0.225	0.184
	162	0.053	0.053	0	0	0
	163	0.158	0	0.079	0.100	0.026
	165	0.026	0.053	0.053	0.025	0.053
	167	0	0	0	0	0.026
177	0	0	0.026	0	0	

Çizelge 4.6. *B.cinerea* örneklerinin *Bc 3* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (*k*) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.

	Atça	Köşk	Sultanhisar	Umurlu	Yenipazar	
Bc 3	N	38	20	8	18	8
	k	5	6	3	5	3
	H_G	0.3158	0.1000	0.0000	0.2222	0.0000
	H_B	0.7632	0.8222	0.8333	0.8403	0.8333
	208	0	0	0	0.167	0
	210	0.237	0.250	0.250	0.333	0.500
	212	0.105	0.100	0.500	0.278	0.250
	213	0	0.100	0.000	0.000	0.000
	214	0	0.400	0.250	0.111	0.250
	216	0	0	0	0.111	0
	218	0.289	0.050	0	0	0
	220	0.342	0	0	0	0
	222	0	0.100	0	0	0
	230	0.026	0	0	0	0

Çizelge 4.7. *B.cinerea* örneklerinin *Bc 4* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (*k*) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.

	Atça	Köşk	Sultanhisar	Umurlu	Yenipazar	
Bc 4	N	38	38	38	40	38
	k	3	2	4	3	3
	H_G	0.4211	0.1053	0.2105	0.4000	0.2105
	H_B	0.5614	0.2778	0.6243	0.4737	0.5789
Alel Büyüklüğü	115	0.526	0.842	0.526	0.200	0.316
	117	0	0	0	0.100	0
	121	0	0	0.079	0	0
	125	0.421	0.158	0.342	0.700	0.579
	127	0.053	0	0	0	0
	129	0	0	0.053	0	0.105
	115	0.526	0.842	0.526	0.200	0.316

Çizelge 4.8. *B.cinerea* örneklerinin *Bc 5* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (*k*) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.

	Atça	Köşk	Sultanhisar	Umurlu	Yenipazar	
<i>Bc 5</i>	N	38	38	38	40	38
	k	3	5	9	3	7
	H_G	0.2632	0.0000	0.6316	0.9000	0.4211
	H_B	0.6345	0.5263	0.7924	0.5724	0.8333
	Alele Büyüklüğü	146	0	0	0.053	0
	148	0	0	0.053	0	0.184
	150	0.158	0.053	0.211	0.075	0.263
	154	0.342	0.158	0.368	0.475	0.211
	156	0	0.053	0	0	0.079
	158	0	0	0.026	0	0
	160	0	0	0.026	0	0
	162	0.500	0.684	0.211	0.450	0.026
	164	0	0.053	0.026	0	0.026
	168	0	0	0.026	0	0

Çizelge 4.9. *B.cinerea* örneklerinin *Bc 6* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (*k*) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.

	Atça	Köşk	Sultanhisar	Umurlu	Yenipazar	
<i>Bc 6</i>	N	38	38	38	40	34
	k	5	6	7	5	7
	H_G	0.3158	0.4211	0.6316	0.4000	0.4706
	H_B	0.5482	0.7778	0.8246	0.7079	0.8401
	Alele Büyüklüğü	110	0	0.079	0	0
	112	0	0	0	0.025	0
	114	0	0	0	0	0.088
	116	0.026	0.211	0.105	0	0.059
	118	0.658	0.395	0.289	0.475	0.235
	122	0.105	0.184	0.263	0.225	0.088
	124	0.158	0.105	0.079	0.100	0.176
	126	0	0.026	0.079	0.175	0.294
	128	0.053	0	0.026	0	0
	130	0	0	0.158	0	0
	134	0	0	0	0	0.059

Çizelge 4.10. *B.cinerea* örneklerinin *Bc 7* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (*k*) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.

		Atça	Köşk	Sultanhisar	Umurlu	Yenipazar
<i>Bc 7</i>	N	38	38	38	40	38
	k	4	5	9	5	8
	H_G	0.0526	0.1053	0.3684	0.0500	0.1053
	H_B	0.3743	0.5570	0.8363	0.5974	0.8377
Alel Büyüklüğü	109	0	0	0	0	0.053
	111	0.053	0.079	0.053	0.075	0.079
	113	0	0	0	0	0.105
	115	0.789	0.658	0.316	0.625	0.316
	117	0.132	0.053	0.263	0.050	0.263
	119	0	0.053	0.105	0.150	0.026
	120	0	0.158	0.053	0	0.105
	125	0.026	0	0.079	0	0.053
	126	0	0	0.053	0.100	0
	127	0	0	0.053	0	0
	128	0	0	0.026	0	0

Çizelge 4.11. *B.cinerea* örneklerinin *Bc 9* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (*k*) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.

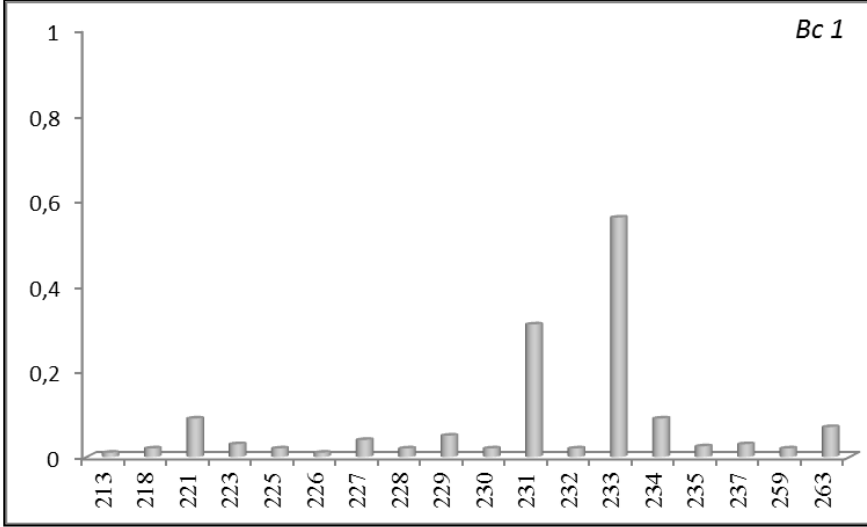
		Atça	Köşk	Sultanhisar	Umurlu	Yenipazar
<i>Bc 9</i>	N	38	38	38	40	38
	k	5	2	7	2	5
	H_G	0.0000	0.0000	0.0526	0.0000	0.0526
	H_B	0.0000	0.0000	0.0526	0.0500	0.0526
Alel Büyüklüğü	139	0	0	0.053	0	0
	140	0	0	0.053	0	0.053
	141	0.053	0	0.053	0	0.105
	142	0.053	0	0	0	0
	143	0	0	0.026	0	0.026
	145	0.053	0	0.105	0	0.105
	147	0.789	0.947	0.658	0.950	0.711
	149	0	0	0.053	0	0
	155	0.053	0.053	0	0.050	0

Çizelge 4.12. *B.cinerea* örneklerinin *Bc 10* lokusu DNA analizi sonucunda elde edilen gen sayısı (N), alel sayısı (*k*) ve alel sıklıkları, gen çeşitliliği (H_B) ve gözlenen (H_G) heterozigotluk değerleri.

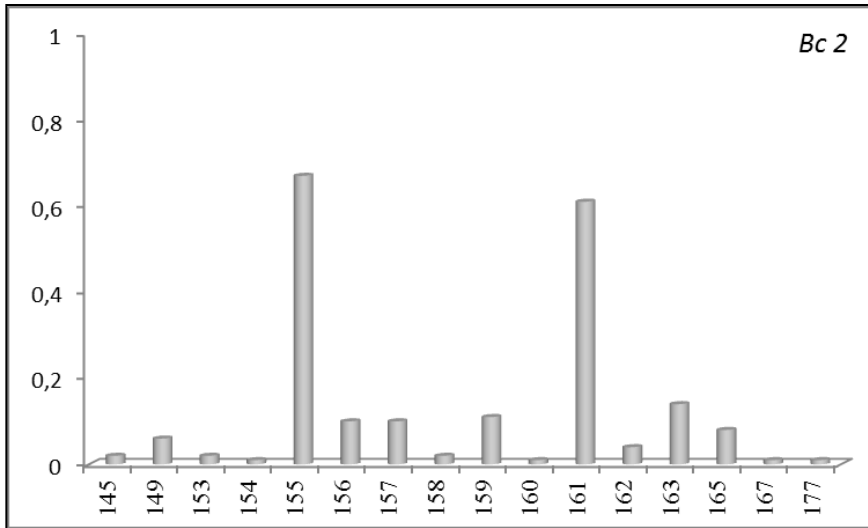
	Atça	Köşk	Sultanhisar	Umurlu	Yenipazar	
<i>Bc 10</i>	N	38	38	38	40	38
	k	6	4	8	3	8
	H_G	0.0000	0.0000	0.0526	0.0500	0.0526
	H_B	0.7427	0.5088	0.8713	0.3763	0.8801
Alel Büyüklüğü	161	0	0	0	0	0.053
	164	0	0	0.105	0	0
	171	0	0	0	0	0.105
	172	0.053	0	0.026	0	0
	173	0.105	0	0.000	0	0.105
	174	0	0	0.053	0	0.000
	175	0.053	0.053	0	0	0.105
	176	0	0	0.105	0	0
	177	0	0	0.053	0	0.158
	178	0.053	0.053	0.237	0.025	0.132
	180	0.421	0.211	0.211	0.200	0
	181	0	0	0	0	0.053
185	0.316	0.684	0.211	0.775	0.289	

Çizelge 4.13. *B.cinerea* örneklerinin incelenen lokusların toplamında istatistiksel olarak tamamlayıcı değerleri (k: Alel sayısı, H_G: Gözlenen heterozigotluk, H_B: Beklenen heterozigotluk, Ort.: Ortalama, SS: Standart sapma, SH: Standart hata)

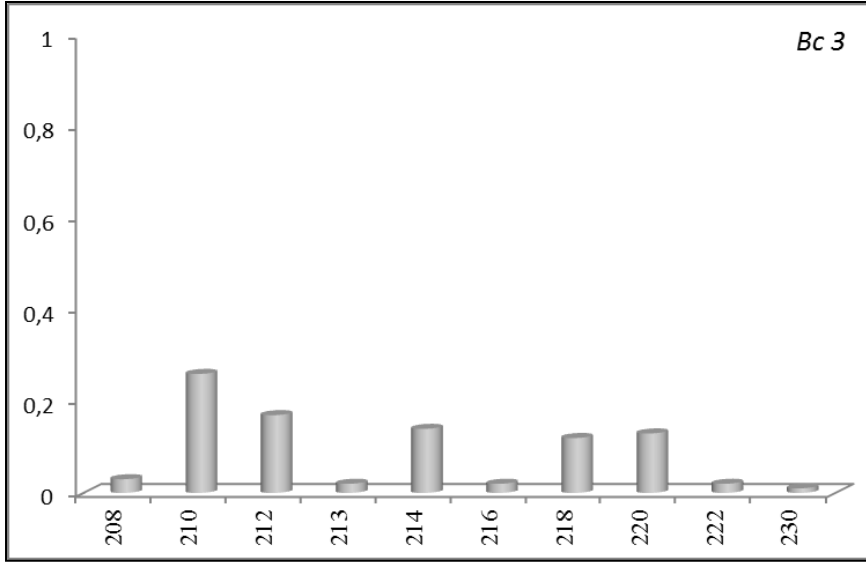
	Ort.	SS.	SH.	Ort.	SS.	SH.	Ort.	SS.	SH.
	k	k	k	H_G	H_G	H_G	H_B	H_B	H_B
Atça	4.78	1.30	0.43	0.22	0.16	0.05	0.57	0.25	0.08
Köşk	5.22	2.39	0.80	0.22	0.29	0.10	0.57	0.29	0.10
Sultanhisar	6.56	2.13	0.71	0.29	0.26	0.09	0.70	0.25	0.08
Umurlu	5.22	3.63	1.21	0.35	0.31	0.10	0.59	0.26	0.09
Yenipazar	6.22	2.17	0.72	0.28	0.26	0.09	0.71	0.26	0.09



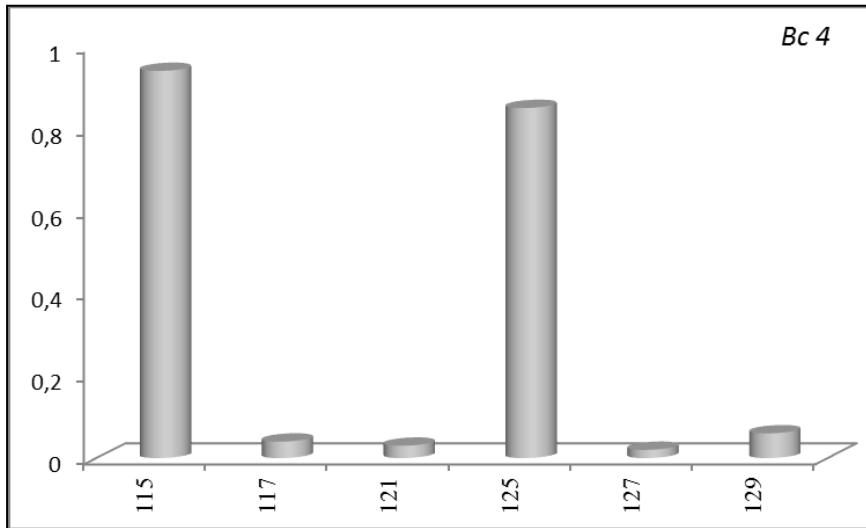
Şekil 4.5. *Bc1* lokusu alel ve alel sıklıkları.



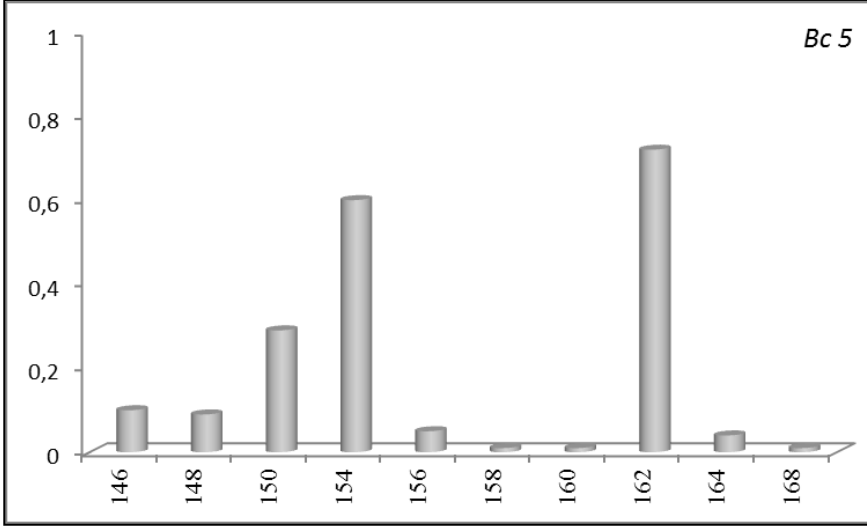
Şekil 4.6. *Bc2* lokusu alel ve alel sıklıkları.



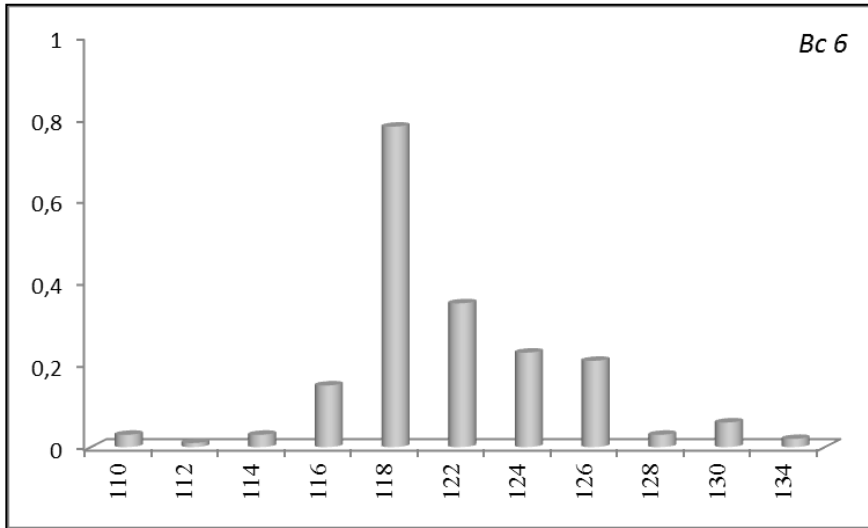
Şekil 4.7. *Bc3* lokusu alel ve alel sıklıkları.



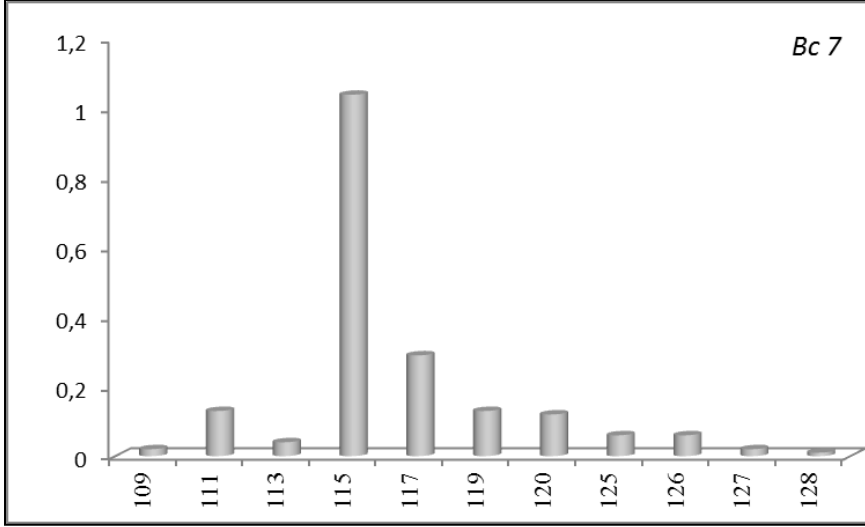
Şekil 4.8. *Bc4* lokusu alel ve alel sıklıkları.



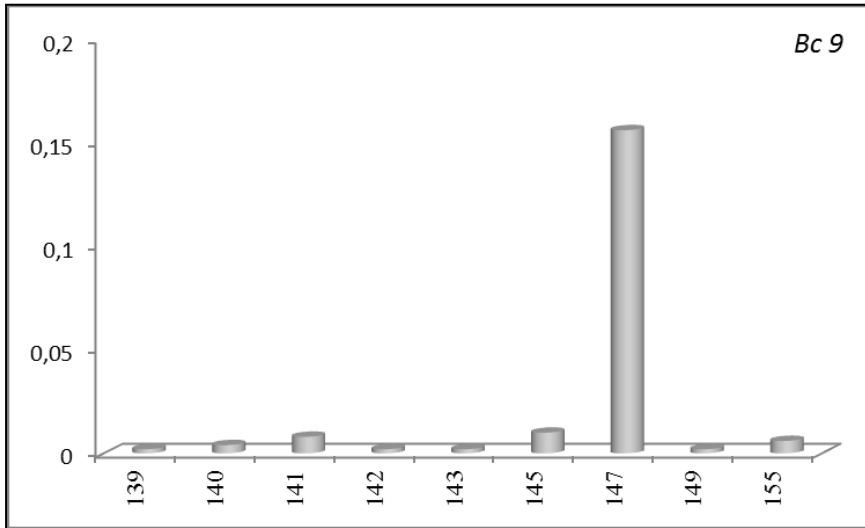
Şekil 4.9. *Bc5* lokusu alel ve alel sıklıkları.



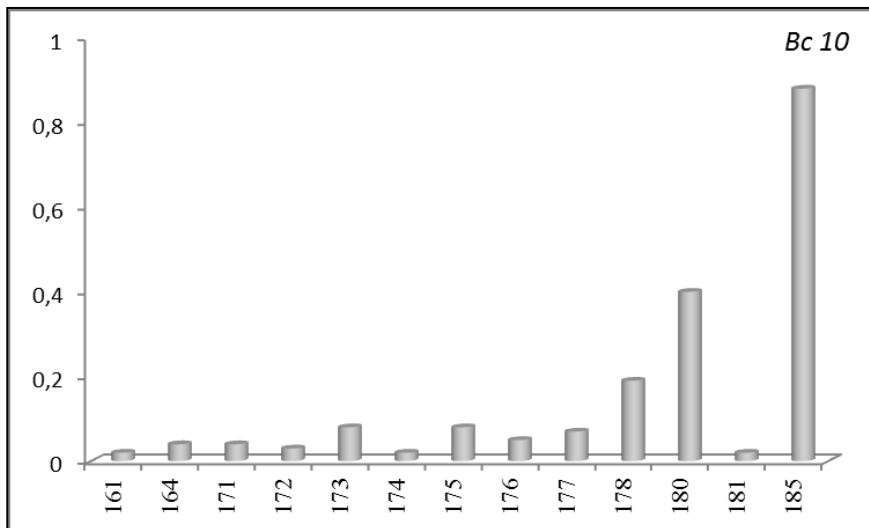
Şekil 4.10. *Bc6* lokusu alel ve alel sıklıkları.



Şekil 4.11. *Bc7* lokusu alel ve alel sıklıkları.



Şekil 4.12. *Bc9* lokusu alel ve alel sıklıkları.



Şekil 4.13. *Bc10* lokusu alel ve alel sıklıkları.

Alel sıklıklarına dayalı X^2 testi kullanılarak tüm populasyonların her bir lokus için Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadıkları test edildi (Çizelge 4.13). Bütün lokuslar için populasyonların toplamında Hardy-Weinberg dengesinden sapma gözlemlendi (X^2 , **ydö**). Köşk'te *Bc 2*, Umurlu'da *Bc 4*, ve Yenipazar'da *Bc 1* ve *Bc 2* lokusları hariç bütün populasyonlardaki lokusların tamamında Hardy-Weinberg dengesinden sapma gözlemlendi.

Çizelge 4.14. *B.cinerea* populasyonlarının Hardy-Weinberg dengesine dayalı alel sıklığı anlamlılığı (p , olasılık; ydö: yüksek derecede önemli)

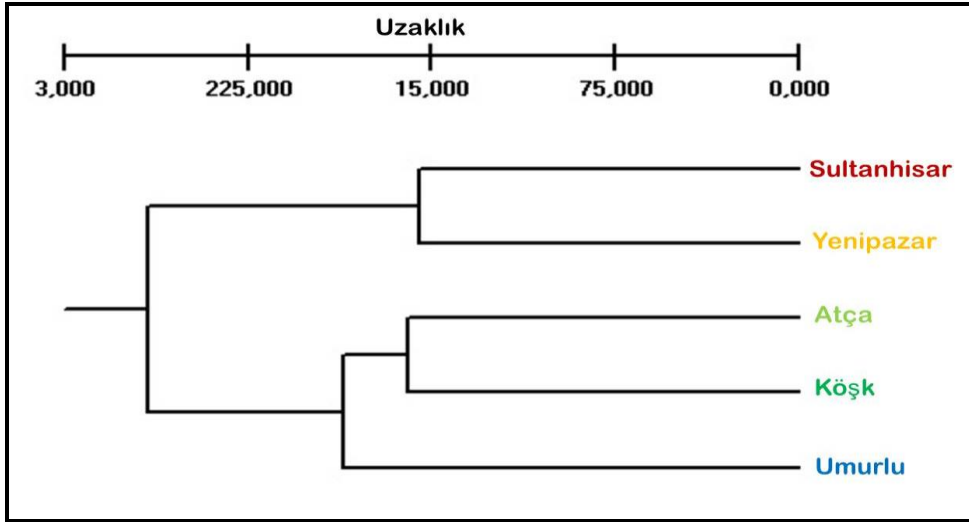
Lokus	Atça	Köşk	Sultanhisar	Umurlu	Yenipazar	Toplam
<i>Bc 1</i>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1018	ydö
<i>Bc 2</i>	0.0010	0.3185	0.0014	0.0001	0.2476	0.0000
<i>Bc 3</i>	0.0000	0.0000	0.0296	0.0000	0.0304	ydö
<i>Bc 4</i>	0.0432	0.0339	0.0001	0.2889	0.0001	0.0000
<i>Bc 5</i>	0.0006	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	ydö
<i>Bc 6</i>	0.0037	0.0011	0.0275	0.0002	0.0032	0.0000
<i>Bc 7</i>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	ydö
<i>Bc 9</i>	0.0000	0.0263	0.0000	0.0265	0.0000	ydö
<i>Bc 10</i>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	ydö
Toplam	ydö	ydö	Ydö	ydö	ydö	ydö

Tüm populasyonların istatistiksel olarak anlamlı bir genetik yapılanma gösterdiği saptanmıştır ($F_{st}=0.0711$, *ydö*). Populasyonların ikiye bölünmüşlüğüne karşılık, her iki bölüme de istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlendi (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. *B.cinerea* populasyonlarının nDNA bakımından genetik yapı olarak ikiye bölünmüşlüğüne karşılık (Altındaki bölüm F_{st} : populasyonlar arasındaki genetik uzaklık değerleri, üstteki bölüm populasyonların ikiye bölünmüşlüğüne karşılık, X^2 anlamlılık dereceleri, *ydö*: yüksek derecede anlamlı).

	Atça	Köşk	Sultanhisar	Umurlu	Yenipazar
Atça	-	Ydö	Ydö	ydö	ydö
Köşk	0.05448	-	Ydö	ydö	ydö
Sultanhisar	0.0478	0.06547	-	ydö	ydö
Umurlu	0.06673	0.08428	0.07456	-	ydö
Yenipazar	0.09607	0.1196	0.005456	0.07759	-

Populasyonlarda tespit edilen alellere göre Nei (1972) modeli kullanılarak UPGMA uzaklık ağacı oluşturuldu (Şekil 4.14).

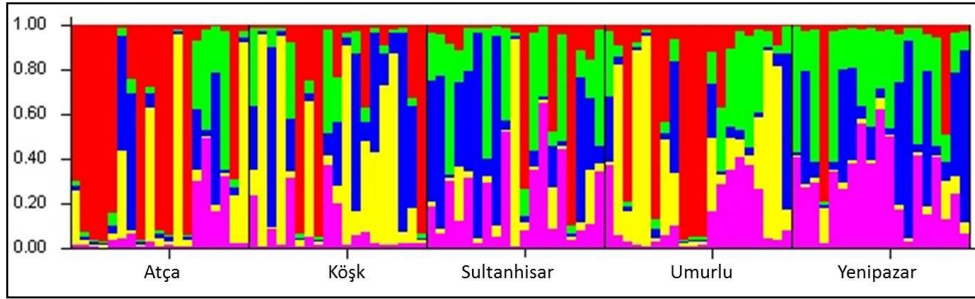


Şekil 4.14. *B.cinerea* lokalitelerinin UPGMA uzaklık ağacı.

UPGMA uzaklık ağacına göre *B.cinerea* populasyonları 2 (**1**: Sultanhisar ve Yenipazar, **2**: Atça, Köşk ve Umurlu) soy hattına ayrılmaktadır.

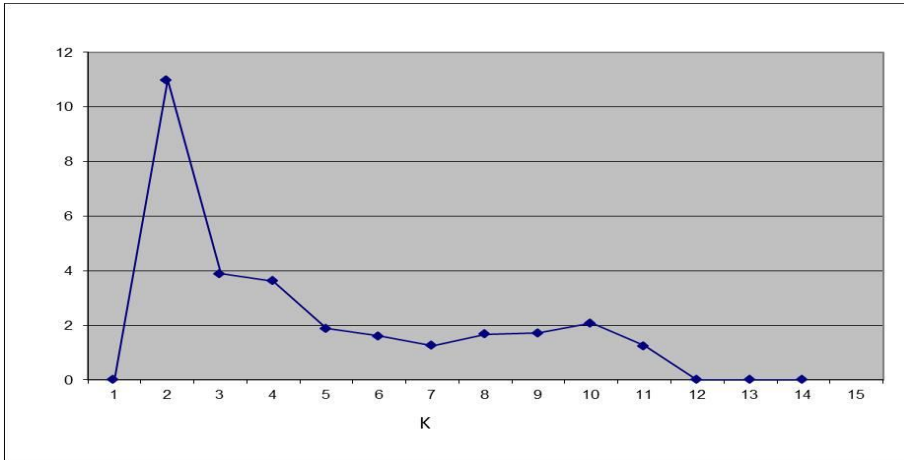
İncelenen bütün popülasyonlar da iki basamaklı mutasyon (TPM) modeli altında, son zamanlarda bir darboğaz geçirdiğine dair kanıt tespit edilemedi (Wilcoxon testinde bütün lokuslarda $p > 0.05$; Atça $p = 0.82031$, Köşk $p = 0.49609$, Sultanhisar $p = 0.42578$, Umurlu $p = 0.54492$, Yenipazar $p = 0.57031$).

Lokaliterde Bayesian kümeleme metodu ile popülasyon yapısı incelendi (Structure



ver. 2.3 run=10000, MCMC=100000, Şekil 4.15, 4.16).

Şekil 4.15. *B. cinerea* lokalitelerinin Structure analizi sonuçları.



Şekil 4.16. *B. cinerea* lokalitelerinin Structure analizi K değeri.

Structure analizi sonucunda beş *B. cinerea* lokalitesinde en uygun K değerinin 2 olduğu tespit edilmiştir (K=2 için $\Delta K: 94,22 / 8,57541621 = 10,9872218$).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çileğin özellikle son yıllarda dünyada ve ülkemizde giderek önem kazanmasında en büyük etken değişik iklim ve toprak koşullarında ekonomik olarak yetiştirilmesidir. Ekonomik öneme sahip yiyecekler küfler tarafından daima tehdit altındadır. Küfler yiyecekleri ya direk olarak beslenme amaçlı ya da dolaylı olarak aflotoksin gibi maddeleri salgılayarak etkilemektedir. Fungal patojenleri doğru olarak tanımlamak, sebep oldukları hastalıklara karşı mücadelede ve ekolojisi ve populasyon genetiği çalışmalarında oldukça önemlidir (Gherbawy ve Voigt, 2010). Ancak bu küf türleri birbirlerine çok benzediği için onları tür seviyesinde doğru olarak tanımlama mümkün olmayabilir. Bu nedenle morfolojik ve moleküler karakterleri birlikte araştırılmalıdır (Iheanacho vd. 2014). Devam eden biyoteknolojik yöntemler ve moleküler belirteçler farklı küf türlerinin doğru olarak tanımlanması için kullanılmaktadır (Attanayake vd., 2009). Bu çalışmada Aydın ilinde çilekte hastalığa sebep olan küflerin morfolojik ve moleküler olarak tanımlanması ve *B.cinerea* populasyonlarının mikrosatellit belirteçleri yardımıyla genetik yapısı ortaya konulmuştur.

5.1. Morfolojik ve Moleküler Tanımlama

Yaptığımız çalışmada 2014-2015 yıllarında Aydın ilinde çilek yetiştiriciliğinin en fazla olduğu 5 lokaliteden hastalıklı çilek örnekleri toplanmış ve 347 küf suşu elde edilmiştir. Morfolojik ve moleküler tanımlama gerçekleştirildikten sonra 11 cinse ait 20 farklı tür elde edilmiştir. İncelenen lokalitelerde tespit edilen küf suşları çizelge 5.1’de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Lolalitelere tespit edilen küf türleri.

Küf Suşları	Umurlu	Köşk	Sultanhisar	Atça	Yenipazar
<i>R. oryzae</i>				+	+
<i>A. flavus</i>				+	+
<i>A. niger</i>		+		+	+
<i>A. fumigatus</i>			+		+
<i>A. tubugensis</i>				+	+
<i>A. quadrilineatus</i>			+	+	
<i>A. terreus</i>				+	+
<i>Aspergillus sp.</i>				+	
<i>T. horzianum</i>					+
<i>T.atroviride</i>				+	
<i>A. alternata</i>	+	+	+	+	+
<i>S. monosporum</i>				+	+
<i>F. proliferatum</i>	+			+	+
<i>F. verticoides</i>					+
<i>T. allahabadensis</i>				+	
<i>P. minioluteum</i>					+
<i>P. citrinum</i>					+
<i>L.corymbifera</i>	+				
<i>B. cinerea</i>	+	+	+	+	+
<i>C. cladosporioides</i>			+		

En fazla küf suşu Yenipazar (14) ve Atça (13) lokalitelerinde tespit edilmiştir. *Bortyis cinerea* ve *Alternaria alternata* türleri incelenen bütün lokalitelerde gözlenmiştir. Bu da bu küf türlerinin Aydın ilinde bulunan çileklerde yoğun olduğu anlamına gelmektedir.

Funguslarda morfolojik tanımlama; konukçu özelleşmesi, besi ortamı, konidi büyüklüğü ve şekli, kültür gelişimi ve rengi, tele morf yapısının olup olmamasına ve diğer özelliklerine göre yapılmaktadır. Morfolojik tanımlama stabil değil yani çevre koşullarına göre değişmektedir. rDNA ITS gen bölgesinin fungus taksonomisinde kabul gören resmi bir moleküler barkod haline gelmesiyle moleküler tanımlama hızlı ve daha doğru sonuçlar vermektedir (Schoch vd, 2012).

Yapmış olduğumuz çalışmada morfolojik olarak tanımlama cins düzeyinde gerçekleşirken tür düzeyinde tanımlama moleküler olarak gerçekleştirilmiştir. Hem morfolojik hem de moleküler tanımlama birbirini desteklemiştir. Sadece *Aspergillus* cinsinde bir küf moleküler olarak tanımlanamamıştır. Bu küfün rDNA ITS gen bölgesi dizisi *Aspergillus tubigensis* türünden 3 baz farklılığına sahiptir

(Şekil 4.3). Bu türün rDNA ITS gen bölgesi dizisinin GENE BANK veri tabanında bulunmamasından kaynaklanmaktadır.

Toplam 20 farklı küf türünde 27 ITS gen bölgesi haplotipi elde edildi. Bu haplotiplere ait UPGMA uzaklık ağacı *Jukes-Cantor* modeli kullanılarak oluşturuldu (Şekil 4.4). UPGMA uzaklık ağacına küfler altı grup'a ayrılmaktadır (1: *Aspergillus*, *Penicilium*, *Talaromyces* ve *Bortyitis*; 2: *Trichoderma* ve *Fusarium*; 3: *Cladosporium*; 4: *Alternaria*; 5: *Rhizopus*; 6: *Lichtheimia*, *Syncephalastrum*).

5.2. *B.cinerea* Populasyonlarının Genetik Yapısı

Aydın ilinde çilek yetiştirilen 5 lokaliteden hastalıklı çilek bitkilerinden elde edilen 96 *B.cinerea* örneğinde dokuz mikrosatellit lokusu araştırıldı. Lokuslar polimorfik olup alel sayıları 6 (*Bc 4*) ile 18 (*Bc 1*) arasında değişmektedir. Dokuz lokus içinde toplam 104 olan alel sayısı, ortalamada 11.56 olarak belirlendi (Çizelge 4.2).

B. cinerea populasyonlarındaki varyasyonu tespit edebilmek için incelenen lokuslara göre gözlenen heterozigotluk değerleri belirlendi (Çizelge 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11). Gözlenen heterozigotluk en yüksek *Bc 5* lokusunda Umurlu ($H_G=0.900$), *Bc 2* lokusunda Köşk ($H_G=0.842$) lokalitesinde, en düşük ise *Bc 3* lokusunda Sultanhisar ve Yenipazar, *Bc 5* lokusunda Köşk, *Bc 9* lokusunda Atça, Köşk ve Umurlu, *Bc 10* lokusunda Atça ve Köşk lokalitelerinde ($H_G=0.00$) gözlemlendi. İncelenen lokusların toplamında gözlenen heterozigotluk değerleri $H_G=0.22$ ile $H_G=0.35$ arasında değişmektedir (Çizelge 4.12).

Çizelge 5.2'de bu çalışmada ve dünya genelinde daha önce yapılan bazı araştırmalarda kullanılan lokusların gen çeşitliliği değerleri verilmiştir.

Çizelge 5.2. Bu çalışma ve dünya genelinde yapılan bazı *B. cinerea* populasyonlarının gen çeşitliliği.

Çalışılan Lokus	Çalışılan Bölge	Çalışılan Bitkiler	Örnek sayısı	Gen Çeşitliliği (Ortalama)	Yazar
Bc2, Bc3, Bc6, Bc7, Bc10	Macaristan	Çilek, Böğürtlen, Üzüm	92	0.66	Fekete vd., 2012
Bc1, Bc2, Bc3, Bc4, Bc5, Bc6, Bc7, Bc9, Bc10	Hindistan/Avustralya	Nohut	104/65	0.61/0.82	Isenegger vd., 2008
Bc2, Bc3, Bc6, Bc7, Bc10	Macaristan	Çilek, Böğürtlen	490	0.82	Asadollahi vd., 2013
Bc1, Bc2, Bc3, Bc4, Bc5, Bc6, Bc7, Bc9, Bc10	Çin	Bakla	100	0.51	Huang vd., 2013
Bc1, Bc2, Bc3, Bc4, Bc5, Bc6, Bc7, Bc9, Bc10	İngiltere	Çilek, Karadut, Papatya, Gül	243	0.89	Rajaguru ve Shaw 2010
Bc1, Bc2, Bc3, Bc4, Bc5, Bc6, Bc7, Bc9, Bc10	Aydın	Çilek	96	0.64	Bu çalışma

Buna göre çalışılan 9 lokus baz aldığımızda *B. cinerea* populasyonunda en fazla gen çeşitliliği 0.89 ile İngiltere populasyonunda olduğu görülmektedir. Bu gen çeşitliliğinin fazla çıkmasının sebebi çalışılan örnek sayısı ve çalışılan bitki sayısının fazla olmasından kaynaklanmaktadır. Aydın ilinde bulunan *B. cinerea* populasyonu ve diğer çalışılan bölgeler arasındaki gen çeşitliliği değerlerinde önemli farklar görülmemiştir.

Alel sıklıklarına dayalı X^2 testi kullanılarak *B.cinerea* populasyonları için her bir lokusun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığı test edildi (Çizelge 4.13). Bütün lokuslar için populasyonların toplamında Hardy-Weinberg dengesinden sapma gözlemlendi (X^2 ydö). Yine populasyonlardaki lokusların tamamında Hardy-Weinberg dengesinden sapma gözlemlendi (X^2 ydö). Hardy-Weinberg dengesinden sapma görülmesinin sebebi de eşeysiz üremenin oldukça baskın olmasından kaynaklanabilir. Mantarlar hem eşeyli hemde eşeysiz olarak üremektedir. Çevre koşullarına bağlı olarak çoğunlukla eşeysiz olarak üremektedirler.

Populasyonlar arasındaki genetik uzaklık (F_{st}) ve populasyonların ikiye karşılaştırmalarına ait X^2 anlamlılık dereceleri karşılaştırıldı (Çizelge 4.13). Populasyonların ikiye karşılaştırılmalarında hepsinde de istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edildi. Bu da *B. cinerea* populasyonların istatistiksel olarak anlamlı bir genetik yapılanma gösterdiği anlamına gelmektedir.

Populasyonlarda tespit edilen alellere göre UPGMA uzaklık ağacı oluşturuldu (Şekil 4.11). Uzaklık ağacına *B. cinerea* populasyonları iki soy hattına ayrılmaktadır (1: Sultanhisar ve Yenipazar, 2: Atça, Köşk ve Umurlu).

Hiçbir populasyonun TPM modeli altında son zamanlarda bir darboğaz geçirdiğine dair kanıt tespit edilemedi. Buda fungusların kötü ortam şartlarına karşı spor ve benzeri yapıları oluşturmasından kaynaklanabilir.

Bayesian kümeleme metodu ile populasyon yapısı incelendi. En uygun K değerinin 2 olduğu tespit edildi (Şekil 4.16). Bu durumda UPGMA uzaklık ağacında tespit edilen iki soy hattını (1: Sultanhisar ve Yenipazar, 2: Atça, Köşk ve Umurlu) desteklemektedir.

Sonuç olarak,

- Fungusları morfolojik olarak tanımlamada kullanılan yapıları çevre koşullarına göre değişmektedir. Bu nedenle fungusları sadece morfolojik olarak tanımlama doğru olmayabilir. Bu nedenle tanımlama hem morfolojik hem de moleküler düzeyde olmalıdır. Morfolojik ve moleküler tanımlama birbirini desteklemelidir.

- Bu çalışma, *B. cinerea* populasyonlarının genetik yapılarını belirlenmesinde ülkemizde yapılan ilk çalışmadır.
- Örnekle hacmi baz alındığında Aydın ilindeki *B. cinerea* populasyonunun gen çeşitliliği diğer çalışılan alanlarındaki gen çeşitliliği değerleri arasında anlamlı farklar gözlenmemiştir.
- Funguslarda eşeysiz üremenin baskın olmasından dolayı Aydın ilindeki *B. cinerea* populasyonunun Hardy-Weinberg dengesinden sapma gösterdiği tespit edilmiştir.
- İncelenen beş *B. cinerea* populasyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir genetik yapılanma gösterdiği tespit edilmiştir.
- Hem UPGMA uzaklık ağacı hemde Bayesian kümeleme metodu ile yapılan analizler sonucunda *B. cinerea* populasyonlarının iki (1:Sultanhisar ve Yenipazar, 2: Atça, Köşk ve Umurlu) gruba ayrıldığı tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Anonymous, 2014. Silifke’de Çilek Üretimi, Sorunları ve Alternatif Ürünlerin Değerlendirilmesi Çalışmayı Sonuç Raporu.
- Anonymous, 2009. Dünya ve Türkiye Çilek Üretimi ve Ticareti. Akdeniz İhracatçı Birlikleri Araştırma Serisi 61.
- Anees, M., Edel-Hermann V., Steinberg C. 2010. Build up of patches caused by *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology & Biochemistry** 42 1661e1672. Anonymous, 2012. Food and Agriculture Organization of The United Nations. [<http://faostat.fao.org>]
- Assadollahi, M. 2013. Genetic diversity of *Botrytis cinera* and its relevance in the development of fungicide resistance. **University of Debrecen Doctorante School of Juhasz-Nagy Pal.**(2013)
- Attanayake, R.N., Glawe, D.A., Dugan, F.M., Chen, W., 2009. Erysiphe trifolii causing powdery mildew of lentil (*Lens culinaris*). **Plant Dis.**93,797e803.
- Bruns, T.D., Vilgays, T.J., Taylor, J.W. 1991. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** 22, 525-564, (1991).
- Bruford, M.W., Wayne, R.K. 1993. Microsatellites and their application to population genetic studies. **Current Opinions in Genetic Development**, 3: 939-43.
- Bruns, T.D., Gardes, M. 1993. Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi-taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. **Molecular Ecology** 2, 233-242.
- Balloux, F., Lugon-Moulin, N 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology** 11,155-165.
- Cornuet, J.M., Luikart, G.; 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, 144: 2001–2014.
- Çebi Kiliçoğlu, M., Özkoç, İ. 2010. Molecular characterization of *Rhizoctonia solani* AG4 using PCR-RFLP of the rDNA-ITS region. **Turk J Biol** 34 261-269.
- Çalış Ö., Çekiç Ç. 2013. Yabani Çilek Genotiplerinde Külleme Hastalık Etmenine Dayanıklılığın Karakterizasyonu. **Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi** 6 (1): 146-150.

- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M.J., Dveksler, G.S. 1993. General concepts for PCR primer design. **PCR Methods and Applications** 3, S30-S37.
- Di Bonita, R., Elliott, M.L., Desjardin, E.A. 1995. Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. **Applied and Environmental Microbiology** 61, 2809-2810.
- Dahlman, M., Danell, E., Spatafora, J.W. 2000. Molecular systematics of *Craterellus* : cladistic analysis of nuclear LSU rDNA sequence data. **Mycol. Res.** 104 (4) 388- 394.
- De Los Santos, B., Barrau, C., Romero, F. 2003. Strawberry fungal disease. **Food, Agriculture & Environment** Vol. 1 (3&4): 129-132.
- Fournier E, Giraud T, Loiseau A, Vautrin D, Estoup A, Solignac M, Cornuet JM, Brygoo Y. 2002. Characterization of nine polymorphic microsatellite loci in the fungus *Botrytis cinerea* (Ascomycota). **Mol Ecol Notes** 2:253–255.
- Fekete, E., Irinyib, L., Karaffaa, M., Árnysic, M., Asadollahia, M., Sándor, E. 2012. Genetic diversity of a *Botrytis cinerea* cryptic species complex in Hungary. Volume 167, Issue 5, , Pages 283–291.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. 2004. A Primer of Conservation Genetics, **University Press**, Cambridge.
- Gherbawy, Y., Voigt, K., 2010. Molecular Identification of Fungi. Springer.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Updated from Goudet (1995). Available from <http://www.unilch/izea/software/fstat.html>.
- Gonzales, G., Moya, M., Sandoval, C., Herrera, R. 2009. Genetic diversity in Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*): differential response to *Botrytis cinerea* infection. **Spanish Journal of Agricultural Research** 7 (4): 886-895.
- Groppe, K., Sanders, I., Wiemken, A. ve Boller, T. 1995. A microsatellite marker for studying the ecology and diversity of fungal endophytes (*Epichloe* spp.) in grasses, **Appl. Environ. Microbiol.**, 61:3943-3949.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser., 41: 95-98.
- Hancock, J.F. 1999. Strawberries. CAB International, Wallingford, UK., 237p.

- Haratian, M., Safaiea, N., Sharifnabib, B., Mahmudic, S. B., Ariana, A. 2012. Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* AG-4 from five provinces in Iran. **Plant Pathology** (2013) 62, 649–656.
- Hartog, B.J. 1981. The detection and quantification of fungi in food. Chapter 2 by Samson, R.A., R.A.; Hoekstra, E.S.; Oorschot, C.A.N. Van; Hartog, B.j.; Northolt, M.D.; Soentoro, P. S. S.; Egmond, H.P. Van; Baggerman, W.I.; Boer, E. de; Ko Swan Djien, **Introduction to Food-borne Fungi**, C.B.S, Baarn, Delf, Institute of Royal Netherlands.
- Hillis, D.M., Moritz, C. Eds. 1990. Molecular systematics. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Huang, Y., Zhu, ZD., Duan, CX., Wu, XF., Lu M, Dongfang Y. 2013. Genetic Diversity of *Botrytis cinerea* Isolates from Broad Bean. **Scientia Agricultura Sinica**, 2014,47(12):2335-2347.
- Iheanacho, H.E., Njobeh, P.B., Dutton, F.M., Steenkamp, P.A., Steenkamp, L., Mthombeni, J.Q., Daru, B.H., Makun, A.H. 2014. Morphological and molecular identification of filamentous *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolated from compound feeds in South Africa. **Food Microbiology** 44 (2014) 180e184.
- Isenegger D.A, Macleod W.J, Ford R, Taylor P.W.J., 2008. Genotypic diversity and migration of clonal lineages of *Botrytis cinerea* from chickpea fields of Bangladesh inferred by microsatellite markers. **Plant Pathology** (2008)57, 967–973.
- Kasiamdari, R.S., Smith, E.S., Scott, E.S., Smith, F.A. 2002. Identification of binucleate *Rhizoctonia* as a contaminant in pot cultures of arbuscular mycorrhizal fungi and development of a PCR-based method of detection. **Mycol. Res.** 106 (12): 1417–1426.
- Kumari S, Tayal P, Sharma E, Kapoor R. 2014. Analyses of genetic and pathogenic variability among *Botrytis cinerea* isolates, **Microbiological Research**(2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres>.
- Lee, S.B., Taylor, J.W. 1992. Phylogeny of five funguslike protist Phytophthora species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Molecular Biology and evolution** 9,636-653.
- Leroch, M., Plesken, C., Weber, R.W.S., Kauff, F., Scalliet, G., Hahn, M. 2013. Gray Mold Populations in German Strawberry Fields Are Resistant to Multiple Fungicides and Dominated by a Novel Clade Closely Related to *Botrytis cinerea*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 79(1):159.

- Maas, J.L. 1998. Compendium of Strawberry Diseases, second edition. **APS press Minnesota USA**, 98p.
- Manici, M.L., Bonora, P. 2007. Molecular genetic variability of Italian binucleate *Rhizoctonia* spp. isolates from strawberry. **European Journal of Plant Pathology**, Volume 118, Issue 1, pp 31-42.
- Maukhamedov, R., Hu, X., Nazar, R.N., Robb, J. 1994. Use of polymerase chain reaction- amplified ribosomal intergenic sequences for the diagnosis of *Verticillium tricorpus*. **Phytopathology** 84, 256-259.
- Moore-Landecker, E. 1996. Fundamentals of the Fungi, Prentice Hall, Upper Saddle River, **New Jersey**. Sf 574.
- Mcdonald, B. A. 1997. The Population Genetics of Fungi: Tools and Techniques. Population Genetics of Soilborne Fungal Plant Pathogens Symposium. **The American Phytopathological Society**, Vol. 87, No. 4.
- Miller, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) [Documentation file]. Available with the program's installation files at <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>
- Munoz, G., Hinrichsen, P., Brygoo, Y., Giraud, T. 2002. Genetic characterisation of *Botrytis cinerea* populations in Chile. **Mycol. Res.** 106 (5) : 594±601.
- Nagarajan, G., Nam, M.H., Song J.Y., Yoo S.J., Kim H.G. 2004. *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, genetic variation, RAPD, rDNA, RFLP. **The Plant Pathology Journal** , Startpage 264 , Endpage 270 , Totalpage 7.
- Nielsen, K. And Heitman, J. 2007. Sex and virulence of human pathogenic fungi. **Adv Gen.**, 57: 143-67.
- Polat, Z. 2009. Örtüaltında Yetiştirilen Marulda Kurşuni Küf (*Botrytis cinerea* Pers.) Hastalığına Karşı Mücadele İmkanlarının Araştırılması. (Yüksek Lisans Tezi)
- Rajaguru, B.A.P., Shaw, M.W., 2010. Genetic differentiation between hosts and locations in populations of latent *Botrytis cinerea* in southern England. **Plant Pathology** (2010) 59, 1081–1090.
- Rosslbroich, H.J., Stuebler, D., 2000. *Botrytis cinerea* history of chemical control and novel fungicides for its management. **Crop Protection** 19 (2000) 557-561.

- Rousset, F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, 8.1: 103-106. Erişim, [<http://kimura.univ-montp2.fr/~rousset/Genepop.htm>]
- Salazar, O., Julian, M.C., Rubia, V. 2000. Primers based on specific rDNA-ITS sequences for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG 2 subgroups and ecological types, and binucleate *Rhizoctonia*. **Mycol. Res.** 104, 281-285.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S. and Frisvad, J.C. 2004. Introduction to Food-and Airborne Fungi, Laboratory Manual Series 2, **Food and Indoor Fungi**, 389pp.
- Sanger, F., Coulson, A.R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, 94(3):441-448.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Prot Nat Acad Sci, USA** 109:6241-6246.
- Sharon, M., Kuninaga, S., Hyakumachi, M., Sneh, B. 2006. The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. Using molecular and biotechnological methods compared with the classical anastomosis grouping. **Mycoscience** 47:299-316.
- Sime D.A., Abbotti L.L., Abbotti S.P. 2002. A mounting medium for use in indoor air quality spore-trap analyses. **Mycologia**, 94(6):1087-1088.
- Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species, APS PRESS The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota, USA. Sf 133.
- Staats, M., Baarlen, P.V., Kan J.A.V. 2004. Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. **Molecular Biology and Evolution Volume 22, Issue 2Pp.** 333-346.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP, phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, 17: 6463-6471.

- Taylor J. W., Geiser D. M., Burt A. 1999. Koufopanou, V. The Evolutionary Biology and Population Genetics Underlying Fungal Strain Typing. **Clinical Microbiology Reviews**, Jan. 1999, p. 126–146.
- Taylor, J. W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T. 2000. Geiser, D. M., Hibbett, D. S., Fisher, M. C. Phylogenetic species recognition and species concept in fungi. **Fungal Genetic and Biology** 31, 21-32.
- Tran-Dinh N., Carter Pitt JI D.A. 1999. Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolate of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Mycological Research**, 103, 1485–1490.
- Turner, P.C., Meennan, A. G., Bates, A.D., White, M.R.H. 2004. Moleküler Biyoloji Önemli Notlar, Nobel Yayın, 613:346 s.
- Ureña-Padilla, A. R., MacKenzie, S. J., Bowen, B. W., Legard, D. E. 2002. Etiology and Population Genetics of *Colletotrichum* spp. Causing Crown and Fruit Rot of Strawberry. **Ecology and Population Biology**.
- Vilgalys, R., Gonzales, D. 1990. Ribosomal DNA Restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, 80, 151-158.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor. J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **Academic Press, san Diego**, pp. 315-322.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Zeynep ÜN
Doğum Yeri ve Tarihi : Bakırköy / 23.10.1988

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Bildiriler

- Uluslar arası

Karakaya, Ş., ÜN, Z., Yılmaz, C., Oruç, A., Türkozan, O., 2013. Relocate or Not. 33rd Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. Baltimore, Maryland, USA 2-8 February 2013.

- Ulusal

Karakaya, Ş., ÜN, Z., Turalı, M., Yılmaz, C., Oruç, A., Türkozan, O. 2012. Akyatan Kumsalında 2012 Üreme Sezonunda tespit edilen Ölü Deniz Kaplumbağaları. IV. Ulusal Deniz Kaplumbağaları Sempozyumu. Çanakkale 18 Mart Üniversitesi. Ekim, 2012.

Geroğlu, Y., ÜN, Z., Karasüleymanoğlu, K. Ş., Gözegir, G., Bıyık, H.H., 2014. Termofilik Çevrelerden İzole Edilen Fungusların Morfolojik ve Moleküler Tanısı. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi. Haziran, 2014.

b) Katıldığı projeler

Aydın İlinde Çilekteki Fungal Kontaminasyonun Moleküler Tanısı ve *Botrytis cinerea* Türünün Genetik Yapısı. Adnan Menderes Üniversitesi. BAP-FEF 14019.

İŞ DENEYİMİ

Adana Akyatan Av Yaban Hayatı Koruma Sahası, Yumurtalık Tabiatı Koruma Alanı ve Tuzla Deniz Kaplumbağası ve Yumuşak Kabuklu Nil Kaplumbağası Popülasyonlarını Araştırma, İzleme ve Koruma Çalışması. **2015** WWF Türkiye, Adana Çevre ve Orman İl Müdürlüğü Projesi.

Adana Akyatan Av Yaban Hayatı Koruma Sahası, Yumurtalık Tabiatı Koruma Alanı ve Tuzla Deniz Kaplumbağası ve Yumuşak Kabuklu Nil Kaplumbağası Popülasyonlarını Araştırma, İzleme ve Koruma Çalışması. **2014** WWF Türkiye, Adana Çevre ve Orman İl Müdürlüğü Projesi.

Acıbadem Maslak. Tüp Bebek Androloji Laboratuvarı- İSTANBUL (01.2014-02.2014)

Adana Akyatan Av Yaban Hayatı Koruma Sahası, Yumurtalık Tabiatı Koruma Alanı ve Tuzla Deniz Kaplumbağası ve Yumuşak Kabuklu Nil Kaplumbağası Popülasyonlarını Araştırma, İzleme ve Koruma Çalışması. **2013** WWF Türkiye, Adana Çevre ve Orman İl Müdürlüğü Projesi.

Avrupa Birliği Projesi. The WILD Foundation/WILD10- İSPANYA (09.2013-10.2013)

Adnan Menderes Üniversite Hastanesi. Mikrobiyoloji laboratuvarı- AYDIN (09.2012-05.2013)

Adana Akyatan Av Yaban Hayatı Koruma Sahası, Yumurtalık Tabiatı Koruma Alanı ve Tuzla Deniz Kaplumbağası ve Yumuşak Kabuklu Nil Kaplumbağası Popülasyonlarını Araştırma, İzleme ve Koruma Çalışması. **2012** WWF Türkiye, Adana Çevre ve Orman İl Müdürlüğü Projesi.

Adnan Menderes Üniversite Hastanesi. Mikrobiyoloji laboratuvarı- AYDIN (04.2012-05.2012)

İstanbul Teknik Üniversitesi. Moleküler Biyoloji ve Genetik- İSTANBUL (06.2011-07.2011)

İLETİŞİM

E-posta Adresi : unzeynep@hotmail.com

Tarih : 02.10.2015