

Biyoinformatik Araçların *Fusarium graminearum* Genomunda Kullanımı

Gülruh Albayrak^{1*}, Emre Yörük²

Özet

Biyoinformatik; fen ve sağlık bilimleri alanında elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve yeniden yorumlanmasında önemli bir bilim dalı haline gelmiştir. Özellikle biyolojik problemlerin çözümünde bilişim teknolojilerinin farklı biçimlerinin etkili kullanımı şeklinde uygulanan biyoinformatik, disiplinler arası çalışmalara yeni bir bakış açısı da kazandırmıştır. Biyoinformatik araçlar, moleküler mikrobiyoloji alanında da yoğun biçimde kullanılmaktadır. Bu derlemede, tarım alanlarında özellikle tahıllar üzerinde etkili bir fungal patojen olan *Fusarium graminearum*'un genomunda biyoinformatik araçların kullanımı kapsamlı olarak gösterilmiştir. Veritabanlarında kayıtlı *F. graminearum*'a ait dizilimlerin çok farklı canlı türlerinde gösterimleri de örneklenmiştir.

Anahtar kelimeler: Biyoinformatik, nukleotid dizilimi, *Fusarium graminearum* genomu

GİRİŞ

BİYOİNFORMATİK

Biyoinformatik, biyolojik problemlerin bilişim teknolojileri ya da mevcut tüm bilgisayar uygulamaları kullanılarak çözülmesi, biyolojik verilerin oluşturulması ve saklanması için veritabanlarının kurulması ve kullanılması şeklinde ifade edilmektedir. Bilişim teknolojilerindeki ilerlemelere paralel olarak son 20 yılda hızla gelişerek multidisipliner bir bilim dalı haline gelmiştir. Biyoinformatik uygulamalar; bilgisayar bilimleri, matematik, istatistik ve başta moleküler biyoloji olmak üzere biyolojinin çeşitli dallarından elde edilen verilerin birlikte değerlendirmesi çalışmalarını kapsamaktadır (1-3).

Son yıllarda özellikle biyoloji alanında sağlanan muazzam veri girişi bulguların değerlendirilmesinde, bu verilerin organize edilerek korunmasında ve diğer grupların bu verilere sistematik ve düzenli bir şekilde ulaşmasında matematik ve bilgisayar bilimlerinin kullanımını gerekli kılmıştır.

* ¹Doç. Dr., ²Doktora Öğr., İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Vezneciler, İstanbul, Türkiye. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: gulruh@istanbul.edu.tr

Bu şekilde farklı disiplinlerin biyoloji bilimlerine entegrasyonu ile geniş veri tabanlarının oluşturulması sağlanmıştır (3, 4).


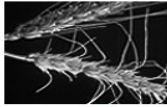
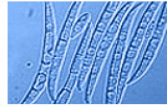


Günümüzde sadece genom projelerinden değil, aynı zamanda özgün gen-işlev çalışmalarından elde edilen sonuçların bulunduğu veri tabanlarında FASTA formatı, BLAST (basic local alignment search tool) analizleri ve benzeri çok sayıdaki biyoinformatik araç kayıtlı verilerin analizini kolaylaştırmaktadır (4). Mevcut dizi bilgilerinin dışında, bir nukleotid diziliminin diğer organizma dizilimleri ile çoklu karşılaştırılması mümkün hale gelmiş, makromoleküllerin yapıları hakkında elde edilen veriler de veritabanında toplanmış, genomik uygulamalar, protein yapı ve işlev tasarımları, modelleme için simülasyonlar da kullanıma sunulmuştur (1, 2). Ek olarak veri organizasyonu, sistem geliştirme ve uygulanma da biyoinformatiğin diğer amaçları arasında yer almıştır (3). İlaç tasarımı da bu alanda son yılların en popüler uygulamalarından biri haline gelmiştir (1, 3, 4).

Depolanan veriler, ileriki çalışmalara kaynak oluşturulması amacıyla, ücretsiz olarak hizmet sağlayan internet kaynaklı sistemler ile geniş kitlelerin kullanımına açılmıştır. Genom projesi tamamlanmış organizmaların genomlarına ait dizi bilgileri 1988 yılında kurulan NCBI (National center for biotechnology information/GenBank) başta olmak üzere çeşitli veri tabanlarında bulunmaktadır. Aynı zamanda NCBI, PubMed aracılığıyla bilimsel makaleler sunmakta, temel biyolojik bilgilere ait eğitim notlarını da içermektedir. Araştırma kurumları tarafından kurulan özgün veri tabanları da özgün bir türe hatta o türün dahil olduğu genustaki diğer türlere ait genom dizilim verilerini de içermektedir. Günümüzde EMBL (European molecular biology laboratory), DDBJ (DNA data bank of Japan), Swiss-prot, PIR (protein identification resource) international, LIGAND, PATHWAY, BRITE ve benzeri veritabanları bu kapsamda sıklıkla kullanılmaktadır.

***Fusarium graminearum* GENOMUNDA BİYOİNFORMATİK ARAÇLARIN KULLANIMI**

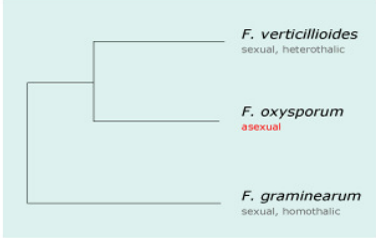
Fusarium graminearum taksonomik olarak Ascomycota bölümü, Sordariomycetidae sınıfından, Hypocreales takımına ait Nectriaceae ailesinin bir üyesidir. Bu tür hemibiotrofik yaşam çevrimine sahiptir. Eşeyli ve eşeysiz üreme biçimlerinin her ikisini de kullanmaktadır (5, 6). Patojenin trikotesenler başta olmak üzere çeşitli mikotoksinleri üretmesi (7, 8, 9), tür içi yüksek genotipik ve fenotipik çeşitlilik göstermesi (10, 11, 12), genom projesinin tamamlanması (13, 14), genlerinin önemli kısmının türe özgün olması ve bazı genlerin sadece bitki enfeksiyonu sırasında anlatım yapması gibi özellikleri, bu türü moleküler mikrobiyolojinin ilgi odağı haline getirmiş, günümüze kadar dünyanın neredeyse bütün bölgelerinden farklı referans ırklar ve izolatlarla çalışmalar gerçekleştirilmiştir (10, 11, 15-18). Nukleotid dizi bilgisi de dahil olmak üzere elde edilen biyolojik veriler veri tabanlarında kayıt altına alınmıştır. *F. graminearum*'a ait veriler diğer organizma genomlarınınkiler ile birlikte NCBI'da yer almaktadır. Ayrıca sadece *Fusarium graminearum* genomuna ait dizilimler MIPS (Munich information center for protein sequences) tarafından kurulan veri tabanında, birden fazla *Fusarium* türüne ait genom verileri de Broad Enstitüsü veri tabanında bulunmaktadır (19, 20). Broad Enstitüsü veri tabanında kayıtlı *F. graminearum* genomu; kromozom, süper kontig ve kontigler halinde detaylandırılarak düzenlenmiş ve sistematik halde paylaşılmıştır (Şekil 1).

Fusarium Comparative Database

The *Fusarium* comparative genomics database provides accesses to multiple sequenced *Fusarium* genomes simultaneously to facilitate the comparative analysis among these closely related fungal species. The *Fusarium* comparative project is part of the Broad Fungal Genome Initiative and was funded by the [U.S. Department of Agriculture's](#) National Institute for Food and Agriculture.

The *Fusarium* Comparative Project



F. verticillioides
sexual, heterothallic

F. oxysporum
asexual

F. graminearum
sexual, homothallic

Fusarium

- [Home](#)
- [Download](#)
- [News](#)
- [Analysis](#)
- [Genomes](#)
- [Credits](#)
- [Links](#)
- [Contact Us](#)

Gene Search

Genome [deselect]

- F. graminearum PH-1
- F. verticillioides 7600
- F. verticillioides mito
- F. graminearum PH-1
- F. graminearum mito
- F. oxysporum 4287
- F. oxysporum mito
- F. oxysporum Fo47
- F. oxysporum FO5C 3-a
- F. oxysporum HDV247
- F. oxysporum MN25

Chromosome [deselect]

- 1
- 2
- 3
- 4
- Unmapped Supercontigs

Supercontig [deselect]

- Supercontig 1
- Supercontig 1
- Supercontig 7
- Supercontig 11
- Supercontig 16

Contig [deselect]

- Contig 1
- Contig 2
- Contig 3
- Contig 4
- Contig 5
- Contig 6
- Contig 7
- Contig 8
- Contig 9
- Contig 10

Range on Contig: 1 - 56920

Strand: ☒ (Applies only to View Sequence)

DNA Sequence:

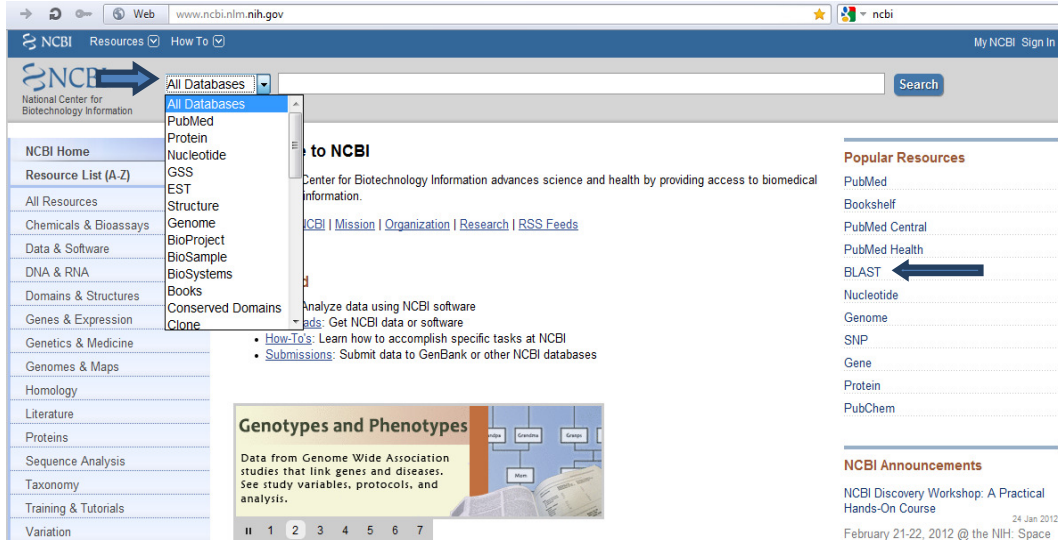
>F. graminearum PH-1 supercont3.1 of Gibberella zeae PH-1 [DNA]
 1-56920 +
 TGCTACTTTTATCACAAAAAAGCTCTTCCACCTCAACTATAGCGCTAAATGCTAAGGTA
 GAAAAGTCAAAGCTAGGGTGGATAGAAATGAAGCTGTAGCTTGACCCCGGCTTTCTTTC
 TCTCAGGCAAAGACTGCCAATAATGACGAGACCACTGATTGAGTTTGTGCTACCCATT
 ATCCACGCTTAGTTTCGGTAGCATTGAAAAAGCCCATCTTCAACGCCCTGCCTCCACC
 AGCATTACATTACTCTCACTCTAGCTCTGATTGCGCCCAAGGAAGAAACACAAGAGAA
 TACTAATGGTCTAGTTACCTTAGCTCTCTCCATAGGCCATCATGTAATGTCGATCTCCC
 TACATTGAACATAAGTCCCTTACCCTTCCGATAGACAGTACCCGGTTTCAACACCACT
 CTAGCGCCTTGTCACGCTTCAATAAAAGAGGCCATCGATCATCGTCTGAGAGCCACA

Şekil 1 Broad Enstitüsü tarafından kurulan *Fusarium* genom veritabanında *F. graminearum*'a ait kromozom, süperkontig ve kontig yan sekmeleri

Genomunda dört kromozoma sahip ($n=4$), %48.33 GC içerikli *F. graminearum* genomu 36.1 Mb boyutundadır. Taşıdığı 13937 geninden 708'inin türe özgün olduğu, 408'inin bitki-patojen etkileşiminden sorumlu olduğu da bildirilmektedir (13, 14). Bu derlemede veri tabanlarında kayıtlı *F. graminearum* genomunda yer alan nukleotid dizi bilgileri (AY102584.1, JN638063 vb) temel alınarak gerçekleştirilen çeşitli biyoinformatik araçların kullanım örnekleri gösterilmektedir (21).

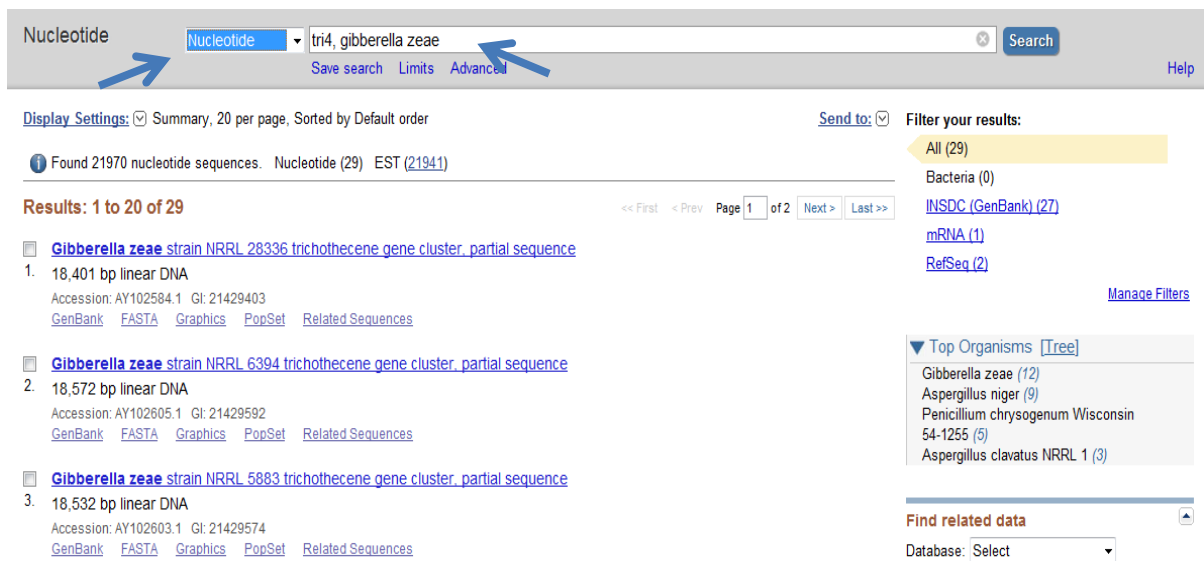
NCBI Kökenli Veritabanlarının *F. graminearum* Genom Analizinde Kullanımı

Web ortamında arama motorundan <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> adresi (21) aracılığıyla NCBI veritabanına ulaşılmaktadır. Siteye girişin ardından gerçekleştirilecek olan analiz konu başlığı; nukleotid, gen, EST, protein, genom ölçütlerinin bulunduğu sekmeden seçilmelidir (Şekil 2).



Şekil 2 NCBI veritabanı ana sayfasından bir pencere. Ölçüt sekmesi okla gösterilmiştir

Bu çalışmada *F. graminearum*'un trikotesen tipi mikotoksinlerinin üretiminden sorumlu *tri5* gen kümesinde yer alan *tri4* geninin analizi biyoinformatik olarak gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle gen dizisine ulaşmak için, konu başlığı "nükleotid" olarak seçilmiş, tür ve gen adı arama çubuğuna yazılarak sunucudan dizilim verilerine ulaşılmıştır (Şekil 3). Tarama sonucunda farklı ırklardan elde edilen dizilim bilgilerini içeren başlıklardan amaca uygun olanlar seçilmiştir. Ek pencerede *tri4* genine ait nükleotid dizi bilgisi elde edilmiş, intron/ekzon bölgeleri, aminoasit dizilim karşılığı vb ölçütlere göre incelenmiştir. Aynı zamanda her bir sekme ile açılan sayfalarda çalışmanın gerçekleştirildiği kurum ve araştırmacılar, çalışılan organizma (tür, ırk, taksonomi vb) ve genin aksesyon numarasına ilişkin ayrıntılı bilgilere de ulaşılmıştır (Şekil 4. a, b, c).



Şekil 3. NCBI veritabanında *F. graminearum* türünde *tri4* geninin nükleotid dizisinin araştırılması. Oklar arama ölçütlerini göstermektedir

Gibberella zeae strain NRRL 28336 trichothecene gene cluster, partial sequence

GenBank: AY102584.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

[Go to:](#)

LOCUS AY102584 18401 bp DNA linear PLN 25-APR-2011
DEFINITION Gibberella zeae strain NRRL 28336 trichothecene gene cluster,
partial sequence.
ACCESSION AY102584
VERSION AY102584.1 GI:21429403
KEYWORDS .
SOURCE Gibberella zeae (anamorph: Fusarium graminearum)
ORGANISM [Gibberella zeae](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Nectriaceae;
Gibberella.
REFERENCE 1 (bases 1 to 18401)
AUTHORS Ward,T.J., Bielawski,J.P., Kistler,H.C., Sullivan,E. and
O'Donnell,K.
TITLE Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene
mycotoxin gene cluster of phytopathogenic Fusarium
JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (14), 9278-9283 (2002)
PUBMED [12080147](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 18401)
AUTHORS Ward,T.J., Bielawski,J.P., Kistler,H.C., Sullivan,E. and
O'Donnell,K.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (08-MAY-2002) Microbial Genomics and Bioprocessing, USDA,
Agricultural Research Service, National Center for Agricultural

gene complement(<2707..4448)
/gene="TRI4"
mRNA complement(join(<2707..2893,2963..3129,3182..4146,
4205..4448))
/gene="TRI4"
/product="cytochrome P450"
CDS complement(join(2707..2893,2963..3129,3182..4146,
4205..4448))
/gene="TRI4"
/codon_start=1
/product="cytochrome P450"
/protein_id="AAU48884.1"
/db_xref="GI:21429405"
/translation="MIDQDMIKSLNIPVSHVAGIFAASTVIYFLSSCFYNLYLHPLR
KIPGPKLAAIGPYLEFYVHEVIDGQYLWEISKMHDKYGVIVRNAREVHIRDSSVYTT
IYTAGSRKTNKDPATVGAFVPSATAATVDHDDHRSRRGYLNYPYFKRTIITNLEPFIZ
ERVTKLLTRFQQLDDQVLSLDGAFALTAADITNRFYKHNLYSLPDFHFVVRDG
FLGLTKIYHLARFLPGLVITLRLPYSCIRMIAPSVCDLQMRDEIQDGGEEFLSNK
SHEAKSSILFGALADSHIPSHERTVERMLDEGTIVLFAGETTTSRTLAITVLYLLTHP
ECLKKLRLEENSLPPVKDDQVSLATLENLPYLVNGVTHEGFRFAFGPISRSGRVATQEN
LKYKEHVIPKGTPIQSSTYFMHTDPKNFPEPEKFKPERWIEAQKGIPLKKDITNFSQ
GSRQCIGYTHFAFMYLALSRIARAYDIELYDTKADIMTHARIVGYPKAIPGKKEH
LGEVRVKYLKAL"

b Şekil 4. NCBI veri tabanında kayıtlı *tri4* geninin *Gibberella zeae* NRRL28336 irkindaki dizilimi ve genel bilgiler (a), intron/ekzon bölgelerine ait bilgiler (b) ve bunların gösterimi (c).

Koyu renk ile işaretli bölgeler kodlama yapan nükleotid dizilimlerini göstermektedir.

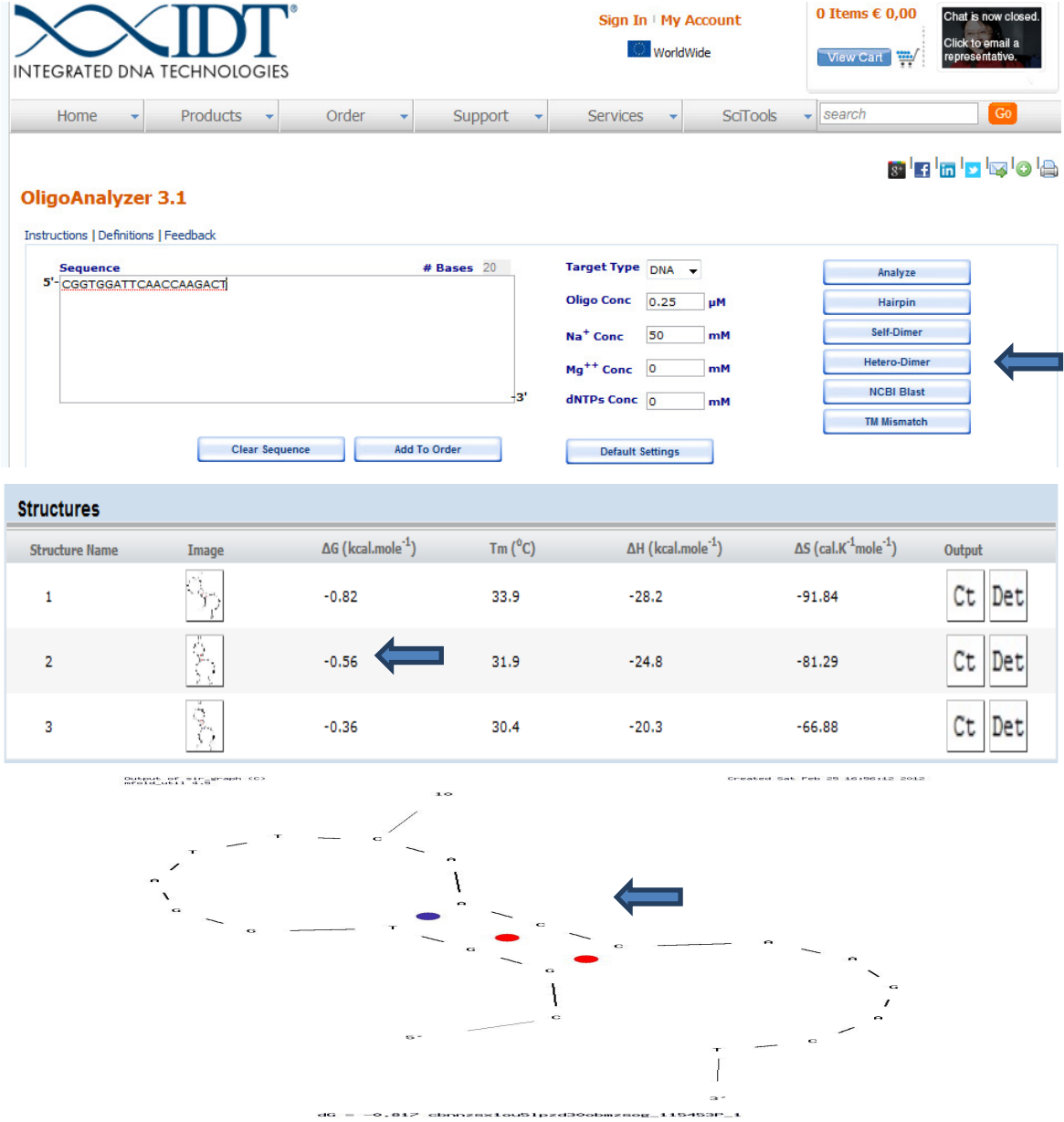
Primer ve Prob Tasarımı

tri4 gen anlatımının kantitatif olarak belirlenmesi için öncelikle polimeraz zincir reaksiyonunu (PZR) gerçekleştirmek üzere primer ve prob tasarımı yapılmıştır. Bu amaçla ücretsiz çevrim içi yazılımı olan primer3 kullanılmıştır (22, 23). Primer tasarımında NCBI'da kayıtlı *tri4* geninin 4 ekzon bölgesine ait nükleotid dizileri FASTA formatında çevrilerek primer3 yazılımındaki veri giriş kutusuna yapıştırılmıştır. Tasarım için gerekli olan özellikler; primer boyutu, PZR ürün boyutu, erime sıcaklığı (Tm) vb ölçütler ayrı ayrı kendi kutularına girilmiş, "pick primers" tuşuna basılmak suretiyle hedef bölgeye uygun tasarlanan primer dizileri alt pencerede

görüntülenmiştir (Şekil 5). Tasarlanacak olan primerler ve ilgili deneyler araştırmacının istediği niteliklere göre değişkenlik gösterebilir. Standart bir PZR’unda kullanılmak üzere tasarlanan primer molekülleri 18-24 nukleotid uzunluğunda, 54 °C ve üzeri sıcaklık değerine (Tm) sahip olabilir. Tasarlanan bölgeye göre primer çiftleri arasındaki Tm farkı maksimum 5 °C olan primer molekülleri PZR için tercih edilmelidir. Çalışmaya bağlı olarak bu şekilde 1 (bir) kilobazın (kb) üstünde çoğaltım gerçekleştirilebilir. Gerçek zamanlı PZR uygulamalarında hem primer hem de prob molekülleri tasarlanmaktadır. Farklı olarak primerlerin optimum Tm derecesi 60 °C, maksimum Tm farkı ise ancak 2 °C olabilir. PZR ürün boyutu ise iki primer bağlanma bölgesi arasındaki probu da içerecek şekilde 70-150 nukleotid çifti arasında hatta 60 nukleotid olmalıdır (24-26). Gen anlatımı çalışmalarında primer hedef bölgeleri ekzon dizilerine göre tasarlanmalıdır. Bu nedenle intron dizileri belirlenerek çıkarılmalıdır. Primer3 yazılımında olduğu gibi çok sayıda ticari firma primer, prob ve siRNA gibi oligonukleotid moleküllerin sentezine olanak sağlayan çevrimiçi hizmetler sunmaktadır. Şekil 5’te de görüldüğü gibi tasarlanan bu oligonukleotid moleküllerinin birden fazla sayıda alternatifleri de sunulmaktadır. Bu şekilde araştırmacı farklı PZR ürün boyutlarını elde etmek amacıyla primer seçim imkanına sahip olabilmektedir. Primer moleküllerinin güvenilirliği primerlerin self-dimer, hetero-dimer ve firkete yapılarını oluşturma olasılıkları araştırılarak sağlanır. Tasarlanan primerlerin bu yapıları oluşturma olasılıkları belirli sıcaklıklardaki ΔG değerlerinin matematiksel hesaplamaları ile öngörülür. ΔG değeri -9 kcal/mol’dan büyük optimum -6 ilave +2 kal/mol arasındaki primerlerin güvenilir oldukları ifade edilir (26, 27). Güvenilirliği araştırmak için günümüzde sıklıkla “Integrated DNA Technologies” (IDT) firmasının çevrimiçi tasarım aracı kullanılmaktadır. Önceki örneklerde olduğu gibi primer dizileri ilgili veri giriş kutusuna yapıştırılır (Şekil 6) ve dimer ve firkete yapısı oluşturma olasılıkları ekranın sağ üst kısmındaki tuşları seçip komut vermek suretiyle araştırılır ve görüntülenir. Primerlerin hangi sıcaklıklarda firkete ve dimer oluşturacağına dair elde edilen bilgiler muhtemel primerlerin tasarım ve kullanımında önemli veriler sunmaktadır.

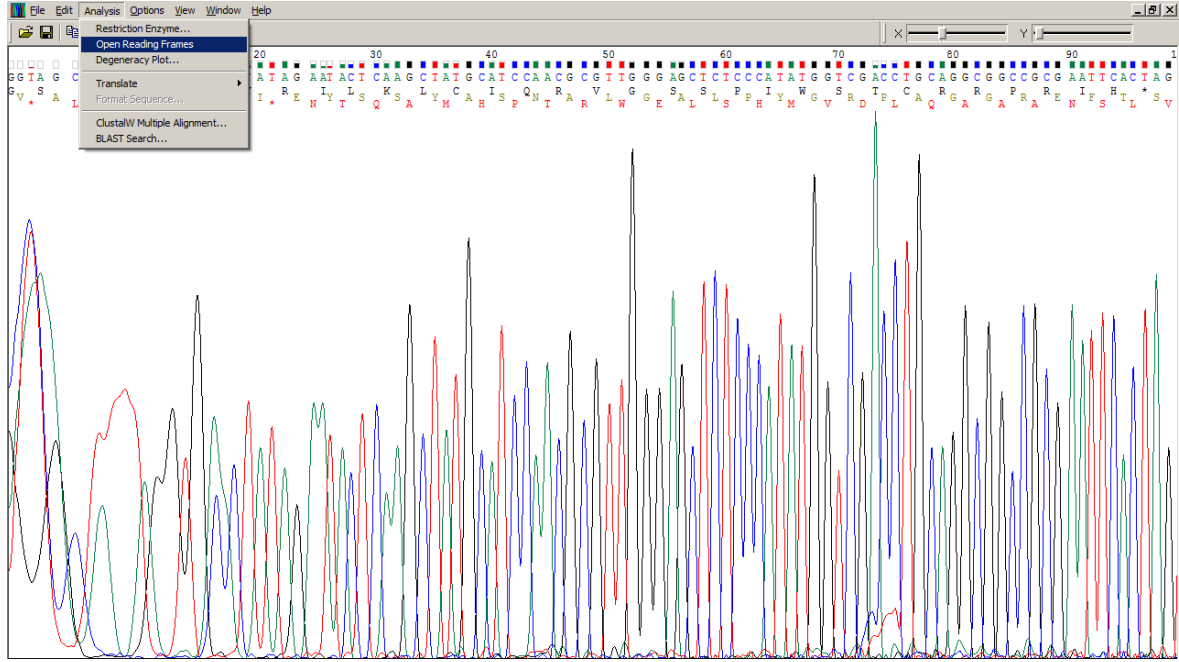
Dizi Bilgilerinin Görüntülenmesi ve Analizi

Özgün çalışmalar sonucunda elde edilen dizilim bilgileri günümüzde programlar kullanılarak görüntülenir ve kaliteleri hakkında bilgi sahibi olunur. Bunlar arasında sıklıkla kullanılan Chromas Pro/Lite yazılımıdır (28). Çalışmada JN638063 aksesyon numarasına sahip *F. graminearum* genomunda RAPD markırı ile çoğaltılıp dizilendikten sonra NCBI veri tabanına yüklenen bir dizilim bilgisi kullanıldı (29). Özgün bilgisayar formatında (kromatogram) elde edilen dizilim bilgisi nukleotid sıralanışı tek tek görüntülendi. Ayrıca dizilenen nukleotidlerin doğruluğu kromatogram aracılığıyla pikler halinde izlendi. Ekranın üst kısmındaki kutucukların doluluğu dizilimin doğruluğunu teyit etti (Şekil 7). Kullanılan Chromas Pro/Lite yazılımı aynı zamanda seçenekler, analizler ve düzeltme linkleri aracılığıyla restriksiyon haritalarının çıkarılmasına, ilgili dizinin amino asit karşılığının bulunmasına, ters-tamamlayıcı nukleotid dizisinin çıkarılmasına, açık okuma çerçevesinin teşhisine ve dizilimin FASTA formatına çevrimine de olanak sağlamaktadır. Şekil 7’de de görüldüğü gibi dizilim bilgilerinde ilk 20 ve son 20 nukleotid dizileme kaliteleri genel anlamda diğer bölgelere kıyasla daha düşüktür. Bu nedenle ilgili kısımlar kromatogramda üst üste çakışan karmaşık pikler şeklinde gözlenir.



Şekil 6. IDT çevrim içi hizmeti kullanılarak primerlerdeki dimer ve firkete yapılarının oluşma olasılıklarının incelenmesi. Yukarıdan aşağıya oklar sırasıyla dimer/firkete seçeneklerini, ΔG değerlerini ve üç nükleotid çiftlik bir firkete yapısını göstermektedir

Nükleotid dizilim bilgilerini FASTA formatına çevirmede çevrimiçi hizmet veren çeşitli biyoinformatik sunucular (30) da kullanılmaktadır (Şekil 8). Primer3 yazılımına benzer şekilde tasarlanan primerlerin Tm değeri, %GC değerleri ve benzeri karakteristikleri de farklı çevrimiçi hizmet ağları (31) aracılığıyla araştırılabilir (Şekil 9). Dizilen bölgede restriksiyon endonükleazı kesim noktalarının belirlenmesinde de benzer ağlar (32) etkin biçimde kullanılmaktadır. Çalışmada JN638063 aksesyon numaralı dizilim bilgisinin restriksiyon endonükleazı kesim noktaları belirlendi. Bu amaçla veri giriş kutusuna FASTA formatı ile nükleotid dizi sırası yapıştırıldı. Enzim alt penceresinde bulunan restriksiyon endonükleazları seçildi (Şekil 10.a).



Şekil 7. Chromas Pro yazılımı ile bir dizilim bilgisinin görüntülenmesi.

Pearson/Fasta [Format for the output](#) (Use this [form](#) for 'Pretty' format)

Additional formatting options:

☒ Mixed Case ☐ Lower Case ☐ Upper Case

☐ Remove Gap Symbols ('-')

Please enter or paste sequence[s] to be converted (most [formats](#) accepted):

TCTCTACCAACGGTGGATTCAACCAAGACTTTGTTCCCCGAAGAACCATTGTTTGC
TTCTCTCTACCAACGGTGGATTCAACCAAGACTTTGTTCCCCGAAGAACCATTGTT
TGTTCTCTCTACCAACGGTGGATTCAACCAAGACTTTGTTCCCCGAAGAACCATT
GTTTGCTTCTCTCTACCAACGGTGGATTCAACCAAGACTTTGTTCCCCGAAGAACA
CTTGTTTGCTTC

Credits: WWW implementation by [BIMAS Staff](#)

Şekil 8 Çevrim içi hizmet ağı aracılığıyla nükleotid dizilimlerinin FASTA formatına çevrimi

Harita tuşu etkinleştirildiğinde yeni sayfada enzimin kesim bölge ve sayıları tablo şeklinde elde edildi (Şekil 10.b). Program kullanımı sırasında amaca göre ekranda belirtilen farklı ölçütler (doğrusal DNA, maksimum 4 kesim sayısı/maksimum 4 nükleotid uzunluk tanıma bölgesi, küt/yapışkan uç vb) işaretlenebilmekte ve analiz daha özgün gerçekleştirilebilmektedir. Bir diğer önemli biyoinformatik araç ise nükleotid dizilimlerdeki tekrar motiflerinin gösterimidir. Çevrim içi ağlar aracılığıyla bu motifler ve sayıları belirlenebilmektedir (33). Şekil 11.a'da JN638063 aksesyon numaralı dizilimde tekrar motifler taraması örneklenmiştir. Komut çubuklarından

tekrar motif uzunluğu 4-6 olarak seçilmiş, dizilimde GGGGC motifinin üç tekrarlı olarak taşındığı belirlenmiştir (Şekil 11.b)

Oligo Calculator

Enter Oligo Sequence in Box	
ATGCCCGAATAGGACGGA	
Length <input type="text"/>	Melting Temperature (Tm) <input type="text"/> °C
%GC content <input type="text"/>	Molecular Weight <input type="text"/> daltons (g/M)
<input type="button" value="Calculate"/>	OD of 1 is equal to <input type="text"/> nanoMolar (pmol/ml).

Şekil 9 Çevrim içi hizmet veren ağ aracılığıyla bir primer molekülünün çeşitli karakteristik bilgilerinin araştırılması

Conformation

Circular ☐ Linear ☒

Sort By

- frequency
- overhang
- name

Filter By

Maximum Cuts

Minimum Site Length

Include

Select Individual Enzymes

All Enzymes

AarI
AasI
AatI
AatII
AccI
AccII

Sequence Info

No non-base letters.
Numbers and spaces OK.

Paste Sequence Here

AAGTCCCTCGAAAGTTGGTGG
TCGTGAGGAGCTTGTATCGTTT
TCGTGATCATCAATGCTAAT
CC
TCCCACTTTTACCAATTTTGG
AAGATTGGGTGCC
TTGACACCGATTGCGGCGCGG
GG
CGGGCGGGGAAACGAGATAGT
CCGGGAATTCAGGG
GCCTGCTGGAGGTTTGGGCTA
TC
GACCCGCTAGACCTCAGCGCC

Menu

Untitled

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
HaeIII	GGCC	4	blunt	1	165
ApoI	RAATTY	6	five_prime	1	155
BbvCI	CCTCAGC	7	five_prime	1	202
BbvI	GCAGC	5	five_prime	1	338
BisI	GCNGC	4	five_prime	1	327
BstEII	GGTNACC	6	five_prime	1	251
ClaI	ATCGAT	6	five_prime	1	51

Şekil 10 (a) JN638063 aksesyon numaralı dizilimin biyoinformatik aracına aktarımı, kriterlerin seçimi ve (b) restriksiyon endonukleaz kesim profilinin bir kısmı

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda en önemli gereksinimlerden biri, elde edilen dizilim bilgilerinin araştırmacılar tarafından NCBI ve benzeri veri tabanlarına doğrultulması, diğeri de güncel olarak bu sitelerde kayıt altına alınmasıdır. Bu kapsamda “sequin” ve benzeri çeşitli programlar kullanılmaktadır (34). Program bilgisayar ortamında kurulabilmektedir. Ancak verilerin yüklenmesinden önce bazı önemli ön araştırmaların yapılması gerekmektedir. Yüklenecek olan dizilimin açık okuma çerçevesinin tespiti, intron/ekzon bölgelerinin bildirilmesi, varsa mikrosatellit motiflerinin gösterilmesi ve şayet dizilim hizmeti klonlama süreci ile elde edilmişse vektör dizi içeriğinin bu dizilimden çıkarılması gerekmektedir. Bu amaçla dizilimler NCBI destekli çeşitli sunucular aracılığıyla ilgili sitelere aktarılır (35, 36). Kayıt için gerekli veriler; araştırmacıların isimleri ve kurumları, dizilimle ilgili bir makale yayımlanmışsa künyesi vb. ölçütler veritabanına girilir (Şekil 12). Bu veriler sisteme

kaydedildikten sonra sorumlu kişiler ile e-posta aracılığıyla iletişime geçilmek suretiyle aksesyon numarası alınır.

TCGTGATCGATCCAATGCTAATCTCCACCTTTACCAATTTTGAAGA
TTTGGGTGCC
TTGCACACCGATTGCGGGCGGGCGGGCGGGGAAACGAGATAGTCCGG
GAATTCAGGG
GCCTGCTGGAGGTTTGGGCTATCGACCCGCTAGACCTCAGCGCTCAG

Search parameters

Minimum no. of repeats (default = 3):

Minimum repeat unit length (default = 2):

Maximum repeat unit length (default = 100):

Options

☒ Show summary report

☒ Show VNTR map

☐ Display potential primer design sequences

Summary report

Start	Stop	Unit	Repeat
676	694	GGGGC	3.8

Microsatellite map (VNTR's in UPPERCASE)

ggtagcttttaggtgaactatagaataactcaagctatgcattccaacgcgt
tgggagctctcccatatgggtgacctgcaggcggccggaattcactagt
gattgtcgccgtcaggagagatgaggatcttgtcgagtcacaggggcca
agagacgactttacgatatttgcgaggttcgagcggcgagaatgtgcga
tttgacggcttcgttaccaaactggcgcttcttccctccctgactagaaa
tatgttagcgagttgaatcgacgggtgagggttggggtaggataaacgca
ctctcgagcagataaaaggagcgcttgcctcatcttcatcaccgcg
ctgtcattgttagctgggaaccacatcatggcaagtcgtcgtataacc
gttgacatgtccaaatctgtccctcgttagctacccctgcctcctgt
tgacaaaagtgtgcaggactcactcatgccatccattgactatccg
ttccaccctggggagctgtatcgttaagattatggcgtttacgggtgt
atcgaaaagtccctcgaaagtgggtggtcgtcaggagcttgatcgttt
tcgtgatcgatcaatgctaactctccacctttaccaatttttgaaga
tttgggtgccttgacacacgattc**GGGGC****GGGGC****GGGGC****GGGGC**aaacga
gatagtcgggaattcaggggcctgcctggagggttgggctatgacccc
gtagacctcagccctcaggtcaggctggcattgagtcgtgacttcat
agcttaggtgacccaccaaagacagcttctgcctccgccaatcatcga
agcatcattaatagagtacatcttttgaatgcagcgcaaaaaaacatc

Şekil 11 (a) JN638063 aksesyon numaralı dizilimin biyoinformatik araca aktarımı ve kriterlerin seçilimi ile birlikte tekrar motiflerinin araştırılması ve (b) elde edilen veriler

Sequin

Sequin Application Version 11.75
Standard Release [Sep 26 2011]
National Center for Biotechnology Information
National Library of Medicine
National Institutes of Health
(301) 496-2475
info@ncbi.nlm.nih.gov

Database for submission ☒ GenBank ☐ EMBL

Submitting Authors

File: Edit

Institution:

Department:

Address:

City:

State/Province: Zip/Postal Code:

Country:

Şekil 12 Nükleotid dizilimlerinin yüklendiği Sequin programının genel yüzü

Dizilerin *Fusarium* Genomu ve Diğer Organizma Genomları ile Homolojilerinin Araştırılması

Veritabanında kayıtlı olan ya da gerçekleştirilen çalışma sonucunda elde edilen nukleotid dizilimini gerek akrabalarla gerekse diğer canlılara ait kayıtlı dizilimlerle ikili veya çoklu karşılaştırmak mümkündür. Bu amaçla NCBI veri tabanı kullanılarak BLAST (basic local alignment search tool) analizi yapılmaktadır (37). Çalışmada AY102584.1 aksesyon numaralı *tri4* genine ait dizilim örneği önce tüm veritabanında çoklu ardından da en yüksek homolojiye sahip olduğu dizilimler ile ikili olarak karşılaştırıldı. BLAST analizini başlatmak için nukleotid dizilim bilgisi FASTA formatı ile elde edilip kopyalandı. Bu dizilimin, çevrimiçi hizmet veren çeşitli kaynaklardan yararlanılarak da FASTA formatına çevrilmesi mümkündür (30). NCBI veri tabanı ana sayfasında BLAST analizi sekmesi açıldı. Yan sekmelerden “nukleotid blast” seçildikten (Şekil 13.a) sonra FASTA formatındaki dizilim yeni sayfada açılan veri giriş kutusuna yapıştırıldı. Eğer birden fazla dizi karşılaştırılacak ise diğer veri giriş kutularına da (“align two or more sequences”) dizilimler yapıştırılır (Şekil 13.b). Analizi başlatmadan önce sayfanın alt penceresinden program seçimi yapıldı. Bu amaçla benzerlik seviyesi en yüksek olan megablast işaretlendi. Ayrıca veritabanı alt penceresinden karşılaştırılacak organizma ölçütü “tüm nukleotid koleksiyonları” olarak belirtildi (Şekil 13.c). BLAST tuşuna basılarak tarama başlatıldı. Ekranda açılan sayfanın üst penceresinde benzerlik skorlaması şekille (Şekil 14.a), orta penceresinde dizi homolojisine sahip organizmalar aksesyon numaraları, bit skoru, maksimum benzerlik ve E değerleri ile birlikte tablo halinde (Şekil 14.b), alt pencerede ise benzerliklerin ikili karşılaştırılması görüntülendi (Şekil 14.c). Bit skoru, E değeri ve maksimum benzerlik homoloji gösteren alanı ifade eden değerlerdir. Çalışmada Bit skoru 50 ve üzerinde olan, E değeri “0”a çok yakın (0.05’ten küçük) olan diziler bilimsel olarak anlamlı kabul edildi ve sonraki değerlendirmeler için seçildi. Homolojinin yüksek olduğu organizmalarda benzer olan dizilerin kapsama aralığı (query coverage) araştırıldı. Bu şekilde aramaya tabi tutulan dizilimin kayıtlı dizilime benzerlik yüzdesi ve identik dizilerin sayısı ve yeri belirlendi (38).

tri4 Geninin Çoklu Nukleotid Dizilimlerinin Karşılaştırımı

Günümüzde genomdaki hedef bölgeler, amino asit dizileri vb internet kaynaklı ya da yazılım kurulumu aracılığı olan CLUSTAL analizleri ile karşılaştırılmaktadır. Veri tabanlarında kayıtlı nukleotid dizilim bilgileri ya da klonlama/dizileme çalışmalarından elde edilen özgün dizilimler CLUSTALW ile analiz edilmektedir (39, 40). Bu çalışmada *Fusarium graminearum*’un üç farklı ırkına ait *tri4* geni dizilimleri CLUSTALW ile analiz edildi. Sayfanın üst kısmında bulunan genel ayar parametresi “CLUSTAL” olarak seçildi. Analiz edilecek dizi bilgisi de “DNA” olarak işaretlendi. Üç farklı izolata ait *tri4* geni nukleotid dizileri FASTA formatına çevrildi. Nukleotid sıraları birkaç satır atlamak suretiyle ardışık olarak ilgili penceredeki kutuya yapıştırıldı (Şekil 15.a). Çoklu karşılaştırma araç çubuğu etkinleştirildiğinde yeni pencerede hizalanmış her üç izolata ait dizilimler 60 nukleotidlik parçalar şeklinde hizalandı (Şekil 15.b). Bu şekilde bütün izolatlarda identik olan nukleotidler (yıldız işaretli) belirlendi. Uyum yakalanmamış ya da delesyon içeren bölgeler nukleotidlerin yerine yatay çizgi (-) ile işaretli olarak seçildi. Üç ırkta *tri4* geninin benzerlik oranı %99.8 olarak hesaplandı (Şekil 15.c). Aynı zamanda dizi benzerliği temel alınarak izolatlar arasındaki ilişki

UPGMA (“unweighted pair group method with arithmetic mean”) analizi ile dendrogram oluşturularak gösterildi (Şekil 15.d).

Basic BLAST

Choose a BLAST program to run.

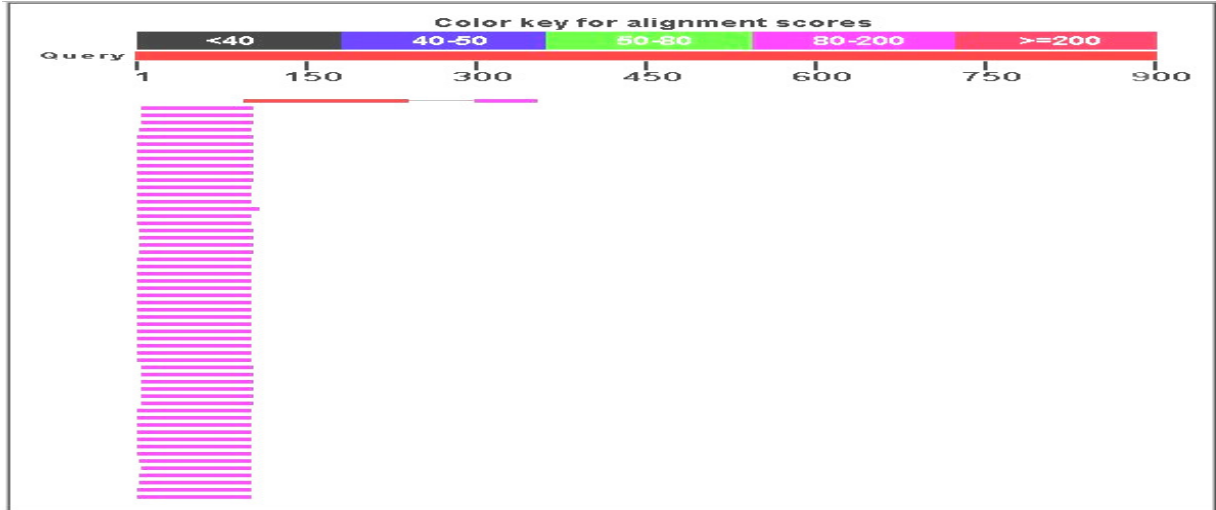
nucleotide blast	Search a nucleotide database using a nucleotide query <i>Algorithms: blastn, megablast, discontinuous megablast</i>
protein blast	Search protein database using a protein query <i>Algorithms: blastp, psi-blast, phi-blast, delta-blast</i>
blastx	Search protein database using a translated nucleotide query
tblastn	Search translated nucleotide database using a protein query
tblastx	Search translated nucleotide database using a translated nucleotide query

a

b

c

Şekil 13 (a) NCBI veritabanında BLAST bölümünde farklı tarama kriterleri ve (b) dizilim karşılaştırması (b). Elips ile gösterilen bölge dizilimlerin girileceği, ince ok birden fazla dizilim karşılaştırılmasına olanak veren kriteri ve kalın ok ise dizilim benzerlik frekansının seçilimine olanak veren kriteri göstermektedir. (c) NCBI veri tabanında bir nükleotid diziliminin benzerlik araştırmasının başlatılması. Elips ile gösterilenler arama kriterleri, ok ile gösterilenler dizilimlerin girildiği ve aramanın başlatıldığı butonlardır



Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
XM_389641.1	Gibberella zeae PH-1 hypothetical protein partial mRNA	244	349	22%	6e-61	100%
FM242733.1	Thermococcus sp. AF1T20.11 partial 16S rRNA gene, isolate A	183	183	10%	1e-42	100%
FM242730.1	Thermococcus sp. AF1T6.12 partial 16S rRNA gene, isolate AF	183	183	10%	1e-42	100%
FM242729.1	Thermococcus sp. AF1T6.10 partial 16S rRNA gene, isolate AF	183	183	10%	1e-42	100%
FM242736.1	Uncultured archaeon partial 16S rRNA gene, isolate AEXO15n.	182	182	10%	5e-42	100%
AM921478.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone ST_37	182	182	11%	5e-42	98%
EU558534.1	Arabidopsis lyrata clone SINE9 transposon-insertion display ba	182	182	11%	5e-42	98%
EU558533.1	Arabidopsis lyrata clone SINE8 transposon-insertion display ba	182	182	11%	5e-42	98%
EU558532.1	Arabidopsis lyrata clone MITE7 transposon-insertion display ba	182	182	11%	5e-42	98%
EU558528.1	Arabidopsis lyrata clone CACTA2 transposon-insertion display	182	182	11%	5e-42	98%
EU558522.1	Arabidopsis lyrata clone Gypsy21 transposon-insertion display	182	182	11%	5e-42	98%
EU558521.1	Arabidopsis lyrata clone Gypsy20 transposon-insertion display	182	182	11%	5e-42	98%
HM211722.1	Uncultured rumen archaeon clone ALIQ-56 16S ribosomal RNA	180	180	11%	2e-41	98%
FN812775.2	Uncultured fungus genomic DNA containing 18S rRNA gene, IT	180	180	11%	2e-41	98%
FN562054.1	Uncultured Ascomycota genomic DNA containing 18S rRNA gei	180	180	11%	2e-41	98%
FN562053.1	Uncultured Ascomycota genomic DNA containing 18S rRNA gei	180	180	11%	2e-41	96%
FN562031.1	Uncultured Ascomycota genomic DNA containing 18S rRNA gei	180	180	11%	2e-41	98%
FN562027.1	Uncultured Ascomycota genomic DNA containing 18S rRNA gei	180	180	11%	2e-41	98%
FN552504.1	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTLCD2-10	180	180	11%	2e-41	99%
FN552493.1	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTLCD1-2	180	180	11%	2e-41	99%
FN552489.1	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTKKA2-11	180	180	11%	2e-41	99%
FN552486.1	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTKKA2-8	180	180	11%	2e-41	99%
EU558531.1	Arabidopsis lyrata clone MITE6 transposon-insertion display ba	180	180	11%	2e-41	98%
AM706708.1	Uncultured alpha proteobacterium partial 16S rRNA gene, clon	180	180	11%	2e-41	98%
AM706638.1	Uncultured cyanobacterium partial 16S rRNA gene, clone cyar	180	180	11%	2e-41	98%
AM706605.1	Uncultured Bacteroidetes bacterium partial 16S rRNA gene, ck	180	180	11%	2e-41	98%
AM706604.1	Uncultured Bacteroidetes bacterium partial 16S rRNA gene, ck	180	180	11%	2e-41	98%
AM706905.1	Uncultured cyanobacterium partial 16S rRNA gene, clone cvar	180	180	11%	2e-41	98%

>[gb|AY102584.1] [D] Gibberella zeae strain NRRL 28336 trichothecene gene cluster, partial sequence
Length=18401

Score = 1330 bits (720), Expect = 0.0
Identities = 720/720 (100%), Gaps = 0/720 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      TTCGCTCCACGGTTTCGTTTCATGAGAGGGGATGTGCGAGTCTGCAAGGGCACCAGAAAAGGA 60
Sbjct 3481    TTCGCTCCACGGTTTCGTTTCATGAGAGGGGATGTGCGAGTCTGCAAGGGCACCAGAAAAGGA 3540

Query 61      TGGATGACTTGGCCTCATGAGATTTGTTAGACAGGAACCTCCTCACCACCGCGGTCCTGAA 120
Sbjct 3541    TGGATGACTTGGCCTCATGAGATTTGTTAGACAGGAACCTCCTCACCACCGCGGTCCTGAA 3600

Query 121     TCTCATCTCGCATCTGGAGAAGATCACACACAGAAGGTGCGATCATGCGGATACAAGAGT 180
Sbjct 3601    TCTCATCTCGCATCTGGAGAAGATCACACACAGAAGGTGCGATCATGCGGATACAAGAGT 3660

Query 181     AAGGGAGGCGCTTCAGAAATGGTGACCAGACCAGGGAGGAAGCGTGCAAGATGGTAGATCT 240
Sbjct 3661    AAGGGAGGCGCTTCAGAAATGGTGACCAGACCAGGGAGGAAGCGTGCAAGATGGTAGATCT 3720

Query 241     TGGTAAGACCCAAGAAATCCGTGCGGAACGACAAAGTGGAAGTCGGGAAGACTGAGATAGT 300
Sbjct 3721    TGGTAAGACCCAAGAAATCCGTGCGGAACGACAAAGTGGAAGTCGGGAAGACTGAGATAGT 3780

Query 301     CGTTGTGCTTGCCATAGAATCGATTAGTGATGACATCGGCGGTCAAAGCACAAAAAGCAC 360
Sbjct 3781    CGTTGTGCTTGCCATAGAATCGATTAGTGATGACATCGGCGGTCAAAGCACAAAAAGCAC 3840

```

Şekil 14 NCBI veri tabanında araştırılan dizilime dizisel homoloji gösteren kayıtlı örneklerin benzerlik gösteren bölgelerinin, nükleotid sayılarının şekilsel (olarak farklı renkler ile) gösterimi (a), matematiksel değerler ile gösterimi (b) ve bir örnekleme ile gösterimi (c)

CLUSTALW
MAFFT
PRRN

[Help](#)

General Setting Parameters:

Output Format: CLUSTAL

Pairwise Alignment: ☒ FAST/APPROXIMATE ☐ SLOW/ACCURATE

Enter your sequences (with labels) below (copy & paste): ☐ PROTEIN ☒ DNA

Support Formats: FASTA (Pearson), NBRF/PIR, EMBL/Swiss Prot, GDE, CLUSTAL, and GCG/MSF

>NRRL6394

tacaaagccttgagaaccttgactcgaacttcgccaaggtgttccttcttgctggaatt

gccttggggttagccaacaatacgggctgagtcagtcgaatgtcgcccttggtggtgtca

taaagctcaatgtcgtgaagctcgcaatgcgagaaaggcgaggtacatctcagcaaaag

gccatactattgaaatgtagcaaggtgttctcctccaatcgagagtgccaataggcaaa

Or give the file name containing your query

Seq...

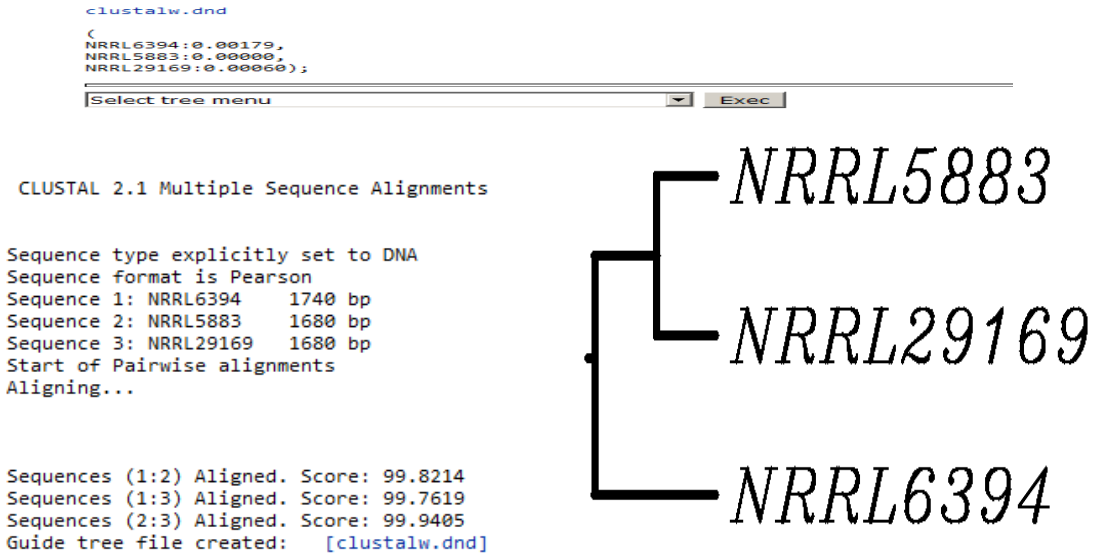
Execute Multiple Alignment
Reset

a

More Detail Parameters...

NRRL5883 NRRL29169 NRRL6394	AAAAGCACCGACAGTGGCGGGGTCTTGTGGTCTTGCAGAACCCAGCAGTATAGATGGT AAAAGCACCGACAGTGGCGGGGTCTTGTGGTCTTGCAGAACCCAGCAGTATAGATGGT AAAAGCACCGACAGTGGCGGGGTCTTGTGGTCTTGCAGAACCCAGCAGTATAGATGGT ***** AGTGTAGTAGGATGAATCCCTGATGTGAACCTTCGCGGGCGTTTACTCGGACGATGGGGCC AGTGTAGTAGGATGAATCCCTGATGTGAACCTTCGCGGGCGTTTACTCGGACGATGGGGCC AGTGTAGTAGGATGAATCCCTGATGTGAACCTTCGCGGGCGTTTACTCGGACGATGGGGCC ***** TTGAGGATGTGATGGTCAGCGTTTGTGTTGTACAAGTTGGATCTCTGCACATCTTACCCT TTGAGGATGTGATGGTCAGCGTTTGTGTTGTACAAGTTGGATCTCTGCACATCTTACCCT TTGAGGATGTGATGGTCAGCGTTTGTGTTGTACAAGTTGGATCTCTGCACATCTTACCCT ***** ATTTATCGTGATCTTGGAGATCTCCAGAGATATTGGCCATCCCGGATGACTTCATGGT ATTTATCGTGATCTTGGAGATCTCCAGAGATATTGGCCATCCCGGATGACTTCATGGT ATTTATCGTGATCTTGGAGATCTCCAGAGATATTGGCCATCCCGGATGACTTCATGGT ***** AGAACTCAAGGTAGGGTCCAATGGCAGCGAGCTTTGGTCCCGGGATCTTTCTCAGTGGGT AGAACTCAAGGTAGGGTCCAATGGCAGCGAGCTTTGGTCCCGGGATCTTTCTCAGTGGGT AGAACTCAAGGTAGGGTCCAATGGCAGCGAGCTTTGGTCCCGGGATCTTTCTCAGTGGGT ***** GCAAGTACAGGTTGTAAAAGCAGGAAGAGAGGAAGTAGATAACAGTCGATGCTGCGAAAA GCAAGTACAGGTTGTAAAAGCAGGAAGAGAGGAAGTAGATAACAGTCGATGCTGCGAAAA GCAAGTACAGGTTGTAAAAGCAGGAAGAGAGGAAGTAGATAACAGTCGATGCTGCGAAAA ***** TCCAGCAACATGGCTGACGGGGATGTTGAGCAAGCTCTTGATCCAATCTTGGTCA---- TCCAGCAACATGGCTGACGGGGATGTTGAGCAAGCTCTTGATCCAATCTTGGTCA---- TCCAGCAACATGGCTGACGGGGATGTTGAGCAAGCTCTTGATCCAATCTTGGTCAATCA *****
-----------------------------------	---

b



c

d

Şekil 15 (a) CLUSTALW analizi için dizilimlerin yüklenmesi ve kriterlerin seçilimi, (b) *F. graminearum* türüne ait üç irkin (NRRL5883, NRRL29169 ve NRRL6394) *tri4* gen dizilimlerinin karşılaştırılması, (c), yüzde benzerlik değerlerinin verildiği benzerlik matrisi (d) UPGMA'ya göre oluşturulan dendrogram

SONUÇ

Biyoinformatik araçların sistemli ve amaca yönelik şekilde kullanımı, moleküler mikrobiyoloji alanındaki araştırmalara büyük ivme kazandırdı. Biyoinformatik alanındaki olumlu gelişmeler, özellikle doğadaki izolatlarında yüksek çeşitlilik görülen ve sadece bitkileri değil aynı zamanda ürettikleri mikotoksinleri ile hayvan ve insanları da olumsuz etkileyen *F. graminearum* türünde çok sayıda araştırmayı yapılabilir hale getirdi. Bu derlemede *F. graminearum* türünün ürettiği en önemli mikotoksin olan trikotesenlerin üretiminden sorumlu gen kümesinde yer alan ve toksin üretimi için anlatımı gerekli olan *tri4* geni üzerinden biyoinformatik araçların kullanımı belirli bir sistematik dahilinde gösterildi. Biyoinformatik araçların bu derlemede bahsedildiği şekilde kullanımı sadece patojen mikroorganizmalar için değil bilim insanlarının ilgi odağı haline gelmiş diğer tüm organizmalar ile gerçekleştirilecek çalışmalar için de büyük önem taşımaktadır. Bu derlemede çalışmasındaki basamaklar izlenerek sadece mikroorganizma genomlarında değil diğer organizma genomlarında da biyoinformatik araçların kullanılmasını gerçekleştirilebilir.

KAYNAKLAR

- 1.Gerstein, M. 1999. Bioinformatics: Introduction, Yale University, 1-21, <http://bioinfo.mbb.yale.edu/mbb452a>.
- 2.Luscombe, N.M., Greenbaum, D., Gerstein, M. 2001. What is Bioinformatics? A Proposed Definition and Overview of the Field. *Methods of Information in Medicine*, 40: 346-358.
- 3.Polat, M., Karahan, A., G. 2009. Multidisipliner yeni bir bilim dalı: biyoinformatik ve tıpta uygulamaları. *S.D.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 16(3): 41-50.
- 4.Tisdall, J. 2001. Beginning perl for bioinformatics. O'Reilly, Sebastopol, 0-596-00080-4.
- 5.Özer, N., Soran, H. 1991. *Fusarium* species of Turkey. *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 6, 259-271.
- 6.Goswami, R.S., Kistler, H.C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crop. *Molecular Plant Pathology*, 5(6), 515-525.
- 7.Bottalico, A. ve Perrone, G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 611–624.
- 8.Desjardins, AE, Proctor, RH. 2007. Molecular biology of *Fusarium* toxins. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 47–50.
- 9.Foroud, N.A. ve Eudes, F. 2009. Trichothecenes in cereal grains. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 147–173.
- 10.Miedaner, T., Schilling, A.G., Geiger, H.H. 2001. Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries. *Journal of Phytopathology*, 149, 641-648.
- 11.Toth, B., Mesterhazy, A., Nicholson, P., Teren, J., Varga, J. 2004. Mycotoxin production and molecular variability of European and American isolates of *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 587-599.

12. Miedaner, T., Cumagun, C.J.R., Chakraborty, S. 2008. Population genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*. *Journal of Phytopathology*, 156, 129-139.
13. Cuomo, C.A., Guldener, U., XU, J.R., Trail, F., Turgeon, B.G., Pietro, A.D., Walton, J.D., Ma, L.J., Baker, S.E., Rep, M., Adam, G., Antoniw, J., Baldwin, T., Calvo, S., Chang, Y.L., Decaprio, D., Gale, L.R., Gnerre, S., Goswami, R.S., Kosack, K.H., Harris, L.J., Hilbrun, K., Kennell, J.C., Kroken, S., Magnuson, J.K., Mannhaupt, G., Mauceli, E., Mewes, H.W., Mitterbauer, R., Muehlbauer, G., Munsterkotter, M., Nelson, D., O'donnell, K., Quellet, T., Qi, W., Quesneville, H., Roncero, M.I.G., Seong, K.Y., Tetko, I.V., Urban, M., Waalwijk, C., Ward, T.J., Yao, J., Birren, B.W., Kistler, H.C.. 2007. The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science*, 317, 1400-1402.
14. Trail, F. 2009. For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiology*, 149, 103-110.
15. Saharan, M.S., Kumar, J., Nagarajan, S. 2004. Fusarium head blight (FHB) or head scab of wheat- a review. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 3, 255-268.
16. Haratian, M., Sharifnabi, B., Alizadeh, A., Safaie, N. 2008. PCR analysis of the *Tri13* gene to determine the genetic potential of *Fusarium graminearum* isolates from Iran to produce nivalenol and deoxynivalenol. *Mycopathologia*, 166, 109–116.
17. Marin, P., Jurada, M., Magan, N., Vazquez, C., Jaen, M. T.G. 2010. Effect of solute stress and temperature on growth rate and *tri5* gene expression using real time RT-PCR in *Fusarium graminearum* from Spanish wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 169-174.
18. Yörük, E. ve Albayrak, G. 2012. Chemotyping of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by PCR Assay. *Mycopathologia*, 173, 53-61.
19. Broad Institute, [online], *Fusarium* comparative database, http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html, [Ziyaret Tarihi: 06.06.2012].
20. Munich Information center for protein sequences, [online], *Fusarium graminearum* genome database, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/fusarium>, [Ziyaret Tarihi: 06.06.2012].
21. National Center for Biotechnology Information, [online], nucleotide, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, [Ziyaret Tarihi: 07.06.2012].
22. Rozen, S., Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, 132: 365-386.
23. Primer3, [online], primer design, <http://frodo.wi.mit.edu/>, [Ziyaret Tarihi: 11.06.2012].
24. Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M., Dveksler, G.S. 1993. Central concepts for PCR primer design. *Genome ResEARCH*, 3: 30-37.
25. Thermo scientific, [online], product information, <http://www.thermoscientificbio.com/qpcr-master-mixes-and-assays/maxima-probe-qpcr-master-mixes/?redirect=true>, [Ziyaret Tarihi: 11.06.2012].

26. Manthey, J., A. 2005. mFold, Delta G, and melting temperature: what does it mean, Integrated DNA Technologies, 1-8.
27. Integrated DNA Technologies, [online], oligoanalyzer, <http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>, [Ziyaret Tarihi: 11.06.2012].
28. Technelysium, [online], software for DNA sequencing, <http://technelysium.com.au/>, [Ziyaret Tarihi: 11.06.2012].
29. Yörük, E. ve Albayrak, G. 2013. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by using random amplified polymorphic DNA. Genetics and Molecular Research, Basımda.
30. Bioinformatics and molecular analysis section (bimas), [online], redseq sequence conversion, <http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/readseq/>, [Ziyaret Tarihi: 07.06.2012].
31. Dana-Farber Cancer Institute- molecular biology core facilities, [online], oligo calculator, <http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligocalc.html>, [Ziyaret Tarihi: 11.06.2012].
32. Restriction mapper, [online], restriction mapping, <http://www.restrictionmapper.org/>, [Ziyaret Tarihi: 11.06.2012].
33. MRC social, genetic and developmental psychiatry centre, [online], <http://sgdp.iop.kcl.ac.uk>, [Ziyaret Tarihi: 11.06.2012].
34. National Center for Biotechnology Information, [online], sequin—a DNA sequence submission and update tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/Sequin/>, [Ziyaret Tarihi: 15.06.2012].
35. National Center for Biotechnology Information, [online], ORF finder, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>, [Ziyaret Tarihi: 15.06.2012].
36. National Center for Biotechnology Information, [online], screen a sequence using vecscreen, www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html, [Ziyaret Tarihi: 15.06.2012].
37. National Center for Biotechnology Information, [online], blast, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, [Ziyaret Tarihi: 07.06.2012].
38. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs, Nucleic Acid Research., 17(25), 3389-3402.
39. Embnet, [online], clustalw, <http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>, [Ziyaret Tarihi: 10.06.2012].
40. Genomenet, [online], multiple sequence alignment by clustalw, <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>, [Ziyaret Tarihi: 10.06.2012].