

DEOKSİNİVALENOL ÜRETİMİNDEKİ POTANSİYEL FARKLILIĞIN ÇOKLU HİZALAMA ANALİZLERİ İLE İNCELENMESİ

Emre Yörük^{1*}, Gülşen Uz²

ÖZET

Fusarium cinsi tarafından üretilen trikotesen B sınıfına ait deoksinivalenolün üretimiyle ilişkili *tri5* gen kümesi 12 genden oluşmaktadır. Gen kümesi dışındaki 3 ilave gen ayrıca toksin sentezinde iş görmektedir. Mevcut veritabanlarındaki *tri5* gen kümesinin dizilim bilgileri incelendiğinde yüksek düzeyde bir dizisel çeşitlilik söz konusudur. Bu çalışmada deoksinivalenol üretimindeki çeşitlilik, çoklu nükleotid dizilim homolojisi ve filogenetik çeşitlilik araştırmaları yapılarak, iki farklı yaklaşım ile analiz edildi. Birinci yaklaşımda, gen kümesi ve özgün gen dizilim bilgileri baz alındı ve genetik çeşitlilik değerlendirildi. Yapılan analizler sonucunda $0,147 \pm 0,02$ arasında gen kümesi düzeyinde ortalama bir genetik çeşitlilik ve $0,034 \pm 0,004$ ile $0,147 \pm 0,01$ arasında değişen özgün gen bazında genetik varyasyon belirlendi. İkinci yaklaşımda ise; *F. culmorum* üzerinde geliştirilen *tri6-tri5* intergenik bölge dizisel çeşitliliğine dayalı deoksinivalenol üretim miktar farklılığı analizi, üç farklı *F. graminearum* ve birer *F. dactylidis*, *F. pseudograminearum*, *F. cerealis* ve *F. lunosporum* ırkına adapte edildi. Yüksek toksin ürettiği bilinen ırkların, yüksek toksin üreten referans *F. culmorum* ırklarıyla aynı alt kümede, NIV üreten ve diğer türlere ait ırkların ise az toksin üreten referans *F. culmorum* ırklarıyla aynı alt kümede yer aldığı belirlendi. Çalışmadan elde edilen veriler, biyoinformatik araçların trikotesen üretimindeki farklılıkların doğru analizinde kritik öneme sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Biyoinformatik, Deoksinivalenol, *Fusarium* sp., *tri5* gen kümesi, çoklu homoloji analizi

GİRİŞ

Deoksinivalenol (DON) özellikle tahılların, *Fusarium* cinsine ait bitki patojeni türler tarafından enfekte olması sonucu biriktiği bilinen önemli bir mikotoksindir. Arpa, buğday ve mısır bu mikotoksinin en sık biriktiği konak bitkidir. *Fusarium graminearum* tür kompleksi üyeleri ve *F. culmorum* türleri ise dünya genelinde bu toksin tipini en sık ürettiği belirlenen patojenlerdir (1-3).

¹ Yrd. Doç. Dr., İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Zeytinburnu, İstanbul. ² Doktora öğr., İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Zeytinburnu, İstanbul.

*Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: emre.yoruk@yeniyuzyil.edu.tr

Seskuiterpenoit yapıdaki mikotoksin sıklıkla asetilenmiş türevlerinden birisi ile birlikte üretilmektedir: 3-asetildeoksinivalenol (3-ADON) ve 15-asetildeoksinivalenol (15-ADON). Bu iki kemotipin dağılımları patojenin türü, konak türü ve coğrafik bölge ve diğer bazı faktörlere göre değişmektedir (4, 5). 15-ADON profilinin *F. culmorum* ve *F. austroamericanum* türlerine ait izolatlarda saptanmaması ya da *F. graminearum sensu stricto* (*Fgss*) izolatlarında her iki mikotoksininde üretilmesi ve arpa, buğday ve mısırdaki enfeksiyona yol açması, trikotesen üretim profilleri açısından önemlidir. Ayrıca bazı izolatlar tarafından her iki asetil türevini birlikte üretebildiği de rapor edilmiştir ve bu verilere çoğunlukla kromatografik uygulamalar ile ulaşılabilmektedir (6-9). Mikotoksinlerin asetil türevlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli belirlenmesi, *in vitro* ve *in planta* açıdan değerlendirme yapıldığı zaman ön bilgi sunmaktadır. Transkriptomik ve metabolomik düzeydeki çalışmalar genomik temelli kemotiplendirme çalışmalarını tamamlayıcı niteliktedir. Üç basamağın bir arada gerçekleştirilmesinde PZR, gerçek zamanlı PZR ve ince tabaka kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve benzeri çeşitli kromatografik uygulamalar kullanılmaktadır (10-14). Ancak günümüzde PZR temelli uygulamalar kısa sürede, kesin ve güvenilir sonuç verdiği için kemotip çeşitlilik analizlerinde PZR sıklıkla tercih edilmektedir.

Deoksinivalenol ve diğer B sınıfı trikotesenlerin biyosentezinden *tri5* gen kümesi sorumludur. Gen kümesi, üç farklı kemotipe ait üç *Fgss* ırkında tamamen dizilenmiştir ve veritabanlarında kayıt altına alınmıştır. Nivalenol (NIV) üreten 88-1, 3-ADON üreten F15 ve 15-ADON üreten H-11 ırklarında gen kümesi toplam boyutlarının sırasıyla 30159, 30197 ve 27022 baz çifti olduğu saptanmıştır (15-17). Gen kümesi iki açıdan ciddi derecede genetik çeşitlilik göstermektedir. Birincisi, bazı genlerin belirli kemotiplerde yalancı gen olarak taşınması ya da tamamen silinmesi. NIV kemotipindeki izolatlarda *tri7* ve *tri13* genleri inaktif yalancı genler olarak taşınırken, 15-ADON kemotipinde bu genler aktiftir. Buna karşın *tri7* geni 3-ADON kemotipinde tamamen silinmiştir (17-19). Genetik çeşitliliğe neden olan ikinci olgu ise, gerek farklı kemotipteki gerekse de aynı kemotipteki, aynı veya farklı türe ait izolatlarda, gen başına %10'un üzerine ulaşabilen dizisel çeşitliliktir. Bu noktada tekli nukleotid değişimleri, insersiyon ve delesyonlar çeşitliliğe yol açmaktadır. *tri5* gen kümesindeki yüksek düzeydeki çeşitlilik, dünya genelinde izolat ve ırkların hangi mikotoksini üretmeye yeteneğine sahip olduklarının doğru, güvenilir ve hızlı biçimde analizine olanak sağlamıştır. Bu amaçla gen kümesindeki üç kemotipin ayrımı, hedef *tri* genlerine özgün primer molekülleri tasarlanarak ya polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ürününün varlığına/yokluğuna göre ya da PZR ürün boyutundaki farklılığa göre gerçekleştirilmiştir (15, 16, 20-23). Böylece PZR temelli olarak kısa sürede güvenilir verilere ulaşılmıştır.

National Center for Biotechnology Information (NCBI) veritabanında günümüzde *F. graminearum* tür kompleksi başta olmak üzere çeşitli *Fusarium* türlerinde, *tri5* gen kümesi dizilim bilgileri kısmen veya tamamen yer almaktadır. A sınıfı toksin üreten *Fusarium* türlerine ait 50 kb'ın üzerinde boyuta sahip *tri5* gen kümesi varlığı, gen kümesindeki çeşitliliğin gösterilmesi açısından önemli bir veridir. Günümüzde çeşitli araştırmalar ile farklı coğrafik bölgelere ait izolatlardaki bazı *tri* genlerine ait dizilim bilgileri çıkarılmış ancak, çoklu homoloji araştırmaları az sayıda gen ile sınırlı kalmıştır (22). *tri101* geninin günümüzde genetik mühendisliği uygulamalarında kullanılması ve hatta tür düzeyinde ayrımı sağladığı düşünülürse, biyoinformatik araçlarla bu genlere ait karşılaştırma analizleri yeni moleküler düzeyde tetkiklerin

geliştirilmesi için önemlidir (24). Bakan ve diğ (20) tasarladıkları deney seti ile kemotiplendirme çalışmalarına farklı bir yaklaşım getirmişlerdir. *tri6-tri5* intergenik bölgesindeki dizisel çeşitliliğe göre 1 ppm ve üzerindeki deoksinivalenol üreten *F. culmorum* izolatlarını, düşük düzeyde toksin üretenlerden ayırmışlardır. N1-2/N1-2R primer seti yüksek deoksinivalenol üretenlerde 200 bç boyutunda amplikonlar verirken, düşük düzeyde toksin üretenlerde amplikon elde edilmemiştir. Durumun tam tersi düşük toksin üretenlerde 4056/3551 primer çifti kullanılarak 650 bç PZR ürünü elde edilerek sağlanmıştır. Bu şekilde mevcut kemotip belirleme çalışmalarına farklı bir yaklaşım geliştirilmiş, ancak bu uygulamanın diğer türlerdeki uygulanabilirliği incelenmemiştir. Bu çalışmada 88-1, H-11 ve F15 ırklarına ait *tri5* gen kümesinde total dizilim bilgisi gen delesyonları dahil olacak ve olmayacak şekilde çoklu homoloji araştırmaları ile incelendi. Farklı kemotiplerde korunmuşluk gösteren işlevsel veya işlevsel olmayan genler ayrı ayrı çoklu homoloji analizlerine tabi tutuldu. Ayrıca *tri6-tri5* intergenik bölgesinin genetik çeşitliliği ve dolayısıyla da deoksinivalenol üretim miktarlarının analizinin *Fgss*'da ve diğer türlerdeki uygulanabilirliği araştırıldı.

MATERYAL VE METOT

Nukleotid Dizilim Bilgileri

tri5 gen kümesinin tüm diziliminin araştırılmasında üç farklı kemotipteki *Fgss* referans ırklarına ait dizilim bilgileri kullanıldı. NIV üreten 88-1, 15-ADON üreten H-11 ve 3-ADON üreten F15 ırklarına ait *tri5* gen kümesi dizilim bilgisi Genbank'tan sağlandı.

İlgili ırkların aksesyon numaraları sırasıyla AF336365.2, AF336366.2 ve AB060689.1'dir. Bakan ve diğ. (20) tarafından geliştirilen yüksek ve az miktarda DON üretiminin ayırımına olanak sağlayan, PZR ve çoklu homoloji karşılaştırılması temelli analizin *Fgss* ve diğer bazı *Fusarium* türlerindeki uygulanabilirliğinin araştırılmasında ise, *tri6-tri5* intergenik bölgesine ait dizilimler Genbank'tan elde edildi. Bakan ve diğ. (20) tarafından veritabanına kayıt ettirilen, az veya çok DON ürettiği karakterize edilmiş 6 *F. culmorum* ırklarına (C1, K2, L2, N1, G1 ve M11) ait 4057-4322 bç boyutlarındaki *tri6-tri5* intergenik nukleotid dizilim bilgilerinin aksesyonları AF480834.1, AF480835.1, AF480836.1, AF480837.1, AY134892.1 ve AY134893.1'dir. DON üreten *F. dactylidis* NRRL 29380, *F. pseudograminearum* NRRL 28334, *F. cerealis* NRRL 25805 ve *F. lunosporum* NRRL 13393 ırklarına ait aksesyon numaraları sırasıyla KP057243.1, AY102583.1, AY102574.1 ve AY102568.1'dir.

Çoklu Hizalama Analizleri

tri5 gen kümesinin üç kemotipteki izolata ait aksesyon numaralarında mevcut bulunan ortak genler; *tri3*, *tri4*, *tri5*, *tri6*, *tri8*, *tri11*, *tri13* ve *tri12/tri102*, ayrı ayrı, ardışık sıralanmış ve tüm gen kümesi olarak çoklu homoloji analizine tabi tutuldu. Bir diğer yaklaşımda ise *tri6-tri5* intergenik bölgesine ait dizilim bilgileri homoloji araştırmaları ile analiz edildi. Bu amaçla ClustalW 2.1 yazılımı (25) kullanılarak, 6 *F. culmorum*, 3 *Fgss* ve birer *F. dactylidis*, *F. pseudograminearum*, *F. cerealis* ve *F. lunosporum* ırklarına ait yüzdesel benzerlik matrisi elde edildi ve filogenetik ağaçlar UPGMA temelli olarak çıkarıldı. N1-2/N1-2R ile 4056/3551 oligonukleotid primer

çiftlerinin 88-1, H-11 ve F15 referans ırklarıyla birlikte *F. dactylidis*, *F. pseudograminearum*, *F. cerealis* ve *F. lunosporum* türlerinde dizisel eşlenirliği NCBI veritabanı üzerinden BLASTN analizi ile araştırıldı.

Filogenetik Analizler

Çoklu homoloji analizleri sonucunda ortaya çıkan verilerin doğrulanmasında Mega 6.0 programı (26) kullanılarak hem *tri5* gen kümesi için hem de *tri6-tri5* intergenik bölgesi için filogenetik analiz gerçekleştirildi. Filogeni rökonstrüksiyonunda istatistiksel olarak maksimum olabilirlik, filogeni testinde 1000 tekrarlı özyükleme metodu ve substitüsyon modeli olarak da Tamura-Nei modeli kullanıldı. Filogenetik ağaçlar çıkarıldı ve özyükleme desteği yüzdesel olarak her gen veya gen kümesi için ayrı ayrı kaydedildi (27).

ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Fgss 88-1, H-11 ve F15 ırklarının GenBank'ta kayıtlı *tri5* gen kümesine ait tüm dizilim bilgisi çoklu homoloji temelli genetik ve filogenetik çeşitlilik analizlerine tabi tutuldu. Gen kümesinde yer alan ve üç ırkta da dolayısıyla da üç kemotipte de korunmuşluk gösteren sekiz genin, ayrı ayrı çoklu homoloji analizlerine göre genetik çeşitliliğin $0,034\pm0,004$ ile $0,147\pm0,01$ arasında değiştiği görüldü (Tablo 1).

Tablo 1. Sekiz *tri* genindeki maksimum olabilirlik temelli çeşitlilik analizi bulguları

Gen	Boyut (bç)	Ortalama çeşitlilik (%)	İdeal Model	BIC	InL
<i>tri3</i>	1763	$0,095\pm0,006$	Kimura-2-parametre	7177,186	-3571,446
<i>tri4</i>	1742	$0,034\pm0,004$	Hasegawa-Kishino-Yano	5875,880	-2907,975
<i>tri5</i>	1179	$0,061\pm0,007$	Kimura-2-parametre	4380,518	-2173,917
<i>tri6</i>	657	$0,05\pm0,007$	Kimura-2-parametre	2377,539	-1173,597
<i>tri8</i>	1311	$0,147\pm0,01$	Kimura-2-parametre	6053,950	-3010,420
<i>tri11</i>	1735	$0,078\pm0,006$	Kimura-2-parametre	6805,342	-3385,556
<i>tri102 /tri12</i>	1902	$0,099\pm0,006$	Kimura-2-parametre	7905,444	-3935,423
<i>tri13</i>	1503	$0,061\pm0,007$	Kimura-2-parametre	7419,219	-3692,782
Tüm gen kümesi	33117	$0,147\pm0,02$	Tamura-3-parametre	143783,745	-71857,739

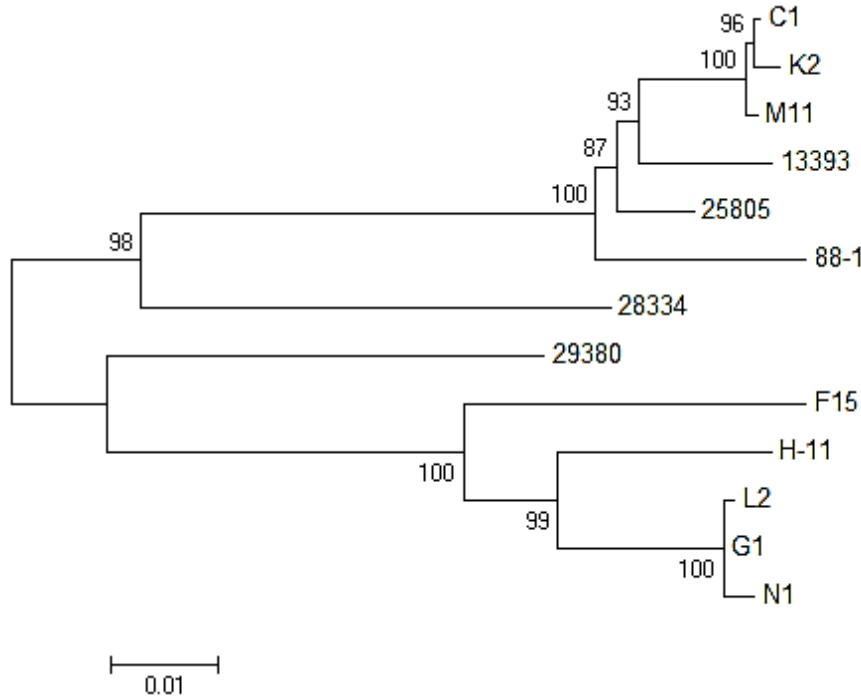
Delesyon ve genlerin çıkarıldığı maksimum olabilirlik analizlerinde, sadece *tri11* geni bakımından *Fgss* 88-1 ve F15 ırkları arasında anlamlı farklılık ($p<0,05$) saptandı. Verilere göre yüksek benzerlik düzeyi üç intron taşıyan *tri4* geninde görülürken, en yüksek çeşitlilik ise *tri8* geninde saptandı. Tüm gen kümesi değerlendirildiğinde ise, *Fgss* 88-1 ve H-11 ırkları arasında anlamlı farklılık olduğu ($p<0,05$), ortalama çeşitliliğin $0,147\pm0,02$ olduğu belirlendi. Ayrıca nükleotidlerin birbirlerine değişme olasılıklarına ait değerlerin 4,5378 ila 16,3572 arasında olduğu belirlendi (Tablo 2). Genler özgün olarak değerlendirildiğinde; korunmuşluk gösteren bu 8 gende kemotipe bağlı olarak dizisel çeşitlilik görülmekte ancak bilimsel olarak anlamlı farklılık toplamda 24 kombinasyondan (3 değerlendirme ile 8 gen) sadece birinde

saptanmıştır. Buna karşın NIV ve 15-ADON üreten ırkların total gen kümesi dizilim bilgisi değerlendirildiğinde ise aradaki farkın matematiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Bu durum pseudogen olması, tamamen silinmiş olması ya da ortak gen olarak GenBank'a kayıt edilmemesi sebebiyle değerlendirmeye alınmayan *tri7*, *tri9* ve *tri14* genlerinin meydana getirdiği genetik çeşitliliğin ve dolayısıyla da fenotipte ortaya çıkan farklı kemotiplerin oluşumunun açıklanmasında destekleyici nitelik taşımaktadır.

Tablo 2. Maksimum olabilirlik temelli nükleotid yer değişim tahmini oranları

Nükleotid	A	T	C	G
A	-	5,1434	4,5378	14,6588
T	5,2914	-	13,8531	4,7420
C	5,2914	15,7018	-	4,7420
G	16,3572	5,1434	4,5378	-

Dizisel çeşitliliğin türler arası yüksek düzeyde olduğu *tri6-tri5* intergenik bölgesinin çoklu homoloji analizleri 13 farklı ırka ait dizilim bilgisi kullanılarak gerçekleştirildi. Maksimum olabilirlik istatistiksel analizi ve 1000 tekrarlı özyükleme metodu filogeni testi bir arada değerlendirildiğinde, yüzdesel özyükleme destekleme değerinin %87 ila %100 arasında değiştiği (Şekil 1).



Şekil 1. 13 *Fusarium* ırkının *tri6-tri5* intergenik dizilim bilgisine göre oluşturulan filogenetik ağaç

InL (maksimum olabilirlik) değerinin -11727,302, BIC (ing., “Bayesian Information Criterion”) değerinin 23735,720 ve en uygun maksimum olabilirlik modelinin Tamura-3-parametresi (Tablo 3) olduğu belirlendi (26, 27).

Tablo 3. ClustalW 2.1. yazılımı ile elde edilen *tri6-tri5* intergenik bölgesine ait yüzdesel benzerlik matrisi

	<i>Fusarium</i> izolatlarının kodları												
	C1	K2	L2	N1	G1	M11	88-1	H-11	F15	29380	28334	25805	13393
C1	100												
K2	99.07	100											
L2	60.31	61.57	100										
N1	68.74	61.35	99.50	100									
G1	64.30	62.5	99.88	99.59	100								
M11	99.38	98.47	57.55	62.16	57.38	100							
88-1	95.44	94.85	70.13	59.85	70.33	95.41	100						
H-11	68.48	63.87	95.50	95.20	95.57	69.04	61.14	100					
F15	70.96	61.13	93.07	92.81	93.09	72.59	66.12	69.68	100				
29380	64.55	68.94	71.93	71.97	71.76	63.07	67.77	74.01	75.36	100			
28334	68.99	69.82	57.03	62.47	56.38	59.4	75.67	66.04	67.06	76.96	100		
25805	96.99	96.64	55.77	70.66	71.23	97.04	96.64	61.77	76.96	70.31	76.73	100	
13393	86.64	86.05	62.86	71.20	62.33	95.41	94.94	65.56	72.27	73.14	72.76	88.2	100

Filogenetik ağaç incelendiğinde iki farklı kümenin oluştuğu görülmektedir. Hem ClustalW 2.1 temelli UPGMA analizi hem de Mega 6.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilen maksimum olabilirlik analizleriyle oluşturulan filogenetik ağaçta (Şekil 1) yüksek düzeyde toksin üreten *F. culmorum* izolatları (L2, N1 ve G1) ile 1 ppm'in üzerinde DON ürettiği belirlenen *Fgss* H-11 ve F-15 ırklarının aynı kümede yer aldığı saptandı. Buna karşın NIV üreten *Fgss* 88-1 ırkı, az toksin üreten üç *F. culmorum* ırkı (C1, K2 ve M11) ve *F. dactylidis*, *F. pseudograminearum*, *F. cerealis* ve *F. lunosporum* türlerine ait ırkların aynı alt kümede bulundukları belirlendi. Bu durum benzerlik matrisi değerleri ile de desteklenmektedir (Tablo 3). Az toksin üreten *F. culmorum* izolatları kendi aralarında %98.47-99.38 benzerlik gösterirken, yüksek toksin üreten üç *F. culmorum* izolatu da benzer şekilde kendi aralarında değerlendirildiğinde, %99.5-99.88 benzerlik taşıdıkları belirlendi. Farklı bir açıdan değerlendirildiğinde NIV üreten (veya laboratuvar koşullarında eser miktarda DON üretebilen) *Fgss* 88-1 ırkı, düşük toksin üreten *F. culmorum* ırkları ile %94.85 ile 95.44 arası benzerlik taşımaktadır. Deneysel olarak 1 ppm'in üzerinde DON ürettiği bilinen (15, 16, 17) *Fgss* H-11 ve F15 ırkları, *Fgss* 88-1 ırkının aksine yüksek miktarda toksin üreten *F. culmorum* ırkları ile aynı alt kümede yer aldı ki bu durum Bakan ve diğ (20) tarafından geliştirilen uygulamanın biyoinformatik temelli DON üretim potansiyellerinin araştırılmasında kullanılabilir bir uygulama olduğunu göstermektedir.

Yüksek ve az miktarda DON üretiminin analizine olanak veren N1-2/N1-2R ile 4056/3551 primer çiftlerinin dizilimleri, sırasıyla yüksek miktarda DON üreten L2, N1 ve G1 *F. culmorum* ırkları ile az miktarda DON üreten *F. culmorum* ırkları C1, K2 ve M11'in, *tri6-tri5* intergenik bölgesine birebir eşlik (E değeri: 0, maksimum benzerlik: %100) göstermektedir. Yüksek miktarda DON ürettiği bilinen ancak Bakan ve diğ. (20) tarafından geliştirilen yaklaşım ile incelenmeyen H-11 ve F15 izolatları da benzer şekilde N1-2/N1-2R primer çiftleri ile birebir eşlik göstermektedir. Buna karşın bu iki izolat yüksek DON üreten *F. culmorum* izolatlarında olduğu gibi 4056/3551 primer çiftleri ile PZR ürünü vermeme potansiyeli taşımaktadır. Benzer durum 4056/3551 primer çiftinin dizilim bilgisi ile *Fgss* F15, *F. dactylidis*, *F. pseudograminearum*, *F. cerealis* ve *F. lunosporum* türlerine ait ırkların *tri6-tri5* intergenik dizilim bilgisi

arasında da görülmektedir. Bu primerler az DON üreten *F. culmorum* ırklarıyla yüksek dizilim benzerliği taşıyan diğer *Fusarium* türlerine ait ırklarla yüksek düzeyde benzerlik taşımaktadır. Bu sekiz ırk N1-2/N1-2R primer çifti ile potansiyel olarak PCR ürününü vermememe potansiyeli taşımaktadır. Bu durum total *tri6-tri5* intergenik dizilim bölgesine ait 13 ırkta gerçekleştirilen çoklu dizisel karşılaştırma analizleri ile benzerlik taşımakta ve geliştirilen sentetik oligonukleotid primer molekülleriyle DON üretim miktarlarının PZR ve biyoinformatik temelli ayırımına olanak sağladığını göstermektedir. Elde edilen veriler biyoinformatik temelli gerçekleştirilen moleküler yaklaşımların ileri biyoinformatik analizlerinde etkin bir biçimde kullanılabileceğini göstermektedir. Bu çalışma ile *Fusarium* ırklarının evrimsel düzeyde geçirdikleri kısmi değişimleri ve dolayısıyla da muhtemel fenotipik karakterlerine olan yansımaları, biyoinformatik temelli olarak öngörü ve değerlendirme analizleri bir arada kullanılarak incelenmiştir.

SONUÇ

Bu çalışma ile DON mikotoksininin üretiminden sorumlu *tri5* gen kümesindeki genetik ve filogenetik çeşitlilik biyoinformatik düzeyde araştırıldı. Farklı trikotesen kemotiplerinin dolayısıyla da farklı fenotiplerin oluşmasında, DNA dizi temelli varyasyonların etkin rol oynadığı gösterildi. Yüksek ve düşük miktarda DON üreten *Fusarium culmorum* ırklarına özgü mevcut analiz metodunun diğer *Fusarium* türlerinde uygulanabilirliği gösterildi. Yüksek miktarda ve düşük miktarda DON üreten veya bu potansiyele sahip ırkların birlikte kümelandikleri görüldü. Ayrıca *tri6-tri5* intergenik bölgesi ile *tri5* total gen kümesine ait tür içi ve türler arası genetik çeşitliliğin benzer bir profile sahip oldukları görüldü. Elde edilen veriler biyoinformatik araçların, *Fusarium* türlerinin kemotip profillerinin detaylandırılmasında kuvvetli ve güvenilir araçlar olduğunu göstermesi açısından önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Parry, D.W., Jenkinson, P., McLeod, L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-a review. Plant Pathol. 44:207-238.
2. Bai, G., Shaner, G. 2004. Management and resistance in wheat and barley to fusarium head blight. Annu. Rev. Phytopathol. 42:135-161.
3. Champail, A., T. Dore and J.F. Fourbet. 2004. Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by Fusarium in wheat grains. Plant Sci. 66: 1389-415.
4. Saharan MS, Kumar J, Sharma AK and Nagarajan S. 2004. Fusarium head blight (FHB) or head scab of wheat-A review. Proc. Indian Natl. Sci. Acad. 3: 255-268.
5. Miedaner, T., Cumagun, C.J.R., Chakraborty, S. 2008. Population genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*. J. Phytopathol. 156:129-139.
6. Carter JP, Rezanoor HN, Holden D, Desjardins AE, et al. 2002. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. Eur. J. Plant Pathol. 108: 573-583.

7. Castañares E, Albuquerque DR, Dinolfo MI, Pinto VF, Patriarca A, Stenglein SA. 2014. Trichothecene genotypes and production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina. *Int J Food Microbiol.* 179:57–63.
8. Gilbert J., Abramson D., McCallum B., Clear R. 2002. Comparison of Canadian *Fusarium graminearum* isolates for aggressiveness, vegetative compatibility, and production of ergosterol and mycotoxins. *Mycopathology*, 153: 209-215.
9. Salas B., Steffensson B.J., Casper H.H., Tacke B., 1999. *Fusarium* species pathogenic to barley and their associated mycotoxins. *Plant Dis.* 83: 667-674.
10. Yoruk E., Aylin G., Albayrak G. 2014. Class B Trichothecene Chemotyping in *Fusarium* Species By PCR Assay. *Genetika.* 46(3): 661-669.
11. Yörük E and Albayrak G. 2012. Chemotyping of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by PCR assay. *Mycopathologia.* 173: 53-61.
12. Chandler, E.A., Simpson, D.R., Thomsett, M.A., Nicholson, P. 2003. Development of PCR assays to *tri7* and *tri13* trichothecene biosynthetic and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiol.Mol. Plant Pathol.* 62:355-367.
13. A.C. Bily, L.M. Reid, M.E. Savard, R. Reddy, B.A. Blackwell, C.M. Campbell, A. Krantis, T. Durst, B.J.R. Philogéne, J.T. Arnason, C. Regnault-Roger. 2004. Analysis of *Fusarium graminearum* mycotoxins in different biological matrices by LC/MS. *Mycopathologia* 157: 117–126.
14. Cvetnic, Z., S. Pepeljnjak, M. Šegvic. 2005. Toxigenic potential of *Fusarium* species isolated from nonharvested maize. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 56: 275-280.
15. Lee, T., Oh, D.-W., Kim, H.-S., Lee, J., Kim, Y.-H., Yun, S.-H. and Lee, Y.-W. 2001. Identification of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(7): 2966-2972.
16. Lee, T., Han, Y.-K., Kim, K.-H., Yun, S.-H. and Lee, Y.-W. 2002. *Tri13* and *Tri7* determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2148-2154.
17. Kimura, M., Tokai, T., O'Donnell, K., Ward, T.J., Fujimura, M., Hamamoto, H., Shibata, T., Yamaguchi, I. 2003. The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. *FEBS Lett.* 539:105-110.
18. Hammond-Kosack, K., Urban, M., Baldwin, T., Daudi, A., Rudd, J., Keon, J., Lucas, J., Maguire, K., Korniyukhin, D., Jing, H.C., Bass, C., Antoniw, J. 2004. Plant pathogens: how can molecular genetic information on plant pathogens assist in breeding disease resistant crops. *New directions for a diverse planet* 44:1-18.
19. Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., Fujimura, M. 2007. Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene pathways gene and evolution. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71:2105-2123.
20. Bakan, B., Delville, C.G., Pinson, L., Richard-Molard, D., Fournier, E., Brygoo, Y. 2002. Identification of *Fusarium culmorum* strains producing large and small amounts of deoxynivalenol. *App. Environ. Microb.* 68(11):5472-5479.

21. Jennings, P., Coates, M.E., Walsh, K., Turner, J.A., Nicholson, P. 2004. Determination of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. *Plant Pathol.* 53:643-652.
22. Ward TJ, Bielawski JP, Kistler HC, Sullivan E, O'Donnell K. 2002. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:9278–9283.
23. Wang, JH., Li HP., Qu B., Zhang JB., Huang T., Chen F F., Liao YC. 2008. Development of a generic PCR detection of 3-acetyldeoxynivalenol-, 15-acetyldeoxynivalenol- and nivalenol chemotypes of *Fusarium graminearum* clade. *Int. J. Mol. Sci.* 9(12): 2495-2504.
24. O'Donnell K., Ward T., Abera D., Kistler H.C., Aoki T., Orwig N., Kimura M., Bjørnstad Å., Klemsdal SS. 2008. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genetics and Biology* 45:1514-1522.
25. Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weightmatrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.
26. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
27. Nei M, Kumar S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York