



Geliş(Received) :23.06.2021
Kabul(Accepted) :01.09.2021

Araştırma Makalesi
Doi: 10.30708.mantar956602

Saleplerden (Orkide) İzole Edilen Endofitik *Fusarium* spp.'nin Moleküler Tanımlanması ve Filogenetik Çeşitlilik Analizleri

Yüksel GEZGİN^{1,2}

*Sorumlu yazar: yukselgezgin@gmail.com, yuksel.gezgin@ege.edu.tr

¹ Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir

² Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Moleküler Tıp Laboratuvarı, İzmir

^{1,2}Orcid ID: 0000-0001-5812-1882/ yukselgezgin@gmail.com

Öz: Türkiye'nin endemik bitkisi Salep (orkide) kök ve yumrularından izole edilmiş endofitik fungus türlerinin moleküler teknikler kullanılarak tanımlanması son derece önemlidir. Bu çalışmada Salep (*Orchid*) bitkisinden izole edilen endofitik *Fusarium* Link türlerinin tanımlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla *beta-tubulin* (β -*tubulin*: *benA*), *Internal Transcribed Spacer* (ITS) ve *Translation Elongation Factor* (EF) gen bölgeleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile özel primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. Daha sonra tüm PZR ürünlerinin dizi analizi yapılmış ve GenBank'daki diğer ilgili diziler ile karşılaştırılmıştır. *Fusarium* izolatları tür düzeyinde *Fusarium redolens* Wollenw. (n=7) ve *Fusarium oxysporum* Schlecht. (n=3) olarak tanımlanmışlardır. Filogenetik analizler the β -*tubulin*, ITS ve EF gen dizilerini temel alarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, ilk olarak üç farklı gen bölgesinin çoğaltılması içeren moleküler tanımlama yöntemleri kullanılarak Türkiye'deki saleplerden (orkidelerden) izole edilen endofitik *Fusarium* spp. izolatları tür düzeyinde tanımlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Salep, Orkide, Endofitik fungus, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, *Fusarium redolens*, *Fusarium oxysporum*

Phylogenetic Diversity Analysis and Molecular Identification of Endofitic *Fusarium* spp. Isolated From Salep (*Orchid*)

Abstract: The endophytic fungi species isolated from Salep (*Orchid*) roots and tubers, endemic plants of Turkey, their identification using the molecular techniques is utmost important. The aim of the present study was to identify the species of endophytic *Fusarium* Link isolated from Salep (*Orchid*). For this purpose, *beta-tubulin* (β -*tubulin*: *benA*), *Internal Transcribed Spacer* (ITS) and *Translation Elongation Factor* (EF) gene regions were amplified by Polymerase Chain Reaction using specific primers. Then, all PCR products were sequenced and compared with the other related sequences in GenBank. The *Fusarium* isolates were identified to species level as *Fusarium redolens* Wollenw. (n=7) and *Fusarium oxysporum* Schlecht. (n=3). The phylogenetic analysis was carried out based on the β -*tubulin*, ITS and EF gene sequences. In the present study, *Fusarium* spp. isolated from Saleps (*Orchids*) in Turkey were firstly identified by molecular identification methods including amplification of the three different gene region.

Key words: Salep, Orchid, Endophytic fungi, Polymerase Chain Reaction, *Fusarium redolens*, *Fusarium oxysporum*

Giriş

Endofitik funguslar ilk olarak 1904'de Freeman tarafından *Lolium temulentum* Linnaeus, bitkisinden izole edilmiştir ve daha sonrasında konu ile ilgili çalışmalar devam etmiştir. Son olarak Antartik yosununda (Melo vd., 2014) tanımlanmış olan endofitik funguslar yüzyılı aşkın

bir süredir botanikçi, ekolog, mikolog, bitki patoloğu ve farmakologların dikkatini çekmeye devam etmektedir. Neredeyse 300.000 bitkinin bir veya birden fazla endofit barındırdığı tahmin edilmektedir.

Günümüzde endofitik funguslardan rapor edilen pek çok antifungal (Tan ve Zou, 2001) antibakteriyel



bileşik (Deshmukh vd., 2015) bulunmaktadır. Endofitik funguslar ürettikleri primer ve sekonder metabolitler ile endüstriyel biyoteknolojide yaygın olarak kullanılan önemli bir endüstriyel mikroorganizma grubudur. Fungal sekonder metabolitler her ne kadar onu üreten organizmanın yaşaması için elzem olmasa da diğer organizmalara karşı rekabette üstünlük sağlanması veya UV radyasyonuna direnç geliştirme gibi durumlarda savunma mekanizmasına oldukça katkıda bulunduğu bilinmektedir (Osborn, 2010). Ülkemizin sahip olduğu oldukça geniş biyoçeşitliliği gözönünde bulundurulacak olursa değişik kaynaklardan izole edilen endofitik funguslar son derece önem taşımaktadır.

Orkidelerin bağımlı oldukları simbiyotik yaşam şekli (orkid mikoriza olarak isimlendirilmektedir) oldukça dikkat çekmektedir. Orkide kök hücreleri içerisinde yer alan fungal hifler bitkiye topraktan mineral ve su temin ederler. Ülkemizde, toplam 24 cins ve 90 tür orkide türü bulunmaktadır (Sandal ve Söğüt, 2010; Sandal Erzurumlu ve Doran, 2011). Türkiye'nin oldukça önemli olan bu endemik bitkileri koruma altına alınmalıdır. Bununla beraber nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya olduğu için bu türlerin çimlendirilmesinde simbiyotik döngüde yer alan veya Ülkemiz salep kök ile yumrularından elde edilmiş mikorizal ve endofitik funguslarla ilgili detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Orkid mikorizal ve endofitik funguslar orkide tohum çimlenmesi ve vejetatif büyüme için gereklidir (Jiang vd., 2018). Literatürde Orkidelerden izole edilen *Fusarium oxysporum* KB-3 türü ile yapılan çalışmada bu türün *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb.f. orkide tohumlarını çimlenmesini teşvik ettiği ve orkid mikorizal fungus gibi davranış sergilediği belirlenmiştir (Jiang vd., 2018). Bunun yanı sıra Endofitik *Fusarium* türleri biyolojik aktiviteye sahip sekonder metabolitlerin zengin bir kaynağıdır. Bu metabolitlerin (mikotoksin gibi) bir kısmı insanlar üzerinde zararlı etkilere sahip olup bazıları ise ilaç geliştirme, biyoteknolojik ürün (hormon, pigment vs) elde etme açısından oldukça büyük bir potansiyele sahiptir (Hansen vd., 2015). Orkid-ilişkili *Fusarium proliferatum* Matsush.'un gibberellin üreticisi olduğu bilinmektedir (Tsavkelova vd., 2008). Bitki büyümesini uyarıcı rolleri sebebiyle *Fusarium verticillioides* türü tarımda çay bahçeleri, bağcılık ve bahçecilikte yaygın kullanıma eğilimi göstermektedir. Bu sebeple bitki büyümesini teşvik etme yeteneğine sahip yeni fungal endofitlerin tanımlanması ve potansiyel sekonder metabolitlerin keşfi ile ilgili çalışmaların artırılması gerekmektedir. Bu endofitik funguslar ekonomik olarak son derece önemli olup aynı zamanda da fitopatojen ve insan patojenlerini de içerdiğinden sistematik olarak

doğru tanımlanmaları oldukça gerekli olan zorlu bir gruptur (O'Donnell vd., 2013). Bu sebeple tarımsal ve tıbbi olarak önemli endofitik *Fusarium* türlerinin karşılaştırmalı filogenetik ve genomik analizlerinin yapılması önemlidir.

Çalışmamızda Ülkemiz endemik bitki türü olan Salep (Orkide) bitkisinin kök ve yumrularından elde edilen endofitik *Fusarium* izolatlarının moleküler yöntemler kullanılarak tür düzeyinde tanımlanması ve filogenetik analizlerinin yapılması amaçlanmıştır. Bu amaçla üç farklı gen bölgesi (*beta-tubulin* (β -*tubulin*: *benA*), *Internal Transcribed Spacer* (*ITS*) ve *Translation Elongation Factor* (*EF*)) kullanılmıştır.

Bu çalışma sözkonusu bu endofitik funguslar ile salep yumrularının çimlendirilmesi konularında yapılacak ileri çalışmalara katkı sağlayacak bilgilere ulaşılması yanısıra biyoteknolojik öneme sahip potansiyel sekonder metabolitler açısından önem taşımaktadır.

Materyal ve Metot

Fungal izolatların aktivasyonu

Önceki çalışmalarda Salep (*Orchis sancta* Linneo ve *Ophrys fusca* Link) kök ve yumrularından elde edilmiş endofitik *Fusarium* izolatlarını (n=10 adet) içeren Malt Ekstrakt Agar (MEA) yatık tüplerinden MEA içeren petrilere üç nokta ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan petrilere 27°C 'de 5 gün süreyle aktivasyonu gerçekleştirilmiştir (Gezgin ve Eltem, 2009). Aktivasyon sonrası elde edilen miselyum kütlesinden 6 mm çapında plaklar alınarak doğrudan Malt Ekstrakt Broth (MEB) besiyeri içeren erlenlere aseptik koşullarda ekim yapılmıştır. Daha sonra erlenler 27°C 'de 120 rpm hızındaki çalkalayıcı inkübatörde 3 gün boyunca inkübe edilmiştir (Gezgin ve Eltem, 2009).

Genomik DNA izolasyonu

Bu çalışmada manuel bir genomik DNA izolasyon yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır (Liu vd., 2000). Bu amaçla MEB besiyeri içeren erlenlerin inkübasyonu sonrasında elde edilen miseller aseptik koşullarda filtrasyon ile besiyerinden ayrılmış ve genomik DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

PZR Çalışmaları

Genomik DNA izolasyonu sonrasında β *tubulin*, *ITS* ve *EF* geni olmak üzere üç farklı gen bölgesi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) işlemi yapılmıştır. Her üç gen bölgesi için en uygun bağlanma sıcaklığının belirlenebilmesi amacıyla öncelikle gradient PZR çalışmaları yapılmıştır. Gradient PZR için farklı sıcaklıklar denenmiş ve uygun PZR koşulu belirlenmiştir. Çalışmada iki farklı deneme aralığı kullanılmış olup, kullanılan gradient PZR koşulu; 94°C 3dk, [94°C 30sn, 48-58°C (1.



deneme aralığı) ile **50-64 °C** (2. deneme aralığı) 30sn, 72°C 2dk] (35 döngü), 72°C 5dk, 4°C ∞ dir. Bu amaçla GeneMark 5X PCR Dye Master Mix II (GeneMark, Tayvan) kullanılmıştır. Son hacmi 25 µl olan PZR karışımının bileşenleri ve miktarları sırasıyla; 5 µl 5X PCR Dye Master Mix II, 1 µl kalıp DNA (5ng/ul), 1 µl forward primer (FP) (10 µM), 1 µl reverse primer (RP) (10 µM), 17µl ddH₂O şeklindedir.

Çalışmada kullanılan üç farklı gen bölgesine (*ITS*, *EF* ve *β-tubulin*) ait primer çiftleri ve bu primerlere ait baz dizileri sırasıyla şöyledir: **ITS1-F**: TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA, **ITS2-R**: GCA TTC CCA AAC AAC TCG ACT C (Van Den Ende ve De Hoog 1999). **TEF1**: F-ATG GGT AAG GA(A/G) GAC AAG AC, **TEF2-R**: GGA (G/A) GT ACC AGT (G/C) AT CAT GTT (O'Donnell vd. 1998; Geiser vd. 2004; Herron, vd. 2015) ve **Bt2a-F**:GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC, **Bt2b-R**: ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC (Glass ve Donaldson, 1995).

PZR ürünlerinin görüntülenmesi

Görüntüleme sonucunda seçilen PZR ürünlerine ait örnekler baz dizi analizi amacıyla Invitrogen Pure Link Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, ABD) kullanılarak saflaştırılmıştır. Genomik DNA ve PZR çalışmalarında elde edilen PZR ürünleri sırasıyla %1 ve %2'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Daha sonra G-BOX jel görüntüleme cihazında (G-Box Syngene, UK) bantlar görüntülenmiştir.

Dizi analizi

Saflaştırma kiti ile saflaştırılan *ITS*, *EF* ve *β tubulin* gen bölgelerine ait PZR örnekleri dizi analizi yapmak üzere REFGEN Biyoteknoloji Limited Şirketine (Ankara) gönderilmiştir.

Biyoinformatik araçlar kullanılarak tür tayini yapılması

Her üç farklı gen bölgesine ait baz dizi analizleri için NCBI (National Center of Biotechnology Information) veri tabanı aracılığıyla BLAST (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>) analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte her bir gene ait DNA dizileri MEGA X (Tamura ve Nei 1993; Kumar vd, 2018) versiyonu kullanılarak ClusterW programı (Thompson vd., 1994) ile align edilip ve türler arasında korunmuş bölgeler tespit edilmiş ve her bir gene ait DNA dizisi birbirleriyle karşılaştırılarak benzerlikler karşılaştırılmıştır.

Bulgular

Genomik DNA izolasyonu

Çalışmamızda elde edilen genomik DNA'ların saflığı ile konsantrasyonları Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) yardımı ile ölçülmüştür. Bu DNA'ların absorbans değerlerinin ise ABS₂₆₀ /ABS₂₈₀ 1,6-2,0 aralığında olduğu belirlenmiştir. Konsantrasyonları belirlenen DNA'lar 5

ng/µL olacak şekilde seyreltilerek, gradient PZR çalışmalarında kullanılmıştır.

Genomik DNA ile gerçekleştirilen gradient PZR çalışmaları

Gradient PZR çalışmaları sonucunda elde edilen jel görüntüleri doğrultusunda *ITS*, *EF* ve *β tubulin* gen bölgeleri için 48°C -54,1°C arasında parlak bant elde edildiği görülmüştür. Çalışmalara *ITS* ve *EF* gen bölgesi için de en parlak bandın elde edildiği ortak sıcaklık olan **51,7 °C** olarak belirlenmiştir. *β-Tubulin* gen bölgesi ile yapılan denemelerde annealing için 50-64 sıcaklık aralığı denenmiş ve 58,5-64 °C arası bant elde edilmiş olup çalışmalarda **58 °C** kullanılmıştır.

Bu sebeple çalışmamızda *ITS* ve *EF* gen bölgesi için optimize koşul; 94°C 3dk, [94°C 30sn, **52°C** 30sn, 72°C 2dk](35 döngü), 72°C 5dk, 4°C ∞ , *β-tubulin* gen bölgesi için optimize koşul; 94°C 3dk, [94°C 30sn, **58°C** 30sn, 72°C 2dk](35 döngü), 72°C 5dk, 4°C ∞ olarak belirlenmiştir.

PZR ürünlerinin saflaştırma işlemler

Görüntülenen jellerde, genomik DNA ile yapılan PZR çalışmaları sonucu ilgili gen bölgeleriyle elde edilen bantların boyutlarının yaklaşık 600-700 bp uzunlukta olduğu görülmüştür (Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3). Her üç gen bölgesine ait bant elde edilmesi sonucunda elde edilen PZR ürünleri saflaştırılıp jelde yürütülmüştür. Elde edilen bant boyutlarının saflaştırma öncesi bant boyutları ile eşit uzunlukta olduğu doğrulanmıştır.

Dizi analizi

Elde edilen PZR ürünleri dizi analizi için REFGEN'e (Ankara) gönderilmiştir. Daha sonra BLAST çalışmaları yapılarak benzerlikler karşılaştırılmıştır. Her üç gen bölgesine göre yapılan BLAST analizleri sonucuna göre izolatlar *Fusarium redolens* "kokuluküf" (Sesli vd., 2020) ve *Fusarium oxysporum* "sebzeküf" (Sesli vd., 2020) olarak tanımlanmıştır. Buna göre her üç gen bölgesi ile doğrulanarak yapılan analizler sonucunda 3 adet *Fusarium oxysporum* ve 7 adet *Fusarium redolens* türü belirlenmiştir. *Orchis sancta* (Çeşme-İzmir) Salep bitkisinden izole edilen endofitik *Fusarium* izolatlarından 5'nin *Fusarium redolens*, 1'nin *Fusarium oxysporum* olduğu belirlenmiştir. *Ophrys fusca* (İzmir) den izole edilen iki izolatin ise *Fusarium oxysporum* olduğu görülmüştür (Tablo 1).

Endofitik *Fusarium* türlerine ait *β-tubulin*, *ITS* ve *EF* gen bölgelerini baz alan filogenetik analizler ve filogenetik ağaçların çizilmesi

Filogenetik ağaçlar MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 10 da yer alan Maximum Likelihood metodu ile Tamura-Nei model kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Kumar vd, 2018; Tamura



ve Nei, 1993) (Şekil 4, Şekil 5 ve Şekil 6). Filogenetik ağaç üzerindeki numaralar Bootstrap değerleridir. 1000 tekrarlı Bootstrap analizi ile gerçekleştirilmiştir.

β -tubulin, ITS ve EF gen bölgesi temelli filogenetik sınıflandırma

Bu çalışmada yer alan türlerin birbirleriyle filogenetik açıdan benzerlik karşılaştırması yapabilmek için β -tubulin gen bölgesi için GenBanka kayıtlı *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* strain ATCC 52422 (Aksesyon numarası: DQ092474.1, 616 bp) (Lee ve Min 2005, unpublished), *Fusarium redolens* strain CBS: 743.97 (Aksesyon numarası: MT011043.1, 1668 bp) (Yand vd., 2020) seçilmiştir (Şekil 4).

Moleküler tanımlama sonucunda belirlediğimiz çalışmadaki türlerle filogenetik benzerlik karşılaştırması yapabilmek için *ITS* gen bölgesi için GenBanka kayıtlı *Fusarium redolens* strain NRRL_22901 (Aksesyon numarası: MT435063.1, 1107 bp) (Gargouri vd., 2020), *Fusarium* sp. isolate DSM100403_C41_RLCS05 (Aksesyon numarası: MT453291, 1150 bp) (Santos vd., 2019) ve *Fusarium oxysporum* isolate RL836 (Unpublished) (Aksesyon numarası: MT557532.1, 700 bp) seçilmiştir (Şekil 5).

Bu çalışmada yer alan türlerin birbirleriyle filogenetik açıdan benzerlik karşılaştırması yapabilmek için *EF* gen bölgesi için GenBanka kayıtlı *Fusarium oxysporum* isolate Foa 72 (Aksesyon numarası: MK968952.1, 688 bp) (Meghatli vd., 2020, unpublished) ve *Fusarium redolens* strain NRRL 52814 (Aksesyon numarası: GU250585.1, 697 bp) seçilmiştir (Balmasvd., 2010) (Şekil 6).

Tartışma

Fusarium genusu doğada oldukça yaygın olup tarım, tıp ve veterinerlik bilimlerinde oldukça önemlidir (Asan, 2011). *Fusarium* genusunda yer alan bazı türler

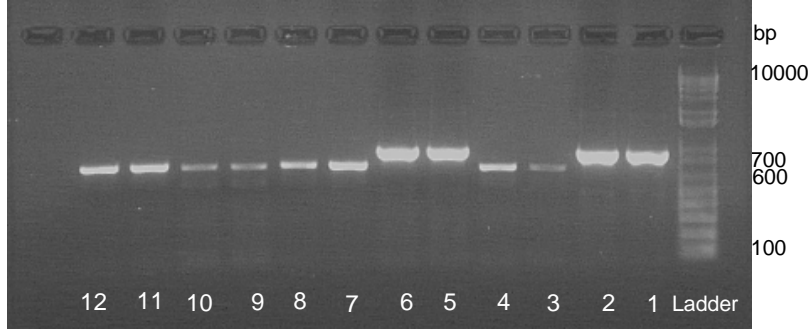
mikotoksin üretirler ve bu mikotoksinler insanlar ve hayvanlar için zararlıdır (Girgin vd., 2001, Asan, 2011). Mikotoksin üretmeleri ve bitkilerde hastalık yapan türlerin yanı sıra *Fusarium* genusunda yer alan bazı türlerin önemli endüstriyel uygulamaları da bulunmaktadır. Bunlardan biri doğal pigment üretimidir. Örneğin *Fusarium* pigmenti benzokininin meme kanseri tedavisinde antiproliferatif ajan olarak kullanım potansiyeli belirlenmiştir (Zheng vd., 2017). Diğer bir çalışmada *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis* P.G. Xiao and K.C. Hsia'den izole edilen endofitik *Fusarium redolens* 6WBY3'den steroidal-alkaloid (peimisine ve imperialine-3 β -D-glucoside) üretimi gerçekleştirilmiştir (Pan vd., 2015). Bu sebeple biyoteknolojik öneme sahip endofitik *Fusarium* türlerinin doğru moleküler tanımlanmalarının yapılması ile ilgili çalışmalar son derece önem taşımaktadır.

Bu çalışmada Salep kök ve yumrularından izole edilmiş endofitik *Fusarium* türlerinin moleküler tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla β -tubulin, ITS ve EF olmak üzere üç gen bölgesi kullanılmış olup bu gen bölgeleri PZR ile kısmi çoğaltılıp baz dizi analizi yapılmıştır. Genomik DNA ile yapılan PZR çalışmaları sonucu ilgili gen bölgeleriyle elde edilen bantların boyutlarının yaklaşık 600-700 bp uzunlukta olduğu görülmüştür.

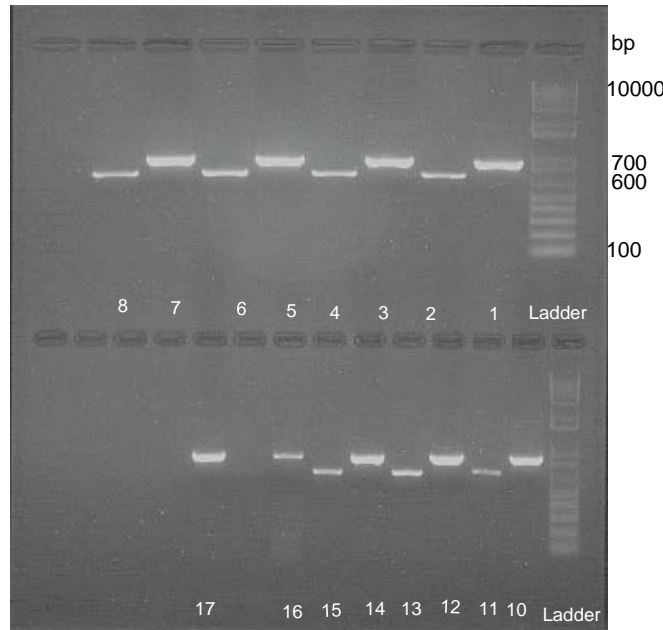
Çalışmamızda ilk olarak üç farklı gen bölgesinin çoğaltılması içeren moleküler tanımlama yöntemleri kullanılarak saleplerden (orkidelerden) izole edilen endofitik *Fusarium* spp. izolatları *Fusarium oxysporum* ve *Fusarium redolens* olarak tür düzeyinde tanımlanmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda bu üç gen bölgesinin birlikte *Fusarium* türlerinin moleküler tanımlanmalarının yapılması amacıyla kullanılabileceğini göstermektedir.

Tablo 1. Endofitik *Fusarium* türleri ve izolasyon kaynağı Salep (Orkide) bitkisi

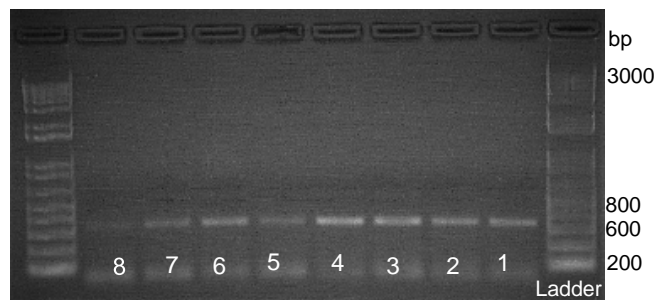
Fungus İzolat İsmi	Fungus Tür İsmi	Salep (Orkide) İsmi
YG-F-izolat-1	<i>Fusarium redolens</i>	<i>Orchis sancta</i> (Çeşme-İzmir)
YG-F-izolat-2	<i>Fusarium redolens</i>	<i>Orchis sancta</i> (Çeşme-İzmir)
YG-F-izolat-3	<i>Fusarium redolens</i>	<i>Orchis sancta</i> (Çeşme-İzmir)
YG-F-izolat-4	<i>Fusarium redolens</i>	<i>Orchis sancta</i> (Çeşme-İzmir)
YG-F-izolat-5	<i>Fusarium redolens</i>	<i>Orchis sancta</i> (Çeşme-İzmir)
YG-F-izolat-7	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Orchis sancta</i> (Çeşme-İzmir)
YG-F-izolat-8	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Ophrys fusca</i> (İzmir)
YG-F-izolat--9	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Ophrys fusca</i> (İzmir)
YG-F-izolat-13	<i>Fusarium redolens</i>	-
YG-F-izolat-14	<i>Fusarium redolens</i>	-



Şekil 1. ITS ve EF gen bölgesi için farklı endofitik *Fusarium* izolatlarına ait genomik DNA kullanılarak yapılan PZR sonucu elde edilen PZR ürünlerine ait jel görüntüleri (1 ve 2: ITS-YG-F-izolat-9, 3 ve 4: EF-YG-F-izolat-9, 5 ve 6: ITS-YG-F-izolat-14, 7 ve 8: EF-YG-F-izolat-14, 9 ve 10: EF-YG-F-izolat-1; 11 ve 12: EF-YG-F-izolat-13).



Şekil 2. ITS ve EF gen bölgesi için farklı endofitik *Fusarium* izolatlarına ait genomik DNA kullanılarak yapılan PZR sonucu elde edilen PZR ürünlerine ait jel görüntüleri (Alt sıra Ladder, ITS-YG-F-izolat-1, EF-YG-F-izolat-1, ITS-YG-F-izolat-2, EF-YG-F-izolat-2, ITS-YG-F-izolat-3, EF-YG-F-izolat-3, ITS-YG-F-izolat-4, EF-YG-F-izolat-4, üst sıra Ladder, ITS-YG-F-izolat-5, EF-YG-F-izolat-5, ITS-YG-F-izolat-7, EF-YG-F-izolat-7, ITS-YG-F-izolat-8, EF-YG-F-izolat-8).



Şekil 3. β -tubulin gen bölgesi için farklı endofitik *Fusarium* izolatlarına ait genomik DNA kullanılarak yapılan PZR sonucu elde edilen PZR ürünlerine ait jel görüntüleri



Türkiyedeki farklı habitat ve substratlardan elde edilmiş *Fusarium* türleriyle ilgili yapılan çalışmaların sonucuna göre en yaygın bulunan türler *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Fusarium equiseti* Schlecht. ve *Fusarium moniliforme* (Sacc.) Nirenberg'dir (Asan, 2011).

Türkiye'de nohutta solgunluğa neden olan *Fusarium* spp.'nin moleküler tanımlamasıyla ilgili yapılan diğer bir çalışmada *Fusarium redolens*'in nohutta solgunluk benzeri hastalığa neden olduğu ilk kez raporlanmıştır (Tekeoğlu vd., 2017). Bu çalışmadaki *Fusarium* izolatların tür seviyesinde tanımlamaları *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* ve *F. redolens* için spesifik PZR primerleri ve *Translation Elongation Factor* gen bölgesinin sekanslanması ile gerçekleştirilmiştir (Tekeoğlu vd., 2017).

Orkide *Bletilla striata* köklerinden izole edilmiş *Fusarium* izolatu morfolojik karakterizasyon ve filogenetik analizlerin sonucuna göre *Fusarium oxysporum* olarak tanımlanmıştır (Jiang vd., 2018). Orkid endofitik *Fusarium oxysporum* KB-3 kullanılarak yapılan bu çalışmada, bu türün orkide tohumlarını çimlenmesini teşvik ettiği ve orkid mikorizal fungus gibi davranış sergilediğinin gözlenmesi orkide bitkisi yetiştirilmesi açısından oldukça umut vericidir (Jiang vd., 2018).

Ülkemizde endemik ve ekonomik öneme sahip bitkiler arasında yer alan salep, kültürü yapılamadığı için

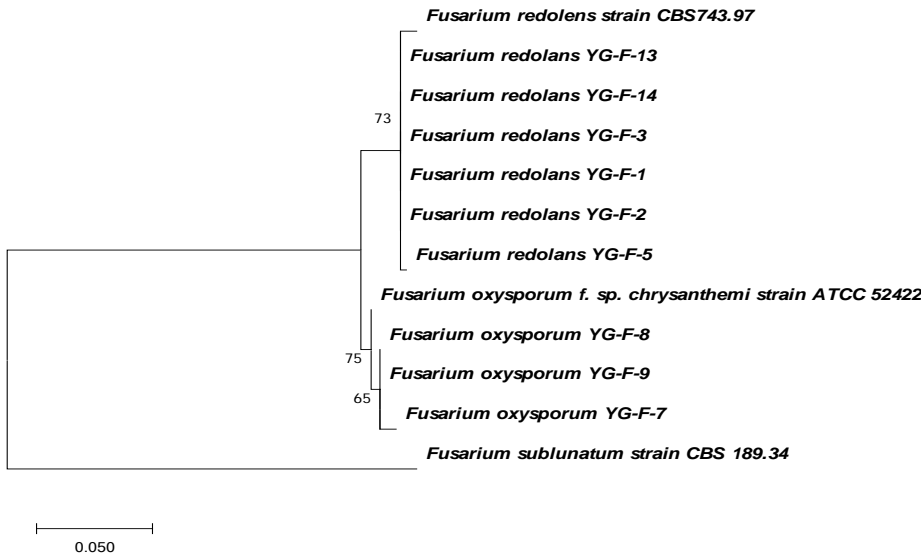
doğadan toplanarak tahrip edilmektedir. Salep bitkisinin tür bazında korunması ve üretiminin gerçekleştirilmesi için salep tohumlarının *in-vitro* çimlendirilmesi gerekmektedir. Türkiye orkideleri (Salepler) ile ilgili yapılan literatüre/literatürlere bakıldığında salep orkidelerinin üretimine olanak sağlayacak çalışmalara ihtiyaç duyulduğu görülmektedir (Sandal ve Söğüt, 2010).

Çalışmamız özellikle salep kök ve yumrularından izole edilmiş endofit *Fusarium* türlerinin üç farklı gen bölgesi kullanılarak moleküler tanımlamalarının yapılması ve tanımlamaları yapılan bu türlerin simbiyotik kültür yöntemiyle salep bitkisi yetiştirilmesine yönelik ilerisi için yapılacak çalışmalara katkı sağlayacak/rehberlik edecek olması açısından önemlidir.

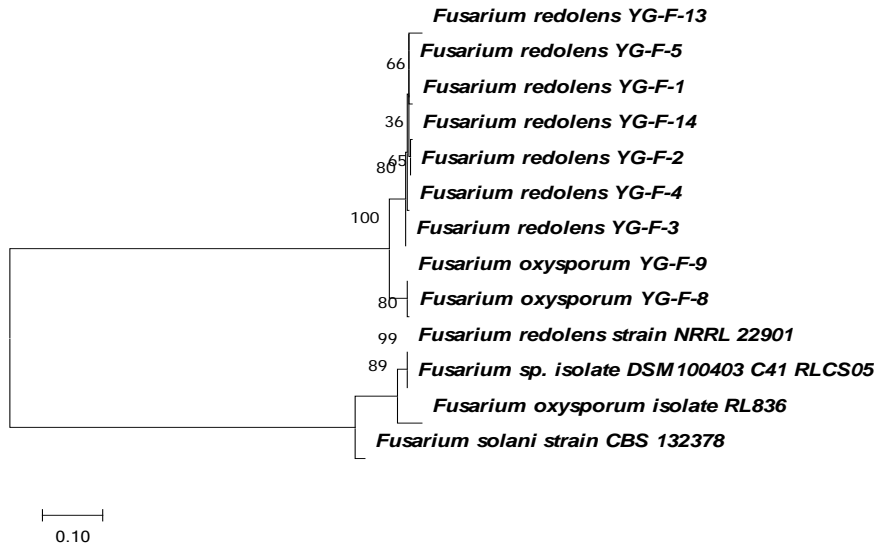
İleri çalışmalarda ilgili gen bölgelerine ait aksesyon numarası alınacak ve bu türlerin sekonder metabolitleri detaylı olarak incelenecektir. Daha sonra elde edilen bilgiler ışığında Salep (Orkide) tohumlarının çimlendirilmesiyle ilişkili detaylı çalışmalar yapılması planlanmaktadır.

Teşekkür

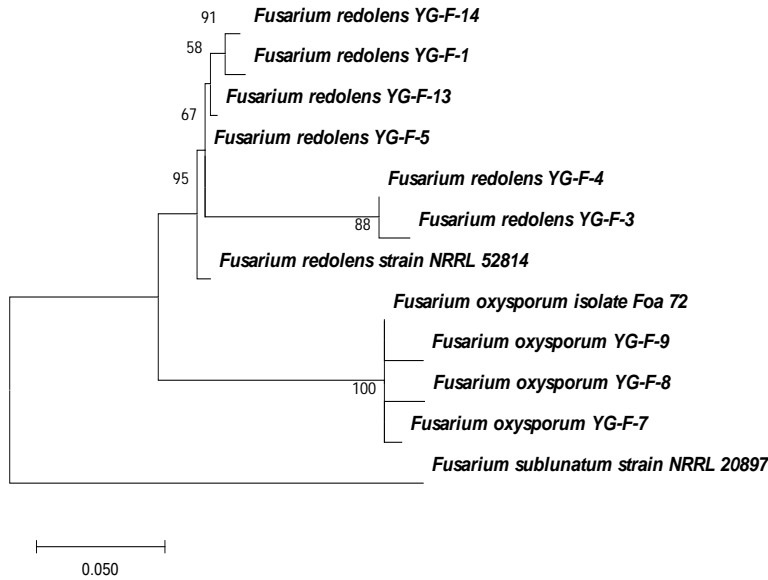
Çalışmalarım esnasında laboratuvar imkânlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Dr. Arzu YILDIRIM'a çok teşekkür ederim.



Şekil 4. Endofitik *Fusarium* türlerine ait β -*tubulin* gen bölgelerini baz alan filogenetik ağacın görünümü ve β -*tubulin* gen temelli filogenetik sınıflandırma. YG-F-izolat 4 sekansı çalışmamıştır. Bu sebeple filogenetik ağaçta yer almamaktadır. Bunun yanısıra bizim türler dışında yer alan bir dış grup olması açısından analizlerde *Fusarium subclunatum* strain CBS 189.34 (Aksesyon numarası: KM232076.1, 622 bp) (Lombard vd., 2015) kullanılmıştır.



Şekil 5. Endofitik *Fusarium* türlerine ait ITS gen bölgelerini baz alan filogenetik ağacın görünümü ve ITS Gen Temelli Filogenetik Sınıflandırma. YG-F-izolat 7 sekansı çalışmamıştır. Bu sebeple filogenetik ağaçta yer almamaktadır. Bunun yanısıra bizim türler dışında yer alan bir dış grup olması açısından analizlerde *Fusarium solani* strain CBS 132378 (Aksesyon numarası: MH866005, 567 bp) (Vu vd., 2019) kullanılmıştır.



Şekil 6. Endofitik *Fusarium* türlerine ait EF gen bölgelerini baz alan filogenetik ağacın görünümü ve EF Gen Temelli Filogenetik Sınıflandırma. YG-F-izolat 2 sekansı çalışmamıştır. Bu sebeple filogenetik ağaçta yer almamaktadır. Bunun yanısıra bizim türler dışında yer alan bir dış grup olması açısından analizlerde *Fusarium subglutatum* strain NRRL 20897 (Aksesyon numarası: KX302919.1, 698 bp) (Lupien vd., 2016, unpublished) kullanılmıştır



Kaynaklar

- Asan A. (2011). Checklist of *Fusarium* Species Reported from Turkey. *Mycotaxon*. 116 (1): 479.
- Balmas, V., Migheli, Q., Scherm, B., Garau, P., O'Donnell, K., Ceccherelli, G., Kang, S. and Geiser, D.M., (2010). Multilocus phylogenetics show high levels of endemic fusaria inhabiting Sardinian soils (Tyrrhenian Islands). *Mycologia*, 102(4), 803-812.
- Deshmukh, S.K., Verekar, S.A. and Bhave, S.V., (2015). Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials. *Frontiers in microbiology*, 5, 715.
- Erzurumlu, G. ve Doran, İ. (2011). Türkiye'de salep orkideleri ve salep kültürü. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 15(1), 29-34.
- Gargouri, S., Balmas, V., Burgess, L., Paulitz, T., Laraba, I., Kim, H.S., Proctor, R.H., Busman, M., Felker, F.C., Murray, T. and O'Donnell, K., (2020). An endophyte of *Macrochloa tenacissima* (esparto or needle grass) from Tunisia is a novel species in the *Fusarium redolens* species complex. *Mycologia*, 112(4), 792-807.
- Geiser, D.M., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraghavan, N., Ward, T.J., Zhang, N., Kuldau, G.A. and O'donnell, K., (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110(5), 473-479.
- Gezgin, Y. and Eltem, R., (2009). Diversity of endophytic fungi from various Aegean and Mediterranean orchids (saleps). *Turkish journal of Botany*, 33(6), 439-445.
- Girgin, G., Başaran, N., ve Şahin, G. (2001). Dünyada Ve Türkiye de İnsan Sağlığını Tehdit Eden Mikotoksinler. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 58(3), 97-118.
- Glass, N.L. and Donaldson, G.C., (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1323-1330.
- Hansen, F.T., Gardiner, D.M., Lysøe, E., Fuertes, P.R., Tudzynski, B., Wiemann, P., Sondergaard, T.E., Giese, H., Brodersen, D.E. and Sørensen, J.L. (2015). An update to polyketide synthase and non-ribosomal synthetase genes and nomenclature in *Fusarium*. *Fungal genetics and biology*, 75, 20-29.
- Herron, D.A., Wingfield, M.J., Wingfield, B.D., Rodas, C.A., Marincowitz, S. and Steenkamp, E.T., (2015). Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. *Studies in Mycology*, 80, 131-150.
- Jiang, J., Zhang, K., Cheng, S., Nie, Q., Zhou, S.X., Chen, Q., Zhou, J., Zhen, X., ting Li, X., wen Zhen, T. and Xu, M., (2019). *Fusarium oxysporum* KB-3 from *Bletilla striata*: an orchid mycorrhizal fungus. *Mycorrhiza*, 29(5), 531-540.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35,1547-1549.
- Lee, H.J. and Min, B.R. (2005). RFLP and partial DNA sequence analysis of beta-tubulin gene in the genus *Fusarium*. Direct Submission, GenBank. Unpublished.
- Lombard, L., Van der Merwe, N.A., Groenewald, J.Z. and Crous, P.W., (2015). Generic concepts in Nectriaceae. *Studies in Mycology*, 80, 89-245.
- Lupien, S.L., Dugan, F.M., Ward, K. and O'Donnell, K. (2016). Wilt, crown and root rot of common rose mallow (*Hibiscus moscheutos*) caused by a novel *Fusarium* sp. Direct Submission, GenBank. Unpublished.
- Meghatli, M., Krimi, Z., Tunali, B. and Kansu, B. (2020). *Fusarium oxysporum* isolate Foa 72 translation elongation factor 1-alpha (EF 1-alpha) gene, partial cds, Direct Submission, GenBank. Unpublished.
- Melo, I.S., Santos, S.N., Rosa, L.H., Parma, M.M., Silva, L.J., Queiroz, S.C. and Pellizari, V.H., (2014). Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the Antarctic moss *Schistidium antarctici*. *Extremophiles*, 18(1), 15-23.
- O'Donnell, K., Rooney, A.P., Proctor, R.H., Brown, D.W., McCormick, S.P., Ward, T.J., Frandsen, R.J., Lysøe, E., Rehner, S.A., Aoki, T. and Robert, V.A. (2013). Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology*, 52, 20-31.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. and Nirenberg, H.I., (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90(3), 465-493.
- Osborn, A., (2010). Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends in Genetics*, 26(10), 449-457.
- Pan, F., Su, X., Hu, B., Yang, N., Chen, Q. and Wu, W. (2015). *Fusarium redolens* 6WBY3, an endophytic fungus isolated from *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*, produces peimisine and imperialine-3 β -d-glucoside. *Fitoterapia*, 103, 213-221.
- Sandal, G. ve Söğüt, Z. (2010). Türkiye orkideleri (salepler). *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23(2), 109-116.
- Santos, A.G., da Rocha, G.O. and de Andrade, J.B., (2019). Occurrence of the potent mutagens 2-nitrobenzanthrone and 3-nitrobenzanthrone in fine airborne particles. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- Sesli, E., Asan, A. ve Selçuk, F. (edlr.) Abacı Günay, Ö., Akata, I., Akgül, H., Aktaş, S., Alkan, S., Allı, H., Aydoğdu, H., Berikten, D., Demirel, K., Demirel, R., Doğan, H.H., Erdoğan, M., Ergül, C.C., Eroğlu, G., Giray, G., Halikî Uztan, A.,



- Kabaktepe, Ş., Kadaifçiler, D., Kalyoncu, F., Karaltı, İ., Kaşık, G., Kaya, A., Keleş, A., Kırbağ, S., Kıvanç, M., Ocak, İ., Ökten, S., Özkale, E., Öztürk, C., Sevindik, M., Şen, B., Şen, İ., Türkel, İ., Ulukapı, M., Uzun, Ya., Uzun, Yu ve Yoltaş, A. (2020). Türkiye Mantarları Listesi (The Checklist of Fungi of Turkey). 1177 Sayfa. Ali Nihat Gökyiğit Vakfı Yayını. İstanbul. ISBN: 978-605-70004-2-2.
- Tamura, K. and Nei, M., (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, 10(3), 512-526.
- Tan, R.X. and Zou, W.X., (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports*, 18(4), 448-459.
- Tekeoğlu, M., Özkılınç, H., Tunalı, B., Küsmenoğlu, İ. and Chen, W. (2017). Molecular identification of *Fusarium* spp. causing wilt of chickpea and the first report of *Fusarium redolens* in Turkey. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 30(1), 27-33.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.
- Tsavkelova, E. A., Bömke, C., Netrusov, A. I., Weiner, J. and Tudzynski, B. (2008). Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proliferatum* strain. *Fungal genetics and Biology*, 45(10), 1393-1403.
- Van Den Ende, A.G. and De Hoog, G.S., 1999. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. *Stud Mycol*, 43,151-162.
- Vu, D., Groenewald, M., De Vries, M., Gehrmann, T., Stielow, B., Eberhardt, U., Al-Hatmi, A., Groenewald, J.Z., Cardinali, G., Houbraken, J. and Boekhout, T., (2019). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in mycology*, 92,135-154.
- Yang, M., Zhang, H., van der Lee, T.A., Waalwijk, C., van Diepeningen, A.D., Feng, J., Brankovics, B. and Chen, W., (2020). Population genomic analysis reveals a highly conserved mitochondrial genome in *Fusarium asiaticum*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 839.
- Zheng, L., Cai, Y., Zhou, L., Huang, P., Ren, X., Zuo, A., Meng, X., Xu, M. and Liao, X. (2017). Benzoquinone from *Fusarium* pigment inhibits the proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 cells through the NF-κB pathway via estrogen receptor signaling. *International journal of molecular medicine*, 39(1), 39-46.
- <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov> (Son erişim tarihi: Ağustos 2021)