

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

PİRİNÇTEN GİBBERELLİK ASİT ÜRETİCİSİ FUNGUSUN İZOLASYONU,
MOLEKÜLER TANIMLAMASI VE FARKLI ORTAMLARDA GİBBERELLİK
ASİT ÜRETİMİNİN BELİRLENMESİ

MEHMET GÜVEN

Aralık 2015

ÖZET

PİRİNÇTEN GİBBERELLİK ASİT ÜRETİCİSİ FUNGUSUN İZOLASYONU, MOLEKÜLER TANIMLAMASI VE FARKLI ORTAMLARDA GİBBERELLİK ASİT ÜRETİMİNİN BELİRLENMESİ

GÜVEN, Mehmet

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Aralık 2015, 60 sayfa

Bitki büyüme maddelerinden biri olan gibberellik asit tarımda yaygın olarak kullanılan bir hormondur ve ülkemizde üretimi olmadığından ithal edilmektedir. Bitki büyüme düzenleyicisi olan gibberellik asit yüksek bitkilerde, bakterilerde, funguslarda ve alglerde bulunmaktadır.

Öncelikle bu çalışmada, Kastamonu ili, Tosya ilçesinde üretilen pirinç bitkisinden gibberellik asit üreticisi fungus uygun besiortamları kullanılarak izole edilmiştir. İzole edilen fungus 18S rRNA sekans analizi sonucunda *Gibberella* genusu mensubu olarak tanımlanmıştır.

İzolat fungusun kesikli sistemde gibberellik asit üretimi çalışılmıştır. Gibberellik asit HPLC ile ölçülmüştür. 6. günde, pH: 4'de ve glukozlu ortamda 91.16 mg/L gibberellik asit ürettiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Pirinç, 18S rDNA sekans analizi, *Gibberella*, Gibberellik asit, HPLC

ABSTRACT

ISOLATION OF GIBBERELIC ACID-PRODUCED FUNGUS FROM RICE, MOLECULAR CHARACTERIZATION AND DETERMINATION OF GIBBERELIC ACID FROM DIFFERENT MEDIUM

GÜVEN, Mehmet

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, MSc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Dec 2015, 60 Pages

Plant growth substance, which is one of the gibberellic acid is a hormone commonly used in agriculture. In our country are imported to gibberellic acid. Gibberellic acid is a plant growth regulator and higher plants, bacteria, fungi and algae have gibberellic acid.

First, in this study, Kastamonu province, the rice plant produced in Tosya district gibberellic acid-producing fungus was isolated by using the appropriate feeding environment. 18S rRNA sequence analysis of the isolated fungus *Gibberella* genus result is defined as a member.

Gibberellic acid production in the batch system isolates of the fungus were studied. Gibberellic acid was measured by HPLC. On day 6, pH 4 and glucose environment 91.16 mg / L was found to produce gibberellic acid.

Keywords: Rice, 18S rRNA sekans analyze, *Gibberella*, Gibberellic asid, HPLC

TEŐEKKÖR

Yüksek Lisans Tezimi hazırlamamda bana yol gösteren, tecrübe ve bilgileri ile her aşamada destekçim olan tez yöneticisi değerli hocam Sayın Prof. Dr. Aysun ERGENE'ye en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında tecrübelerini esirgemeyerek bana yol gösteren çalışmalarım boyunca her an beraber olduğumuz, tüm maneviyatı ile yanımda olan Dr. Fadime YILMAZ, Barış KAHYAOĞLU, Selçuk TOKLUCU, Sıla CANPOLAT, Ramazan KOÇAK, Semih CERİT, Özgün ŞAHİN, Güven Emre SARIKAYA, İrem AKIN, Burak BEYGU, Gamze TURALI ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Eğitim hayatım boyunca yanımda olan, bana yol gösteren, maddi manevi hiçbir desteği esirgemeyen, babam Salih GÜVEN, annem Fedile GÜVEN, ablam Selin GÜVEN ve çalışmamın her safhasında yanımda olan Dilan AKKÖSE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Literatür Özetleri	2
1.1.1. Mikroorganizmalar.....	2
1.1.1.1. Biyoteknolojide mikroorganizmaların önemi.....	3
1.1.1.2. Funguslar	5
1.1.1.2.1. Küfler.....	5
1.1.1.2.2. Mayalar.....	6
1.1.1.2.3. Şapkaklı Mantarlar	6
1.1.2. Bitki Hormonları	7
1.1.2.1. Bitki Büyüme Düzenleyicileri	8
1.1.3. Gibberellinler	9
1.1.3.1. Gibberellinlerin Keşfi ve Tarihçesi	9
1.1.3.2. Gibberellinlerin kimyasal, fiziksel ve biyolojik özellikleri.....	12
1.1.3.3. Gibberellinlerin biyosentezi	14
1.1.3.4. Gibberellinlerin ölçüm metodları	16
1.1.4. Mikrobiyal İdentifikasyon.....	17
1.1.4.1. Geleneksel Yöntemler	18
1.1.4.2. 18S rRNA Dizi Analizi.....	19
1.1.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	20
1.1.4.4. 18S rRNA Analizinin Avantajları ve Dezavantajları	22
1.2. Atık ve artık değerlendirme çalışmaları	24
1.3. Çalışmanın Amacı.....	29

2. MATERYAL VE YÖNTEM	30
2.1. Materyal	30
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri	30
2.1.1.1. Patates Dekstroz Agar (PDA) Besiyerinin Hazırlanışı.....	30
2.1.1.2. Malt Ekstrakt Broth (MEB) Besiyerinin Hazırlanışı.....	30
2.1.1.3. Czapek-Dox Broth Besiyerinin Hazırlanışı.....	30
2.1.1.4. Malt Ekstrakt Agar Besiyerinin Hazırlanışı	31
2.1.1.5. Melash Besiyerinin Hazırlanışı	31
2.1.1.6. Peynir Altı Suyu Kullanılan Besiyerinin Hazırlanışı	31
2.1.1.7. Zeytin Karasuyu Kullanılan Besiyerinin Hazırlanışı.....	32
2.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar	32
2.1.2.1. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon	
Çözeltiler.....	32
2.1.2.1.1. Tris/EDTA Tamponu (250 mL).....	32
2.1.2.1.2. % 10'luk SDS Tamponu (100 mL).....	32
2.1.2.1.3. Proteinaz-K'nın Hazırlanması (10 mL)	32
2.1.2.1.4. NaCl Tamponu (5 M, 100 mL).....	33
2.1.2.1.5. CTAB/NaCl tamponu (100 mL).....	33
2.1.2.1.6. Kloroform/İzoamil Alkol Tamponu (100 mL)	33
2.1.2.1.7. Kloroform/İzoamil Alkol/ Fenol Tamponu (100 ml) ..	33
2.1.2.1.8. İzopropanol Alkol (100 mL).....	33
2.1.2.1.9. % 70'lik Etil Alkol (100 mL)	33
2.1.2.1.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM, 100 mL).....	34
2.1.2.1.11. Tris-HCl Tamponu (1 M, 100 mL).....	34
2.1.2.1.12. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlama.....	34
2.1.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Primerler ve	
Özellikleri	34
2.2. Yöntem.....	35
2.2.1. Çalışma Alanı ve Örneklerin Toplanması.....	35
2.2.2. Gibberellik Asit Üreticisi Fungusun İzolasyonu.....	35
2.2.3. Gibberellik Asit Üreticisi Fungusun Morfolojik Karakterizasyonu	35
2.2.4. Gibberellik Asit Üreticisi Mantarın Moleküler Karakterizasyonu	36
2.2.4.1. Kromozomal DNA İzolasyonu.....	36

2.2.4.2. Kromozomal DNA Miktar Tayini	36
2.2.4.3. PZR Amplifikasyonu	36
2.2.4.4. Agaroz Jel Elektroforezi	37
2.2.4.5. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi	37
2.2.4.6. Fungal İzolatların Tanımlanması	37
2.2.5. Ekstraktif Fermantasyonda Gibberellik Asit Üretimi	38
2.2.6. Gibberellik Asit Ekstraksiyonu	38
2.2.7. Gibberellik Asit Analizi	38
2.2.8. Zamanının Gibberellik Asit Üretimine Etkisi	40
2.2.9. Farklı Karbon Kaynaklarının Gibberellik Asit Üretimi Üzerine Etkisi ..	40
2.2.10. Farklı pH Değerlerinin Gibberellik Asit Üretimi Üzerine Etkisi	41
2.2.11. Fabrika Atık ve Artıklarının Gibberellik Asit Üretimi Üzerine Etkisi ..	41
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	42
3.1. Gibberellik Asit Üreticisi Fungusun İzolasyonu	42
3.2. Gibberellik Asit Üreticisi Fungusun Morfolojik Karakterizasyonu	42
3.3. Gibberellik Asit Üreticisi Mantarın Moleküler Karakterizasyonu	43
3.3.1. Kromozomal DNA İzolasyonu	43
3.3.2. TOSÇ3 Suşunun PZR Optimizasyonu	44
3.3.3. TOSÇ3 kodlu Suşun 18 S rRNA Sekans Analizi İle Tanımlanması	44
3.4. Fermantasyon Süresinin Gibberellik Asit Üretimine Etkisi	47
3.5. Farklı Karbon Kaynaklarının Gibberellik Asit Üretimi Üzerine Etkisi	48
3.6. Farklı pH Değerlerinin Gibberellik Asit Üretimi Üzerine Etkisi	49
3.7. Fabrika Atık ve Artıklarının Gibberellik Asit Üretimi Üzerine Etkisi	50
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	51
KAYNAKLAR	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Bitki hormonlarının (bitki büyüme düzenleyiciler) gruplandırılması.....	9
1.2. Sterol ve gibberellinlerin biyosentezi	15
1.3. Pirinç bitkisinde erken 13-hidroksilasyon yolağındaki metabolik adımlar	15
1.4. Asetil-CoA'dan gibberellinlerin, yağ asitlerinin, fusarin C ve bikaverinin biyosentezi.....	16
1.5. PZR aşamaları.....	21
2.1. Gibberellik asit kalibrasyon grafiğı	40
3.1. TOSÇ3 izolatının morfolojik yapısı	43
3.2. Sekans analizi sonucunda elde edilen TOSÇ3 suşuna ait DNA sekansları	44
3.3. TOSÇ3 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram...46	
3.4. İnkübasyon süresinin gibberellik asit üretimlerine etkisi	47
3.5. Farklı karbon kaynaklarının gibberellik asit üretimlerine etkisi	48
3.6. Ortam başlangıç pH değerinin TOSÇ3 suşunun Gibberellik asit üretimine etkisi	49
3.7. Çeşitli fabrika atık ve artıkları kullanılarak hazırlanmış besiyerlerinde TOSÇ3 suşunun Gibberellik asit üretimine etkisi	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Bazı önemli gibberellinlerin yapısı.....	14
1.2. Pancar ve şekerkamışından elde edilen melasların bileşimi.....	25
1.3. 100 mL peyniraltı suyunun kimyasal bileşimi	27
1.4. Klasik ve sürekli yöntemle zeytinyağı üretimi yapan tesislerden çıkan karasuların bileşimleri	28
2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Primerler.....	34
2.2. Sulu fazdaki gibberellik asitin HPLC cihazındaki analiz koşulları	39
3.1. TOSÇ3 kodlu suş için 18S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri	47

SİMGELER DİZİNİ

Na	Sodyum
K	Potasyum
Mg	Magnezyum
Ca	Kalsiyum
Fe	Demir
Cl	Klor
P	Fosfor
S	Kükürt

KISALTMALAR DİZİNİ

GA ₃	Gibberellin A ₃
pH	Hidrojenin İyonu Konsantrasyonu
rRNA	Ribozomal Ribo Nükleik Asit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
NCBI	National Center of Biotechnology Information
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
bp	Baz çifti
pmol	pikomol
DNTP	Dideoksinükleit Trifosfat
mL	mililitre
µL	mikrolitre
mM	milimol
PDA	Patates Dekstroz Agar
MEB	Malt Ekstrakt Broth
ATM	Atmosfer (Basınç)

ABD
CTAB

Amerika Birleşik Devletleri
Cetyltrimethyl ammonium bromid



1. GİRİŞ

Dünyada özellikle gelişmiş ülkelerde ziraat ve gıda sektöründe yeni teknolojilerin kullanılmasıyla daha kaliteli, ucuz olarak kolay sürekli ve sağlıklı ürün elde edilmesi hedeflenmektedir. Bunun nedeni insanoğlunun temel ihtiyaçlarından birisi olan gıda maddelerinin veriminin ve miktarının artırılmasına yönelik yeni yöntemler geliştirmektir. Çevresel olumsuzluklar, ekonomik çıkmazlar, programlanmayan genetik deformasyonlar nedeniyle doğal gıda kaynakları giderek tükenmektedir. Bu nedenle dünyadaki büyük güçler başta olmak üzere çeşitli ülkelerde tarım ve gıda sektöründeki çalışmalar yoğunlaştırılmış durumdadır. Bitkisel ürün verimini sağlamak için tüm dünyada tercih edilen yöntemlerin başında gübreleme ve bitki büyüme regülatörlerinin kullanımı gelmektedir. Özellikle bitki büyüme regülatörlerinin çeşitli endüstri alanlarında kullanımı yaygındır. 1950'li yıllardaki kimyasal keşiflerden itibaren bitki büyüme regülatörlerinin en önemli sınıfını oluşturan gibberellinlerin (GAs) kullanımı yaygınlaşmıştır. Bunların arasında en çok tercih edilip kullanılan gibberellik asittir (GA_3) [1].

Günümüzde gibberellik asitin biyolojik aktivitesinden birçok alanda yararlanılmaktadır. Özellikle tarımda, bağcılık endüstrisinde, içki sanayisinde, gıda ve kozmetik sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır [2].

Ticari anlamda gibberellik asit 1950'li yıllardan bu yana üretilmektedir. Dünyada USA(Abott Laboratories, Merck and Company) İngiltere ve Japonya gibi gelişmiş ülkeler başta olmak üzere çeşitli büyük firmalarca üretilip pazara sürülmektedir. Yıllık getirisi 100 milyon US doları geçen piyasası olan bir üründür [3].

Endüstriyel ölçekte en çok kullanılan ve üretilen, ekonomik ve fizyolojik etkinliği en fazla olan gibberellik asit bitkilerin yanı sıra *Gibberella fujikuroi*, *Sphaceloma sp.*, *Phaeosphaeria sp.*, *Azospirillum sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Aspergillus niger* vb. çok sayıda mikroorganizma tarafından da üretilmektedir [4].

Günümüzde gibberellik asit üretimi için kaynak *Gibberella fujikuroi* kullanılarak fermantasyon (kesikli, geri beslemeli, sürekli sistemler) teknikleriyle gerçekleştirilmektedir ve dolayısıyla üretimi etkileyen en önemli ekonomik faktör fermantasyon prosesinin maliyetidir [5].

Bu tekniklerde serbest hücreler kullanılarak başlanan çalışmalar daha sonraları immobilize hücrelere doğru yönelmiştir [6,7]. İmmobilize hücre sistemleri, mikroorganizmanın canlı kalma süresinin uzatılması, hücrelerin tekrar kullanılabilmesi, ürün stabilitesinin korunması, ortam koşullarının daha iyi (sıcaklık, pH, besiyeri, konsantrasyonu, biyokitle) kontrol edilmesi gibi avantajlarından dolayı yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır [8]. Kullanılan teknikler genelde pahalı olmakla birlikte bunların arasından maliyeti nispeten düşük yöntemlerin seçilmesiyle daha kolay, hızlı, dayanıklı, verimli ve ucuz bir şekilde ürün elde edilmesi hedeflenmektedir.

Çalışmada Kastamonu - Tosya'dan alınan pirinç bitkisinden gibberellik asit üreticisi fungusun uygun besiortamları kullanılarak izole edilmesi, izole edilen fungusun 18S rRNA sekans analizi ile moleküler tanımlanması ve farklı ortamlarda, farklı fizyolojik şartlarda gibberellik asit veriminin saptanması amaçlanmıştır.

1.1. Literatür Özetleri

1.1.1. Mikroorganizmalar

Yalnızca mikroskop yardımıyla gözlemlenebilen, çoğunlukla tek hücreli, basit yapıdaki organizmalara “mikroorganizma” veya “mikrop” denir. Önemli mikroorganizma grupları; Bakteriler, funguslar, algler, protozoonlar ve belirli şartlarda canlılık özelliği gösteren virüslerdir. Mikroorganizmalar karmaşık yapılı organizmalarda görülmeyen bazı ortak özelliklerle birbirlerine benzerler. Mikroorganizmaları inceleyen bilim dalına “mikrobiyoloji” denir.

Mikroorganizmalar, insan sağlığı ve günlük hayatımızla doğrudan ilgili canlılardır; bunların birçoğu faydalı diğer bir kısmı ise zararlıdır. Ekmek, yoğurt, peynir, turđu, sirke v.b. gıdalar ile antibiyotikler, aşılar organik zcler ve alkol üretiminde mikroorganizmalar kullanılır. Ayrıca atık suların arıtılmasında ve çöplerin bertaraf edilmesinde mikroorganizmalardan yararlanır. Bir kısım mikroorganizmalar insan, hayvan ve bitkilerde çeşitli hastalıklara sebep olurlar. Gıda ve yemleri bozarlar. Su boruları, ahşap binaları kumaş v.b. organik eşyaları rtrler [9].

Mikroorganizmalardan, inorganik hammadde kullananlara ototrof, organik besin maddeleri kullananlara ise heterotroflar denir. Enerji kaynağı olarak güneş ışığı kullananlar fototroflar ve kimyasal maddeleri kullanmalarına ise kemotroflar olarak adlandırılırlar.

1.1.1.1. Biyoteknolojide mikroorganizmaların nemi

Mikroorganizmaların insanlar tarafından kullanılması yeni değildir. Bundan 8000 yıl önce Sümer ve Babiller bira gibi alkollü içkileri yapabiliyorlardı. Mısırlılar bundan 6000 yıl önce hamur mayası kullanarak, ekmek yapmayı biliyordu. Bugün mikrobiyolojik ve biyokimyasal bilgileri endüstride kullanmak için, mikroorganizmaların üretimi ve onların metabolik ürünlerinin ekonomik olmasını sağlayan yöntemler geliştirilmiştir. Endüstriden kullanılacak mikroorganizmalar genellikle bakteri ve fungus türlerinin uygun suşlarıdır. Büyük retim kazanları için önemli miktarlarda mikroorganizmaya gereksinim vardır. Bunlar önce katı besin ortamındaki hücre kolonilerinden elde edilir. Bunun akabinde hücre kolonileri adım adım çalkalama kültürüne aktarılır ve son olarak büyük kaplara konur. Bunlara biyoreaktör veya üretim fermenteri denir. Fermantasyon sistemi ve besin ortamı steril olmalıdır.

Mikroorganizmaların biyoteknolojideki önemi, insanların kullanabileceği maddeleri retmelerindedir. Bu maddeler enzim, vitamin, organik asit ve antibiyotiklerdir. Küçük olmaları nedeniyle mikroorganizmalar, hacimlerine oranla fazla yüzey alanına sahiptir. Böylece besin maddeleri hücre içine, metabolik ürünler ise derhal hücre

dışına nakledilir. Mikroorganizmaların biyoteknolojik tercihlerinin en büyük nedeni ise çok çabuk büyüüp çoğalmalarıdır [10].

Biyoteknoloji alanındaki son gelişmelerle endüstriyel fungusların önemi de artmaktadır. Günümüzde bilinen yaklaşık 120 000 fungus türünden pek çoğu endüstriyel öneme sahiptir. Örneğin *Gibberella fujikuroi* önemli bir fungusdur. Endüstriyel midye işleme fabrikalarında bir yılda meydana gelen atık miktarının 60 000 m³ olduğu, bu atığın temizlenmesi amacı ile *Gibberella fujikuroi* funguslarının kullanıldığı, aynı zamanda da büyüme hormonu olan gibberellik asit ürettiği bildirilmiştir [11].

Yeryüzünde bulunan çok sayıda fungus türü çeşitli kimyasal maddeleri sentezleyebilmekte ve bu yetenekleri uzun yıllardan beri araştırmalara konu olmaktadır. Funguslar çok sayıda ve farklı karbon kaynaklarını kullanabilme yeteneğine sahiptirler. Fungus kullandığı besin maddelerini, enerjiye, maya ve hücre oluşumu için gerekli maddelere çevirir. Üreme için gerekli olan bileşikler primer metabolitler, bu olaya da primer metabolizma denilmektedir. primer metabolitlerin birçoğu hücre replikasyonu ve büyümesi için gerekli maddelerdir. Primer metabolit olan bu maddelere sitrik asit, etanol, glukonik asit, vitamin, aminoasit ve polisakkarit örnek verilebilir [12].

Sekonder metabolizma primer metabolizmaya zıt olarak fungus büyümesi için esas olmayan metabolitlerin üretildiği, çoğalmanın ve ölümün dengede olduğu durağan fazdır. Literatür bilgilerine göre genelde funguslarda üreme ortamında besin maddelerinin azalmasıyla birlikte sekonder metabolitlerin (örneğin gibberellik asit, absisik asit) sentezinin başladığı bildirilmiştir. Ayrıca birçok mikroorganizmada inorganik fosfatın sekonder metabolitlerinin üretimini kontrol ettiği de bildirilmiştir. Antibiyotikler, toksinler, alkaloidler, antikanser ilaç ham maddeleri, boyalar, büyüme regülatörleri gibi maddeler endüstri ve tarım açısından öneme sahip en iyi bilinen sekonder metabolitlerdir.

1.1.1.2. Funguslar

Ökaryotik canlılar olup, gelişmiş bir çekirdeğe sahiptirler. Bakterilerden bu yönleriyle ayrılırlar. Ayrıca bakterilerden daha büyük hücrelere sahiptirler. Fotosentetik pigment içermezler bu yüzden parazit veya çürükçül yaşarlar. Eşeyli veya eşeysiz çoğalabilirler. Genel olarak 3 kısımda incelenirler.

1.1.1.2.1. Küfler

Besin maddeleri üzerinde beyaz ya da renkli görünüşleriyle dikkat çekerler. Çürükçül, parazit ya da simbiyotik olarak yaşayan heterotrofororganizmalardır. Yani sentez yapamadıklarından daha önce oluşmuş organik maddelere gereksinim duyarlar. Karbon kaynağı olarak genellikle glukoz, sakkaroz ve maltozu seçerler. En çok amonyum azotunu bazı türleri nitrat ve nitrit azotlarını kullanırlar. Küf mantarları aerob olduklarından yüzeyde gelişirler.

Günümüzde pek çok ülkede fermente ürünlerin elde edilmesinde kullanılırlar. Tercih edilmelerinin en büyük nedeni, patojen olmamaları ve toksik madde oluşturmamalarıdır. Buna rağmen insanlar için çok tehlikeli olduğu bilinen bazı küf türleri de vardır. Bunlardan *Aspergillus fumigatus* toksik madde üreten küflere bir örnektir. Küflerin bileşiminde % 15-50 oranında protein bulunur. Nükleik asit oranı % 10 kadardır. Proteinlerin aminoasit yapısı diğer mikroorganizmalara benzer. Doğada çok yaygın olarak bulunan küfler, çok hücreli iplikçikler oluşturarak gelişirler. Yapısında hif adı verilen, tüp şeklinde dallanmış iplikler bulunur. Hifler yaklaşık 2-10 mikrometre genişliğindedir. Bazı hifler bölmeli bazıları bölmesizdir.

Hiflerin uçlarında uzamaları, dallanmaları ve birleşmelerinden oluşan ağ adapte olma özelliği gösterir. Çoğalmaları sporlar yardımıyla olur. Sporlar eşeyli veya eşeysiz olarak oluşabilirler.

Büyük bir kısmı 25°C ile 36°C'lerde iyi gelişirler. Ancak genel olarak küf miselleri 30°C'nin üstündeki sıcaklıklara toleranslı değildir. Küflerden alkol, antibiyotik ve organik asitlerin üretiminde endüstri alanında geniş ölçüde yararlanılmaktadır [9].

1.1.1.2.2. Mayalar

Fungusların tek hücreli grubudur. Oval veya yuvarlak şekillerde olup çiçeklerin nektarı üzerinde, meyve ve toprakta bulunurlar. Oksijensiz ortamda şekeri, alkol ve karbonik aside çevirirler. Oksijenli ortamda ise şekeri alkole çevirmeden yeni maya hücrelerinin yapımı için harcarlar. Mayalar tarih öncesinden beri bütün alkollü içkilerin fermantasyonu ile ekmeğin kabarmasını temin etmek için kullanılmaktadır. Çeşitli faktörlerden dolayı, renkleri ve şekilleri ne kadar farklı olursa olsun, bütün mayaların besin olarak birçok ortak özellikleri vardır. Mayalarda ham protein oranı % 55-60 kadardır. Mayaların madde ağırlığı esas alındığında nükleik asit miktarı %15 civarındadır. Bu miktar azaltılabilir. Mayalar zaman zaman üreme dönemlerinde birbirlerine yapışık olarak koloniler halinde veya zincirler oluşturabilirler. Bu şekilde hücre zincirlerinden oluşmuş ipliğe yalancı hif denir. Bazı funguslar için küf veya maya ayrımı yapmak zordur. Bunlar buldukları ortam koşullarının etkisiyle görünüm değiştirebilmektedirler. Ancak genel anlamda iplikçik görünümünde olan funguslara küf, tek hücreli yapı gösteren mantarlara da maya denilmektedir [9].

1.1.1.2.3. Şapkalı Mantarlar

Fungusların bu grubu üzerinde şapka şeklinde bir yapıya sahiptir. Beslenmede tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Şapkalı mantarın ticari üretimine daha 16. yüzyılda başlanmıştır. Bugün yeryüzünde bilinen mantar türlerinin ancak 25'i beslenmede kullanılır. Bu mantarlar gıda olarak yüksek potansiyele sahiptir. Özellikle protein bakımından zengindir. Besin olarak kullanımlarının dışında bazı ilaçların yapımında da kullanılmaktadır [9].

1.1.2. Bitki Hormonları

Bitkinin belirli bölümlerinde oluşturulup, diğer kısımlarına taşınabilen, çok küçük miktarlarda etkin olabilen, bitkinin besin maddesi (karbon ve enerji veya gerekli mineral elementleri sağlayan madde) dışında kalan organik maddelerine bitki hormonları denir.

Bitki büyüme düzenleyicisi olarak etki eden organik madde küçük miktarlarda büyüme ve gelişmeyi teşvik eder, engeller veya nitel olarak değişikliğe uğratar. Bitkilerin doğal ürünleri olan tüm hormonlar büyüme düzenleyicisidirler fakat bunun tersi doğru değildir. Yani büyüme düzenleyici maddeler hormon kapsamına girmezler. Örneğin indol-3-asetik asit, zeatin, gibberellic asit, absisik asit hem hormon hem de büyüme düzenleyicisidir. Bitkilerde sentezlenmesi ve taşınabilmesine rağmen sakkaroz bir hormon değildir. Sakkaroz sadece çok yüksek konsantrasyonlarda büyümeye sebep olur.

Bir maddenin büyütücü etkisi olup olmadığı, kullanım miktarı yani konsantrasyonu ile anlaşılır. Bitki büyüme maddeleri bir konsantrasyonda teşvik edici özellik gösterirken, diğer bir konsantrasyonda da engelleyici özellik gösterebilir.

Bitkinin değişik organları bitki büyüme maddelerine değişik reaksiyon gösterebilir. Örneğin bitki büyüme düzenleyicilerinden gibberellin, bir bitkinin sürgün büyümesini arttırırken, yine aynı bitkinin kök büyümesini engelleyebilir.

Bitkinin değişik gelişme süreçlerinde bitki büyüme maddelerinin etkileri farklı olabilir. Değişik bitki türlerinin büyüme maddelerinden etkilenmeleride farklıdır.

Bitkilerdeki temel işlevleri dikkate alınarak, büyüme düzenleyici maddeler iki ana grupta toplanabilir.

1.1.2.1. Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Bitkilerde doğal olarak oluşan büyüme ile buna bağlı diğer fizyolojik faaliyetlerini kontrol eden, meydana geldikleri yerden başka bir yerde de aktif olabilen, çok az yoğunluklarda sentezlenen etki edebilen maddelerdir [13].

Bitkilerde büyüme, gelişme ve farklılaşma olayları, fiziksel özellikleri (fenotip) ve genetik özelliklerinin (genotip) dış çevreyle olan etkileşimleri sonucunda meydana gelir. Bu süreç sırasında gerçekleşen seri haldeki değişimler kontrol sistemlerine gerek duyar. Bitki büyüme ve gelişmesinde rol oynayan en önemli içsel kontrol sistemi bitki hormonları bir diğer ifade ile fitohormonlardır [14].

Birçok araştırmacı bitki hormonları terimi yerine döngüsel bir sisteme sahip olmadıkları ve etkilerinin bitki doku ve organ tipine bağlı olarak farklılık göstermesinden dolayı bitki büyüme regülatörleri ifadesinin kullanılması önerilmektedir [13].

Bitki büyüme regülatörleri arasında ilk keşfedilen indol asetik asit olmuştur. Daha sonra 1950'li yıllarda gibberellinler, sitokinler, absisik asit ve etilen keşfedilmiştir. Bu yıllardan sonra hormonlarla ilgili çalışmalar hızla gelişmeye başlamıştır [14].

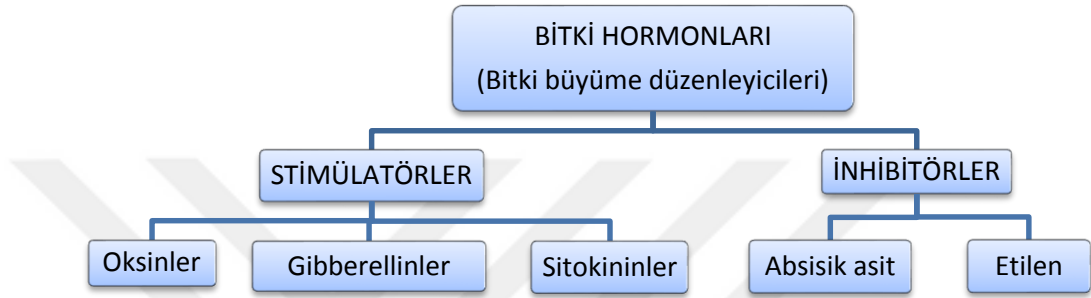
1.1.2.1.1. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Sınıflandırılması

Bitki büyüme regülatörleri çok küçük konsantrasyonlarda (10^{-7} M'dan daha az) çevresel uyarıcılara karşı verilen fizyolojik cevapları etkileyen küçük kimyasallardır. Bunlar metabolik ya da gelişim proseslerini direkt olarak etkileyerek değil sadece bunları düzenleyerek etkin olurlar. Bitki büyüme regülatörleri yaygın olarak tarımda, bahçecilikte ve biyoteknoloji alanlarında bitki büyümesini ve farklılaşmasını düzenlemek için kullanılırlar [14].

Bitki büyüme regülatörleri; hücre bölünmesi, hücre büyümesi, çiçeklenme, meyve olgunlaşması, hücre farklılaşması, hareket (tropizm), stomalı iletim (taşıma), tohum

dormansisi, yaşlanma ve yaprak dökümü gibi birçok fizyolojik olayda rol sahibidir [15].

Bitki büyüme regülatörleri etki mekanizmaları ele alındığında bunlar, büyüme hormonları, organ yapıcılar, yara hormonları olarak gruplandırılmaktadırlar [13]. Bunlardan ayrı olarak son yıllarda temelde beş sınıfa ayrılarak incelenmektedirler.



Şekil 1.1. Bitki hormonlarının (bitki büyüme düzenleyiciler) gruplandırılması [9].

Bunların dışında bitki büyüme ve gelişiminde önemli etkileri olan hormon benzeri maddelerde vardır. Örn: Poliaminler, salisilik asit, brassinosteroidler, florigenler vb [16].

1.1.3. Gibberellinler

1.1.3.1. Gibberellinlerin Keşfi ve Tarihçesi

Pirinç dünya çapında en önemli gıda maddelerinden birisidir. Dünya nüfusunun yaklaşık olarak yarısının temel gıdası olan pirincin tüketimi her geçen gün giderek artmaktadır [17].

Birleşmiş Milletler gıda ve tarım organizasyonunun 2011 verilerine göre dünya genelinde 163.4 x 106 hektarlık bir alan üzerinde yılda 718.3 x 106 ton pirinç üretimi yapılmaktadır [18].

Yüksek ekonomik öneme sahip olan pirinç bitkisi üzerinde *Fusarium fujikuroi* Nirenberg [*Gibberella fujikuroi* (Sawada)'nın teleomorf hali], Bakanae hastalığının etken maddesini barındırır [19].

Bakanae Hastalığının etkisi Asya ülkelerinde daha belirgin olmuştur, son zamanlarda *Fusarium fujikuroi*'nin önemi Avrupa'da da artmıştır [20].

Bakanae hastalığının tipik belirtileri sararma, bodurluk, uzama, kök ve taç çürüklüğüdür [21].

Hastalıktan kaynaklanabilecek ekin kayıpları salgın durumunda %40'lara ulaşabilmektedir [22].

1898'de Japonya'da keşfedilmiş olmalarına rağmen, gibberellinler batılı araştırmacıların dikkatini çok daha sonra çekmişlerdir. Gibberellinler ilk kez pirinç paraziti olan *Gibberella fujikuroi*'de (batıda *Fusarium moniliforme*) keşfedilmişlerdir ve ismini de *Gibberella fujikuroi*'den almışlardır. Bu fungus konak bitkide devleşmeye neden olmaktadır (Bakanea hastalığı) [23].

1926'da Kurosawa adlı fizyolog pirinç bitkisinin aşırı büyümesinin fungusun sulu ekstraktı ile de sağlanabileceğini göstermiştir.

1926'da Kurosawa tarafından pirinç fidelerinden izole edilen fungus filtratlarının kontrolsüz uzamaya neden olan bir kimyasal madde salgıladığını bulunmuştur [24].

1938'de Yabuta ve Sumiki elde ettikleri katı kristal formda Gibberellin A ve Gibberellin B ürünü elde edilmiştir. Bu kristal madde karışımına gibberellin ismini vermişlerdir. Bu maddenin çok düşük dozlarda verilmesi halinde sadece pirinçte değil, diğer değişik bitkilerde de büyümede aşırılıklara neden olduğu görülmüştür.

1955'te Sumiki ve Takahashi Gibberellin A'nın metal esterlerini 3 komponente ayırmayı başarmışlardır. Elde edilen bu yapılar Gibberellin A₁, A₂ ve A₃ olarak adlandırılmıştır. Gibberellin A₃, gibberellik asit olarak tanımlanmıştır.

1956'de Amerika Birleşik Devletleri'nde West ve arkadaşları. İngiltere'de Brian gibberellin üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışmalar sonucunda gibberellinlerin tüm bitki gruplarında bulunduğu anlaşılmıştır.

1957'de Gibberellin A4 denilen yeni bir kimyasal da Takahashi ve arkadaşları tarafından bulunmuştur [25].

1957'de Brian ve arkadaşları gibberellinler içinde gibberellik asidin önemini vurgulayan bir derleme çalışması yayınlamışlardır.

1959'da Marjorie ve arkadaşları *Fusarium moniliforme*'den fermantasyonla gibberellik asit üretmişlerdir.

1960'larda gibberellinlerin fungal ve bitkisel olmak üzere farklı kaynaklarda da yer aldığı belirtilmiştir.

1968'de MacMilan ve Takahashi Gibberellin A_{1-n} şeklinde numaralandırılması gerektiğini önermişlerdir.

Daha sonraki yıllarda yeni gibberellinlerin keşfi sürerken, gibberellinin fermantasyonla üretimi çalışmaları hız kazanmıştır.

Ülkemizde gibberellik asit ve bitki büyüme hormonu üretimi ile ilgili çalışmalara 1990'lı yıllarda başlanmıştır. Ülkemizdeki çalışmalar genellikle yeni fermantasyon tekniklerinin ve uygun üreme koşullarının saptanması ile üretim sırasında endüstriyel atıkların kullanılması üzerinedir [26].

Günümüzde büyüme hormonları bitki dokularından, funguslardan, bakterilerden, yosunlardan ve likenlerden, dietileter, metanol veya etilasetat gibi organik

çözücülerle ekstrakte edilerek elde edilmektedir. Ayrıca analiz için UV ve IR spektroskopisi, gaz kromatografisi, gaz kütle spektroskopisi, ince tabaka kromatografisi, tarayıcı densitometre, florometri gibi hassas fizikokimyasal teknikler ve son yıllarda yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) teknikleri kullanılmaktadır.

Modern tekniklerin kullanımıyla bilim insanları 136'dan fazla bitki ve fungal kaynaklı, bitkilerde farklı rolleri olan gibberellin tanımlanmıştır.

1.1.3.2. Gibberellinlerin kimyasal, fiziksel ve biyolojik özellikleri

Gibberellinler tetrasiklik halka sistemi içeren diterpen yapısında bileşiklerdir. Terpenler izopren (2-metil-1,3-bütadien) polimeridirler. Diterpenler dört izopren birimi içerirler. Gibberellinlerin sistematik adlandırılmasında bu iskelet temel olarak alınır. Çoğunlukla gibberellinler ticari isimleri ile “ gibberellin A₁, A₂, A₃ A_n ya da GA₁, GA₂, GA₃ GA_n” şeklinde adlandırılırlar. Bu numaralar gibberellinlerin keşfedildikleri sıraya göre verilmişlerdir.

Gibberellinler iki gruba ayrılırlar. C₂₀ gibberellinleri ve C₁₉ gibberellinleri. C₂₀ gibberellinleri 20 karbon (C) atomlu diterpen iskeleti taşırlar. C₁₉ gibberellinleri genetik olarak bir karbon atomu (20 nolu C atomu) kaybetmişlerdir ve C₁₉ hormonları C₂₀ hormonlarından daha yüksek aktifliğe sahiptirler. A₁, A₃, A₄ ve A₇ gibberellinleri bu gruba aittirler.

Gibberellinler arasında yapısal farklılıklar hidrosilleme, yükseltgenme, halka küçülmesi ve birçok fonksiyonel grupların eklenmesi sonucunda oluşur. Bu farklılıkların sonucu olarak gibberellinlerin polarlıkları geniş bir aralığa yayılır ve çözünürlükleri de farklı olur.

Gibberellinler arasında en önemlisi Gibberellin A₃ ya da GA₃ olarak gösterilen gibberellik asittir. Çünkü GA₃ mikrobiyal fermantasyonda yüksek verimde oluşur ve

bitkilerde yüksek biyolojik aktiviteye sahiptir. Çizelge 1.1'de gibberellik asitin özellikleri verilmiştir.

GA₃ beyaz kristal bir katı formunda bulunur ve suda 5 g/L olacak şekilde çözünür. GA₃ etanol, metanol, etilasetat, bütilasetat ve asetonda kolayca çözünür. Gibberellik asit kuru halde kararlı fakat sulu çözeltilerinde kararsız bir formdadır. Seyreltik sulu çözeltilerinde yarı ömrü 20°C'de 14 gün ve 50°C'de 2 saattir. Sulu çözeltilerinde GA₃ pH değeri 3-4 arasındadır.

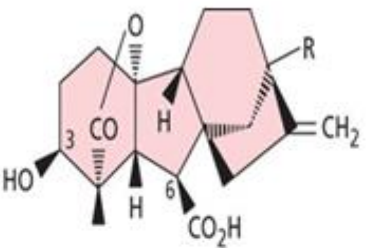
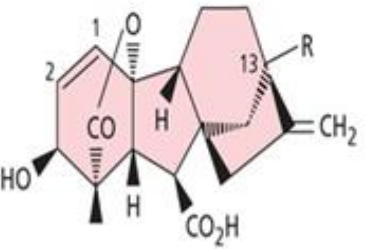
Bitkilerde doğal olarak bulunan gibberellinlerin sadece üçte biri fizyolojik olarak aktiftir. Gelişmiş bitkilerde en çok tayin edilen ve aktif olan gibberellin, GA₃ yani gibberellik asittir. Bitki dokuları 1 kg yaş ağırlıkta 0,001-1,0 mg arasında gibberellik asit içerirler.

Genellikle aynı bitkide farklı gibberellinler bulunur ve bunlar bitkinin farklı gelişme basamağına göre değişir. Bitkilerin hormonal sistemi içinde bulunan gibberellinler diğer bitki büyüme hormonlarıyla oksinler, sitokininler, absisik asit ve diğer bitki düzenleyicilerle etkileşirler. Aşağıda gelişmiş bitkilerde gözlenen gibberellin etkileri maddeler halinde verilmiştir.

- 1- Cüce bitkilerin boyca uzaması
- 2- Uzun gün bitkilerinde gövde uzaması
- 3- Meyve oluşumunun artması
- 4- Çiçeklenmenin uyarılması
- 5- Tohum oluşumunun hızlanması
- 6- Canlanma

GA₃'ün bazı hayvansal organizmalarda toksik etkisi de araştırılmıştır. Örneğin farelerde oral uygulamaya tolerans sınırı 25 g/kg, damar içine enjeksiyon yoluyla uygulamada ise tolerans sınırı 6.3 g/kg'dır. Şimdiye kadar hayvan ve bitki doku kültürlerinde kanserojen etki gözlenmemiştir.

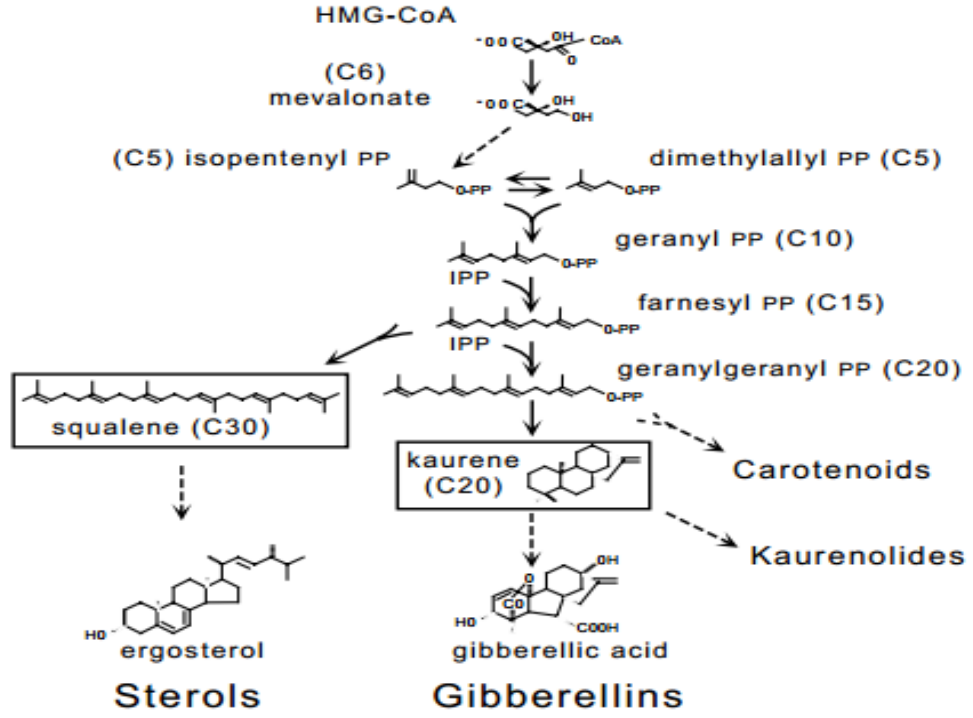
Çizelge 1.1. Bazı önemli gibberellinlerin yapısı [9].

ADI	FORMÜLÜ	KİMYASAL YAPISI	MK(g/mol)
GA ₄	C ₁₉ H ₂₄ O ₅		332
GA ₁	C ₁₉ H ₂₄ O ₆	GA ₄ R = H GA ₁ R = OH	348
GA ₇	C ₁₉ H ₂₂ O ₅		330
GA ₃	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	GA ₇ R = H GA ₃ R = OH	346

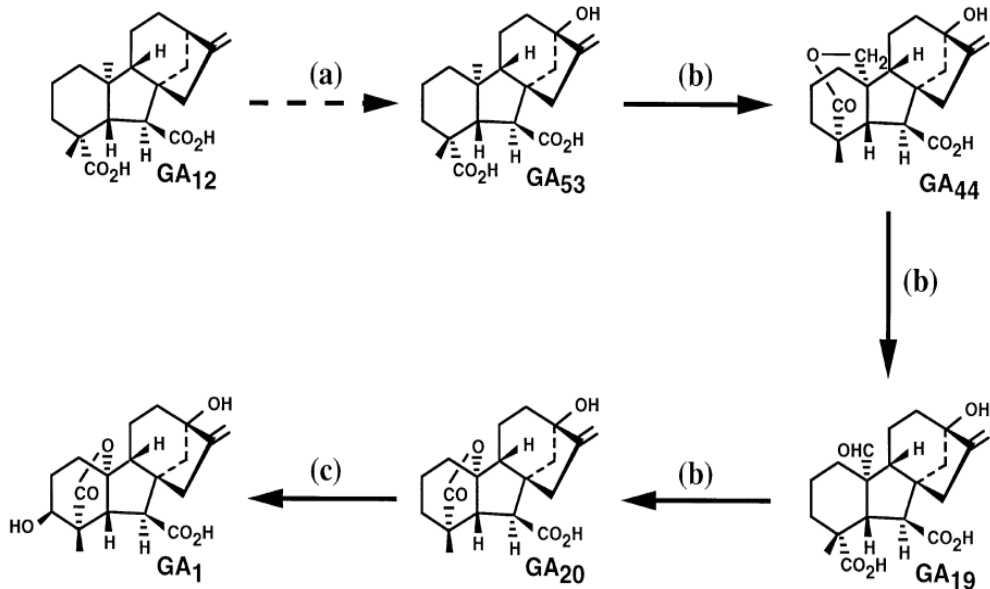
1.1.3.3. Gibberellinlerin biyosentezi

Gibberellinler tetrasiklik diterpenoidlerdir. Bu terpenoid beş karbon iskeletinden oluşmaktadır. Buna izoprene denilmektedir. Gibberellinler dört izoprenoid'den meydana gelmiştir [26].

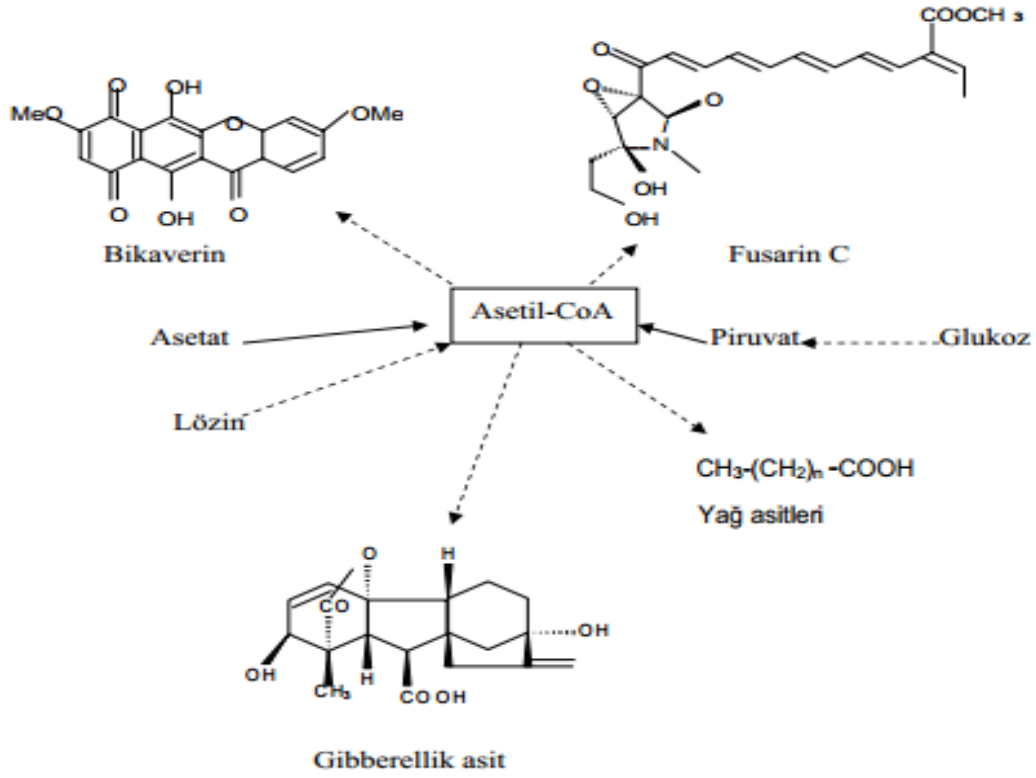
Gibberella fujikuroi'de ilk belirlenen gibberellin tipi GA₄'tür. GA₄, GA₁ veya GA₇'ye dönüşebilir. GA₁ ve GA₇'nin ise GA₃'ün öncül maddesi olduğu ispatlanmıştır [12,27].



Şekil 1.2. Sterol ve gibberellinlerin biyosentezi [28].



Şekil 1.3. Piriñç bitkisinde erken 13-hidroksilasyon yolağındaki metabolik adımlar [29].



Şekil 1.4. Asetil-CoA'dan gibberellinlerin, yağ asitlerinin, fusarin C ve bikaverinin biyosentezi [9].

1.1.3.4. Gibberellinlerin ölçüm metodları

Gibberellinler NMR (Nükleer Magnetik Rezonans), kütle spektrofotometrik ve X-ışın analiz gibi fiziksel birçok metodlarla tanımlanabilir. Ayrıca kromatografik yöntemlerle, floresan yöntemi ile de gibberellin tespiti yapılabilir. Bunların dışında gibberellinlerin de içinde bulunduğu bitki büyüme düzenleyicilerinin analizinde HPLC (High Performance Liquid Chromatography) metodunun kullanılması ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Bu metod her tip için özgüdür ve çok hassas bir yöntemdir [30].

Gibberellik asitin tespit edilmesi için uygulanan spektrofotometrik yöntem ise Holbrook, Edge ve Bailey tarafından tasarlanmıştır [7]. Bu yöntem gibberellik asitin gibberellonik aside dönüşümü esasına dayanır. Bileşenin 254 nm'deki

absorbsiyonunun tayini ile tamamlanır. Ortamda yabancı ürünlerin varlığında gibberellik asit için özel bir metottur [7].

İnce tabaka kromatografisinde gibberellik asit noktaları sülfürik asit ile belirlenir ve UV lambasında gözlemlenir. Bu metodun hassasiyeti 0.003 ppm civarındadır. Son zamanlarda bitkilerde bulunan gibberellin karışımlarının karakterizasyonu ve ayrımı amacıyla tercih edilen metot gaz kromatografisi ile kütle spektrofotometrisinin birleştiği GC-MS metodudur. Diğerlerine kıyasla daha tatmin edici sonuçlar elde edilmesi, metodu başarılı kılmıştır [31].

Bitki özütlerindeki gibberellin tayininde hızlı ve basit bir diğer metot da amilaz enzimi aktivitesine dayalı olarak çalışmaktadır. Bu metodun çalışma prensibi de arpa endosperminden salınan α -amilaz tarafından oluşturulan redükte şekerin uygun bir inkübasyon periyodundan sonra ölçülmesi yer alır [32].

Son yıllarda ise özellikle edilen tarım ürünlerinde (sebze ve meyvelerde) kalıntı halindeki GA_3 'i hızlı bir şekilde tespit ihraç etmek için iyon-seçici elektrotlar geliştirilmiştir. Bu metotta, gibberellat anyonlarına seçici elektrotların analitik uygulaması ve değerlendirilmesiyle 10^{-4} ve 10^{-1} mol. L^{-1} arasındaki miktarı tespit edilebilmektedir [33].

Ayrıca enzim işaretli antikorların kullanımıyla da hızlı bir şekilde analiz edilebilmektedirler [34].

1.1.4. Mikrobiyal İdentifikasyon

İdentifikasyon, tanıma anlamına gelir. Bir mikroorganizmanın kimliklendirilmesi de identifikasyon adını alır. İdentifikasyon işlemleri, o mikroorganizmanın ait olduğu genusun ve spesifik epitelinin belirlenmesine kadar devam ettirilir. Gerektiğinde tiplerine (serotip, genotip vb.) ve varyetelerine kadar ilerletilir [35].

İdentifikasyon amacı ile de kullanılan basit biyokimyasal testler ile immünolojik, genetik, immünoenzimatik vb. pek çok gelişmiş yöntem bulunmaktadır. İdentifikasyon zor, deneyim isteyen, uzun süre alan ve pahalı bir uygulamadır. Yüzlerce identifikasyon testi arasından belirli bir sistematik yaklaşım ile en basit ve en çabuk sonuç verecek olanlar seçilmelidir [36].

Mikroorganizmaların sınıflandırılmasında ve tanımlanmasında kullanılan klasik tekniklerin sınırlı olmasından dolayı, mikrobiyal çeşitlilik ve mikroorganizmaların ekosistemdeki rolü ile ilgili bilgilerimiz oldukça azdır. Mikroorganizmalar birbirine benzerliklerinden dolayı, morfolojik yapılarına göre sınıflandırma yapmak zordur. Metabolik ve biyokimyasal özelliklere dayanan sınıflandırmada karşılaşılan en büyük problem ise; mikroorganizmaların birebir kendi doğal ortamlarını yansıtan kültür ortamlarında yetiştirilememesidir. Bu nedenle mikrobiyal çeşitliliği ve mikroorganizmaların ekosistemdeki rolünü daha iyi anlayabilmek için, tamamlayıcı mikrobiyolojik yaklaşımlara ihtiyaç vardır [37].

Mikrobiyal çeşitliliği ve dağılımı belirleme çalışmalarında, 18S rRNA gibi moleküler işaretlerin kullanılması ile “moleküler mikrobiyal ekoloji” olarak tanımlanan yeni bir disiplin ortaya çıkmıştır. Termal su kaynakları, sediment yapılar ve deniz suyu gibi farklı habitatlardan alınan numunelerde, moleküler tekniklerin temelini oluşturan yöntemlerle yapılan çalışmalar sonucunda, mikrobiyal çeşitliliğin bildiğimizden çok fazla olduğu ve klasik tanımlama tekniklerinin ne kadar yetersiz kaldığı anlaşılmıştır [38].

1.1.4.1. Geleneksel Yöntemler

Suşlar arasındaki ayrımı sağlayabilmek için gen ekspresyonunun ürünü karakterize eden (gözlemlenebilir karakterleri) ve genelde cins-tür düzeyinde identifikasyona olanak sağlayan geleneksel fenotipik yöntemler arasında morfolojik, fizyolojik, metabolik, biyokimyasal özellikler ve kemotaksonomik markörler (hücrel yağ asitleri, mikolik asit, polar lipitler, quininler, poliaminler, hücre duvarı bileşikleri, ekzopolisakkaritler) ile beraber faj tiplendirmeleri, hücre yüzeyindeki antijenler,

antimikrobiyal duyarlılık profilleri ve toplam hücre ya da hücre duvarı proteinlerinin elektroforetik patternleri (1D yada 2D) yer almaktadır. Farklı pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonunda gelişme, gaz üretimi gibi bazı basit fizyolojik testler cins identifikasyonunda kullanılmaktadır. Karbonhidrat fermantasyonu gibi biyokimyasal testler fenotipik yöntemler olarak kullanılmakta ve tür bazında ayırım sağlayabilmektedir [36-39].

1.1.4.2. 18S rRNA Dizi Analizi

Protein sentezinin oldukça eski ve tüm organizmalarda ortak bir özellik olması nedeniyle organizmalar arasındaki evrimsel ilişkiyi ayırt edebilmek için rRNA'lar üstün moleküllerdir. rRNA eski, fonksiyonel olarak sabit, evrensel olarak yayılış gösteren ve filogenetik farkı ölçülü bir şekilde koruyabilen bir moleküldür. rRNA genlerinin kodlandığı DNA dizileri funguslarda taksonomik ilişkilerin ve genetik varyasyonun belirlenmesi çalışmalarında geniş oranda kullanılmaktadır. Funguslarda çekirdek rDNA, ardışık tekrarlanan rDNA birimleri olarak organize olmuştur. Her birimde üç rRNA geni bulunmaktadır: Küçük rRNA geni (18S vb.), 5.8S rRNA geni ve büyük rRNA geni (28S vb.) [40].

Bu amaçla, 18S rRNA genlerinin incelenmesine dayanan moleküler metotlar ve denatüre gradyan jel elektroforezi (DGGE) kullanılmaktadır. Bu metot farklı işletme koşullarında mikroorganizma popülasyonunda meydana gelen değişimleri izlemek amacıyla kullanılan bir tekniktir. Mikrobiyal tür tayininde, kültürden izole edilen 18S rRNA örneği birleştirilmiş zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile çoğaltılmakta ve RNA profili belirlenerek karışık kültürün hangi funguslardan oluştuğu belirlenmektedir [41].

Dizi analizi öncesi tür farklılıkları, denatüre gradyan jel elektroforezi (DGGE) tekniği ile Guanin (G) ve Sitozin (C) içeriğine göre tespit edilmektedir. DGGE, PZR ile çoğaltılmış DNA örneklerindeki tek baz değişimlerinin belirlenmesinde etkili bir genetik analiz yöntemidir. DGGE analizinde denatüre madde (formamit ve üre karışımı), poliakrilamit jellerdeki yarı erimiş, çift sarmallı DNA moleküllerinin

elektroforetik hareketine bağlıdır. Mevcut çalışmalarda bu deneyden faydalanılarak türlerin zamana bağlı değişimleri gözlemlenmektedir [42].

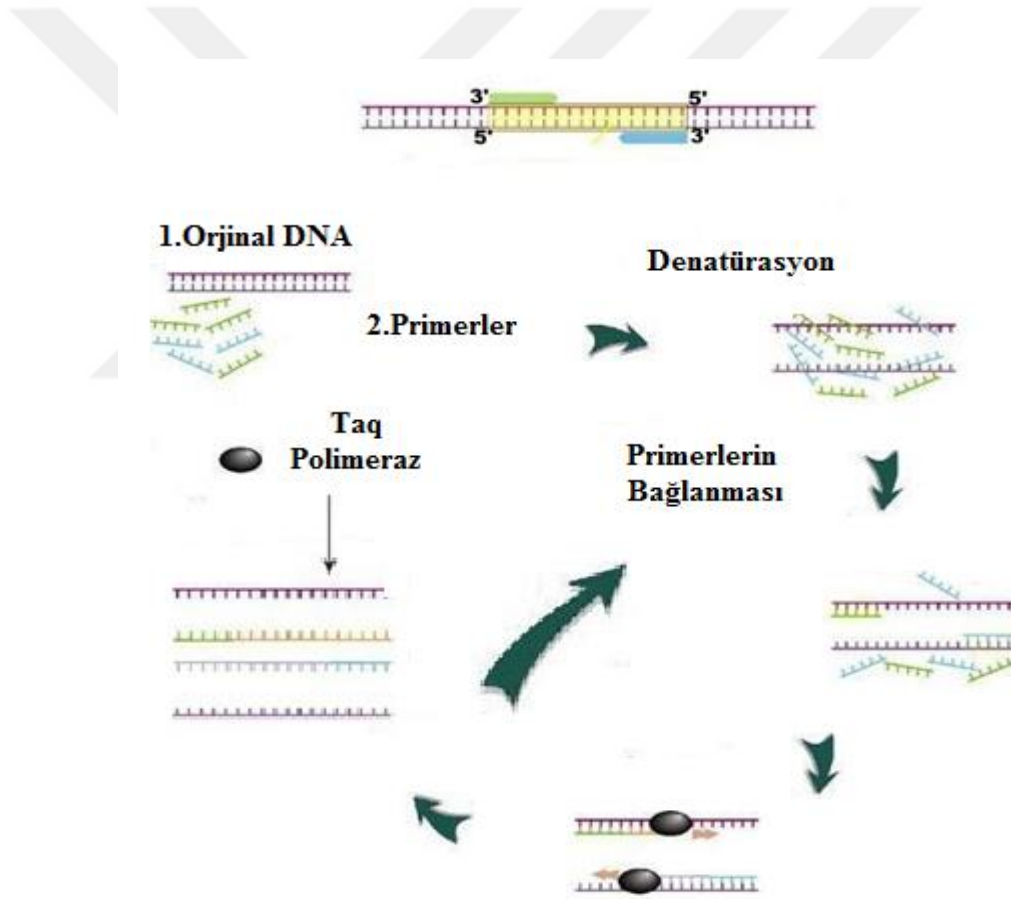
Türlerin birbirinden ayırt edilmesi için klasik PZR ile 18S rRNA genlerinin çoğaltılmasından sonra, DGGE analiziyle türler birbirinden ayırt edilmektedir. Dizi analizi için seçilecek klonların miktarı PZR ve DGGE analizleri sonunda tespit edilmektedir. PZR ya da DGGE jellerinde görüntülenen bantlar, uygun saflaştırma kitleri kullanılarak saflaştırılmakta, bu ürünler daha sonra “dye terminator cycle sequencing” reaksiyonuna sokularak floresan işaretli fragmanların amplifikasyonları gerçekleştirilmektedir. Elde edilen ürün saflaştırılmakta ve formamid çözeltisi içinde süspansiyon edilmektedir. Kapiler elektroforez tekniği ile çalışan cihazdan elde edilen dizi analizi verileri, A-G-C-T dizin dosyaları biçiminde kopyalanarak, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) internet sitesinde BLAST programında değerlendirmeye alınmakta ve bu veri tabanında tanımlanmış mevcut türlerle olan muhtemel farklılıklar raporlanmaktadır [43].

1.1.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR, klasik tanımlama yöntemlerin yanı sıra bakterilerin moleküler düzeyde tanımlanması amacıyla yaygın olarak başvurulan bir teknik haline gelmiştir. Yeni ve güçlü bir teknik olan PZR'nin laktik asit bakterileri için de uygulanması kolay ve çok duyarlı bir tanımlama yöntemi olduğu bildirilmektedir [44-47].

PZR tekniği bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin primerler aracılığı ile çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı bir *in vitro* DNA sentezi yöntemidir. PZR ile hücre içerisinde meydana gelen doğal DNA replikasyonu bir tüp içerisinde taklit edilerek gerçekleştirilmektedir. Hücre içerisinde DNA replikasyonunun gerçekleşebilmesi için bir kısmı enzim özelliği taşıyan birçok proteinin görev yaptığı bilinmektedir. PZR tekniğinde, replikasyonun başlayabilmesi için gerekli olan iki DNA zincirinin birbirinden ayrılması, ortam sıcaklığını 94°C'ye kadar yükseltilmesi ve böylece iki zincir arasındaki hidrojen bağlarının kırılması ile sağlanabilmektedir. Canlı bir hücrede DNA zincirlerinin ayrılma işlemi ise, bu

hücrenin optimum gelişme sıcaklığında (örneğin 37°C’de) ve bu amaçla görev yapan yardımcı proteinlerin sayesinde gerçekleşmektedir. Hücre içi replikasyonun başlamasında bir başka önemli olay primaz adı verilen enzim tarafından genellikle 12 nükleotit uzunluğunda, replikasyonun başlayacağı bölgede, bir RNA primerinin yapılmasıdır. DNA polimeraz bu primere bağlanıp, 3'ucuna nükleotidleri ekleyerek DNA sentezini gerçekleştirmektedir. PZR’de ise replikasyonun başlatılacağı bölgeye özgün olarak bağlanan primerler, reaksiyon karışımının içerisine önceden eklenmekte ve DNA sentezi termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*’dan elde edilen sıcaklığa dirençli Taq DNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir [48].



Şekil 1.5. PZR aşamaları [54].

PZR tekniğinde bu temel üç basamak bir döngüyü oluşturur. Bu döngü genelde 25-35 kez tekrarlanır ve her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgün DNA parçasının her iki zincirinin birer kopyası çıkarılmış olur. Başlangıçta DNA molekül sayısı, PZR işleminin kaç döngü sonunda bitirileceğini belirler. Bir PZR uygulamasında 'n' sayıda döngü varsa, ortamda maksimum '2ⁿ' sayıda çoğaltılmış DNA beklenir. Bu döngüler sonunda elde edilen PZR ürünlerinin tanımlanmasında sıklıkla kullanılan yöntem agaroz jel elektroforezidir. Elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektroforezle ayrıştırılır ve DNA zincirleri etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık kaynağında floresans vererek görünür hale getirilir. Agaroz jel elektroforezinde, jel hazırlığındaki agaroz derişimi DNA moleküllerinin yürümesini etkileyen önemli bir faktör olarak gösterilmektedir [49].

1.1.4.4. 18S rRNA Analizinin Avantajları ve Dezavantajları

Bilimsel yöntemler kullanılarak, canlıların bireysel benzerlik ve farklılıklarının geniş bir bakış açısı ile incelenmesi ve sınıflandırılması, asırlar önce başlamış ve günümüzde de devam eden bir süreçtir. Hayatın çeşitliliği ve yayılımıyla ilgili olayların modelini ortaya çıkaran ve ilgili ağacın yeniden yapılandırılmasını içine alan biyoloji sahası sistematik olarak adlandırılır [50].

Sistematığın amacı, organizmalar arasındaki evrimsel geçmişin ve birbirleriyle olan ilişkilerin belirlenmesi (filogeni) ve daha sonra organizmaların sınıflandırılmasında bu bilgilerin kullanılmasıdır. Sistematik alanında yapılan çalışmalarla, tüm yaşam formlarının filogenetik bir ağaçla bağlantısının kurulması, son 50 yılın en önemli keşiflerinden birini oluşturmaktadır [51].

Canlıları sınıflandırırken jeolojik devirlerde kalmış bu tarihsel hikayeyi de hesaba katmak zorundayız. Bu nedenle her benzerliğin gerçek bir benzerlik (aynı orijinden gelen) olmadığını, ortak ata ve evrimsel tarihi paylaşmış paylaşmadıklarını canlı sınıflandırmasında temel kriter olarak ele almak durumundayız [52].

Filogenetik sistematikğin özü de türemiş (apomorfik) karakterler kullanarak ortak ata ilişkisini yeniden düzenlemek ve taksonları ortak ata temelinde gruplamaktır [53].

Son yıllarda moleküler biyoloji ve genetik alanında yaşanan baş döndürücü gelişmeler sistematik alanında yeni tekniklerin ortaya çıkışını kaçınılmaz hale getirmiş ve bu gelişmeler fungal sistematiğe de etkisini göstermiştir. Funguslar her yıl tarımsal ürünlerde milyonlarca dolarlık zarara neden olmaktadır. Bu organizmaların neden olduğu hastalıkların kontrolü için, fungal türlerin teşhisi ve karakterizasyonu gereklidir [54].

Fungusların morfolojik karakterlerine göre yapılan sınıflandırmalar, moleküler sistematikte belirlenen filogenetik ilişkilerle birlikte yeniden değerlendirilmelidir. Taksonlar arasında morfolojik karakterlerin birbirine anlamlı olmayan benzerliği, indirgenmiş olabileceği ya da taksonlar arasında ortadan kalkmış olduğu durumlarda, filogenetik analiz için moleküler karakterlerin kullanımı önem kazanmaktadır [54].

Geleneksel olarak fungusların sınıflandırılmasında temel kriter eşeyli üreme yapılarıdır. Moleküler karakterlerin kullanımının bir avantajı da, aseksüel fungusların sınıflandırılmasındaki belirsizliği ortadan kaldırıp onların en yakın akrabaları içinde sınıflandırılmalarını sağlamasıdır [54].

1970'lerden günümüze kadar fungal sistematiğe moleküler veriler tüm taksonomik seviyelerde kullanılmakta olup son yıllarda kullanım oranında önemli ölçüde artışlar olmuştur. Moleküler veriler fungi alemindeki yüksek seviyeli taksonomik grupların ve büyük evrimsel soyların belirlenmesinde, düşük taksonomik seviyelerde ise türlerin, kısmi popülasyonların ve bireylerin teşhisinde kullanılmaktadır. Ancak moleküler verilerin yaygın kullanımında bazı sınırlandırmalar da mevcuttur. Bunlardan bazıları, farklı fungal gruplar arasında yöntemlerin karşılaştırılabilirliği ve uyumluluğuyla ilişkiliyken bazıları fungusun adapte olduğu hayat döngüsünün çeşitliliğiyle ilişkilidir. Moleküler verilerdeki mevcut sınırlandırmalara rağmen, fungal sistematikğin anlamamızı kolaylaştırdığı ve bu konuyla ilgili verilerdeki artışa bağlı olarak gelecekte sistematik uygulamalarda daha açıklayıcı olabileceği düşünülmektedir [55].

Son yıllardaki gelişmeler fungal sistematiğe de etkisini göstererek hızlı ve güvenilir teşhislere olanak sağlamıştır. Moleküler çalışmalar yaygınlaşmadan önce morfolojiye ve biyokimyasal tekniklere dayalı araştırmalar yoğun olarak yapılmaktaydı. Ancak bu çalışmalarda özellikle morfolojik olarak yapılan gözlemlerle sonuçlara ulaşmak hem fazlasıyla deneyim hem de oldukça fazla zaman gerektirmekte, ayrıca sonuçlar zaman zaman araştırmacılara göre farklılıklar gösterebilmekteydi. Bu nedenlerle artık geleneksel yöntemlerin yanısıra moleküler yöntemler de fungal sistematiğe sıkça kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan bazıları, giderek yaygın bir kullanım alanı bulan PCR temelli teknikler ve özellikle DNA dizileme çalışmalarıdır. Fungal sistematiğe, değişikliğin ilk meydana geldiği moleküller olan DNA üzerinde çalışmalar yapmak, hem güvenilir hem de hızlı sonuçlar elde etmemizi sağlamaktadır. DNA molekülünde organizmaların evrimini yansıtabilecek türe özgü bölgeler (evrimsel kronometre) olduğu için taksonomik çalışmalarda tercih edilmektedir. Fungal sistematiğe en çok tercih edilen bölge ribozomal DNA (rDNA) birimi içinde yer alan 18S rDNA'nın yanısıra Internal Transcribed Spacer (ITS)'dir. Kodlanmayan bölge olan ITS daha hızlı evrim geçiren bir bölge olup bir tür içindeki suşların ya da bir cins içindeki fungal türlerin karşılaştırılması için kullanışlıdır. Moleküler yöntemlerdeki bu gelişmeler, özellikle ekonomik öneme sahip bitkilerde büyük hasara neden olan ve ürün kalitesini etkileyen hastalık etmeni fungusların kısa süre içinde teşhisinde ve bu doğrultuda önlemlerin alınmasında da faydalı olmuştur [56].

1.2. Atık ve artık değerlendirme çalışmaları

Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de endüstriyel alandaki yatırımlar giderek artmakta; gelişen endüstriyel etkinliklere ve evlerden oluşan atıklara bağlı olarak doğanın dengesi bozulmakta ve böylece önemli çevresel sorunlar oluşarak insan yaşamını olumsuz etkilemektedir. Ekolojik dengenin bu şekilde bozulması çevre kirlenmesi olarak kabul edilmektedir. Endüstriyel kirlenme, gerek karşılaşılan kirlenme sorunlarının çok ve çeşitli olması gerekse doğanın korunması ve bu amaçla alınacak önlemlerin dengesi yüzünden en karmaşık kirlenme şeklini oluşturmaktadır.

Endüstriyel atık suların hiçbir işlem uygulanmadan alıcı su ortamlarına atılması bugün gelişen dünyanın en tehlikeli ve önemli sorunlarından birisidir.

Melas, şeker endüstrisinde atık madde olup, şeker fabrikalarında yan ürün olarak elde edilmektedir. Şekerin kristal hale gelmesi için yapılan birçok işlemden sonra, geriye kalan kıvamlı koyu renkli, yapışkan maddedir. Ortalama %50 sakkaroz, %30 diğer maddeler ve %20 su içerir. Pancar ve şeker kamışından elde edilen 2 tip melas vardır. Pancar ve şeker kamışından elde edilen melasın kimyasal bileşimi çizelge 1.2'de görülmektedir.

Çizelge 1.2. Pancar ve şeker kamışından elde edilen melasların bileşimi [57].

Maddeler	Melaslar	
	Pancar	Şeker kamışı
Sukroz	48.5	33.4
Rafinoz	1.0	-
İnvert şeker	1.0	21.2
Kül	10.8	9.8
Şeker olmayan organik maddeler	20.7	19.6
Azot	1.5-2.0	-
Su	18.0	16.0

Ülkemizde ise 20. yüzyılın ortalarında başlayan ve giderek hızlanan endüstrileşme sürecinde, özellikle gıda, tekstil, kimya gibi sektörler öne çıkmaktadır. Gıda sektörünün önemli bir yan kolu olan süt ve süt ürünlerinin üretimi ve işlenmesi, hem üretim kapasitesi hem de çevreye verdiği kirlilik yükü bakımından ülkemizde önemli bir yer tutmaktadır.

Peyniraltı suyu, süt bileşenlerinden laktoalbumin ve laktoglobulin gibi serum proteinleri ile değişen düzeylerde laktoz, yağ, mineral madde, proteinler içeren ve peynir yapımı sırasında süzme sonucunda oluşan önemli bir yan üründür [58].

Peyniraltı suyunun bileşimi peynire işlenen sütün bileşim ve kalitesine, peynir yapım tekniğine, pıhtılaşmada kullanılan maya veya asit miktarı ile kalitesine, pıhtılaştırma süresi ve sıcaklık gibi birçok parametreye bağlıdır. Süt kuru maddesinin yaklaşık % 45–50’si peyniraltı suyuna geçer. Değerlendirilemeyen peyniraltı suyu, kanalizasyonlara verilerek büyük bir evre problemi oluşurmaktadır. Özellikle küçük ölçekli süt işleme tesislerinde peyniraltı suyunu işleyebilecek alt yapı imkanları olmadığı için bu yan ürün değerlendirilememekte ve kanalizasyonlara verildiği için evre kirlenmesine neden olmaktadır. Ülkemizde 2002 yılında istatistiklere girmiş olan süt üretim miktarı 8.408.566 tondur [59].

Bunun yaklaşık % 20’sinin peynire işlendiği kabul edilirse işlenen süt miktarı yaklaşık olarak 1.681.732 tondur [60].

Peynir yapımında kullanılan sütün yaklaşık olarak % 70-90’lık kısmı peyniraltı suyu olarak elde kalır. Bu da 1.17-1.51 milyon ton peyniraltı suyu oluştuğu anlamına gelir. Bu miktarın ne kadarının işlendiği tam olarak bilinmemekte fakat işletmelerin çoğunda peyniraltı suyu işleme tesislerinin olmadığı ortadadır [58].

Ülkemizde genel olarak peynir işleme tekniğinin yetersizliği, yerli peynirlerde randımanı düşürürken, peyniraltı suyunun miktar ve bileşimini zenginleştirmektedir. Özellikle yağ ve proteinin önemli bir kısmı peyniraltı suyuna geçmektedir. Peyniraltı suyunun bileşiminde yaklaşık olarak % 6.96 oranında süt kuru maddesi bulunmaktadır. Bunda % 0.36 yağ, % 0.84 protein, % 5.76 laktoz ve tuzlar, % 0.2 kadar laktik asit yer almaktadır. Bu değerler çeşitli etkenlere bağlı olarak değişmektedir.

Sütün bileşimi ve kullanılan peynir işleme yöntemlerine göre içerik değişmektedir. Peyniraltı suyunda vitaminler de yer almaktadır. Vitamin A çoğunlukla yağla birlikte peynire geçmekte çok az bir kısmı peyniraltı suyunda kalmaktadır. Vitamin B1, B2

ve C suda çözündüklerinden peyniraltı suyunda kalmaktadır. Vitamin D çok az bulunmaktadır. Bunlardan başka peyniraltı suyunda potasyum oksit % 0.188, sodyum oksit % 0.075, kalsiyum oksit % 0.071, magnezyum oksit % 0.018, demir oksit % 0.001, fosforpentoksit % 0.11, klor % 0.107 ve kükürttrioksit % 0.029 kadar bulunmaktadır. Peynir yapımından kalan yaklaşık % 4–5 oranında laktoz içeren peyniraltı suyu mikrobiyolojik işlemler için iyi birer ham madde kaynağıdır. Peyniraltı suyunda bulunan kalsiyum, fosfor ve laktoz besin değerini yükseltmektedir. Peyniraltı suyu proteinleri yüksek nitelikli olup hayvanların beslenmesinde önemli bir kaynaktır.

Çizelge 1.3. 100 mL peyniraltı suyunun kimyasal bileşimi [61].

Bileşen	Miktar	Ölçü Birimi
Kuru madde	6.3-7.0	g
Yağ	0.05-0.4	g
Ham protein	0.85-1.15	g
Karbonhidrat	4.6-5.2	g
Kül	0.5-0.6	g
Laktoz	4.6-5.2	g
Laktik asit	0.05-0.2	g
Sitrik asit	0.14-0.17	g
Kazein	0.04-0.05	g
α -laktoglobulin	0.12	g
β -laktoglobulin	0.32	g
Serum albümün	0.40	g
Immüoglobulinler	0.70	g
Na	36-51	mg
K	140-160	mg
Ca	40-50	mg
Mg	8-10	mg
Fe	0.10	mg
Cl	70-120	mg

P	40-55	mg
S	15-18	mg
Tiamin	0.03-0.05	mg
Riboflavin (B2)	0.1-0.16	mg
Piridoksin	0.04-0.07	mg
Vitamin C	0.9-1.5	mg
Vitamin A	0.002-0.004	mg

Zeytin karasuyu, zeytin ve zeytinyağı endüstrisinde temel artık maddelerinden birisidir. Önemli bir çevre kirleticisi olan zeytin karasuyu bileşiminde bulunan şeker ve azot çeşitli mikrobiyoloji çalışmalarında artık maddelerin değerlendirilmesi ve üretim çalışmalarında günümüze kadar kullanılmıştır. Bu çalışmamızda da fabrika artıklarından yararlanmak ve ucuz karbon ve azot kaynakları kullanılarak üretim yapmak amacıyla zeytin karasuyu kullanılmıştır. Çizelge 1.2'de zeytin karasuyunun bileşimi verilmiştir.

Çizelge 1.4. Klasik ve sürekli yöntemle zeytinyağı üretimi yapan tesislerden çıkan karasuların bileşimleri [62].

Parametreler	Klasik Yöntemde Atılan Karasu	Sürekli Yöntemde Atılan Karasu
pH	4.5-5	4.7-5.2
Toplam Katı Madde	% 12	%3
Toplam Uçucu Katı Madde	% 10.5	%2.6
Toplam Mineral Katı Madde	%1.5	%0.4
Askıda Katı Madde	%0.1	%0.9
Kimyasal Oksijen İhtiyacı (mg/L)	120 000-130 000	40 000
Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı (mg/L)	90 000-100 000	33 000

Şeker	%2-8	%1.0
Toplam Azot	%5-2	%0.28
Organik Asitler	%0.5-1	-
Polialkoller	%1-1.5	%1.0
Pektin, Tanin vb.	%1	%0.37
Polifenoller	%1-2.4	%0.5
Yağ ve gres	%0.03-10	%0.5-2.3

1.3. Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, Kastamonu - Tosya ilçesinde üretilen pirinç bitkisinden gibberellik asit üreten fungus izole edilmiştir. İzole edilen fungusun moleküler karakterizasyonu, gibberellik asit üretimi için optimum koşullar (pH, sıcaklık, karbon kaynağı etkisi) kesikli sistemde belirlenmiştir. Farklı endüstriyel atıklarda gibberellik asit üretim verimi araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.1. Patates Dekstroz Agar (PDA) Besiyerinin Hazırlanışı

Pirinçten izole edilen fungusların stok kültür şeklinde saklanması için kullanılmıştır. Patates dekstroz agar besiyeri; patates özütü (4.0 g), dekstroz (20.0 g) ve agardan (15.0 g) oluşmaktadır. Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanmadan önce 121°C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir. Sterilizasyon işlemi öncesinde pH 5.6+/- 0.2'ye ayarlanmıştır.

2.1.1.2. Malt Ekstrakt Broth (MEB) Besiyerinin Hazırlanışı

Pirinçten izole edilen fungusların, moleküler çalışmalar için geliştirilmesi amacıyla zenginleştirilmiş besiyeri olarak kullanılmıştır. Malt ekstrakt broth; mikolojik pepton (3.0 g) ve malt özütünden (17.0 g) oluşmaktadır. Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanmadan önce 121°C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir. Sterilizasyon işlemi öncesinde pH 5.4 +/- 0.2'ye ayarlanmıştır.

2.1.1.3. Czapek-Dox Broth Besiyerinin Hazırlanışı

Fungusların üretimi ve gibberellik asit verimi artırma çalışmaları sırasında kullandığımız karbon ve azot oranları ayarlanabilir, genel amaçlı mantar için geliştirici sıvı besiyeridir. Czapek-Dox besiyeri; Sakkaroz (30.0 g), sodyum nitrat (3.0 g), magnezyum sülfat (0.5 g), potasyum klorit (0.5 g), potasyum fosfat dibazik (1.0) g ve demir sülfattan (0.01 g) oluşmaktadır. Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri

kullanmadan önce 121°C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir. Sterilizasyon işlemi öncesinde pH 7.3+/- 0.2'ye ayarlanmıştır.

2.1.1.4. Malt Ekstrakt Agar Besiyerinin Hazırlanışı

Malt özütü agar özellikle fungus ve mayaların tespiti, izlasyonu ve sayımı için önerilen katı zengin içerikli besiyeridir. Çalışmamızda katı kültür ortamında fungusun yetiştirilmesi ve yapılacak deneylere hazırlanması amacıyla kullanılmıştır. Malt ekstrakt agar; malt özütü (30.0 g), mikolojik pepton (5.0 g) ve agardan (15.0 g) oluşmaktadır. Kullanılacak miktarda besiyeri, öncesinde otoklavda 121°C'de 1 atm basınçta steril edilmiştir. Sterilizasyon işlemi öncesinde pH 5.4+/- 0.2'ye ayarlanmıştır.

2.1.1.5. Melash Besiyerinin Hazırlanışı

Ankara Etimesgut şeker fabrikasından alınan melas örneği içerisinde % 3.5 ve % 7 şeker bulunduracak şekilde distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır. İçerisine başka herhangi bir madde katılmaksızın 250 ml'lik erlenmayer içerisinde 100 ml olacak şekilde 121°C de 1 atm basınç altında sterilizasyonu yapılmıştır.

2.1.1.6. Peynir Altı Suyu Kullanılan Besiyerinin Hazırlanışı

Peynir altı suları içerisinde % 3.5 ve % 5 şeker bulunduracak şekilde distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır. İçerisine başka herhangi bir madde katılmaksızın 250 ml'lik erlenmayer içerisinde 100 ml olacak şekilde 121°C de 1 atm basınç altında sterilizasyonu yapılmıştır.

2.1.1.7. Zeytin Karasuyu Kullanılan Besiyerinin Hazırlanışı

Zeytin karasuyunun içerisinde % 3.5 ve % 5 şeker bulunduracak şekilde distile su ile seyreltildi. İçerisine başka herhangi bir madde katılmaksızın 250 ml'lik erlenmayer içerisine 100 ml olacak şekilde 121°C de 1 atm basınç altında sterilizasyonu yapılmıştır.

2.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

Çalışma süresince kullanılan kimyasallar Merck (Almanya) ve Sigma (ABD) firmalarından temin edilmiş veya bu iki firmanın içerikleri göz önünde bulundurularak hazırlanmıştır.

2.1.2.1. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.2.1.1. Tris/EDTA Tamponu (250 mL)

0.3 g Tris ve 0.008 g EDTA tartılarak 250 mL distile suyla (pH 8.0) tamamlanmıştır.

2.1.2.1.2. % 10'luk SDS Tamponu (100 mL)

10 gram SDS tartılarak 100 mL distile suda çözülmüştür.

2.1.2.1.3 Proteinaz-K'nın Hazırlanması (10 mL)

0.0384 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 5 mL gliserol ve 100 μL 1M Tris-HCl (pH 8.0) ile çözülmüştür. Son hacim 10 mL oluncaya kadar distile su eklenmiştir. Hazırlanan bu çözeltiden 10 mL alınarak 100 mg proteinaz-K çözülmüştür.

2.1.2.1.4. NaCl Tamponu (5 M, 100 mL)

20 g NaCl tartılarak 100 mL distile su ile çözülmüştür.

2.1.2.1.5. CTAB/NaCl tamponu (100 mL)

4.1 g NaCl tartılarak 90 mL distile suda çözülmüştür ve 10 g CTAB yavaşça solüsyona eklenerek 65 °C'ye kadar ısıtılmıştır. Son hacim 100 mL oluncaya kadar distile su ile tamamlanmıştır.

2.1.2.1.6. Kloroform/İzoamil Alkol Tamponu (100 mL)

96 mL kloroform 4 mL izoamil alkol ile karıştırılarak 100 mL tampon hazırlanmıştır.

2.1.2.1.7. Kloroform/İzoamil Alkol/ Fenol Tamponu (100 ml)

48 mL kloroform 2 mL izoamil alkol ve 50 mL fenol ile karıştırılarak 100 mL tampon hazırlanmıştır.

2.1.2.1.8. İzopropanol Alkol (100 mL)

İzopropanol alkolden 100 mL alınarak kromozomal DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

2.1.2.1.9. % 70'lik Etil Alkol (100 mL)

70 mL % 100'lük etil alkol ile 30 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

2.1.2.1.10. Tris-HCl Tamponu (50 mM, 100 mL)

70 mL % 100'lük etil alkol ile 30 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

2.1.2.1.11. Tris-HCl Tamponu (1 M, 100 mL)

0.12 g Tris-HCl tartılarak 100 mL distile suda çözülmüştür

2.1.2.1.12. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlama

242 g Tris, 37.2 g Na₂EDTA.2H₂O tartılarak 57.1 mL glasiyel asetik asit ile çözülmüştür. Son hacim 1000 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

2.1.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Primerler ve Özellikleri

Çizelge 2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Primerler

Primer	Dizi (5'-3')	Özellik	Referans
ITS1	TCC GTAGGT GAA CCT GCG	Üniversal, Düz	White et al., 1990
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT	Üniversal, Ters	White et al., 1990

2.2. Yöntem

2.2.1. Çalışma Alanı ve Örneklerin Toplanması

Bilindiği gibi Tosya'nın en büyük tarımsal gelir kaynağı olarak pirinç üretimi ilk sırada gelmektedir. Yapılan bu çalışmada Türkiye'nin Karadeniz bölgesinde bulunan Kastamonu ilinin Tosya bölgesinde yetiştirilen pirinç tarlalarındaki pirinçlerin sulandırılması sonucunda izolasyonu yapılmış olan fungus kullanılmıştır.

Pirinç örnekleri tesadüfi örnekleme yöntemiyle Tosya ilçesinde bulunan çeltik üreticilerinin depoları, çeltik alımı yapan işletmeler, çeltik işleme fabrikaları ve pirinç satışı yapan toptan ve perakende satış merkezlerinden toplanmıştır. Her ambar 200 kg'lık alt numune bölümlerine ayrılarak, her alt birimin üst, orta ve alt kısmından toplamda 10 numune alınarak karıştırılmış ve bu karışımdan 1000 gr numune laboratuvar ortamına alınmıştır.

2.2.2. Gibberellik Asit Üreticisi Fungusun İzolasyonu

Besiyeri ortamı olarak Poteto Dekstroz Agar (PDA) kullanılmış, her numune için 5 paralel çalışılmıştır. Pirinç numunelerinden 10 gr alınarak içerisinde 90 ml steril damıtık su bulunan steril şişelerde 1/10 oranında seyreltilmiştir. Daha sonra petrilere ekim yapılmıştır. İçerisine 30 ml PDA dökülmüş petrilere 0.5 ml ekim yapılarak yayma yapılmıştır. Petriler 28°C de 6 gün inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonunda koloniler sayılmış, her farklı koloni, tek koloni metoduyla petrilere ekilerek fungal kütüphane oluşturulmuştur.

2.2.3. Gibberellik Asit Üreticisi Fungusun Morfolojik Karakterizasyonu

Karışık kültürlerden seri pasajlama işlemleri sonucunda elde edilen tek koloniler PDA ve MEA besiyerlerinde 25°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. 7. günün sonunda pigment üretimleri ve koloni karakterizasyonları not edilmiştir. Literatür

çalışmalarıyla karşılaştırmalar sonucunda izolatların gibberella cinsine benzer pigment üreten ve benzer koloni yapısına sahip olan pasajlar ayrılarak moleküler karakterizasyonu yapılmıştır.

2.2.4. Gibberellik Asit Üreticisi Mantarın Moleküler Karakterizasyonu

2.2.4.1. Kromozomal DNA İzolasyonu

Besince zenginleştirilmiş Malt Ekstrakt Broth 30 °C'de misel gelişimleri gözleninceye kadar inkübe edilmiş, gelişmiş olan miseller toplanılıp sıvı nitrojen ile muamele edilmiştir. Katlaşıp kuruyan miseller bir havanda dövülüp toz haline getirilmiştir. Toz misellerin tartımları yapılarak LETS buffer [20 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M LiCl, % 0.5 SDS] ile muamele edilmiştir. Elde edilen süspansiyon iki defa fenol-kloroform-izoamil alkol solusyonu (25:24:1) ile ekstrakte edilmiş ve DNA etil alkolde çöküntü halinde geri kazanılmıştır. Elde ettiğimiz DNA pelleti % 70'lik etil alkolle yıkanmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kurumuş DNA pelleti 10 mM Tris buffer (pH 8.0) ile muamele edilmiştir ve 2 µL RNase (10 mg/mL) eklenmiştir. Son olarak 65°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.4.2. Kromozomal DNA Miktar Tayini

İzolatlardan elde edilen genomik DNA'lar bütünlükleri bakımından agaroz jel elektroforezinde kontrol edildikten sonra, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri Qubit Fluorometer (Invitrogen) ile yapılmıştır.

2.2.4.3. PZR Amplifikasyonu

ITS1-5.8S-ITS2 bölgelerini amplifiye etmek için ITS1 ve ITS4 primer çifti kullanılmıştır (White et al., 1990). Forward (ITS1, 5'-TCC GTAGGT GAA CCT

GCG G-3') ve reverse (ITS4, 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT-3'). PZR amplifikasyonunda toplam hacmi 25 µL olan PCR karışımı, 2.5 µL buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4 - 500 mM KCl, 1x konsantre), 2.0 µL dNTP (2.5 mM), 1.5 µL ITS1 ve ITS4 primerleri (Invitrogen – 10 pmol µL⁻¹), 1.0 µL MgCl₂ (50 mM), 0.2 µL Taq DNA polymerase (5 U mL⁻¹), 2 µL DNA (5 ng/µL) ve 14.3 µL distile su ile hazırlanmıştır. Thermal cycler da 30 döngü için izlenen prosedür şu şekilde uygulanmıştır. 5 dk 95°C de preheating, 94 ° C'de sn 30 döngü denatürasyon, 45 sn 56 °C primerlerin bağlanması, 1 dk 72°C elongasyon ve 7 dk 72°C son final ekstansiyon. Bütün örnekler PZR'da çoğaltıldıktan PZR saflaştırma kiti ile saflaştırılmıştır.

2.2.4.4. Agaroz Jel Elektrofrez

Her jel için moleküler marker olarak 100 bp Plus DNA Ladder kullanılmış, saflaştırılan PCR ürünleri % 0.7'lik (w/v) agaroz jelde 80 voltta 1 saat boyunca elektroforezde yürütülmüş ve jel, etidyum bromürle boyanarak UV altında görüntülenmiştir.

2.2.4.5. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

PZR ürünlerinin elektroforez ile yürütüldüğü jel daha sonra jel görüntüleme cihazı (Gel Logic 2200 Pro Imaging System, USA) kullanılarak bantların göreceli miktarlarını belirlemek için taranmıştır.

2.2.4.6. Fungal İzolatların Tanımlanması

Tüm izole edilen funguslar 18S rDNA gen sekanslarıyla tanımlanmıştır. Sekanslama, ABI PRISM boya sonlandırıcı cycle sequencing metodu (Perkin Elmer) kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen nukleotid sekansları, BLAST programı

doğrultusunda NCBI GenBank, EMBL ve Ribosomal Database Project (RDP)'de yayınlanan sekanslarla kıyaslanmıştır.

2.2.5. Ekstraktif Fermantasyonda Gibberellik Asit Üretimi

Gibberellik asit üretimi için 100ml Czapek-Dox/250 ml erlenmayer hazırlanarak steril edildi (121°C 1 atm basınç altında 15 dakika). Fungus ekildikten sonra üremesi için 28 °C de inkübasyona bırakıldı.

2.2.6. Gibberellik Asit Ekstraksiyonu

Yapılan çalışmada gibberellik asidin ekstraksiyonu ve saflaştırılması organik çözücü olarak etilasetat kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile yapıldı. Bu yöntem üç aşamada gerçekleştirildi.

1. pH'sı 2N HCl ile 2'ye ayarlanan kültür filtratı ilk aşamada 1:10 volümde ardı ardına üç kez etilasetat ile ekstrakte edildi ve üst fazlar toplandı.
2. Daha sonra 1:1 volümde toplanan üst fazlar 1M NaHCO₃ ile ekstrakte edildi ve alt faz toplandı.
3. Son aşamada toplanan alt fazın pH'sı tekrar 2N HCl ile 2'ye ayarlandı. Sıvı faz 1:10 volümde son olarak etilasetatla ekstrakte edildi ve üst faz toplandı [7].

Elde edilen örnekler Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazında gibberellik asit standardına karşı okunmuştur.

2.2.7. Gibberellik Asit Analizi

Fermantasyon sonunda elde edilen kültürler Whatman No 1 filtre kağıdından süzlmüştür. Süzüntülerin pH'değeri 2.5 olarak 0.1 M HCl ve 0.1 M NaOH ile

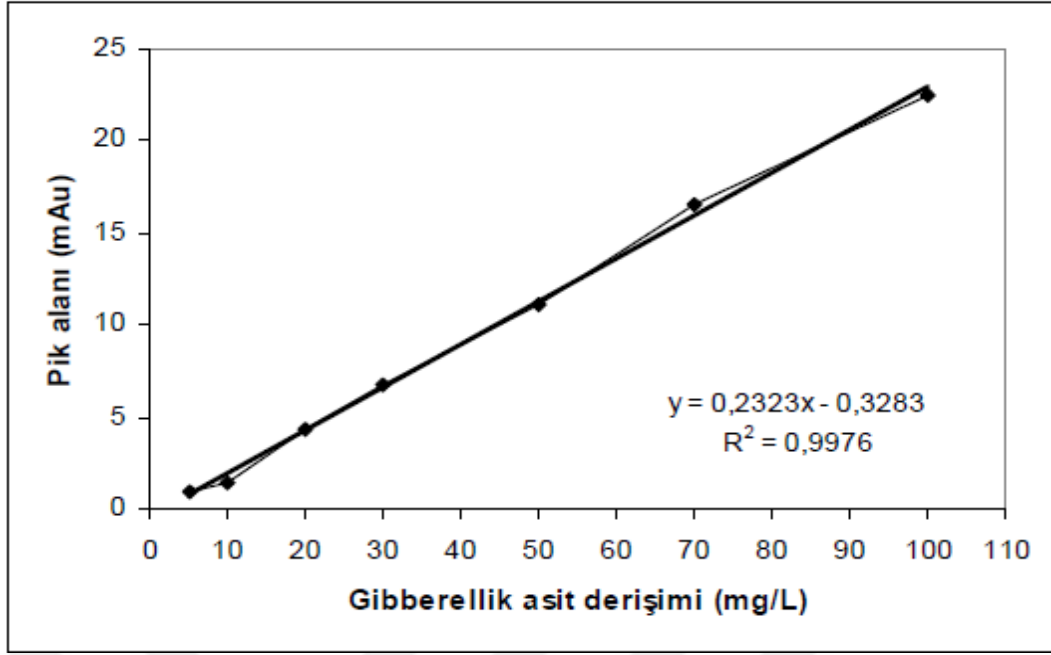
ayarlanmıştır. Analiz için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazı (Shimadzu Dad UV Dedector) kullanılmıştır. pH ayarlamasından sonra çözelti kalibrasyon eğrisini hazırlamada kullanılan konsantrasyon aralığına gelecek şekilde (dedektörün cevap verebilmesi için) hareketli faz ile seyreltilmiştir. Daha sonra süzüntü şırınga ucu filtreden (0.45 µm) geçirilmiştir [30].

20 µl hacmindeki örnekler Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi'nde Çizelge 2.1'de verilen koşullarda analiz edilmiştir [63].

Çizelge 2.2. Sulu fazdaki gibberellik asitin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazındaki analiz koşulları

Cihaz	HPLC
Dedektör	UV-GB Dedektör
Kolon	C ₁₈ , Nükleodur marka (25 cm X 4.6 mm I.D., 5 µm) kolon
Kolon Sıcaklığı	35 °C
Enjeksiyon Hacmi	20 µl
Hareketli Faz Bileşimi	Hacimce % 30 metanol ve % 70 0.01 M H ₃ PO ₄ (pH'sı KOH ile 3'e ayarlanmış)
Hareketli Faz Akış Hızı	1 mL/dak
Analizin Yapıldığı Dalga Boyu	206 nm

Kalibrasyon eğrisi 5-100 mg/L derişim aralığında HPLC saflığındaki gibberellik asit hareketli fazda çözümlenerek hazırlanmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Gibberellik asit kalibrasyon grafiği

2.2.8. Zamanının Gibberellik Asit Üretimine Etkisi

İnkübasyon süresinin gibberellik asit üretimine etkisini tespit etmek için 250 mL'lik erlenmayerin içerisinde 100 mL olacak şekilde Czapek-Dox sıvı besiyeri hazırlanmıştır. 121°C 1 atm basınç altında 20 dakika steril edildi. 4, 6, 8, 14.ve 15. günlerde inkübasyondan alınan örnekler HPLC cihazında gibberellik asit (Merck) standardına karşı okunmuştur.

2.2.9. Farklı Karbon Kaynaklarının Gibberellik Asit Üretimi Üzerine Etkisi

Besiyerinde kullanılan karbon kaynağının (glukoz, sukroz, laktoz)gibberellik asit üretiminin derişiminde yarattığı etkiyi tespit etmek için 250 mL'lik erlenmayerin içerisinde 100 mL olacak şekilde Czapek-Dox sıvı besiyeri hazırlanmıştır. 121°C 1 atm basınç altında 20 dakika steril edildi. 6. günlerde inkübasyondan alınan örnekler HPLC cihazında gibberellik asit (Merck) standartına karşı okunmuştur.

2.2.10. Farklı pH Değerlerinin Gibberellik Asit Üretimi Üzerine Etkisi

Farklı pH değerlerinin gibberellik asit üretiminin derişiminde yarattığı etkiyi tespit etmek için farklı pH değerlerinde (pH:4, pH:5 ve pH:7) 250 mL'lik erlenmayerin içerisinde 100 mL olacak şekilde Czapek-Dox sıvı besiyeri hazırlanmıştır. 121°C ve 1 atm basınç altında 20 dakika steril edilmiştir. 6. günlerde inkübasyondan alınan örnekler HPLC cihazında gibberellik asit (Merck) standartına karşı okunmuştur.

2.2.11. Fabrika Atık ve Artıklarının Gibberellik Asit Üretimi Üzerine Etkisi

Çeşitli fabrika atık ve artık maddelerinin (melas, peyniraltı suyu, zeytin karasuyu) gibberellik asit üretimi üzerine yaptığı etkiyi tespit etmek için 250 mL'lik erlenmayerlerin içerisinde 100 mL olacak şekilde artık ve atık maddeler seyreltilmiştir. İçerisine başka herhangi bir madde katılmaksızın 121°C ve 1 atm basınç altında 20 dakika steril edildikten sonra besiyeri olarak kullanılmıştır. 6. günlerde inkübasyondan alınan örnekler HPLC cihazında gibberellik asit (Merck) standartına karşı okunmuştur.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Gibberellik Asit Üreticisi Fungusun İzolasyonu

Kastamonu Tosya ilçesinden izole etmiş olduğumuz fungus gibberellik asit üreticisi olmasından ve izole edildiği bölgenin lokasyonunu temsil edecek şekilde bir kod verilerek kültüre alınmıştır. Tosya ilçesi Osmancık tipi çeltik ve 3 numaralı örnek olarak izole edilmesinden ötürü izole ettiğimiz suş TOSÇ3 olarak kodlanmıştır.

3.2. Gibberellik Asit Üreticisi Fungusun Morfolojik Karakterizasyonu

Bitki patojeni mantarların morfolojik tanımlaması ilk ve tanımlama sürecinin en zor basamağıdır. Morfolojik gözlemler tam tanımlama için yeterli olmayabilir ancak, önemli bilgi bu aşamada kültürün morfolojik incelemesi ile elde edilir. PDA besiyerinde ürettiğimiz TOSÇ3'ün koloni morfolojileri Gerlach ve Nirenberg (1982) ve Leslie ve Summerell (2006) kriterlerini kullanılarak yapılmıştır.

Gibberella (Fusarium) türlerini sadece morfolojik özellikleri kullanılarak tanımlamak ile ilgili pek çok güçlük birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir [64]. Ancak, moleküler tanımlamadan önce ilk morfolojik tanımlama oldukça önemlidir. TOSÇ3 izolatının yüne benzeyen sık bazen seyrek beyaz veya soluk mor pamuksu hava misellerinin olduğu gözlemlendi. Üretildiği agarda koyu mor pigment sentezlediği saptandı (Sekil 3.1).



Şekil 3.1. TOSÇ3 izolatının morfolojik yapısı

3.3. Gibberellik Asit Üreticisi Mantarın Moleküler Karakterizasyonu

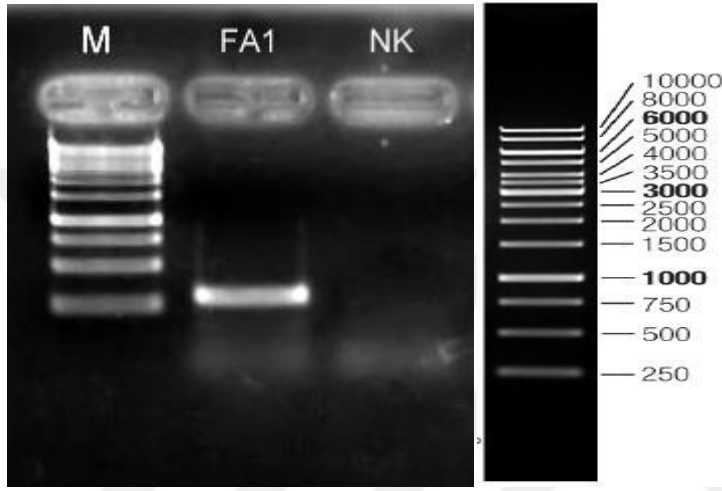
İzole ettiğimiz fungustan kromozomal DNA izole edilmiş, PZR optimizasyonu çalışmaları yapılmış ve saflaştırılmış PZR ürünleri, DNA sekans analizi için Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (Ankara, Türkiye) gönderilmiştir. 18S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır.

3.3.1. Kromozomal DNA İzolasyonu

PZR amplifikasyonu öncesi izole edilmiş fungustan kromozomal DNA izolasyonu yapılmış ve % 1'lik agaroz jelde yürütülerek incelenmiştir.

3.3.2. TOSÇ3 Suşunun PZR Optimizasyonu

18S rRNA bölgeleri PZR’da çoğaltıldıktan sonra % 1’lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerinin yaklaşık 1000 baz çiftine karşılık gelen bölgede olduğu görülmektedir. Şekil 3.1’de TOSÇ3 kodlu suşa ait farklı primer bağlanma sıcaklıklarındaki PZR ürünleri görülmektedir.



Şekil 3.2. Sekans analizi sonucunda elde edilen TOSÇ suşuna ait DNA sekansları
Marker (M), TOSÇ3 (FA1)

3.3.3. TOSÇ3 kodlu Suşun 18 S rRNA Sekans Analizi İle Tanımlanması

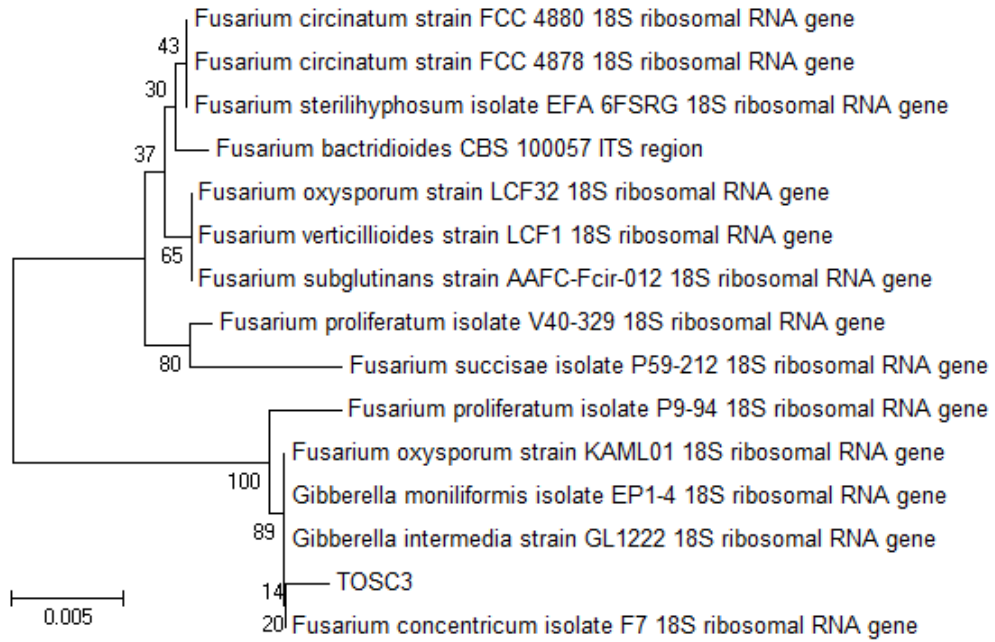
18S rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, National Center of Biotechnology Information’ın web sayfasındaki BLAST programı doğrultusunda yayımlanan sekanslarla kıyaslanmıştır. Gen bankasında yapılan BLAST analizlerinde TOSÇ3 kodlu suşun %99 oranında *Fusarium oxysporum* strain KAML01, *Gibberella moniliformis* isolate EP1-4, *Gibberella intermedia* strain GL1222 ve *Fusarium concentricum* isolate F7 türleri ile homoloji gösterdiği saptanmıştır.

Nümerik analizlerin gerçekleştirilebilmesi için türler arası uzaklık/yakınlık matrisinin hesaplanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. TOSÇ3 kodlu suş için 18S rRNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen türlerin eşleştirme değerleri

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. TOSÇ3															
2. <i>Fusarium proliferatum</i> isolate v 40-329	0.060														
3. <i>Fusarium succisae</i>	0.064	0.008													
4. <i>Fusarium proliferatum</i> isolate p9-94	0.006	0.054	0,060												
5. <i>Fusarium oxysporum</i> strain LCF 32	0.054	0.006	0,012	0,056											
6. <i>Fusarium verticillioides</i>	0.054	0.006	0,012	0,056	0,000										
7. <i>Fusarium sterilihyphosum</i>	0.056	0.004	0,010	0,058	0,002	0,002									
8. <i>Fusarium subglutinans</i>	0.054	0.006	0,012	0,056	0,000	0,000	0,002								
9. <i>Fusarium circinatum</i> strain FFC 4880	0.056	0.004	0,010	0,058	0,002	0,002	0,000	0,002							
10. <i>Fusarium circinatum</i> strain FFC 4878	0.056	0.004	0,010	0,058	0,002	0,002	0,000	0,002	0,000						
11. <i>Fusarium bactridioides</i>	0.054	0.006	0,012	0,056	0,004	0,004	0,002	0,004	0,002	0,002					
12. <i>Fusarium oxysporum</i> strain KAML 01	0.002	0.058	0.062	0.004	0.052	0.052	0,054	0,052	0,054	0,054	0,052				
13. <i>Gibberella moniliformis</i>	0.002	0.058	0.062	0.004	0.052	0.052	0,054	0,052	0,054	0,054	0,052	0,000			
14. <i>Gibberella intermedia</i>	0.002	0.058	0.062	0.004	0.052	0.052	0,054	0,052	0,054	0,054	0,052	0,000	0,000		
15. <i>Fusarium concentricum</i>	0.002	0.058	0.062	0.004	0.052	0.052	0,054	0,052	0,054	0,054	0,052	0,000	0,000	0,000	

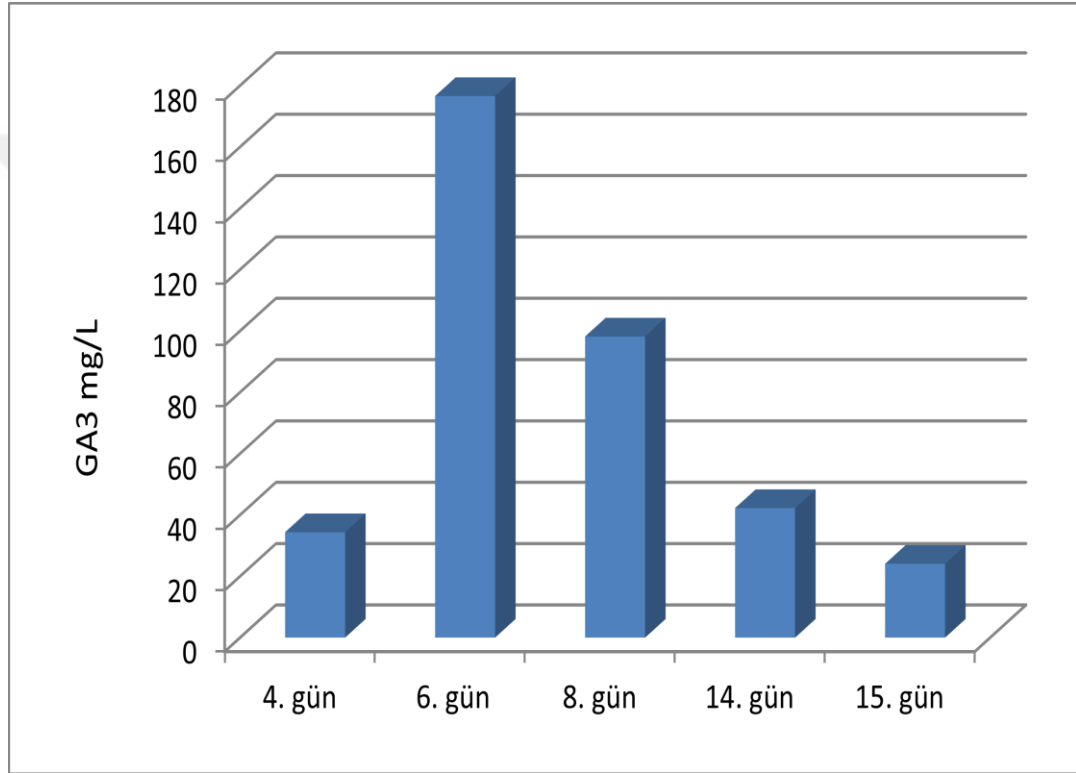
TOSÇ3 kodlu suşun filogenetik ağacı, 18S rRNA gen sekans dizisi kullanılarak MEGA 5.2 programında neighbour-joining metodu ile çizilmiştir. Şekil 3.3'de görüldüğü gibi TOSÇ3 kodlu suşun homoloji gösterdiği ilk 15 fungus ile soy ağacı oluşturulmuştur. Oluşturulan soy ağacının doğruluğunu (ağacın güvenilirliğini) istatistiksel olarak belirlemek amacıyla 1000 tekrarlı bootstrap (seç-bağla) analizi yapılmıştır. Suşların soy ağacında birbirlerine olan uzaklığı evrimsel akrabalıklarını göstermektedir. Buna göre TOSÇ3 kodlu suş evrimsel açıdan *Fusarium oxysporum* strain KAML01, *Gibberella moniliformis* isolate EP1-4, *Gibberella intermedia* strain GL1222 ve *Fusarium concentricum* isolate F7 suşları ile yakın akraba olduğu görülmüştür.



Şekil 3.3. TOSÇ3 kodlu suşa ait neighbour joining metoduyla oluşturulan dendogram (0,005; nükleotidler arasındaki farkı göstermektedir)

3.4.Fermantaston Süresinin Gibberellik Asit Üretimine Etkisi

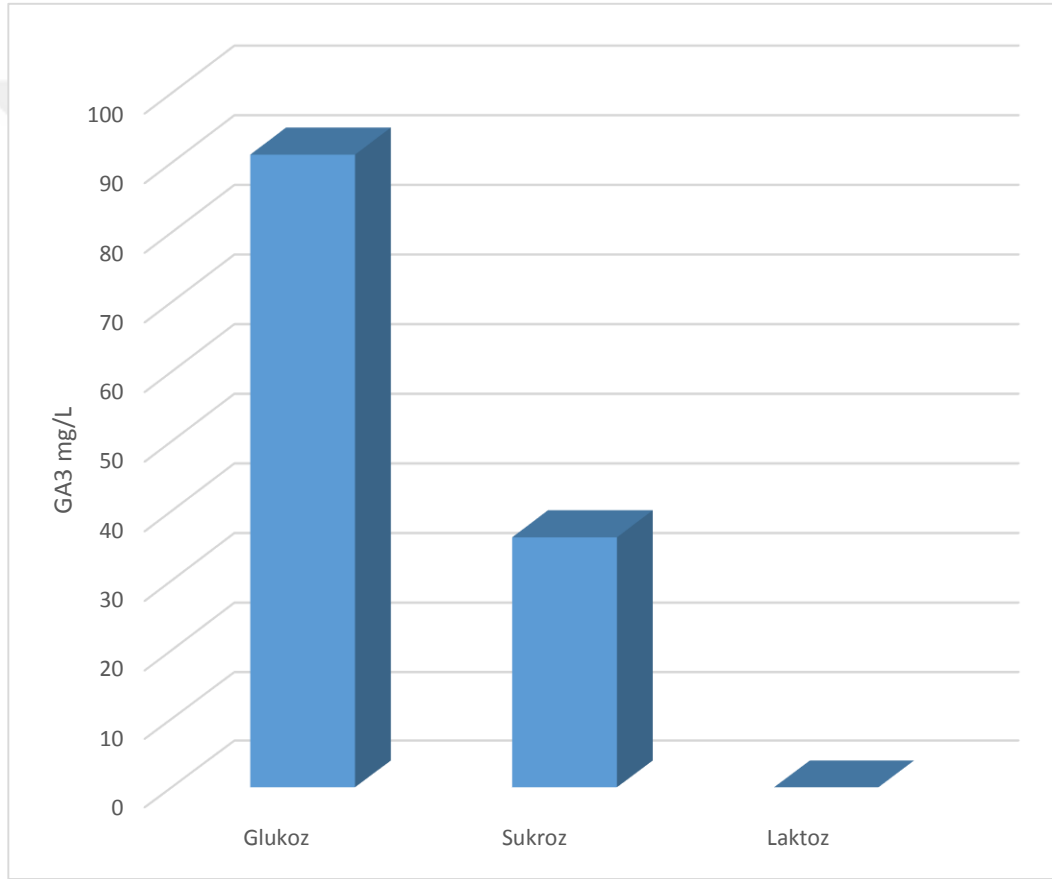
TOSÇ3 kodlu suşun fermantasyon zamanının gibberellik asit üretimine etkisi belirlenmesi amacıyla 4, 6, 8, 14.ve 15. günlerdeki gibberellik asit üretimine bakılmış ve maksimum üretimin hangi gün yapıldığı belirlenmiştir. Buna göre, 6. günde en fazla gibberellik asit üretimi gerçekleştirildiği saptanmıştır (Şekil 3.4)



Şekil 3.4. İnkübasyon süresinin gibberellik asit üretimlerine etkisi

3.5.Farklı Karbon Kaynaklarının Gibberellik Asit Üretimi Üzerine Etkisi

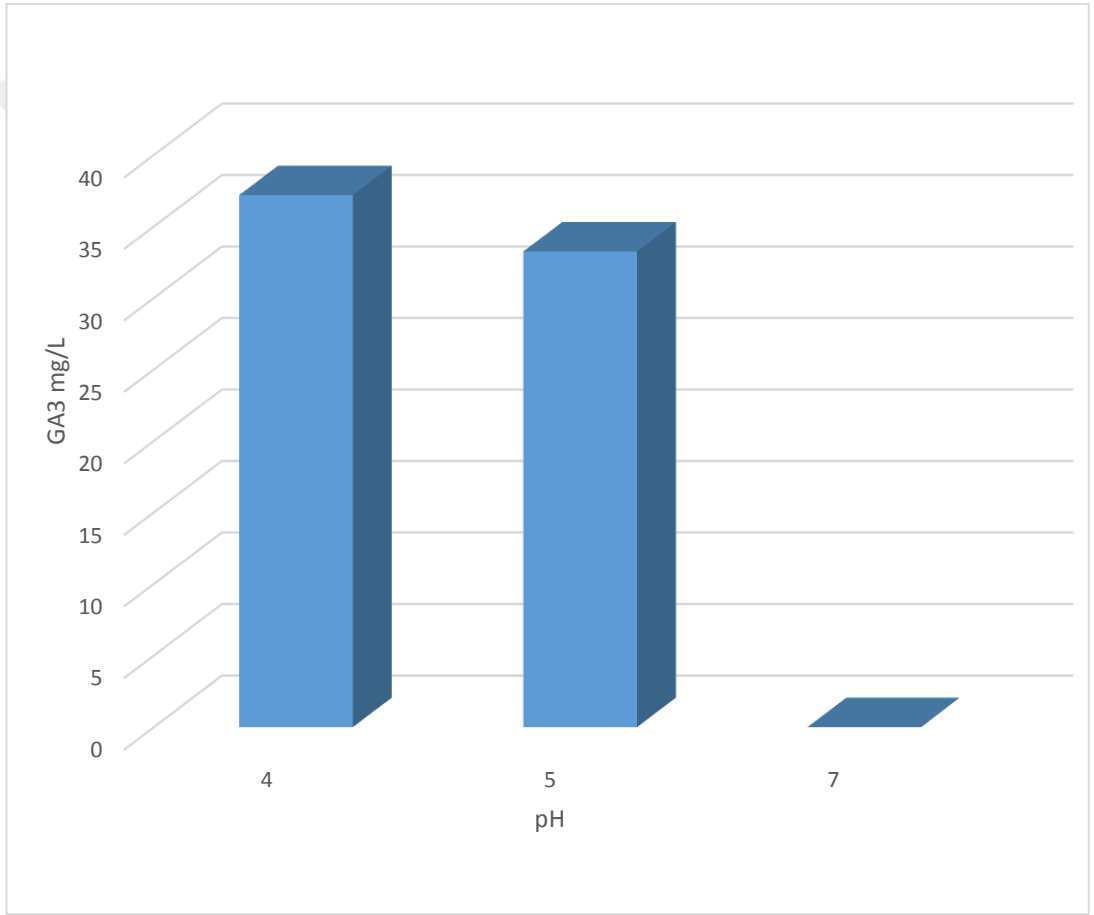
Farklı karbon kaynaklarının gibberellik asit üretimi üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla karbon kaynağı olarak glukoz, sukroz ve laktoz kullanılmıştır. Buna göre, glukozlu ortamda 91.16 mg/L, sukrozlu ortamda 37.19 mg/L gibberellik asit üretildiği saptanmıştır. TOSÇ3 kodlu suş laktozlu ortamda gibberellik asit üretimi gerçekleştirilmemiştir. (Şekil 3.5)



Şekil 3.5. Farklı karbon kaynaklarının gibberellik asit üretimlerine etkisi

3.6. Farklı pH Değerlerinin Gibberellik Asit Üretimi Üzerine Etkisi

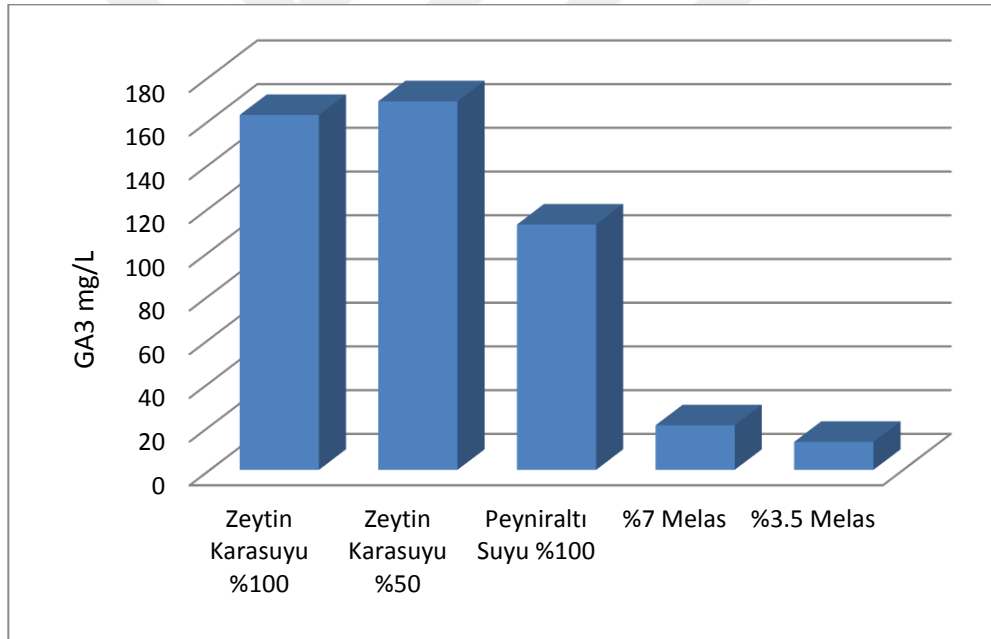
Çeşitli pH değerlerinde gibberellik asit üretiminin miktarını tayin etmek için Czapek-Dox sıvı besiyeri hazırlandı. pH değerleri 4, 5 ve 7 ye ayarlandı. İnkübasyonun 6. gününde pH 4’de 37.16 mg/L, pH 5’de 33.25 mg/L gibberellik asit üretimi saptanmıştır. TOSÇ3 kodlu suş pH 7’de gibberellik asit üretimi gerçekleştirmemiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Ortam başlangıç pH değerinin TOSÇ3 suşunun Gibberellik asit üretimine etkisi

3.7. Fabrika Atık ve Artıklarının Gibberellik Asit Üretimi Üzerine Etkisi

Çeşitli fabrika atık ve artıklarının gibberellik asit üretiminin miktarını tayin etmek için peyniraltı suyu, zeytin karasuyu ve melas belirli karbon derişimlerine sahip olacak şekilde seyreltilerek besi ortamları hazırlandı. pH değerleri 4'e ayarlandı. İnkübasyonun 6. gününde sadece zeytin karasuyu olan besiyerinde 162.34 mg/L, yarı yarıya distile su ile seyreltilmiş olan zeytin karasuyu bulunan besiyerinde 168.59 mg/L, sadece peyniraltı suyu bulunan besiyerinde 112.22 mg/L, % 7'ye kadar distile su ile seyreltilmiş melaslı besiyerinde 20.38 mg/L, % 3.5'a kadar distile su ile seyreltilmiş melaslı besiyerinde 12.78 mg/L gibberellik asit üretimi saptanmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Çeşitli fabrika atık ve artıkları kullanılarak hazırlanmış besiyerlerinde TOSÇ3 suşunun Gibberellik asit üretimine etkisi

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Gibberella (Fusarium) genusu mensubu türlerin gibberellik asit üreticisi olduğu 1950 den bu yana yapılan çalışmalardan bilinmektedir. Tarımsal üretimi ve tarım teknolojisi yüksek ülkeler (ABD, Japonya vb.) tarımsal verimin artırılması için bitki regülatörleri üzerine birçok araştırmada bulunmuşlardır. En yüksek verimin *Gibberella fujikuroi* türü fungustan alındığı tespit edilmiştir. [1,4]

Bu çalışmanın başlangıç aşamasında, gibberellik asit üreticisi fungusun morfolojik ve moleküler karakterizasyonunun yapılması esas alınmıştır. Yapılan 18S rRNA sekans analizi sonucunda pirinç örneklerinden izole ettiğimiz TOSÇ3 kodlu suşun *Gibberella (Fusarium)* genusu mensubu 4 tür (*Fusarium oxysporum* strain KAML01, *Gibberella moniliformis* isolate EP1-4, *Gibberella intermedia* strain GL1222 ve *Fusarium concentricum* isolate F7) ile % 99 oranında akrabalık ilişkisi içerisinde olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızın ilerleyen aşamalarında, izole ettiğimiz fungusun gibberellik asit üreticisi olduğu saptanmış ve verimi araştırılmıştır. En yüksek gibberellik asit veriminin inkübasyonun 6. gününde olduğu saptanmıştır. Escamilla ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da, gibberellik asit sentezinin yüksek verimine inkübasyonun 4. ve 6. günleri arasında raslandığını rapor edilmiştir [5]. Bu çalışma bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

Gibberellik asit fermantasyonu için başlangıç pH değerinin 3.5 – 5.5 arasında bulunmasının uygun olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [6,26]. Çalışmamızda da en yüksek gibberellik asit veriminin pH başlangıç değerinin 4'e ayarlanmış ortamda olduğu görülmüştür. Bu sonuç, konu hakkında daha önce yapılmış olan diğer çalışmalar ile örtüşmektedir.

Farklı karbon kaynaklarının gibberellik asit üretimine etkisinin incelendiği çalışmalarda gibberellik asit üretimi için en uygun karbon kaynağı glukoz olarak

belirlenmiştir [7]. Bazı araştırmacılar ise sukroz kullanılabilirliğini göstermişlerdir [57]. Bizim alışmamızda da, en yüksek giberellik asit üretiminin glukozlu ortamda olduğu saptanmıştır. Karbon kaynağı olarak sukrozun kullanıldığı ortamlardakigiberellik asit üretiminin glukozluortama göre daha az olduğu görülmüştür.

Çalışmanın son aşamasında ise çeşitli fabrika atık ve artık maddelerinin besiyortamı olarak kullanımıyla alınabilecek giberellik asit verimi araştırılmıştır. şeker miktarı göz önüne alınarak hazırlanmak üzere zeytin karasuyu, peyniraltı suyu ve şeker fabrikası atığı olan melas farklı oranlarda seyreltilmiş ve besiyeri olarak kullanılmıştır. Melasın fazla sulandırılması sonucunda sakarozun şeker miktarının ayarlanamamasından dolayı melasla hazırlanan besiyerlerinde verimin düşük olduğu görülmüştür.

Peyniraltı suyu daha önce de araştırmacılar tarafından GA₃ üretiminde substrat olarak kullanılmıştır [57]. Peyniraltı suyu ile hazırlanan besiyerindeki giberellik asit üretimi melaslı besiyerlerinden yüksek çıkması peyniraltı suyunun seyreltilmeden kullanılması ile ilişkili olduğu saptanmıştır.

Zeytin karasuyu ile hazırlanan besiyerinde ise 1:1 volümde seyreltilmiş olan zeytin karasuyunun giberellik asit veriminin en yüksek olduğu saptanmıştır. Zaten karbon kaynaklarınıu etkisinin araştırıldığı çalışmamızda da glukozlu ortamda en yüksek giberellik asit verimini elde etmemiz bu sonucu destekler niteliktedir.

Alınan sonuçlar literatür bilgileri ile karşılaştırıldığında paralellik görterdiği görülmüştür.

Bu alışma, Kastamonu-Tosya ilçesi eltik fabrikalarının pirinç harmanından izole ettiğimiz *Gibberella* genusu üyesi gibberellik asit üreticisi fungusun veriminin arttırılması ve elde edilen saf gibberellinin endüstriyel ölçekte üretimi ve tarım ürünlerinde büyüme regülatörü olarak kullanılabilirliğinin gösterilebileceği çalışmalara bir zemin oluşturabilecektir.

KAYNAKLAR

- [1] Urrutia, O., Hedden, P., Rojas, M.C., Monooxygenases involved in GA(12) and GA(14) synthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, 56(5): 505-511, 2000.
- [2] Rademacher, W., Gibberellin formation in microorganisms. *Plant growth regulation*, 15(3): 303-314, 1994.
- [3] Bruckner, B., Bleschmidt, D., The Gibberellin fermentation. *Critical Review in Biotechnology*, 11(2): 163-192, 1991.
- [4] Başaçık, K.S., Aksöz, N., Optimization of carbon-nitrogen ratio for production of gibberellic acid by *Pseudomonas* sp. *Polish Journal of Microbiology formerly Acta Microbiologica Polonica*, 53(2): 117-120, 2004.
- [5] Escamilla, E.M., Dendooven, L., Magaña, I.P., Parra, R., De La Torre M., Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors. *J. Biotechnology*, 76(2): 147-155, 2000.
- [6] Kumar, P.K.R., Lansane, B.K., Gibberellic acid by solid state fermentation: consistent and improved yields. *Biotechnology and Bioengineering*, 30(2): 267-271, 1987.
- [7] Saucedo, J.E.N., Barbotin, J.N., Thomas, D., Continuous production of gibberellic acid in a fixed-bed reactor by immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi* in calcium alginate beads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30(3): 226-233, 1989.

- [8] Gelmi, C., Perez-Correa, R., Agosin, E., Modeling *Gibberella fujikuroi* growth and GA3 production in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 37(9): 1033-1040, 2002.
- [9] Gökdere, M., Serbest ve immobilize *Gibberella fujikuroi* fungusu kullanılarak ekstaktif fermentasyonla gibberellik asit üretimi, Gazi Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara, 2009.
- [10] Özçelik, S., Genel Mikrobiyoloji, İkinci basım. Süleyman Demirel Üniversitesi, Atabey/Isparta, 1-9, 1998.
- [11] Pastrana, L.M., Gonzalez, Ma.P., Murado, M.A., Production of gibberellic acid from mussel processing wastes in submerged batch culture. *Bioresource Technology*, 45(3):213–221, 1993.
- [12] Gelderblom, W.C., Thiel, P.G., van der Merwe, K.J., The chemical and enzymatic interaction of glutathione with the fungal metabolite, fusarin C. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 199(1): 207-214, 1988.
- [13] Vardar, Y., Güven, A., Bitki Fizyolojisine Giriş. Barış Yayınları, 11. Baskı, İzmir, 1993.
- [14] Rivier, L., Crozier, A., Principles and practice of plant hormone analysis. Vols 1 and 2. London: Academic Press, 1–401, 1987.
- [15] Başaçık, Ş., Bitki büyüme regülatörü gibberellik asidin (GA3) *Pseudomonas* sp.'den üretimi için uygun ortamsal koşulların saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-46, 1997.

- [16] Berbegal, M., Pérez-Sierra, A., Armengol, J., Grünwald, N.J., Evidence for multiple introductions and clonality in Spanish populations of *Fusarium circinatum*. *Phytopathology*, 103(8): 851-861, 2013.
- [17] Matic, S., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L., Antagonistic yeasts and thermotherapy as seed treatments to control *Fusarium fujikuroi* on rice. *Biological control*, 73, 59-67, 2014.
- [18] Anonim, FAOSTAT, 2011. Agriculture data, agricultural production, <http://faostat.fao.org/site/567/> (Erişim tarihi: 23.10.2015)
- [19] Carter, L.L.A., Leslie J.F., Webster R.K., Population structure of *Fusarium fujikuroi* from California rice and water grass. *Phytopathology*, 98(9): 992-998, 2008.
- [20] Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L., Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. *Postharvest Biology and Technology*, 33(2): 141–151, 2004.
- [21] Webster, P., Gunnel, M., APS Press. American Phytopathological Society, Minnesota, 1992.
- [22] Wulff, E.G., et al., *Fusarium* spp. associated with rice Bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. *Environmental Microbiology*, 12(3): 649-657, 2010.
- [23] Hori,S., Some observations on 'bakanaea' disease of the rice plant. *Mem Agric. Res. Sta. Tokyo*, 12, 110–119, 1898.
- [24] Hardtke, C.S., Gibberellin Signaling: GRASs Growing Roots Dispatch. *Current Biology*, Volume 13(9): 366–367, 2003.

- [25] Buchanan, B.B., Jones, R.L., Biochemistry and molecular biology of plants. Vol. 40. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 2000.
- [26] Başıaçık, K.S., Aksöz, N., Bazı matrikslere tutuklanmış *Aspergillus niger* 'den gibberellik asit üretimi. Hacettepe Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara, 2004.
- [27] Cihangir, N., *Aspergillus niger*'den gibberellik asit üretimi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 1992.
- [28] Martín, RF., Domenech, C., Olmedo, E.C., Avalos, J., ent-Kaurene and squalene synthesis in *Fusarium fujikuroi* cell-free extracts. Phytochemistry, 54(7): 723–728, August 2000.
- [29] Kobayashi, M., MacMillan, J., Phinney, B., Gaskin, P., Spray, C.R., Hedden, P., Gibberellin biosynthesis: metabolic evidence for three steps in the early 13-hydroxylation pathway of rice. Phytochemistry, Volume 55(4): 317–321, October 2000.
- [30] Castillo, G., Martinez, S., Reversed-phase C18 high-performance liquid chromatography of gibberellins GA3 and GA1. J. Chrom. A, 782(1): 137-139, 1997.
- [31] Taiz, L., Zeiger. E. Mineral nutrition. Plant physiology, 2, 103-124, 1998.
- [32] Kumar, P.K.R., Lonsane, B.K., Immobilized growing cells of *Gibberella fujikuroi* P-3 for production of gibberellic acid and pigment in batch and semi-continuous cultures. Applied microbiology and biotechnology, 28(6): 537-542, 1988.

- [33] Santos, M.G.E., Couto, M.C.M., Rebelo, H.L.S., et al., Ion-selective electrodes based on metalloporphyrins for gibberellic acid determination in agricultural products. *Anal bioanal Chem*, 375(4): 511-516, 2003.
- [34] Bianco, P., Ultrastructural immunohistochemistry of noncollagenous proteins in calcified tissues. *Ultrastructure of Skeletal Tissues*. Springer US, 63-78, 1990.
- [35] Gutnick, D., Bacterial Interaction with Heavy Metals in the Environment. *Research in Microbiology*, 148, 513-551, 1997.
- [36] Bigersson, B., Sterner, O., Zimerson, E., *Chemie und Gesundheit, Eine Verstandliche Einfuhrung in die Toxikologie*. VCHVerlagsgesellschaft, ISBN 3-527-26455-8, 1988.
- [37] Muyzer, G., DGGE/TGGE a Method for Identifying Genes From Natural Ekosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2(3): 317-322, 1999.
- [38] Muyzer, G., Smalla, K., Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) in Microbial Ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1): 127-141, 1998.
- [39] Yiğit, N., Aktaş A.E., Uslu, H., Comparison of Different Systems for Identification of Candida Strains. *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi*, 38(2): 83-86, 2008.
- [40] Kahyaoğlu, B., Kırıkkale-Kızılırmak'tan Demir (Fe) Ağır Metaline Dirençli Bakterilerin İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2014.

- [41] Welch, D.F., Applications of Cellular Fatty Acid Analysis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(4): 422-438, 1991.
- [42] Tozoğlu, S., Uslu, H., Ertaş, Ü., Kaya, Ö., Antimicrobial Susceptibility of Microorganisms Isolated from Orofacial Infections. *Düzce Tıp Dergisi*, 12(1): 48-53, 2010.
- [43] Özkaya, B., Microbial Community Analysis with PCR-DGGE-Sequencing Based Molecular Methods in Municipal Solid Waste Management. *Sigma*, 3, 219-227, 2011.
- [44] Klijn, N., Weerkamp, A.H., De Vos, W.M., Identification of Mesophilic Lactic Acid Bacteria by Using Polymerase Chain Reaction Amplified Variable Regions of 16S rRNA and Specific DNA Probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(11): 3390-3393, 1991.
- [45] Stefan, R.J., Atlas, R.M., Polymerase Chain Reaction. Application in *Environmental Microbiology*, 45(1): 137-161, 1991.
- [46] Gasson, M.J., De Vos, W.M., Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Springer Science & Business Media, 2012.
- [47] Swaminathan, B., Feng, P., Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 48(1): 401-426, 1994.
- [48] Watson, J.D., Gilman, M., Witkovski, J., Zoller, M., Recombinant DNA. Scientific American Books, USA, 1992.
- [49] Yılmaz, R., Temiz, A., Streptococcus salivarius subs. Thermophilus ve Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus'un Klasik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanımlanması ve Karakterizasyonu. *Orlab Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(3): 19-42, 2003.

- [50] Quicke, D.L.J., Principles and techniques of contemporary taxonomy. Springer Science & BusinessMedia, 1993.
- [51] Lipscomb, D.L., et al., Support, ribosomal sequences and the phylogeny of the eukaryotes. *Cladistics*, 14(4): 303-338, 1998.
- [52] Basibuyuk, H.H., et al., Two new genera of the Evaniidae (Insecta: Hymenoptera) from Late Cretaceous New Jersey amber. *Studies on Fossils in Amber, with Particular Reference to the Cretaceous of New Jersey*, 313-325, 2000.
- [53] Dupuis, C., Willi Henning's Impact on Taxonomic Thought. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15(1): 1-25, 1984.
- [54] Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Reeb, V., A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 111(5): 509-547, 2007.
- [55] Lopez, D.M.R., McSherry, D., Bridge, D., Leake, D., Smyth, B., Craw, S., Watson, I., Retrieval, reuse, revision and retention in case-based reasoning. *The Knowledge Engineering Review*, 20(03): 215-240, 2005.
- [56] Kılıçoğlu, M., Özkoç, İ., Fungal sistematikteki moleküler gelişmeler. *J. of Fac. of Agric, OMU* 23(1): 65-72, 2008.
- [57] Rose, A.H., *Economic Microbiology: Volume 4, Microbial Biomass*, 207–311. Academic Press, Inc. (London) Ltd. ISBN 0-12-596554-0, 1979.
- [58] Sözer, S., Yıldız, O., Sığır gübresi ve peyniraltı suyu karışımlarından biyogaz üretimi üzerine bir araştırma. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19, 179–183, 2006.

- [59] DİE, 2004. Tarımsal Yapı (Üretim, Fiyat, Değer), T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü Yayınları, 2002.
- [60] Goncu, A., Alpkent, Z., Sensory and chemical properties of white pickled cheese produced using kefir, yoghurt or a commercial cheese culture as a starter. *International Dairy Journal*,15(6): 771-776, 2005.
- [61] Yiğit, N., Peyniraltı suyundan sürekli sistemde biyogaz üretimi için en uygun koşulların belirlenmesi. Gazi Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2007.
- [62] Şengül, F., Endüstriyel atıksuların özellikleri ve arıtılması. DEÜ, 1991.
- [63] Bhalla, K., Singh, S.B., Agarwal, R., Quantitative determination of gibberellins by high performance liquid chromatography from various gibberellins producing *Fusarium* strains. *Environmental monitoring and assessment*, 167, 1(4): 515-520, 2010.
- [64] Marasas, W.F.O., Rheeder, J.P., Lamprecht, S.C., Zeller, K.A., Leslie, J.F., *Fusarium andiyazi sp. nov.*, a new species from sorghum. *Mycologia*, 93, 1203–1210, 2001.