

**MISIRDA KOÇAN ÇÜRÜKLÜĞÜ ETMENİ  
*Fusarium verticillioides*'İN OLUŞTURDUĞU  
ZEARALENONE TOKSİNİ VE PEKTOLİTİK  
ENZİMLER ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

**Orhan BÜYÜK**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Bitki Koruma Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Nuray ÖZER**

**2011**

T.C.  
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MISIRDA KOÇAN ÇÜRÜKLÜĞÜ ETMENİ *Fusarium verticillioides*'İN  
OLUŞTURDUĞU ZEARALENONE TOKSİNİ VE PEKTOLİTİK ENZİMLER  
ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

Orhan BÜYÜK

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Nuray ÖZER

TEKİRDAĞ-2010

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Nuray ÖZER danışmanlığında, Orhan BÜYÜK tarafından hazırlanan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından. Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda, Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Juri Başkanı : Prof. Dr. Nuray ÖZER

*İmza :*

Üye : Yrd. Doç. Dr. Arzu COŞKUNTUNA.

*İmza :*

Üye : Yrd. Doç. Dr. Tuncay GÜMÜŞ

*İmza :*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun ..... tarih ve ..... sayılı  
kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Fatih KONUKÇU  
**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### MISIRDA KOÇAN ÇÜRÜKLÜĞÜ ETMENİ *Fusarium verticillioides*'İN OLUŞTURDUĞU ZEARALENONE TOKSİNİ VE PEKTOLİTİK ENZİMLER ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nuray ÖZER

Bu çalışmanın ilk bölümünde Bartın, Bolu, Düzce ve Zonguldak illeri mısır ekiliş alanlarından toplanan 70 mısır koçan örneğindeki, mısır koçan çürüklüğü etmeni *Fusarium verticilloides*'den dolayı oluşan Zearalenone (ZEA) toksin miktarları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ZEA toksin miktarı ortalama 828,47 ppb olarak saptanmıştır. Çalışmamız sonucunda elde edilen ZEA miktarları ülkemiz ve AB'nin ZEA için belirlediği maksimum limitlerin üzerinde bulunmuştur. Farklı illerden toplanan mısır örneklerinde tespit edilen ZEA toksin miktarları arasında herhangi bir farklılık belirlenmemiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde aynı illerden alınan ve *Fusarium spp* ile bulaşık olmayan 11 yerel mısır çeşidinin etmene karşı dayanıklılığı belirlenmiştir. Dayanıklılık çalışmalarında inokulasyondan sonra meydana gelen enfeksiyon şiddeti, enfeksiyon süresince ZEA toksini, pektolitik enzim (Poligalakturonaz-PG; Pektin Metil Galakturonaz-PMG; Pektat Liyaz-PL) üretimi kriterleri dikkate alınmıştır. Örneklerde inokulasyondan önce ZEA toksin miktarı 2 çeşit hariç Türk ve AB Gıda Kodeksi maksimum ZEA limit değerlerinin altında tespit edilmiştir. 50, 22 ve 97 nolu çeşitlerde, enfeksiyon süresince ZEA miktarının yüksek miktarda artmadığı, etmenin PG, PMG ve PL enzim üretiminin düşük olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Dayanıklılık, *Fusarium verticilloides*, mısır koçan çürüklüğü, pektolitik enzim, zearalenone toksini

2011, 47 sayfa

## ABSTRACT

MSc. Thesis

### THE RESEORCH ON ZEARALENONE TOXIN AND PECTOLYTIC ENZYMES PRODUCED BY *Fusarium verticillioides*, THE CAUSAL AGENT OF MAIZE EAR ROT

Namık Kemal University  
Graduate School of Natural and Applied sciences  
Main Science Division of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Nuray ÖZER

The amounts of zearalenone (ZEA) toxin formed due to *Fusarium verticillioides* which is causal agent of maize ear rot was determined in maize growing areas in Bartın, Bolu, Düzce and Zonguldak provinces in the first part of this study. Average ZEA production was determined as 828.47 ppb. As a result of the study, the mean of ZEA toxin at samples was found considerable higher than the limit values placed on Turkish Food Codex and Codex Alimentarius. There were not statistical differences among local cultivars for ZEA production.

The resistance of 11 local maize cultivars, which were not contaminated with *Fusarium* spp., to the pathogen was determined in the second part of this study. The criteria were infection severity, ZEA toxin and pectolytic enzymes (Polygalacturonase-PG; Pectin Methyl Galacturonase-PMG and Pectate Lyase-PL) production during infection after inoculation of pathogen to kernels for resistance studies. ZEA toxin production in all samples except that two of them before inoculation were below the limits of Turkish Food Codex and Codex Alimentarius. It was determined that ZEA production did not increase and that PG, PMG and PL enzyme production were low in the cultivar 50, 22 and 97.

**Keywords:** Resistance, *Fusarium verticillioides*, maize ear rot, pectolytic enzymes, zearalenone toxin,

## ÖNSÖZ

Mısır (*Zea mays* L.) doğrudan insan tüketiminde, hayvan beslenmesinde, sanayinin değişik alanlarında hammadde olarak ve tohumluk endüstrisinde kullanılmaktadır. Dünya ekiliş ve üretim rakamları ile kıyaslandığında, Türkiye'nin dünya mısır tarımında ekiliş alanı bakımından %0.38, üretim miktarı açısından ise %0.39'luk bir paya sahip olduğu görülmektedir. Ekiliş alanı ve üretim miktarları açısından mısır, ülkemizde buğday ve arpa bitkilerinden sonra 3. sırada yer almaktadır. Mısır ekim alanlarında hastalık ve zararlılardan kaynaklanan önemli ürün kayıpları söz konusudur. Bunların başında *Fusarium* türlerinin oluşturduğu koçan ve sap çürüklüğü ile kök ve kök boğazı hastalıkları gelmektedir. Koçan çürüklüğü hastalıkları ürün miktarı ve kalitesinde azalmalara neden olmakta, ayrıca hastalığın şiddetine bağlı olarak oluşan toksin miktarları da sıcakkanlılara zarar verecek seviyelere ulaşabilmektedir. Son yıllarda mikotoksinlerle ilgili yapılan çalışmalar büyük artış göstermiş ve özellikle bu çalışmalarda *Fusarium* türlerinin oluşturduğu toksinler ön plana çıkmıştır. *Fusarium verticilloides* etmeninin oluşturduğu Zeraelonone (ZEA) toksini insanlarda ve sıcakkanlılarda önemli sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Araştırmamızda Bartın, Bolu, Düzce ve Zonguldak illerinden toplanan 70 adet mısır koçan örneklerindeki ZEA toksin analizleri yapılmış, ayrıca toplanan bu mısır koçan örneklerinden hastalık izole edilemeyen (yani dayanıklı olduğu düşünülen) örneklerde ZEA toksini ve pektolitik enzimler arasındaki ilişki incelenmiştir.

Bu çalışma Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilim Dalı'nda yapılmış bir Yüksek lisans çalışması olup, Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Ana Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Nuray ÖZER danışmanlığında hazırlanmış ve yürütülmüştür.

## SİMGELER DİZİNİ

ZEA	Zearelenone
DON	Deoxynivalenol
OA	Ochratoxin
FUM	Fumonisin
PME	Pektinmetilesteraz (Pectin methyl esterase)
PG	Poligalakturonaz (Polygalacturonase)
PMG	Pektin Metil Galakturonaz (Pectin Methyl Galacturonase)
PL	Pektat Liyaz (Pectate Lyase)
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
PPA	Peptone PCNB Agar
SNA	Sentetik Nutrient Agar
IAK	Immunoaffinite Kolon
ACN	Acetonitril
TAGEM	Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü
ha	hektar
da	dekar
ppm	miligram/kilogram (mg/kg)
ppb	Nanogram/gram-ng/g veya mikrogram/kilogram- $\mu$ g/kg
$\mu$ g	mikrogram
kg	kilogram
g	gram
NIV	Nivalenol

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>5</b>
2.1. <i>F. verticillioides</i> 'in oluşturduğu mikotoksinler ile ilgili çalışmalar.....	5
2.2. <i>F. verticillioides</i> 'in ürettiği pektolitik enzimlerle ilgili çalışmalar .....	8
2.3. Mısırdaki <i>F. verticillioides</i> 'e dayanıklılık ve dayanıklılığın mikotoksin ve pektolitik enzim üretimi ile ilişkisine yönelik çalışmalar .....	10
<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>13</b>
3.1. Materyal .....	13
3.2. Metot.....	15
3.2.1. Çalışma materyalinin toplanma yöntemi ve muhafazası .....	15
3.2.2. Zearalenone Analizi.....	16
3.2.3. HPLC ile zearalenone konsantrasyonunun belirlenmesi .....	19
3.3. Dayanıklılık Testleri .....	21
3.3.1. Mısır tohumlarının inokulasyonu ve hastalık değerlendirme .....	21
3.3.2. Zearalenone tespiti.....	22
3.3.3. Pektolitik Enzim Üretiminin Belirlenmesi .....	22
3.4. İstatistiksel Değerlendirme .....	24
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>25</b>
4.1. <i>F. verticillioides</i> 'in oluşturduğu zearalenone düzeylerinin belirlenmesi.....	25
4.2. Dayanıklılık Testleri .....	29
4.2.1. Mısır tohumlarının inokulasyonu ve enfeksiyon değerlendirme .....	30
4.2.2. Zearalenone tespiti.....	31
4.2.3. Pektolitik enzim aktivitesi ölçümleri için optimum pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi .....	32
4.2.4. <i>F. verticillioides</i> 'in farklı mısır çeşitlerini enfeksiyonu süresinde pektolitik enzim üretimi.....	34
4.2.5. <i>F. verticillioides</i> 'in farklı mısır çeşitlerinde sergilediği PG ve PL izoenzimleri .....	36
4.2.6. Hastalık şiddeti ile zearalenone ve pektolitik enzim üretimi arasındaki ilişkiler .....	38
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>39</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>42</b>
TEŞEKKÜR .....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	47



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1 Mısırdaki <i>F. verticilloides</i> 'in oluşturduğu koçan çürüklüğü hastalığı.....	2
Şekil 3.1. <i>F. verticillioides</i> 'in tohum üzerindeki gelişimi (A) ve mikroskopik görünümü (B) .....	13
Şekil 3.2. Değirmen .....	16
Şekil 3.3. Örneklerin çalkalayıcıda çalkalanması.....	17
Şekil 3.4. Ekstraktın filtre kâğıdından süzülmesi .....	17
Şekil 3.5. Cam mikrofiber filtre (A), örneklerin filtreden süzülmesi (B), hızlı kolon (C) ve örneklerin hızlı kolondan geçirilmesi (D) .....	18
Şekil 3.6. Kalibrasyon grafiği.....	19
Şekil 3.7. 50– 800 ppb konsantrasyon aralığında standartların kromatogramlarının birbirleriyle karşılaştırılmalı olarak gösterilmesi .....	20
Şekil 3. 8. Mısır örneğindeki Zeraelonone toksini kromatogramı.....	20
Şekil 4.1. <i>F. verticillioides</i> ile bulaşık yerel mısır çeşitlerindeki zearalenone (ZEA) miktarının örnekler göre dağılımı.....	27
Şekil 4.2. <i>F. verticillioides</i> izolatının farklı yerel mısır çeşitlerinde meydana getirdiği enfeksiyon şiddeti. Birbirinden farklı harflerle gösterilen sütunlar Duncan Çoklu karşılaştırma testine göre (P=0.05) birbirinden önemli derecede farklıdır.....	30
Şekil 4.3. <i>F. verticillioides</i> izolatının (61) ve inokule edilmiş 84 nolu mısır çeşidine ait tohumlardan elde edilen substratlarda farklı pH derecelerinde poligalakturonaz (PG) enzim aktivitesi. +%0.25 (w/v) 'lik poligalakturonik asitten (PGA) indirgenen gruptaki artış miktarı/da.....	32
Şekil 4.4. <i>F. verticillioides</i> izolatının (61) ve inokule edilmiş 84 nolu mısır çeşidine ait tohumlardan elde edilen substratlarda farklı sıcaklık derecelerinde poligalakturonaz (PG) enzim aktivitesi. +%0.25 (w/v) 'lik poligalakturonik asitten (PGA) indirgenen gruptaki artış miktarı/da.....	33
Şekil 4.5. <i>F. verticillioides</i> izolatının (61) ve inokule edilmiş 84 nolu mısır çeşidine ait tohumlardan elde edilen substratlarda farklı pH derecelerinde pektat liyaz (PL) enzim aktivitesi. + % 0.25 'lik poligalakturonik asitten 1 µmol uronide oluşumu/da.....	33
Şekil 4.6. <i>F. verticillioides</i> izolatının (61) ve inokule edilmiş 84 nolu mısır çeşidine ait tohumlardan elde edilen substratlarda farklı sıcaklık derecelerinde pektat liyaz (PL) enzim aktivitesi. + % 0.25 'lik poligalakturonik asitten 1 µmol uronide oluşumu/da.....	34
Şekil 4.7. <i>F. verticillioides</i> izolatının (61) sıvı kültürde ve farklı yerel mısır çeşitlerini inokulasyonu süresince oluşturdukları poligalakturonaz (PG) izoenzim formları (beyaz renkli bantlar) S.P.: Standart protein.Sağ tarafta verilen izoelektrik noktaları (pI) standart proteine, sol tarafta verilen pI değerleri araştırma örneklerine aittir. ....	36

Şekil 4.8. *F. verticillioides* izolatının (61) sıvı kültürde ve farklı yerel mısır çeşitlerini inokulasyonu süresince oluşturdukları pektat liyaz (PL) izoenzim formları (beyaz renkli bantlar) S.P.: Standart protein. Sağ tarafta verilen izoelektrik noktaları (pI) standart proteine, sol tarafta verilen pI değerleri araştırma örneklerine aittir. ....37

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Batı Karadeniz Bölgesi'ndeki illerden alınan mısır örneklerinde <i>F. verticillioides</i> ile bulaşık tohum oranı .....	14
Çizelge 3.2. Örnek alınan illerin 2005 ve 2006 yıllarına ait sıcaklık yağış ve nem değerleri .....	15
Çizelge 3.3. Türk ve AB Gıda Kodeksine göre maksimum zearalenone (ZEA) limitleri .....	21
Çizelge 4.1. <i>F. verticillioides</i> ile bulaşık tohum tohumlardaki zearalenone (ZEA) miktarı .....	25
Çizelge 4.2. <i>F. verticillioides</i> ile bulaşık yerel mısır çeşitlerindeki zearalenone (ZEA) miktarının yıllara göre dağılımı .....	28
Çizelge 4.3. <i>Fusarium</i> spp. ile bulaşık olmayan yerel mısır çeşitlerindeki inokulasyondan önce ve sonraki zaeralenone (ZEA) miktarı ve toksin miktarındaki artış oranı .....	31
Çizelge 4.4. <i>F. verticillioides</i> 'in farklı mısır çeşitlerini enfeksiyonu süresinde oluşan poligalakturonaz (PG), pektin metil galakturonaz (PMG) ve pektat liyaz (PL) enzim aktiviteleri .....	35

## 1. GİRİŞ

Mısır (*Zea mays* L.) genellikle çok nemli iklim bölgelerinde yetiştirilebilen, tek yıllık özellikle yağı doymamış yağ grubunda olan bir endüstri bitkisidir. Bilimsel olarak sınıflandırmada Poales takımı, *Poaceae* familyası, *Zea* cinsi içinde yer almaktadır. Mısır bitkisinin anavatanı hakkında çeşitli görüşler ileri sürülmektedir. Ancak birçok kaynakta bitkinin ana vatanının Amerika kıtası olduğu belirtilmektedir (Kün 1997). Yurdumuza 16. yy ortalarında giren mısır bitkisi, insan besini ve hayvan yemi olarak fazlasıyla benimsenmiş, tarımının oldukça kolay olması nedeniyle de geniş yayılma alanı bulmuştur (Alkan 1973). Bu bitki doğrudan insan tüketiminde, hayvan beslenmesinde, sanayinin değişik alanlarında hammadde olarak ve tohumluk endüstrisinde kullanılmaktadır (Sencar ve ark. 1994). Bir mısır tanesinde yaklaşık %70 nişasta, %10 protein, %5 yağ, %2 şeker, %2 kepek ve ayrıca kül bulunmaktadır. Ülkemizde yetiştirilen mısır çeşit grupları; atdışi mısır, sert mısır, unlu mısır, şeker mısır, patlak (cin) mısır, mumlu mısır ve kavuzlu mısırdır (Kırtok 1998). Yurdumuzda üretilen mısır çeşitlerinin %80'ini ise sert mısır çeşidi grubu oluşturmaktadır (Şahin 2001).

Mısır yetiştiriciliğinde dünyada önde gelen ülkeler arasında Amerika Birleşik Devletleri, Çin, Brezilya, Meksika, Endonezya, Hindistan, Fransa Arjantin, Güney Afrika Cumhuriyeti, Ukrayna, Romanya ve İtalya gelmektedir. Ekiliş alanı ve üretim bakımından A.B.D ilk sırada yer alırken, Türkiye sırasıyla 21. sırada yer almaktadır. 2009 yılında dünyada toplam mısır ekim alanı 159.531007 ha, üretim 817.110.509 ton (Anonymous 2010a) Türkiye'de ise ekim alanı 592.000 ha ve üretim 4.250.000 ton olarak bildirilmiştir (Anonymous 2010b). Dünya ekiliş ve üretim rakamları ile kıyaslandığında, Türkiye'nin dünya mısır tarımında ekiliş alanı bakımından %0.38, üretim miktarı açısından ise %0.39'luk bir paya sahip olduğu görülmektedir. Ekiliş alanı ve üretim miktarları açısından mısır, ülkemizde buğday ve arpa bitkilerinden sonra 3. sırada yer almaktadır. Hemen hemen tüm bölgelerimizde yetiştirilmesine rağmen, ekonomik anlamda önemli olarak başta Akdeniz olmak üzere Karadeniz ve Marmara bölgelerinde yetiştirilmektedir. Karadeniz Bölgesi'nin ülkemiz mısır ekim alanları içindeki payı %33,3'tür. Batı Karadeniz Bölgesi illerinden Bartın, Bolu, Düzce ve Zonguldak illeri ise 553,753 da ekiliş alanı ve 635,160 ton üretimi ile Karadeniz Bölgesinde en fazla mısır yetiştiriciliğinin yapıldığı illerdir (Anonymous 2008).

Mısır ekim alanlarında hastalık ve zararlılardan kaynaklanan önemli ürün kayıpları söz konusudur. Bunların başında *Fusarium* türlerinin oluşturduğu koçan ve sap çürüklüğü ile kök ve kök boğazı hastalıkları gelmektedir.

Mısırdaki koçan çürüklüğü hastalık etmenlerinden birisi de *Fusarium verticilloides* (Sacc) Nirenberg (Syn: *F. moniliforme*)'dir. Hastalık sonucunda koçanda bireysel ya da gruplar halinde etmenin beyazımsı-pembe renkte misellerini görmek mümkündür (Şekil 1.1.). Ülkemizde yapılan çalışmalarda mısırdaki etmenin en yaygın tür olduğu bildirilmektedir (Sorani ve Asan 1987, Leslie ve ark. 1990, Nelson 1992, Logrieco ve ark. 1993, 1995, Gonzalez ve ark. 1995, Aktaş ve ark. 1998, Glenn ve ark. 2002, Adejumo ve ark. 2007a). Patojen fungus belirti vermeksizin bitkinin içerisinde endofitik olarak bulunabilmektedir (Glenn ve ark. 2002). Ayrıca etmenin tohumla taşındığı ileri sürülmektedir (Wilke ve ark. 2007, Somda ve ark. 2008).

Koçan çürüklüğü hastalıkları ürün miktarı ve kalitesinde azalmalara neden olmakta, ayrıca hastalığın şiddetine bağlı olarak oluşan toksin miktarları da sıcakkanlıklara zarar verecek seviyelere ulaşabilmektedir (Munkvold 2001). Son yıllarda mikotoksinlerle ilgili yapılan çalışmalar büyük artış göstermiş ve özellikle bu çalışmalarda *Fusarium* türlerinin oluşturduğu toksinler ön plana çıkmıştır.



Şekil 1. 1 Mısırdaki *F. verticilloides*'in oluşturduğu koçan çürüklüğü hastalığı

*F. verticillioides* insan ve diğer sıcakkanlılarda kanserojen etkisi bilinen “Zearalenone” (ZEA) adı verilen bir toksinin mısır koçanlarında oluşmasına neden olmaktadır. ZEA soğuk iklim koşullarına maruz kalan nemli hububatta hızla üremektedir. Östrojen benzeri anabolik bir etkiye sahip olup, etkileri veteriner hekimliğinde daha iyi bilinmektedir. En duyarlı hayvan domuzdur. Süt sığırları, tavuk ve hindilerde infertilite, mumifikasyon ile fetal absorpsiyon ve abort meydana getirmektedir. Bir östrojen agonisti gibi davranarak 17- $\beta$  östradiol ile östrojen reseptörlerine bağlanmak üzere yarışmakta, zayıf mitojen maddeler gibi davranarak meme tümörü oluşumuna yol açmaktadır. Kadınlarda meme ve uterus kanserine neden olmaktadır. Atlara 10 ppm ZEA verildiğinde meme kanseri oluşumu gözlemlenmiştir. ZEA, bulaşık yemle beslenen hayvanların sütü ve yumurtası ile çıkartılmaktadır Kanatlılarda ibik, ovaryum ve testis ağırlığında artışa ve ovidukt kisti oluşumuna yüksek dozda fertilitte ve permatogenezisde azalmaya yol açmaktadır. Yemle birlikte 0.05 ppm miktarlarında alan domuzlarda bu belirtiler daha baskın olarak açığa çıkmaktadır. Yüksek dozlarda hayvanlarda kalıcı öst-usa ve infertiliteye neden olmaktadır (Fink-Gremmels 1999). Ortaya çıkma sıklıkları ülke ve bölgelere göre farklılık göstermekle birlikte (Oruç 2005) *Fusarium* cinsine giren fungusların ürettikleri diğer mikotoksinler arasında deoxynivalenol DON, T-2 ve HT-2 toksinleri ve fumonisin (FUM) yer almaktadır. *F. verticillioides* ile yapılan çalışmalarda ise daha ziyade FUM üretimi ile üzerinde durulmuştur.

Bazı mikotoksinler endotoksin olarak misel içinde birikirken, birçoğunun miselden substrata doğru salgılandığı ve difüze olduğu görülmektedir. Bu nedenle küflü gıda ve yemlerden miseller uzaklaştırılsa bile ürünün mikotoksin tehlikesi ortadan kalkmamaktadır (Anonymous 2006).

Mikotoksin alımının neden olduğu başlıca sağlık sorunları olarak; kanserojenik, teratojenik (embriyonal zararlanmalar), tremorgenik (titreme ve refleks kayıpları sorunları), hemoraljik (doku ve organlarda kanama sorunları), dermatitik (deride lezyonlar), hepatoksik (karaciğer zararlanmaları), nefrotoksik (böbrek sisteminde zararlanmalar), nörotoksik (sinir sistemi zararlanmaları) vb. olumsuzluklar örnek olarak sayılabilmektedir. Ayrıca ölüme sebep olabilen akut riskler de taşımaktadırlar. Mikotoksinleri üreten funguslar yetiştirme sürecinde, hasat sırasında, ürünün işlenmesi, işlemeyi izleyen evrede ya da depolama evresinde, ürünlere bulaşabilmektedir. Hayvanlar da toksin riskinin bulaşması bakımından doğrudan tehlike taşıyan faktörler olabildiği gibi,

yaşamdaki büyüme sürecinde veya tüketim esnasında doğal biyo-döngü ile bağlantılı olarak, toksik maddelerin tüketiciye geçişinde etken faktör olabilmektedirler (Topal 2003).

Mikotoksinlerin önemi gelişmiş ülkelerde son yirmi yılda iyi anlaşılabilirdiği halde bu konu ülkemizde yeni yeni dikkate alınmaktadır. Mikotoksin çalışmaları Avrupa Birliği'nin de öncelikli konuları içinde yer almaktadır. Ülkemizdeki durumun bilinmesi bu açıdan da oldukça önemlidir.

Daha önceki yıllarda Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) desteği ile Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü'nde tarafımdan yürütülen bir projede, Batı Karadeniz Bölgesi'nde yetiştirilen mısır çeşitlerine ait tohumların *F. verticillioides* ile bulaşıklılık oranının % 2 ila %86 arasında değiştiği tespit edilmiş, etmenin ürettiği mikotoksinlerden deoxynivalenol (DON) ve fumonisin'inin (FUM) varlığı belirlenmiştir. Söz konusu çeşitlerde etmen tarafından üretilen, yine insan ve sıcakkanlılarda kanserojen etkisi bilinen ZEA toksini açısından da incelenmesi gerekmektedir. Yapılan projede ayrıca bazı mısır çeşitlerinin *F. verticillioides* ve diğer *Fusarium* türleri ile bulaşık olmadığı dikkati çekmiş, bu çeşitlerin hastalığa karşı dayanıklılık durumlarının belirlenmesi gerektiği düşünülmüştür.

Bitki hastalıklarına karşı dayanıklılık çalışmaları genellikle, etmenlerin oluşturdukları enfeksiyon oranları ya da hastalık şiddetleri dikkate alınarak gerçekleştirilmekte bu durum bazı yanılgılara neden olmaktadır. Dayanıklılık testlerinin konukçu-patojen ilişkileri çerçevesinde gerçekleştirilmesi daha net sonuçların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu bağlamda düşünüldüğünde, *F. verticillioides*'in sekonder metabolitleri olan mikotoksinleri üretmeden önce, konukçu bitkiyi penetrasyonu sırasında bitki hücre duvarının orta lamelinin ana maddesi olan pektini parçalayarak hücre ölümüne neden olan pektolitik enzim üretimi dikkat çekici bir noktadır. Bu üretim mısır çeşitlerine göre farklılık göstermektedir.

Bu çalışmanın amacı, Batı Karadeniz Bölgesi'nde yetiştirilen ve *F. verticillioides* ile bulaşıklılık oranları bilinen yerel mısır çeşitlerinde ZEA varlığını belirlemek herhangi bir *Fusarium* türü içermeyen tohum örneklerinin *F. verticillioides*'e karşı dayanıklılık durumunu pektolitik enzim ve toksin üretimi dikkate alınarak tespit etmektir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. *F. verticillioides*'in oluşturduğu mikotoksinler ile ilgili çalışmalar

Mısır koçanında farklı funguslar bulunabilmekte ve bunlardan bazıları mikotoksin üretebilmektedir. Fitopatolojik yönden yapılan araştırmalarda toksinin varlığı ile birlikte etmenin bulunma oranı da büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, mısır tanelerinde mikotoksin tayinine yönelik çok sayıda rutin çalışmadan ziyade, *Fusarium* türünün varlığının belirlendiği araştırmalar burada dikkate alınmıştır.

Munkvold (1994)'un yaptığı surveylerde; koçan çürüklüğünün gözle görülebildiği koçanların yanı sıra %46 oranında hiç belirti vermeksizin mikotoksin üretebilen *Fusarium* türlerine *F. graminearum* ve *F. verticilloides* 'inde dahil olduğu saptanmıştır

A.B.D.'de 1992 ve 1993 yılları arasında yapılan bir çalışmada Wisconsin eyaletinden 25 kasabaya ait 98 tarladan mısır koçan örneği toplanarak, bu örneklerin mikrobiyal içerikleri ve toksin konsantrasyonları açısından analizleri yapılmıştır. İncelenen örneklerin 85'inde, %67.1 oranında *F. graminearum*, %57.6 oranında *F. subglutinans*, %56.5 oranında *F. sporotrichioides*, %44.7 oranında *F. poae*, %22.4 oranında *F. moniliforme* ve %11.8 oranında *F. proliferatum* tespit edilmiştir. Ayrıca örneklerin büyük bir kısmında saprofitik olarak bulunan *Cladosporium* ve *Epicoccum* spp.'de saptanmıştır. Çalışma sonucunda %40'ın üzerindeki örnekte toplam DON ve %17'nin üzerindeki örnekte tip-A trichotecenlerin 1-100 ppb arasında değişen miktarlarda bulunduğu belirlenmiş, tüm örneklerdeki ortalama tip-A trichotecenlerin miktarının 305.6 ppb, ortalama toplam DON miktarının 237.7 ppb, ortalama ZEA miktarının ise 904.3 ppb olduğu tespit edilmiştir (Park ve ark. 1996).

Saubois ve ark. (1998) Arjantin'in merkezi ve Santa Fe eyaletinin kuzeyinden temin edilen toplam 37 mısır örneğinde aflatoksinlerin (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> ve AFG<sub>2</sub>), B tipi trichotecenlerin (DON, Nivalenol-NIV, 3-ADON, 15-ADON, 4-ANIV) ve ZEA'un doğal oluşumlarını araştırmışlardır. Çalışmada örneklerin *F. graminearum*, *A. flavus* ve diğer *Fusarium* spp. ile bulaşık oldukları belirlenmiştir. *A. flavus* örneklerin %56.8'inde



(örneklerdeki tanelerde bulunma oranı %2.5-30), *F. graminearum* ise örneklerin %35.1'inde (örneklerdeki tanelerde bulunma oranı % 2.5-12.5) saptanmıştır. Örneklerin, %10.8'inin AFB<sub>1</sub> ve/veya AFB<sub>2</sub> ile bulaşık olduğu belirtilirken, bu örneklerde DON ve diğer araştırılan B tipi trichothecenlerle ZEA'un bulunmadığı bildirilmiştir.

Arjantin'in Entre Rios eyaletinin 3 ayrı bölümünden fungus bulaşmaları ile *Fusarium* mikotoksinleri, aflatoxin ve ochratoksin (OA)'nın doğal oluşumunu belirlemek amacıyla 1999 yılında bir sürvey çalışması yapılmış ve 52 adet mısır örneği toplanmıştır. Sürvey çalışmasının yürütüldüğü 3 bölgede de *F. verticilloides* en yaygın fungus türü olarak belirlenmesine rağmen ZEA, DON ve OA örneklerin hiçbirinde tespit edilmemiştir (Pacin ve ark. 2001).

Demir (2002), Samsun ili merkez köyleri ve ilçelerinden tarladan (hasat öncesi), harmandan koçan olarak ve mısır borsasındaki tüccarlardan alınan 100 mısır örneğinin %94 ünün *F. verticilloides* ile bulaşık olduğunu bildirmektedir. Araştırmacı 52 örnekte Fumonisin B1 miktarının 50-25720 ppb 25 örnekte fumonosin B2 miktarının 50-5700 ppb arasında değişen seviyelerde bulunduğunu, ayrıca bulaşık olmadığı belirlenen örneklerin birinde yüksek seviyede FB1 ve FB2 bulunduğunu belirlemiştir.

Glenn ve ark. (2002), *F. verticilloides*'in ana konukçusunun mısır olduğunu, bitkide önemli ekonomik kayıplara yol açtığını, ayrıca sıcakkanlı canlılara olumsuz etkilerini olduğunu kaydetmektedirler.

Logrieco ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada, Avrupa'da *Fusarium* toksinleri içerisinde en yaygınlarının titikotosen, zerelon, fumonisin ve moniliformin olduğunu ve kırmızı koçan çürüklüğü belirtisi gösteren mısır koçanlarında en yaygın toksin türlerinin deoxynivalenol ve zearelonone olduğunu belirtmişlerdir.

Domijan ve ark. (2005) tarafından Hırvatistan'da 2002 yılı sonbaharında yapılan çalışmada toplanan 15 mısır örneği, (FB<sub>1</sub>), (FB<sub>2</sub>), (ZEA) ve (OA) seviyelerinin belirlenmesi amacıyla incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda *Penicillium* spp. ve *F. graminearum* örneklerin tamamında, *F. proliferatum* 15 örneğin 14'ünde, *F. verticilloides* 8'inde, *Trichoderma* spp. 7'sinde, *Aspergillus* spp. ve *Alternaria* spp. ise 5'inde tespit edilmiştir. *Penicillium* spp. örneklerde ortalama %57.8, *F. proliferatum*

ortalama %18.1, *Aspergillus* spp. ortalama %10.2, *F. verticilloides* ortalama %4.3 ve *F. graminearum* ise ortalama %4.1 oranında belirlenmiştir. FB<sub>1</sub>'in örneklerin tümünde en düşük 196.8 ppb, en yüksek 1377.6 ppb, FB<sub>2</sub>'nin ise sadece 2 örnekte 68.4 ve 3084.0 ppb düzeylerinde saptandığı bildirilmiştir. Yine ZEA'un 15 örneğin 12'sinde ortalama 1.40 ppb, ochratoksin (OA)'in ise 15 örneğin 7'sinde ortalama 1.70 ppb düzeyleri ile bu çalışmada belirlenen diğer toksinler oldukları ifade edilmiştir.

Blandino ve ark. (2009) *Fusarium* koçan çürüklüğüne karşı hassas olan iki farklı mısır çeşidi kullanarak, üç farklı yıl (2000, 2001 ve 2002) ve ayda (Mart, Nisan ve Mayıs) ekim yaparak, tarlada hastalık şiddetini ve mikotoksin üretimini araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda ekim zamanlarına göre değişmekle birlikte yüksek oranda (%13,5-96) *F. verticillioides*, düşük oranda (% 0-7,5) *F. graminearum* enfeksiyonu olduğunu, FUM' in tüm yıllarda yüksek oranda var olduğunu ZEA ve DON'un ise sadece yağışın daha fazla olduğu 2002 yılında test edilen tanelerde bulunduğunu, geç ekimlerde mikotoksin miktarında artış meydana geldiğini belirlemişlerdir.

Tabuc ve ark. (2009), Romanya da 54 adet mısır örneğinden yapılan izolasyonlarda örneklerin *F. graminearum* (%29,3), *F. culmorum* (%18,5) ve *F. verticillioides* (%18,3) ile bulaşık olduğunu örneklerin %36 sının DON (>1,750 ppb), %18 inin ise ZEA (100 ppb) içerdiğini tespit etmişlerdir.

Miedaner ve ark. (2010), 3 farklı yılda çiçeklenme döneminden sonra *Fusarium verticillioides* ile inokule edilmiş mısır örneklerinde hasat döneminde meydana gelen Fumonisin miktarını belirlemişlerdir. Araştırmacılar söz konusu toksin miktarının 2006, 2007 ve 2008 yıllarında sırasıyla ortalama 56.6, 8.6, 74.4 ppm olduğunu bildirmektedirler.

Mukanga ve ark. (2010), Zambia'da mısır üretimi yapılan alanlardan alınan koçan çürüklüklüğü belirtisi gösteren ve göstermeyen örneklerde en yüksek oranda *F. verticillioides* izole edildiğini, yine örneklerin çoğunun fumonisin içerdiğini belirtmektedirler.

## 2.2. *F. verticillioides*'in ürettiği pektolitik enzimlerle ilgili çalışmalar

Dış ülkelerde yapılan çalışmalarda, *F. verticillioides*'nin' *in vitro* koşullarda (sıvı kültürde) ve değişik konukçu bitkileri enfeksiyonu süresince pektolitik enzimleri (Poligalakturonaz-PG; Pektin metil galakturonaz-PMG; Pektat Liyaz-PL) ve izoenzim formlarını üretimi ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Hameed ve ark. (1991), mısırdan elde ettikleri *F. verticillioides* izolatının (F3) pektinmetilesteraz (PME) ve PG enzimlerini 35°C 'de üretme yeteneğine sahip olduğunu bildirmektedir.

Mehta ve ark. (1992) pektin substrat olarak kullanıldığında *F. verticillioides* izolatının PMG üretebildiğini, misel ağırlığı ile enzim üretimi arasında bir ilişki olmadığını bildirmektedirler.

Yubedee ve Arinze (1994), çürümüş mısır tohumlarından izole ettikleri 2 *F. verticillioides* izolatı tarafından üretilen PG enziminin PG1 ve PG2 izoenzim formlarının, mısır, havuç, cocoyam (*Colocasia esculenta*) ve tatlı patates tarafından yüksek miktarda adsorbe olduğunu, PG1 formunun enfekteli dokuyu bir saat içinde ayrıştırdığını ve PG2 formuna göre daha toksik olduğunu tespit etmişlerdir.

Shihata ve ark. (1995), farklı börülce çeşitlerinin *F. verticillioides*, *F. oxysporum* ve *F. solani* 'ye karşı reaksiyonlarına yönelik yaptıkları çalışmalarda, *F. moniliforme* 'nin enfekteli fidelerde düşük oranda pektinaz enzim aktivitesi sergilediğini tespit etmişlerdir.

Rao ve ark. (1996) *F. verticillioides* tarafından üretilen PL enzime ait bir izoenzim formunun izoelektrik nokta (pI) değerinin 9.1 olduğunu bildirmektedir.

Posada ve ark. (2001), çam ağaçlarından izole edilen *F. verticillioides*'in yüksek PG enzim aktivitesine sahip olduğunu ve asidik ve bazik karakterde kompleks izoenzim formlarını sergilediğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar patojenin PG enziminin endo ve exo formunu oluşturma yeteneğinde olduğunu bildirmektedirler.

Daroda ve ark. (2001), *F. verticillioides*'nin mısır bitkisini erken gelişme dönemlerinde enfeksiyonu süresince endopoligalakturonaz enzim aktivitesinin önemli rol oynadığını tespit etmişlerdir.

Ibiam ve Arinze (2005), çeltik tohumlarından elde edilen *F. verticillioides* tarafından *in vitro* koşullarda poligalakturonaz üretimi için optimum sıcaklığın 25 ve 30°C, *in vivo* koşullarda ise 20°C olduğunu, yine *in vitro* ve *in vivo* koşullarda poligalakturonaz üretimi için optimum pH'nın sırasıyla 5-6 ve 6 olduğunu belirlemişlerdir.

Ahmad ve ark. (2006), mısırdaki sap çürüklüğüne neden olan fungal patojenlerden *F. verticillioides* (*Gibberella moniliformis*) 'nin *in vitro* koşullarda pektinaz enzimini ürettiğini, ancak pektinaz aktivitesinin 48 saat sonra azaldığını ileri sürmektedirler.

Niture ve Pant (2004), tropikal bitkilerden izole edilen *F. verticillioides* izolatının ürettiği PG izoenzimlerinden PG I 'in sadece sıvı kültürde oluştuğunu, buğday kepeği ve portakal posası içeren ortamda ise PG I ile birlikte PG II izoenzim formlarını sergilediğini, PGI ve PG II 'nin alkali karakterde olup sırasıyla 8.1 ve 8.6 isoelektrik noktasına (pI) sahip olduğunu bildirmektedirler.

Niture ve Pant (2007), tropikal bitkilerden izole edilen *F. verticillioides* izolatının pH 3-9 arasında iyi geliştiğini, sıvı kültürde pektinaz (PG ve PL), karboksimetilsellulaz, ksilanaz ve amilaz gibi hücre duvarını parçalayan enzimleri üretebildiğini, bu enzimlerin üretiminin buğday kepeği ve portakal hamuru içeren yarı katı ortamlarda daha fazla olduğunu bildirmektedirler. Araştırmacılar patojenin domates ve karnabahar bitkilerini enfekte ettiğinde, bitkilerin kortikal dokularında lokalize olduğunu, pektinaz, karboksimetilsellulaz ve ksilanaz enzimlerini salgıladığını tespit etmişlerdir.

Niture ve ark. (2008), *F. verticillioides* ile yaptıkları çalışmada, hücre dışı PG ve PL üretiminin sırasıyla pH5 ve pH8 de gerçekleştiği, ortam ve hücre özsuyu pH 'sının domates ve karnabahar fidelerini enfeksiyonu süresince önemli olduğu bildirmektedirler.

### **2.3. Mısırdaki *F. verticillioides*'e dayanıklılık ve dayanıklılığın mikotoksin ve pektolitik enzim üretimi ile ilişkisine yönelik çalışmalar**

Mısır çeşit ve hatlarının Fusarium koçan çürüklüğüne neden olan *F. verticillioides*'e karşı dayanıklılık çalışmaları hastalık şiddeti ölçülerek gerçekleştirilmiştir. Dayanıklılığın konukçu-patojen ilişkisi sırasında meydana gelen biyokimyasal olaylar ise aşağıda kronolojik sırada verilen çalışmalarda görüldüğü gibi etmenin sekonder metabolitleri olan mikotoksinlerden fumonisin dikkate alınarak incelenmiş, hastalık şiddeti ile etmenin konukçuyu enfeksiyonu süresince ürettiği pektolitik enzimler ve zearalenone ile ilişkisine yönelik yapılmış bir çalışma ile karşılaşılmamıştır.

Presello ve ark. (2007) 16 hibrit mısır çeşidine tarlada *F. verticillioides* ile mısır püskülü inokulasyonu sonucunda oluşan enfeksiyon şiddeti ve fumonisin miktarını ölçmüşlerdir. Araştırma sonucunda fumonisin konsantrasyonunda etkili genotipik etkilerin hastalığa karşı dayanıklılıkta etkili olan genotipik etkilere bağlı olduğunu, gözle görünen hastalık şiddetinin yüksek düzeyde fumonisin biriktiren çeşitleri elimine etmek için ön seçim kriteri olabileceğini bildirmektedirler.

Aynı araştırmacılar daha sonraki yılda yaptıkları bir çalışmada (Presello ve ark. 2008), *F. verticillioides*'e karşı ikisi dayanıklı, biri hassas olmak üzere 3 mısır hibrit çeşitinde, etmeni tarlada mısır püskülleri arasına inokule etmişler, inokule edilmiş ve doğal koşullarda gelişen koçanlarda enfeksiyon şiddeti ve fumonisin üretimini incelemişlerdir. Araştırmacılar, hassas çeşide ait koçanların her iki yılda da %50'den fazlasının etmenle enfekte olduğunu, dayanıklı çeşitlerin ise yine her iki yılda %50'den daha az oranda etmenle enfekte olduğunu ve verim kaybının azaldığını, ancak fumonisin konsantrasyonunun düşük oranda enfeksiyon şiddeti gösteren koçanlarda dahi yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Schjøth ve ark. (2008), 20 adet Zambian mısır hibrit çeşitlerini *Fusarium* spp. ile bulaşıklılık oranı ve *F. verticillioides*'e dayanıklılık açısından incelemişler, izole edilen *Fusarium* türlerinin % 95'inin *F. verticillioides* olduğunu, etmenin herhangi bir symptom oluşturmayan koçanlardan daha yüksek oranda izole edildiği bildirmişlerdir. Araştırmacılar doğal koşullar altında Fusarium koçan çürüklüğü açısından çeşitler arasında farklılık olmadığını, tarlada ekimden 62-88 gün sonra yapılan suni inokulasyonlar

sonucunda, enfeksiyon şiddeti dikkate alındığında iki hibrit çeşidin (MM701-1 ve MM 752) etmene karşı dayanıklı olduğunu tespit etmişlerdir.

Sampietro ve ark. (2009), 14 adet mısır genotipine ait tanelerin *F. verticillioides* tarafından üretilen fumonisin birikimine karşı dayanıklılığını, laboratuarda tanelerin yaralandığı ve yaralanmadığı koşullarda perikarp ve üzerindeki mum tabakasının rolünü dikkate alarak araştırmışlar, tane üzerindeki mum tabakası kaldırıldığında fumonisin konsantrasyonunun arttığını, perikarp ve üzerindeki mum tabakası içeriğinin fumonisin birikimine karşı dayanıklılık faktörü olduğunu belirlemişlerdir.

Alessandra ve ark. (2010), farklı mısır hatlarında *F. verticillioides* tarafından fumonisin üretimi ile enfeksiyon şiddeti arasındaki ilişkiyi incelediklerinde dayanıklı hatların tanelerinde enfeksiyon şiddetinin azaldığı ve sınırlı miktarda fumonisin üretildiğini, bu mekanizmada dayanıklılık genlerinin rol oynadığını ortaya koymuşlardır.

Löffler ve ark. (2010a), 2007-2008 yıllarında, Almanya, İtalya, Fransa ve Macaristan'ın farklı bölgelerinde, üç farklı olgunlaşma dönemini (erken, orta ve geç) dikkate alarak 150 hibrit hattı (diş mısır ve sert mısır) *F. verticillioides*'e karşı dayanıklılık açısından test etmişler, testlerde suni (püsküllerden inokulasyon) ve doğal inokulasyon yöntemlerini kullanmışlardır. Araştırmacılar sert mısır hatlarının etmene karşı daha hassas olduğunu, dayanıklılık için seleksiyon çalışmalarının at diş mısır hatları ile yapılması gerektiğini ve suni inokulasyonun daha gerçekçi sonuçlar verdiğini bildirmektedirler. Söz konusu çalışmada kurak koşullarda *F. verticillioides* tarafından oluşturulan koçan çürüklüğü hastalık şiddetinin arttığı, abiyotik stres faktörlerine karşı tolerans gösteren çeşitlerin koçan çürüklüğüne karşı dayanıklılığının artacağı ileri sürülmektedir. Aynı araştırmacılar yaptıkları diğer bir çalışmada (Löffler ve ark. 2010b) fumonisin oluşumu ile hastalık şiddeti arasındaki ilişki dikkate alınarak etmene karşı dayanıklı genotiplerin seçiminde mikotoksin miktarının dikkate alınması gerektiğini, düşük hastalık şiddeti gösteren ancak yüksek mikotoksin içeren çeşitlerin elimine edilmesi gerektiğini bildirmektedirler.

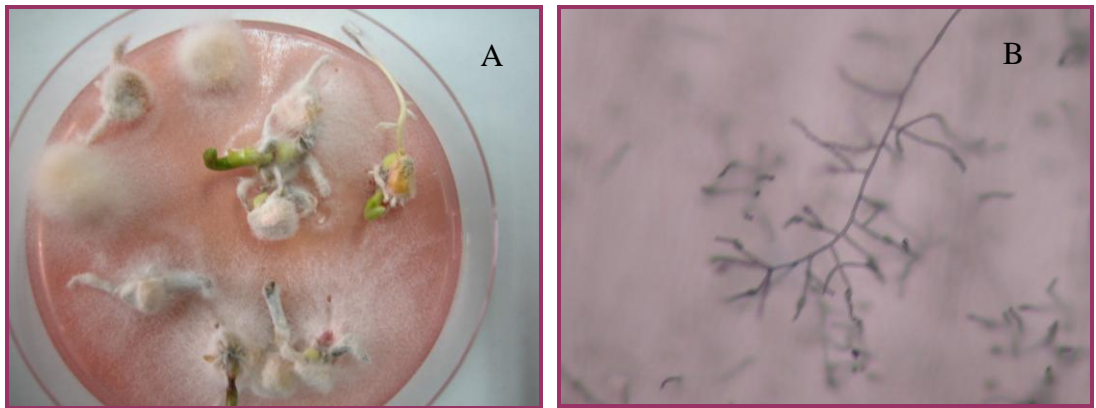
Nagy ve ark. (2010), 3 farklı hibrid mısır çeşidi üzerinde tür dikkate alınmaksızın *Fusarium* koçan çürüklüğü hastalığının etkisini suni inokulasyonlar yaparak belirlemeye çalışmışlar ve enfeksiyon sonucunda çeşitlerin nişasta ve yağ içeriğinde azalma, bunun

tersine protein ve mikotoksin (DON, FUM ve ZEA) içeriklerinde önemli artışın olduğunu tespit etmişlerdir. Hastalıklı tane ve mikotoksin içeriği arasında pozitif bir korelasyon varken, ürün verimi ile mikotoksin içeriği arasında negatif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

Çalışmanın bitki materyalini Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) desteği ile tarafımdan Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsünde yürütülen “Batı Karadeniz Bölgesi Mısır Ekiliş Alanlarında Koçan Çürüklüğüne Neden Olan *Fusarium* Türlerinin Yayılışı Ve Önemli Mikotoksinlerinin Saptanması” isimli proje kapsamında 2005 ve 2006 yıllarında toplanan, peptone PCNB agar üzerinde yapılan izolasyonlar sonucunda *F. verticillioides* ile farklı oranlarda bulaşık olduğu bilinen 70 yerel mısır çeşidi (Çizelge 3.1) ve herhangi bir *Fusarium* türü ile bulaşık olmayan 11 adet mısır çeşidi oluşturmuştur. Çalışmada ayrıca bu koçanlardan elde edilen ve patojen olduğu bilinen *F. verticillioides* izolatu (Şekil 3.1), patates dekstroza agar (PDA) besi ortamı, antibiyotikler, laboratuvar malzemeleri, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazı, çalkalayıcı, santrifüj, evaporatör, spektrofometre, yatay IEF elektroforez vb. cihazlar, toksin standartları, toksin analiz çalışmalarında kullanılacak kimyasallar, ile laboratuvarda kullanılan diğer araç ve gereçler oluşturmuştur.



Şekil 3.1. *F. verticillioides*'in tohum üzerindeki gelişimi (A) ve mikroskopik görünümü (B)



Çizelge 3.1. Batı Karadeniz Bölgesi'ndeki illerden alınan mısır örneklerinde *F. verticillioides* ile bulaşık tohum oranı

Örneğin alındığı		Bulaşık tohum oranı (%)	Örneğin alındığı		Bulaşık tohum oranı (%)
İl	İlçe-köy		İl	İlçe-köy	
Bartın	Göynük-Çavuştepe	6	Bolu	Merkez	6
	Göynük-Çavuştepe	18		Merkez	18
	Merkez	10		Merkez-Mescile	10
	Kayadibi	12		Merkez-Mescile	12
	Gürpınar	10		Merkez-Mescile	10
	Kayadibi	10		Merkez-Mescile	10
	Merkez	18		Örencik	18
	Merkez	78		Merkez	78
	Merkez	26		Mudurnu-Sarıyar	26
	Merkez	36		Mudurnu-Sarıyar	36
	Merkez-Okçular	12		Mudurnu-Sarıyar	12
	Merkez-Okçular	36		Mudurnu-Sarıyar	36
	Darıören	42		Çaycuma-Çomralı	10
	Düzce	Merkez-Yazıpınar		6	Çaycuma-Karakoç
Merkez-Alacamescit		10	Karapınar	11	
Hocaoğlu		13	Çaycuma-Çomralı	18	
Merkez-Kuşaçması		16	Çaycuma-Çomralı	14	
Merkez-Kuşaçması		10	Çaycuma-Çomralı	86	
Gölyaka		40	Çaycuma-Kayıkçılar	60	
Merkez-Yenikaraköy		14	Çaycuma-Kayıkçılar	4	
Merkez-Köprübaşı		2	Ereğli-Çiğdemli	26	
Merkez-Konuralp		6	Çaycuma-Çomralı	56	
Merkez-Köprübaşı		16	Çaycuma-Kayıkçılar	6	
Merkez-İçmeler		50	Ereğli-Yazıcılar	12	
Merkez-Paşakonağı		8	Çaycuma-Karakoç	54	
Gölyaka-Boyamacı		38	Çaycuma-Çomralı	10	
Gölyaka-Hacıyakup		14	Çaycuma-Çomralı	16	
Gölyaka-Hacıyakup		40	Ereğli-Kızılcapınar	12	
Merkez-Konuralp		20	Çaycuma-Kayıkçılar	18	
Merkez-Köprübaşı		18	Çaycuma-Kayıkçılar	4	
Gölyaka-Hacıyakup		46	Ereğli-Yazıcılar	24	
Gölyaka-Aydınınarı		18	Ereğli-Yazıcılar	68	
Gölyaka-Boyamacı		4	Çaycuma-Kayıkçılar	24	
Gölyaka-Aydınınarı		6	Çaycuma-Karakoç	6	
Gölyaka-Aydınınarı		24			
Merkez-Yenikaraköy		8			

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Çalışma materyalinin toplanma yöntemi ve muhafazası

Mısır koçanı örnekleri 2005 ve 2006 yıllarının mısırın tam olum dönemi olan Ağustos-Eylül aylarında, sistematik örnek alma yöntemine göre Bartın, Bolu, Düzce ve Zonguldak illeri mısır ekiliş alanına göre belirlenen tarla sayısı ve büyüklüğü dikkate alınarak ekim alanının en az %0.5'ini temsil edecek şekilde tesadüfi örnekleme yapılarak toplanmıştır (Bora ve Karaca 1970). Örneklemelemlerde seçilen tarlaların köşegenleri doğrultusunda yürünerek 10 da'dan küçük olan tarlalardan 5 koçan, 10-100 da arası büyüklükte olan tarlalardan ise 10 koçan örneği alınarak kağıt poşetlere konulmuş ve poşetler etiketlenmiştir (Munkvold 1994). Her bir tarladan alınan örneklerin rakım ve koordinatları belirlenerek kayıt edilmiş ve ayrıca illerin nem, sıcaklık ve yağış değerleri Metroloji Genel Müdürlüğünden alınmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Örnek alınan illerin 2005 ve 2006 yıllarına ait sıcaklık yağış ve nem değerleri

İller	Yıllar	Sıcaklık (°C)	Nem (%)	Yağış (mm)
<b>Bartın</b>	2005	17.67	71.87	80.37
	2006	18.14	74.37	43.45
	<b>Ortalama</b>	<b>17,90</b>	<b>73,12</b>	<b>61,91</b>
<b>Bolu</b>	2005	15.80	71.1	39.42
	2006	19.82	69.2	31.02
	<b>Ortalama</b>	<b>17,81</b>	<b>70,15</b>	<b>35,22</b>
<b>Düzce</b>	2005	18.38	74.55	59.12
	2006	17.81	71.81	38.7
	<b>Ortalama</b>	<b>18,09</b>	<b>72,98</b>	<b>48,91</b>
<b>Zonguldak</b>	2005	18.04	76.45	93.65
	2006	18.65	75.44	98.88
	<b>Ortalama</b>	<b>18,34</b>	<b>75,94</b>	<b>96,26</b>

Her bir kâğıt poşette bulunan koçan örnekleri soyulduktan sonra taneler koçanlardan ayrılarak paçal yapılmıştır. Bu karışım oda sıcaklığında 1 hafta kurutulduktan sonra tekrar kağıt poşetlere konularak üzerlerine alındıkları yer, tarih, tarla sahiplerinin isimleri yazılarak etiketlenmiş, *F. verticillioides* ile bulaşık tohum oranları belirlenmiş ve bu

örnekler toksin analizleri ve dayanıklılık testleri yapılmaya kadar 4 °C’de ki soğuk hava deposunda muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2. Zearalonone Analizi

Toksin analizi sırasında *F. verticillioides*’in saptandığı örneklerin her birinden hassas terazi ile 50’şer g tartılarak kağıt poşetlere konulduktan sonra, bu poşetler numaralandırılmıştır.

Analizler HPLC cihazında, Fazekasa ve Tar (2001) 'dan yararlanılarak yapılmıştır. Zearalonon analizi sırasında aşağıda belirtilen işlem sırası takip edilmiştir.

**Örnek Hazırlama:** Mısır örneklerinden 50 g alınarak 20 mesh’lik elekli değirmende öğütülmüştür (Şekil 3.2). Öğütülerek elde edilen mısır unları kapaklı bir kaba konularak numaralandırılmıştır.



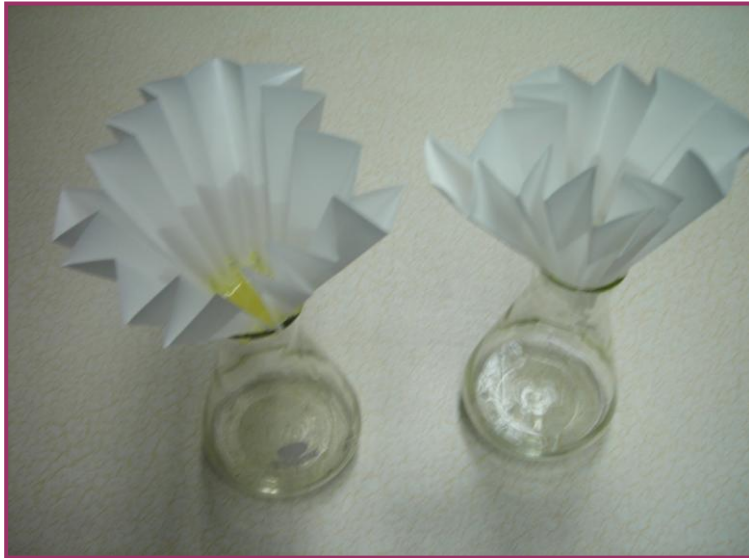
Şekil 3.2. Değirmen

**Ekstraksiyon:** ZEA toksin analizi için hazırlanan örnekler aşağıdaki yönteme göre ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur.

250 ml' lik erlen içinde 25 g mısır ununa, 4 g tuz (NaCl) ilave edilerek karıştırılmış, üzerine 100 mL metanol+su (80+20)(V+V) karışımı eklenmiş ve 60 dakika çalkalama cihazında (Şekil 3.3) çalkalanmıştır. Elde edilen karışım, filtre kâğıdından (Whatman No.4) geçirilerek süzölmüştür (Şekil 3.4).



Şekil 3.3. Örneklerin çalkalayıcıda çalkalanması



Şekil 3.4. Ekstraktın filtre kâğıdından süzölmesi

**Immunoaffinite kolon (IAK) ile temizleme işlemi:** Ağzı kapaklı bir erlene elde edilen süzütüden 10 ml alınarak üzerine 40 ml saf su eklenmiş ve karıştırılmıştır. Bu şekilde seyreltilmiş olan bu ekstrakt cam mikrofiber filtreden süzülmüştür (Şekil 3.5 A ve B ). IAK kolonları vakum manifolduna yerleştirilmiştir. Ekstraktan 20 ml alınarak yaklaşık 3-6 ml/dakika (1-2 damla/sn) hızla kolondan geçirilmiştir (Şekil 3.5 C ve D). Ekstrakt geçişi tamamlandıktan sonra kolondan 2-3 ml hava, ardından 20 ml su geçirilerek (2 damla/sn) yıkanmış, tekrar 2-3 ml hava geçirilerek kolon manifolddan ayrılarak vial üzerine yerleştirilmiştir. Daha sonra 1,5 ml HPLC saflıkta Asetonitril (ACN) ile ZEA vialine elute edilmiş ve tekrar 2-3 ml hava geçirilerek kolonda ACN kalmaması sağlanmıştır. Eluata 1,5 ml ultra saf su ilave edilmiş ve 0,2 µm' lik filtreden geçirilerek HPLC cihazında enjeksiyona hazır hale getirilmiştir. Her bir örnek iki paralel çalışılmıştır. HPLC ile yapılan ekstraksiyonların çoğunda performansı yüksek, kesinlik, doğruluk, spesifiklik, hassasiyet ve yeniden üretilebilirlik sağlayan immunoaffinite kolon kullanılmakta ve gıda kontrol ve tarama programlarında da bu kolonlardan yararlanılmaktadır (Visconti ve Girolamo 2005).



Şekil 3.5. Cam mikrofiber filtre (A), örneklerin filtreden süzülmesi (B), hızlı kolon (C) ve örneklerin hızlı kolondan geçirilmesi (D)

### 3.2.3. HPLC ile zearalenone konsantrasyonunun belirlenmesi

IAK'dan geçirilen örnekler Agilent 1100 HPLC cihazı ile analiz edilmiştir.

HPLC cihaz koşulları aşağıda verilmiştir.

Hareketli faz: Su : ACN (asetonitril) (1:1) (v+v)

Akış hızı: 1,0 ml/dak

Enjeksiyon hacmi: 100 µl

Kolon: ZORBAX Eclipse XDB C18 column (4,6 x 150 mm x 5 µm)

Kolon fırını sıcaklığı: 40 °C

Dedektör: FLD,  $\lambda_{ex}$ : 232 nm,  $\lambda_{em}$ : 440 nm

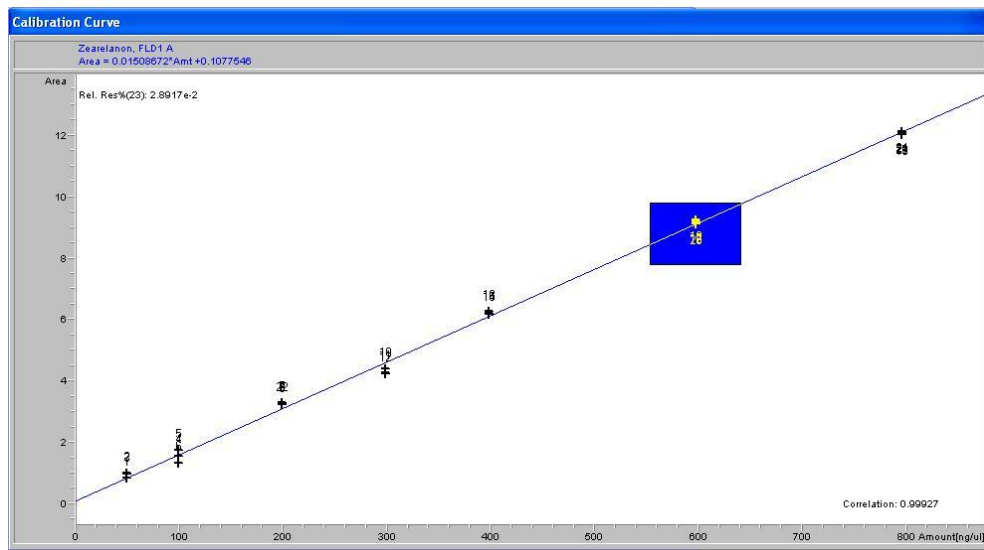
Toplam analiz süresi: 12 dak

HPLC cihazında 50 – 800 ppb aralığında 7 farklı konsantrasyon'da toplam 24 noktali kalibrasyon grafiği çizdirilmiştir. Kalibrasyon grafiği Şekil 3.6 'da görülmektedir. Grafikten elde edilen doğrusal denklem ile örneklerde bulunan ZEA konsantrasyonları hesaplanmıştır. Her bir örnek iki paralel çalışılmıştır.

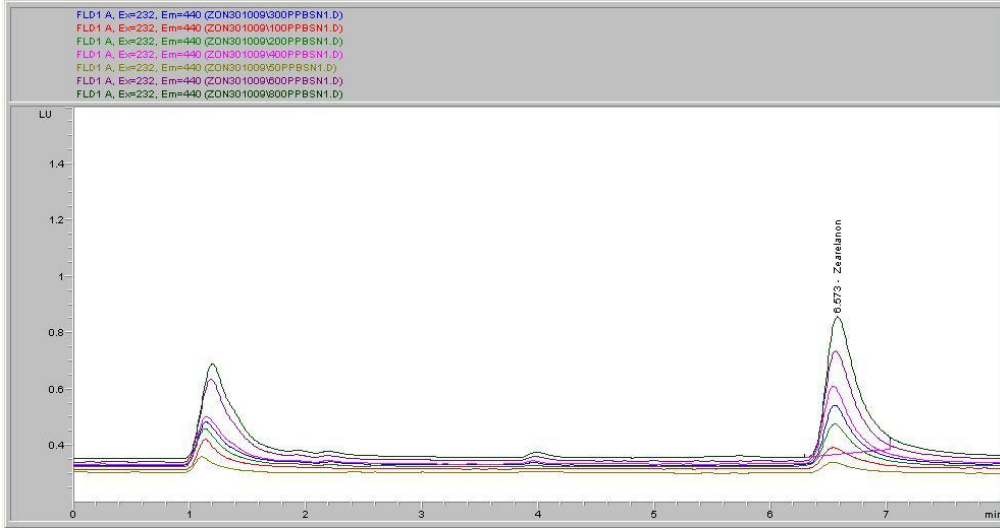
Grafiğin korelasyon katsayısı 0.99927, denklemi ise

Alan = 0.0150867 x C + 0.107755' dir.

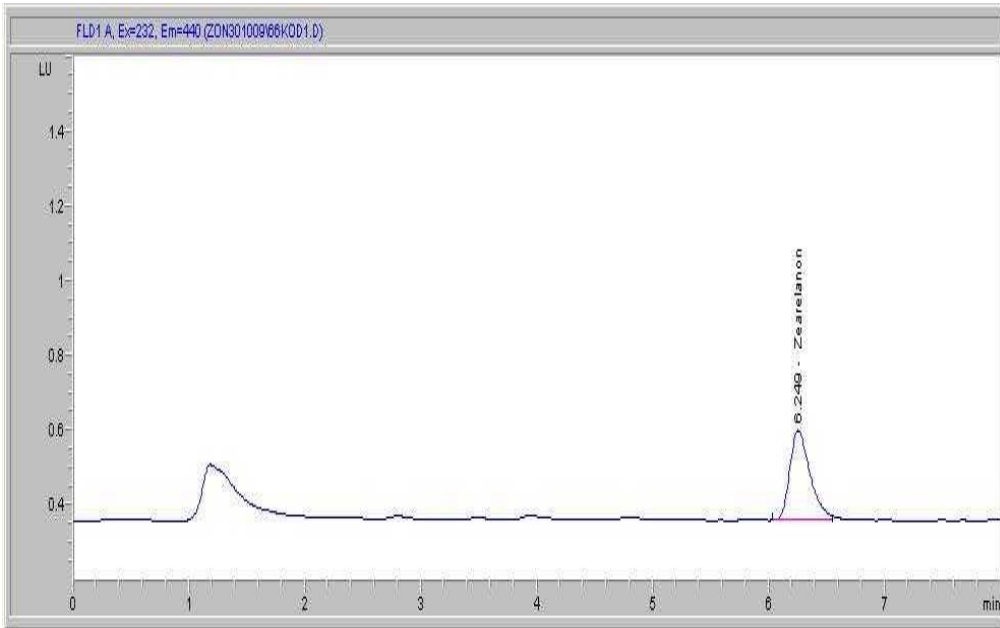
Tüm standartların (50 – 800 ppb) kromatogramları birbirleriyle karşılaştırmalı olarak (Şekil 3.7)'de gösterilmektedir. Bu çalışma sonucunda elde edilen ZEA konsantrasyon değerleri Türk ve AB Gıda Kodeksi "Zeraelonone" toksin limitleri ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.6. Kalibrasyon grafiği



Şekil 3.7. 50 – 800 ppb konsantrasyon aralığında standartların kromatogramlarının birbirleriyle karşılaştırılması olarak gösterilmesi



Şekil 3. 8. Mısır örneğindeki Zeraelonone toksini kromatogramı

Ekstraksiyon verimini karşılaştırmak için, geri kazanım çalışmaları da yapılmıştır.

Çizelge 3.3. Türk ve AB Gıda Kodeksine göre maksimum zearalenone (ZEA) limitleri

Gıda Maddesi	Türkiye Maksimum limit (ppb)	AB Maksimum limit (ppb)
İşlenmemiş tahıllar (mısır hariç)	100	100
İşlenmemiş mısır (ıslak öğütülecekler hariç)	350	350
Doğrudan tüketime sunulan tahıllar, doğrudan insan tüketimine sunulan tahıl unları, kepek (son ürün olarak) ve embriyo	75	75
Rafine mısır yağı	400	400
Ekmek (hafif fırıncılık ürünleri dahil), pastacılık ürünleri, bisküvi, tahıl çerezleri, kahvaltılık tahıllar (mısır çerezleri ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar hariç)	50	50
Doğrudan insan tüketimine sunulan mısır, mısır çerezleri ve mısır bazlı kahvaltılık tahıllar	100	100
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları <sup>(3)</sup>	20	20
500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısırın kabaca öğütülmesinden elde edilen küçük parçalar ve mısır irmiği (GTİP 1103 13) veya mısırdan elde edilen pelleter (GTİP 1103 20 40) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan büyük eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	200	200
500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır unu (GTİP 1102 20) ve doğrudan insan tüketimine sunulmayan 500 mikrondan küçük ve eşit eleklerden geçirilerek üretilen mısır veya mısır ürünlerinin kabartılması veya kavrulması suretiyle elde edilen gıda maddeleri (GTİP 1904 10 10)	300	300

### 3.3. Dayanıklılık Testleri

Dayanıklılık testleri Batı Karadeniz Bölgesinde yetiştirilen ve *F. verticillioides* ve diğer *Fusarium* türleri ile bulaşık olmayan 11 adet yerel tohum çeşidi ile gerçekleştirilmiştir. Testlerde patojen izolatin tohumlarda oluşturduğu enfeksiyon şiddeti, enfeksiyon süresince pektolitik enzimleri ve zearalenone toksinini üretebilme yetenekleri incelenmiş, enzim ve toksin üretiminin enfeksiyon şiddeti ile ilişkisi ortaya konmuştur.

#### 3.3.1. Mısır tohumlarının inokulasyonu ve hastalık değerlendirilmesi

Farklı çeşitlere ait mısır tohumları öncelikle % 1' lik sodyum hipoklorit ile yüzey dezenfeksiyonuna tabii tutulmuş, daha sonra PDA besi ortamında 7 gün süre ile geliştirilen patojen fungus kültüründen 1 cm çapındaki agar diskleri alınarak, içinde PDA besi ortamı içeren 9 cm çaplı petri kaplarındaki tohumlar üzerine yerleştirilmiştir (Shen ve Auster



1998). Denemeler her bir petriye 5 adet tohum yerleştirilerek 40 tekrarlı olarak tesadüf parselleri deneme deseninde düzenlenmiş ve her çeşit için toplam 200 adet tohum kullanılmıştır. 7 günlük inkübasyon periyodundan sonra, enfekteli tohumlar enfeksiyon derecesi dikkate alınarak 0-3 (0: Enfeksiyon yok, 1: Kök iyi gelişmemiş ve kök ucu enfekteli, 3: Çimlenme yok, tamamen kolonize olmuş) skalası oluşturulmuştur (Şekil 3.8).

İnokule edilmiş tohumlarda enfeksiyon şiddeti aşağıda verilen Tawsend-Heuberger formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Karman 1971).

$$\text{Enfeksiyon şiddeti \%} = [\Sigma (n.V) / Z.N]$$

N= Skalada farklı enfeksiyon tipine isabet eden tohum adedi

V= Skala değeri

Z= En yüksek skala değeri

N= Kontrole tabii tutulan tohum adedi



Şekil 3. 9. Hastalık şiddetinin belirlenmesinde kullanılan skalayı oluşturan örnekler

### 3.3.2. Zearalenone tespiti

İnokule edilmeyen ve inokule edilmiş tohumlardaki ZEA toksin analizleri 3.2.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

### 3.3.3. Pektolitik Enzim Üretiminin Belirlenmesi

**Sıvı Kültürde fungusun geliştirilmesi:** Sıvı kültürde ham enzim preparatlarının elde edilmesi için patojen fungus izolatı, 250 ml 'lik erlenmayerlerde hazırlanmış 50 ml'lik, karbon kaynağı olarak % 1 pektin içeren pH 5.0 Czapek's sıvı besi ortamında kültüre alınmıştır. İnokulum olarak PDA üzerinde geliştirilen fungus kültüründen 6 mm büyüklükte alınan agar diski kullanılmıştır.

**Sıvı kültürden ve inokule edilmiş tohumlardan enzim ekstraksiyonu:** Yedi günlük inkübasyon periyodundan sonra sıvı besi ortamında gelişen kültürün miselyum tabakası ortamdaki uzaklaştırılarak, elde edilen substrat vakum yardımıyla steril filtreden (0.45 µm) süzülmesi ve substrat +4°C’ de saf su içindeki değişikliklere karşı dializ edilmiştir. Tohumlardan enzim ekstraksiyonu amacıyla, enfekteli mısır tohumu dokuları üzerine % 1 (w/v) oranında suda çözünmeyen polyvinylpolypyrrolidone ve % 0.5 w/v cysteine, 0.1 M KCL içeren 0.1 M Tris-HCL buffer pH 8 (1g doku ml<sup>-1</sup>) eklenerek steril havanlarda buz üzerinde ezilmiştir. Karışım 15 000 g’ de 4°C de 15 dakika süre ile santrifüj edilerek, steril filtrelerden (0.22 µm) geçirilmiştir. Elde edilen substratlar 4°C 'de saf su içindeki değişikliklere karşı dializ edilmiştir.

### **Pektolitik enzim aktivitesi ölçümleri için optimum pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi**

Çalışmada öncelikle pektolitik enzim aktivitesinin belirlenmesinde önemli bir kriter olan optimum sıcaklık ve pH değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla patojenisite testlerinde virulent bulunan *Fusarium verticillioides* izolatının (Fv.61) ve inokule edilmiş tohumlardan elde edilmiş bir yerel çeşide ait (84) enzim substratları kullanılmıştır. Poligalakturonaz (PG) aktivitesi için optimum pH değerinin belirlenmesinde 4, 4.5, 5 ve 5.5 pH değerleri, Pektat Liyaz (PL) aktivitesi için optimum pH değerinin belirlenmesinde ise 7.5, 8, 8.5 ve 9 pH değerleri dikkate alınmıştır. Yine optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi için söz konusu izolatların 30, 35, 40 ve 45°C 'de PG ve PL aktiviteleri ölçülmüştür.

### **Pektolitik enzim aktivitesinin ölçümü:**

Substratlarda Poligalakturonaz (PG) ve Pektin metil galakturonaz (PMG) enzim aktiviteleri modifiye edilmiş Nelson (1944) metoduna göre ölçülmüştür. PG ve PMG aktivitesi 35 °C de 0.25 (w/v) 'lik sırasıyla poligalakturonik asit (PGA) ve pektinden (pH 5.0) indirgenen gruplardaki artış dikkate alınarak belirlenmiştir. Ölçümler spektrofotometrede 540 nm 'de gerçekleştirilmiştir. Pektat Liyaz (PL) aktivitesi ise spektrofotometrik olarak 235 nm 'de absorbanstaki artış ölçülerek tanımlanmıştır. Bir birimlik (U) enzim aktivitesi, Tris HCL buffer (0.1 M, pH 8) içinde % 0.25 'lik

poligalakturonik asitten 35 °C 'de 1 µmol uronide/da oluşumu olarak belirlenmiştir (Zucker ve Hankin 1970).

### **İzoenzim formlarının belirlenmesi:**

İzoenzim ayrımı izoelektrik odaklama (IEF) yoluyla yatay mini elektroforez sistemi ile % 5 oranında ampholite (pH genişliği 3.5-10) içeren 0.4 mm kalınlıktaki poliakrilamid jel (polyacrylamide gel) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla jeller 200 V, 450 V, 600 V ve 950 V 'da sırasıyla 15 dak, 30 dak, 20 dak. ve 25 dak. elektrik akımına tabii tutulmuştur. PG izoenzim formlarının belirlenmesi için % 1 'lik Agaroz jel; % 0.1 PGA ve 50 mM Sodyum Asetat buffer (pH 5.0) ile, PL izoenzim formlarının belirlenmesi için % 0.1 Poligalakturonik asit ve 50 mM Tris HCL buffer (pH 8) ile hazırlanmıştır (Ried ve Collmer 1985). Agaroz jel ile kaplanmış poliakrilamid jel nemli hücrede (%100) 35 °C de 2 saat süre ile inkübe edilmiştir. Aktivite gösteren bantlar agaroz jelin % 0.05 oranındaki Ruthenyum red ile boyanması ve distile su içinde çalkalanması yoluyla elde edilmiştir. Pektolitik izoenzimlerin izoelektrik nokta (pI) değerleri standart proteine ait regresyon eğrisi kullanılarak belirlenmiştir.

### **3. 4. İstatistiksel Değerlendirme**

İllerin ortalama ZEA toksin miktarları arasında farklılığın olup olmadığını belirlemek için varyans analizi yapılmıştır. Dayanıklılık testleri denemelerinde (Enfeksiyon şiddeti ve enzim) elde edilen veriler varyans analizine tabii tutulmuş, ortalamalar arasındaki farklılıkların önemliliği Duncan Çoklu Karşılaştırma (p=0.05) yöntemine göre belirlenmiştir. Hastalık şiddeti ile toksin ve pektolitik enzim üretimi arasındaki ilişkileri belirlemek için Pearson's korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. *F. verticillioides* 'in oluşturduğu zearalenone düzeylerinin belirlenmesi

Zearalenone düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan metot ile %87 ile 94 arasında geri kazanım elde edilmiş ve bu metodun çalışmada kullanılabileceği kanaatine varılmıştır. Buna göre tüm örnekler bu metoda göre analize alınmıştır.

Batı Karadeniz Bölgesi' ndeki Bartın, Bolu, Düzce ve Zonguldak illeri mısır ekiliş alanlarından alınan ve koçan çürüklüğü etmeni *Fusarium verticillioides* ile bulaşık olduğu bilinen 70 yerel mısır çeşidinde tespit edilen Zearalenone toksin miktarı Çizelge 4.1. de verilmiştir. Aynı örneklerde saptanan en düşük toksin miktarı 112,15 ppb, en yüksek toksin miktarı ise 6001,75 ppb olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. *F. verticillioides* ile bulaşık tohum tohumlardaki zearalenone (ZEA) miktarı

İl	Örneğin alındığı	Bulaşık tohum oranı (%)	Ort. ZEA miktarı ppb
	İlçe-köy		
Bartın	Göynük-Çavuştepe	6	329,51
	Göynük-Çavuştepe	18	125,36
	Merkez	10	296,23
	Kayadibi	12	202,00
	Gürpınar	10	112,15
	Kayadibi	10	170,04
	Merkez	18	233,89
	Merkez	78	650,38
	Merkez	26	4497,91
	Merkez	36	6001,75
	Merkez-Okçular	12	663,7
	Merkez-Okçular	36	434,83
	Darıören	42	906,33
Bolu	Merkez	12	162,02
	Merkez	6	378,01
	Merkez-Mescile	12	274,23
	Merkez-Mescile	12	578,56
	Merkez-Mescile	12	338,89
	Merkez-Mescile	4	604,82
	Örencik	12	960,03
	Merkez	2	1037,21
	Mudurnu-Sarıyar	4	960,03
	Mudurnu-Sarıyar	44	670,14
	Mudurnu-Sarıyar	12	424,19
Mudurnu-Sarıyar	8	3227,33	

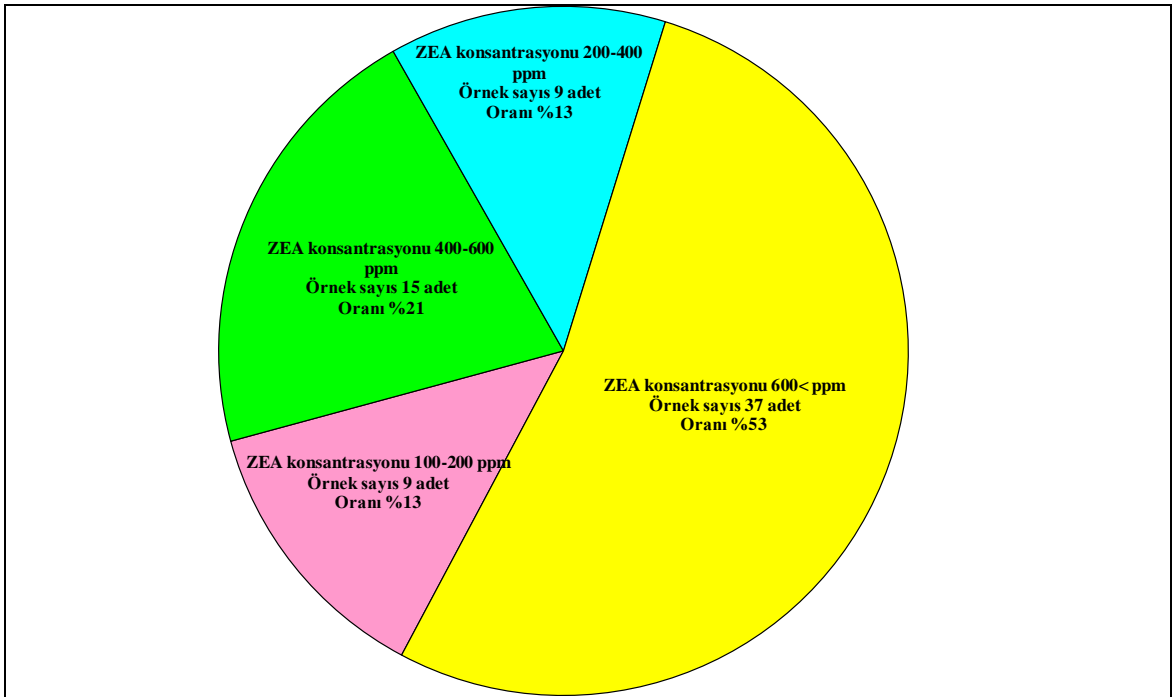
Çizelge 4.1. (Devamı)

Örneğin alındığı		Bulaşık tohum oranı (%)	Ort. ZEA miktarı ppb
İl	İlçe-köy		
Düzce	Merkez-Yazıpınar	6	195,13
	Merkez-Alacamescit	10	237,85
	Hocaoğlu	13	258,75
	Merkez-Kuşaçması	16	157,11
	Merkez-Kuşaçması	10	129,11
	Gölyaka	40	341,58
	Merkez-Yenikaraköy	14	165,98
	Merkez-Köprübaşı	2	805,56
	Merkez-Konuralp	6	227,50
	Merkez-Köprübaşı	16	163,97
	Merkez-İçmeler	50	203,48
	Merkez-Paşakonağı	8	1864,89
	Gölyaka-Boyamacı	38	1181,00
	Gölyaka-Hacıyakup	14	2126,65
	Gölyaka-Hacıyakup	40	1110,70
	Merkez-Konuralp	20	1794,31
	Merkez-Köprübaşı	18	828,57
	Gölyaka-Hacıyakup	46	858,23
	Gölyaka-Aydınpınarı	18	784,52
	Gölyaka-Boyamacı	4	1466,50
Gölyaka-Aydınpınarı	6	863,11	
Gölyaka-Aydınpınarı	24	636,77	
Merkez-Yenikaraköy	8	195,13	
Zonguldak	Çaycuma-Çomralı	10	297,41
	Çaycuma-Karakoç	12	266,51
	Karapınar	11	242,41
	Çaycuma-Çomralı	18	237,87
	Çaycuma-Çomralı	14	558,34
	Çaycuma-Çomralı	86	182,73
	Çaycuma-Kayıkçılar	60	131,37
	Çaycuma-Kayıkçılar	4	167,01
	Ereğli-Çiğdemli	26	156,95
	Çaycuma-Çomralı	56	930,47
	Çaycuma-Kayıkçılar	6	1010,55
	Ereğli-Yazıcılar	12	534,18
	Çaycuma-Karakoç	54	1277,65
	Çaycuma-Çomralı	10	1443,03
	Çaycuma-Çomralı	16	815,25
	Ereğli-Kızılcapınar	12	1942,14
	Çaycuma-Kayıkçılar	18	701,54
	Çaycuma-Kayıkçılar	4	474,95
	Ereğli-Yazıcılar	24	1332,23
	Ereğli-Yazıcılar	68	479,38
	Çaycuma-Kayıkçılar	24	297,41
	Çaycuma-Karakoç	6	266,51
	<b>ORTALAMA</b>		

Toplam 70 örneğin 9 tanesinde (%13) ZEA miktarı 100–200 ppb, 15 tanesinde (%21) 200–400 ppb, 9 tanesinde (%13) 400–600 ppb ve 37 tanesinde (%53) ise 600 ppb ve üzerinde bulunmuştur (Şekil 4.1). Yapılan istatistikî analiz sonucunda da etmenin bulunma oranları ile ZEA toksin miktarı arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir ( $r=0,015$ ).

ZEA toksin miktarı 2005 ve 2006 yılları ortalaması 828,47 ppb olarak saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlara göre Türkiye ve AB ZEA maksimum limitleri üzerinde tespit edilmiştir.

Etmenin oluşturduğu ZEA miktarı, iller ve yıl bazında incelendiğinde en yüksek ZEA miktarı ortalama 1163,36 ppb ile Bartın ilinden toplanan örneklerde tespit edilmiştir. Varyans analizi sonucunda; farklı illerden toplanan mısır örneklerinde tespit edilen ZEA toksin miktarları arasında herhangi bir farklılık belirlenmemiştir ( $F=0,422$ ;  $p=0,738$ ).



Şekil 4.1. *F. verticillioides* ile bulaşık yerel mısır çeşitlerindeki zearalenone (ZEA) miktarının örneklere göre dağılımı

Çizelge 4.2. *F. verticillioides* ile bulaşık yerel mısır çeşitlerindeki zearalenone (ZEA) miktarının yıllara göre dağılımı

İller	Yıllar	Örnek sayısı	ZEA toksin miktarı (ppb) Ortalama±Standart hata (min-max)
Bartın	2005	6	1931,66±1067,88 (125,36–6001,76)
	2006	7	395,07±128,95 (112,16–906,33)
	<b>Ortalama</b>	<b>13</b>	<b>1163,36±562,68</b> <b>(112,16–6001,76)</b>
Bolu	2005	4	1093,05±717,15 (162,03–3227,34)
	2006	8	500,31±118,31 (186,38–960,04)
	<b>Ortalama</b>	<b>12</b>	<b>731,19±221,10</b> <b>(162,03–3227,34)</b>
Düzce	2005	18	700,79±141,91 (129,11–2126,65)
	2006	5	844,00±310,48 (157,11–1864,89)
	<b>Ortalama</b>	<b>23</b>	<b>731,93±127,07</b> <b>(129,11–2126,65)</b>
Zonguldak	2005	15	783,11±256,69 (131,37–4094,89)
	2006	7	849,38±248,35 (156,95–1942,15)
	<b>Ortalama</b>	<b>22</b>	<b>804,19±188,69</b> <b>(131,37–4094,89)</b>
<b>ÇALIŞMA ALANI</b>		<b>70</b>	<b>828,47±125,22</b> <b>(112,16–6001,76)</b>

Mısırdaki koçan ve sap çürüklüğü hastalık etmeni *F. verticillioides*'in oluşturduğu mikotoksinlerden ZEA toksini ile ilgili çalışmalar son yıllarda ülkemizde ve yurt dışında büyük önem kazanmıştır. Bu toksinin insanlarda ve hayvanlarda birçok hastalıklara hatta ölümle sonuçlanan vakalar oluşturmaktadır.

Daha önceki çalışmalarda, *F. verticillioides* ile bulaşık tohum oranının % 22,4 olduğu ve diğer *Fusarium* türlerinin de bulunduğu mısır tanelerinde DON ve ZEA (903,3 ppb) (Park ve ark. 1996), etmenin yüksek oranda bulaşık olduğu mısır tanelerinde FUM B1 (Demir 2002, Adejumo ve ark. 2007b, Blandino ve ark. 2009, Mukanga ve ark. 2010),

DON, DAS, ZEA (115-779 ppb,  $\alpha$ -zearalenols 'ün (Adejumo ve ark. 2007 a, b) varlığını bildirmektedirler. Söz konusu patojenle düşük oranda bulaşık mısır örneklerde ise FUM B1, FUM B2 ve ZEA (1.40 ppb) belirlenmiştir (Domijan ve ark. 2005, Tabuc ve ark. 2009). Bu çalışmaların aksine Arjantin'in Entre Rios eyaletinin 3 ayrı bölümünde yapılan survey çalışmalarında tüm bölgelerde *F. verticilloides* en yaygın fungus türü olarak belirlenmesine rağmen ZEA, DON ve Ochratoksin (OA) örneklerin hiçbirinde tespit edilmemiştir (Pacin ve ark. 2001).

Çalışmamızda ise 2005 yılına ait yerel mısır çeşitlerinden elde edilen izolatların büyük çoğunluğunu (%66) *F. verticillioides*, 2006 yılı izolatlarının ise % 34'ünü *F. verticillioides* oluşturmuştur. Türk ve Avrupa Birliği (AB) Gıda Kodeksinde mısır ve mısır ürünlerindeki maksimum ZEA limitleri ile karşılaştırıldığında, çalışmada tespit edilen ZEA değerleri oldukça yüksek değerlerde bulunmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen ZEA toksin miktarı ortalamaları da ülkemiz maksimum toksin limit sınırlarının üzerindedir.

Mısırdaki ZEN toksin miktarının yağışın daha fazla olduğu yıllarda arttığı bildirilmektedir (Blandino ve ark. 2009). Bu araştırmada Bartın ilinde yağışın daha yüksek olduğu 2005 yılında ZEA miktarının yüksek olduğu görülmekle birlikte, Düzce ve Zonguldak illerinde yağış farklılığı toksin miktarı üzerine etkili bulunmamıştır. Hasat dönemindeki sıcaklığı ise yıllara göre çok büyük farklılık göstermediği belirlenmiştir.

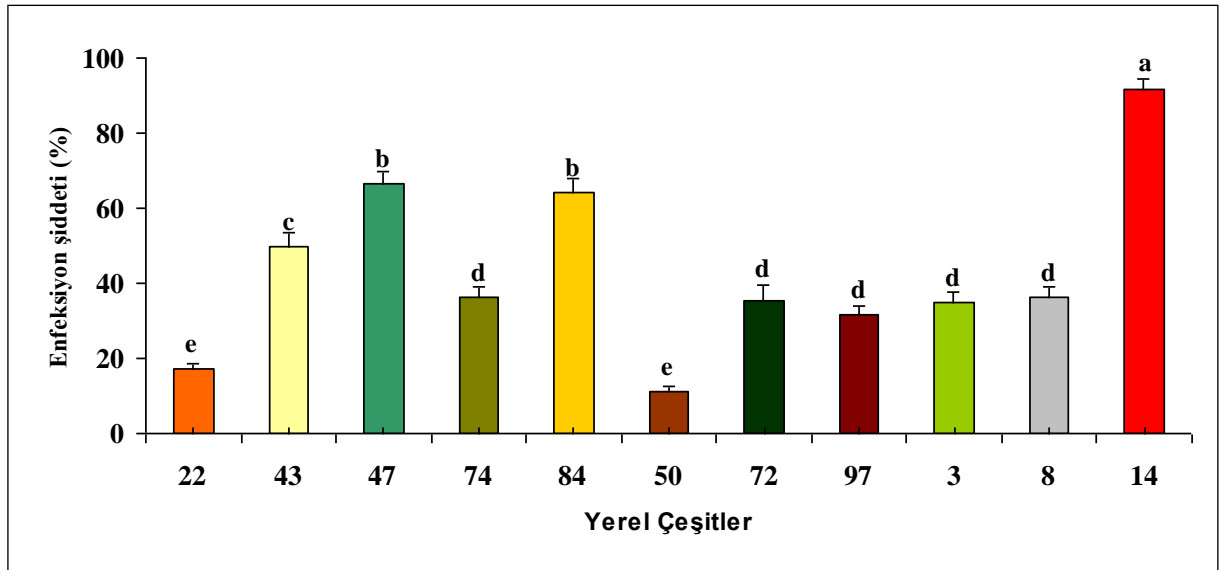
#### **4.2. Dayanıklılık Testleri**

Dayanıklılık testleri *F. verticillioides* ve diğer *Fusarium* spp. ile bulaşık olmayan, Batı Karadeniz Bölgesinin farklı illerine ait 11 adet (Bartın: 22, 43, 47; Bolu: 74, 84; Düzce 50, 72, 97; Zonguldak: 3, 8, 14) yerel tohum çeşidi ile yürütülmüştür. Söz konusu yerel çeşitlere ait tohumlar, patojen *F. verticillioides* izolatı ile inokule edilmiş, etmenin tohumlarda oluşturduğu enfeksiyon şiddeti, enfeksiyon süresince oluşturduğu ZEA ve pektolitik enzim üretimi incelenmiş, enzim ve toksin üretiminin hastalık şiddeti ile ilişkisi ortaya konmuştur.



#### 4.2.1. Mısır tohumlarının inokulasyonu ve enfeksiyon değerlendirilmesi

Çalışmamızda kullanılan ve *F. verticillioides*'e karşı dayanıklılık açısından ümitvar görülen mısır çeşitleri, etmen tarafından inokule edildiğinde, meydana gelen enfeksiyon şiddetleri çeşitler arasında önemli derecede farklılık göstermiştir (Şekil 4.2). Patojen izolat, 14 nolu tohum çeşidinde en yüksek oranda enfeksiyona neden olmuş, bunu 47, 84 ve 43' nolu çeşitler izlemiştir. 50 ve 22 nolu çeşitlerde ise diğer çeşitlere göre önemli derecede düşük enfeksiyon meydana gelmiştir. Enfeksiyon şiddeti açısından, 74, 72, 97, 3 ve 8 nolu çeşitler aynı grupta yer almış, patojen bu çeşitlerde orta derecede etkili olmuştur. Mısırdaki enfeksiyon şiddeti dikkate alınarak yapılan dayanıklılık testleri, patojen fungusun genellikle tarlada mısır püsküllerine inokulasyonu yapılarak gerçekleştirilmiş (Löffler ve ark. 2010a,b; Presello ve ark. 2007, Presello ve ark. 2008), tohum inokulasyonu ile ilgili bir çalışma ile karşılaşılmamıştır.



Şekil 4.2. *F. verticillioides* izolatının farklı yerel mısır çeşitlerinde meydana getirdiği enfeksiyon şiddeti. Birbirinden farklı harflerle gösterilen sütunlar Duncan Çoklu karşılaştırma testine göre ( $P=0.05$ ) birbirinden önemli derecede farklıdır.

#### 4.2.2. Zearalenone tespiti

*Fusarium* türlerini bulunmayan çeşitler inokulasyondan önce ZEA varlığı açısından test edilmiş, 2 çeşit hariç (84 ve 3), Türk Gıda Kodeksinde yer alan maksimum limitlerin altında olmakla birlikte ZEA içerdikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.3.). Çizelge 4. 3' de görüldüğü gibi inokulasyondan sonra artışlar olmakla beraber, 84 ve 3 nolu çeşitlerin dışındaki toksin miktarları maksimum limitleri aşmamıştır. Toksinin artış oranı incelendiğinde, en yüksek artışın (%23.39) 43 nolu çeşitte olduğu, bunu 47 ve 3 nolu çeşitlerin izlediği görülmektedir.

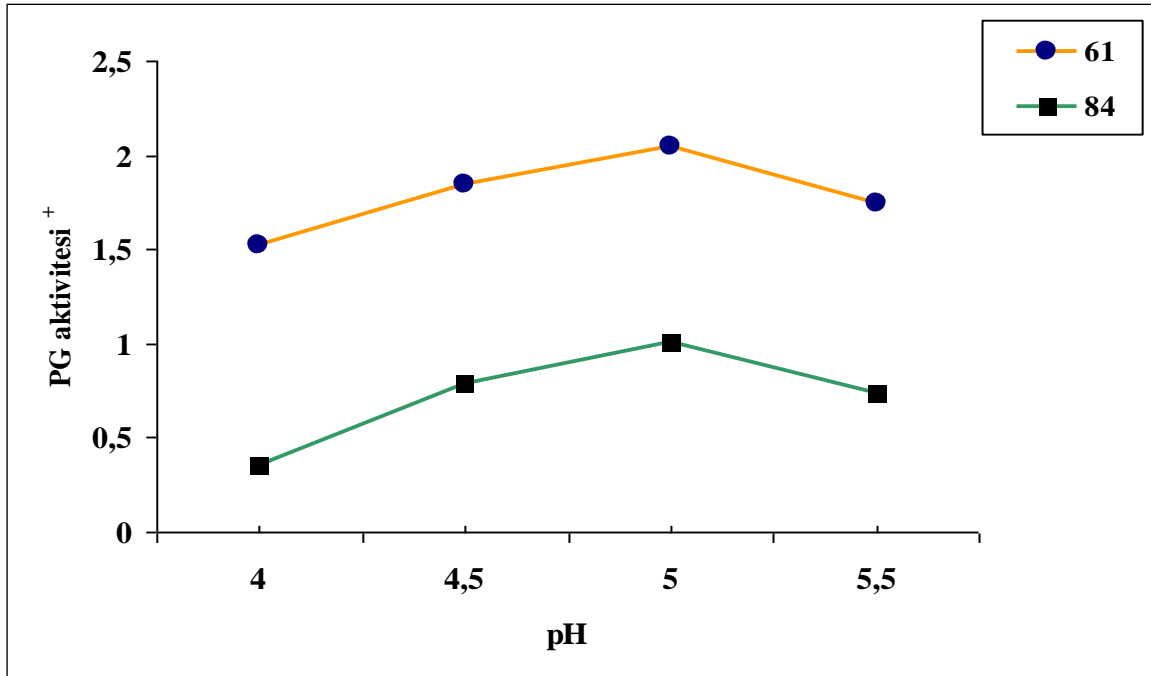
Daha önce yapılmış çalışmalarda, *F. verticillioides*'in hiç belirti vermeksizin FUM toksinini üretebildiği ileri sürülmektedir (Munkvold 1994; Sohn ve ark. 1999; Demir 2002; Presello ve ark. 2008; Schjøth 2008; Mukanga ve ark. 2010). Çalışmamızın sonuçları test edilen tohumlarda patojen fungus bulunmamasına rağmen, ZEA toksininin de bulunabildiğini göstermiştir.

Çizelge 4.3. *Fusarium* spp. ile bulaşık olmayan yerel mısır çeşitlerindeki inokulasyondan önce ve sonraki zearalenone (ZEA) miktarı ve toksin miktarındaki artış oranı

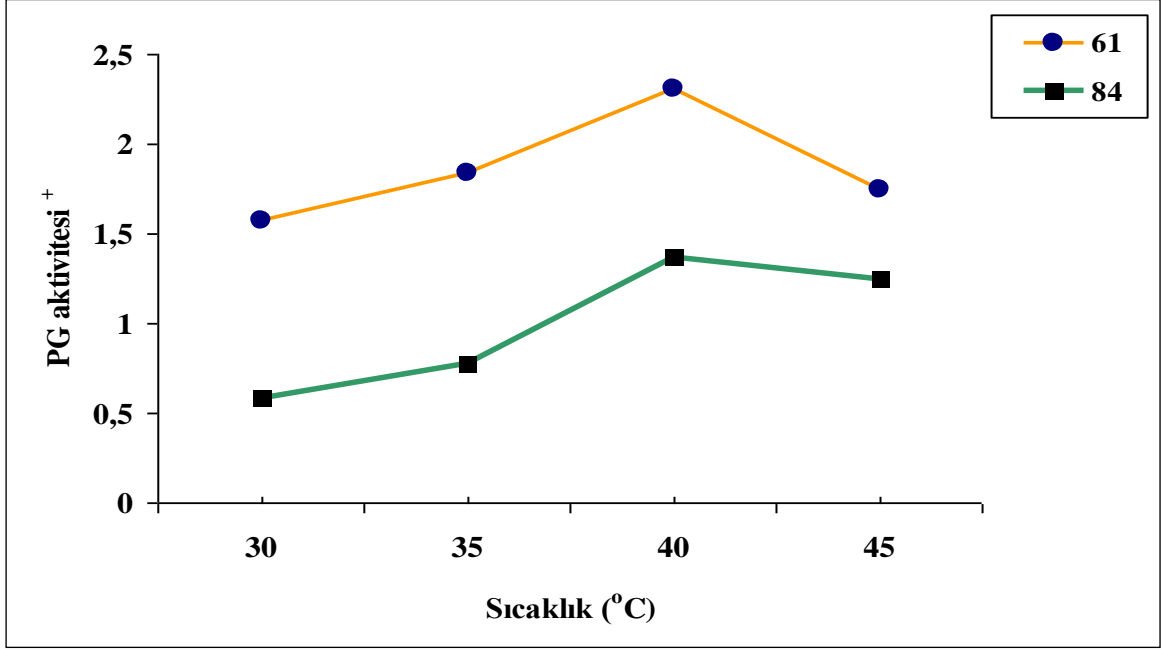
Çeşit No	ZEA miktarı (ppb)		Toksın miktarındaki artış (%)
	İnokulasyon önce	İnokulasyondan sonra	
22 (Bartın)	286.40	293.10	2.28
43 (Bartın)	76.40	108.20	23.39
47 (Bartın)	129.10	163.70	21.13
74 (Bolu)	124.30	136.70	9.07
84 (Bolu)	343.40	356.40	3.64
50 (Düzce)	106.27	107.63	1.26
72 (Düzce)	250.70	253.00	0.90
97 (Düzce)	276.30	278.40	0.75
3 (Zonguldak)	307.60	376.30	18.25
8 (Zonguldak)	272.81	286.40	4.74
14 (Zonguldak)	220.10	236.70	7.01

#### 4.2.3. Pektolitik enzim aktivitesi ölçümleri için optimum pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi

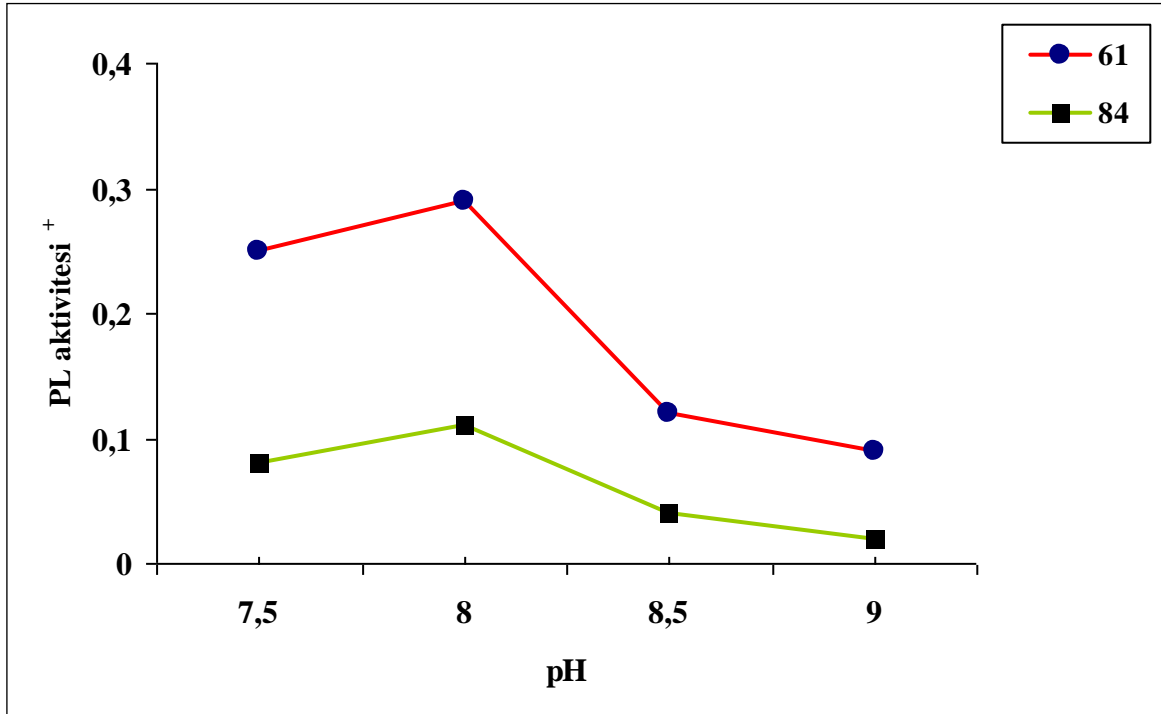
Patojenisite testlerinde virülent bulunan *Fusarium verticillioides* izolatının (Fv.61) ve inokule edilmiş tohumlardan elde edilmiş bir yerel çeşide ait (84) enzim substratları ile gerçekleştirilen denemelerde her iki substratın maksimum PG enzim aktivitesi gösterdiği pH değeri 5.0, sıcaklık ise 40 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3 ve 4.4.). Yine her iki substrat pH 8.0 ve 40°C sıcaklıkta en yüksek PL aktivitesi göstermiştir (Şekil 4.5 ve 4.6.). Diğer çeşitlerle yürütülecek denemelerde ilgili enzim aktivitesi ölçümlerinde bu değerler dikkate alınmıştır.



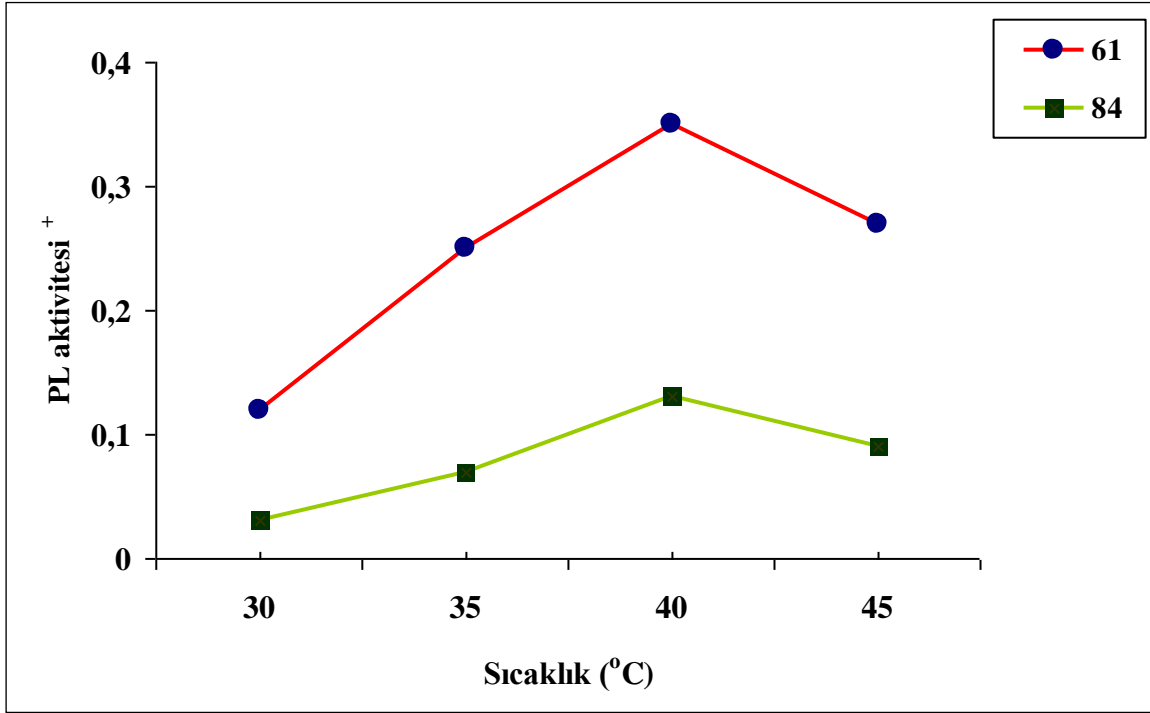
Şekil 4.3. *F. verticillioides* izolatının (61) ve inokule edilmiş 84 nolu mısır çeşidine ait tohumlardan elde edilen substratlarda farklı pH derecelerinde poligalakturonaz (PG) enzim aktivitesi. <sup>+</sup>%0.25 (w/v) 'lik poligalakturonik asitten (PGA) indirgenen gruplardaki artış miktarı/da



Şekil 4.4. *F. verticillioides* izolatının (61) ve inokule edilmiş 84 nolu mısır çeşidine ait tohumlardan elde edilen substratlarda farklı sıcaklık derecelerinde poligalakturonaz (PG) enzim aktivitesi. +%0.25 (w/v) 'lik poligalakturonik asitten (PGA) indirgenen gruplardaki artış miktarı/da



Şekil 4.5. *F. verticillioides* izolatının (61) ve inokule edilmiş 84 nolu mısır çeşidine ait tohumlardan elde edilen substratlarda farklı pH derecelerinde pektat liyaz (PL) enzim aktivitesi. + % 0.25 'lik poligalakturonik asitten 1  $\mu$ mol uronide oluşumu/da



Şekil 4.6. *F. verticillioides* izolatının (61) ve inokule edilmiş 84 nolu mısır çeşidine ait tohumlardan elde edilen substratlarda farklı sıcaklık derecelerinde pektat liyaz (PL) enzim aktivitesi. + % 0.25 'lik poligalakturonik asitten 1 µmol uronide oluşumu/da

Çalışmamızda *F. verticillioides*'in PG ve PL üretimi için tespit edilen pH ve sıcaklık dereceleri, daha önce yapılan çalışmalarla uyum içindedir (Mehta and Mehta 1985, Niture ve ark. 2001, Niture ve ark. 2006, 2008). Bazı araştırmacılar ise PG ve PL aktivitesi için optimum pH değerlerinin sırasıyla 5-6 ve 8.5 olduğunu ileri sürmektedirler (Dixit ve ark. 2004, Ibiam ve Arinze 2005).

#### 4.2.4. *F. verticillioides*'in farklı mısır çeşitlerini enfeksiyonu süresinde pektolitik enzim üretimi

Patojen izolatın farklı mısır çeşitlerine ait tohumları enfeksiyonu sırasında meydana getirdiği, bitki hücre duvarını parçalayan pektolitik enzimlerden PG, PMG ve PL enzim aktiviteleri Çizelge 4.4'de görülmektedir. Çizelge'de de görüldüğü gibi etmen 50 nolu çeşitte en düşük miktarda PG üretmiş, 22 ve 74 nolu çeşitler hariç, diğer çeşitlerdeki PG üretimi açısından aralarındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur. 84 nolu çeşit ise etmenin en yüksek miktarda PG üretebildiği çeşit olmuş, 3, 14 ve 47 nolu çeşitler de

PG üretimi açısından etmene karşı hassasiyet göstermişlerdir. 22, 74 ve 50 nolu çeşitler patojenin 8 nolu çeşit dışında diğer çeşitlere göre önemli derecede daha düşük miktarda PMG üretebildiği çeşitler olmuştur. Patojen PL aktivitesini sadece 14, 72 ve 84 nolu çeşitlerde gösterebilmiştir.

Daha önce yapılmış çalışmalar incelendiğinde, mısırdan, çam ağaçlarından, çeltik tohumlarından ve tropikal bitkilerden elde edilen *F. verticillioides* izolatının sıvı kültürde PG ve pektinaz enzimlerini üretebildiği bilinmektedir (Hameed ve ark. 1991, Yubedee ve Arinze 1994, Posada ve ark. 2001, Daroda ve ark. 2001, Ibiyam ve Arinze 2005, Ahmad ve ark. 2006, Nitire ve Pant 2004, 2007). Söz konusu etmene karşı hassasiyette *F. verticillioides*'in pektinaz enziminin rolü bürülcede araştırılmış, söz konusu enzimin patojenin enfeksiyonu için önemli olmadığı belirlenmiştir (Shihita ve ark. 1995). Öte yandan etmenin domates ve karbahabar bitkilerini enfeksiyonu süresince PG ve PL enzimlerini ürettiği bildirilmektedir (Nitire ve ark. 2008).

Çizelge 4.4. *F. verticillioides*'in farklı mısır çeşitlerini enfeksiyonu süresinde oluşan poligalakturonaz (PG), pektin metil galakturonaz (PMG) ve pektat liyaz (PL) enzim aktiviteleri

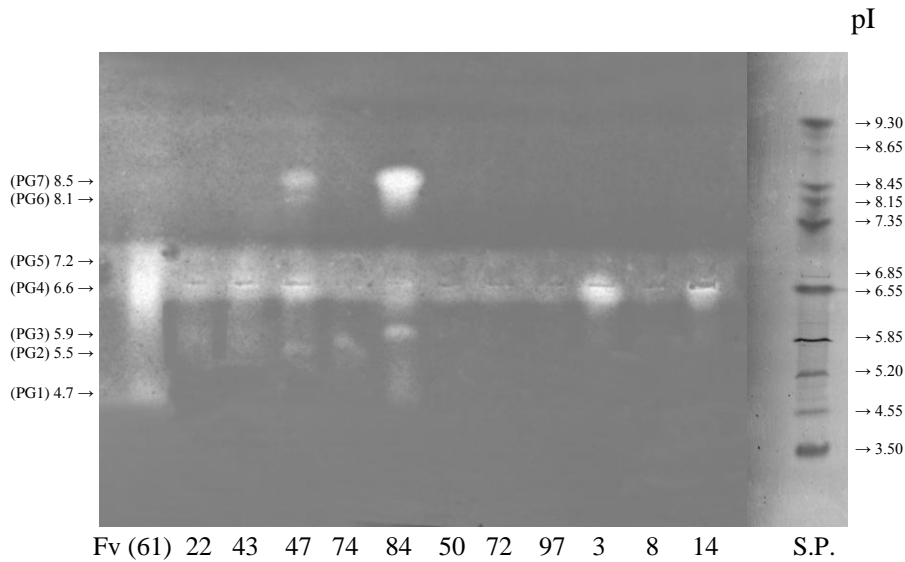
Çeşit No	PG aktivitesi*	PMG aktivitesi**	PL aktivitesi***
22 (Bartın)	0.46±0.03 ef	0.60±0.09 ef	0.00±0 c
43 (Bartın)	0.63±0.06 de	0.82±0.01 cd	0.00±0 c
47 (Bartın)	0.83±0.06 bc	0.94±0.03 bc	0.00±0 c
74 (Bolu)	0.47±0.01 e	0.39±0.02 g	0.00±0 c
84 (Bolu)	1.37±0.08 a	0.66±0.05 e	0.13±0.003 a
50 (Düzce)	0.42±0.02 f	0.47±0.01 fg	0.00±0 c
72 (Düzce)	0.73±0.03 cd	0.84±0.05 cd	0.10±0.006 b
97 (Düzce)	0.60±0.06 de	0.71±0.03 de	0.00±0 c
3 (Zonguldak)	0.94±0.06 b	1.08±0.05 a	0.00±0 c
8 (Zonguldak)	0.58±0.05 def	0.58±0.03 ef	0.00±0 c
14 (Zonguldak)	0.95±0.08 b	1.03±0.05 ab	0.12±0.003 a
Fv. Sıvı kültür	2.30±0.05	0.76±0.12	0.35±0.01

Aynı sütunda birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler Duncan Çoklu karşılaştırma testine göre (P=0.05) birbirinden önemli derecede farklıdır. \* %0.25 (w/v)'lik poligalakturonik asitten (PGA) indirgenen gruptaki artış miktarı/da. \*\*%0.25 (w/v)'lik pektinden indirgenen gruptaki artış miktarı/da. \*\*\*% 0.25 'lik poligalakturonik asitten 1 µmol uronide oluşumu/da

Mısır bitkisinin erken gelişme dönemlerinde *F. verticillioides*'in enfeksiyonu süresince endo-poligalakturonaz enziminin rolü bilinmekle birlikte (Daroda ve ark. 2001), etmenin mısır tohumlarını enfeksiyonu süresince oluşturduğu pektolitik enzimler ve dayanıklılıktaki rollerine ilişkin yapılmış herhangi bir çalışma ile karşılaşmamıştır.

#### 4.2.5. *F. verticillioides*'in farklı mısır çeşitlerinde sergilediği PG ve PL izoenzimleri

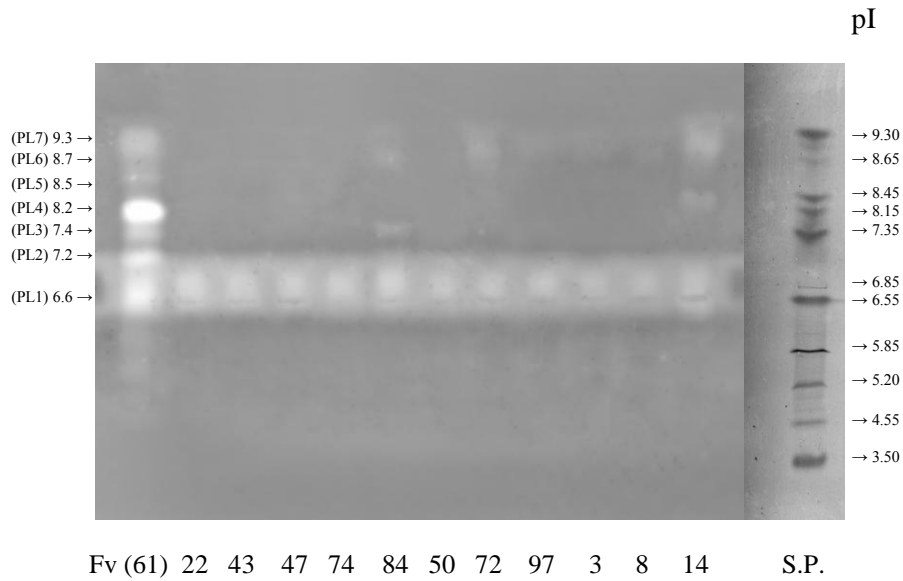
Hastalık etmeni sıvı kültürde ve mısır tohumlarını enfeksiyonu sürecince ürettiği PG ve PL enzimlerinin izoenzim formlarını çeşitlere göre farklı şekilde sergilemiştir (Şekil 4.7.). Patojenin sıvı kültüründen elde edilen enzim ekstraktlarından, 3 adet PG izoformu [PG1 (pI 4.7); PG4 (pI 6.6); PG5 (pI 7.2)] elde edilmiştir. Etmen tohum enfeksiyonu süresince 22, 43, 50, 72, 97 ve 8 nolu çeşitlerde bu izoformlardan hiçbirisini oluşturamamıştır. Etmenin sıvı kültürden elde edilen enzim substratlarında bulunan PG4'ü 47, 3 ve 14 nolu çeşitlerde sergileyebildiği gözlenmiştir. Patojen sıvı kültür enzim ekstraktlarında bulunmayan alkali karakterde 2 PG izoformunu (PG6, pI 8.1 ve PG7, pI 8.5) 47 ve 84 nolu çeşitleri, asidik karakterdeki PG2 (pI 5.5)'yi 47 nolu çeşidi, PG3 (pI 5.9)'ü ise 74 ve 84 nolu çeşitleri enfeksiyonu süresince sergilemiştir.



Şekil 4.7. *F. verticillioides* izolatının (61) sıvı kültürde ve farklı yerel mısır çeşitlerini inokulasyonu süresince oluşturdukları poligalakturonaz (PG) izoenzim formları (beyaz renkli bantlar) S.P.: Standart protein. Sağ tarafta verilen izoelektrik noktaları (pI) standart proteine, sol tarafta verilen pI değerleri araştırma örneklerine aittir.

Patojenin sıvı kültürden elde edilen enzim ekstraktları incelendiğinde 6 PL izoenzim formu [PL1 (pI 6.6); PL2 (pI 7.2); PL3 (pI 7.4); PL4 (pI 8.1); PL5 (pI, 8.5) ve PL7 (pI 9.3)] üretebildiği görülmüştür. Bunlardan PL3 ve PL4'ü sırasıyla 84 ve 14 nolu çeşitlerde, PL6 ve PL7'yi 84, 14 ve 72 nolu çeşitleri enfeksiyonu sırasında oluşturmuştur. 22, 43, 47, 74, 50, 97, 3 ve 8 nolu çeşitlerde ise etmen hiçbir PL izoenzim formunu sergileyememiştir (Şekil 4.8).

Daha önce yapılan az sayıda çalışmada *F. verticillioides*' in 2 PG (PG1 ve PG2) izoenzim formunun bulunduğu bunların alkali karakterde olduğu (PG1, pI 8.1; PG2, pI 8.6) bildirilmektedir (Niture ve ark. 2001, Niture ve Pant 2004). Bu çalışmada ise patojenin sıvı kültürden elde edilen ekstraktlarında 2 asidik, bir alkali karakterde 3 PG izoenzim formu elde edilmiş [PG1 (pI, 4.7); PG4 (pI 6.6); PG5 (pI, 7.2)], daha önce belirlenen pI 8.1 değerindeki formun 47 ve 84 nolu çeşitlerin enfeksiyonu süresince kendini gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.8. *F. verticillioides* izolatının (61) sıvı kültürde ve farklı yerel mısır çeşitlerini inokulasyonu süresince oluşturdukları pektat liyaz (PL) izoenzim formları (beyaz renkli bantlar) S.P.: Standart protein. Sağ tarafta verilen izoelektrik noktaları (pI) standart proteine, sol tarafta verilen pI değerleri araştırma örneklerine aittir.



Söz konusu etmen tarafından üretilen PL enziminin ise pI değeri 9.1 olan tek izoenzim formu bildirilmektedir (Rao ve ark. 1996). Çalışmamızda ise patojen izolatın sıvı kültürde 6 PL izoenzim formu ürettiği ancak pI 9.1 değerine sahip bir formu içermediği belirlenmiştir. Etmenin mısır tohumlarını enfeksiyonu süresince oluşturduğu PG ve PL izoenzim formları ilk bulgu niteliğini taşımaktadır.

#### **4.2.6. Hastalık şiddeti ile zaeralenone ve pektolitik enzim üretimi arasındaki ilişkiler**

Çalışmamızda, *Fusarium* türleri ile bulaşık olmayan tohumlar inokule edildiğinde meydana gelen enfeksiyon şiddeti ile etmenin ZEA toksini ve pektolitik enzim üretimi arasındaki ilişkiler incelendiğinde enfeksiyon şiddeti ile PG enzim üretimi arasında pozitif ( $r=0.69$ ) ve önemli bir ilişki ( $p=0.05$ ), PL enzim üretimi arasında yine pozitif ( $r=0.61$ ) ve önemli bir ilişki ( $p=0.05$ ) olduğu belirlenmiştir. Enfeksiyon şiddeti ile ZEA üretimi ve PMG enzim üretimi arasında ise herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Daha önce yapılan çalışmalar daha ziyade enfeksiyon şiddeti ile fumonisin oluşumu arasındaki ilişkinin belirlenmesine yöneliktir. Bazı araştırmacılar hastalık şiddet ile fumonisin oluşumu arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu (Presello ve ark. 2007, Alessandra ve ark. 2010, Löffler ve ark. 2010a) bildirmektedir. Bununla birlikte bazı çalışmalarda fumonisin konsantrasyonunun düşük oranda hastalık şiddeti gösteren koçanlarda dahi yüksek olabileceği bildirilmektedir (Presello ve ark. 2008). Bir diğer çalışmada mısır tanesi üzerindeki mum tabakası içeriğinin fumonisin birikimine karşı dayanıklılık faktörü olduğu belirlenmiştir (Sampietro ve ark. 2009). Mısırdaki enfeksiyon şiddeti ile zaeralenone toksin üretimi ve pektolitik enzim üretimi arasındaki ilişkilere yönelik bulgular ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışma sonucunda koçan çürüklüğüne neden olan *F. verticillioides* ile bulaşık olduğu bilinen, Bartın, Bolu, Düzce ve Zonguldak illeri mısır ekim alanlarından elde edilen yerel mısır çeşidi örneklerinin tamamında ZEA toksini Türk ve AB Gıda Kodeksi maksimum ZEA limiti değerleri üzerinde tespit edilmiştir.

*Fusarium* spp ile bulaşık olmayan ve aynı illerden alınan yerel mısır çeşidi örneklerinde 2 çeşit hariç Türk Gıda Kodeksi maksimum ZEA limit değerlerinin altında ZEA tespit edilmiştir. Söz konusu çeşitlerin etmene karşı dayanıklılığı, etmenin inokulasyonundan sonra oluşan enfeksiyon şiddeti, toksin ve pektolitik enzim üretimi dikkate alınarak incelenmiştir. Enfeksiyon şiddeti, etmenin zaeralenone toksin üretiminin enfeksiyondan sonra artış oranı, enfeksiyon süresince üretilen PG, PMG ve PL enzim ve izoenzim formları dikkate alındığında *F. verticillioides*'e karşı dayanıklılık açısından 50, 22 ve 97 nolu çeşitler üzerinde durulması gerektiği düşünülmektedir.

### **Tahıllarda *Fusarium* toksin bulaşıklığını engellemek ve azaltmak için alınacak tedbirler**

- Mikotoksin bulaşan ürünlerin tamamen temizlenmesi şu an mevcut olanaklarla mümkün değildir, burada amaç iyi tarım uygulamaları ile bu toksinlerin ortaya çıkışını yani oluşumunu minimuma indirmektir.
- Önemli olan üreticilerin, mikotoksin oluşumunu engelleyebilecek ya da azaltabilecek iyi tarım uygulamalarını benimsemesinin yanı sıra tahıllardan üretilen insan gıdaları ve hayvan yemlerinin işlenmesi, depolanması ve dağıtımında iyi yönetim pratiklerini uygulaması ve benimsemesidir.
- Mısır yetiştiriciliğinde münavebede kullanılan buğday ve diğer tahıllar veya bu ürünlere olan yakınlık dikkatli bir yönetim ve kontrol gerektirmektedir.
- *Fusarium* toksinlerinin bulaşıklığını engellemek ve azaltmak için en önemli konular münavebe, toprak işleme, çeşit ve hibrit seçimi ve doğru fungusit kullanımınıdır.

- Hasat sonrası enfekteli ürün artıklarının kaldırılması, yakılması, inokulumu azaltarak, bir sonraki üründe *Fusarium* enfeksiyon riskini de azaltacaktır.
- Tarladaki yabancı otlar ya mekanik mücadele ile ya da ruhsatlı bir herbisit kullanılarak veya daha güvenilir bir eradikasyon metodu varsa o kullanılarak yok edilmelidir.
- Mümkün olduğu kadar uygun nem içeriğine sahip tane hasat edilmelidir. *Fusarium* türleri ile enfekteli tanelerin hasadında yaşanacak gecikmeler, muhtemelen bu türlerin ürettiği toksin içeriğinde önemli bir artışa sebep olmaktadır
- Hasat, tanede oluşabilecek mekanik zararı mümkün olduğu kadar aza indirecek ve toprakla az temas edecek şekilde yapılmalıdır. Küçük, buruşuk taneler sağlıklı ve normal görünümlü olanlardan daha yüksek miktarlarda toksin içerebilmektedir. Bu nedenle bu tip taneleri ve yine mikotoksin oluşumunu teşvik edebilecek diğer yabancı maddeleri ortadan kaldıracak şekilde bir işlemde ürün geçirilmelidir.
- Tahıllar depolanma sırasında fungal gelişimi desteklemeyecek bir oranda kurutulduktan sonra depolanmalıdır. 0,65'ten daha az bir su aktivitesi genellikle % 15'ten daha az bir nem içeriğine tekabül etmektedir.
- Çuvallanacak ürünler için, kullanılacak çuvalların temiz ve kuru olması gerekmektedir.
- Mümkün olduğu kadar depolama alanının yeknesak bir sıcaklık seviyesinde tutulması ve depolama alanının iyi havalandırılması gerekmektedir. Depolama periyodu boyunca tanenin nem içeriği ve sıcaklığı düzenli aralıklarla kontrol edilmelidir. Eğer kapalı bir şekilde depolanmışsa tanede bir koku oluşacaktır ki bu da ısınmanın bir belirtisidir, bundan kaçınılmalıdır.
- Batı Karadeniz Bölgesi en fazla mısır yetiştiriciliğinin yapıldığı bölgelerden biri olması, mısırın insan beslenmesinde ve hayvan yemi olarak fazla miktarlarda tüketilmesi, bölgenin yağışlı ve nemli bir iklime sahip olması nedeniyle bölgede yetiştirilen mısırların mikotoksinlerle bulaşıklık ihtimali göz ardı edilmemeli ve mısır yetiştiriciliğinde tarladan

bařlayarak hasat, kurutma, depolama ve nakliye ařamalarında büyük titizlik gösterilmelidir.

- Ülkemizde ve özellikle Karadeniz Bölgesi'nde insan ve hayvan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan mısırdaki, koçan rklg ve mikotoksinler konusunda özellikle dayanıklılık üzerine daha detaylı çalışmalar yapılarak gerekli önlemler alınmalıdır.

## 6. KAYNAKLAR

- Adejumo, TO, Hettwer U, Karlovsky P (2007a). Occurrence of *Fusarium* species and trichothecenes in Nigerian maize. *Inter. J. Food Microbiol.*, 116: 350-357.
- Adejumo TO, Hettwer U, Karlovsky P (2007b). Survey of maize from soith-western Nigeria for zearalenone,  $\alpha$ - and  $\beta$ -zealarenols, fumonisin B<sub>1</sub> and enniatins produced by *Fusarium* species. *Food Addit. Contam.*, 24: 993-1000.
- Ahmad Y, Hameed A, Ghaffar A (2006). Enzymatic activity of fungal pathogens in corn. *Pakistan J. Botany*, 38: 1305-1316.
- Aktaş H, Tunalı B, Aktuna, İ (1998). Bolu ve Zonguldak illerinde mısır tohumlarında görülen fungusların saptanması üzerinde araştırmalar. VIII. Türkiye Fitopatoloji Kongre Bildirileri, 305-310, Türkiye
- Alessandra L, Luca P, Adriano M (2010). Differential gene expression in kernels and silks of maize lines with contrasting levels of ear rot resistance after *Fusarium verticillioides* infection. *J. Plant Physiol.*, 167: 1398-1406.
- Alkan B (1973). Mısır Tarımı ve Gübrelemesi. Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Teknik Yayınlar serisi, No: 32. Ankara 11-14
- Anonymous, 2008. Tarımsal Yapı (Üretim, Fiyat, Değer). T.C. D.İ.E. Yayınları, Ankara.
- Anonymous, 2010a. FAO Statistical Databases (<http://faostat.fao.org>) (eriřim tarihi, 31.12.2010).
- Anonymous, 2010b. Bitkisel Üretim. Tahıllar Tarım İstatistikleri (<http://www.tuik.gov.tr>) (erişim tarihi, 31.12.2010).
- Anonymous (2006). Funguslar ve Mikotoksinler. (<http://www.mikrobiyoloji.org>) (eriřim tarihi, 21.10.2010).
- Blandino M, Reyneri A, Vanara F (2009). Effect of sowing time on toxigenic fungal infection and mycotoxin contamination of maize kernels. *J. Phytopathol.*, 157: 7-14.
- Bora T, Karaca İ (1970). Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yardımcı Ders Kitabı, No: 167, s: 10-13.
- Daroda L, Hahn K, Pashkoulov D, Benvenuto E (2001). Molecular characterization and in planta detection of *Fusarium moniliforme* endopolygalacturonase isoforms. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 59:317-325.
- Demir C (2002). Samsun ve civarında yetiştirilen mısırlarda *Fusarium moniliforme* ve Fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> varlığı üzerinde bir araştırma. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 84 s.
- Dixit VS, Kumar AR, Pant A, Khan MI (2004). Low molecular mass pectate lyase from *Fusarium moniliforme*: similar modes of chemical and thermal denaturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315: 477-484
- Domijan AM, Peraica M, Cvjetkovic B, Turcin S, Jurjevic Z, Ivic D (2005). Mould contamination and co-occurrence of mycotoxins in maize grain in Croatia. *Acta Pharm.*, 55: 349-356.
- Fazekas B, Tar A (2001). Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. *Food Addit Contam.* 22: 856-863
- Fink-Gremmels J (1999). Mycotoxins: Their implications for human and animal health. *Vet.Quart.*, 21: 115-120.
- Glenn AE, Gold SE, Bacon CW (2002). *Fdb1* and *Fdb2*, *Fusarium verticillioides* loci necessary for detoxification of preformed antimicrobials from corn. *Mol. Plant Microbe Interac.*, 15 (2): 91-101.
- Gonzalez HHL, Resnik SL, Boca RT, Marasas WFO (1995). Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production area in 1990. *Mycopathologia*, 130: 29-36.

- Hameed A, Pervez A, Iqbal MJ (1991). Studies on the role of pectinolytic enzymes in fungal pathogenesis. *Pakistan J. Phytopathol.*, 3:1-6
- Ibiam OFA, Arinze AE (2005). *In vitro* and *in vivo* production of pectic enzymes, polygalacturonase, by seed-borne pathogen, *Fusarium moniliforme* Sheldon, from seeds of rice (*Oryzae sativa* L.) and its role in the disease of rice. *Bio-Research*, 3: 9-13
- Karman M (1971). Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler, Denemelerin Kuruluşu ve Değerlendirme Esasları. T.C. Tarım Bakanlığı, Zirai Mücadele ve Karantina Genel Müdürlüğü Yayınları, 278s, İzmir.
- Kırtok Y (1998). Mısır Üretimi ve Kullanımı. İstanbul, 445 s.
- Kün E (1997). Tahıllar II (Sıcak iklim Tahılları) Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 1452, Ders Kitabı No: 432, Ankara.
- Leslie JF, Pearson CAS, Nelson PE and Toussoun TA (1990). *Fusarium* spp. from corn, sorghum and soybean fields in the Central and Eastern United States. *Phytopathology*, 80: 343-350.
- Logrieco A, Moretti A, Altomare C, Bottalico A, Torres EC (1993). Occurrence and toxicity of *Fusarium subglutinans* from Peruvian maize. *Mycopathologia*, 122: 185-190.
- Logrieco A, Moretti A, Ritieni A, Bottalico A, Corda P (1995). Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot and associated mycotoxins in Italy. *Plant Dis.*, 79: 727-731.
- Logrieco L, Mule G, Moretti A, Bottalico A (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot. *Eur. J. Plant Pathol.*, 108: 597-609
- Löffler M, Kessel B, Ouzunova M, Miedaner T (2010a). Population parameters for resistance to *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* ear rot among large sets of early, mid-late and late maturing European maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Theoretical Appl. Genetics*, 120: 1053-1062.
- Löffler M, Miedaner T, Kessel B, Ouzunova M (2010b). Mycotoxin accumulation and corresponding ear rot rating in three maturity groups of European maize inoculated by two *Fusarium* species. *Euphytica*, 174: 153-164.
- Mehta A, Chopra S, Kare V, Mehta P (1992). Influence of native carbon sources on the production of pectolytic and cellulolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium moniliforme*. *ZE Atrablatt für Mikrobiologie*, 147: 557-561.
- Mehta A, Mehta P (1985). Production of pectolytic and cellulolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* and *F. moniliforme* under different cultivation conditions. *Folia Microbiol.*, 30: 42-50.
- Miedaner T, Bolduan C, Melchinger AE (2010). Aggressiveness and mycotoxin production of eight isolates each of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* for ear rot on susceptible and resistant early maize inbred lines. *Eur. J. Plant Pathol.*, 127: 113-123.
- Mukanga M, Derera J, Tongoona P, Laing MD (2010). A survey of pre-harvest ear rot diseases of maize and associated mycotoxins in South and central Zambia. *Inter. J. Food Microbiol.*, 141: 213-221.
- Munkvold GP (1994). Corn ear rots and mycotoxins in 1994. *Integrated Crop Management*, 468: 191-193.
- Munkvold GP (2001). Ear rot and mold problems. *Integrated Crop Management*, 486 (23): 183-184.
- Nagy E, Haş V, Haş I, Suciú A, Florian V (2010). Effect of ear *Fusarium* infection on the maize yield and mycotoxin content. 11<sup>th</sup> European *Fusarium* Seminar, "Fusarium- Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity and Host Resistance" 287, Radzikow-Poland.

- Nelson N (1944). A photometric adaptation of the Smogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153: 375-380.
- Nelson PE (1992). Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*, 117: 19-36.
- Niture SK, Kumar AR, Pant A (2006). Role of glucose in production and repression of polygalacturonase and pectate lyase from phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme* NCIM 1276. *World J. Microbiol. Biotech.*, 22: 893-899.
- Niture SK, Kumar AR, Parab PB, Pant A (2008). Inactivation of polygalacturonase and pectate lyase produced by pH tolerant fungus *Fusarium moniliforme* NCIM 1276 in a liquid medium and in the host tissue. *Microbiol. Res.*, 163: 51-62.
- Niture SK, Pant A (2004). Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. *Microbiol. Res.*, 159: 305-314.
- Niture SK, Pant A, Kumar AR (2001). Active site characterization of the single endopolygalacturonase produced by *Fusarium moniliforme* NCIM 1276. *Eur. J. Biochem.*, 268: 832-840.
- Niture SK, Pant A (2007). Production of cell wall-degrading enzymes by a pH tolerant estuarine fungal isolate *Fusarium moniliforme* NCIM1276 in different culture conditions. *World J. Microbiol. Biotech.*, 23(8):1169-1177.
- Oruç HH (2005). Mikotoksinler ve Tanı Yöntemleri, *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.*, 24 1-2-3-4:105-110.
- Pacin AM, Broggi LE, Resnik SL, Gonzalez HHL (2001). Mycoflora and mycotoxins natural occurrence in corn from Entre Rios province, Argentina. *Mycotoxin Res.*, 17: 31-38.
- Park JJ, Smalley EB, and Chu FS (1996). Natural Occurrence of *Fusarium* mycotoxins in field samples from the 1992 Winconsin corn crop. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 1642-1648.
- Posada ML, Patino B, Mirete S, Munoz MC, Vazquez C, Gonzalez-Jaen MT (2001). Comparative analysis of polygalacturonases in isolates of seven species of *Fusarium* from *Pinus pinea*. *Mycological Res.*, 105:100-104.
- Presello DA, Botta G, Iglesias J, Eyhéabide GH (2008). Effect of disease severity on yield and grain fumonisin concentration of maize hybrids inoculated with *Fusarium verticillioides*. *Crop Protec.*, 27: 572-576.
- Presello DA, Iglesias J, Botta G, Eyhéabide GH (2007). Severity of *Fusarium* ear rot and concentration of fumonisin in grain of Argentinian maize hybrids. *Crop Protec.*, 26: 852-855.
- Rao, MN, Kembhavi, A.A, Pant A (1996). Role of lysine, tryptophan and calcium in the beta-elimination activity of low-molecular-mass pectate lyase from *Fusarium moniliforme*. *Biochem. J.*, 319: 159-164.
- Ried JL, Collmer A (1985) Activity stain for rapid characterization of pectic enzymes in isoelectric focusing and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 615-622.
- Sampietro DA, Vattuone MA, Presello DA, Fauguel CM, Catalan CAN (2009). The pericarp and its surface wax layer in maize kernels as resistance factors to fumonisin accumulation by *Fusarium verticillioides*. *Crop Protec.*, 28: 196-200.
- Saubois A, Tanaka T, Nepote MC, Wagner ML, Ueno Y (1998). Aflatoxins, type B trichothecenes and relative toxigenic fungi in Indian corn from a region of Argentina. *Microbiologie Aliments Nutrition*, 16: 61-69.
- Schjøth JE, Tronsmo AM, Sundheim L (2008). Resistance to *Fusarium verticillioides* in 20 Zambian Maize Hybrids. *J. Phytopathol.*, 156: 470-479.

- Sencar Ö, Gökmen S, Yıldırım A, Kandemir N (1994). Tarla Bitkileri Üretimi Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Ders Notları.
- Shihata ZA, Abdou ES, Galal AA (1995). Production of pectolytic and cellulolytic enzymes by *Fusarium* species in diseased cowpea plants and in vitro. *Assiut J. Agric. Sci.*, 26: 339-349
- Sneh B, Ichielevich-Auster M (1998) Induced resistance of cucumber seedlings caused by some non-pathogenic *Rhizoctonia* (np-R) isolates. *Phytoparasitica* 26: 27-38
- Sohn HB, Seo JA, Lee YW (1999). Co-occurrence of *Fusarium* mycotoxins in mouldy and healthy corn from Korea. *Food Addit. Contam.*, 16: 153-158.
- Somda I, Sanou J, Sanon P (2008). Seed-borne infection of farmer-saved maize seeds by pathogenic fungi and their transmission to seedlings. *Plant Pathol. J.*, 7: 98-103.
- Soran H, Asan A (1987). Edirne ve civarında yetiştirilen mısırlarda tohumla taşınan fungusların tespiti üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 27: 111-117.
- Şahin S (2001). Türkiye’de Mısır ekim alanlarının dağılışı ve mısır üretimi. *G.Ü Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 21: 73-90.
- Tabuc C, Marin D, Guerre P, Sesan T, Bailly JD (2009). Molds and mycotoxin content of cereals in Southeastern Romania. *J. Food Protec.*, 72: 662-665.
- Topal RŞ (2003). Türkiye’nin Tarımsal Ürün ve Bölgelerine Göre Dominant Mikroflora Dağılımları ve Mikotoksin Profilleri, Ed: D. Heperkan, G. Dalkılıç, H. Şenyuva, Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, Türkiye, 111-115.
- Visconti A, Girolamo A (2005). Fitness for Purpose – Ochratoxin A Analytical Developments. *Food Addit. Contam., Suppl.*: 1:37-44.
- Wilke AL, Bronson CR, Tomas A, Munkvold GP (2007). Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. *Plant Dis.*, 91: 1109-1115.
- Yubedee AG, Arinze AE (1994). Discriminatory adsorption of polygalacturonases of two isolates of *Fusarium moniliforme* on plant tissues and the effect on the host range of fungal isolates. *Inter. J. Tropical Plant Dis.*, 12: 67-74.
- Zucker M, Hankin L (1970). Regulation of Pectate Lyase synthesis in *Pseudomonas fluorescens* and *Erwinia carotovora*. *J. Bacteriol.*, 104: 13-18.



## TEŞEKKÜR

Mısırdaki Koçan Çürüklüğü Etmeni *Fusarium verticilloides*(Sacc)'in Oluşturduğu Zearalenon Toksini ve Pektolitik Enzimler Üzerine Araştırmalar isimli çalışmalarını yapmayı amaçlayan bu araştırmam boyunca yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren danışmam hocam sayın Prof. Dr.Nuray ÖZER (Namık Kemal Üniversitesi Ziraat fakültesi) teşekkür eder, saygıları sunarım.

Çalışmalarım süresince yardımcı olan başta Sayın Dr. Ali TAMER, Yard. Doç. Dr.Arzu COŞKUNTUNA, Dr. Pelin AKSU, Dr. Numan BABAROĞLU, Dr.Aynur KARAHAN, Uzm. Şeno ALTUNDAĞ, Dr.Üftade GÜNER ve Uzm. Ergün CONGER olmak üzere Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü elamanlarına ve çalışmalarım süresince manevi desteklerini esirgemeyen arkadaşlarıma ve aileme en derin duygularıyla teşekkür ederim.

Orhan BÜYÜK

Ankara Aralık 2010

## ÖZGEÇMİŞ

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden 1989 yılında mezun oldu. Askerlik görevinden sonra kamu ve özel sektörde görev yaptı.2001 yılından itibaren Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü fitopatoloji bölümü hububat hastalıkları laboratuvarında göreve başladı Çeşitli projelerde yardımcı ve lider olarak görev aldı. Halen aynı laboratuvarında görev yapmaktadır.