

Rhizoctonia solani VE BİNÜKLEAT
Rhizoctonia ANASTOMOSİS GRUPLARI
ARASINDAKİ FİLOGENETİK İLİŞKİLERİN
18S rDNA DİZİ ANALİZİ İLE
BELİRLENMESİ

EDA UĞURTAY

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Doktora Tez Çalışması Ondokuz Mayıs
Üniversitesi 1904.11.011 nolu Proje ile
Desteklenmiştir

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Rhizoctonia solani* VE BİNÜKLEAT *Rhizoctonia*
ANASTOMOSİS GRUPLARI ARASINDAKİ FİLOGENETİK İLİŞKİLERİN
18S rDNA DİZİ ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKADEMİK DANIŞMAN

PROF. DR. İBRAHİM ÖZKOÇ

SAMSUN- 2011

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından 11/10/2011 tarihinde yapılan sınav ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

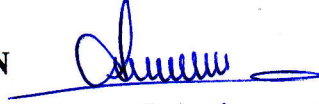
BAŞKAN : Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ



ÜYE : Prof. Dr. Erkol DEMİRCİ



ÜYE : Doç. Dr. Miray SÖKMEN



ÜYE : Doç. Dr. Kamil IŞIK



ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Eylem AKMAN GÜNDÜZ



ONAY :

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../.....

Prof. Dr. Hasan GÜMÜŞ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZ***Rhizoctonia solani* VE BİNÜKLEAT *Rhizoctonia* ANASTOMOSİS GRUPLARI ARASINDAKİ FİLOGENETİK İLİŞKİLERİN 18S rDNA DİZİ ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ**

Bu çalışmada, multinükleat ve binükleat *Rhizoctonia* spp. anastomoz grupları ve intraspesifik gruplar arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla, dünyanın farklı bölgelerinden izole edilmiş olan, 45 *Rhizoctonia* spp. temsilci izolatu kullanılmıştır. Temsilci izolatların 18S rDNA baz dizileri belirlenmiş ve filogenetik analizleri yapılmıştır. Bu amaçla, 18S rDNA bölgesinin amplifikasyon ve dizi analizi için oligonükleotit primerler NS1, NS3, NS4 ve NS8 kullanılmıştır. Filogenetik analizler ise, PAUP V. 40b10 programında maksimum parsimoni ve neighbour joining algoritmaları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Evrimsel olarak korunmuş olması sebebiyle 18S rDNA, *Rhizoctonia* spp.'deki genetik çeşitliliğin anlaşılması için önemli bir bilgi kaynağıdır.

Bu gruptaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde daha önce ITS ve 28S rDNA dizileri kullanılmıştır. Bu çalışmada, ilk defa 18S rDNA dizisinin tamamı kullanılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, geleneksel anastomoz grubu sınıflandırmasını büyük ölçüde desteklemektedir. Fakat binükleat AG Fa, AG Fb ve AG I izolatlarının filogenetik açıdan multinükleat *Rhizoctonia* izolatları ile daha yakın ilişkili olduğu ve belirli anastomoz gruplarının monofiletik olmadıkları gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Rhizoctonia* spp., 18S rDNA filogeni, anastomoz grubu

ABSTRACT**DETERMINATION OF PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS IN *Rhizoctonia solani* AND BINUCLEATE *Rhizoctonia* ANASTOMOSIS GROUPS WITH 18S rDNA SEQUENCE ANALYSIS**

In this study, we aimed to determine phylogenetic relationships in different anastomosis groups and intraspecific groups of multinucleate and binucleate *Rhizoctonia* spp.

For this purpose, 45 representative isolates of multinucleate and binucleate *Rhizoctonia* were used. We determined the base sequences of 18S rDNA and performed the phylogenetic analysis. The oligonucleotide primers NS1, NS3, NS4 and NS8 were used for amplification and sequencing of the small subunit 18S rDNA region. The phylogenetic analysis was performed using the maximum parsimony and neighbour joining algorithm in PAUP v. 4.0b10.

This region was found to be more conserved and informative for understanding genetic diversity in *Rhizoctonia*.

In this group, the phylogenetic relationships studied with ITS ve 28S sequences earlier, were firstly assessed with the full 18S rDNA sequence data.

Our results supported the classic anastomosis groups classification. But it seemed that, BN AG Fa, AG Fb and AG I isolates were more closer to multinucleate *Rhizoctonia* spp. isolates and certain AGs are not monophyletic.

Keywords: *Rhizoctonia* spp., 18S rDNA phylogeny, anastomosis grouping

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans ve Doktora çalışmalarım süresince danışmanlığı üstlenen, bilgi ve deneyimi ile bana yol gösteren sayın hocam Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ'a,

Tez çalışmam sırasında değerli bilgilerinden yararlandığım tez izleme komitesindeki değerli hocalarım sayın Doç. Dr. Miray SÖKMEN'e ve sayın Yrd. Doç. Dr. Eylem AKMAN GÜNDÜZ'e,

Temsilci izolatların temini konusunda yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Erkol DEMİRCİ' ye,

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümündeki değerli hocalarıma ve Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında bana destek olan, sevgili aileme, annem Gülsevrim TURGUT'a, varlığını hep yanımda hissettiğim babam Yılmaz TURGUT'a, kardeşlerime, eşim Emre UĞURTAY'a, sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Rhizoctonia</i> Grubu Fungusların Genel Özellikleri.....	3
2.2. <i>Rhizoctonia</i> Grubu Fungusların Taksonomisi.....	4
2.2.1. <i>Rhizoctonia</i> Grubu Fungusların Teleomorfik Sınıflandırması	5
2.2.2. <i>Rhizoctonia</i> Grubu Fungusların Anamorfik Sınıflandırması.....	7
2.3. <i>Rhizoctonia</i> spp.'nin Sınıflandırılmasında Kullanılan Geleneksel Yöntemler ..	9
2.3.1. Hifal Anastomoz Reaksiyonu Yoluyla <i>Rhizoctonia</i> spp.'nin Gruplandırılması	9
2.3.1.1. Anastomoz Kavramı ve Anastomoz Tipleri	9
2.3.1.2. Hifal Anastomoz Reaksiyonlarının Karakterizasyonu	11
2.3.1.3. Anastomoz Grupları (AG) ve Anastomoz Gruplarının Alt Grupları (Intraspesifik Gruplar-ISG).....	14
2.3.1.4. Köprü Grupları ve Köprü İlişkileri.....	14
2.3.1.5. Vejetatif Olarak Uyumlu Populasyonlar	15
2.3.1.6. Anastomoz Grubunun Taksonomik Durumu	15
2.3.1.7. Multinükleat <i>Rhizoctonia</i> Türlerinin Anamorfik Sınıflandırması.....	16
2.3.1.8. Binükleat <i>Rhizoctonia</i> Türlerinin Anamorfik Sınıflandırması	28
2.4. <i>Rhizoctonia</i> Grubu Fungusların Sınıflandırılmasında Kullanılan Biyokimyasal Yöntemler	35
2.4.1. İzozim Analizleri	35
2.4.2. Yağ Asidi Analizleri	36
2.5. <i>Rhizoctonia</i> Grubu Fungusların Sınıflandırılmasında Kullanılan Genetik Yöntemler	37
2.5.1. Fungal rDNA Gen Bölgesi	39
2.5.2. Elektroforetik Karyotipleme	41
2.5.3. RAPD (Rastgele Amplifiye Olmuş Polimorfik DNA)	42
2.5.4. AFLP (Amplifiye Olmuş Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi)	43
2.5.5. RFLP (Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi) Analizleri 44 Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	44
2.5.6. AT-rich RFLP (AT' ce zengin bölgelerin RFLP analizleri).....	44
2.5.7. DNA-DNA Hibridizasyonu	45

2.5.8.	Ribozomal RNA Genlerinin Analizi.....	45
2.5.8.1.	rDNA RFLP.....	45
2.5.8.2.	rDNA Dizi Analizleri	46
2.6.	Filogenetik Değerlendirme.....	47
3.	MATERYAL VE YÖNTEM.....	49
3.1.	Materyal	49
3.2.	Yöntem.....	51
3.2.1.	İzolatların aktifleştirilmesi.....	51
3.2.1.1.	Kullanılan Besi Ortamları.....	51
3.2.1.2.	Stok Kùltürlerin Besi Ortamlarına Aktarılması.....	52
3.2.2.	DNA İzolasyonu İçin Kuru Misel Elde Edilmesi	52
3.2.3.	DNA İzolasyonu	52
3.2.4.	Agaroz Jel Elektroforez	54
3.2.5.	DNA'nın Agaroz Jelde Gözlenmesi	55
3.2.6.	18S rDNA Bölgesinin Polimeraz ZincirReaksiyonu (PCR).....	55
3.2.7.	18S rDNA Dizileme.....	57
3.2.8.	18S rDNA Sekans Verilerinin Analizi.....	58
3.2.8.1.	Parsimoni (Tutumluluk) Analizi.....	58
3.2.8.2.	Distance (Uzaklık) Analizi	59
4.	BULGULAR.....	60
4.1.	Genomik DNA İzolasyonu.....	60
4.2.	18S rDNA Bölgesinin PCR Amplifikasyonu.....	60
4.3.	Parsimoni Analizi.....	62
4.4.	Distance (Uzaklık) Analizi.....	69
5.	TARTIŞMA	76
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	80
7.	KAYNAKLAR	82
	ÖZGEÇMİŞ.....	91

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

AFLP	Amplifiye olmuş fragmentlerin uzunluk polimorfizmi (amplified fragment length polymorphism)
AG	Anastomoz grubu
AIC	Akaike information criterion
BIC	Bayesian information criterion
BNR	Binükleat <i>Rhizoctonia</i>
bç	Baz çifti
ddH₂O	Çift distile saf su
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
G	Gama doğrulama değeri
IGS	Genler arası bölge (intergenic spacer)
ITS	Ara transkripsiyon bölgesi (intergenic spacer)
kb	Kilobaz
Mb	Megabaz
MNR	Multinükleat <i>Rhizoctonia</i>
NJ	Neighbour Joining
PAUP	Phylogenetic analysis using parsimony
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction)
PDA	Patates dekstrozu agar
PDB	Patates dekstrozu broth
RAPD	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (random amplification of polymorphic DNA)
rDNA	Ribozomal DNA bölgesi
RFLP	Restrüksiyon fragmentlerinin uzunluklarının polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism)
RNase	Ribonükleaz A
rRNA	Ribozomal RNA geni
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SSU	Çekirdek küçük alt birim (nuclear small subunit)

TBE	Tris-Borik asit- EDTA
TIM	Transition model
TrNef	equal-frequency Tamura-Nei model
UNR	Tek çekirdekli <i>Rhizoctonia</i>
UPGMA	Ağırlıklı olmayan çift grup yöntemin aritmetik ortalaması (unweigted pair grup method with arithmetic mean)
VCP	Vejetatif olarak uyumlu populasyon (vegetatitive compatible population)

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
	No
Şekil 2.1. <i>Rhizoctonia</i> cinsinin karakteristik hif yapısı	3
Şekil 2.2. <i>Rhizoctonia</i> sklerot yapısı	4
Şekil 2.3. Dolipor septum yapısı	4
Şekil 2.4. <i>Rhizoctonia solani</i> 'de anastomoz reaksiyonunun video mikroskopik görüntüsü	10
Şekil 2.5. <i>Rhizoctonia solani</i> izolatlarında anastomoz reaksiyonları	14
Şekil 2.6. AG 1-IB izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	18
Şekil 2.7. AG 1-IC izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	19
Şekil 2.8. AG 2-1 izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	20
Şekil 2.9. AG 2-2 IIIB izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	20
Şekil 2.10. AG 3 izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	22
Şekil 2.11. AG 4 HG-I izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	23
Şekil 2.12. AG 4 HG-II izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	23
Şekil 2.13. AG 5 izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	24
Şekil 2.14. AG 6 HG I izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	25
Şekil 2.15. AG 8 izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	26
Şekil 2.16. AG 9 izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	26
Şekil 2.17. AG Bb izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	29
Şekil 2.18. AG Bo izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	29
Şekil 2.19. AG E izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	30
Şekil 2.20. AG I izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	31
Şekil 2.21. AG L izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	32
Şekil 2.22. AG O izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	32
Şekil 2.23. AG P izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	33
Şekil 2.24. AG R izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	34
Şekil 2.25. AG S izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi	34
Şekil 2.26. Funguslarda ribozomal DNA gen bölgesi	41
Şekil 2.27. 18S rRNA gen bölgesinin şematik gösterimi	41
Şekil 3.1. Sekans diyagramının BioEdit programı ile gözlenmesi	58

Şekil 4.1. Bazı izolatlara ait NS3- NS8 PCR reaksiyonu ürünleri	60
Şekil 4.2. AG Fa ÇrTb9 örneğine ait konsensus dizisi	61
Şekil 4.3. <i>Rhizoctonia</i> spp. izolatlarının 18S rDNA dizisinin polimorfik DNA bölgeleri	62
Şekil 4.4. Multinükleat <i>Rhizoctonia</i> spp. izolatlarına ait 18S rDNA bölgesinin parsimoni analizi sonucu oluşturulan %50 Majority Rule Konsensus soy ağacı.	63
Şekil 4.5. Binükleat <i>Rhizoctonia</i> spp. izolatlarına ait 18S rDNA bölgesinin parsimoni analizi sonucu oluşturulan %50 Majority Rule Konsensus soy ağacı	65
Şekil 4.6. <i>Rhizoctonia</i> spp. izolatlarına ait 18S rDNA bölgesinin parsimoni analizi sonucu oluşturulan %50 Majority Rule Konsensus soy ağacı	67
Şekil 4.7. Multinükleat <i>Rhizoctonia</i> spp. izolatlarına ait 18S rDNA bölgesinin kullanılması sonucu oluşan Neighbour Joining soy ağacı	70
Şekil 4.8. Binükleat <i>Rhizoctonia</i> spp. izolatlarına ait 18S rDNA bölgesinin kullanılması sonucu oluşan Neighbour Joining soy ağacı	72
Şekil 4.9. <i>Rhizoctonia</i> spp. izolatlarına ait 18S rDNA bölgesinin kullanılması sonucu oluşan Neighbour Joining soy ağacı	74

ÇİZELGELER LİSTESİ

	Sayfa
	No
Çizelge 2.1. <i>Rhizoctonia</i> grubu fungusların teleomorfik sınıflandırılması	6
Çizelge 2.2. <i>Rhizoctonia</i> grubu fungusların anamorfik sınıflandırılması	8
Çizelge 2.3. Anastomoz reaksiyonlarına göre yapılan sınıflandırmanın tarihsel gelişimi	11
Çizelge 2.4. <i>Rhizoctonia solani</i> 'de hifal anastomoz reaksiyonunu tanımlamada kullanılan terminolojiler	12
Çizelge 2.5. <i>Rhizoctonia solani</i> 'de hifal anastomoz reaksiyonlarının karakterizasyonu	13
Çizelge 2.6. Multinükleat <i>R. solani</i> anastomoz grupları, oluşturduğu hastalıklar ve teleomorfları	17
Çizelge 2.7. Binükleat <i>Rhizoctonia</i> grupları	35
Çizelge 2.8. <i>Rhizoctonia</i> grubu fungusların sınıflandırılmasında kullanılan çeşitli moleküler yöntemler ve etkinlikleri	39
Çizelge 3.1. Kullanılan <i>Rhizoctonia</i> spp. izolatları ve kökenleri	50
Çizelge 3.2. PCR reaksiyon karışımı	56
Çizelge 3.3. NS1-NS4 için PCR programı	57
Çizelge 3.4. NS3-NS8 için PCR programı	57

1. GİRİŞ

Rhizoctonia ismi Yunanca kök anlamına gelen “riza” kelimesinden türemiştir (Kammerer ve Harmon, 2008). *Rhizoctonia*, geniş konukçu çeşitliliğine sahip olan toprak kaynaklı bir bitki patojenidir (Liu ve Sinclair, 1992). *Rhizoctonia* cins kavramı ilk kez De Candolle tarafından 1815’te tanımlanmıştır (Garcia ve ark., 2006).

Cins içerisinde en çok çalışılan tür *Rhizoctonia solani* Kühn (Teleomorf: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk)’dir (Sneh ve ark., 1991). *Rhizoctonia solani* yakın akraba fakat genetik olarak izole olmuş alt gruplar içermesi nedeniyle bir tür kompleksi olarak adlandırılır (Carling ve ark., 2002).

Rhizoctonia solani 500’den fazla konukçuya sahip olan bir bitki patojenidir (Liu ve ark., 1995; Khodayari ve ark., 2009) ve son yıllarda küresel ısınma sonucu artan sıcaklıklar nedeniyle bu fungusla enfekte olan ürün sayısının ve enfeksiyon şiddetinin gittikçe arttığı belirtilmiştir (Baiswar ve ark., 2010).

Rhizoctonia spp. gibi geniş konukçu potansiyeline sahip patojenlerin izolatları tarımsal ürünlerden doğal bitki komunitelerine göç edebilirler. Patojenler bu şekilde konukçu sayılarını artırabilir ve yeni hastalıklara neden olabilirler (Chakraborty ve ark., 2000). Benzer bir durum Bangladeş’te gözlenmiştir. Daha önceleri *R. solani*’nin neden olduğu kın yanıklığı (sheath blight) önemsiz bir hastalık iken, son yıllarda çeltik tarlalarını en çok tahrip eden hastalıklardan biridir. Yüksek sıcaklık ve nispi nem hastalığın yayılmasında etki olmuştur (Haq ve ark., 2008).

Değişen iklim koşulları hastalık etmeni fungus gruplarının da farklılaşmasına neden olmaktadır. Örneğin şeker pancarında taç çürüklüğü etmeni daha önceki yıllarda *R. solani* AG 4 izolatları iken, son yıllarda yüksek sıcaklığa toleransı daha fazla olan AG 2-2 izolatları etkili olmaktadır (www.inia.cl/medios/remehue/noticias/Gary.pdf, 12.06.2011).

Anastomoz, farklı fakat akraba hişler arasında somatik veya vegetatif uyumun bir göstergesidir. Anastomoz grubu (AG), birbirleriyle anastomoz yapabilme yeteneklerine göre bir arada gruplandırılan yakın akraba izolatlar topluluğudur (Sneh ve ark., 1996; Çebi Kılıçoğlu, 2009).

Rhizoctonia solani için 13 anastomoz grubu (AG 1, AG 2, AG 3, AG 4, AG 5, AG 6, AG 7, AG 8, AG 9, AG 10, AG 11, AG 12, AG 13) tanımlanmıştır (Ogoshi 1996; Carling ve ark., 1999, 2002; Harikrishnan ve ark., 2004; Woodhall ve ark., 2007).

Binükleat *Rhizoctonia* izolatları ise günümüzde 16 anastomoz grubuna (AG A, AG B, AG C, AG D, AG E, AG F, AG G, AG H, AG I, AG K, AG L, AG O, AG P, AG Q, AG R ve AG S) ayrılmıştır. Daha önce anastomoz gruplarına dahil edilen AG M izolatlarının kayıp, AG N ve AG J izolatlarının *Rhizoctonia* olmadığı, AG T izolatlarının AG A içerisinde yer aldığı ve AG U izolatlarının da AG P' ye ait izolatlar olduğu rapor edilmiştir (Mghalu ve ark., 2007; Sharon ve ark., 2008).

Rhizoctonia grubu funguslar oldukça heterojen yapıdadır. Bu sebeple geleneksel yöntemlerle yapılan taksonomik çalışmalar yetersiz kalmaktadır. Günümüzde bu eksiklikleri gidermek amacıyla moleküler taksonomi yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Moleküler taksonomi çalışmalarında yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri de, evrimsel süreçte korunmuş olduğu belirlenen rDNA bölgelerinin karakterizasyonu esasına dayanmaktadır. Elde edilen izolatların DNA'ları PCR reaksiyonuna tabi tutularak istenilen bölge uygun primerler kullanılarak çoğaltıldıktan sonra örnekler sekans, RFLP ve RAPD teknikleriyle karşılaştırılmaktadır (Liu ve Sinclair 1992).

Fungal sistematikte kullanılan yeni metotlar ve tekniklere rağmen *Rhizoctonia* türlerinin sınıflandırılması halen gelişim sürecindedir (Garcia ve ark., 2006). *Rhizoctonia* grubu fungusların morfolojik, patolojik ve fizyolojik olarak yüksek oranda kalıtsal çeşitlilik göstermesi, taksonomilerindeki belirsizliğin de sürmesine neden olmaktadır (González ve ark., 2001).

Anastomoz grupları arasındaki filogenetik ilişkinin belirlenmesi *Rhizoctonia* form cinsinin taksonomik durumunun netleştirilmesi bakımından oldukça önemlidir. Bu sebeple rDNA bölgeleri kullanılarak yapılan moleküler çalışmalar önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada multinükleat ve binükleat *Rhizoctonia* spp.'nin anastomoz grupları arasındaki filogenetik ilişkinin belirlenmesinde önemli bir yere sahip olan 18S rDNA dizisinin analizi yapılarak gen bankasına kazandırılması ve anastomoz grupları arasındaki filogenetik ilişkinin ortaya çıkarılmasına katkıda bulunması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Rhizoctonia* Grubu Fungusların Genel Özellikleri

De Candolle'nin orijinal tanımına göre bir fungusun *Rhizoctonia* olarak sınıflandırılması için:

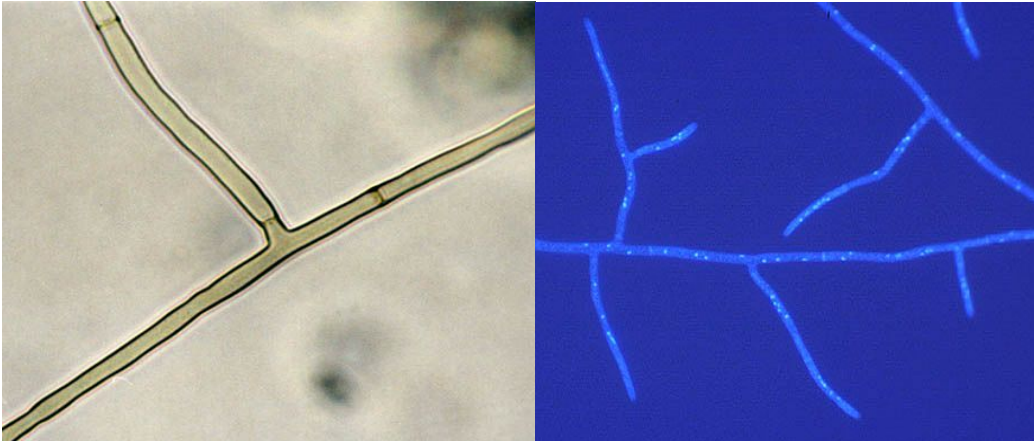
- uniform yapıda sklerot oluşturması
- canlı bitkilerin kökleri ile ilişkili olması gerekmektedir (Carling ve Summer, 1992; Stalpers ve Andersen, 1996).

Ancak daha spesifik karakterlerin eksikliği ilişkisiz birçok fungusun *Rhizoctonia spp.* olarak sınıflandırılmasına yol açmıştır (Sneh ve ark., 1991). Garcia ve ark. (2006)'nın bildirdiğine göre bugüne dek 120 epitet (takson) *Rhizoctonia* tür kompleksine dahil edilmiş fakat bu sayı taksonomik düzenlemeler ile Andersen ve Stalpers (1994) tarafından 37, Roberts (1999) tarafından 49 ile sınırlandırılmıştır.

Rhizoctonia cinsi;

- Genç vejetatif hiflerdeki dallanmanın distal bölmenin biraz gerisinde meydana gelmesi (Şekil 2.1)
- hifal dallarda dallanmanın olduğu kısımda daralma ve hemen yakınında bölme oluşması (Şekil. 2.1)
- sklerotların iç ve dış kısımlarının farklılaşmaması (Şekil 2.2)
- kanca yapısı (Clamp connection), konidium ve rizomorf bulunmaması
- dolipor bölme bulunması (Şekil 2.3)

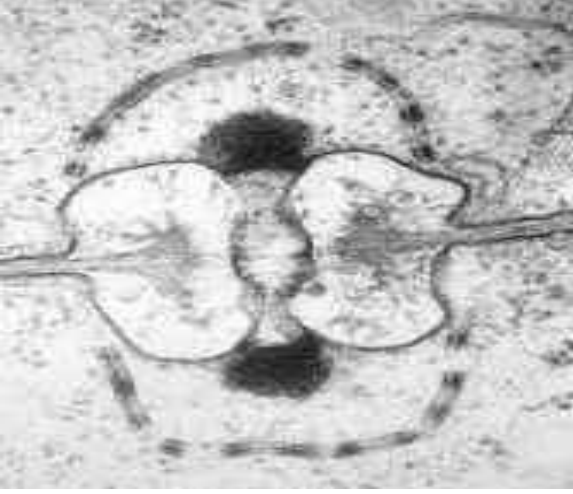
ile karakterize edilir (Sneh ve ark., 1991).



Şekil 2.1. *Rhizoctonia* cinsinin karakteristik hif yapısı (Tredway ve Burpee, 2001)



Şekil 2.2. *Rhizoctonia* sklerot yapısı (Tredway ve Burpee, 2001)



Şekil 2.3. Dolipor septum yapısı (<http://www.mycolog.com/chapter5a.htm>, 19.06.2011).

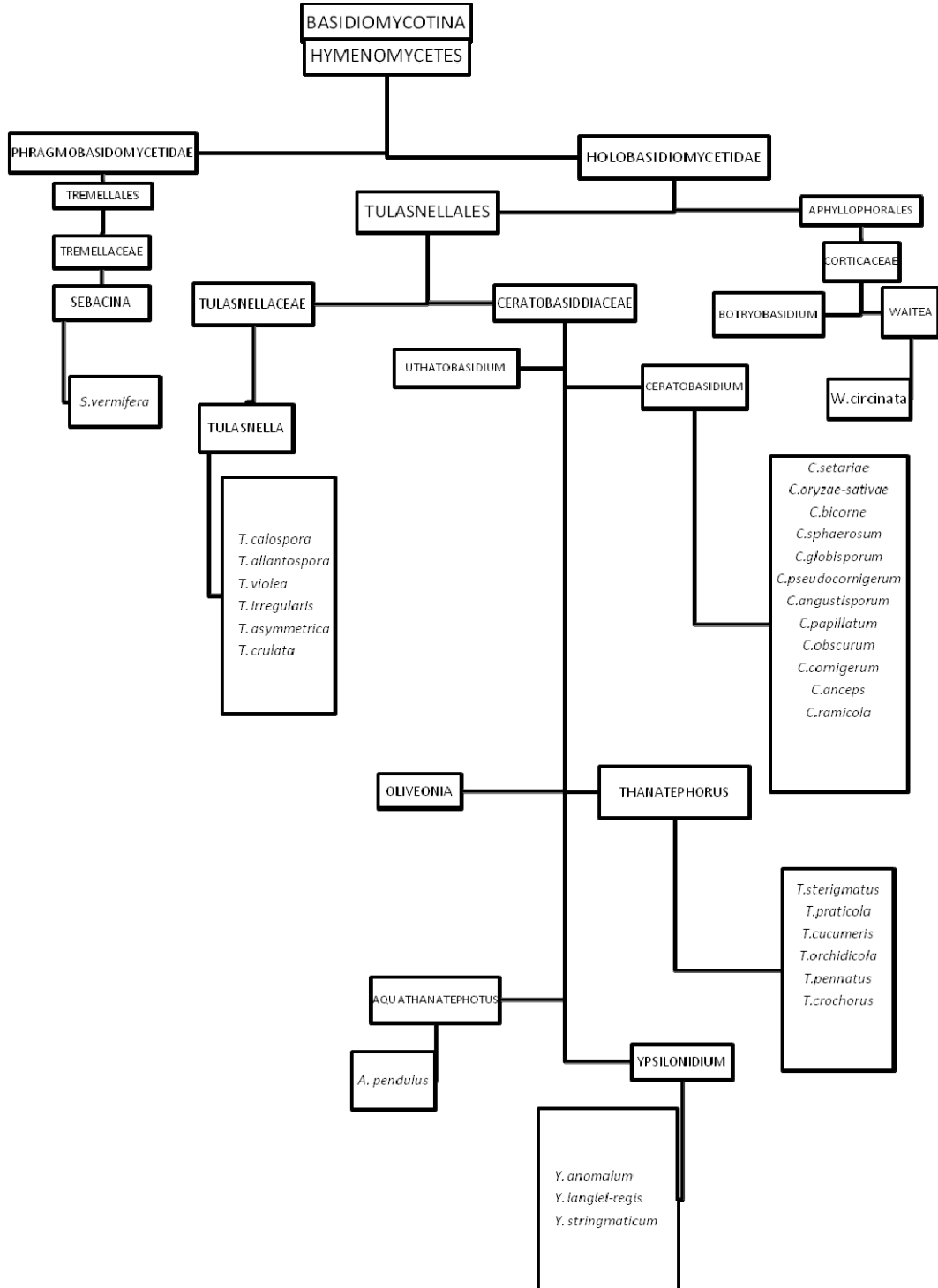
2.2. *Rhizoctonia* Grubu Fungusların Taksonomisi

Farklı *Rhizoctonia* taksonlarının sınıflandırılması önceleri büyük ölçüde hastalıklı bitkilerden elde edilen izolatların çalışılması ile mümkün olmuştur. Ancak karakterizasyon için kullanılan kriterler ve metodoloji geliştikçe sınıflandırmada ciddi değişiklikler yapılmıştır. 70'li yıllar öncesinde tarımsal açıdan önemli ve kültürel özellikleri dikkate alınarak *R. solani* olarak sınıflandırılan izolatların farklı teleomorfik durumları olduğu belirlenmiştir.

2.2.1. *Rhizoctonia* Grubu Fungusların Teleomorfik Sınıflandırması

Rhizoctonia spp. teleomorfları Basidiomycotina alt bölümü, Hymenomyces sınıfı Holobasidiomycetidae alt sınıfına dahil olan *Thanatephorus* (anamorf: *Rhizoctonia solani*), *Ceratobasidium* (anamorf: binükleat *Rhizoctonia*), *Tulasnella* (anamorf: *Rhizoctonia repens*) ve *Waitea* (anamorf: *R. zae*, *R. oryzae*) cinslerinden bir tanesinde bulunmaktadır (Çizelge 2.1) (Sneh ve ark., 1991; Gürkanlı, 2005).

Çizelge 2.1. *Rhizoctonia* grubu fungusların teleomorfik sınıflandırılması (Gürkanlı, 2005)

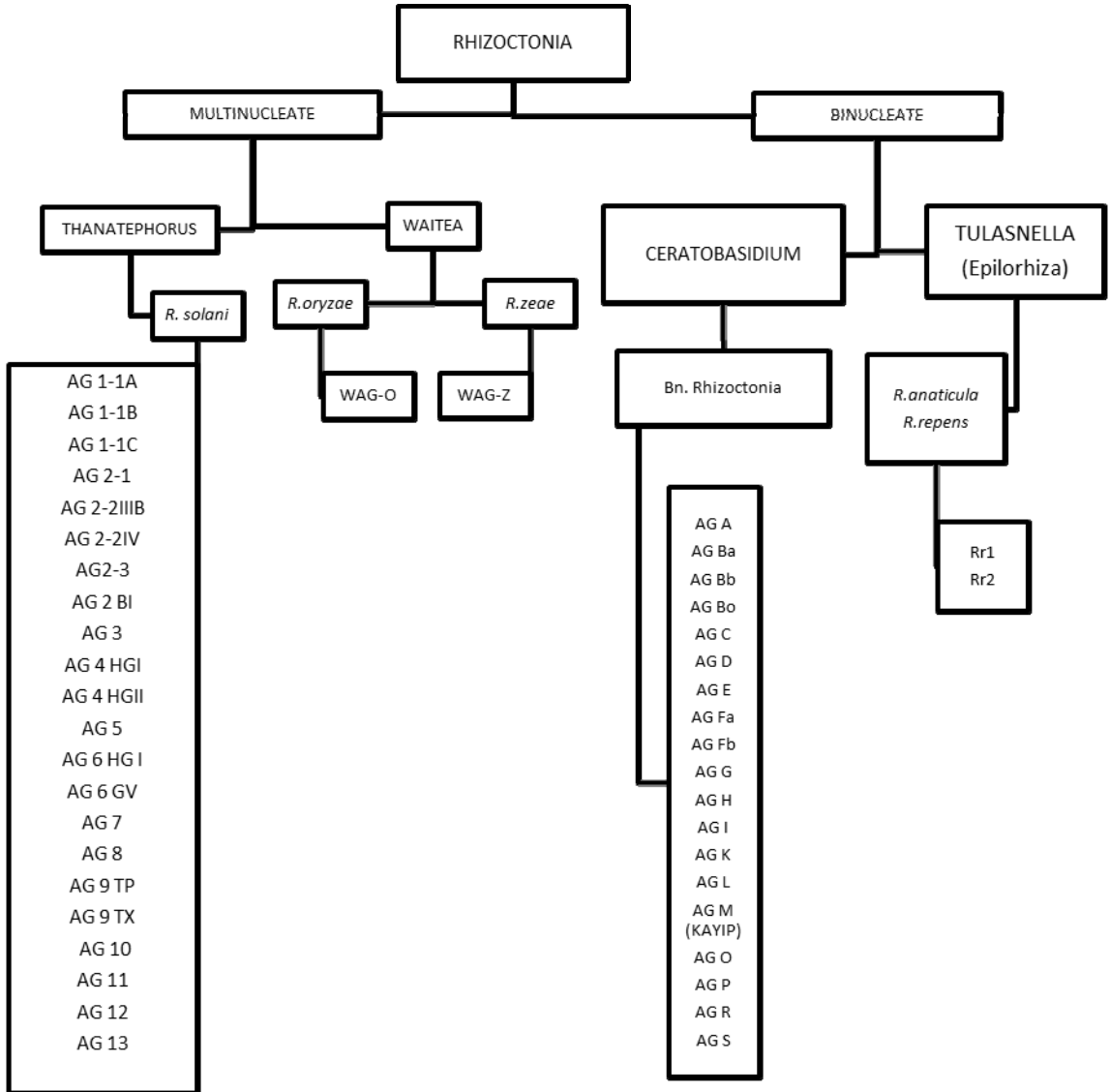


2.2.2. *Rhizoctonia* Grubu Fungusların Anamorfik Sınıflandırması

Rhizoctonia spp. anamorfları Deuteromycota şubesi, Mycelia Sterilia form ordosu içerisindeki *R. solani*, Binükleat *Rhizoctonia*, *R. zae*, *R. oryzae* ve Üninükleat *Rhizoctonia* form türlerine dahil edilmektedir (Çizelge 2.2) (Barnet ve Hunter, 1998).

Rhizoctonia'da anamorfik sınıflandırma genç hücrelerdeki çekirdek sayısı ve anastomoz grupları ile hifal birleşmeler esas alınarak yapılmıştır (Sharon ve ark., 2006).

Çizelge 2.2. *Rhizoctonia* grubu fungusların anamorfik sınıflandırılması (Gürkanlı, 2005)



2.3. *Rhizoctonia* spp.'nin Sınıflandırılmasında Kullanılan Geleneksel Yöntemler

Rhizoctonia spp.'nin sınıflandırılmasında kullanılan geleneksel yöntemler;

- İzolatların besiyeri üzerindeki gelişim şekli ve sklerosyal alanının desenlenmesi, sklerot rengi, kültür altı ve kültür üstü pigmentasyonunun belirlenmesi,
- İzolatların sklerot büyüklüklerinin belirlenmesi,
- İzolatların hif genişliklerinin belirlenmesi,
- Her bir hücredeki çekirdek sayılarının belirlenmesi,
- Hifal anastomoz grup tayini,
- Patojenite özelliklerinin belirlenmesi

şeklinde özetlenebilir (Sneh ve ark., 1991; Çebi Kılıçoğlu, 2009).

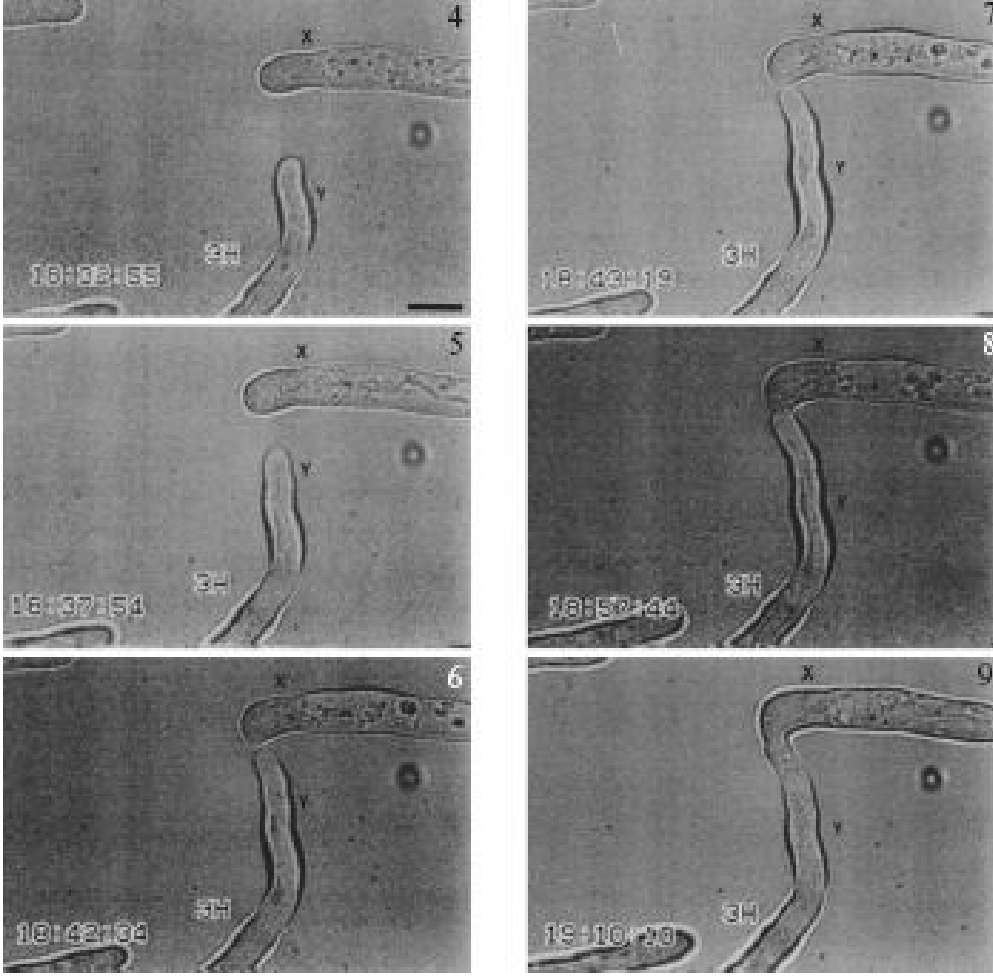
Kullanılan geleneksel yöntemlerin tamamı gözlemlere dayalı, mikroskop bilgisi ve deneyimi gerektiren, uzun zaman gerektiren ve hata yapma olasılığı fazla olan yöntemlerdir.

2.3.1. Hifal Anastomoz Reaksiyonu Yoluyla *Rhizoctonia* spp.'nin Gruplandırılması

2.3.1.1. Anastomoz Kavramı ve Anastomoz Tipleri

Rhizoctonia grubu funguslarda gen transferi, anastomoz olarak adlandırılan hiflerin vejetatif birleşmeleri ile meydana gelmektedir. Anastomoz, farklı izolatlar arasında varyasyona ve gen değişimine izin veren vejetatif hücre birleşmesi mekanizmasıdır. Şekil 2.4'te *R. solani*'de anastomoz reaksiyonu görülmektedir.

Anastomoz reaksiyonu funguslarda gen değişimi için yaygın bir metottur ve *R. solani*, binükleat *Rhizoctonia*'lar ve *Waitea* telemorfları anastomoz yeteneklerine göre spesifik gruplar içerisine dahil edilirler (Sneh ve ark.,1996; McCabe ve ark., 1999).



Şekil 2.4. *Rhizoctonia solani*'de anastomoz reaksiyonunun video mikroskopik görüntüsü (McCabe ve ark., 1999).

Rhizoctonia solani'de hifal anastomoz reaksiyonlarının varlığı ilk olarak Matsumoto tarafından 1921'de rapor edilmiştir (Johnk ve ark., 1992). Schutz (1936) ise ilk kez izolatları anastomoz yeteneklerine göre gruplandırmıştır (Sneh ve ark., 1996). Ardından Flentje ve Stretton, Richter ve Schneider ve Parmeter tarafından anastomoz reaksiyonlarına göre gruplama çalışmaları yapılmış bu araştırmacılar tarafından farklı gruplama sistemleri kullanılmıştır. Araştırmacıların tanımladığı anastomoz grupları ve bu grupların bugünkü karşılıkları Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Hifal anastomoz reaksiyonlarına 1970'li yıllardan itibaren bazı genel tanımlamalar kazandırılmıştır. Bu tanımlamalar sayesinde anastomoz reaksiyonları, *R. solani* izolatlarının daha homojen ve anlaşılabilir gruplar içine dahil edilmesi için (Sneh ve ark., 1996) kullanışlı bir yöntem olmuştur.

Çizelge 2.3. Anastomoz reaksiyonlarına göre yapılan sınıflandırmanın tarihsel gelişimi (Sneh ve ark, 1996)

YIL	YAZAR	ÖNERİLEN GRUP	BUGÜNKÜ KARŞILIĞI
1936	Schultz	Grup I (hortensis) Grup II (brassicae) Grup III (typica) Grup IV (chicorii-endiviae) Grup V (fuchsiae)	(AG 1) (AG 2) (AG 3) (AG 4) (binucleate)
1953	Richter ve Schneider	Füzyon grup A Füzyon grup B Füzyon grup C Füzyon grup D “cruciferen” Füzyon grup E Füzyon grup F “kartoffel”	(AG 1) (AG 5) (AG 4) (AG 2) (binucleate) (AG 3)
1969	Parmeter ve ark.	AG 1 AG 2 AG 3 AG 4	(AG 1) (AG 2) (AG 3) (AG 4)

2.3.1.2. Hifal Anastomoz Reaksiyonlarının Karakterizasyonu

Rhizoctonia solani'deki hifal anastomoz reaksiyonu, farklı fakat akraba hifler arasındaki somatik veya vejetatif uyumun bir göstergesidir (Sneh ve ark., 1996). Araştırmacılar farklı terminolojiler kullanarak anastomoz reaksiyonlarını kategorize etmeye çalışmışlar fakat bu terminolojiler farklı kategorileri tanımlamada hangi kriterlerin kullanılacağını anlamak için gerekli özel sitolojik detaylardan yoksun kalmıştır. Kullanılan terminolojiler ve kategoriler Çizelge 2.4'te verilmiştir.

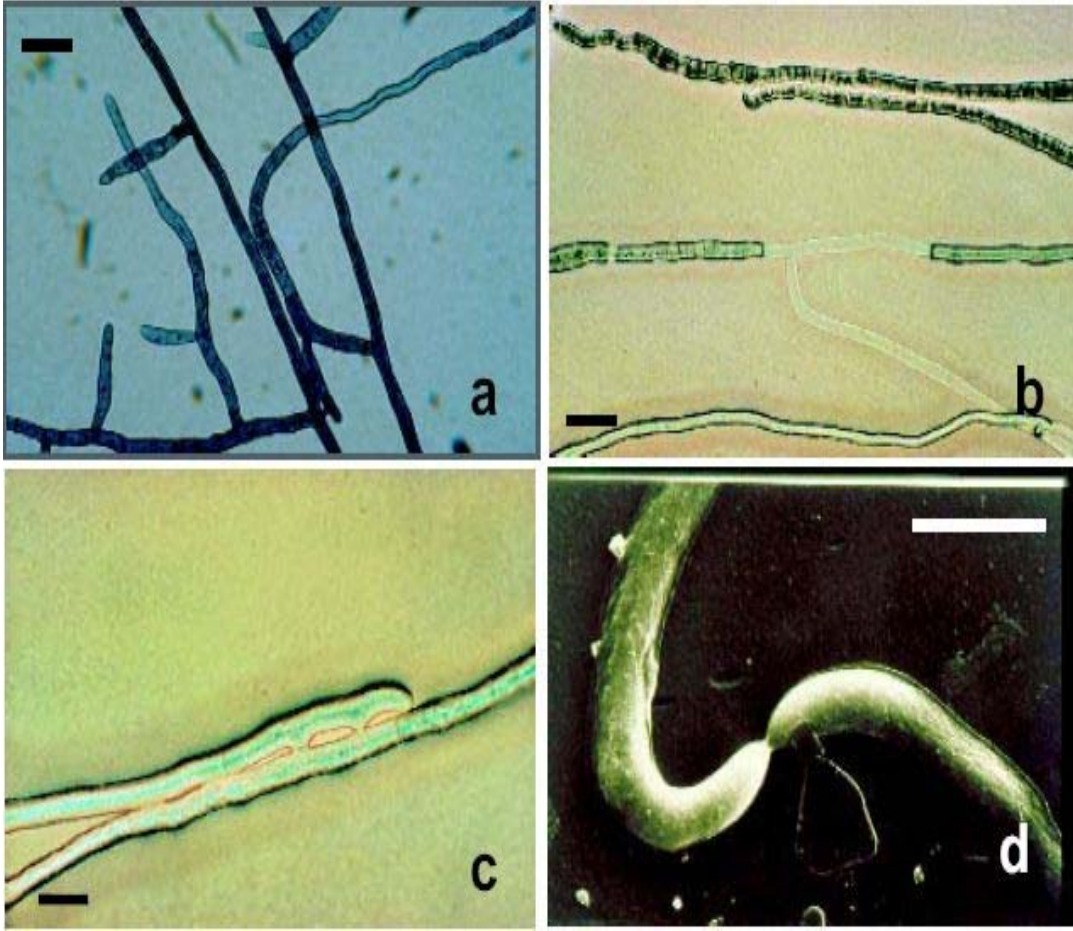
Çizelge 2.4. *Rhizoctonia solani*'de hifal anastomoz reaksiyonunu tanımlamada kullanılan terminolojiler (Carling, 1996)

Matsumoto ve ark. (1932)	Flentje ve Stretton (1964)	Parmeter ve ark. (1969)	Carling ve ark. (1988)
<u>Perfekt</u> Aynı atasal misellerden hifler	<u>S</u> Hücre ölümü yok Hücre duvarı ve membran birleşmeli	<u>2 (Perfekt)</u> Duvar ve sitoplazmik birleşme Hücre ölümü	<u>“C3”</u>
<u>İmperfekt</u> Membran yeterince çözünmemiş, sitoplazmik karışım yok	<u>K</u> Anastomoz yapan hücre ile diğer hücrelerin sitoplazmik anastomoz ölümü	<u>2 (İmperfekt)</u> Duvarlar birleşmiş sitoplazmik birleşme yok Hücre ölümü	<u>“C2”</u>
<u>Temas</u> Temas var fakat birleşme yok	<u>WF</u> Duvar anastomozu var fakat sitoplazmik anastomoz yok	<u>1</u> Birleşme yok Hücre ölümü yok	<u>“C1”</u>
<u>Reaksiyon yok</u> Reaksiyon yok	<u>NR</u> Reaksiyon yok	<u>0</u> Reaksiyon yok	<u>“C0”</u>

Çizelgedeki ilk üç sistem arasındaki farklılıklar ve eksiklikleri gidermek üzere Carling ve ark. (1988) hifal anastomoz reaksiyonlarını tanımlamada dört kategorili bir sistem oluşturmuştur (Çizelge 2.5). Bu sistemde; C3, çok yakın ilişkiyi ve aynı anastomoz grubunu, vejetatif olarak uyumlu aynı popülasyonu (VCP) ve muhtemelen aynı bireysel organizmayı göstermektedir. C2, aynı AG'da olan fakat farklı VCP'lerde olan akraba izolatları temsil eder. C1, ise oldukça heterojen AG (AG 2, AG 8)'ler içinde veya köprü ilişkilerinin var olduğu AG'ler arasındaki daha uzak ilişkiyi temsil etmektedir. C0, farklı AG'lerini temsil eder ve hücreler arasında etkileşim yoktur (Sneh ve ark., 1996).

Çizelge 2.5. *Rhizoctonia solani*'de hifal anastomoz reaksiyonlarının karakterizasyonu (Carling, 1996)

Kategori	Akrabalık	Etkileşim tanımı
<u>C3</u>	Yakın akraba Aynı anastomoz grubu Aynı vejetatif uygunluğa sahip populasyon (VCP) Aynı izolat	-Duvarlar ve membranlar birleşir -Anastomoz noktaları çoğunlukla belirgin değildir -Anastomoz noktasının çapı hif çapına eşit ya da hemen hemen eşit -Anastomoz yapan hücreler ve bitişik hücreler ölebilir ya da genellikle ölmez
<u>C2</u>	Akraba Aynı anastomoz grupları fakat farklı VCP'ler	-Duvar bağlantısı belirgin, membran teması belirsiz -reaksiyon bölgesinin yeri belirgin -anastomoz yapan ve bitişik hücreler daima ölür
<u>C1</u>	Uzak akraba Farklı anastomoz grupları ya da aynı anastomoz grupları	-Hifler arasında temas - duvar bağlantısı belirgin fakat duvar penetrasyonu ve membran temasına ilişkin kanıt yok -nadiren anastomoz yapan hücrelerden biri ya da her ikisi ve bitişik hücreler ölür
<u>C0</u>	Akraba değil Farklı anastomoz grupları	Reaksiyon yok



Şekil 2.5. *Rhizoctonia solani* izolatlarında anastomoz reaksiyonları
a) C0 b) C2 c ve d) C3 (Garcia ve ark., 2006)

2.3.1.3. Anastomoz Grupları (AG) ve Anastomoz Gruplarının Alt Grupları (Intraspesifik Gruplar-ISG)

Intraspesifik grup (ISG) tanımı Ogoshi (1987) tarafından *R. solani* AG'larını alt grupları için kullanılmıştır. ISG kavramı kabul edilmiş ve kısa sürede literatürde yer almıştır. Halen AG alt gruplarının teşhisi mümkün ve kullanışlıdır. Bunlar ISG referans izolatları olmadan da teşhis edilebilirler. Örneğin AG 1'in alt grupları koloni morfolojisi patolojisine bakılarak teşhis edilebilir (Sneh ve ark., 1996).

2.3.1.4. Köprü Grupları ve Köprü İlişkileri

Köprü izolatları birden fazla AG izolatı ile hifal anastomoz reaksiyonu gerçekleştirebilen izolatlardır. Bu reaksiyonlar genellikle C1 tipi anastomoz reaksiyonlarıdır. Hifal anastomoz reaksiyonları kullanılarak *R. solani* izolatlarının tamamına yakını bir AG'na dahil edilebilir. Ancak köprü izolatlarının varlığı bazen bir

izolatın uygun bir AG'na yerleştirilmesini zorlaştırır. AG'ları genellikle birbirinden genetik olarak izole olmuş olarak tanımlanmaktadır. Ancak köprü izolatlarının varlığı bu ayrımın daima kesin olmadığını göstermektedir. Bu sebeple, anastomoz gruplarının tür olarak nitelendirilmesi tartışılan bir konudur.

2.3.1.5. Vejetatif Olarak Uyumlu Populasyonlar

Hifal anastomoz reaksiyonları *R. solani* izolatlarını anastomoz grupları içine yerleştirdiği gibi, aynı zamanda anastomoz gruplarını da daha küçük, daha homojen alt birimlere ayırmak için de kullanılabilir. Bu, C3 tipi anastomozun C1 ve C2 tipi anastomoz reaksiyonuna göre çok daha yakın bir ilişki düzeyini göstermesi ile mümkün olmaktadır. Bu üç reaksiyon tipi de bir izolatı bir AG'na yerleştirmek amacıyla kullanılabilir, fakat sadece C3 izolatları bir AG'nun alt birimlerini belirlemek için kullanılabilir. Ogoshi ve Ui (1983) bu alt birimleri "klon" olarak adlandırmış ve bu metodolojiyi tarladan alınan AG 1, 2, ve 3'e ait populasyon içindeki ilişkilerin belirlenmesinde kullanmışlardır. C3 reaksiyonu ile bu üç anastomoz AG'na dahil izolatlar arasındaki klonal ilişkileri tespit etmişlerdir.

Ogoshi ve Ui (1987) ve MacNish ve ark (1993) tarafından kullanılan "klon" terimi sadece anastomoz tekniğine dayanılarak ayrılamayan izolatlar arasındaki benzerlik derecesini göstermektedir. Araştırmacılar VCP kavramını kendi aralarında C3 reaksiyonları oluşturabilen bir AG içindeki izolat koleksiyonunu tanımlamak için kullanmışlardır. VCP klon terimi ise benzerlik gerektirmeksizin vejetatif reaksiyona (C3) dayalı olarak tanımlanan uyumlu ilişkiyi kesin ve doğru olarak ortaya çıkarır (Sneh ve ark., 1996).

2.3.1.6. Anastomoz Grubunun Taksonomik Durumu

Anastomoz grubu kavramının resmi taksonomik durumu birçok tartışmanın konusu olmuştur. Bazı araştırmacılar AG'larının tür statüsünde değerlendirilebileceğini öne sürmüş fakat *Rhizoctonia* içerisindeki türler, gerekli anatomik özelliklerden yoksun olması veya eşleşme ve eşleşme ilişkileriyle ilgili bilgilerin yetersiz oluşu sebebiyle iyi anlaşılabilir değildir. Birçok araştırma AG'larının *R. solani* içindeki genetik olarak izole olmuş populasyonlar olduğunu desteklemiştir. Resmi durumlarını dikkate almaksızın,

AG'ları *R. solani* ile çalışan mikolog ve bitki patoloğları için yararlı bir karakterizasyon yöntemi olmaya devam etmektedir (Sneh ve ark., 1996).

2.3.1.7. Multinükleat *Rhizoctonia* Türlerinin Anamorfik Sınıflandırması

Multinükleat *Rhizoctonia* türleri *R. solani*, *R. zea* ve *R. oryzae*' yi kapsamaktadır (Sneh ve ark., 1991)

Rhizoctonia solani

Bugüne kadar *R. solani* tür kompleksi içerisinde 13 anastomoz grubu (AG 1, AG 2, AG 3, AG 4, AG 5, AG 6, AG 7, AG 8, AG 9, AG 10, AG 11, AG 12, AG 13) tanımlanmıştır (Kuramae ve ark., 2007).

Ülkemizde ilk kez 1994 yılında rapor edilmiştir (Gürkanlı ve ark., 2009; Bremer ve ark., 1948' den). Daha sonra ise farklı araştırmacılar tarafından birçok *R. solani* AG bildirilmiştir. Ülkemizden bildirilen AG'ları ve konukçuları kısaca şu şekildedir:

AG 2-1, AG 2-2, AG 3, AG 4 ve AG 5 –patates (Demirci ve Döken, 1991)

AG 1, AG 3, AG 4, AG 5, AG 9, ve AG 10- farklı sebze ve ürünler (Demirci ve Döken, 1995)

AG 2, AG 4 ve AG 5- fasulye (Karaca ve ark., 2002)

AG 4- hıyar (Erper ve ark., 2002)

AG 2-1, AG 3, AG 4, AG 5 ve AG 11- arpa ve buğday (Demirci, 1998)

AG 4 ve AG 5-Kanyaş çimi (Demirci ve ark., 2002)

AG 4 -domates (Yildiz ve Döken, 2002)

AG 2-1, AG 3, AG 4, AG 5 ve AG 10- yem bitkileri (Eken ve Demirci, 2003)

AG 2-1, AG 3, AG 4, AG 5, AG 9, AG 10 ve AG 11- fasulye (Eken ve Demirci, 2004)

AG 1-IB, AG 2-1, AG 4 HGI ve AG 4 HG II- tütün (Gürkanlı ve ark., 2009)

AG 4 ve AG 6-fasulye (Çebi Kılıçoğlu, 2009)

Multinükleat *R. solani* anastomoz grupları, oluşturduğu hastalıklar ve teleomorfları Çizelge 2.6.'da verilmiştir.

Çizelge 2.6. Multinükleat *R.solani* anastomoz grupları, oluşturduğu hastalıklar ve teleomorfları (Garcia ve ark., 2006)

Grup/Altgrup	Hastalık oluşturduğu bitkiler	Teleomorf
AG 1 IA	pirinç, mısır, sorgum, fasulye, soya fasulyesi, çim, kafur ağacı fideleri	<i>Thanatephorus cucumeris</i> (= <i>Corticium sasakii</i> ; <i>Pellicularia sasakii</i>) <i>T. sasakii</i> ?
AG 1 IB	fasulye, pirinç, soya fasulyesi, odunsu legüminöz bitkiler, marul, ortanca, lahana	<i>Thanatephorus cucumeris</i> <i>T. microsclerotius</i> ?
AG 1 IC	kara buğday, havuç, soya fasulyesi, keten, çam	<i>T. cucumeris</i>
AG 2-1	krusiferler, çilek, lale	<i>T. cucumeris</i>
AG 2-2IIIB	pirinç, hasır sazı, zencefil, çim mısır, şeker pancarı, krizantem	<i>T. cucumeris</i>
AG 2-2IV	şeker pancarı, çim	<i>T. cucumeris</i>
AG 2 BI	patojen değil	<i>T. cucumeris</i>
AG 3	patates, tütün, domates, patlıcan	
AG 4 (HGI, HGII, HGIII)	domates, bezelye, patates, soya fasulyesi, soğan, pamuk	<i>T. cucumeris</i> (= <i>Pellicularia praticola</i>), <i>T. praticola</i> ?
AG 5	patates, turfgrass, fasulye, soya fasulyesi	<i>T. cucumeris</i>
AG 6 (HG-I, GV)	patojen değil	<i>T. cucumeris</i>
AG 7	soya fasulyesi	<i>T. cucumeris</i>
AG 8	buğdaygiller	<i>T. cucumeris</i>
AG 9 (TP, TX)	krusiferler ve patates	<i>T. cucumeris</i>
AG 10	patojen değil	<i>T. cucumeris</i>
AG 11	buğday	<i>T. cucumeris</i>
AG 12	karnabahar, turp	<i>T. cucumeris</i>
AG 13	patojen değil	<i>T. cucumeris</i>

***Rhizoctonia solani* AG 1**

Rhizoctonia solani AG 1 izolatları sadece AG 1 üyeleri ile hifal birleşme yeteneğine sahiptir. Kültürel karakterleri ve DNA baz dizi homolojileri dikkate alınarak üç alt gruba ayrılmıştır. Ancak hifal anastomoz reaksiyonları ile alt grup ayrımı yapmak mümkün değildir.

AG 1-IA

AG 1-IA izolatları büyük, (1-3mm. çapında) küresel sklerotları ve 1-IA üyeleri arasında yüksek (%98-100), 1-IB üyeleri ile de düşük (%50-56) DNA dizi homolojisi göstermeleri ile karakterize edilirler (Sneh ve ark, 1991).

AG 1-IB

İzolatlar küçük düzensiz şekilli sklerotları ve 1-IB üyeleri arasında yüksek, 1-IA üyeleri ile düşük homoloji göstermeleri ile karakterize edilir (Sneh ve ark, 1991). AG 1-IB izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. AG 1-IB izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

AG 1-IC

İzolatlar küçük (0.2- 0.8 mm. çapında), daire şeklinde sklerotları ile tanınırlar. 1-IA ve 1-IB üyeleri ile homolojileri belirlenememiştir (Sneh ve ark, 1991). AG 1-IC izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. AG 1-IC izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

***Rhizoctonia solani* AG 2**

Bu izolatlar AG 2 ve düşük sıklıkla da AG 8 üyeleri ile hifal birleşme yeteneğine sahiptirler. AG 2 anastomoz sıklığı ve kültürel karakterleri dikkate alınarak gruplara ayrılmıştır (Sneh ve ark., 1991). AG 2-2 izolatları şeker pancarında kök çürüklüğü ve çökerten hastalığına neden olmaktadır (Anees ve ark., 2010).

AG 2-1

AG 2-1 üyeleri arasında yüksek sıklıkta ($\geq\%50$) ve AG 2-2 üyeleri ile düşük sıklıkta ($\leq\%30$) hifal birleşme meydana gelir. Dizi homolojileri AG 2-1 üyeleri arasında yüksek ($\%100$), AG 2-2IIIB ve AG 2-2IV üyeleri ile düşük (sırasıyla $\%37.6-40$ ve $\%43-49$)'tür (Sneh ve ark, 1991). AG 2-1 izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. AG 2-1 izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

AG 2-2 III B

AG 2-2 üyeleri ile yüksek sıklıkta anastomoz oluştururken, AG 2-1 üyeleri ile hifal birleşme sıklığı düşüktür. 35°C’de gelişebilirler. DNA dizi homolojileri ise AG 2-2IIIB üyeleri arasında yüksek (%98), AG 2-2 IV üyeleri ile düşük (%69-71) ve AG 2-1 üyeleri le oldukça düşük (%38-40)’ tür (Sneh ve ark, 1991). AG 2-2 III B izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2.9’da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. AG 2-2IIIB izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

AG 2-2 IV

AG 2-2 üyeleri ile yüksek sıklıkta hifal birleşme gerçekleştirirken, 2-1 üyeleri ile düşük sıklıkta hifal birleşme yeteneğine sahiptirler. Kùltürleri 35°C’ de gelişemezler. Aynı anastomoz grubu üyeleri ile yüksek (%100) dizi homolojisi gösterirler. AG 2-2IIIB ve AG 2-1 üyeleri ile ise düşük (sırasıyla %69-71 ve %43-49) homoloji gösterirler (Sneh ve ark, 1991).

AG 2 BI

AG 2 BI ilk olarak Japonya’ da bulunmuştur ve köprü izolatu olarak adlandırılmaktadır (Vilgalys ve González, 1990). Tiamin oksotrof izolatlardır. AG 2 BI üyeleri kendi aralarında %91-97 DNA dizi homolojisi gösterirler. İzolatlar AG 2, AG 3, AG 6 ve AG 8 üyeleri ile hifal anastomoz gerçekleştirebilirler (Sneh ve ark., 1991). AG 2-2 üyeleri ile güçlü anastomoz reaksiyonları vermeleri sebebiyle Carling ve ark. (2001) tarafından daha önce AG BI olarak isimlendirilen izolatlar, AG 2 BI adı ile AG 2’nin bir alt grubu olarak önerilmiştir.

***Rhizoctonia solani* AG 3**

Bu izolatlar AG 3, AG 2 BI üyeleri ve düşük sıklıkta olmak üzere AG 8 üyeleri ile anastomoz yaparlar. Üyeleri arasında %100 dizi homolojisi gösterirler (Sneh ve ark, 1991). AG 3 izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2.10’da gösterilmiştir.



Şekil 2.10. AG 3 izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

***Rhizoctonia solani* AG 4**

AG 4 üyeleri ile anastomoz yaparlar. Sklerot şekilleri ve dizi homolojilerine göre alt gruplara ayrılmıştır (Sneh ve ark, 1991).

AG 4 HG-I

İzolatlar PDA üzerinde geliştirildiğinde koyu kahverengi sklerotları ile karakterize edilirler. AG 4 HG-I üyeleri ile yüksek (%89-93) ve AG 4 HG-II üyeleri ile düşük (%31-48) homoloji gösterirler (Sneh ve ark, 1991). AG 4 HG-I izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2.11’de gösterilmiştir.



Şeki 2.11. AG 4 HG-I izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

AG 4 HG-II

PDA besiyeri üzerinde gri veya beyazımsı kahverengi sklerotları ile karakterize edilirler (Sneh ve ark, 1991). AG 4 HG-II izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2.12' de gösterilmiştir.



Şekil 2.12. AG 4 HG-II izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

***Rhizoctonia solani* AG 5**

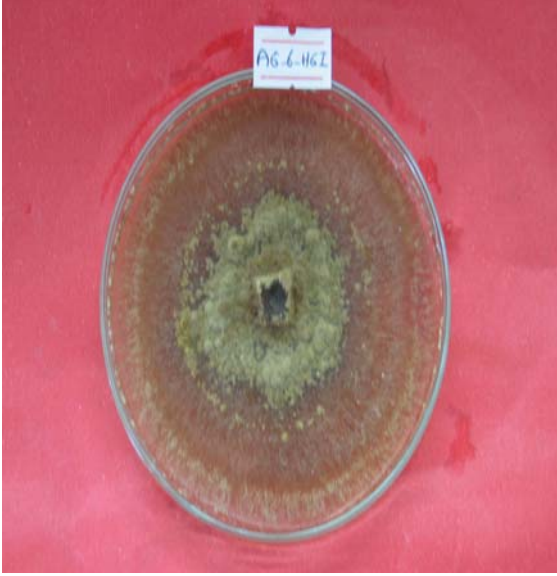
Sadece kendi üyeleri ile anastomoz yaparlar ve üyeleri arasında %94-98 dizi homolojisi gösterirler (Sneh ve ark, 1991). AG 5 izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2.13’de gösterilmiştir.



Şekil 2.13. AG 5 izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

***Rhizoctonia solani* AG 6**

AG 6 üyeleri arasında ve düşük sıklıkta olmak üzere AG 8 ve AG BI üyeleri ve binükleat *Rhizoctonia* AG F üyeleri ile anastomoz yapma yeteneğine sahiptirler. Dizi homolojileri dikkate alınarak alt gruplara ayrılmıştır (Sneh ve ark., 1991). AG 6 HG I izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2.14’de gösterilmiştir.



Şekil 2.14. AG 6 HG I izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

***Rhizoctonia solani* AG 7**

Sadece kendi üyeleri ile anastomoz yaparlar. Üyeleri arasında %99 homoloji gösterirler (Sneh ve ark., 1991).

***Rhizoctonia solani* AG 8**

AG 8 üyeleri ile yüksek sıklıkta (≥ 50) ve AG 3, AG 6, AG BI ve AG 2 üyeleri ile düşük sıklıkta (≤ 30) hifal birleşme gösterirler (Sneh ve ark., 1991). AG 8 izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2.15’de gösterilmiştir.



Şekil 2.15. AG 8 izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

***Rhizoctonia solani* AG 9**

Sadece AG 9 üyeleri ile hifal birleşme yapabilirler. Tiamin ihtiyacı ve dizi homolojilerin göre alt gruplara ayrılmıştır (Sneh ve ark., 1991). AG 9 izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2.16' da gösterilmiştir.



Şekil 2.16. AG 9 izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

AG 9 TP

İzolatları tiamin ototroftur ve AG 9 TP üyeleri arasında (\geq %94) ve AG 9 TX üyeleri ile %78-87 oranında homoloji gösterirler (Sneh ve ark., 1991).

AG 9 TX

Tiamin oksotrof izolatlardır.

***Rhizoctonia solani* AG 10**

Sadece AG 10 üyeleri ile anastomoz yapabilirler (Sneh ve ark., 1991).

***Rhizoctonia solani* AG 11**

İzolatları tiamin oksotroftur. AG 11' in kendi üyeleri arasında ve AG 2 ve AG 8 üyeleri ile anastomoz yapabildiği gözlenmiştir. Olgun sklerotları krem-açık kahverengi renktedir ve agar yüzeyinde dağılmıştır (Carling ve ark., 1994).

***Rhizoctonia solani* AG 12**

İlk olarak orkide bitkisinden elde edilmiştir. Koloni rengi başlangıçta açık renklidir fakat yaşlandıkça koyu kahve rengi olmaktadır (Carling ve ark., 1999).

***Rhizoctonia solani* AG 13**

İlk kez 2002'de rapor edilmiştir. Hifleri açık kahverengi renktedir. Sadece kendi aralarında anastomoz yapabilirler. Tüm izolatları havai hif üretir (Carling ve ark., 2002).

2.3.1.8. Binükleat *Rhizoctonia* Türlerinin Anamorfik Sınıflandırması

Rhizoctonia repens dışındaki binükleat *Rhizoctonia* spp. hifal birleşme yeteneklerine göre anastomoz gruplarına ayrılmışlardır (Sneh ve ark., 1991). Binükleat *Rhizoctonia* grupları anamorf ve teleomorf isimleri ile birlikte Çizelge 2.7'de verilmiştir.

AG A

AG A üyeleri AG A ve CAG 2 üyeleri ile anastomoz yaparlar.

AG B

AG B üyeleri ile hifal birleşme yeteneğine sahiptirler. Anastomoz sıklığı ve kültürel karakterleri dikkate alınarak alt gruplara ayrılmıştır (Sneh ve ark., 1991).

AG Ba

Bu izolatlar kendi grubundaki izolatlar ile yüksek sıklıkta ($\geq\%50$) anastomoz yaparken, AG Bb ve AG Bo üyeleri ile düşük sıklıkta ($\leq\%30$) anastomoz yaparlar. Sklerotlar düzensiz şekilli ve grimsi renktedir (Sneh ve ark., 1991).

AG Bb

AG Bb üyeleri ile yüksek sıklıkta ($\geq\%50$) anastomoz yaparken, AG Ba ve AG Bo üyeleri ile düşük sıklıkta ($\leq\%30$) anastomoz yaparlar. Sklerotları küresel şekilli ve kahverengidir (Sneh ve ark., 1991). AG Bb izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2.17'de gösterilmiştir.



Şekil 2.17. AG Bb izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

AG Bo

Bu izolatlar AG Ba ve AG Bb üyeleriyle düşük sıklıkta anastomoz yaparlar. Kültürel ve morfolojik özellikler bakımından çeşitlilik gösterir ancak AG Ba ve AG Bb' den farklıdır (Sneh ve ark., 1991). AG Bo izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2.18' de gösterilmiştir.



Şekil 2.18. AG Bo izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

AG C

AG C üyeleriyle ve bazen de AG I temsilcileriyle hifal birleşme gösterirler (Sneh ve ark., 1991).

AG D

AG D ve CAG 1 izolatları ile anastomoz yaparlar (Sneh ve ark., 1991).

AG E

AG E, CAG-3 ve CAG 6 üyeleriyle hifal birleşme gösterirler (Sneh ve ark., 1991). AG E izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2.19'da gösterilmiştir.



Şekil 2.19. AG E izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

AG F

AG F, CAG 4 ve düşük sıklıkta da *R. solani* AG 6 ile anastomoz yaparlar (Sneh ve ark., 1991).

AG G

Sadece kendi üyeleri ile hifal birleşme yeteneği gösterirler (Sneh ve ark., 1991).

AG H

AG H üyeleriyle anastomoz yapabilirler (Sneh ve ark., 1991).

AG I

AG I ve bazen de AG C izolatları ile anastomoz yaparlar (Sneh ve ark., 1991).
AG I izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2.20’de gösterilmiştir.



Şekil 2.20. AG I izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

AG K

AG K izolatlarıyla hifal birleşme gösterirler (Sneh ve ark., 1991).

AG L

Kendi üyeleri ile anastomoz yaparlar. AG L izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2.21’ de gösterilmiştir.



Şekil 2.21. AG L izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

AG M

AG M izolatlarıyla hifal birleşme gösterirler (Sneh ve ark., 1991). Ancak test izolatu kayıptır.

AG O

AG O izolatlarıyla hifal birleşme gösterirler (Sneh ve ark., 1991). AG O izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2.22’de gösterilmiştir.



Şekil 2.22. AG O izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

AG P

AG P izolatlarıyla hifal birleşme gösterirler (Sneh ve ark., 1991). AG P izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2. 23’de gösterilmiştir.



Şekil 2.23. AG P izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

AG Q

AG Q izolatlarıyla hifal birleşme gösterirler (Sneh ve ark., 1991).

AG R

AG R ve CAG 5 izolatlarıyla hifal birleşme gösterirler (Sneh ve ark., 1991). AG R izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2.24’de gösterilmiştir.



Şekil 2.24. AG R izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

AG S

AG S ve CAG 7 üyeleri ile anastomoz yapabilirler (Sneh ve ark., 1991). AG S izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi Şekil 2. 25' da gösterilmiştir.



Şekil 2.25. AG S izolatının PDA üzerindeki koloni morfolojisi

Çizelge 2.7. Binükleat *Rhizoctonia* Grupları (Garcia ve ark., 2006)

Anastomoz grubu	Anamorf	Teleomorf
AG A (Amerikan CAG2)	<i>R. candida</i> ; <i>R. endophytica</i> var. <i>endophytica</i> ; <i>R. fragariae</i> ; <i>R. ramicola</i>	<i>Ceratobasidium</i> <i>cornigerum</i> ; (= <i>C. ramicola</i>)
AG Ba	<i>R. fumigata</i>	<i>C. setariae</i>
AG Bb	<i>R. oryzae-sative</i>	<i>C. oryzae- sative</i>
AG Bo	bilinmiyor	<i>C. cornigerum</i>
AG C	<i>R. globularis</i>	<i>C. cornigerum</i>
AG D (Amerikan CAG1)	<i>R. cerealis</i>	<i>C. cereale</i>
AG E(Amerikan CAG3, CAG6)	<i>R. muneratii</i>	<i>Ceratobasidium sp.</i>
AG F (Amerikan CAG4)	bilinmiyor	<i>Ceratobasidium sp</i>
AG G	<i>R. fragariae</i>	<i>Ceratobasidium sp</i>
AG H	bilinmiyor	<i>Ceratobasidium sp</i>
AG I	<i>R. fragariae</i>	<i>bilinmiyor</i>
AG K	bilinmiyor	<i>Ceratobasidium sp</i>
AG L	bilinmiyor	<i>Ceratobasidium sp</i>
AG O	bilinmiyor	<i>Ceratobasidium sp</i>
AG P	bilinmiyor	<i>C. cornigerum</i>
AG Q	bilinmiyor	<i>C. cornigerum</i>
AG R (Amerikan CAG5)	bilinmiyor	<i>Ceratobasidium sp</i>
AG S (Amerikan CAG7)	bilinmiyor	<i>Ceratobasidium sp</i>

2.4. *Rhizoctonia* Grubu Fungusların Sınıflandırılmasında Kullanılan Biyokimyasal Yöntemler

2.4.1. İzozim Analizleri

İzozimler, genom üzerinde dağılmış birkaç lokusta veya farklı allellerde kodlanan, belirli enzimlerin çoklu moleküler formlarıdır.

İzozimlerin elektroforetik ayrımı, elektroforetik bir jel üzerindeki allelik formlar arasındaki farklılıklardan sorumlu olan aminoasit değişikliklerine ve dolayısıyla genetik polimorfizmlerin varlığına dayanır.

İzozim analizleri;

- bir fungal grup veya alt gruplar içindeki yakın akraba izolatlar arasında yüksek seviyede varyasyon göstermeleri,
- çok sayıda izolatin eşzamanlı olarak değerlendirilmesine olanak sağlaması

nedeniyle *Rhizoctonia* spp.'nin populasyon biyolojisi çalışmalarında oldukça kullanışlıdır (Sharon ve ark., 2006). Sharon ve ark.'nın bildirdiğine göre izozim analizleri farklı anastomoz grupları ve MNR ve BNR alt gruplar arasındaki çeşitlilik ve akrabalık ilişkilerini belirlemek için kullanılmıştır.

Genel olarak izozim elektroforetik şablonları, anastomoz grupları ve alt gruplar arasındaki genetik çeşitlilik için iyi birer belirteç sağlamış ve anastomoz gruplarının genetik temelini doğrulamıştır. AG 1 içindeki 6 alt grup ve AG 2 içindeki 5 alt grubun ayrılması için 10 enzim sistemi kullanılmıştır. Ancak bilinen AG 1 alt gruplarının ayrımı için sadece izozim analizleri yeterli olmamıştır. Bu yöntem, (Liu ve Sinclair 1992;1993) bir fungal populasyonda sınırlı varyasyon gösteren bağımsız izolatlar hakkında bilgi verir ancak belirli allel ve lokusların dağılım sıklığının belirlenmesi için büyük bir populasyon gerekmektedir.

İzozim profilleri aynı zamanda patates tarlarından izole edilen AG 3 ve AG 9 izolatlarını ayırt etmede kullanılmıştır. Ek olarak, izozim bantlanma şablonlarının küme analizleri ile AG 3 izolatlarını alt grupları (IIA, IIB, IIC) da birbirinden ayırt edilmiştir. Kanada ve Amerikan izolatları, Asya ve Avrupa izolatlarından genetik olarak uzak olmalarına rağmen bir arada gruplandırılmıştır (Laroche ve ark., 1992; Sharon ve ark., 2006). Bu sonuç, Ceresini ve ark. (2002)'nin Kuzey Amerika ve Kanada'daki AG 3 genotipinin Kuzey Carolina'ya enfekte olmuş tonumluk patates yumrularıyla göç ettiğini doğrulamıştır. İzozim fenotipleri BNR'ların genetik olarak farklı 4 ayrı gruba ayrıldığı desteklemektedir (Damaj ve ark., 1993; Sharon ve ark., 2006). Bu gruplar 28S rDNA RFLP şablonları ile belirlenen 7 gruptan 5'i ile uyumludur (Cubeta ve ark.,1991; Sharon ve ark., 2006).

Rhizoctonia solani izolatları pektik zimogram olarak tanımlanan pektin esterazlar ve poligalakturonazlar ürettikleri bilinmektedir. Pektik zimogram analizleri izozimlerin belirlenmesinde kullanılan yaklaşımlardan biridir. Bu yöntem AG 8 altgruplarının, çiçek soğanı ve tütünde patojen olan tarla izolatlarının ve çeltik tarlalarındaki AG 1-A izolatlarının ayrımında başarılı olmuştur (Sharon ve ark., 2006).

2.4.2. Yağ Asidi Analizleri

Yağ asidi metil esteri bakteri ve mayalarda yakın akraba suşların ayrımında rutin olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem, yağ asidi metil esteri türevlerinin gaz ve sıvı

kromotografisi ve bir bilgisayar program paketi (Microbial Identification System (MIDI)) kullanılarak teşhisi ve analizine dayanır. MIDI yöntemiyle MNR anastomoz gruplarının karakterizasyonu başarıyla kullanılır. AG 2, AG 3, ve AG 4 izolatlarında alt grup ayrımı yapılabilmektedir. Ancak AG 1'de AG1-IA, AG 1-IB izolatlarından ayırt edilemezken, AG 1- IC izolatları onlardan farklıdır. Yağ asidi metil esteri profilleri diğer moleküler yöntemleri ile birlikte kullanılarak AG 1 yeni alt grubu AG 1-ID tanımlanmıştır (Priyatmojo ve ark., 2001; Sharon ve ark., 2006).

Toplam yağ analizleri farklı *R. solani* AG izolatlarının karakterizasyonunda ve ayırt edilmesinde kullanılmıştır. Ancak bu yöntem AG 4 ve AG 7 izolatlarını ayırt etmede yeterli olmamıştır. *Waitea (Rhizoctonia) circinata'* nın üç varyetesinin toplam yağ asidi küme analizi sonucunda, grupların net şekilde ayrımı yapılmıştır (Priyatmojo ve ark., 2002; Sharon ve ark., 2006). Bu yöntem MNR'lara ek olarak çeltikte patojen olan BNR'ların teşhisinde de kullanılmıştır (Sharon ve ark., 2006).

Bu yöntemin kullanılması sırasında teknik bazı problemler ortaya çıkabilir. Kültür yaşı ve sıcaklık gibi kültürel koşulların yağ asidi kompozisyonunu etkilediği bilinmektedir. Kültürel koşullar ve ekstraksiyon işlemindeki farklılıklar nedeniyle farklı laboratuarlarda elde edilen sonuçlar tutarsız olabilir. Bu sebeple yağ asidi analizlerinde yöntemin standardize edilmesi gerekmektedir (Sharon ve ark., 2006).

2.5. *Rhizoctonia* Grubu Fungusların Sınıflandırılmasında Kullanılan Genetik Yöntemler

Morfolojik kriterler dikkate alınarak yapılan sınıflandırma, her ne kadar geçerliliğini devam ettirse de, *Rhizoctonia* tür kompleksi izolatlarının ayırımında yeterince doğru ve kullanışlı değildir (Sharon ve ark., 2006).

Anastomoz mekanizmalarının tam anlaşılmasına rağmen, anastomoz grubuna dayalı sınıflandırma *Rhizoctonia* hastalıklarına sebep olan primer ajanların tanınmasında uygun ve kullanışlıdır (Liu ve ark., 1995).

Ancak, aynı anastomoz grubundaki izolatlar her zaman aynı (eşit) sıklıkta anastomoz yapmazlar. Bu durum AG 2 ve AG 4'te mevcuttur (Liu ve ark., 1995). Farklı anastomoz gruplarına (AG 2, 3, 6, 8) dahil olan bazı izolatların da birbiriyle anastomoz yaptıkları gözlenmiştir (Liu ve ark., 1995). Buna ilaveten, bazı izolatların bilinen

anastomoz grubunun temsilcileri ile anastomoz yapmadıkları gözlenmiş ve bu sebeple tanımlanmış bir AG ve alt grubuna yerleştirilememiştir (Liu ve ark., 1995).

Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) geliştirilmesi ve ardından farklı rDNA bölgelerinin amplifikasyonu için primerlerin dizaynı funguslarla yapılan taksonomik çalışmaları kolaylaştırmış ve hızlandırmıştır. Korunmuş bölgelerden geliştirilen bu primerler, birçok fungusta bulunan fragmentlerin amplifikasyonuna izin vermektedir. Örneğin White ve ark. (1990)'nın dizayn ettiği ITS primerleri farklı funguslardaki ITS dizilerinin belirlenmesini sağlamış ve farklı cinslerin türleri arasındaki taksonomik ve filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde kullanılmıştır (Bridge ve ark., 1998).

Anastomoz grupları arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde esteraz zimogramları, protein elektroforezi, seroloji, DNA-RFLP ve RNA-RNA hibridizasyonu gibi yöntemler kullanılmış fakat çoğu başarısız olmuştur (Liu ve ark., 1995). DNA-DNA baz kompozisyonları ve DNA-DNA hibridizasyonu sonuçları bazı farklılıklar içermekle birlikte anastomoz grubu sınıflandırması ile kısmen uyumludur (Liu ve ark., 1995). DNA reassociation kinetics, izozim analizleri ve ribozomal DNA haritalama çalışmaları birkaç anastomoz grubu içerisinde alt grupların varlığını göstermiştir (Liu ve ark., 1995). Ancak, birçok anastomoz grubunda izolatlar ve gruplar arasındaki genetik ilişkiler halen anlaşılammıştır. *Rhizoctonia* spp.'nin sınıflandırılmasında kullanılan çeşitli moleküler yöntemler ve bunların etkinlikleri Çizelge 2.8'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.8. *Rhizoctonia* grubu fungusların sınıflandırılmasında kullanılan çeşitli moleküler yöntemler ve etkinlikleri (Sharon ve ark., 2006)

Yöntem	Farklı AG	Aynı AG	AG içinde altgruplar	Bireysel
Nükleik Asitler				
DNA-DNA hibridizasyonu		+++	+++	
RFLP				
18S, 28S rDNA	+++	+	+	
ITS rDNA		+++	+	
AT-zengin DNA		+	+	+++
Tek kopya nükleer DNA		+	+	+++
DNA parmak izi				
RAPD				+++
AFLP				+++
DNA dizileme				
18S, 28S rDNA	+++	+++	+	
ITS rDNA	+++	+++	+++	
Elektroforetik Karyotipleme		+	+	+
Proteinler				
İzozimler		+	+	+++
Zimogramlar		+	+	+++
Hücrel Yağ Asitleri	+++	+	+	

Rhizoctonia tür kompleksi hakkındaki bilginin bu denli yetersiz oluşu bu organizmayı çalışmayı ve neden olduğu hastalıkların kontrolünü engellemektedir (Liu ve ark., 1995). Biyolojisi ve patolojisiyle ilgili yürütülecek çalışmalar için, bu tür kompleksinin genetik anlamda net bir tanımlamaya ihtiyacı vardır (Liu ve ark., 1995).

2.5.1. Fungal rDNA Gen Bölgesi

Homolog makro moleküllerin nükleotit ve aminoasit dizisindeki farklılıklar, evrimsel uzaklıklarının bir sonucudur. Moleküler dizileme ile evrimsel uzaklıkların ölçülmesi için, yapılacak dizileme çalışmalarında doğru moleküller seçilmesi çok önemlidir (Madigan ve ark., 2003).

Doğru moleküler belirteçleri seçmek için bazı kriterler vardır. Öncelikle kullanılacak molekül çalışma için seçilen organizma gruplarında evrensel olarak yayılış göstermelidir. İkinci olarak, işlevselliği farklı olan moleküllerin dizi benzerliği göstermesi beklenemeyeceğinden molekül her organizma için fonksiyonel olarak homolog olmalıdır. Üçüncü olarak, dizilerin hizalanabilmesi (alignment) için molekülün korunmuş dizi bölgeleri içermesi gerekir. Son olarak da, seçilen molekülün organizmadaki evrimsel değişimi bir bütün olarak yansıtması gerekir (Madigan ve ark., 2003).

Protein sentezinin oldukça eski olması ve yukarıdaki kriterler dikkate alındığında organizmalar arasındaki evrimsel ilişkiyi ayırt etmede rRNA' lar mükemmel evrimsel belirteçlerdir. Ribozomal RNA' lar, oldukça büyük, fonksiyonel olarak sabit, evrensel olarak yaygın moleküllerdir ve tüm hücrelerde nükleotit dizisinin korunduğu çok sayıda bölge içerirler (Madigan ve ark., 2003).

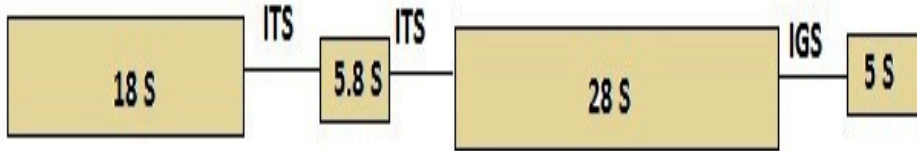
Filogenetik ve taksonomik olarak aydınlatıcı bu bölgeler, DNA restriksiyon bölgelerindeki varyasyonlar ve izoenzim polimorfizmleri sebebiyle funguslarda sistematik çalışmalar ve genetik analizler için oldukça kullanışlı moleküler belirteçlerdir (Liu ve ark., 1995).

rRNA gen kümesi hem çekirdekte hem de mitokondride bulunan, oldukça korunmuş değişken bölgelerden meydana gelmektedir (White ve ark., 1990; Cubeta ve ark., 1996). Mitokondrial rDNA, çekirdek DNA'sından yaklaşık 16 kez daha hızlı evrimleşmektedir ve ara taksonomik seviyedeki filogenetik çalışmalar için oldukça kullanışlıdır (Bridge ve ark., 1998; Çebi Kılıçoğlu, 2009).

Funguslarda çekirdek rDNA'sı ardışık tekrarlanan birimler halinde organize olmuştur. AG 4 izolatlarında her bir haploid genomda tekrarlanan birim sayısının 59 olduğu belirlenmiştir (Vilgalys ve González, 1990).

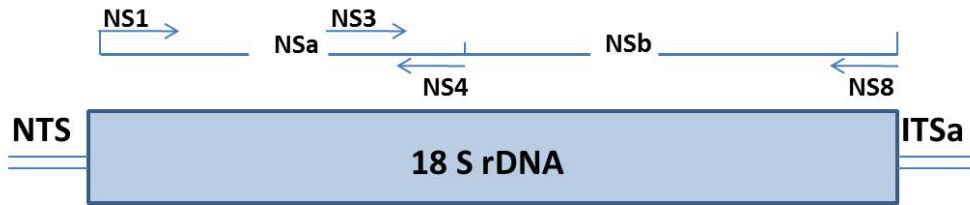
Tekrarlanan her bir birim üç rRNA geni içermektedir. Küçük rRNA geni (18S), 5.8S rRNA geni ve büyük rRNA geni (28S) (Şekil 2.27). Bir birim genler ise iki ara transkripsiyon bölgesi (internal transcribed spacer-ITS1 ve ITS) ile ayrılmaktadır. İki birim arasında ise genler arası bölge (intergenic spacer -IGS) ile ayrılmaktadır. 5 S rRNA geni ise fungal taksona bağlı olarak tekrarlayan birim içinde olabilir veya olmayabilir (Bridge ve ark., 1998). 5.8S rRNA geni ise fungusların mitokondriyal genomunda bulunmaz. Korunmuş olan diziler büyük alt birim (LSU) ve küçük alt birim (SSU) genlerinde bulunmaktadır. 18S rDNA gen bölgesi nispeten daha yavaş evrim

geçirmektedir ve özellikle uzak akraba organizmaların karşılaştırılmasında kullanışlıdır. Kodlanmayan bölgeler olan ITS ve IGS ise, daha hızlı evrim geçirir ve bir tür içindeki izolatların ya da bir cins içindeki fungal türlerin karşılaştırılmasında kullanılabilir. 28S rDNA'nın bazı bölgeleri ise türler arasında değişkenlik gösterebilmektedir (Lee ve Taylor, 1992; Bridge, 1998; Çebi Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008)



Şekil 2.26. Funguslarda ribozomal DNA gen bölgesi (Salazar ve ark., 2000)

18S rDNA, evrimsel olarak ITS- 5.8S rDNA bölgelerinden daha korunmuş olması sebebiyle, bu fungal gruptaki genetik çeşitliliğin anlaşılması için önemli bir bilgi kaynağıdır (Şekil 2.27)(Liu ve ark., 1995).



Şekil 2.27. 18S rRNA gen bölgesinin şematik gösterimi (Liu ve ark., 1995)

2.5.2. Elektroforetik Karyotipleme

Pulsed field jel elektroforezi (PFGE) çok büyük DNA fragmentlerinin (12 Mb'a kadar) ayrılmasını sağlayan bir yöntemdir. PFGE uygulaması fungal genomik araştırmalar için güçlü bir yöntem olup agaroz jel üzerinde kromozomal DNA'nın ayrılmasını sağlamaktadır. İlk olarak *Saccharomyces cerevisiae* kromozomlarını ayırmak için kullanılmış, daha sonra *Rhizoctonia* spp.'de dahil olmak üzere birçok fungusda kullanılmıştır. Sharon ve ark. (2006)'nın bildirdiğine göre, ilk kromozom sayısı tahmini ve bir AG 4 izolatının genom büyüklüğü Wako ve ark. tarafından

1991’de rapor edilmiştir. Bu çalışmada, toplam genomun 11Mb. büyüklüğünde olduğu ve 0.8-3.8 Mb. büyüklüklerinde 6 kromozoma sahip olduğu bildirilmiştir. Bir diğer çalışma ise Keijer ve ark. (1996) tarafından yapılmış ve MNR izolatlarının (AG 2-1, 3 ve 4) karyotipleri arasında önemli derecede bir varyasyon olduğu ve en az 11 kromozoma sahip oldukları rapor edilmiştir. Kromozom büyüklüklerinin 0.6 ile 6 Mb arasında değiştiği ve ölçülebilen genom büyüklüğünün ise 37-46 Mb olduğu bildirilmiştir. Karyotip ve anastomoz grupları arasında kesin bir korelasyon yoktur. Karyotip varyasyonu fungusların fenotipik varyasyonları şeklinde ortaya çıkar ve genellikle bir anastomoz grubu içindeki çeşitlilik anastomoz grupları arasındaki çeşitlilikten daha azdır. Kromozomlardaki yeniden düzenlenmeler örneğin insersiyon (örn. hareketli elementler ile), delesyonlar, duplikasyonlar, translokasyonlar ve B kromozomlarının varlığı *R. solani*’deki karyotip varyasyonunun kaynağı olarak düşünülebilir (Sharon ve ark., 2006).

Geleneksel sitolojik çalışmalar ise *R. solani*’de 6 kromozom olduğunu göstermiştir. Işık mikroskopu kullanılarak yapılan geleneksel sitoloji, fungal kromozomun küçük olması ve boyamadan kaynaklı olarak yanlış sonuçlar verebilir. Bu da aynı fungus için kromozom sayısının PFGE ile belirlenen sayıdan daha az olmasına neden olabilir. PFGE metodunda ise, büyük kromozomların (yaklaşık <6Mb) çözünürlüğünde sınırlı kalması ve eşit büyüklükteki kromozomların birlikte hareket etmesi ile kromozom sayısında hatalara yol açar.

2.5.3. RAPD (Rastgele Amplifiye Olmuş Polimorfik DNA)

Rastgele Amplifiye Olmuş Polimorfik DNA (RAPD) analizi, genom boyunca rastgele dağılım gösteren DNA segmentlerinin amplifikasyonu için keyfi olarak seçilen dizilerin tek zincirli kısa oligonükleotit primerlerinin kullanımı esasına dayanmaktadır. Hızlı ve basit bir tekniktir ve analiz edilecek genom hakkında bilgi sahibi olmayı gerektirmez. RAPD markörleri genetik harita yapımı, populasyon genetik yapısının analizi, bireysel parmak izi (fingerprint) ve genomun belirli bölgelerini hedef alan markörlerin üretimi çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Sharon ve ark., 2006).

Rastgele Amplifiye Olmuş Polimorfik DNA yöntemi kullanılarak, *R. solani*’nin birkaç AG’nun (AG 1, AG 2, AG 3, AG 8 ve AG 9), genomik fingerprinti için yeni

genetik markörler başarıyla elde edilmiştir (Tommerup ve ark., 1995; Yang ve ark. 1995, 1996; Bounou ve ark., 1999; Toda ve ark., 1998, 2004; Pascual ve ark., 2000). Bu yöntem aynı zamanda BNR AG D (Nicolson ve Parry, 1996), UNR (Lilja ve ark., 1996) ve *Rhizoctonia* endofitlerinin (Shan ve ark., 2002) genetik ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla da kullanılmıştır.

RAPD-PCR metodu kullanılarak Avustralya ve Japonya'dan izole edilen MNR AG 1 ve AG 8 izolatları ile yapılan çalışma sonucunda, aynı coğrafik bölge izolatları arasında dahi yüksek polimorfizm olduğu, farklı coğrafik bölgelerden elde edilen izolatların ise farklı olduğu gösterilmiştir (Duncan ve ark., 1993).

RAPD aynı zamanda MNR izolatlarının hızlı tiplendirmesi için de oldukça kullanışlı bir yöntemdir.

RAPD oldukça kolay bir yöntemdir. Ancak standart reaksiyon koşulları uygulanan farklı laboratuvarlardan elde edilen sonuçlar RAPD şablonlarının oluşturulması ve güvenilirliği bakımından farklı olabilir (Sharon ve ark., 2006).

2.5.4. AFLP (Amplifiye Olmuş Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi)

Amplifiye Olmuş Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), kökeni veya karmaşıklık derecesine bakılmaksızın DNA için yeni ve güçlü bir parmak izi yöntemidir. Toplam genomik DNA'nın kesilmesiyle elde edilen restriksiyon fragmentlerinin PCR ile çoğaltılması esasına dayanır. Tipik olarak 50-100 kadar restriksiyon fragmenti çoğaltılarak denature poliakrilamid jeller üzerinde gözlenir. AFLP çok sayıda lokusun tek bir reaksiyonla görüntülenmesi açısından oldukça kullanışlı bir yöntemdir.

Son zamanlarda AFLP yöntemi sadece Ceresini ve ark. (2002) tarafından Kuzey Carolina'da AG 3 alt gruplarının (PT ve TB) genetik çeşitliliğini değerlendirmek için kullanılmıştır. 32 PT izolatının her biri ayrı AFLP fenotipine sahipken, 36 TB izolatu arasında 28 AFLP fenotipi olduğu belirlenmiştir. Her bir patojenin biyoloji, ekoloji ve epidemiyolojisi hakkında önceki bilgiler esas alınarak TB populasyonlarının PT populasyonlarına göre genetik çeşitliliğinin daha fazla olduğu hipotezi öne sürülmüştür. Ancak bu çalışma, hipotezi reddetmektedir. Çünkü TB izolatları PT izolatlarına göre daha az sayıda AFLP fenotipine ve somatik olarak uyumlu gruba sahiptir.

AFLP markörlerinin dezavantajı ise, allellerin kolay şekilde belirlenememesidir. Allelik fragmentler gerçekte öyle olmamasına rağmen, tahminlerin üzerinde varyasyona izin vereceği için, bağımsız olarak değerlendirilirler.

2.5.5. RFLP (Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi) Analizleri

Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Parmak izi analizleri, funguslarda oldukça yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. RAPD yöntemine göre daha güvenilirdir ancak teknik olarak daha zahmetlidir. RFLP analizleri klonlama gerektirir. Buna ilaveten, her bir izolat için southern blot, prob işaretleme ve nispeten daha büyük miktarlarda DNA gerektirir.

Multilokus RFLP yöntemi homozigot ve heterozigot ayrımı yapılarak izolat genotiplerinin belirlenmesini sağlamaktadır. Tek lokus RFLP analizleri ise *Rhizoctonia* spp. populasyon genetiği çalışmaları için muhtemelen önemli bir yöntem değildir.

2.5.6. AT-rich RFLP (AT' ce zengin bölgelerin RFLP analizleri)

Total DNA'nın HaeIII restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi yöntemidir. Bu enzim çekirdek DNA'sını 1 kb'dan küçük fragmentlere ayırmaktadır. Aslında adenin ve timin bazları yönünden zengin DNA daha az sıklıkta kesilir. Böylece farklı büyüklükte molekül ağırlığına sahip DNA bantları oluşur.

Farklı MNR AG'larına ait izolatlardan farklı AT-DNA RFLP şablonları oluşturulmuştur. Ancak farklı ülkelerden izole edilen AG 1-IA izolatlarında düşük seviyede değişiklik olduğu belirlenmiştir. Başka bir çalışmada ise aynı tarla izolatları sadece bir tip RFLP şablonu oluşturmuş, fakat bunları SSR-PCR'larının (single sequence repeat) farklı olması izolatların bir klon olmadıklarını göstermiştir.

Bu sonuçlara göre AT-rich DNA RFLP, farklı MNR AG'larının çalışılması için uygun bir yöntemdir ancak farklı coğrafik bölgelerden izole edilen izolatlar veya grupların ayrımını yapmak için yeterince duyarlı değildir (Sharon ve ark., 2006).

2.5.7. DNA-DNA Hibridizasyonu

Rhizoctonia solani'nin genom büyüklüğünün yaklaşık olarak 28-46 Mb olduğu tahmin edilmektedir ve tekrarlayan diziler genomda oldukça küçük bir yer kaplar (%8- %17) (Kuninaga, 1996; Sharon ve ark., 2006). Fungusların genomları yüksek bitkilerinkine göre oldukça küçüktür ve bu yüzden DNA hibridizasyon çalışmaları için oldukça uygundur. *R.solani*'de DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları spektrofotometrik veya izotopik analizler kullanılarak 1980'lerin ortalarında yapılmıştır (Kuninaga ve Yokosawa, 1985; Vilgalys, 1988; Sharon ve ark., 2006). Bu yöntem kullanılarak anastomoz gruplamasının *R.solani*'deki genomik DNA benzerliklerinin en iyi göstergesi olabileceği doğrulanmıştır. Aynı anastomoz grubu içindeki DNA benzerliğinin % 80' den büyük, farklı AG' ları arasındaki DNA benzerliğinin ise %30' dan küçük olduğu belirlenmiştir (Carling ve Kuninaga, 1990; Kuninaga, 1996).

Bu yöntemin *R. solani*'deki AG'larının farklı birer biyolojik tür olarak belirlenmesi için uygun bir yöntem olabileceği belirtilmiştir. Ancak anastomoz grupları arasındaki düşük hibridizasyon seviyeleri sebebiyle, AG arasındaki hiyerarşi DNA hibridizasyon değerleriyle çözümlenememektedir.

2.5.8. Ribozomal RNA Genlerinin Analizi

Son yıllarda gen bankalarında saklanan diziler ve mevcut PCR primer setleri kullanımı *Rhizoctonia* spp. ve diğer funguslarla yapılan karşılaştırmalı çalışmaları oldukça kolaylaştırmış ve çalışmalar daha çok rDNA üzerine odaklanmıştır.

2.5.8.1. rDNA RFLP

Bu yöntem PCR ile çoğaltılan rDNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi, elde edilen DNA fragmentlerinin jel elektroforezi yapılarak büyüklüklerine göre ayrılması ve RFLP şablonları ile karşılaştırılması esasına dayanmaktadır (Sharon ve ark., 2006).

Polimeraz zincir reaksiyonu temelli rDNA RFLP, ilk olarak BNR'ların 28S rDNA'sı için kullanılmış (Cubeta ve ark.,1991), sonrasında ise MNR'ların rDNA ITS bölgesine uygulanmıştır Liu ve Sinclair, 1992; Liu ve ark., 1993). Her iki rDNA bölgesi

kullanılarak yapılan RFLP çalışmaları MNR ve BNR'lar için oldukça önemlidir. Bu çalışmalar klasik anastomoz grup kavramını genetik olarak destekler niteliktedir. Ancak, aynı anastomoz grubu içindeki izolatlar tahmin edilenden daha fazla genetik varyasyon göstermektedir. Bu polimorfizm, anastomoz grupları içinde yeni alt gruplar (AG 2-3 ve AG 1-ID oluşturulmasını sağlamıştır (Kanematsu ve Naito, 1995; Prijatmojo ve ark., 2001). Benzer şekilde rDNA-ITS bölgeleri kullanılarak yapılan RFLP analizleri ile BNR AG D iki alt gruba (AG D(I) ve AG D (II)) ayrılmıştır (Toda ve ark., 1999).

ITS bölgesininin RFLP analizleri MNR AG 1 içerisinde en az 6 alt grup, AG 2 içerisinde ise 5 alt grup olduğu öne sürülmüş (Liu ve Sinclair, 1992; 1993), sonraki bir çalışma ile AG 2 içindeki grup sayısı 4 olarak belirlenmiştir. ITS restriksiyon fenotiplerinin karmaşıklığı BNR AG I içinde gösterilmiştir. Sadece bantlanma şablonları temel alınarak AG I içindeki ilişkileri belirlemek hatalı ürün değerlendirilmesine ve sonuçta yanlış tartışmalara neden olabilir (Sharon ve ark., 2006).

28S rDNA RFLP çalışmaları BNR AG (Ba, C, D, F, H, I, J ve K)'larının karakterizasyonunda oldukça etkili olmuştur. Ancak AG J izolatları kanca yapısına sahip olması nedeniyle *Rhizoctonia* spp.' den çıkarılmıştır (Cubeta ve ark., 1991). 28S rDNA RFLP çalışmaları ile, AG A, AG G, AG I, AG J ve AG Q'da restriksiyon şablonlarında grup içi varyasyonlar olduğu gözlenmiştir (Mazzola, 1997; Martin, 2000).

2.5.8.2. rDNA Dizi Analizleri

rDNA dizi analizleri 1990'lı yılların ortalarından itibaren *Rhizoctonia* türlerinin ayırımında kullanılmaya başlanmıştır (Boysen ve ark., 1996; Kuninaga ve ark., 1997; Johanson ve ark., 1998; Salazar ve ark., 1999; 2000; Kuninaga ve ark., 2000a,b; Pope ve Carter, 2001; Carling ve ark., 2002; Toda ve ark., 2004).

Son yıllarda, rDNA dizi analizi yöntemi *Rhizoctonia* türleri arasındaki taksonomik ve filogenetik ilişkilerin anlaşılması için en doğru yol olarak görülmektedir (Sharon ve ark., 2006).

Rhizoctonia solani izolatlarında 5.8S bölgesinde bazı BNR AG izolatlarında varyasyonlar görülse dahi, genel olarak korunmuş olduğu bulunmuştur (Kuninaga, 1997). Diğer taraftan, farklı AG' ları ve alt gruplar arasında ITS1 ve ITS2 bölgelerinin

nükleotit dizileri yüksek ölçüde farklılık göstermektedir (Kuninaga, 1997; Kuninaga, 2002).

R. solani AG'ları arasındaki genetik ilişkiler Kuninaga ve ark. (1997) tarafından kapsamlı olarak çalışılmıştır. ITS dizilerinde %96'dan daha fazla benzerlik yüzdesi aynı AG alt grup içinde olduğunu kanıtlarken, bu oran bir AG içindeki farklı altgruplar için %66-100 ve farklı AG'ları için ise %55-96'dır.

AG 2 oldukça heterojen bir gruptur ve morfoloji, besin ihtiyacı ve hifal anastomoz sıklıkları dikkate alınarak alt gruplara ayrılmıştır. 2-1, 2-2IIIB, 2-2IV, 2-2LP, 2-3, 2-4 ve 2 BI halen AG 2 içerisine dahil edilmektedir (Carling ve ark., 2002). Bu alt gruplandırma ITS dizi analizi verileri ile de uyumludur (Salazar ve ark., 1999, 2000; Carling ve ark., 2002).

Benzer olarak, rDNA ITS dizi analizleri AG 1, AG 3, AG 4 ve AG 6 içindeki alt gruplandırmayı da doğrulamaktadır (Boysen, 1996; Kuninaga ve ark., 1997, 2000; Pope ve Carter, 2001).

AG 6 ve AG 12 mikorizal izolatları ise fonksiyonel benzerliklerine rağmen ağaçta farklı kümelerde bulunmaktadır. Bu AG'ları muhtemelen ayrı evrimsel geçmişlere sahiptir. Ek olarak, Kuzey yarımküreden izole edilen AG 6 izolatlarının Güney yarımküreden izole edilen AG 6 izolatlarından farklı olduğu görülmüştür. Bu da farklı coğrafik bölge izolatlarının gelişiminin bağımsız olduğunu göstermektedir (Sharon ve ark., 2006).

2.6. Filogenetik Değerlendirme

Günümüzde hizalanmış protein ve nükleik asit dizilerinin filogenisini oluşturmak için dört temel yöntem kullanılmaktadır:

- 1- Distance (Neighbour Joining (NJ) ve Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA))
- 2- Maksimum Parsimoni (MP)
- 3- Maksimum (ML)
- 4- Bayesian

Bu yöntemlerin hiçbiri tüm durumlar için en iyi yöntem değildir. Yöntem seçimi, ne öğrenmek istediğinize, veri setinizin büyüklüğüne ve karmaşıklığına bağlı olarak değişmektedir

Ağaç oluşturmada tree-searching ve algoritmik olmak üzere iki temel yaklaşım vardır. Algoritmik yaklaşımda ağaç oluşturmak için bir algoritma kullanılır. Tree-searching yaklaşımı ise, öncelikle çok sayıda ağaç oluşturur ve sonra da bazı kriterler kullanarak en iyi ağaç veya ağaçları belirler (Hall, 2004).

Parsimoniye göre tercih edilen ağaç, oluşan evrimsel değişimin toplam miktarını en aza indirgeyen ağaçtır. En tutumlu ağaçların güvenilirlik dereceleri istatistiksel olarak değerlendirilir. Seç- bağla testi (bootstrapping), bu değerlendirme yaklaşımlarından biridir. Bu testte bilgisayar mevcut veri setinden tekrarlı örnekleme yaparak yeni bir veri seti oluşturur. Test sonucunda bir dal ne kadar çok açığa çıkarsa, bu dalın gerçekten var olduğu konusundaki güvenilirlik artmaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak dünyanın farklı bölgelerinden 36 temsilci izolatu ve daha önceki çalışmalarda Türkiye (Samsun ve Zonguldak)'dan izole edilmiş 9 olmak üzere, 45 multinükleat ve binükleat *Rhizoctonia* izolatları kullanılmıştır. İzolatların kökenleri ve kodları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan *Rhizoctonia* spp. izolatları ve kökenleri

AG	İZOLAT KODU	COĞRAFİ KAYNAK	TANIMLAYAN ARAŞTIRICI
1-IA*	CS-Ka	Japonya	A.Ogoshi
1-IB*	Bakacak2a	Samsun, Türkiye	C.T.Gürkanlı
1-IB	B-19	Japonya	A.Ogoshi
1-IC*	BV-7	Japonya	A.Ogoshi
2-1*	PS-4	Japonya	A.Ogoshi
2-1*	Rhz-104	Samsun, Türkiye	C.T.Gürkanlı
2-2IIIB*	IFO-30943	Japonya	
2-2IIIB	C-96	Japonya	A.Ogoshi
2-2IV*	92155		
2- 2IV	RI- 64	Japonya	A.Ogoshi
2 BI*	ST-2-4		
3*	ST11-6	Japonya	A.Ogoshi
4HGI	Yarbaşı	Samsun, Türkiye	C.T.Gürkanlı
4HGI*	ZGbey62	Zonguldak, Türkiye	M.Ç.Kılıçoğlu
4HGII*	RH-K5	Japonya	A.Ogoshi
4HGII*	Çalman 1(a)	Samsun, Türkiye	C.T.Gürkanlı
5*	GM-10	Japonya	A.Ogoshi
6HGI*	OHT1-1	Japonya	A.Ogoshi
6 GV	NKN2-1	Japonya	A.Ogoshi
7*	HO1556	Japonya	A.Ogoshi
8*	JW-92	Japonya	
9 TX*			
10*			
11*	Roth 26		
12*	Wda	Avustralya	
13*	Hud 2-1	Amerika	
A*	TkTb43	Samsun, Türkiye	C.T.Gürkanlı
A	AlTb19	Samsun, Türkiye	C.T.Gürkanlı
A	TkTb5	Samsun, Türkiye	C.T.Gürkanlı
Ba*	C-484	Japonya	A.Ogoshi
Bb*	C-455	Japonya	A.Ogoshi
Bo*	STR-2	Japonya	A.Ogoshi
C*	AO-1-2		
D*	W-12	Japonya	A.Ogoshi
Fa*	ÇrTb9	Samsun, Türkiye	C.T.Gürkanlı
Fa	P517		
Fb*	OmTb16	Samsun, Türkiye	C.T.Gürkanlı
G*	AH-9	Japonya	A.Ogoshi
H*	STC-9	Japonya	A.Ogoshi
I*	AV-2	Japonya	A.Ogoshi
K*	AC-1	Japonya	A.Ogoshi
O*	FPO-2-24	Japonya	A.Ogoshi
Q*	C-620	Japonya	A.Ogoshi
R*	TC-2		
S*			

*İşaretli izolatlar filogenetik analizlerde kullanılan izolatlardır. Diğer izolatlara ait diziler DNASp V.5 kullanılarak yapılan haplotip sekans analizi sonucunda veri setinden çıkarılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. İzolatların aktifleştirilmesi

3.2.1.1. Kullanılan Besi Ortamları

Tüpte yulaf tohumlarında ve yatık PDA (patates dekstroz agar) kültürlerinde stoklanmış olan *Rhizoctonia* izolatlarının aktifleştirilmesinde asitli su agarı ve hazır PDA (Oxoid) besi ortamları kullanıldı.

Asitleştirilmiş Su Agarının Hazırlanışı

Agar agar (Merck)	20 g
ddH ₂ O	1000 ml
% 10'luk laktik asit çözeltisi	3 ml

Önerilen miktarda agar hassas terazide (Precisa XB220 A) tartılarak toplam hacim 1000 ml olacak şekilde saf suda çözüldü ve 121°C'de 20 dk otoklavda (Nüve OT4060) steril edildi. Sterilizasyon sonrasında besi yerinin sıcaklığı 50°C'ye düşürüldükten sonra laktik asit çözeltisi ilave edildi. Besi yeri steril kabin içerisinde (LN090) petrilere aktarıldı ve düz bir zemin üzerinde soğumaya bırakılarak katılaşmaları sağlandı (Ogoshi ve ark., 1990).

Patates Dekstroz Agar (PDA) Besiyerini Hazırlanışı

Patates Dekstroz Agar (Oxoid)	39 g
ddH ₂ O	1000 ml

Önerilen miktarda PDA hassas terazide (Precisa XB220 A) tartılarak 1 litre saf su içerisinde çözüldü ve 121°C'de 20 dk otoklavda (Nüve OT4060) steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra 50°C'ye kadar soğutulan besiyerleri steril kabin içerisinde (LN090) petrilere aktarıldı ve düz bir zemin üzerinde soğumaya bırakıldı.

3.2.1.2. Stok Kùltürlerin Besi Ortamlarına Aktarılması

Kùltürlerin aktifleştirilmesi için tüp içerisinde yulaf tohumlarından ve yatk PDA' da bulunan önceden hazırlanan ve bir gün bekletilen asitleştirilmiş su agarı ve patates dekstroz agar besi ortamlarına aktarıldı.

3.2.2. DNA İzolasyonu İçin Kuru Misel Elde Edilmesi

İzolatların kuru misellerinin elde edilmesi için öncelikle PDB (patates destroz broth) besiyeri hazırlandı.

Patates Dekstroz Broth (Acumedia)	24 g
ddH ₂ O	1000 ml

Toz haldeki besiyeri 1 litre ddH₂O içinde çözüldü ve her birinde 40 ml hacimde olacak şekilde erlenlere aktarıldı. Erlenler pamuk yardımıyla kapatılıp alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra 121°C'de 20 dakika boyunca otoklavda steril edildi. *Rhizoctonia spp.*'den DNA izolasyonu yapmak için PDA ortamına aktarılıp birkaç gün gelişmeye bırakılan izolatlar daha sonra PDB ortamına aşılandı ve erlenlerin etrafı alüminyum folyo ile sarılarak çalkalayıcılı su banyosunda 7-10 gün süreyle inkübe edildi. (Pascual ve ark., 2000).

Sıvı besiyerinde gelişen mantar miseli steril pens yardımıyla içinde katlanmış halde steril kurutma kağıtları bulunan petriye nakledildi. Bu şekilde üç adet petri kullanılarak mantar miseli kurutma kağıtları arasında iyice kurutuldu. Elde elden mantar miseli steril bir pens yardımıyla steril havan içine transfer edildi. Daha sonra sıvı azot kullanarak toz haline gelinceye kadar ezilen miseller, 1.5 ml'lik steril ependorflarda -50°C'de DNA izolasyonu yapılana kadar saklandı.

3.2.3. DNA İzolasyonu

Kuru misel şeklinde saklanan izolatların DNA izolasyonları Qiagen DNeasy Plant Mini Kit kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyonda, kit için önerilen prosedür optimize edilerek uygulandı.

1- 40 mg. kuru misel hassas terazi kullanılarak tartıldı ve steril havan içerisine yerleştirildi. Üzerine 400 µl ekstraksiyon tamponu (Buffer AP1)

eklenerek tortu kalmayacak şekilde iyice ezildi. Elde edilen karışım ependorfa aktarılarak 4 µl RNase stok solüsyonu ilave edildi ve vortekslendi.

- 2- Karışım 65°C' de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresince 2-3 kez ters yüz edilerek karıştırıldı.
- 3- Karışıma 130 µl tampon AP2 eklendi, vortekslendi ve 5 dk. buz üzerinde bekletildi.
- 4- Karışım 5 dk 14000 rpm' de santrifüjlendi.
- 5- Karışım mikropipet yardımıyla QIAshredder Mini Spin Column içerisine aktarıldı ve 14000 rpm' de 2 dk santrifüj edildi.
- 6- QIAshredder Mini Spin Column'un alt kısmında toplanan supernatant yeni bir ependorfa aktarıldı.
- 7- Hacminin 1.5 katı kadar tampon AP3/E karışıma eklendi ve pipetleme yaparak karıştırıldı..
- 8- Elde edilen çözültiden 650 µl pipetle alınarak DNeasy Spin Column' a aktarıldı.
- 9- 8000 rpm' de 1 dk santrifüjlendi ve altta kalan kısım atıldı.
- 10-Kalan örnekle DNeasy Spin Column'a aktarılarak 8000 rpm' de santrifüj edildi. Altta kalan kısım ve ependorf atıldı.
- 11-DNeasy Spin Column yeni bir ependorfa yerleştirildi. 500 µl tampon AW eklendi ve 8000 rpm' de 1 dk. santrifüjlendi. Altta kalan kısım atıldı.
- 12-500 µl. tampon AW eklendi ve 14000 rpm.' de 2 dk santrifüjlendi.
- 13-Çözelti 14000 rpm' de 1 dk daha santrifüjlendi.
- 14-DNeasy Spin Column yeni bir ependorfa aktarıldı ve DNeasy membranın tam üzerine gelecek şekilde 100 µl tampon AE pipetlendi. 5 dk oda sıcaklığında (15-25°C) inkübe edildi ve sonra 8000 rpm.' de 1 dk. santrifüjlendi.
- 15-Başka bir ependorf kullanılarak 14. adım tekrarlandı. Bu adımda 25 µl tampon AE pipetlendi.

Bu işlemler sonunda her bir izolat için iki ayrı eppendorfta elde edilen DNA örnekleri buzdolabında -20°C' de saklandı.

3.2.4. Agaroz Jel Elektroforez

İzole edilen DNA'ların varlığını doğrulamak için agaroz jel elektroforez (Maxfill HU13, HU6) kullanıldı. Elektroforez işlemi %1'lik agaroz (Ambresco) jel kullanılarak yapıldı. Jel hazırlanırken 10X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) stoktan elde edilen 1X TBE tamponu kullanıldı. Bu işlem için kullanılan çözeltilerin hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

10 X TBE Tampon

Trizma base	108 g
Borikasit (Merck)	55 g
0.5M EDTA (pH:8)	40 ml
ddH ₂ O	1000 ml

Belirtilen kimyasallar hassas terazide tartılarak, toplam hacim 1000 ml olacak şekilde saf suda çözülüp kapaklı cam şişede 121°C'de 20 dk otoklavda steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı (Maniatis ve ark., 1982).

1 X TBE Tampon

10 X TBE tamponu	100 ml
ddH ₂ O	900 ml

1/10 oranında sulandırılan çözelti 1000 ml'lik cam şişe içerisinde oda sıcaklığında muhafaza edildi.

1 g agaroz, 100 ml 1X TBE tamponu içinde berrak bir görüntü elde edinceye kadar mikrodalga fırında ısıtılıp sıcaklık 50°C'ye düşünce taraklı elektroforez tablasına döküldükten sonra, soğumaya bırakıldı. Jel soğuduktan sonra içinde 1X TBE tamponu bulunan elektroforez set içine yerleştirilip taraklar çıkarıldı.

DNA örneklerinin yüklenmesi:

DNA örneği	3 ml
6X yükleme tamponu %0.25 ksilensiyanol %0.25 bromfenol mavisi %40 sükröz)	1 ml
ddH ₂ O	2 ml

olacak şekilde karışım hazırlandıktan sonra bu karışım jeldeki oyuklara yüklenerek 80 voltta 30 dk yürütüldü (Sambrook ve Russell, 2001).

Ethidium Bromide (10 mg/ml stok)

Ethidium Bromide (Sigma)	1 g
ddH ₂ O	100 ml

100 ml'lik kapaklı cam şişe içerisine 1 g ethidium bromide ve 100 ml ddH₂O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda birkaç saat karıştırıldı. Şişenin etrafı alüminyum folyo ile ışığı geçirmeyecek şekilde sarılarak +4°C'de saklandı.

3.2.5. DNA'nın Agaroz Jelde Gözlenmesi

Çeker ocak içine yerleştirilen küvete 500 ml saf su ve 80 µl ethidium bromid ilave edildi. Agaroz jel bu küvet içine yerleştirilerek 20 dk boyandıktan sonra saf suda 10 dk bekletildi ve boyanan DNA bantları görüntüleme sisteminde (Syngene Gene Genius Bio imaging system) fotoğraflandı.

3.2.6. 18S rDNA Bölgesinin Polimeraz ZincirReaksiyonu (PCR)

Multinukleat ve Binukleat *Rhizoctonia* izolatlarından farklı anostomoz gruplarını temsil eden izolatların DNA örneklerinin 18S'i kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için dört primer (NS1, NS3, NS4 ve NS8) kullanıldı (White ve ark., 1990; Liu ve ark., 1995).

Polimeraz zincir reaksiyon işlemleri 0.2 ml'lik PCR tüplerinde Thermal Cycler (Primus 25) da yapıldı. Stok solüsyonlar kontaminasyon riskini azaltmak amacıyla küçük miktarlarda (25-100 µl) steril ependorflara bölünerek kullanılabilecek kadar -20°C'de

saklandı. 18S rDNA bölgesinin çoğaltılması için iki ayrı reaksiyon programı (NS1-NS4 ve NS3-NS8) oluşturuldu.

- dNTP karışımı (her biri 25 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP)
- primer NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC)
- primer NS3 (GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC)
- primer NS4 (CTTCCGTCAATTCCTTTAAG)
- primer NS8 (TCCGCAGGTTACCTACGGA)
- 10X *Taq* tampon (Fermentas)
- MgCl₂ (Fermentas)

buz üzerinde çözüldü ve vortekslendi. Reaksiyon hazırlama süreci buz üzerinde gerçekleştirildi. *Taq* DNA polimeraz (Fermentas) ise enzim ekleme aşamasına kadar -20 °C’ de tutulmaya devam edildi. Bir örnek için PCR reaksiyonunun toplam hacmi 50 µl olacak şekilde belirlendi. PCR reaksiyon karışım Çizelge 3.2’deki gibi hazırlandı.

Çizelge 3.2. PCR reaksiyon karışımı

Çözelti	Reaksiyon Tüpü	Negatif Kontrol
10X PCR tampon	5 µl	5 µl
MgCl ₂ (1.5 mM)	3 µl	3 µl
dNTP karışımı (2.5 mM)	1,5 µl	1,5 µl
Primer 1 (20 pmol)	1,5 µl	1,5 µl
Primer 2 (20 pmol)	1,5 µl	1,5 µl
Kalıp DNA	3 µl	–
ddH ₂ O	34,15 µl	37,15 µl
<i>Taq</i> polimeraz (5U)	0,35 µl	0,35 µl
Toplam hacim	50 µl	50 µl

Master mix hazırlamak için reaksiyonda kullanılacak malzemeler *Taq* DNA polimeraz ve kalıp DNA hariç örnek sayısınca artırılarak 1.5 ml’lik soğutulmuş steril ependorf içerisine buz üzerinde transfer edildi. Hazırlanan master mix vortekslendi ve buz üzerinde bekletilerek her bir PCR tüpüne bu karışımdan 47 µl ilave edildi. Bu

işlemi takiben her bir PCR tüpüne ilgili kalıp DNA ve en son olarak da *Taq* polimeraz eklenerek vortekslendi. Negatif kontrol diğer tüplerden farklı olarak kalıp DNA içermeyecek şekilde hazırlandı. Bu işlemleri takiben hazırlanan PCR tüpleri fazla bekletilmeden PCR programların uygulaması için Thermal cycler'a yerleştirildi. Kullanılan PCR programları Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. NS1-NS4 için PCR programı

95°C	3 dk	⇒Başlangıç denatürasyonu	
94°C	1 dk	DNA denatürasyonu	} 40 döngü
51°C	1 dk	Primerlerin bağlanması	
72°C	2 dk	Uzama ve amplifikasyon	
72°C	5 dk	⇒Son sentez	

Çizelge 3.4. NS3-NS8 için PCR programı

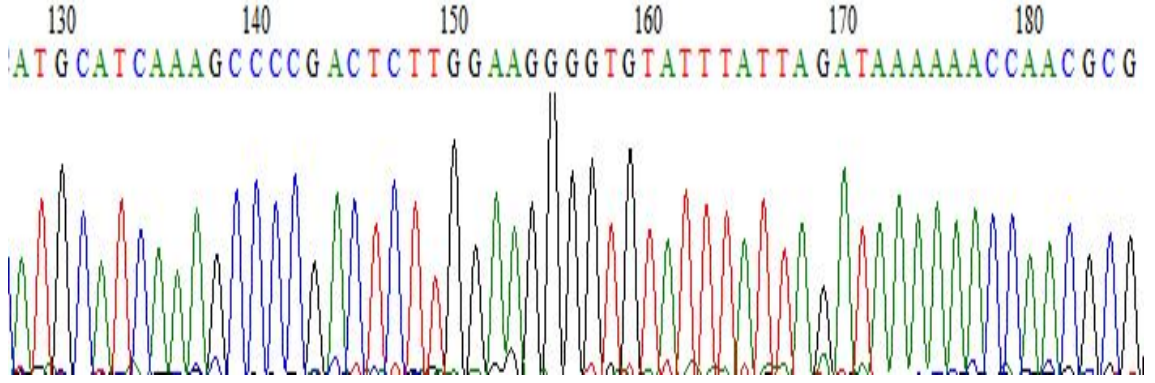
95°C	3 dk	⇒Başlangıç denatürasyonu	
94°C	1 dk	DNA denatürasyonu	} 40 döngü
60°C	1 dk	Primerlerin bağlanması	
72°C	2 dk	Uzama ve amplifikasyon	
72°C	10 dk	⇒Son sentez	

3.2.7. 18S rDNA Dizileme

Rhizoctonia spp. 18S gen bölgesi Primer NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC), primer NS3 (GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC), primer NS4 (CTTCCGTCAATTCCTTTAAG) ve primer NS8 (TCCGCAGGTTACCTACGGA) primerleri kullanılarak Thermal Cycler'da amplifiye edildi. Her bir örneğe ait 3 µl amplifikasyon ürünü %1'lik agaroz jelde (30 ml 1X TBE tampon, 0.3 g agaroz) DNA marker ile birlikte 100 voltta 30 dakika yürütülerek görüntüleme sisteminde ürün varlığı kontrol edildi. 18S rDNA amplifikasyon ürünleri sekans reaksiyonları için Macrogen INC (Korea) firmasına gönderildi. Automatic sequencer 3730XL kullanılarak her bir örnek NS1-NS4 ve NS3-NS8 dört ayrı reaksiyon şeklinde iki yönlü okundu. ABI 1.6.0 analizi sonucu elde edilen ham sekans verileri internet aracılığıyla tarafımıza ulaştırıldı.

3.2.8. 18S rDNA Sekans Verilerinin Analizi

İki yönlü primerler kullanılarak (NS1-NS4, NS3-NS8) elde edilen 18S rDNA ham sekans verileri, ilk olarak Bio Edit 7.0.5.3. (Hall, 1999) programı kullanılarak birleştirildi ve her bir izolata ait bir konsensus sekansı oluşturuldu (Şekil 3.1) Dış grup olarak gen bankasından (NCBI) 18S sekansı temin edilen *R. zae* SW-1 izolatu kullanıldı. Elde edilen diziler dış grupta birlikte Clustal X V.2.0 programına aktararak hizalanma (alignment) işlemi yapıldı ve daha sonra hizalama gözle kontrol edildi (Thompson ve ark., 1997). Hizalanmış sekans verileri DNASp V.5 (Librado ve Rozas, 2009) programı kullanılarak haplotip sekanslar belirlendi ve buna göre veri seti tekrar oluşturuldu.



Şekil 3.1. Sekans diyagramının BioEdit programı ile gözlenmesi

3.2.8.1. Parsimoni (Tutumluluk) Analizi

Hizalanmış dizi verileri PHYLIP V.3.69 (Felsenstein, 2005) programına aktararak parsimoni analizi yapıldı. Bu analiz için dnapars opsiyonu kullanıldı. Ağaç elde etmede ise TreeView (Page, 1996) ağaç çizim programı kullanıldı. Analizler sonucunda olası en kısa ağacın tümünü özetleyen Majority Rule konsensus ağacı elde edildi. Oluşturulan ağaçtaki kladların istatistiksel olarak ne kadar desteklendiğini görmek amacıyla bootstrap (1000 replikasyon) analizi yapıldı. Bootstrap analizi için Phylip V.3.69 paket program içindeki seqboot ve consense opsiyonları kullanıldı. Elde edilen bootstrap değerleri majority rule konsensus ağacı üzerinde gösterildi.

3.2.8.2. Distance (Uzaklık) Analizi

Veri setine en uygun baz değişim modelini (substitution model) belirlemek için, jMODEL TEST V.0.1.1 programı kullanıldı (Posada, 2008). Akaike Information Criterion (AIC) tahmin testi en uygun baz değişim modeli olarak gama doğrulama değeri (G) 0.7040 olan TIM (Transition model) modelini önerdi (Akaike, 1974). Bayesian Information Criterion (BIC) ise gama doğrulama değeri (G) 0.6970 olan TrNef (equal-frequency Tamura-Nei model) modelini önerdi (Schwarz,1978).

Baz değişim modellerinin belirlenmesinden sonra sekans veri seti PAUP* V.4.0b10 (Swofford, 2002) programına aktarılarak TIM ve TrNef baz değişim modelleri ile distance analizi yapıldı. Ağaç üretme tekniği olarak ise Neighbour Joining (NJ) algoritması kullanıldı. NJ ağacındaki soy hatlarının istatistiksel olarak ne kadar desteklendiğini belirlemek amacıyla bootstrap (10000 replikasyon) analizi yapıldı ve bootstrap değerleri NJ ağacı üzerinde gösterildi.

Her iki baz değişim modeli için ayrı ayrı NJ ağaçları elde edildi. Aynı modeller kullanılarak bootstrap analizleri sonucunda en yüksek bootstrap değeriyle desteklenen TIM (G=0.7040) NJ ağacı verildi.

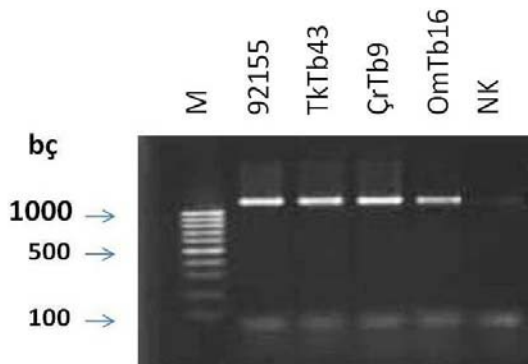
4. BULGULAR

4.1. Genomik DNA İzolasyonu

Multinükleat ve binükleat *Rhizoctonia* izolatlarından Genomik DNA izolasyonunda Qiagen DNeasy Plant Mini Kit kullanılmıştır. Ancak kit prosedürü aynen uygulandığında olumlu sonuç alınamamıştır. Bunun üzerine prosedürde bazı değişiklikler yapılmıştır. Öncelikle 20 mg olarak önerilen misel miktarı 40 mg'a çıkarılmıştır. Fungus hücre duvarının parçalanabilmesi için, örnek ekstraksiyon tamponu (buffer AP1) ile steril havan kullanılarak iyice ezilmiştir. Ayrıca 65°C'deki inkübasyon süresi 10 dk. iken 30 dk'ya çıkarılmıştır. Tüm bu değişiklikler yapıldığında yeterli miktarda DNA elde edilmiştir.

4.2. 18S rDNA Bölgesinin PCR Amplifikasyonu

Rhizoctonia izolatlarının 18S rDNA gen bölgesi NS1-NS4 ve NS3- NS8 primer çiftleri kullanılarak iki ayrı reaksiyon programı ile Thermal Cycler'da çoğaltılmıştır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jel üzerinde 100 voltta 30 dk yürütülmüştür. Elektroforez sonrasında jeller görüntüleme sistemi ile görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilerek kaydedilmiştir (Şekil 4.1). PCR amplifikasyonu sonucunda NS1-NS4 reaksiyonu için 900 bç, NS3- NS8 reaksiyonu için 1100 bç ürün elde edilmiştir.



Şekil 4.1. Bazı izolatlara ait NS3- NS8 PCR reaksiyonu ürünleri
M:Markör NK: Negatif kontrol

18S rDNA bölgesine ait PCR amplifikasyon ürünlerini sekans verileri MacroGen (Kore) firması tarafından ABI 3730XL kullanılarak ABI 1.6.0 analizi ile elde edilmiştir. Her bir PCR ürünü için hedef nükleotit dizisi 4 oligonükleotit primeri NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC), NS4 (CTTCCGTCAATTCCTTTAAG) ve NS3 (GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC), NS8 (TCCGCAGGTTACCTACGGA) kullanılarak iki yönde okunmuştur. Elde edilen dizilerin BioEdit (7.0.5.3) (Hall, 1999) programı kullanılarak konsensus dizileri oluşturulmuş ve her bir örnek için ayrı dosyalara kaydedilmiştir. Elde edilen dosyalar Clustal X (2.0) (Thompson ve ark., 1997) programına aktarılarak hizalanmış (alignment) ve gözle kontrolü yapılmıştır. Şekil 4.2’te AG Fa ÇrTb9 örneğine ait konsensus dizisi fasta formatında gösterilmiştir.

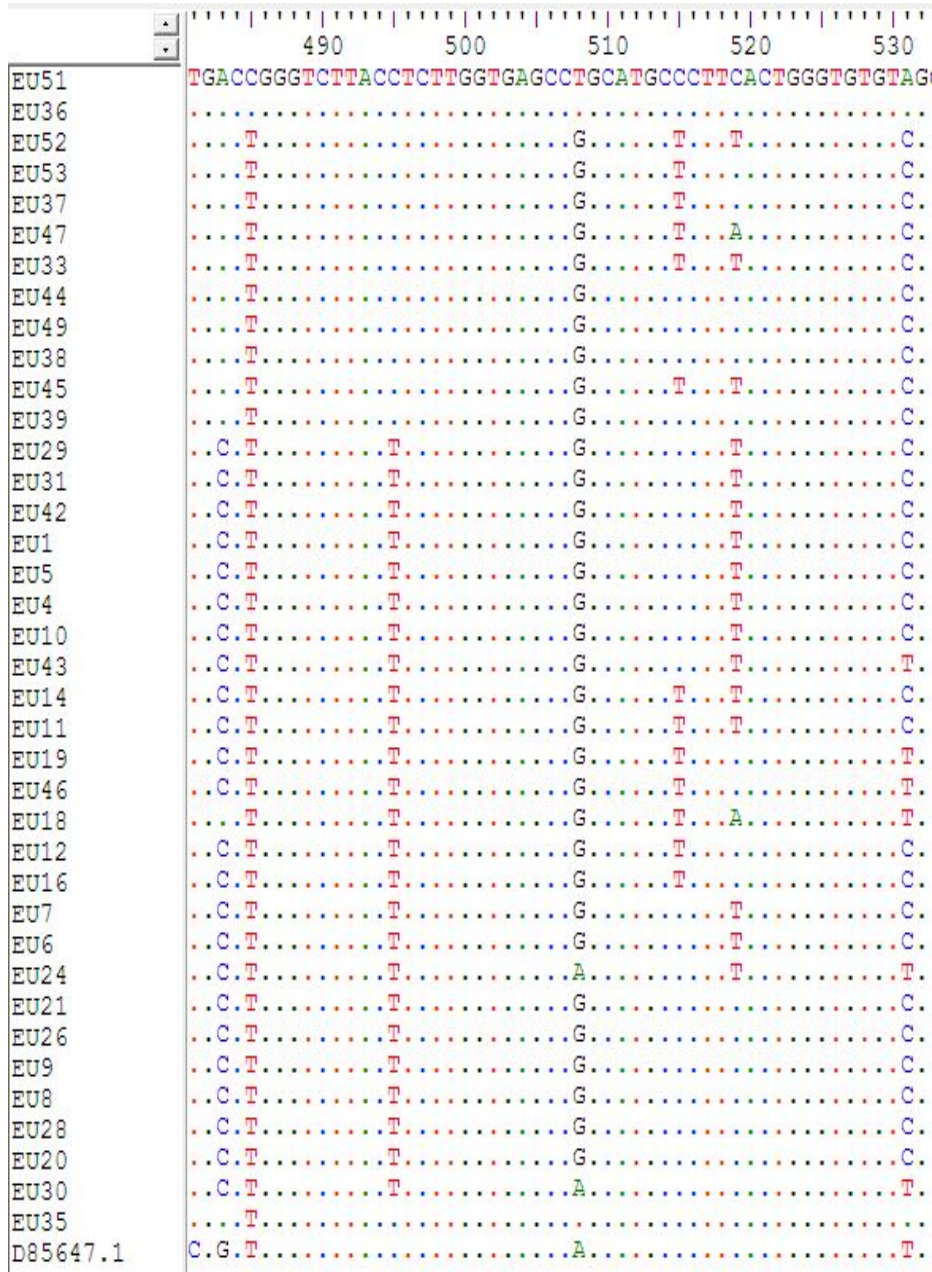
> AG Fa ÇrTb9-18S

```
GAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTATCTTACTACATGGA
TAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCATCAAAGCCCCGACTCTTGGA
GGGTGTATTTATTAGATAAAAAACCAACGCGTTTCGCCGCTCCTTTGGTGAT
TCATAATAACTTCTCGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGCTTCATTCAA
TATCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACATGGTTTCAACG
GGTAACGGGGAATAAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTAC
CACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAG
GTAGTGACAATAAATAACAATATAGGGCTCTTTTGGGTCTTATAATTGGAATG
AGTACAATTTAAATCCCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAA
AAAGCTCGTAGTTGAACTTCAGGCCTGGGCGGCGGTCTGCCTCACGGTATGTA
CTGTCTGCCTGGGTCTTACTTCTTGGTGAGCCGGCATGCCCTTTACTGGGTGT
GTCGGGGAACCAGGACTTTTACCTTGAGAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCT
TATGCCCGAATACATTAGCATGGAATAATAAATAGGACGTGCGGTTCTATTT
TGTGGTTTCTAGAGTCGCCGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAG
TATTCAGTTGCTAGAGGTGAAATTCTTGGATTTACTGAAGACTAACTACTGCG
AAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTATTAAATCAAGAACGAAGGTTAGGGGATCG
AAAACGATCAGATACCGTTGTAGTCTTAACAGTAACTATGCCGACTAGGGAT
CGGGCGATCTCACTTTTATGTGTGCTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCT
TTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTGCAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGG
AAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAA
ACTCACCAGGTCCAGACATAACTAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGA
TTTTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGG
TTAATTCCGATAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATAGTCCGGCCGGCTTT
TGCTGGTCCGAGACTTCTTAGAGGGACTGTCAGCGTCTAGCTGACGGAAGTTT
GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCT
ACACTGACAGAGCCAGCGAGTTCTCACCTTGGCCGGAAGGTCTGGGTAATCTT
GTGAAACTTTGTCTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGA
GGAATTCCTAGTAAGCGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCT
TTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGTCTCCG
GATTGGCTTTGGGGAGCCGGCAACGGCACTCTATTGCTG
```

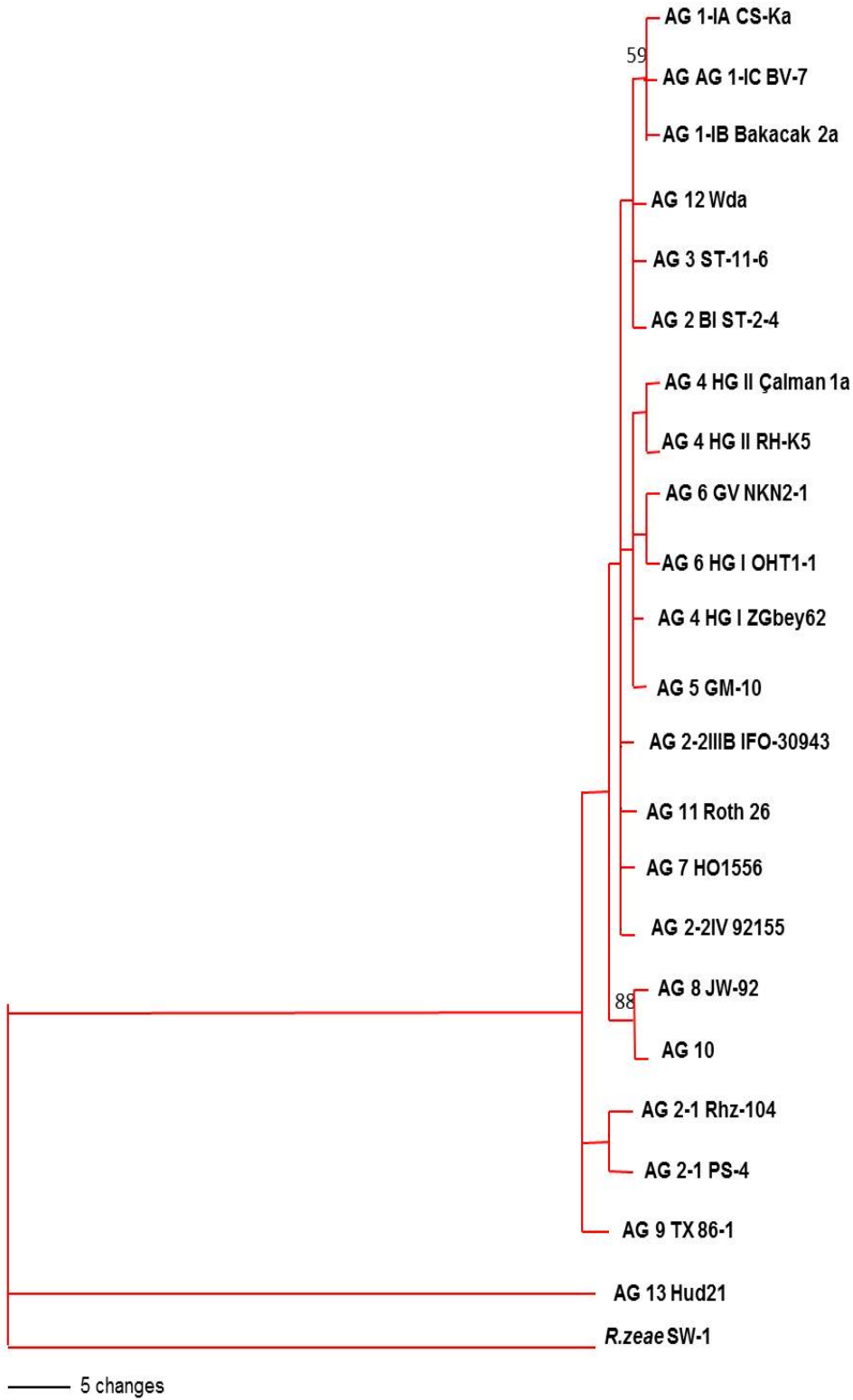
Şekil 4.2. AG Fa ÇrTb9 örneğine ait konsensus dizisi

4.3. Parsimoni Analizi

Multinükleat ve binükleat *Rhizoctonia* izolatlarına ait 18S sekans verileri ile oluşturulan veri seti PHYLIP V.3.69 paket programı ile analiz edilmiştir. Parsimoni analizinde “dnapars” algoritması kullanılmıştır. 18S rDNA veri setinde 1464 karakterden 64 tanesinde baz değişimi gözlenmiş (Şekil 4.3), bunlardan 26 tanesinin parsimonik olduğu saptanmıştır. Maksimum parsimoni ağacı oluşturmada bootstrap analizi (1000) kullanılmıştır. Oluşturulan %50 Majority Rule Konsensus ağaçları Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6’ de verilmektedir.



Şekil 4.3. *Rhizoctonia* spp. izolatlarının 18S rDNA dizisinin polimorfik DNA bölgeleri



Şekil 4.4. Multinükleat *Rhizoctonia* spp. izolatlarına ait 18S rDNA bölgesinin parsimoni analizi sonucu oluşturulan %50 Majority Rule Konsensus soy ağacı. Dallar üzerindeki rakamlar bootstrap değerlerini göstermektedir.

Multinükleat *Rhizoctonia* spp. izolatlarına ait Majority Rule konsensus ağacı (Şekil 4.4) incelendiğinde, MNR'ların iki ana soy hattı oluşturacak şekilde ayrıldığı fakat bu ayrımın istatistiksel olarak desteklenmediği görülmektedir.

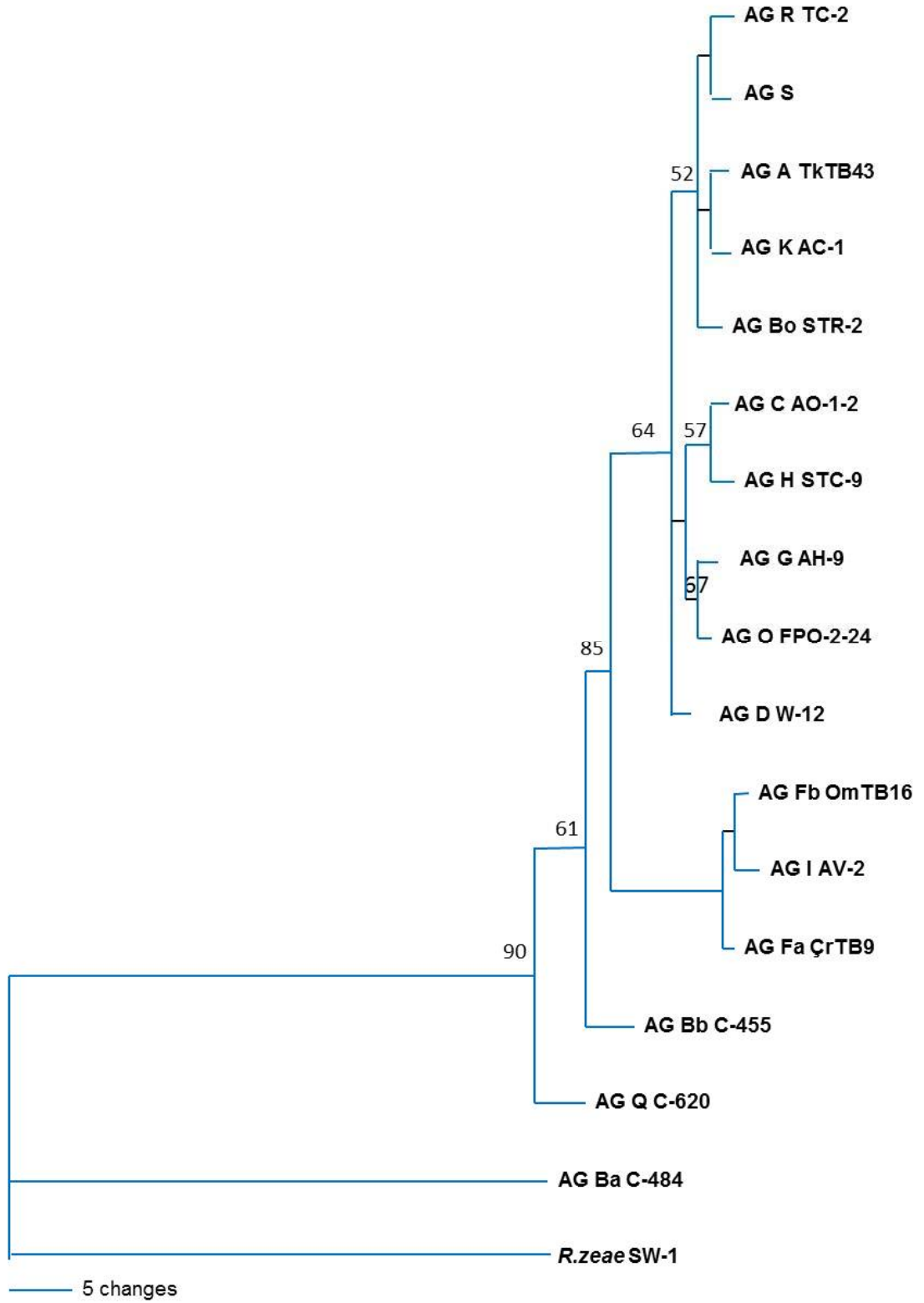
İlk ana soy hattında, AG 1 (1-IA, 1-IB ve 1-IC) izolatlarının %59 bootstrap değeri ile desteklenen bir alt grup oluşturduğu görülmektedir.

AG 2 izolatlarından AG 2-2IIIB ve AG 2-2IV izolatları ilk ana soy hattında bulunurken, AG 2-1 izolatları (Rhz-104 ve PS-4) ikinci ana soy hattında yer almıştır. Köprü izolatı olarak adlandırılan AG 2-BI izolatı ise, ilk soy hattında yer almakta fakat diğer AG 2 izolatları ile birlikte bulunmayıp AG 1, AG 12 ve AG 3 izolatları ile bir alt grup oluşturmaktadır.

İlk soy hattında AG 4, AG 5 ve AG 6 izolatları ikinci bir alt grup oluşturmuş ve bu grup içerisinde AG 4 HG II izolatları ve AG 6 HG I, AG 6 GV izolatları kendi aralarında alt gruplar oluşturmuş, AG 4 HGI ve AG 5 izolatı ise gruba ayrı birer koldan bağlanmışlardır.

AG 2- 2IIIB, AG 11, AG 7 ve AG 2-2IV her iki alt gruba ayrı birer koldan bağlanmışlardır.

İkinci ana soy hattı incelendiğinde ise, AG 8 ve AG 10 izolatlarının %88 bootstrap değeriyle desteklenen bir alt grup oluşturduğu görülmektedir. Bu alt gruba AG 2-1 izolatları (Rhz 104 ve PS-4), AG 9 TX izolatı ve AG 13 izolatı ayrı birer koldan bağlanmışlardır.



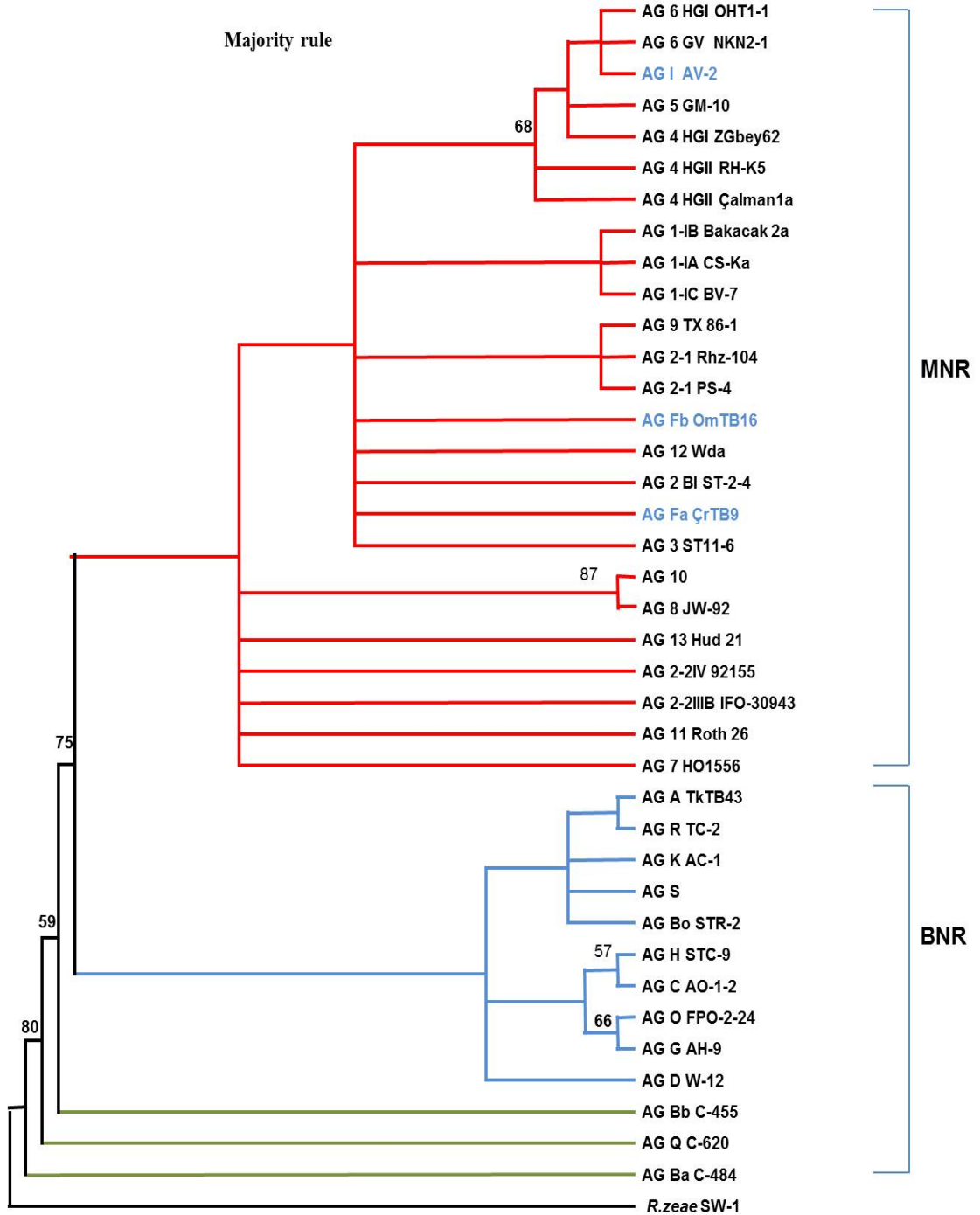
Şekil 4.5. Binükleat *Rhizoctonia* spp. izolatlarına ait 18S rDNA bölgesinin parsimoni analizi sonucu oluşturulan %50 Majority Rule Konsensus soy ağacı. Dallar üzerindeki rakamlar bootstrap değerlerini göstermektedir.

Binükleat *Rhizoctonia* izolatları ile oluşturulan Majority Rule konsensus ağacı (Şekil 4.5) incelendiğinde %85 bootstrap değeri ile desteklenen iki ana soy hattı görülmektedir.

İlk soy hattına bakıldığında, iki alt grup görülmektedir. AG R, AG S, AG A, AG K ve AG Bo aynı grupta yer almaktadır ve bu grup %52 bootstrap değeri ile desteklenmektedir. Diğer alt grupta ise AG C ve AG H %57 bootstrap değeri ile desteklenen küçük bir alt grup oluşturmuştur. AG G ve AG O ise bir diğer küçük alt grupta yer almış ve %67 bootstrap değeri ile desteklenmiştir. AG D ise ana soy hattına %64 bootstrap değeri ile ayrı bir koldan bağlanmıştır.

İkinci ana soy hattına bakıldığında, AG I, AG Fa ve Ag Fb izolatlarının bir alt grup oluşturduğu görülmektedir.

AG Bb izolatı %85 ile desteklenerek her iki soy hattına ayrı bir koldan bağlanmıştır. Diğer iki BNR izolatı AG Q ve AG Ba diğer izolatlara sırasıyla %61 ve %90 değerleri ile desteklenerek ayrı birer koldan bağlanmışlardır.



Şekil 4.6. *Rhizoctonia* spp. izolatlarına ait 18S rDNA bölgesinin parsimoni analizi sonucu oluşturulan %50 Majority Rule Konsensus soy ağacı. Dallar üzerindeki rakamlar bootstrap değerlerini göstermektedir.

Multinükleat ve binükleat *Rhizoctonia* izolatlarının tümü ile oluşturulan %50 Majority Rule konsensus ağacı incelendiğinde (Şekil 4.6) MNR ve BNR izolatlarının ayrılarak %75 bootstrap değeri ile desteklenen iki ana soy hattı oluşturduğu görülmektedir. Ancak bu iki ana soy hattı üzerinde BNR AG I, AG Fa ve AG Fb MNR monofiletik grubu içerisinde yer almaktadır.

MNR soy hattı incelendiğinde, AG 1 izolatlarından AG 1-IA, AG 1B ve AG 1-IC izolatlarının, istatistiki olarak desteklenmese de (%50'nin altında) açık şekilde diğer MNR gruplarından ayrılarak bir alt grupta yer aldığı görülmektedir.

Genetik varyasyonun yüksek olduğu bilinen AG 2 izolatları ise MNR ana kladı içerisinde ayrı bir klad oluşturmayıp, iki farklı alt grup içerisinde yer almıştır. Bu izolatlardan AG 2-1 izolatları PS-4 ve Samsun' dan izole edilmiş olan Rhz 104 izolatları ayrı bir klad içerisinde AG 9 TX izolatı ile birlikte iken, AG 2-IIIB IFO-30943 ve AG 2-2IV 92155 ve AG 2BI ST-2-4 izolatlarının MNR grubuna ayrı birer koldan bağlandığı görülmektedir.

AG 4 izolatları AG 4 HG-I ve AG 4 HG II izolatları MNR içerisinde aynı kladda bulunmaktadır. Grubun yer aldığı klad %65 bootstrap değeri ile desteklenmekte olup, klad içerisinde AG 5 GM 10, AG 6 HGI OHT1-1, AG 6 GV NKN2-1 ve AG I izolatları da yer almaktadır. Ayrıca ağaç incelendiğinde AG 6 HGI OHT1-1, AG 6 GV NKN2-1 ve AG I izolatlarının bir alt klad oluşturduğu görülmektedir.

AG 8 JW-92 ve AG 10, %87 bootstrap değeri ile MNR ana kladı içerisinde bir alt klad oluşturmuştur.

AG 12 Wda, AG Fa ÇrTB9, AG Fb OmTB16, AG BI ST-2-4, AG 3 ST11-6, AG 13 Hud21, AG 11 ve AG 7 izolatları MNR ana soy hattı içerisinde yer almakta ve alt gruplar oluşturmaksızın ayrı birer koldan bağlanmaktadır.

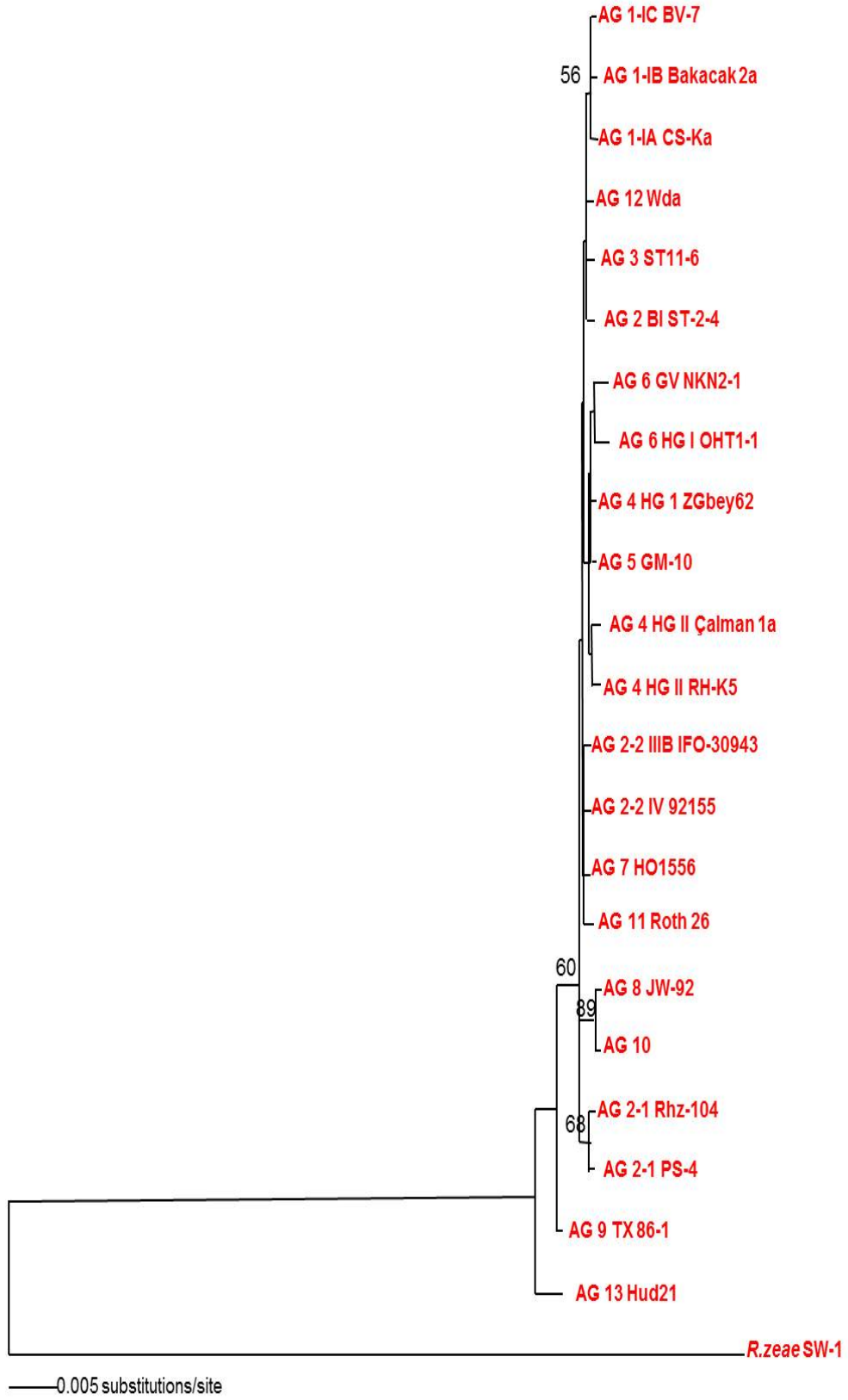
%50 Majority Rule konsensus ağacı BNR ana soy hattı incelendiğinde Samsun' dan izole edilen AG A TkTB43 ve AG R TC-2 izolatlarının ayrı bir alt klad oluşturduğu görülmektedir. Bu alt klada ise AG K AC-1, AG S ve AG Bo STR 2 ayrı birer koldan bağlanmaktadır.

AG H STC-9 ve AG C AO-1-2 izolatları ana klad içerisinde % 57 bootstrap değeri ile desteklenen bir alt klad oluşturmuştur. AG O FPO-2-24 ve AG G AH-9 izolatları %66 bootstrap değeri ile desteklenen bir alt klad oluşturmaktadır. Oluşan bu iki alt klada AG D W-12 izolatı da ayrı bir koldan bağlanmıştır.

AG Bb C-455 izolatu %75 bootstrap değeri ile desteklenen BNR ana kladına ayrı bir koldan bağlanmaktadır. Diğer BNR izolatları AG Q C-620 % 59 bootstrap değeri ile ve AG Ba C- 484 izolatu ise % 80 bootstrap değeri ile desteklenerek BNR ana kladına ayrı birer koldan bağlanmışlardır.

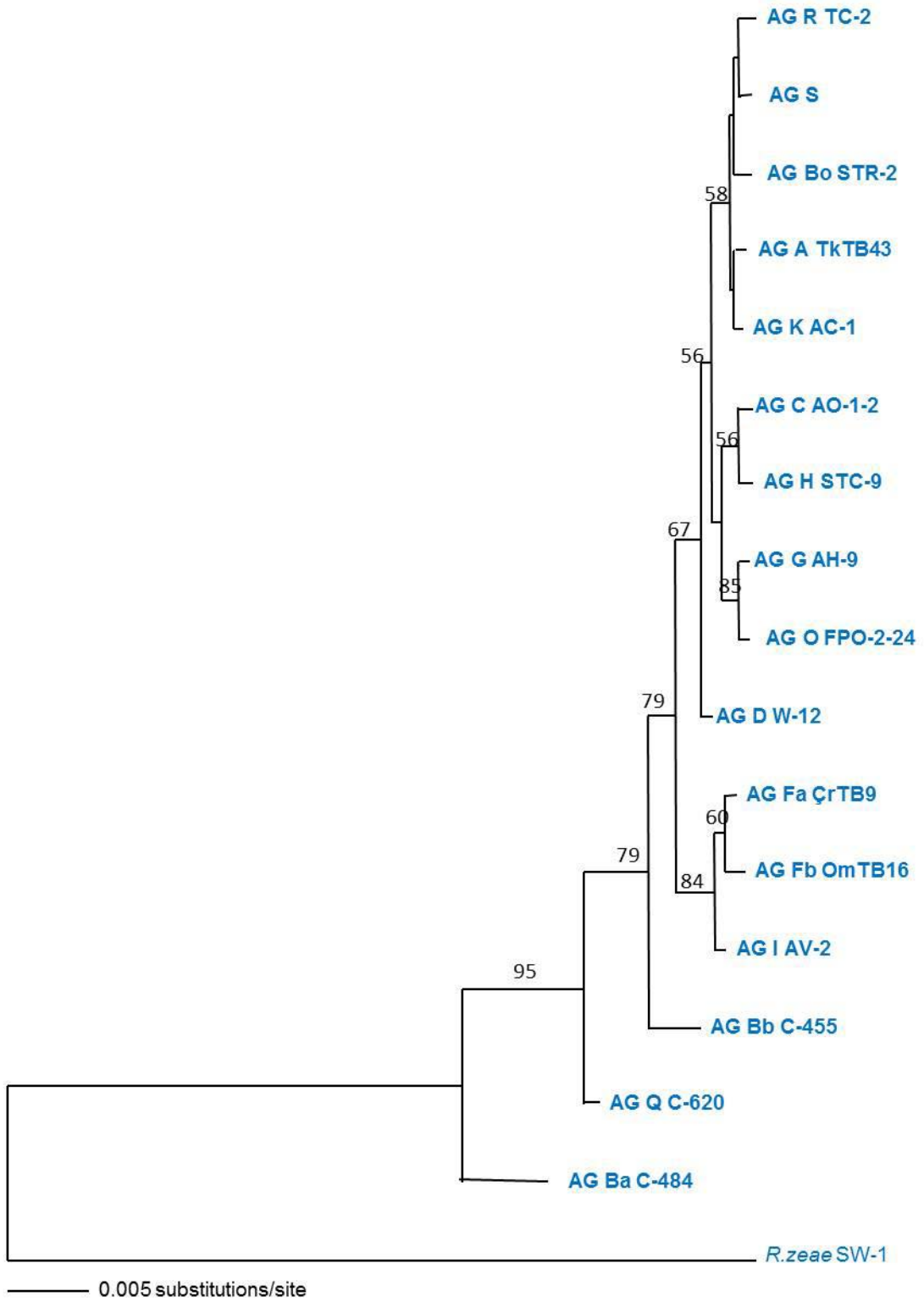
4.4. Distance (Uzaklık) Analizi

jMODEL TEST V.0.0.1 (Posada, 2008) programı ile Akaike Information Criterion (AIC) ve Bayesian Information Criterion (BIC) tahmin testleri kullanılarak model test analizi yapılmıştır. TIM ve TrNef baz değişim modelleri ayrı ayrı kullanılarak Neighbour Joining ağaçları elde edilmiştir. Aynı modellerin kullanılmasıyla bootstrap ağaçları oluşturulmuş ve bunlardan en yüksek bootstrap değerlerine sahip olan (TIM G= 0.7040) NJ ağaçları Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9' da verilmiştir.



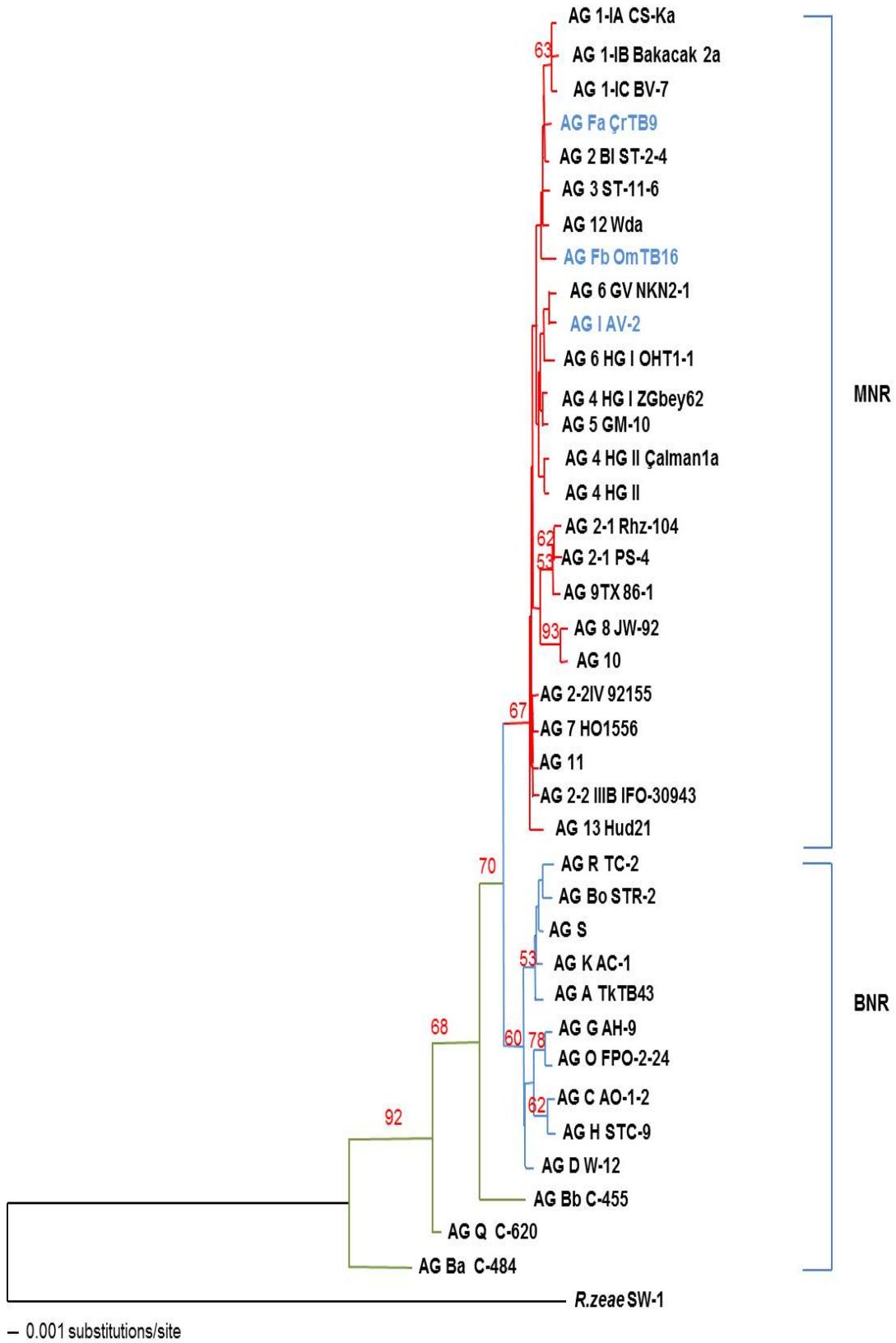
Şekil 4.7. Multinükleat *Rhizoctonia* spp. izolatlarına ait 18S rDNA bölgesinin kullanılması sonucu oluşan Neighbour Joining soy ağacı. Dallar üzerindeki rakamlar bootstrap değerlerini göstermektedir.

Multinükleat *Rhizoctonia* izolatları ile oluşturulan Neighbour Joining soy ağacı (Şekil 4.7) Majority Rule konsensus ağacı ile bire bir örtüşmektedir. Ağaçların istatistiksel değerlendirmeleri de oldukça yakın değerler vermiştir.



Şekil 4.8. Binükleat *Rhizoctonia* spp. izolatlarına ait 18S rDNA bölgesinin kullanılması sonucu oluşan Neighbour Joining soy ağacı. Dallar üzerindeki rakamlar bootstrap değerlerini göstermektedir.

Binükleat *Rhizoctonia* izolatları ile oluşturulan Neighbour Joining soy ağacı (Şekil 4.8) incelendiğinde, dallar üzerindeki bootstrap değerlerinde küçük farklılıklar gözlenmekle beraber Majority Rule konsensus ağacı ile topolojik olarak aynı olduğu görülmektedir.



Şekil 4.9. *Rhizoctonia* spp. izolatlarına ait 18S rDNA bölgesinin kullanılması sonucu oluşan Neighbour Joining soy ağacı. Dallar üzerindeki rakamlar bootstrap değerlerini göstermektedir.

Multinükleat ve binükleat *Rhizoctonia* izolatlarının tümü ile oluşturulan NJ ağacı incelendiğinde (Şekil 4.9), MNR ve BNR izolatları ayrılarak iki ana soy hattı oluşturduğu görülmektedir. Ancak bu iki ana soy hattı üzerinde BNR AG I, AG Fa ve AG Fb MNR monofiletik grubu içerisinde yer almaktadır. Bu sonuçlar parsimoni analizi sonucu elde edilen Majority Rule konsensus ağacını desteklemektedir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, multinükleat ve binükleat *Rhizoctonia* spp. izolatlarının 18S rDNA bölgelerinin dizi analizleri yapılmış ve filogenetik olarak değerlendirilmiştir. Filogenetik değerlendirme yapılırken Neighbour Joining ve Maksimum Parsimoni algoritmaları kullanılmıştır.

Rhizoctonia spp.'nin karakterizasyonunda genellikle misel rengi, hif çapı, çekirdek sayısı, hücre uzunluğu, monilioid hücrelerin büyüklüğü ve sklerot çapı gibi morfolojik karakterler kullanılmıştır. Ancak, bu özellikler sıcaklık, ışık ve besin içeriği gibi faktörlerin etkisiyle büyük ölçüde değişkenlik gösterir (Andersen, 1990; Stalpers ve Andersen, 1996). *Thanatephorus* ve *Ceratobasidium* izolatlarının birçoğu besiyerinde geliştirildiğinde benzer görünümde dirler ve hatta yakın ilişkili olmayan izolatlar arasında hifal birleşmeler gözlenmektedir (Ogoshi, 1987).

Bunun yanısıra, vejetatif hücrelerdeki çekirdek sayısı da nadiren kesin sonuç vermektedir. Örneğin, *Thanatephorus* (anamorf: *R. solani*) izolatlarının multinükleat olduğu bilinmektedir (González ve ark., 2006; Parmeter ve Whitney, 1970'den) fakat çekirdek durumu değişkendir, tek bir suşun hücreleri oldukça farklı çekirdek sayılarına sahiptir (örn. 2-18) (González ve ark., 2006; Tu ve ark., 1977'den). *Ceratobasidium* (anamorf: *Rhizoctonia* spp.) hücreleri genellikle binükleattır (González ve ark., 2006; Burpee ve ark., 1980'den) fakat *C. koleroga*'nın multinükleat olduğu bildirilmiştir (Stalpers ve Andersen, 1996).

Günümüzde, rDNA dizi analizi yöntemi *Rhizoctonia* türleri arasındaki taksonomik ve filogenetik ilişkilerin anlaşılması için en doğru yol olarak görülmektedir (Sharon ve ark., 2006).

González ve ark. tarafından 2006'da yapılan çalışmada, multinükleat ve binükleat *Rhizoctonia* izolatlarının ITS, 28S ve β -tubulin gen bölgesinin dizi analizi yapılmış ve filogenetik olarak değerlendirilmiştir. Filogenetik değerlendirme sonucu elde edilen ağaçlarda 26 *Rhizoctonia solani* izolatu (AG 1-11) ve altı BNR (CAG-3, CAG-4, CAG-5, CAG-6, CAG-7 ve AG F) aynı kladda yer almaktadır.

Bu çalışmanın sonucu González ve ark. (2001)'nin daha önce öne sürdüğü *R. solani* ve binükleat *Rhizoctonia*'ların monofiletik birer grup olmadığı fikrini doğrulamaktadır. Bu sonuç aynı zamanda septal por incelemesi, teleomorfik karakterler ve dizi verileri sonucunda önerilen, bazı binükleatların multinükleat izolatlara daha

yakın ilişkili olabileceği fikrini de desteklemektedir (Andersen, 1996; González ve ark., 2001; Moore, 1996; Müller ve ark., 1998). Elde edilen dizi analizleri, çekirdek durumları ve hifal anastomoz reaksiyonları da dikkate alındığında *Ceratobasidium* içerisine dahil edilen bazı izolatların *Thanatephorus*'a dahil edilmesinin daha iyi olabileceği önerilmiştir (González ve ark.,2006).

Sharon ve ark. (2007)'nın çilekten izole ettikleri AG A, AG G, AG F, AG 4 HGI ve AG HG III *Rhizoctonia* izolatları ile rDNA-ITS dizi analizi çalışmaları sonucunda BNR AG F izolatlarının MNR AG 4 izolatları ile daha yakın ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. AG F izolatları ile AG 4 izolatları arasındaki dizi benzerliği %86- %91' dir. Oysaki AG F izolatları BNR AG A, B, G, I ve K ile nispeten daha düşük benzerliğe (%79-83) sahiptir. Bu sonuç BNR AG F izolatının MNR AG 4'e diğer BNR izolatlarından daha yakın olduğunu göstermiştir.

González ve ark. (2001)'nin bildirdiğine göre Yokoyama ve Ogoshi (1986) yaptıkları çalışmada *Ceratobasidium* AG F izolatının *Thanatephorus* AG 6 izolatı ile hifal anastomoz yaptığını ve bu iki grubun genetik olarak yakın ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir.

Sharon ve ark. (2008)'nin rDNA-ITS dizi analizleri ile oluşturdukları Neighbour Joining ağacı sonuçlarına göre BNR AG'ları 6 ayrı grupta yer almaktadır. Bu gruplar şu şekildedir:

- 1- AG A ve AG K
- 2- AG G, AG L ve AG Q
- 3- AG E, AG F, AG P, AG R ve AG S
- 4- AG D (üç alt grup içermektedir)
- 5- AG B(üç alt grup içermektedir) ve Ag Q
- 6- AG C, AG H ve AG I

rDNA ITS bölgesi kullanılarak yapılan RFLP çalışmaları özellikle *R. solani*'de AG'ları ve alt gruplar arasında önemli ölçüde varyasyon olduğunu göstermiştir (Kanematsu ve Naito, 1995; Prijatmojo ve ark., 2001). Pannecouque ve Höfte (2009)'nin *R. solani* AG 2-1 izolatları ile yaptıkları çalışma bu polimorfizmi oldukça belirgin şekilde ortaya koymuştur. AG 2'nin oldukça heterojen bir grup olduğu bilinmektedir. Fakat alt grupları arasındaki polimorfizm tahmin edilenden çok daha fazladır.

Multinükleat ve binükleat *Rhizoctonia* izolatlarının 18S dizi analizi verileri ile oluşturulan %50 Majority Rule konsensus ve Neighbour Joining ağacı incelendiğinde MNR ve BNR izolatlarının iki ana soy hattı oluşturduğu görülmektedir. Ancak bu iki ana soy hattı üzerinde BNR AG I, AG Fa ve AG Fb MNR monofiletik grubu içerisinde yer almaktadır.

Multinükleat *Rhizoctonia* soy hattı incelendiğinde, AG 1 izolatlarından AG 1-IA, AG 1B ve AG 1- IC izolatlarının açık şekilde diğer MNR gruplarından ayrılarak bir alt grupta yer aldığı görülmektedir. AG1 hifal anastomoz reaksiyonları ile alt grup ayrımı yapmak mümkün değildir (Sneh ve ark., 1991). Bu sonuçlar AG 1'in monofiletik bir grup olduğunu fikrini desteklemektedir.

Genetik varyasyonun yüksek olduğu bilinen AG 2 izolatları ise MNR ana kladı içerisinde ayrı bir klad oluşturmayıp, iki farklı alt grup içerisinde yer almıştır. Bu izolatlardan AG 2-1 izolatları PS-4 ve Samsun' dan izole edilmiş olan Rhz 104 izolatları ayrı bir klad içerisinde AG 9 TX 86-1 izolatı ile birlikte iken, AG 2-2IIIB IFO-30943 ve AG 2-2IV 92155 ve AG 2 BI ST-2-4 izolatlarının MNR grubuna ayrı birer koldan bağlandığı görülmektedir.

AG 4 izolatları AG 4 HG-I ve AG 4 HG II izolatları MNR içerisinde aynı kladda bulunmaktadır. Grubun yer aldığı klad içerisinde AG 5 GM 10, AG 6 HGI OHT1-1, AG 6 GV NKN2-1 ve AG I AV-2 izolatları da yer almaktadır. Ayrıca ağaçlar incelendiğinde AG 6 HGI OHT1-1, AG 6 GV NKN2-1 ve AG I AV-2 izolatlarının bir alt klad oluşturduğu görülmektedir. AG 4 ve AG 6 izolatlarından genetik olarak birbiriyle yakın ilişkili olduğu bilinmektedir (González, 2001) ancak BNR AG I AV-2 izolatının MNR kladı içerisinde yer alması oldukça ilginç bir sonuçtur.

AG 8 JW-92 ve AG 10, MNR ana kladı içerisinde bir alt klad oluşturmuştur.

AG 12 Wda, AG Fa ÇrTB9, AG Fb OmTB16, AG 2 BI ST-2-4, AG 3 ST11-6, AG 13 Hud21, AG 11 ve AG 7 HO1556 izolatları MNR ana soy hattı içerisinde yer almakta ve alt gruplar oluşturmaksızın ayrı birer koldan bağlanmaktadır.

Her iki AG F izolatının da MNR soy hattında yer alması González ve ark. (2006) ve Sharon ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmaları doğrulamaktadır.

Binükleat *Rhizoctonia* ana soy hattı incelendiğinde Samsun'dan izole edilen AG A TkTB43 ve AG R TC-2 izolatlarının ayrı bir alt klad oluşturduğu görülmektedir. Bu alt klada ise AG K AC-1, AG S ve AG Bo STR 2 ayrı birer koldan bağlanmaktadır.

AG H STC-9 ve AG C AO-1-2 izolatlari ana klad içerisinde bir alt grup oluşturmuştur. AG O FPO-2-24 ve AG G AH-9 izolatlari ise başka bir alt grup oluşturmaktadır. Oluşan bu iki alt gruba AG D W-12 izolati da ayrı bir koldan bağlanmiştır.

AG Bb C-455 izolati BNR ana kladına ayrı bir koldan bağlanmaktadır. Diğer BNR izolatlari AG Q C-620 ve AG Ba C- 484 izolati ise BNR ana kladına ayrı birer koldan bağlanmişlardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, multinükleat ve binükleat *Rhizoctonia* spp. izolatlarının 18S rDNA bölgelerinin moleküler dizi analizleri yapılarak anastomoz grupları ve altgruplar arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

- 18S rDNA gen bölgesi evrimsel olarak korunmuş bir bölge olduğu için *Rhizoctonia* grubu fungusların filogenisi için önemli bir kaynaktır. Bu gen bölgesinin tüm *Rhizoctonia* spp. anastomoz grupları için veri bankalarına kazandırılması da biyolog ve bitki patoloğları için oldukça kullanışlı olacak ve diğer çalışmalara hız kazandıracak bir bilgi kaynağıdır.
- *Rhizoctonia* form cinsi genç hücrelerdeki çekirdek sayılarına bakılarak multinükleat, binükleat ve uninükleat olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Filogenetik analizler sonucunda elde edilen ağaçlar, topolojik olarak küçük farklılıklar göstermekle birlikte oldukça uyumludur. Neighbour Joining ve Maksimum Parsimoni algoritmaları kullanılarak oluşturulan ağaçlarda, multinükleat ve binükleat *Rhizoctonia* izolatlarının belirgin şekilde iki ana soy hattı üzerinde bulunduğunu doğrulamaktadır (Şekil 4.6 ve Şekil 4.9).
- Binükleat AG Fa, Ag Fb ve AG I izolatlarının ise MNR soy hattında bulunması ise çarpıcı bir sonuçtur. Bu sonuç daha önce öne sürülen bazı BNR izolatlarının MNR'larla daha yakın ilişkili olduğu fikrini desteklemektedir (Yokoyama ve Ogoshi, 1986; González ve ark., 2001, 2006; Sharon ve ark., 2007).
- *Rhizoctonia* 18S rDNA gen bölgesi dizi analizi sonuçları geleneksel anastomoz grubu kavramını ve anastomoz grubu sınıflandırmasını büyük ölçüde desteklemektedir. Ancak, aynı anastomoz grubu içinde izolatlar arasındaki genetik varyasyonun tahmin edilenden daha fazla olduğu, hatta aynı anastomoz grubu içinde yer alan bazı izolatların (örn. AG 2) oluşturulan filogenetik ağaçlarda farklı kladlarda yer aldığı görülmektedir.

- Daha önceki rDNA RFLP çalışmaları da belirli anastomoz gruplarının monofiletik olmadığını göstermiştir. Anastomoz grupları içinde görülen bu genetik varyasyon nedeniyle, yeni alt gruplar tanımlanmaya devam etmektedir (Kanematsu ve Naito, 1995; Prijatmojo ve ark., 2001; Pannecoucque ve Höfte, 2009).
- 18S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre *Rhizoctonia* spp. anastomoz grupları ve alt gruplar arasındaki genetik varyasyon oldukça fazladır. Elde edilen veriler, tüm alt gruplar ile farklı gen bölgelerinin birlikte değerlendirileceği bir çalışma ile desteklenecektir.

7. KAYNAKLAR

- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Automat Contr*, 19, 716-723.
- Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Faloya, V., Steinberg, C., 2010. Biotic changes in relation to local decrease in soil conduciveness to disease caused by *Rhizoctonia solani*. *European Journal of Pathology*, 126, 29-41.
- Andersen, T.F., 1990. A study of hyphal morphology in the form genus *Rhizoctonia*. *Mycotaxon*, 37, 25-46.
- Andersen, T.F., 1996. A comparative taxonomic study of *Rhizoctonia* sensu lato employing morphological, ultrastructural and molecular methods. *Mycological Research*, 100, 1117-1128.
- Baiswar, P., Rosa, D.D., Chandra, S., Ngachan, S.V., 2010. *Rhizoctonia solani* AG groups in northeast India. *Australian Plant Disease Notes*, 5, 85-86.
- Barnet, H.L., Hunter, B.B., 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, APS Press, The American Phytopathological Society, 218s, Minnesota, USA.
- Bounou, S., Jabaji- Hare, S.H., Hogue, R., Charest, P.M., 1999. Polymerase chain reaction-based assay for specific detection of *Rhizoctonia solani* AG 3 isolates. *Mycological Research*, 103, 1-8.
- Boysen, M., Borja, M., del Moral, C., Salazar, O., Rubio, V., 1996. Identification at strain level of *Rhizoctonia solani* AG 4 isolates by direct sequence of asymmetric PCR products of the ITS regions. *Current Genetics*, 29, 174-181.
- Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A., Elander, R.P., 1998. *Application of PCR in Mycology*, Cab International , s.358., New York.
- Carling, D.E., Kuninaga, S., 1990. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn: Inter- and intra group relatedness of anastomosis group-9. *Phytopathology*, 80, 1362-1364.
- Carling, D.E., Summer, D.R., 1992. *Rhizoctonia. Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. (Editörler Singleton L.L., Mihail, J.D., Rush, C.M.) APS Press., S:157-165, St. Paul Minnesota.
- Carling, D.E., Rotrock, C.S., MacNish, G.C., Sweetingham, M.W., Brainard, K.A., Winters, S.W., 1994. Characterization of anastomosis group 11 (AG 11) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 84, 1387-1393.
- Carling, D.E., 1996. Grouping in *Rhizoctonia solani* by the anastomosis reaction. In: *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and*

Disease Control.(Editörler Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., Dijst, G.) Kluwer Academic Publishers, s.37-47, Dordrech.

- Carling, D.E., Pope, E.J., Brainard, K.A., Carter, D.A., 1999. Characterization of mycorrhizal isolates of *Rhizoctonia solani* form an Orchid, Including AG-12, a new anastomosis group. *Phytopathology*, 89, 942-946.
- Carling, D.E., Kuninaga, S., Brainard, K.A., 2001. Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequence, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group- 2 (AG-2) and AG BI. *Phytopathology*, 92, 43-50.
- Carling, D.E., Baird, R.E., Gitaitis, R.D., Brainard, K.A., Kuninaga, S., 2002. Characterization of AG- 13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*, *Phytopathology* 92:893-899.
- Ceresini, P.C., Shew, H.D., Vilgalys, R.J., Cubeta, M.A., 2002. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco in North Carolina. *Mycologia*, 94(3), 437-449.
- Chakraborty, S., Tiedemann, A.V., Teng, P.S., 2000. Climate change: potential impact on plant diseases. *Environmental Pollution* 108,317-326.
- Cubeta, M.A., Echandi, E., Abernety, T., Vilgalys, R., 1991. Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* species using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA gene. *Phytopathology*, 81, 1395-1400.
- Cubeta, M.A., Vilgalys, R., González, D., 1996. Molecular analysis of ribosomal RNA genes in *Rhizoctonia* fungi. In:*Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control (Editörler Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., Dijst, G.) Kluwer Academic Publishers, s.81-86, Dordrech.
- Çebi Kılıçoğlu, M., Özkoç, İ., 2008. Fungal sistematikteki moleküler gelişmeler. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23(1), 65-72.
- Çebi Kılıçoğlu, M., 2009. Karadeniz Sahil Şeridinde Fasulye Bitkisi ve Rizosfer Bölgesinden İzole Edilen Multinükleat *Rhizoctonia* spp.'nin Genetik Çeşitliliğinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 126 s.
- Damaj, M., Jabaji-Hare, S.H., Charest, P.M., 1993. Isozyme variation and genetic relatedness in binucleate *Rhizoctonia* species. *Phytopathology*, 83, 864-871.
- Demirci, E., Döken, M.D., 1991. Erzurum ve yöresinde patatesten izole edilen *Rhizoctonia solani* Kühn'nin anastomoz gruplarının kültürel ve morfolojik özellikleri. Türkiye VI. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 7-11 Ekim 1991. İzmir, Turkey, Türkiye Fitopatoloji Derneği Yayınları, 6, 97-100.

- Demirci, E., Döken, M.D., 1995. Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn and binucleate *Rhizoctonia* isolates from various crops in Turkey, J. Turk. Phytopathol, 24, 57-62.
- Demirci, E., 1998. *Rhizoctonia* species and anastomosis groups isolated from barley and wheat in Erzurum, Turkey. Plant Pathology, 47,10-15.
- Demirci, E., Eken, C., Zengin, H., 2002. First report of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* from Johnson grass in Turkey, Plant Pathology, 51, 391.
- Dolipor septum yapısı. Pictorial supplement to *The Fifth Kingdom* <http://www.mycolog.com/chapter5a.htm> (19.06.2011)
- Duncan, S., Barton, J.E., O'Brien P.A., 1993. Analysis of variation in isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA assay. Mycological Research, 97, 1075-1082.
- Eken, C., Demirci, E., 2003. Identification and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* anastomosis groups isolated from forage legums in Erzurum, Turkey. Phytoparasitica, 31, 1-5.
- Eken, C., Demirci, E., 2004. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* isolates from bean in Erzurum, Turkey. Journal of Plant Pathology, 86, 49-52.
- Erper, I, Karaca, G.H., Ozkoc, I., 2002. Characterization of *Rhizoctonia* species causing root- rot of cucumber plants grown in greenhouses in Samsun, Turkey. ACTA Horti, 579, 531-534.
- Felsenstein, J. 2005. Using the quantitative genetic threshold model for inferences between and within species. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, series B, 360, 1427-1434.
- Garcia, V.G., Portal Onco M.A., Rubio Susan V., 2006. Review, biology and systematic of the form genus *Rhizoctonia*. Spanish Journal of Agricultural Research, 4(1), 55-79.
- Global warming/climate change: Effects on pests and diseases of potato and other crops. www.inia.cl/medios/remehue/noticias/Gary.pdf (12.06.2011)
- González, D., Carling, D.E., Kuninaga, S., Vilgays, R., Cubeta, M.A., 2001. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. Mycologia, 93(6), 1138- 1150.
- González, D., Cubeta, M.A., Vilgalys, R., 2006. Phylogenetic utility of indels within ribosomal DNA and – tubulin sequences from fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex. Molecular Phylogenetics and Evolution, 40, 459-470.

- Gürkanlı, C.T., 2005. Samsun İlinde Yetiştirilen Tütün (*Nicotiana tabacum L.*) Bitkisinden İzole Edilen *Rhizoctonia* Grubu Fungusların Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 150 s.
- Gürkanlı, C.T., Özkoç, İ., Gündüz, İ., 2009. Molecular and conventional identification and pathogeneticity of *Rhizoctonia solani* isolates from tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) in Samsun, Turkey. *Journal of Phytopathology*, 157:686-696.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/ 98/ NT. *Nuc. Acids.Symp.Ser.* 41: 95-98.
- Hall, 2004. *Phylogenetic Trees Made Easy. A how to manual. Second Editon. Sinauer associates. Inc publishers USA.*
- Haq, M., Taher Mia, M.A., Rabbi, M.F., Ali, M.A., 2008. Incidence and severity of rice diseases and insect pests in relation to climate change. *International Symposium on Climate Change and food security in South Asia, 25-30 August 2008, Dhaka, Bangladesh.*
- Harikrishnan, R., Yang, X.B., 2004. Recovery of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* from different latitudinal positions and influence of temperatures on their growth and survival. *Plant Disease*, 88 (8), 817-823.
- Johanson, T., Turner, H.C., Mckay, G.J., Brown, A.E., 1998. A PCR-based method to distinguish fungi of the rice sheath blight complex, *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae* and *R. oryzae-sativae*. *FEMS Microbiology Letters*, 162- 289-294.
- Johnk, J.S., Jones, R.K., 1992. Differentiation of population of AG 2-2 of *Rhizoctonia solani* by analysis of cellular fatty acids. *Phytopathology*, 83, 278-283.
- Kanematsu, S., Naito, S., 1995. Genetic characterization of *Rhizoctonia solani* AG 2-3 by analyzing restriction fragment length polymorphisms of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, 61, 18-21.
- Karaca, G.H., Ozkoc, I, Erper, I., 2002. Determination of the anastomosis grouping and virulence of *Rhizoctonia solani* Kühn isolates associated with bean plants grown in Samsun/Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5(4), 434-437.
- Keijer, J., Houterman, P.M., Dulemans, A.M., Korsman, M.G., 1996. Heterogeneity in electrophoretic karyotype within and between anastomosis groups of *Rhizoctonia solani*. *Mycological Research*, 100, 789-797.
- Khodayari, M., Safaie, N., Shamsbakhsh, 2009. Genetic diversity of Iranian AG 1-IA isolates of *Rhizoctonia solani*, the cause of rice sheath blight, using morphological and molecular markers. *Journal of Phytopathology* 157, 708-714.

- Kuramae, E.E., Buzeto, A.L., Nakatani, A.K., Souza, N.L., 2007. rDNA-based characterization of a new binucleate *Rhizoctonia* spp. Causing root rot on kale in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 119, 469- 475.
- Kuninaga, S., Yokosawa, R., 1985. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kuhn. VI. Genetic relatedness among seven anastomosis groups. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 51, 127-132.
- Kuninaga, 1996. DNA base sequence complementary analysis. In: *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. (Editörler Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., Dijst, G.) Kluwer Academic Publishers, s.73-80, Dordrech.
- Kuninaga, S., Natsuaki, T., Takeuchi, T., Yokosawa, R., 1997. Sequence variation of the rDNA ITS region within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*, *Current Genetics*, 32, 237-247.
- Kuninaga, S., Carling, D.E., Takeuchi, T., Yokosawa, R., 2000a. Comparisons of rDNA –ITS sequences between potato and tobacco strains in *Rhizoctonia solani* AG 3. *Journal of General Plant Pathology*, 66, 2-11.
- Kuninaga, S., Nicoletti, R., Lahoz, E., Naito, S., 2000b. A description of Nt- isolates of *Rhizoctonia solani* to anastomosos group 2-1 (AG 2-1) on account of rDNA-ITS sequence similarity. *Journal of Plant Pathology*, 82, 61-64.
- Kuninaga, S., 2002. Current sitation of the taxonomy of the genus *Rhizoctonia* and the *Rhizoctonia* species complex. *Japanese Journal of Phytopathology*, 68, 3-20.
- Laroche, J.P., Jabaji-Hare, S.H., Charest, P.M., 1992. Differentiation of two anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by isozyme analysis. *Phytopathology*, 82, 1387- 1393.
- Lee, S.B., Taylor, J.W., 1992. Phylogeny of five fungus-like protoctistan Phytophyhora species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA: *Molecular Biology and Evolution*, 9, 636-653.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DNASPv5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Lilja, A., Hietala, A.M., Karjalainen, R., 1996. Identification of a uninucleate *Rhizoctonia* spp. by pathojenicity, hyphal anastomosis and RAPD analysis. *Plant Pathology*, 45, 997-1006.
- Liu, Z.L., Sinclair, J.B., 1992. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2. *Phytopathology* , 82, 778-786.
- Liu, Z.L., Sinclair, J.B., 1993. Differentiation of intraspecific groups within anastomosis group 1 of *Rhizoctonia solani* species complex. *Mycologia*, 85, 797-800.

- Liu, Z.L., Domier, L.L., Sinclair, J.B., 1995. Polymorphism of genes coding for nuclear 18S rRNA indicates genetic distinctiveness of anastomosis group 10 from other groups in the *Rhizoctonia solani* species complex. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), 2659-2664.
- MacNish, G.C., Carling, D.E., Brainard, K.A., 1993. Characterization of *Rhizoctonia solani* AG 8 from bare patches by pectic isozyme (zymogram) and anastomosis techniques. *Phytopathology*, 83, 922-927.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2003. *Brock Biology of Microorganisms*, Tenth Edition, Pirentice Hall, Pearson Education International.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, N.Y.
- Martin, F.N., 2000. *Rhizoctonia spp.* recovered from strawberry roots in central coastal California. *Phytopathology*, 90, 345-353.
- Mazzola, 1997. Identification and pathogenicity of *Rhizoctonia spp.* Isolates from apple roots and orchard soils. *Phytopathology*, 87, 582-587.
- Mccabe P.M., Gallagher, M.P., Deacon J.W., 1999. Microscopic observation of perfect hyphal fusion in *Rhizoctonia solani*.
- Mghalu, M.J., Horibe, M., Kubota, M., Kawagishi, H., Hyakumachi, M., 2007. Isolation and characterization of lectins from the AG-D group of binucleate *Rhizoctonia* species. *Journal of General Plant Pathology*, 73, 235-241.
- Moore, R.T., 1996. The dolipore/parenthesome septum in modern taxonomy. In: *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control.(Editörler Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., Dijst, G.) Kluwer Academic Publishers, s.49-63, Dordrech.
- Müller, W.H., Stalpers, J.A., van Aelst, A.C., vanderKrift, T.P., Boekhout, T., 1998. Field emission gun-scannig electron microscopy of septal pore caps of selected species in the *Rhizoctonia s.l.* complex. *Mycologia*, 90, 170-179.
- Nicholson, P., Parry, D.W., 1996. Development and use of a PCR assay to detect *Rhizoctonia cerealis*, the cause of sharp eyespot in wheat. *Plant Pathology*, 45, 872- 883.
- Ogoshi, A., 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annual Review of Phytopathology*, 25, 125-143.
- Ogoshi, A., Ui, T., 1983. Diversity of clones within an anastomosis group of *Rhizoctonia solani* Kühn in a field. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, 49, 239-245.

- Ogoshi, A., Cook, R.J., Bassett, E.N., 1990. *Rhizoctonia* species and anastomosis groups causing root rot of wheat and barley in the Pacific Northwest. *Phytopathology*, 80, 784-788.
- Ogoshi, A., 1996. Introduction- The Genus *Rhizoctonia*. In: *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. (Editors Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., Dijst, G.) Kluwer Academic Publishers, s.1-9, Dordrech.
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Pannecouque, J., Höfte, M., 2009. Detection of rDNA ITS polymorphism in *Rhizoctonia solani* AG 2-1 isolates. *Mycologia*, 101:1, 26-33.
- Pascual, C.B., Toda, T., Raymondo, A.D., Hyakumachi, M., 2000. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. *Plant Pathology*, 49, 108- 118.
- Pope, E.J., Carter, D.A., 2001. Phylogenetic placement and host specificity of mycorrhizal isolates belonging to AG 6 and AG 12 in the *Rhizoctonia solani* species complex. *Mycologia*, 93, 712-719.
- Posada, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1253- 1266.
- Priyatmojo, A., Escopalao, V.E., Tangonan, N.G., Pascual, C.B., Suga, H., Kageyama, K., Hyakumachi, M., 2001. Characterization of a new subgroup of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 1 (AG1- ID), causal agent of a necrotic leaf spot on coffee. *Phytopathology*, 91, 1054- 1061.
- Priyatmojo, A., Yamaguchi, R., Carling, D.E., Kageyama, K., Hyakumachi, M., 2002. Differentiation of three varieties of *Rhizoctonia circinata*; *var. circinata*, *var. oryzae*, and *var. zaeae* on the basis of cellular fatty acid composition. *Journal of Phytopathology*, 150, 1-5.
- Salazar, O., Schneider, J.H.M., Julian, M.C., Keijer, J., Rubio, V., 1999. Phylogenetic subgrouping of *Rhizoctonia solani* AG 2 isolates based on ribosomal ITS sequences. *Mycologia*, 91, 459-467.
- Salazar, O., Julian, M.C., Rubia, V., 2000. Primers based on specific rDNA- ITS sequences for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG 2 subgroups and ecological types, and binucleate *Rhizoctonia*. *Mycological Research*, 104, 281-285.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Volume 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Shan, X.C., Liew, E.C.Y., Weatherhead M.A., Hodgkins, I.J., 2002. Characterization and taxonomic placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. *Mycologia*, 94, 230-239.
- Sharon, M., Kuninaga S., Hyakumachi, M., Naito, S., Sneh, B., 2006. The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. using molecular and biotechnological methods compared with the classical anastomosis grouping. *Mycoscience*, 47, 299-316.
- Sharon, M., Freeman, S., Kuninaga, S., Sneh, B., 2007. Genetic diversity, anastomosis groups and virulence of *Rhizoctonia* spp. from strawberry. *European Journal of Plant Pathology*, 117, 247-265.
- Sharon, M., Kuninaga S., Hyakumachi, M., Naito, S., Sneh, B., 2008. Classification of *Rhizoctonia* spp. Using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. *Mycoscience* 49, 93-114.
- Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A., 1991. Identification of *Rhizoctonia* species, APS press The American Phytopathological Society, s.133, St. Paul, Minnesota, USA.
- Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., Dijst, G., 1996. *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control, Kluwer Academic Publishers, s.578, Dordrech.
- Stalpers, J.A., Andersen, T.F., 1996. A synopsis of the taxonomy of teleomorphs connected with *Rhizoctonia* S.L. In: *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. (Editörler Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., Dijst, G.) Kluwer Academic Publishers, s.49-63, Dordrech.
- Schwarz, Gideon E., 1978. Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics* 6 (2): 461–464
- Swofford, 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research*, 25, 4876-4882.
- Tredway, L.P., Burpee, L.L., 2001. *Rhizoctonia* diseases of turfgrass. *The Plant Health Instructor*, 1109-01.
- Toda, T., Nasu, H., Kageyama, K., Hyakumachi, M., 1998. Genetic identification of the web-blight fungus (*Rhizoctonia solani* AG 1) obtained from European pear using RFLP pf rDNA-ITS and RAPD analysis. *Reserch Bulletin Faculty College of Agriculture Gifu University*. 63, 1-9.

- Toda, T., Hyakumachi, M., Suga, H., Kageyama, K., Tanaka, A., Tani, T., 1999. Differentiation of *Rhizoctonia* AG D isolates from turfgrass into subgroups I and II based on rDNA and RAPD analysis. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 835-846.
- Toda, T., Mushika, T., Hyakumachi M., 2004. Development of specific PCR primers for the detection of *Rhizoctonia solani* AG 2-2LP from the leaf sheaths exhibiting large patch symptom on zoysia grass. *FEMS Microbiology Letters*, 232- 67-74.
- Tommerup, I.C., Barton, J.E., O'Brien, P.A., 1995. Reliability of RAPD fingerprinting of three basidiomycete fungi, *Laccaria*, *Hydnangium* and *Rhizoctonia*. *Mycological Research*, 99, 179-186.
- Vilgalys, R., 1988. Genetic relatedness among anastomosis groups in *Rhizoctonia solani* as measured by DNA/DNA hybridization. *Phytopathology*, 78, 698-702.
- Vilgalys, R., González, D., 1990. Ribosomal DNA Restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 80, 151-158.
- Wako, T., Ishikawa, T., Hashiba, T., 1991. Unique DNA plasmid pRS64 associated with chromosomal DNAs of the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Journal of General Microbiology*, 137, 2817-2821.
- White, T. J. , Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, San Diego, 315-322.
- Woodhall, J.W., Lees, A.K., Edwards, S.G., Jenkinson, P., 2007. Characterization of *Rhizoctonia solani* from potato in Great Britain. *Plant Pathology*, 56, 286-295.
- Yang, J., Sivasithamparam, K., Baton, J.E., O'Brien P.A., 1995. Characterization of cereal bare patch isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA analysis. *Plant Pathology*, 44, 811-818.
- Yang, J., Kharbanda, P.D., Wang, H., McAndrew, D.W., 1996. Characterization, virulence, and genetic variation of *Rhizoctonia solani* AG 9 in Alberta. *Plant Disease*, 80, 513-518.
- Yildiz, A., Doken, M.T., 2002. Anastomosis group determination of *Rhizoctonia solani* Kühn (Teleomorph: *Thanatephorus cucumeris*) isolates from tomatoes grown in Aydin, Turkey and their disease reactions on various tomato cultivars. *Journal of Phytopathology*, 150, 526- 528.
- Yokoyama, K., Ogoshi, A., 1986. Studies on hyphal anastomosis of *Rhizoctonia solani*. IV. Observation of imperfect fusion by light and electron microscopy. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 27, 399-413.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Eda UĞURTAY
Doğum Yeri :Samsun
Doğum Tarihi :04.02.1980
Medeni Hali :Evli
Bildiği Yabancı Diller :İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum/Yıl)

Lise :Tülay Başaran Anadolu Lisesi (1994-1998)
Lisans :Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü Samsun (1998-2002)

Yüksek Lisans :Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü Samsun (2002-2005)

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl

- Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (2004-2008)
- Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi (2008-)

İletişim Bilgileri

Tel :0 362 312 19 19

e-mail :eturgut@omu.edu.tr

Adres :Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi İlköğretim Fen Bilgisi
Öğretmenliği Kurupelit Kampüsü Atakum/ Samsun