



Araştırma Makalesi

Kışlık Buğdaylarda Kök ve Kökboğazı Çürüklüğüne Sebep Olan *Fusarium* spp. İzolatları Arasındaki Genetik Varyasyonun Retrotranspozon Temelli iPBS Markörleri ile İncelenmesi

Mehtap Alkan¹, Mehmet Erhan Göre¹, Harun Bayraktar², Göksel Özer^{1*}

¹Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bolu

²Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Ankara

Geliş tarihi (Received): 08.03.2019

Kabul tarihi (Accepted): 19.04.2019

Anahtar kelimeler:

Buğday, *Fusarium* spp., iPBS markörleri, retrotranspozon

Özet. Bu çalışmada, kışlık buğdaylarda kök ve kökboğazı çürüklüğüne sebep olan farklı *Fusarium* türlerine ait izolatlar arasındaki genetik çeşitlik, retrotranspozon temelli olan primerler arası bağlanma bölgesi (iPBS) markörleri kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla, 2017 ve 2018 yıllarında Türkiye ve Azerbaycan buğday yetiştirme alanlarından 32 *Fusarium* türü izolat elde edilmiştir. İzolatlar arasında en yaygın bulunan tür 23 izolat ile *F. culmorum* olarak belirlenmiş, bunu beş izolat ile *F. pseudograminearum* ve dört izolat ile *F. graminearum* takip etmiştir. Yedi iPBS retrotranspozon markörü izolatlar için 99 adeti polimorfik (%86.8) olmak üzere 114 bant üretmiş, primer başına ortalama 14.14 polimorfik bant elde edilmiştir. Markörlerin polimorfik bilgi içeriği (PIC) ortalama 0.17 olup, bu değer 0.10 ile 0.29 arasında değişmiştir. iPBS markörleri ile elde edilen verilere dayalı ağırlıklı olmayan aritmetik ortalama eş grup metodu (UPGMA) küme analizlerinin sonrasında elde edilen dendrogramda, izolatlar tür seviyesinde ile üç gruba ayrılmıştır. Ayrıca grup içerisinde yer alan izolatlar ise orijini olan ülkeye göre dağılım sergilemiştir. Popülasyon yapısı, Bayesian modellemesine dayanılarak hesaplanmış ve sonuçlar dendrogramdaki izolatların kümelenmesini destekleyecek şekilde üç popülasyona ayrılmış ($K = 3$) ve Ln olasılığının en yüksek ortalama değeri (-476.0) eşlik etmiştir. iPBS markörlerinin kullanılması, türler arası seviyede oldukça yüksek düzeyde polimorfizm üretmiş olup türlerin birbirinden ayrılmasını sağlamıştır. Çalışma, buğdaydan elde edilmiş *Fusarium* spp. izolatlarının genetik çeşitliliğini ve popülasyon yapısını iPBS markörleri analizi ile ortaya koyan ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

*Sorumlu yazar

gokozer@gmail.com

Genetic Variation of *Fusarium* spp. Isolates Associated with Root and Crown Rot of Winter Wheat Using Retrotransposon-Based iPBS Assays

Keywords:

Wheat, *Fusarium* spp., iPBS markers, retrotransposons

Abstract. Genetic variation among the isolates of *Fusarium* spp., causal agent of root and crown rot of winter wheat, was evaluated using retrotransposons-based inter-primer binding site (iPBS) markers in this study. Thirty-two isolates were isolated from diseased wheat plants obtained from wheat growing areas in Turkey and Azerbaijan in 2017 and 2018, for this purpose. Among the isolates, *F. culmorum* was the most commonly found with 23 isolates, followed by *F. pseudograminearum* with five isolates, and *F. graminearum* with four isolates. The seven iPBS retrotransposon markers produced 114 bands, of which 99 were polymorphic (86.8%) with an average of 14.14 polymorphic bands per primer for the isolates. The polymorphism information contents (PIC) per markers ranged from 0.10 to 0.29 with the average being 0.17. The dendrogram derived from unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) cluster analyses based on the data of iPBS markers divided the isolates into three clusters in according to their taxonomic grouping at species level and their origin country in the groups. Population structure was estimated based on Bayesian modeling and the results showed three populations ($K = 3$) supporting the clustering of isolates in the dendrogram with the highest mean value of Ln likelihood of data (-476.0). Utilization of the iPBS markers produced high level of polymorphism at the interspecies level, which allows for the separation of species. This is the first study on genetic diversity and population structure of *Fusarium* spp. isolates on wheat using iPBS markers.

GİRİŞ

Fusarium türleri buğday ve diğer hububat türlerinin kök ve kök boğazında nekroz ve kuru çürüklüklere neden olarak ürünlerin hem kalitesinde hem de veriminde önemli kayıplara yol açan dünya çapında yaygın toprak kökenli fungal patojenlerdir (Chakraborty *et al.*, 2006). Hastalık oluşumundan *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc., *Fusarium pseudograminearum* O'Donnell & T. Aoki ve *Fusarium graminearum* Schwabe bireysel veya kompleks olarak sorumlu olmakla birlikte coğrafik bölgelere göre ve seneden seneye önem sırasında değişiklik görülebilmektedir (Mishra *et al.*, 2006; Pettitt *et al.*, 1996, 2003; Tunalı *et al.*, 2008). Bu türler tarla koşullarında ayrıca başak yanıklığı hastalığına da neden olmakta ve depolama sırasında da ürün kayıplarına yol açabilmektedir. Yukarıda bahsedilen zararlarının yanı sıra bu patojenler ürünler üzerinde hayvanlar ve insanlarda önemli sağlık riski teşkil eden ve mikotoksinler olarak adlandırılan sekonder metabolitler de üretirler. Bunlardan özellikle trichothecene, zearalenone ve fumonisin gibi bazı mikotoksinler ürünlerde birikerek tüketen canlılarda mikozislere neden olmaktadır (Nicholson *et al.*, 2004; Rohweder *et al.*, 2011).

Değişik konukçulardan elde edilmiş *Fusarium* spp. izolatları, önemlerinden dolayı moleküler biyoloji, ekoloji, toksikoloji ve patoloji gibi bir çok çalışma alanında yoğun olarak ilgi görmektedir. Belirli *Fusarium* türlerinin kesin tanısı ve elde edilen popülasyonlarının incelenmesi; hastalık oluşumunda türlerin bireysel ve kompleks ilişkilerini anlamak, uygun mücadele stratejisini belirlemek ve insan ve çevre sağlığını için oldukça ümitvar olarak görülen dayanıklı çeşit ıslahı çalışmaları için kritik öneme sahiptir. Aynı zamanda oluşan mikotoksinin türü ve miktarının tayini ile ürünlerdeki birikiminin sonuçlarını, insan ve hayvan tüketicilerine yönelik tehditlerini anlamak için de yakından ilişkili türler arasında ki ayırım kilit rol oynamaktadır (Nicholson *et al.*, 2004).

Fusarium türlerinin teşhisi genellikle kültür özellikleri, hif, spor ve spor verici yapılarının şekil ve boylarına dayandırılarak gerçekleştirilmektedir (Leslie and Summerell, 2006). Bununla birlikte, kültürel ve morfolojik karakterler, kullanılan kültür ve inkübasyon koşullarına göre oldukça değişkenlik gösterebilmektedir. Ayrıca türlerin birbirinden ayırmasını sağlamak ve teşhisini gerçekleştirebilmek oldukça yoğun işgücü, zaman ve önemli derecede taksonomik uzmanlık gerektirmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'na dayalı moleküler markör teknikleri duyarlılığı ve potansiyel özgüllüğü sayesinde son zamanlarda *Fusarium* türlerinin kesin tanısı noktasındaki bu darboğazı aşmak, ayrıca tür içi ve türler arası popülasyon analizleri için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Günümüze kadar random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Bayraktar and Dolar, 2009), inter simple sequence repeats (ISSR) (Albayrak *et al.*, 2016), amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Monds *et al.*, 2005) gibi DNA markörleri *Fusarium* spp. izolatlarının tür ayırımında ve tür içi polimorfizmi incelemede başarı ile kullanılmıştır. Ayrıca ribozomal DNA'nın internal transcribed spacer (ITS) (Waalwijk *et al.*, 1996) ve intergenic spacer (IGS) bölgeleri (Özer and Bayraktar, 2015), translocation elongation factor 1- α (TEF) (Wulff *et al.*, 2010) ve β -tubulin (O'Donnell *et al.*, 1998) gibi gen bölgelerinin sekansları da sıklıkla *Fusarium* spp. izolatları arasındaki genetik ilişkiyi incelemek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Retrotranspozonlar (sınıf I transpozonlar) tekrarlayan ve mobil DNA dizileri olup kendilerini kopyalayarak buldukları genomun başka bir bölgesine kendilerini taşıma özelliğine sahip transpozonlardır. Bu nedenle mutasyonlara, genom büyüklüğünün artmasına ve nihayetinde genetik çeşitliliğe neden olduğundan mükemmel bir markör kaynağı olarak düşünülmektedir (Schulman *et al.*, 2004). Retrotranspozonlar tüm ökaryotların genomları boyunca bol miktarda bulunur (Finnegan, 1989). Funguslarda retrotranspozonlar ilk olarak 1970'de tanımlanmış olmasına rağmen hifsel gelişme gösteren funguslarda long terminal repeats (LTR) retrotranspozonlarının varlığı yaklaşık 10 yıl sonra bildirilmiştir (Muszewska *et al.*, 2011). Yüksek markör üretme potansiyellerinden dolayı retrotranspozon-microsatellite amplified polymorphism (RMAP) ve inter-retrotranspozon amplified polymorphism (IRAP) gibi retrotranspozon markörleri birçok ökaryotik organizmanın karakterizasyonu ve genetik haritalaması için kullanılmıştır. Bununla birlikte PCR ürünlerinin büyüklüğündeki değişkenlik ve primer tasarlamak için klonlama ve sekans bilgisi gereksinimi bu markör sistemlerinin yaygınlaşmasını engellemiştir. Retrotranspozon temelli primerler arası bağlanma bölgesi (inter-primer binding site; iPBS) amplifikasyon tekniği ise LTR retrotranspozonlarında ters transkriptaz primer bağlanma bölgesine dayalı evrensel bir DNA markör yöntemi olarak Kalendar *et al.* (2010) tarafından deklare edilmiş ve pek çok ökaryotik organizmada etkinliği gösterilmiştir. iPBS markörleri şimdiye kadar birçok bitki patojeni fungusun tür içi ve türler arası seviyedeki genetik farklılığının araştırılması için başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Pourmahdi and Taheri, 2015; Özer *et al.*, 2016, 2017; Özer and Bayraktar, 2018; Skipars *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019).

Bu çalışma kapsamında kışık buğdaylarda kök çürüklüğüne neden olan ve farklı coğrafik alanlardan elde edilmiş *Fusarium* spp. izolatları morfolojik ve türe spesifik PCR ile tanımlanmış ve aralarındaki genetik çeşitlilik iPBS retrotranspozon markörleri kullanılarak ilk defa incelenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Fungus İzolatlarının Temini

Fusarium izolatlarının temini için 2017 yılının haziran ve temmuz aylarında ekinlerin olgunlaşma aşamasında Azerbaycan'ın önemli buğday yetiştirme bölgelerinden 76 tarladan örnekler alınmış ve 2018 yılının haziran ayında ise Türkiye'deki buğday tarlalarından hastalıklı bitki örnekleri alınmıştır. Kök ve kökboğazı semptomları gösteren bitkilerin toprak altı kısımları 3-5 dakika boyunca toprak parçacıklarını uzaklaştırmak için akan musluk suyu altında iyice yıkanmıştır. Dokulardan küçük parçalar alınarak 1 dakika süreyle %1'lik sodyum hipoklorit çözeltisi muamele edilmiş ve 3 seri steril saf su ile durularak bir steril kabin içerisinde steril filtre kağıtları arasında kurutulmuştur. Yüzeysel dezenfeksiyon gerçekleştirilmiş olan parçalar 100 mg/l streptomisin sülfat ve 25 mg/l kloramfenikol eklenmiş 1/4 kuvvetli patates dekstroz agar (PDA; Merck, Almanya) içeren 9 cm'lik Petri kaplarına aktarılmış ve üç gün boyunca sürekli karanlıkta 22 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Petri kapları binoküler mikroskop yardımı ile incelenmiş ve şüpheli *Fusarium* izolatlarından hif ucu alınarak tam kuvvetli PDA içeren ortamlara aktararak saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen izolatlar ayrıca karantil yaprak agarına aşılanmış ve floresan ışığı altında (12 saat/gün) 22 °C'de 5 gün boyunca inkübe edilerek morfolojik özellikler, Leica DM1000 mikroskobu (Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) ve Leica LAS EZ yazılımıyla 400x büyütmede Leslie and Summerell (2006) kriterleri dikkate alınarak incelenmiş ve her bir izolattan 30 sporun ölçümü gerçekleştirilmiştir.

DNA İzolasyonu ve Türe Spesifik PCR

İzolatların genomik DNA'sının izolasyonu amacıyla DArT protokolünde (<http://www.diversityarrays.com>) açıklanan bir hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) tabanlı yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Her izolata ait yaklaşık 100 mg misel/spor dokusu, kültür yüzeyinden hafifçe kazınmış ve 2 ml'lik Ependorf tüplere aktarılmıştır. Önceden ısıtılmış (65 °C) 750 µl ekstraksiyon-lizis tamponu (125 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0, %2 CTAB, %2 PVP-40, 0.8 M NaCl, %0.5 sodium disulfite, %1 sarcosyl) tüpe eklenerek örnekler bir steril çelik ezici kullanılarak homojen hale getirilmiş ve her 15 dakikada bir hafifçe ters düz edilerek 65 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuru blok ısıtıcıdan alınan örnekler oda sıcaklığına kadar soğutularak üzerlerine 750 µl kloroform/izoamil alkol (24:1 w/w) eklenmiş ve 10 dakika süre ile yavaşça ters düz edilerek 12000 g'de 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Süpernatantlar temiz 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine aktararak üzerlerine DNA'yı çökeltmek için 0.6 hacim soğuk izopropanol eklenmiştir. 12000 g'de 5 dakika santrifüj işleminden sonra, süpernatantlar uzaklaştırılarak ve pelletler 2 kez %70'lik soğuk etanolle yıkanmış ve oda sıcaklığında 30 dakika ile kurutulmuştur. DNA 200 µl steril ultra-saf su içinde çözülerek, konsantrasyonu DS-11 FX Serisi spektrofotometre (Denovix Inc., ABD) yardımı ile ölçülmüş ve PCR çalışmaları için 50 ng/µl'ye ayarlanmıştır.

Türe spesifik PCR çalışmaları türe-spesifik FcOIF-FcOIR, Fg16F-Fg16R (Nicholson *et al.*, 1998) ve Fp1-1-Fp1-2 (Aoki *et al.*, 1999) primer setleri kullanılarak sırasıyla *F. culmorum*, *F. graminearum* ve *F. pseudograminearum* izolatlarının tür teşhislerini doğrulamak için önerilen PCR amplifikasyon koşullarında gerçekleştirilmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan türe spesifik primer setlerine ait bilgiler.

Table 1. The information about species-specific primers used in this study.

Tür	Primer		Ürün (bp)	Referans
	İsmi	Sekansı (5'-3')		
<i>F. culmorum</i>	FcOIF	ATGGTGAACCTCGTCGTGGC	570	Nicholson <i>et al.</i> , 1998
	FcOIR	CCCTTCTTACGCCAATCTCG		
<i>F. graminearum</i>	Fg16F	CTCCGGATATGTTGCGTCAA	520	Aoki <i>et al.</i> , 1999
	Fg16R	GGTAGGTATCCGACATGGCAA		
<i>F. pseudograminearum</i>	Fp1-1	CGGGGTAGTTTCACATTTCCG	400-500	Aoki <i>et al.</i> , 1999
	Fp1-2	GAGAATGTGATGACGACAATA		

iPBS Markörleri ile Genetik Varyasyon Analizleri

İzolatlar arasındaki genetik çeşitliliği değerlendirmek için, genomik DNA Kalender *et al.* (2010)'nın tasarladığı seksen üç iPBS primeri ile önerilen annealing sıcaklıklarında PCR amplifikasyonuna tabi tutulmuştur. Bu amaçla her bir türe ait iki izolat ile ön çalışmalar gerçekleştirilmiş olup, izolatlar arasında değişken ve temiz bant profili

üretim yeteneklerine göre yedi iPBS markörü (Çizelge 2) ile tüm izolatlar kullanılarak türler arası ve tür içi polimorfizmler araştırılmıştır. iPBS amplifikasyonları, Kalender *et al.* (2010)'nın önerdiği protokole göre Dream Taq DNA polimeraz (Thermo Scientific, ABD) ve Pfu DNA polimeraz (Thermo Scientific, ABD) ile 95 °C'de 3 dk bir ön denatürasyonu takiben 95 °C 15 s, primere bağlı olarak değişen 50–63 °C annealing sıcaklığında 1 dk ve 68 °C 1 dk uzama olmak üzere 30 döngü ve 72°C'de 5 dk'lık bir son uzama programında gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon ürünleri 100 V'da 1.5 saat boyunca %1.4 agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuş ve etidyum bromür ile boyanarak bir G: Box F3 jel dokümantasyon sistemi (Syngene, UK) ile görüntülenmiştir.

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan iPBS markörlerine ait bilgiler.

Table 2. The information about iPBS markers used in this study.

Primer	Primer sekansı (5'–3')	T (°C)	GC (%)	TB	PB	PPB (%)	PIC	RP
iPBS2080	CAGACGGCGCCA	63	75.0	23	21	91.3	0.29	9.43
iPBS2415	CATCGTAGGTGGGCGCCA	61	66.7	15	13	86.7	0.17	4.00
iPBS2244	GGAAGGCTCTGATTACCA	50	50.0	14	11	78.6	0.10	2.00
iPBS2395	TCCCCAGCGGAGTCGCCA	53	72.2	11	9	81.8	0.13	2.14
iPBS2242	GCCCCATGGTGGGCGCCA	57	77.8	18	16	88.9	0.20	4.93
iPBS2221	ACCTAGCTCACGATGCCA	57	55.6	19	16	84.2	0.15	3.93
iPBS2077	CTCACGATGCCA	55	58.3	14	13	92.9	0.17	3.21
Toplam				114	99			
Ortalama						86.8	0.17	4.23

T (°C) annealing sıcaklığı; TB toplam bant sayısı; PB polimorfik bant sayısı; PPB (%) polimorfik bant yüzdesi; PIC polimorfik bilgi içeriği; RP ayırma gücü.

Verilerin Analizi

iPBS markörleri ile elde edilen tüm bantlar, ikili veri matrisinin oluşturulması için pozisyonlarına göre mevcut (1) veya yok (0) olarak skorlanmıştır. Her bir primer-örnek kombinasyonu, en az iki farklı PCR amplifikasyonu ile tekrarlanmış ve sadece tekrarlanabilir bantlar değerlendirilmeye tabi tutulmuştur. iPBS markörlerinin izolatların genetik profillerini analiz etmedeki performansları her bir markör için Rolden-Ruiz *et al.* (2000)'in önerdiği polimorfik bilgi içeriği (PIC) ve Prevost and Wilkinson (1999)'nın önerdiği ayırma gücü (RP) verileri hesaplanarak değerlendirilmiştir.

Markörlerden elde edilen veri matrisi, NTSYS-PC versiyon 2.02 programı (Rohlf, 2000) ile Jaccard'ın benzerlik kat sayısı kullanılarak genetik benzerlik matrisine çevrilmiştir. Benzerlik matrisi ağırlıklı olmayan aritmetik ortalama eş grup metodu (UPGMA) yardımıyla kümeleme analizi yapılarak dendrogram elde edilmiş ve izolatlar arasındaki genetik akrabalık değerlendirilmiştir.

Popülasyonlar arasındaki genetik varyasyon ayrıca Popgene versiyon 1.32 istatistik yazılımı (Yeh *et al.*, 1999) kullanılarak gözlenen alleller sayısı, etkili alleller sayısı, Nei'nin gen çeşitliliği, Shannon'ın bilgi endeksi, genetik varyasyon derecesi ve tahmini gen akışı değerleri hesaplanarak gerçekleştirilmiştir. Markörlerden elde edilen veri matrisi ile popülasyon genetik yapı araştırmasının daha ayrıntılı değerlendirilmesi Bayesian model tabanlı kümeleme programı Structure 2.3.4 kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Pritchard *et al.*, 2000). Structure Harvester (Earl, 2012), optimal *K* değerini bulmak için kullanılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Buğday tarımında *Fusarium* türleri ister toprak altı olsun ister ise toprak üstü olsun oluşturdukları önemli ve yaygın hastalıklar ile ciddi bir tarımsal tehdit unsurudur. Hastalıktan sorumlu olan etmenin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanması ve popülasyonlardaki genetik çeşitliliğin izlenmesi bu patojenlere karşı etkili kontrol stratejilerinin geliştirilmesi için anahtar rol oynamaktadır. Birçok moleküler markör tekniği, klasik tanımlama metodlarındaki yoğun işgücü, uzman ve uzun soluklu zaman gereksinimi gibi kısıtlamaları aşmak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Çalışmamız kapsamında son zamanlarda yeni bir moleküler markör sistemi olarak ortaya çıkmış olan iPBS markörleri, buğday bitkisinin kök ve kökboğazında hastalığa neden olan *Fusarium* spp. izolatlarının arasındaki genetik çeşitliliği araştırmak amacıyla ilk defa kullanılmıştır.

Çalışma kapsamında elde edilen *Fusarium* spp. izolatları Leslie and Summerell (2006)'e göre morfolojik kriterlere dayandırılarak 23'ü *F. culmorum*, 5'i *F. pseudograminearum* ve 4'ü *F. graminearum* olarak

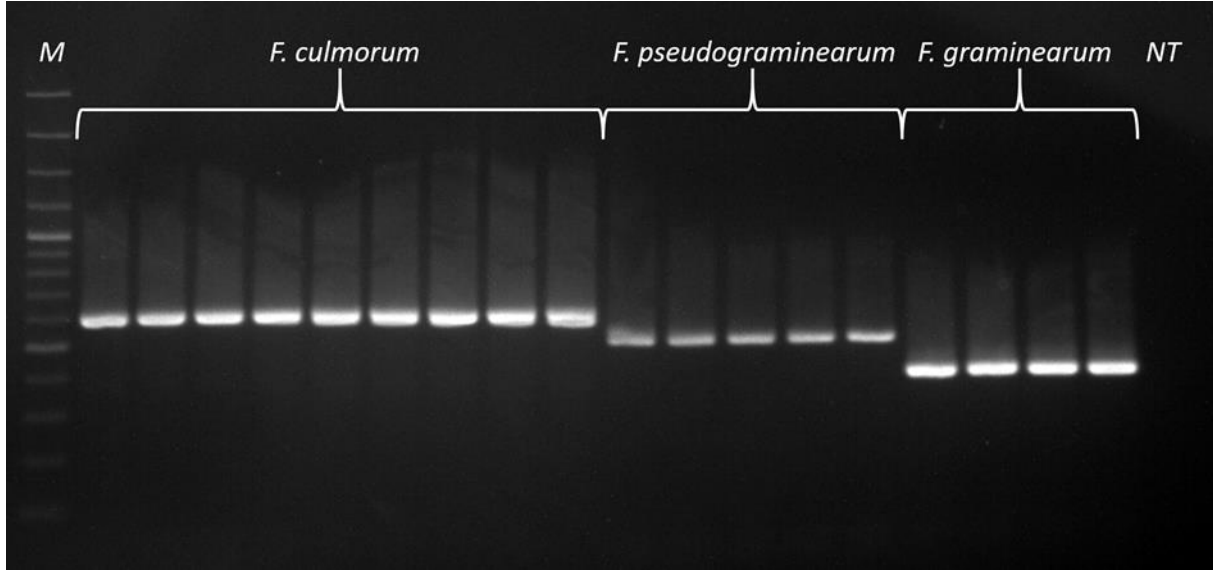
tanımlanmıştır (Çizelge 3). Kök ve kökboğazı çürüklüklerine neden olan etmenleri araştıran *Tunalı et al.* (2008)'in %14'ü ile en yaygın olarak *F. culmorum* türünü belirlemiş, bunu %10 ile *Bipolaris sorokiniana* ve %2 ile *F. pseudograminearum* izlemiştir ki bulgular çalışmamızdan elde edilen bulgular ile uyuzmaktadır. *F. culmorum* izolatlarının makrokonidileri 3-4 bölmeye ve ayak hücrelerine sahip olup boy ve en ölçüleri sırasıyla ortalama $30.26 (\pm 2.9) \times 6.14 (\pm 0.91) \mu\text{m}$ 'dir. Bu değerler *Mueller et al.* (2018) tarafından buğdaydan elde edilmiş olan *F. culmorum* izolatların ölçümleri ile benzerlik göstermektedir. *F. pseudograminearum* izolatlarının makrokonidileri 4-6 arasında ve genellikle 5 bölmeli, diğer türlere göre nispeten daha ince ve düz olup boyutları boy ve en olarak ortalama $31.76 (\pm 3.24) \times 4.24 (\pm 0.81) \mu\text{m}$ ölçülerinde ve belirgin ayak hücrelerine sahiptir. Elde edilen bulguların değişik araştırmacıların buğdaydan elde ettikleri. *F. pseudograminearum* izolatlar ile uyumlu olduğu görülmüştür (*Agustí-Brisach et al.*, 2018; *Ji et al.*, 2016). *F. graminearum* makrokonidileri *Leslie and Summerell* (2006)'e uyumlu olarak kıvrımlı, belirgin ayak hücreli olup boy ve en ölçümleri ortalama $32.23 (\pm 3.25) \times 5.92 (\pm 0.7) \mu\text{m}$ olup 5-6 bölmeye sahiptir. İzolatların hiçbirisinde mikrokonidiye rastlanmamıştır.

Çizelge 3. Çalışmada kullanılan *Fusarium* spp. izolatlarına ait bilgiler.

Table 3. The information about *Fusarium* spp. isolates used in this study.

İzolat Kodu	Lokasyon		Tür	Makrokonidilerin uzunluk ölçüleri (n = 30; μm)	Makrokonidilerin en ölçüleri (n = 30; μm)
	Ülke	Şehir			
Fc01	Azerbaycan	Şeki	<i>F. culmorum</i>	27.02 (± 2.46)	6.21 (± 1.02)
Fc02	Azerbaycan	Şeki	<i>F. culmorum</i>	29.15 (± 1.71)	7.45 (± 0.96)
Fc03	Azerbaycan	Şeki	<i>F. culmorum</i>	30.42 (± 2.45)	5.47 (± 0.62)
Fc04	Azerbaycan	Berde	<i>F. culmorum</i>	36.17 (± 3.79)	6.43 (± 0.68)
Fc05	Azerbaycan	Berde	<i>F. culmorum</i>	32.75 (± 2.38)	5.77 (± 1.07)
Fc06	Azerbaycan	Berde	<i>F. culmorum</i>	28.35 (± 3.61)	6.2 (± 1.1)
Fc07	Azerbaycan	Berde	<i>F. culmorum</i>	28.92 (± 1.39)	6.46 (± 0.55)
Fc08	Azerbaycan	Ucar	<i>F. culmorum</i>	31.77 (± 3.19)	5.82 (± 0.97)
Fc09	Azerbaycan	Ucar	<i>F. culmorum</i>	31.55 (± 2.82)	6.13 (± 0.51)
Fc10	Azerbaycan	Kürdemir	<i>F. culmorum</i>	28.8 (± 2.94)	5.77 (± 1.07)
Fc11	Azerbaycan	Kürdemir	<i>F. culmorum</i>	28.4 (± 3.22)	6.43 (± 0.8)
Fc12	Azerbaycan	Kürdemir	<i>F. culmorum</i>	32.13 (± 2.54)	6.21 (± 1.02)
Fc13	Azerbaycan	Kürdemir	<i>F. culmorum</i>	31.27 (± 3.36)	7.63 (± 0.93)
Fc14	Azerbaycan	Kürdemir	<i>F. culmorum</i>	28.75 (± 3.72)	5.35 (± 0.8)
Fc15	Azerbaycan	Kürdemir	<i>F. culmorum</i>	29.57 (± 3.8)	5.75 (± 1.1)
Fc16	Azerbaycan	Kürdemir	<i>F. culmorum</i>	29.26 (± 2.02)	5.83 (± 1.05)
Fc17	Azerbaycan	Kürdemir	<i>F. culmorum</i>	30.23 (± 2.67)	5.9 (± 0.9)
Fc18	Azerbaycan	Kürdemir	<i>F. culmorum</i>	31.5 (± 2.96)	6.04 (± 0.87)
Fc19	Azerbaycan	Kürdemir	<i>F. culmorum</i>	30.4 (± 2.99)	6.53 (± 1.07)
Fc20	Azerbaycan	Kürdemir	<i>F. culmorum</i>	27.63 (± 3.23)	5.7 (± 0.93)
Fc21	Azerbaycan	Kürdemir	<i>F. culmorum</i>	29.31 (± 3.04)	5.94 (± 0.9)
Fc22	Türkiye	Bolu	<i>F. culmorum</i>	27.52 (± 3.21)	6.26 (± 1.06)
Fc23	Türkiye	Eskişehir	<i>F. culmorum</i>	35.16 (± 3.15)	5.92 (± 0.98)
Fpg01	Azerbaycan	Berde	<i>F. pseudograminearum</i>	27.38 (± 2.83)	4.75 (± 0.88)
Fpg02	Azerbaycan	Ağdaş	<i>F. pseudograminearum</i>	26.67 (± 2.89)	3.7 (± 0.68)
Fpg03	Azerbaycan	Ağdaş	<i>F. pseudograminearum</i>	31.65 (± 3.98)	4.58 (± 0.63)
Fpg04	Azerbaycan	Kürdemir	<i>F. pseudograminearum</i>	36.57 (± 3.21)	4.52 (± 0.91)
Fpg05	Türkiye	Eskişehir	<i>F. pseudograminearum</i>	36.52 (± 3.27)	3.67 (± 0.94)
Fg01	Azerbaycan	İsmayilli	<i>F. graminearum</i>	34.76 (± 3.25)	5.97 (± 0.38)
Fg02	Azerbaycan	İsmayilli	<i>F. graminearum</i>	37.1 (± 3.88)	6.4 (± 0.98)
Fg03	Türkiye	Bolu	<i>F. graminearum</i>	27.58 (± 2.06)	5.96 (± 0.78)
Fg04	Türkiye	Bolu	<i>F. graminearum</i>	29.48 (± 3.81)	5.36 (± 0.67)

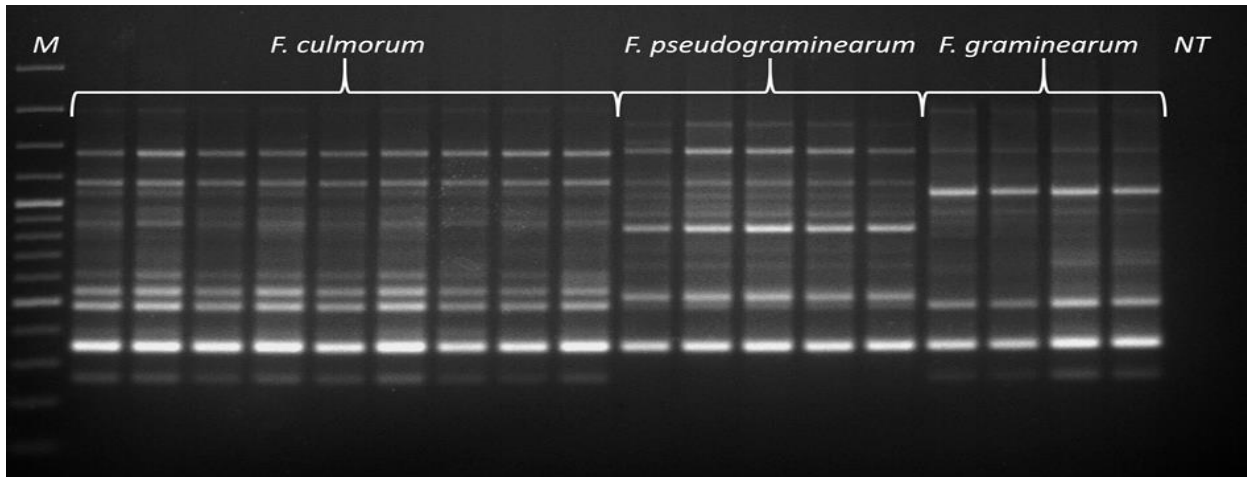
Gerçekleştirilen türe spesifik primeler ile yürütülen PCR çalışmaları sonucunda *F. culmorum*, *F. pseudograminearum* ve *F. graminearum* izolatları için beklenen boyutlarda, sırasıyla 570 bp, 520 bp ve 420 bp amplifikasyon ürünleri elde edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Türe spesifik PCR ürünleri; 1-9: *F. culmorum* izolatları, 10-14: *F. pseudograminearum* izolatları, 15-18: *F. graminearum* izolatları, DNA markör (M): GeneRuler 100 bp plus (Thermo Scientific, ABD) ve NT: Kontrol.

Figure 1. Species-specific PCR products; 1-9: *F. culmorum* isolates, 10-14: *F. pseudograminearum* isolates, 15-18: *F. graminearum* isolates, DNA marker (M): GeneRuler 100 bp plus (Thermo Scientific, USA) and NT: non-template DNA.

Çalışmada kullanılan 32 izolat için yedi iPBS markörü ile toplamda 114 lokus üretilmiştir. Markör sistemi, farklı *Fusarium* türlerine ait izolatlar arasında önemli bir değişkenlik sağlayan çok sayıda fragment üretmiştir (Şekil 2). iPBS-PCR'dan elde edilen ve tekrarlanabilir 114 amplifikasyon ürününden 99'unun (%86.8) türler arasında polimorfik olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2). iPBS primerleri ile çoğaltılmış bantların sayısı primer başına ortalama 16.3 olarak saptanırken, bu değer 11 (iPBS2395) ile 23 (iPBS2080) arasında değişmiştir. En yüksek polimorfik bant oranı %92.9 ile iPBS2077 için oluşmuş, en düşük oran ise %77.6 ile iPBS2244 primerinden elde edilmiştir. Bu polimorfizm oranları Albayrak *et al.* (2016)'nın geneli Türkiye ve İran olmak üzere buğdaydan elde edilmiş olan 20 *F. culmorum* izolatı ve 43 *F. graminearum* izolatının 25 ISSR primeri ile gerçekleştirdikleri çalışmada elde ettikleri %5.92 polimorfizm oranına göre oldukça yüksektir. Benzer şekilde gerçekleştirilen bir çalışmada Sclerotiniaceae familyasının 6 türüne ait 34 izolat arasındaki türler arası polimorfizm 6 iPBS markörü ile incelenmiş ve oluşan bantların %98 oranında türler arasında polimorfik olduğu gözlenmiştir (Özer *et al.*, 2017).

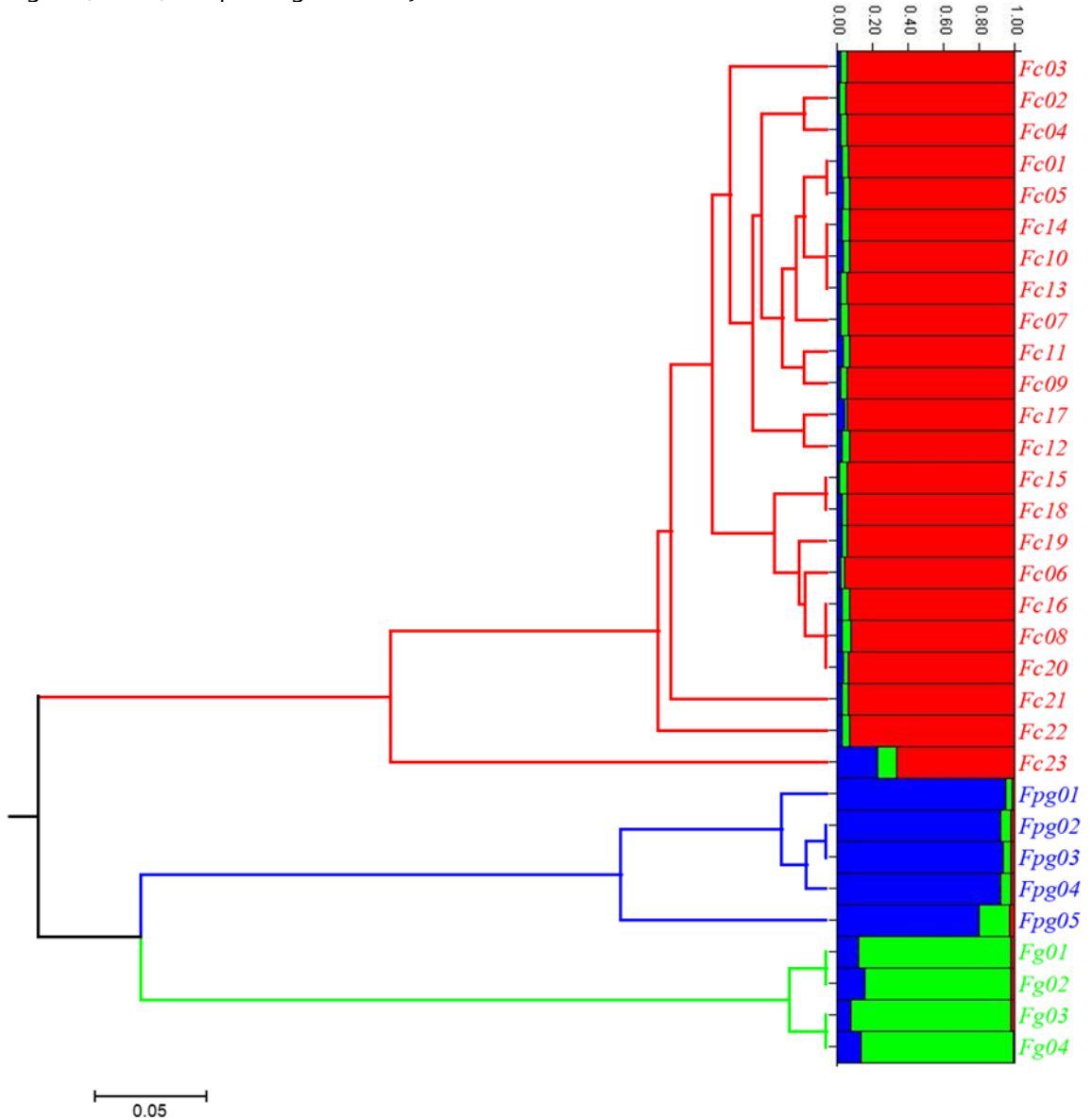


Şekil 2. iPBS2242 primeri ile elde edilmiş bant profilleri; 1-9: *F. culmorum* izolatları, 10-14: *F. pseudograminearum* izolatları, 15-18: *F. graminearum* izolatları, DNA markör (M): GeneRuler 100 bp plus (Thermo Scientific, ABD) ve NT: Kontrol.

Figure 2. Band profiles obtained with the iPBS2242 primer; 1-9: *F. culmorum* isolates, 10-14: *F. pseudograminearum* isolates, 15-18: *F. graminearum* isolates, DNA marker (M): GeneRuler 100 bp plus (Thermo Scientific, USA) and NT: non-template DNA.

PIC ve RP değerleri iPBS markör sistemine ait kullanılan yedi primer için hesaplanmış ve Çizelge 2'te sunulmuştur. PIC değerleri 0.10 (iPBS2244) ile 0.29 (iPBS2080) aralığında olup, primerler için ortalama PIC değeri 0.17 olarak gerçekleşmiştir. Primerler için ortalama RP değeri ise 4.23 olmuş, en düşük ve en yüksek RP değerlerine PIC değerleri için olduğu gibi sırasıyla iPBS2244 (2.00) ve iPBS2080 (9.43) primerlerinde gözlenmiştir.

iPBS primerler ile elde edilen verilerin UPGMA kümeleme analizi sonucu oluşturulan dendrogram izolatları 3 ana gruba ayırmıştır ki her bir grup sadece bir türe ait izolatları içermektedir (Şekil 3). Bununla birlikte *F. culmorum* izolatlarının diğer tüm izolatlardan ayrıldığı görülmüştür. Benzer şekilde iPBS markörleri ile gerçekleştirilen diğer çalışmalarda da farklı fungus türleri yine ayrı gruplar içerisinde yer almıştır (Özer *et al.*, 2016). Buğdaydan elde edilen farklı türlerin ISSR markörleri ile incelendiği diğer bir çalışmada da yine farklı türler dendrogramda farklı gruplar içerisinde kümelenmiştir (Albayrak *et al.*, 2016) Her bir türün oluşturduğu grup içerisinde Türkiye ve Azerbaycan izolatları farklı alt gruplara ayrılmıştır. Structure Harvester analizlerinin sonucu, üç popülasyon için en iyi veri kümesi sayısının $K = 3$ olduğu ve 32 bireyden oluşan üç popülasyonun dendrogramdakine benzer bir dağılımla üç kümeye ayrıldığı saptanmıştır. $K = 3$ Ln olasılığının ortalamasının en yüksek değere (-476.0) sahip olduğu izlenmiştir.



Şekil 3. 32 *Fusarium* spp. izolatının iPBS data matrisine dayandırılarak elde edilen UPGMA ve $K = 3$ için izolatların Structure barplot'ta dizilimi.

Figure 3. UPGMA tree based on iPBS combined data matrix for 32 *Fusarium* spp. isolates and Structure barplots for individuals assignment results for $K = 3$.

iPBS markörleri ile elde edilen verilerin üzerine Popgene yazılımı kullanılarak elde edilen genetik parametreler olan gözlenen alleller sayısı (N_a Observed number of alleles), etkili alleller sayısı (N_e effective number of alleles), Nei'nin gen çeşitliliği (h Nei's gene diversity) ve Shannon'ın bilgi endeksi (I Shannon's

information index)'ne ait hesaplanan değerler Çizelge 4'te sunulmuştur. Ayrıca ortalama genetik varyasyon derecesi (G_{st} degree of genetic differentiation) ve tahmini gen akışı (N_m estimae of gene flow) değerleri sırasıyla 0.89 ve 0.06 olarak gerçekleşmiştir. Bu veriler, iPBS markörlerinden elde edilen genetik varyasyonun büyük oranla tür içerisinde değil türler arasındaki genetik farklılıklardan kaynaklandığını ortaya koymaktadır.

Çizelge 4. *Fusarium* spp. izolatları içerisindeki popülasyonların analiz edilen çeşitli genetik çeşitlilik indeksleri.

Table 4. Summary of various genetic diversity indices analyzed in populations of *Fusarium* isolates.

Markör sistemi		N_a	N_e	h	I	H_t	H_s	G_{st}	N_m
iPBS	Mean	1.87	1.39	0.25	0.40	0.33	0.03	0.89	0.06
	St. Dev	0.34	0.28	0.15	0.20	0.03	0.004		

N_a Observed number of alleles; N_e Effective number of alleles; h Nei's (1973) gene diversity; I Shannon's Information index; H_t heterozygosity; H_s average heterozygosity; G_{st} degree of genetic differentiation; N_m estimae of gene flow.

SONUÇ

Yürütülmüş olan çalışmada kışık buğdayların kök ve kök boğazından elde edilmiş *Fusarium* spp. izolatları morfolojik ve kültür özelliklerine dayandırılarak ve ayrıca türe spesifik PCR metodu kullanılarak tanımlanmıştır. Elde edilen türler için farklı araştırmacılar tarafından önceki çalışmalarda dizayn edilen türe spesifik primerlerin *F. culmorum*, *F. pseudograminearum* ve *F. graminearum* izolatlarının tür teşhislerini doğrulamada oldukça etkin olduğu görülmüştür. Bununla birlikte tespit edilmiş türlerin genetik varyasyonun incelenmesi için literatürde ilk defa kullanılan retrotranspozon temelli iPBS markörlerinin özellikle türler arası polimorfizmi ortaya koymakta oldukça etkin olduğu ayrıca tür içi oluşturduğu polimorfizm neticesinde izolatların ülkesel düzeyde coğrafik kaynaklarına göre ayrıldığı izlenmiştir. iPBS markör sistemi tek başına kullanılmasıyla elde edilen türler arası seviyedeki yüksek polimorfizm oranı, türlerin tanımlanmasında ve herhangi bir dizi verisi olmadan türler arasındaki evrimsel ilişkilerin aydınlatılması için değerli bilgiler sağlamıştır.

TEŞEKKÜR

Yazarlar olarak Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) ve Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje no: 2016.10.06.1072) çalışmanın yürütülmesinde maddi kaynak sağladığı için teşekkür ederiz. Ayrıca Azerbaycan izolatlarının elde edildiği hasta bitki örneklerini titiz bir sorvey sonucunda bizlere ulaştıran Doç.Dr. Mustafa İmren ve Dr. Abdelfattah A. DABABAT'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Agustí-Brisach, C., Raya-Ortega, M. C., Trapero, C., Roca, L. F., Luque, F., López-Moral, A., & Trapero A. (2018). First report of *Fusarium pseudograminearum* causing crown rot of wheat in Europe. *Plant Disease*, 102(8), 1670-1670.
- Albayrak, G., Yörük, E., Gazdağlı, A., & Sharifnabi, B. (2016). Genetic diversity among *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates based on ISSR markers. *Archives of Biological Sciences*, 68(2), 333-343.
- Aoki, T., & O'Donnell, K. (1999). Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia*, 91(4), 597-609.
- Bayraktar, H., & Dolar, F. S. (2009). Genetic diversity of wilt and root rot pathogens of chickpea, as assessed by RAPD and ISSR. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 33(1), 1-10.
- Chakraborty, S., Liu, C. J., Mitter, V., Scott, J. B., Akinsanmi, O. A., Ali, S., & Simpfendorfer, S. (2006). Pathogen population structure and epidemiology are keys to wheat crown rot and *Fusarium* head blight management. *Australasian Plant Pathology*, 35(6), 643-655.
- Earl, D. A. (2012). Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359-361.
- Finnegan, D. J. (1989). Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends in Genetics*, 5, 103-107.
- Ji, L. J., Kong, L. X., Li, Q. S., Wang, L. S., Chen, D., & Ma, P. (2016). First report of *Fusarium pseudograminearum* causing *Fusarium* head blight of wheat in Hebei Province, China. *Plant Disease*, 100(1), 220-220.

- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Professional, Ames, 663 IA, USA; ISBN: 978-0-813-81919-8.
- Mishra, P. K., Fox, R. T., & Culham, A. (2003). Inter-simple sequence repeats and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and long-range dispersal in *Fusarium culmorum*. *Annals of Applied Biology*, 143(3), 291-301.
- Mishra, P. K., Tewari, J. P., Clear, R. M., & Turkington, T. K. (2006). Genetic diversity and recombination within populations of *Fusarium pseudograminearum* from western Canada. *International Microbiology*, 9(1), 65-68.
- Monds, R. D., Cromey, M. G., Lauren, D. R., Di Menna, M., & Marshall, J. (2005). *Fusarium graminearum*, *F. cortaderiae* and *F. pseudograminearum* in New Zealand: molecular phylogenetic analysis, mycotoxin chemotypes and co-existence of species. *Mycological Research*, 109(4), 410-420.
- Mueller, B. D., Groves, C. L., Holtz, D., Deutsch, A., & Smith, D. L. (2018). First report of *Fusarium culmorum* causing *Fusarium* head blight of wheat in Wisconsin. *Plant Disease*, 102(5), 1028-1028.
- Muszewska, A., Hoffman-Sommer, M., & Grynberg, M. (2011). LTR retrotransposons in fungi. *PLoS One*, 6(12), e29425.
- Nicholson, P., Simpson, D. R., Wilson, A. H., Chandler, E., & Thomsett, M. (2004). Detection and differentiation of trichothecene and enniatin-producing *Fusarium* species on small-grain cereals. In *Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi*, Springer, Dordrecht, pp. 503-514.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., & Nirenberg, H. I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90(3), 465-493.
- Özer, G., & Bayraktar, H. (2015). Intraspecific variation within *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* from *Cuminum cyminum* in Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology*, 17(2), 375-380.
- Özer, G., Bayraktar, H., & Baloch, F. S. (2016). iPBS retrotransposons 'A Universal Retrotransposons' now in molecular phylogeny of fungal pathogens. *Biochemical Systematics and Ecology*, 68, 142-147.
- Özer, G., Sameeullah, M., Bayraktar, H. & Göre, M. E. (2017). Genetic diversity among phytopathogenic Sclerotiniaceae, based on retrotransposon molecular markers. *Phytopathologia Mediterranea*, 56(2), 251-258.
- Özer, G., & Bayraktar, H. (2018). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* isolates analyzed by vegetative compatibility, sequences analyses of the rDNA IGS region and iPBS retrotransposon markers. *Journal of Plant Pathology*, 2, 225-232.
- Pourmahdi, A., & Taheri, P. (2015). Genetic Diversity of *Thanatephorus cucumeris* Infecting Tomato in Iran. *Journal of Phytopathology*, 163(1), 19-32.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Rosenberg, N. A., & Donnelly, P. (2000). Association mapping in structured populations. *The American Journal of Human Genetics*, 67(1), 170-181.
- Prevost, A., & Wilkinson, M. J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 107-112.
- Rohlf, F. J. (2000). NTSYS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system, vol v. 2.1. Exceter Software, New York.
- Roldan-Ruiz, I., Dendauw, J., Vanbockstaele, E., Depicker, A., & De Loose, M. (2000). AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding*, 6, 125-134.
- Škipars, V., Siaredzich, M., Belevich, V., Bruņevića, N., Brūna, L., & Ruņģis, D.E. (2018). Genetic differentiation of *Phoma* sp. isolates using retrotransposon-based iPBS assays. *Environmental and Experimental Biology* 16(4), 307-314.
- Pettitt, T., Xu, X., & Parry, D. (2003). Association of *Fusarium* species in the wheat stem rot complex. *European journal of plant pathology*, 109(7), 769-774.
- Pettitt, T. R., Parry, D. W., & Polley, R. W. (1996). Effect of temperature on the incidence of nodal foot rot symptoms in winter wheat crops in England and Wales caused by *Fusarium culmorum* and *Microdochium nivale*. *Agricultural and Forest Meteorology*, 79(4), 233-242.
- Rohweder, D., Valenta, H., Sondermann, S., Schollenberger, M., Drochner, W., Pahlow, G., & Dänicke, S. (2011). Effect of different storage conditions on the mycotoxin contamination of *Fusarium culmorum*-infected and non-infected wheat straw. *Mycotoxin Research*, 27(2), 145-153.
- Schulman, A. H., Flavell, A. J., & Ellis, T. H. N. (2004). The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. *Methods in Molecular Biology*, 260, 145-175.
- Tunali, B., Nicol, J. M., Hodson, D., Uckun, Z., Büyük, O., Erdurmuş, D., & Bağcı, S. A. (2008). Root and crown rot fungi associated with spring, facultative, and winter wheat in Turkey. *Plant Disease*, 92(9), 1299-1306.

- Voigt, K., Schleier, S., & Brückner, B. (1995). Genetic variability in *Gibberella fujikuroi* and some related species of the genus *Fusarium* based on random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current genetics*, 27(6), 528-535.
- Waalwijk, C., de Koning, J. R., Baayen, R. P., & Gams, W. (1996). Discordant groupings of *Fusarium* spp. from sections Elegans, Liseola and Dlamia based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. *Mycologia*, 88(3), 361-368.
- Wu, J., Xie, X., Shi, Y., Chai, A., Wang, Q., & Li, B. (2019). Analysis of pathogenic and genetic variability of *Corynespora cassicola* based on iPBS retrotransposons. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 41(1), 76-86.
- Wulff, E. G., Sørensen, J. L., Lübeck, M., Nielsen, K. F., Thrane, U., & Torp, J. (2010). *Fusarium* spp. associated with rice Bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. *Environmental Microbiology*, 12(3), 649-657.