

## FUNGAL SİSTEMATİKTEKİ MOLEKÜLER GELİŞMELER

Melike ÇEBİ KILIÇOĞLU İbrahim ÖZKOÇ  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 55200-Kurupelit, Samsun

Sorumlu Yazar: mcebi@omu.edu.tr

Geliş Tarihi: 09.11.2007

Kabul Tarihi: 14.03.2008

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

**Anahtar Kelimeler:** Fungal sistematiği, Teşhis, rDNA, ITS, PCR, DNA dizileme

## MOLECULAR DEVELOPMENTS IN FUNGAL SYSTEMATICS

**ABSTRACT:** Amazing developments in molecular biology have affected whole fields of biology positively in recent years. These developments have also showed their effects on fungal systematic and provided fast and reliable identifications. Before molecular studies, morphologic and biochemical techniques have been extensively used in researchs. But it was hard to obtain results, especially with the morphological examinations, and lost of time, experience have been required in these studies. The results of these studies have also been subjective, some times showing inconsistencies among the researchers. For these reasons, molecular techniques have started to used commonly with conventional techniques in fungal systematics. Some of these are, they are used in common recently, those based on PCR techniques and especially DNA sequences studies. In fungal systematics, it is both more reliable and less time consuming to work on DNA; the first molecule the changes have occurred. DNA molecule has been preferred for taxonomic studies because there are species-specific (evolutionary chronometer) regions which reflects the evolution of the organisms. The most common regions used in fungal systematics are 18S rDNA and internal transcribed spacer (ITS) of rDNA. ITS being the noncoding region evolves faster and is useful for comparing the strains of a species or species in a genus. These developments in molecular biology have provided rapid methods for identification of plant pathogenic fungi causing quality and yield reduction of economically important crops.

**Key Words:** Fungal systematic, Identification, rDNA, ITS, PCR, DNA sequence

### 1. GİRİŞ

Bilimsel yöntemler kullanılarak, canlıların bireysel benzerlik ve farklılıklarının geniş bir bakış açısı ile incelenmesi ve sınıflandırılması, asırlar önce başlamış ve günümüzde de devam eden bir süreçtir. Hayatın çeşitliliği ve yayılımıyla ilgili olayların modelini ortaya çıkaran ve ilgili ağacın yeniden yapılandırılmasını içine alan biyoloji sahası sistematiği olarak adlandırılır (Quicke, 1993). Sistematiğin amacı, organizmalar arasındaki evrimsel geçişin ve birbirleriyle olan ilişkilerin belirlenmesi (filogeni) ve daha sonra organizmaların sınıflandırılmasında bu bilgilerin kullanılmasıdır. Sistematiği alanında yapılan çalışmalarla, tüm yaşam formlarının filogenetik bir ağaçla bağlantısının kurulması, son 50 yılın en önemli keşiflerinden birini oluşturmaktadır (Lipscomb, 1998).

Canlıları sınıflandırırken jeolojik devirlerde kalmış bu tarihsel hikayeyi de hesaba katmak zorundayız. Bu nedenle her benzerliğin gerçek bir benzerlik (aynı orijinden gelen) olmadığını, ortak ata ve evrimsel tarihi paylaşmış paylaşımadıklarını canlı

sınıflandırılmasında temel kriter olarak ele almak durumundayız (Başbüyük ve ark., 2000). Filogenetik sistematiğin özü de türemiş (apomorfik) karakterler kullanarak ortak ata ilişkisini yeniden düzenlemek ve taksonları ortak ata temelinde gruplamaktır (Dupuis, 1984).

Son yıllarda moleküler biyoloji ve genetik alanında yaşanan baş döndürücü gelişmeler sistematiği alanında yeni tekniklerin ortaya çıkmasını kaçınılmaz hale getirmiş ve bu gelişmeler fungal sistematiğe de etkisini göstermiştir.

Funguslar her yıl tarımsal ürünlerde milyonlarca dolarlık zarara neden olmaktadır. Bu organizmaların neden olduğu hastalıkların kontrolü için, fungal türlerin teşhisi ve karakterizasyonu gereklidir (Zhang ve ark., 2007). Fungusların morfolojik karakterlerine göre yapılan sınıflandırmalar, moleküler sistematiğiyle belirlenen filogenetik ilişkilerle birlikte yeniden değerlendirilmelidir. Taksonlar arasında morfolojik karakterlerin birbirine anlamlı olmayan benzerliği, indirgenmiş olabileceği yada taksonlar arasında

ortadan kalkmış olduğu durumlarda, filogenetik analiz için moleküler karakterlerin kullanımı önem kazanmaktadır (Blackwell ve ark., 2007).

Geleneksel olarak fungusların sınıflandırılmasında temel kriter eşeyli üreme yapılarıdır. Moleküler karakterlerin kullanımının bir avantajı da, aseksüel fungusların sınıflandırılmasındaki belirsizliği ortadan kaldırıp onların en yakın akrabaları içinde sınıflandırılmalarını sağlamasıdır (Blackwell ve ark., 2007).

1970'lerden günümüze değin fungal sistematikte moleküler veriler tüm taksonomik seviyelerde kullanılmakta olup son yıllarda kullanım oranında önemli ölçüde artışlar olmuştur. Moleküler veriler Fungi alemindeki yüksek seviyeli taksonomik grupların ve büyük evrimsel soyların belirlenmesinde, düşük taksonomik seviyelerde ise türlerin, kısmi populasyonların ve bireylerin teşhisinde kullanılmaktadır. Ancak moleküler verilerin yaygın kullanımında bazı sınırlandırmalar da mevcuttur. Bunlardan bazıları, farklı fungal gruplar arasında yöntemlerin karşılaştırılabilirliği ve uyumluluğuyla ilişkiliyken bazıları fungusun adapte olduğu hayat döngüsünün çeşitliliğiyle ilişkilidir. Moleküler verilerdeki mevcut sınırlandırmalara rağmen, fungal sistematigi anlamamızı kolaylaştırdığı ve bu konuyla ilgili verilerdeki artışa bağlı olarak gelecekte sistematik uygulamalarda daha açıklayıcı olabileceği düşünülmektedir (Bridge ve ark., 2005).

Fungusların sistematigi oldukça değişkendir. Fungi alemi içindeki grupların belirlenmesi ve sınıflandırılma çabaları oldukça eski olmakla birlikte, 2004 yılında başlatılan ve şu anda da devam eden AFTOL adı verilen ortak bir çalışma ile (yeni moleküler filogenetik yöntemler kullanarak) fungusların tüm gruplarının en yüksek seviyede moleküler (filogenetik) sınıflandırılması hedeflenmiştir. Bu çalışmada toplam 195 taksonu içeren bir fungus grubuyla çalışılmış ve sonuçta 7 filum [Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Dikarya: (Ascomycota, Basidiomycota)] 10 subfilum, 35 sınıf, 129 ordo şeklinde bir sınıflandırma elde edilmiştir (Hibbett ve ark., 2007).

Bu projeye elde edilen yeni sınıflandırmalardaki en önemli değişiklik geleneksel olarak Chytridiomycota ve Zygomycota içerisinde sınıflandırılmış olan organizmalarla ilgilidir. Chytridiomycota oldukça sınırlandırılmış ve Blastocladiomycota ve Neocallimastigomycota ayrı flagellumlu filum içine alınmıştır. Geleneksel olarak Zygomycota içerisinde yerleşen taksonlardan Glomeromycota ve birkaç subfilum incertae sedis (Mucoromycotina, Entomophthoromycotina, Kickxellomycotina ve Zoopagomycotina) içinde değerlendirilmiştir.

Ayrıca Microsporidia Fungi alemine dahil edilmiş fakat bu grubun daha ileri seviyedeki ayrımından bahsedilmemiştir. Pozisyonları belirsiz birkaç bazal fungus cinsi (*Basidiobolus*, *Caulochytrium*, *Olpidium*

ve *Rozella* ) daha üst taksonlara yerleştirilmiştir (Hibbett ve ark., 2007).

## 2. FUNGAL SİSTEMATİK

Fungi alemi içinde yer alan organizmaların yaşam döngülerinde hem eşeyli hem de eşeysiz üreme safhaları yer alır. Fungusların sınıflandırılmasında kullanılan temel kriterler, yaşam döngülerinin eşeyli safhasında oluşturdukları bu üreme yapılarıdır (Moore-Landecker, 1996). Ancak eşeyli üreme yapıları özel koşullar altında oluşturulduğu için bazı fungusların eşeyli safhası ya henüz belirlenmemiş ya da bazı funguslarda bu safha tamamen ortadan kalkmış olabilir. Bundan dolayı günümüzde funguslar iki şekilde sınıflandırılmaktadır. Bunlardan, fungusların yaşam döngülerinin eşeyli safhalarında oluşturdukları fruktifikasyon yapıları, eşeyli sporları ve tallus yapıları kriter alınarak gerçekleştirilen sınıflandırma teleomorfik sınıflandırma olarak adlandırılır. Eşeyli üreme yapıları tesbit edilemediği için, bazı funguslar tallus yapıları ve eşeysiz sporları göz önüne alınarak sınıflandırılırlar, bu sınıflandırma biçimi ise anamorfik sınıflandırma olarak adlandırılır (Sneh ve ark., 1991).

Anamorfik sınıflandırmada kullanılan yöntemlerin ortak özelliği gözlemlere dayalı olması, fazla zaman alması ve hata yapma olasılığının fazla olmasıdır. Bazı fungusların sınıflandırılmasındaki bu belirsizlik çoğu zaman aynı taksona iki farklı isim verilmesine hatta farklı organizmalara da aynı ismin verilmesine neden olabilmektedir. Örneğin Mayaların taksonomisinde en önemli kaynaklardan biri kabul edilen Lodder ve Kreger-van Rij (1952) literatürüne göre, *Saitoella complicata* olarak teşhis edilmiş 2 maya izolatıyla (Himalayalardan izole edilen) daha sonra yapılan bir takım moleküler çalışmalar (mevcut türün morfolojik benzerliğine rağmen) bu iki izolatın farklı türler olduklarını ortaya çıkarmıştır. Yamazaki ve Komagata (1981)'in çalışmasına kadar önceki teşhisten hiç kimse şüphe duymamıştır. Literatürde, fenotipe dayalı hatalı teşhis konusunda oldukça fazla çalışma vardır (Reynolds ve Taylor, 1992).

Bu tür karışıklıkların önlenmesi için günümüzde güvenilirliğinden dolayı moleküler yöntemler sıklıkla kullanılmaya başlamıştır. Moleküler yöntemlerde ağırlıklı olarak kullanılan molekül DNA'dır. Evrimsel değişikliğin ilk olarak yansıdığı moleküller olan DNA ile yapılan araştırmalar daha güvenilir ve hızlı sonuçlara ulaşmamızı sağlayabilir (Taylor ve ark., 2000).

### 2.1. Fungal Sistematikte Yaygın Olarak Kullanılan Moleküler Yöntemler

Polimeraz zincir reaksiyonunun keşfiyle organizmaların genlerinin klonlanması ve bunların birbirleriyle karşılaştırılması sistematik alanda büyük bir kolaylık yaratmıştır.

#### 2.1.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Özgüllük ve duyarlılığından dolayı, PCR temelli

yöntemler fungusların teşhisi için kullanışlı olmakta ve fungal suçların, türlerin yada daha üst takson gruplarının belirlenmesi amacıyla kullanılabilir. PCR aracılığıyla elde edilen bilgiler sayesinde mevcut taksonlar için spesifik oligonükleotid primerlerin tasarlanması mümkün hale gelmiştir (Dieffenbach ve ark., 1993).

Fungal türler arasındaki polimorfik DNA dizilerinden biri olan ITS bölgesi, günümüzde bir türün doğru olarak tesbiti açısından iyi bir aday olarak görülmekte ve bu uygulama ile diğer tüm türlerden büyük ölçüde ayrılabilirler. Bununla birlikte, ITS dizilerindeki varyasyon ve bu varyasyonu doğrudan değerlendirebilen PCR temelli teknikler sayesinde fungusun izolasyonuna gerek duyulmaksızın konukçu bitkiler içindeki ve çevresindeki bir çok fitopatojenik fungal türün belirlenmesi mümkün hale gelmiştir (Maukhamedov ve ark., 1994).

Spesifik fungal primerlerle gerçekleştirilen PCR amplifikasyon yöntemleri sadece teşhiste değil, simbiyot ve zorunlu parazitler konusundaki çalışmaları da büyük oranda kolaylaştırmıştır. Örneğin normal izolasyon yöntemleriyle izolasyonu mümkün olmayan mikorizal fungus DNA'sının spesifik amplifikasyonu bitki köklerinden yapılabilmektedir (Di Bonita ve ark., 1995).

Fungal populasyonların karakterizasyonu ve taksonomisinde kullanılan PCR temelli bir çok yöntem vardır, bunlardan **Rastgele Amplifiye Olmuş Polimorfik DNA (RAPD)** uygulamaları başlangıçta yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Bu uygulamaların avantajı DNA dizisinin bilinmesini gerektirmemesidir. Bundan dolayı herhangi bir rastgele primer herhangi bir fungal DNA bölgesini amplifiye etmek için kullanılabilir. RAPD primerleri deneysel olarak seçilebilir ve çalışılan taksonlar arasında polimorfik olan RAPD bantlanma modelini bulmak için deneysel olarak test edilebilir. RAPD yöntemi fungusların ayırt edilmesinde, tür içi ve türler arası seviyede başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Brezilya'nın farklı coğrafik bölgelerindeki buğday bitkisinden elde edilen 20 *Bipolaris sorokiniana* izolatının genetik farklılığını araştırmak amacıyla RAPD yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan 70 primerden 30'undan amplifikasyon ürünü elde edilmiştir. RAPD analizleri sonucunda 19 izolatın daha yakın gruplarda yer aldığı belirlenmiştir. Bu çalışmada araştırılan izolatlar arasındaki ilişki ve genetik varyasyonun derecesiyle ilgili önemli bilgiler elde edilirken ortaya çıkan polimorfizm ve elektroforetik profiller bu fitopatojenlerin karakterizasyonu için bu yöntemin kullanışlı olduğunu ortaya çıkarmıştır (Müler ve ark., 2005). Japonya, USA, Malezya, Filipinler, Kolombiya ve Çin'den elde edilen *Aschersonia*'nın dört türüne ait 11 izolat ile yapılan çalışmada 17 RAPD primeri karakterize edilmiştir. Sonuç olarak *Aschersonia* izolatları arasındaki genetik çeşitlilik RAPD analizleriyle belirlenirken bu cinsin teşhis ve sınıflandırılmasında bu yöntemin kullanılabilirliği

ortaya çıkarılmıştır (JunZhi ve ark., 2004). Diğer yöntemlere göre daha kolay uygulanmasına rağmen, RAPD analizinin bir çok dezavantajı olabilir. Örneğin standart reaksiyon koşulları uygulanmasına rağmen, aynı RAPD şablonlarının oluşturulması ve bunların güvenilirliği açısından farklı laboratuvarlardan elde edilen sonuçlar her zaman uyumlu olmayabilir (Sharon ve ark., 2006). Ayrıca RAPD ile DNA çoğaltımında, saf DNA kalıbına ihtiyaç duyulması nedeniyle, karışık numuneden fungusların belirlenmesi amacıyla kullanılamaz (Majer ve ark., 1996).

ITS dizileri türler içinde nisbeten korunmuş olmasına karşın bir cinsin türleri arasında değişebilmesi nedeniyle, bu diziler **Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)** analizi ile fungal türlerin teşhisinde ve aynı zamanda hızlı prosedürlerin geliştirilmesinde ve tür spesifik primerlerin dizaynında yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Bridge ve ark., 1998). Üzümden elde edilen *Aspergillus* cinsine ait çok sayıda türün teşhisinde ITS-RFLP analizleri hızlı ve kolay bir yöntem olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada *HhaI*, *NlaIII* ve *RsaI* restriksiyon endonükleazları kullanılarak *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius* ve *A. aculeatus*'a ait dört farklı RFLP şablonuna ilaveten *A. niger*'e ait yeni bir RFLP şablonu belirlenmiştir (Martinez-Culebras ve Ramon, 2006). Elde edilen bu sonuçlar çok sayıda *Aspergillus* türünün teşhisinde araştırmacılara hız ve kolaylık sağlamıştır. Kuzey Amerika ve Avrasya'dan elde edilen 441 *Agaricus bisporus* izolatı ile yapılan RFLP ve populasyon genetiği analizleri, bu türde genetik olarak 4 farklı doğal populasyonun var olduğunu göstermiştir (Xu ve ark., 1997).

Son zamanlarda çeşitli organizmalar arasında polimorfizmi değerlendirmek amacıyla **Amplifiye Olmuş Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)** yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem funguslarda tür içi ve türler arası genetik varyasyonun belirlenmesi amacıyla uygulanmaktadır. AFLP her bir reaksiyonun çözünürlük seviyesi ve tekrarlanabilirliği açısından RAPD'e göre daha avantajlıdır. Ayrıca AFLP yöntemi özellikle tür içi seviyede birçok fungus arasındaki varyasyonların ortaya çıkarılmasında büyük potansiyele sahiptir (Bridge ve ark., 1998). Afrika'da yapılan bir çalışmada, beş farklı *Fusarium* türüne ait doğal bir populasyon içindeki genetik ilişkilerin belirlenmesi amacıyla AFLP yöntemi kullanılmıştır. *Fusarium* DNA'sı *EcoRI* and *MseI* restriksiyon endonükleazlarla kesilerek AFLP kalıpları ile birlikte, dört primer kombinasyonundan toplam 80 polimorfik AFLP profili elde edilmiştir. Sonuçlar *Fusarium*'un moleküler karakterizasyonu için bu yöntemin kullanılabilir olduğunu göstermiştir (Abdel-Satar ve ark., 2003).

Mikolojideki PCR uygulamalarının ilklerinden biri de, White ve arkadaşlarının (1990) çalışmasıdır. Bu çalışma fungusların filogenetik ve taksonomik ilişkilerini ortaya koymak amacıyla rDNA'nın direk

çoğaltılması ve nükleotid dizilerinin belirlenmesini içermektedir. Daha önce belirtildiği gibi, bu diziler hem değişken hem de korunmuş bölgeleri içerdiği için, farklı taksonomik seviyedeki organizmaların karşılaştırma ve ayrılmasına olanak sağlamıştır.

**DNA dizi analizi** organizmalar arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için çok kullanışlı bir yöntemdir. Bruns ve arkadaşları (1990) karşılaştırılan çok sayıda karakterin çözünürlük gücünü önemli derecede artırabileceği için filogenetik analizlerde DNA dizilerinin kullanılmasının yararlı olacağını ileri sürmüşlerdir. Bu yöntemin yararlarından biri de dizi varyasyon şeklinin gözlenebilmesi, yani bir değişimin transversiyon yada transisyon olup olmadığı, sessiz (silent) yada seçilmiş (selected) olup olmadığı gibi konularda aydınlatıcı olmasıdır. Ayrıca diğer bir yararı da nükleotid sapma derecesinin ölçülebilmesi, farklı laboratuvar sonuçlarının direk karşılaştırılabilmesi, dizilerin yayınlanması ve elektronik veri tabanlarında saklanması (GenBank, EMBL ve DDBJ), sonuçların doğrulanması ve bu uygulamaların diğer taksonlara suş yada klon elde etmeye gerek kalmaksızın uygulanabilmesi yada deneylerin tekrarlanabilmesine izin verecek özellikte olmasıdır. Filogenetik çalışmalarda dizi analizi için kullanışlı olduğu ispatlanmış DNA bölgeleri; çekirdek ve mitokondrial rDNA ve protein kodlayan genlerdir (Bridge ve ark., 1998). DNA dizi analizi *Trichoderma* taksonomisine önemli katkılar sağlamıştır. Bu yöntem kullanılarak yaklaşık atmışdan fazla tür tanımlanırken, iki yada daha fazla gen karakterize edilmiştir. Sonuç olarak moleküler analizler sayesinde morfoloji temeline dayalı olarak belirlenenden daha fazla türün varlığı ortaya çıkarılmıştır (Samuels, 2004). Pas funguslarının taksonomisi ve filogenisi oldukça tartışmalıdır. Çünkü bu organizmalar çok küçük morfolojik farklılıklarla birbirinden ayrılır ve karışık bir hayat döngüsüne sahiptir. Melampsoraceae familyasına ait pas fungusları arasındaki evrimsel ilişkileri araştırmak için küçük miktarda DNA'nın spesifik amplifikasyonuna izin verecek yeni yöntemler geliştirilirken pek çok türü için çekirdek ve mitokondriyal genlerinin nükleotid dizileri analiz edilmiş ve filogenetik ilişkiler ortaya çıkarılmıştır (Bruns, 2007).

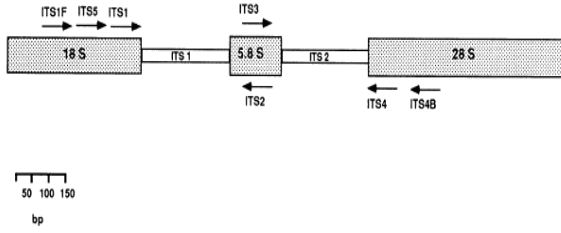
PCR amplifikasyonu için seçilecek ideal bölgenin özellikleri (Bruns ve Gardes, 1993) dikkate alındığında, ribozomal RNA'ların kodlandığı genler (rRNA) bu kriterlerin çoğunu içerir ve kapsamlı bir şekilde analiz edilebilirler. rDNA bölgelerinin çoğaltılması için primerlerin dizayn edilmesi, fungusların taksonomik çalışmalarını oldukça kolaylaştırmıştır (White ve ark., 1990).

## 2.2. Funguslarda rDNA Bölgesi

Protein sentezinin oldukça eski ve tüm organizmalarda ortak bir özellik olmasından dolayı organizmalar arasındaki evrimsel ilişkiyi ayırt edebilmek için rRNA'lar üstün moleküllerdir. rRNA eski, fonksiyonel olarak sabit, evrensel olarak yayılmış gösteren (yaygın) ve filogenetik farkı, ölçülü bir

şekilde koruyabilen bir moleküldür. Ayrıca rRNA gibi büyük bir moleküldeki olasılıkların sayısı oldukça fazladır ve iki dizi arasındaki benzerlikler filogenetik bir ilişkiyi işaret etmektedir. rRNA dizi analizlerinin sonuçları ve moleküler genetik çalışmalar organizmalar arasındaki doğru evrimsel ilişkileri yansıtacak şekilde filogenetik ağaçların elde edilmesini sağlamıştır. (Madigan ve ark., 2003).

rRNA genlerinin kodlandığı DNA dizileri funguslarda taksonomik ilişkilerin ve genetik varyasyonun belirlenmesi çalışmalarında geniş oranda kullanılmaktadır. Funguslarda çekirdek rDNA (rRNA gen kümesi) ardışık tekrarlanan rDNA birimleri olarak organize olmuştur (Salazar ve ark., 2000) (Şekil 2.1). rRNA gen kümesi hem çekirdek hem de mitokondriyalde bulunur ve oldukça korunmuş ve değişken bölgelerden meydana gelir (White ve ark., 1990). Fungal çekirdek rRNA genleri her genomda birkaç yüz kopyası olan, ardışık tekrarlanan yapılar olarak düzenlenmiştir. Bu tekrarlanan birim sayısının *Rhizoctonia solani* AG4 izolatlarında her bir haploid genomda 59 olduğu belirlenmiştir (Vilgays ve Gonzales, 1990). Her bir birimde üç rRNA geni bulunmaktadır: küçük rRNA geni (18S vb.), 5.8S rRNA geni ve büyük rRNA geni (28S vb.). Gen kümesinin sonunda yer alan 5S rRNA geni ise fungal taksona bağlı olarak tekrarlayan birim içinde olabilir veya olmayabilir. 5.8S rRNA geni ise funguslarda mitokondriyal genomda bulunmaz. Korunmuş diziler büyük alt birim (LSU) ve küçük alt birim (SSU) genlerinde bulunur. LSU ve SSU genleri funguslarda bir çok taksonomik çalışmada kullanılmıştır. *Cantharellus*'un bir çok türüyle ilgili taksonomik karışıklık vardır. Bir çok izolat morfolojik karakterleri dikkate alınarak ne *Cantharellus* ne de *Craterellus* olarak sınıflandırılmaktadır. LSU genlerinin dizi analizine dayanan son filogenetik çalışmalar şu anda *Cantharellus* cinsi içinde sınıflandırılan bazı türlerin moleküler kanıtlarla *Craterellus* olduğunu doğrulamıştır (Dahlman ve ark., 2000). *Tilletia*'ya ait izolatlarla yapılan LSU rDNA dizi analizlerinden elde edilen verilerin, filogenetik olarak morfolojik karakterlerden daha fazla bilgi verici (informatif) olabileceği gösterilmiştir (Castlebury ve Carris, 2005). Alt birimler arasındaki ara (spacer) bölgeleri, transkripsiyonu yapılmayan bölgeler (internal transcribed spacer-ITS) ve genler arası bölge (intergenic spacer-IGS) olarak adlandırılır. Bunlar alt birim dizilerinden daha değişkendir ve tek bir cins içindeki türler arasındaki yada tür içi (intraspesifik) popülasyonlar arasındaki çalışmalarda geniş oranda kullanılmaktadır. Funguslarda 18S rDNA bölgesi nisbeten yavaş bir şekilde evrim geçirir ve uzak akraba organizmaların kıyaslanmasında kullanışlıdır. Ancak kodlanmayan bölge (ITS ve IGS) daha hızlı evrim geçirir ve bir tür içindeki suşların yada bir cins içindeki fungal türlerin karşılaştırılması için kullanışlıdır. 28S rDNA'nın bazı bölgeleri de türler arasında değişkendir (Lee ve Taylor, 1992).



Şekil 2.1. Funguslarda rDNA bölgesi (Boysen ve ark., 1996).

### 2.2.1. Ara (Spacer) Bölgeler

Bir fungal cinsin yakın akraba türleri arasındaki ayrım için, farklı organizmalara (*Verticillium*, *Fusarium*, *Boletus* ve *Rhizoctonia*) ait bu ara bölgelerdeki RFLP yada dizi farklılıklarının kullanıldığı bir çok örnek çalışma mevcuttur. (Nazar ve ark., 1991, Schilling ve ark., 1996, Leonardi ve ark., 2005, Hyakumachi ve ark., 1998).

#### 2.2.1.a. ITS (Transkripsiyonu Yapılmayan Bölgeler) Bölgeleri

Kodlanmayan iki değişken bölgeden meydana gelen ITS bölgesi, oldukça korunmuş küçük alt birim (SSU) ile 5.8S alt birimi arasında (ITS1 bölgesi) ve de büyük alt birim (LSU) rRNA genleri ile 5.8S alt birimi arasındaki bölgede (ITS2) yer almaktadır. ITS bölgesi 4 temel nedenle funguslarda moleküler karakterizasyon çalışmaları için özellikle kullanışlıdır (White ve ark., 1990, Bruns ve ark., 1991, Lee ve Taylor, 1992):

1. ITS bölgesi nispeten küçüktür (500-800 bp) ve evrensel tek bir primer çifti (rRNA alt birimleri içindeki korunmuş bölgelerin komplementeri) kullanılarak PCR ile kolaylıkla çoğaltılabilir.
2. rDNA birimlerinin çok sayıda tekrarlarının olması nedeniyle, seyreklik yada oldukça degrade olmuş DNA örneklerinden bile ITS bölgesi kolaylıkla çoğaltılabilir.
3. Morfolojik açıdan farklı türler arasında ITS bölgesi yeterince değişken olabilir ve bundan dolayı ITS-RFLP restriksiyon verileri genetik uzaklığı tahmin etmek için kullanılabilir böylece filogenetik ve sistematik analizler için karakterler sağlayabilir.
4. ITS türe özgü problemleri, bir kromozomal kütüphane oluşturmaya gerek kalmaksızın hızlı bir şekilde PCR ile üretilebilir. Bir çok araştırmacı dizilerin tekrarlayan birimler şeklinde olması ve türler arasında değişken, tür içinde benzer olma eğiliminde olmasından dolayı, türe özgü problemleri geliştirmek için dizileri ITS bölgesinden seçmektedir.

White ve arkadaşlarının (1990) dizayn ettikleri ITS primerleri, farklı funguslara ait bir çok ITS dizisinin de belirlenmesine olanak sağlamıştır. Bu sayede, bazı cinslerin (örneğin *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Penicillium*, *Fusarium*) türleri arasındaki filogenetik ve taksonomik ilişkiler belirlenebilmiştir. *Fusarium* cinsinin hızlı bir şekilde teşhis edilebilmesi için iki taksona özgü spesifik primerler (ITS-Fu-f, ITS-Fu-r) geliştirilmiştir. Bu

primerler sayesinde *Rhizoctonia solani* ve *Macrophomina phaseolina* DNA'larından PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmezken pamuk fidelerinde hastalığa neden olan *Fusarium* cinsinin DNA'sı amplifiye edilerek hızlı bir şekilde teşhisi gerçekleştirilmiştir (Abd-Elsalam ve ark., 2003).

*Boletus edulis* ektomikorhizal bir tür kompleksidir. Bu funguslar oldukça farklı morfolojik özelliklere sahip olduğu için türlerin belirlenmesi oldukça zordur. Bu çalışmada rDNA ITS dizi analizi yapılarak İtalya'dan elde edilen çok sayıda *B. edulis* türü analiz edilmiştir. Moleküler analizler *B. edulis*, *B. aventivalis*, *B. pinophilus* ve *B. aereus* türleri arasındaki ayrım ve içindeki ayrıma olanak sağlarken, filogenetik ilişkileri de ortaya çıkarmıştır (Leonardi ve ark., 2005). *Ophiosphaerella* cinsine ait türler bir çok bitkide hasara sebep olur ve bu türlerin teşhisi zor ve zaman alıcıdır. *Ophiosphaerella agrostis*'in spesifik olarak teşhisi moleküler yöntemlerle mümkün olmuştur. Bu türün ITS1 ve ITS2 bölgesi için spesifik primerler geliştirilmiştir. Bu çalışmada diğer patojenler amplifikasyon ürünü oluşturamazken seksen *Ophiosphaerella agrostis* türüne ait ITS bölgesi amplifikasyon ürünü oluşturmuş ve bu sayede teşhis süreci oldukça hızlı ve güvenilir olarak gerçekleştirilmiştir (Kaminski ve ark., 2005).

PCR ile çoğaltılan (amplifiye edilen) rDNA ITS dizileri *Verticillium albo-atrum* ve *V. dahliae*'nin karakterizasyon, teşhis ve belirlenmesinde kullanılmıştır (Nazar ve ark., 1991). Bu çalışmada hem ITS1 hem de ITS2 içindeki homolog olmayan farklı nükleotid kümelerinin belirlenmesi sayesinde, bu iki önemli bitki patojeninin güvenilir bir şekilde teşhis edilmesini sağlamıştır. Maukhamedov ve arkadaşları da (1994) aynı prensibi kullanarak *V. tricorpus*'u ayırt etmek için 5.8-28S ITS bölgesinin amplifikasyon ürünlerinin dizilemesini yapmıştır. Bu çalışmada 5.8S dizisinin *Verticillium*'un türleri arasında korunduğu fakat *V. tricorpus*'un ITS bölgesinin tür spesifik primerlerin oluşturulmasına izin verecek kadar farklı olduğu belirlenmiştir.

*Fusarium* cinsi oldukça heterojen bir gruptur, morfolojik ve biyokimyasal kriterlere göre türlerin teşhisi zor ve karışıktır. 28S rDNA ve ITS bölgesinin RFLP analizleriyle tür seviyesinde birkaç *F. oxysporum* suşu ayırt edilmiştir (Edel ve ark., 1995). Yine son dönemlerde *F. avenaceum*, *F. culmorum* ve *F. graminearum* türlerini ayırt edebilmek için ITS bölgesinin dizi varyasyonlarından yararlanılmıştır. *F. culmorum* ve *F. graminearum*'da ITS bölgesi türe özgü primerler elde etmeye olanak sağlayacak derecede polimorfik iken *F. culmorum* ve *F. graminearum*'u *F. avenaceum*'dan ayırt etmek için ITS1 ve ITS2 bölgelerindeki dizi varyasyonunun yeterli olmadığı belirlenmiştir (Schilling ve ark., 1996).

*Rhizoctonia* cinsi de yaygın bir bitki patojeni olup bu form cins içinde tarımsal açıdan önemli bir çok tür grubu bulunmaktadır. Bu organizmaların da diğer funguslar gibi eşeyli ve eşeysiz safhaları bulunmakta

(Sneh ve ark., 1996), fakat eşeyli safhanın tesbiti her zaman mümkün olmadığı için bu grubun ayrımı anastomoz temeline dayalı olarak gerçekleştirilmektedir (Özkoç ve ark., 2002; Karaca ve ark., 2002). Diagnostik protokoller geliştirmek ve filogenetik akrabalığı belirleyen karakterleri değerlendirmek amacıyla, *Rhizoctonia*'daki rRNA genlerinin farklı anastomoz grupları (AG) arasındaki ilişkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, PCR ile çoğaltılan rRNA genlerinin binükleat (BN) *Rhizoctonia* türleri ve *R. solani*'nin farklı AG'leri içindeki genetik akrabalığı incelemek için kullanışlı olacağı belirlenmiştir (Liu ve ark., 1995; Cubeta ve ark., 1996; Hyakumachi ve ark., 1998). Bu çalışmalardan birinde Liu ve Sinclair (1993) birkaç *R. solani* alt grubunun (AG1 ve AG2) ITS1-5.8S-ITS2 amplifikasyon ürünlerinin restriksiyon analizini yapmıştır. Bu çalışmalarda AG1 içinde altı alt grup ve AG2 içinde beş alt grup belirlenmiştir. Boysen ve arkadaşları (1996) 9 adet *R. solani* AG4 izolatu ile ITS1-5.8S-ITS2 rDNA bölgelerinde bir asimetrik PCR tekniği kullanmıştır. Bu veriler AG4 içindeki 3 alt grubun teşhisi için filogenetik analizlerde kullanılmıştır. Mazzola ve arkadaşları (1996) ise, *R. oryzae* ve *R. solani* AG1, AG5, AG6 ve AG8'in ITS1 ve ITS2 dizilerini karşılaştırarak *R. oryzae* için tür spesifik primerleri geliştirmişlerdir. Bu primerler sayesinde, *R. solani* AG8 ve *R. oryzae* ile birlikte enfekte olmuş buğday dokularından *R. oryzae*'yi spesifik olarak belirlemek mümkün olmuştur.

#### 2.2.1.b. IGS (Genler Arası Bölge) Bölgesi

ITS bölgesinin aksine, IGS bölgesi üzerine çalışmalar daha azdır. Arora ve arkadaşları (1996) IGS bölgesinden elde ettikleri RFLP profillerini kullanarak *V. chlamyosporium* ve yakın akraba türler içindeki değişkenliği belirlemişler, genel olarak tür içinde bu bölgenin heterojenliğinin düşük bir seviyede olduğunu ve farklı IGS tiplerinin türe özgü olabileceğini tesbit etmişlerdir. IGS bölgesi *Fusarium*'da da çalışılmıştır. Appel ve Gordon (1995) PCR amplifikasyon ürünlerinin RFLP'si ile *F. oxysporum*'da bu bölgenin heterojen olduğunu göstermiştir. IGS bölgesi ile ilgili diğer bir çalışma da *Pythium ultimum*'da yapılmış ve IGS bölgesinin bu türde de heterojen olduğu tesbit edilmiştir (Klassen ve Buchko, 1990). Benzer durum *Puccinia gramininis*, *V. albo-atrum* ve *V. dahliae*'nin IGS bölgesi için de rapor edilmiştir. Bu sonuçlar da, IGS bölgesinin türler arasındaki ayrım için kullanılabilir olduğunu göstermiştir (Morton ve ark., 1995). Her ne kadar ITS bölgesi kadar yoğun çalışılan bir bölge olmasa da, bu bölgenin de en azından çalışılan fungal türler için ayırt edici olduğu tesbit edilmiştir.

### 3. SONUÇ VE ÖNERİLER

Fungal sınıflandırma çalışmalarında, yeterli ve güvenilir sonuçlara ulaşmak için sadece geleneksel yöntemlerin (morfolojik, biyokimyasal vb.) kullanılması günümüzde kabul gören bir uygulama

olmaktan çıkmaktadır. Gelişmiş teknolojilerin sistematik alana uygulanması sonucunda, moleküler temelli çalışmalarla daha hızlı, daha güvenilir ve uluslararası geçerliliği olan sonuçlara ulaşılabilmektedir. Moleküler alandaki bu gelişmeler göz önüne alındığında, sistematikçilerin geleneksel yöntemlere göre teşhisini yaptıkları organizmaları moleküler olarak da incelemeye alması zaman açısından fayda sağlayacağı gibi yapılan çalışmaların daha güvenilir olmasını da sağlayacak ve kişisel hataları ve onun doğuracağı sonuçları da en aza indirebilecektir. Şu anda pahalı bir işlem gibi görülse de, sürekli gelişen teknoloji bu analizleri hem daha pratik hem de daha ucuz hale getirmektedir.

### 4. KAYNAKLAR

- Abd-El Salam, K.A., Aly, I.N., Mohmed, A., Abdel-Satar, M.A., Khalil, M.S., Joseph, A., Verreet, J.A., 2003. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. African Journal of Biotechnology. Vol. 2, pp. 82-85.
- Abdel-Satar, M.A., Khalil, M.S., Mohmed I.N., Abd-El Salam K.A., Verreet, J.A., 2003. Molecular phylogeny of *Fusarium* species by AFLP fingerprint African Journal of Biotechnology. Vol. 2 (3), pp. 51-55
- Appel, D.J., Gordon, T.R., 1995. Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. Experimental Mycology 19, 120-128.
- Arora, D.K., Hirsch, P.R., Kerry, B.R. 1996. PCR based molecular discrimination of *Verticillium chlamyosporium* isolates. Mycological Research 100, 801-809.
- Başbüyük, H.H., Bardakçı, F. Belshaw, R., Quicke, D.L.J., 2000. Phylogenetic Systematics: A Practical Guide to Theory and Practice. Önder Matbaa Sivas, 134p.
- Blackwell, M., Vilgays, R., James, T.Y., Taylor, J.W., 2007. Fungi. Available From <http://tolweb.org/Fungi/2377/2007.07.13>
- Boysen, M., Bojra, M., del Moral, C., Salzar, O., Rubio, V., 1996. Identification at strain level of *Rhizoctonia solani* AG4 isolates by direct sequence of asymmetric PCR Product 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, New York, 357p.
- Bridge, P.D., Spooner, B.M., Roberts, P.J., 2005. The Impact of Molecular Data in Fungal Systematics. Advances in Botanical Research, 42, 33-67.
- Bruns, T. D., Fogel, R., Taylor, J. W., 1990. Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. Mycologia 82, 175-184.
- Bruns, T.D., Vilgays, T.J., Taylor, J.W., 1991. Fungal molecular systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 22, 525-564.
- Bruns, T.D., Gardes, M., 1993. Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi-taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. Molecular Ecology 2, 233-242.
- Bruns, T., 2007. Molecular Systematic Investigation of Rust Fungi Associated with Pinaceae. Available from <http://www.sciencestorm.com/award/8918454.html>
- Castlebury, L.A., Carris, K.V., 2005. Phylogenetic analysis of *Tilletia* and allied genera in order Tilletiales

- (Ustilaginomycetes; Exobasidiomycetidae) based on large submit nuclear rDNA sequences. *Mycologia* 97, 888-900.
- Cubeta, M.A., Vilgayus, R., Gonzales, D., 1996. Molecular analysis of ribosomal RNA genes in *Rhizoctonia* fungi. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp.81-86.
- Dahlman, M., Danell, E., Spatafora, J.W., 2000. Molecular systematics of *Craterellus*: cladistic analysis of nuclear LSU rDNA sequence data. *Mycol. Res.* 104 (4) 388-394.
- Di Bonita, R., Elliott, M.L., Desjardin, E.A., 1995. Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2809-2810.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M.J., Dveksler, G.S., 1993. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Applications* 3, S30-S37.
- Dupuis, C., 1984. Willi Hennig's impact on taxonomic thought. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 1-24.
- Edel, V., Steinberg, C., Avelance, I., Laguerre, G., Alabouvette, C., 1995. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology* 85, 579-585.
- Hibbett, S.A., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Lumbsch H., Lutzoni, T., Matheny, F., McLaughlin, P.B., Powell, D. J., Redhead, M.J., Schoch, S., Spatafora, C.L., Stalpers, J.W., Vilgalys, J.A., Aime, R., Aptroot, M.C., Bauer, A., Begerow, R., Benny, D., Castlebury, G.L., Crous, L.A., Dai, P.W., Gams, Y.C., Geiser, W., Griffith, D.M., Gueidan, G.W., Hawksworth, C., Hestmark, D.L., Hosaka, G., Humber, K., Hyde, R.A., Ironside, K.D., Klösch, J.E., Kurtzman, U., Larsson, C.P., Lichtwardt, K.H., Longcore, R., Midlikowska, J., Miller, J., Moncalvo, A., Mozley-Standridge, J.M., Oberwinkler, S., Parmasto, F., Reeb, E., Rogers, V., Roux, J. D., Ryvarden, C., Sampaio, L., Schüssler, J. P., Sugiyama, A., Thorn, J., Tibell, R. G., Untereiner, L., Walker, W.A., Wang, C., Weir, Z., Weiss, A., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.J., Zhang, N., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. 111:509-547.
- Hyakumachi, M., Mushika, T., Ogiso, Y., Toda, T., Kageyama, K., Tsuge, T., 1998. Characterization of a new cultural type (LP) of *Rhizoctonia solani* AG2-2 isolated from warm-season turgrasses, and its genetic differentiation from other cultural types. *Plant Pathology* 47.
- JunZhi, Q., ZhiPeng, H., Jieru, P., XueQin, X., YanPing, Z., ShaoSheng, Z., XiOng, G., 2004. RAPD and LSU rDNA sequences analyses of entomogenous fungus *Aschersonia*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, Vol.12, pp, 578-582.
- Kaminski, J., Dernoeden, P., O'Neill, N.R., Whetzel, H.C. 2005. A PCR-based method for the detection of *Ophiopogon prostratus* in creeping bentgrass. *Plant Disease*. 89:980-985.
- Karaca, G.H., Özkoç, I., Erper, İ., 2002. Determination of the Anastomosis Groupings and Virulence of *Rhizoctonia solani* Kuhn Isolates Associated with Bean Plants Grown in Samsun/Turkey, *Pakistan Journal of Biological Sciences* 5(4): 434-437.
- Klassen, G.R., Buchko, J., 1990. Subrepeat structure of the intergenic region in the ribosomal DNA of the oomycetous fungus *Pythium ultimum*. *Current Genetic* 17, 125-127.
- Lee, S.B., Taylor, J.W., (1992). Phylogeny of five fungus-like protist *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and evolution* 9,636-653.
- Leonardi, M., Paolocci, F., Rubini, A., Simonini, G., Pacioni, G., 2005. Assessment of inter and intra-specific variability in the main species of *Boletus edulis* complex by ITS analysis. *FEMS Microbiology Letters* 243, 411-416
- Lipscomb, D., 1998. Basics of cladistic Analysis. Available from [www.gwu.edu/~clade/faculty/lipscomb/Cladistics.pdf](http://www.gwu.edu/~clade/faculty/lipscomb/Cladistics.pdf)
- Liu, Z.L., Sinclair, J.B., 1993. Differentiation of intraspecific groups within anastomosis group I 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 distinctness of anastomosis group 10 from other groups in *Rhizoctonia* species complex. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2659-2664.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker. J., 2003. *Brock Biology of Microorganisms*, tenth edition, Pirence Hall, Pearson Educatin International.
- Majer, D., Mithen, R., Lewis, B.G., Vos, P., Oliver, R.P., 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycological Research* 100, 1107-1111.
- Martinez-Culebras, P.V., Ramon, D., 2006. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 113, pp. 147-153.
- Maukhamedov, R., Hu, X., Nazar, R.N., Robb, J., 1994. Use of polymerase chain reaction- amplified ribosomal intergenic sequences for the diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Phytopathology* 84, 256-259. Mazzola, M., Wong, O.T., Cook, R.J., 1996. Virulence of *Rhizoctonia oryzae* and *R. solani* AG-8 on wheat and detection of *R. oryzae* in plant tissues by PCR. *Phytopathology* 86, 354-360.
- Moore-Landecker, E., 1996, *Fundamentals of the Fungi*, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. Sf 574.
- Morton, A., Tabrett, A.M., Carder, J.H., Barbara D.J., 1995. Sub-repeat sequences in the ribosomal RNA intergenic regions of *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae*. *Mycological Research* 99, 256-266.
- Müller, M.V.G., Germani, J.C., Van Der Sand, S.T., 2005. The use of RAPD to characterize *Bipolaris sorokiniana* isolates. *Genet. Mol. Res.* 4 (4): 642-652.
- Nazar, R.N., Hu, X., Schmidt, J., Culham, D., Robb, J., 1991. Potential use of PCR amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogen. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39, 1-11.
- Özkoç, İ., Karaca, G.H., Erper, İ., 2002. Pathogenicity of *Rhizoctonia repens* Bernard on different plants and its effect on the suppression of root-rot on cucumber plants. *Acta Horticulture*, Vol 579, 463-467.
- Quicke, D. L.J., 1993. *Principles and Techniques of Contemporary Taxonomy*. Blackie Academic & Professional, London, 311 pp.
- Reynolds, D.R., Taylor, J.W., 1992. *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal*

- Systematics. Cab International. Newport Oregon. 375 pp.
- 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*. Mycol. Res. 104, 281-285.
- Samuels, G.J., 2004. Changes in taxonomy, occurrence of the sexual stage and ecology of *Trichoderma* spp. Phytopathology 94, 138
- Schilling, A.G., Moller, E.M., Geiger, H.H., 1996. Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* ve *F. avenaceum*. Phytopathology 86, 515-522.
- Sharon, M., Kuninaga, S., Hyakumachi, M., 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.
- Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A., 1991. Identification of *Rhizoctonia* species, APS PRESS The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota, USA. Sf 133.
- Sneh, B., Jabaji -Hare, S., Neate, S., Dijst, G., 1996. *Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, and Disease Control. Kluwer Academic Press, Dorcrecht, p. 578.,
- Taylor, J. W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S., Fisher, M. C., 2000. Phylogenetic species recognition and species concept in fungi. Fungal Genetic and Biology 31, 21-32.
- Vilgalys, R., Gonzales, D., 1990. Ribosomal DNA Restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 80, 151-158.
- 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, pp. 315-322.
- Xu, J., Kerrigan, R.W., Sonnenberg, A.S., Callac, P., Horgen, P.A., Anderson, J.B., 1998. Mitochondrial DNA variation in natural populations of the mushroom *Agaricus bisporus*. Molecular Ecology 7, 19-33.
- Zhang, N., Sung, G., Castlebury, L.A., Seifert, K.A., Rossman, A.Y., Rogers, J.D., Miller, N., Huhndorf, S.M., Schoch, C.L., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., 2007. An overview of Molecular Phylogeny of the Sordariomycetes. Mycologia. 98, 1076-1087.