

**DÜNYANIN DEĞİŞİK YÖRELERİNDEN
İZOLE EDİLEN *Rhizoctonia zae* (*Waitea
circinata* var. *zae*) İZOLATLARININ
FİLOGENETİK İLİŞKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

EMİNE BANU KİBAROĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DÜNYANIN DEĞİŞİK YÖRELERİNDEN İZOLE EDİLEN *Rhizoctonia zae* (*Waitea circinata* var. *zae*) İZOLATLARININ FİLOGENETİK İLİŞKİLERİNİN
BELİRLENMESİ

EMİNE BANU KİBAROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKADEMİK DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ

SAMSUN-2009

T.C.

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından 22/01/2009 tarihinde yapılan sınav ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ

Üye: Yrd. Doç. Dr. Haydar KARAKAYA

Üye: Yrd. Doç. Dr. Mustafa EVREN

ONAY:

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../200.

Prof. Dr. Hasan GÜMÜŞ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZ

DÜNYANIN DEĞİŞİK YÖRELERİNDEN İZOLE EDİLEN *Rhizoctonia zae* (*Waitea circinata* var. *zae*) İZOLATLARININ FİLOGENETİK İLİŞKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Bu çalışmada, dünyanın değişik bölgelerinden izole edilmiş, *Waitea circinata* var. *zae* izolatları (22 adet) kullanılmıştır.

Çalışmalar sırasında, elde edilmiş olan izolatların öncelikle kültürel morfolojisi incelenmiş, bu özelliklerin literatürde belirtilen özelliklerle uyumlu olduğu tespit edilmiştir. İzolatların morfolojik olarak değişken olduğu belirlenmiş olsa da, kültürel morfolojiye dayalı olarak *Waitea circinata* var. *zae* içinde altgrup ayrımı yapılamamıştır.

Makroskobik anastomoz çalışmaları *Waitea circinata* türü içindeki izolatlar arasında genetik bir ilişkinin varlığını göstermiş fakat, bu özelliklerle ilişkili grupların ayrımı yapılamamıştır.

İzolatlar genetik olarak 2 farklı yöntemle değerlendirilmiştir: rDNA-ITS PCR-RFLP ve rDNA-ITS dizi analizi. Her iki yöntemde de, öncelikle ITS 1 ve ITS 4 primerleri kullanılarak rDNA-ITS gen bölgesi PCR işlemi ile çoğaltılmıştır.

PCR-RFLP çalışmasında, elde edilen DNA bölgesi saflaştırıldıktan sonra *Hha*I, *Mse*I ve *Taq*^aI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Enzimatik kesim sonucu oluşan şablonlar kullanılarak UPGMA ağacı elde edilmiştir. Elde edilen ağaç bazı izolatlar hariç grupların ayrılabilirdiğini ve her grup içindeki farklılıklar olduğunu göstermiştir.

rDNA-ITS dizi analizi ile her bir izolatın ilgili DNA bölgesinin dizileri belirlenmiş ve hizalama yapıldıktan sonra 2 farklı filogenetik teknik ile analiz edilmiştir. Bu analizlerin sonucunda, grupların ayrımının rDNA-ITS dizi analiziyle PCR-RFLP'ye göre daha iyi bir şekilde yapılabildiği görülmüş ve özellikle *Waitea circinata* var. *zae* içinde 2 alt grubun olabileceği ilk kez tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Waitea circinata* var. *zae*, *Rhizoctonia zae*, PCR-RFLP, rDNA-ITS dizi analizi

ABSTRACT**DETERMINATION OF PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF *Rhizoctonia zea* (*Waitea circinata* var. *zea*) ISOLATES ISOLATED FROM THE VARIOUS REGIONS OF THE WORLD**

In this study, isolates of *Waitea circinata* var. *zea* (22 piece), isolated from various regions of the world, were used.

During studies, cultural morphologies of isolates obtained were examined and determined that these properties was in consonance with the literature. Although it was found out that isolates were different morphologically, subgroup differentiation in relation with these properties were not made.

Macroscopic anastomosis reactions implied presence of genetic relationship among isolates within *Waitea circinata* var. *zea*, but failed to differ the isolates.

The isolates were analysed with 2 different genetic methods: rDNA-ITS PCR-RFLP and rDNA-ITS sequence analysis. For these two methods, rDNA-ITS regions were initially amplified by PCR using universal primers ITS1 and ITS 4.

For PCR-RFLP analysis, the purified PCR products were digested with restriction enzymes *Hha*I, *Mse*I and *Taq*^oI. Then UPGMA trees were obtained using the resultant enzyme patterns. The tree revealed that the groups were able to distinguish from each other and differences in groups existed.

With rDNA-ITS sequence analysis, phylogenetic relations between isolates were determined with 2 different phylogenetic algoritms (NJ and Parsimoni) after aligning the homolog DNA residues. In results of these analysis, it was determined that differentiation of the group could make better with ITS-sequence anlysis than those of PCR-RFLP and *Waitea circinata* var. *zea* were able to cluster 2 sub-group at first time in the world.

Key Words: *Waitea circinata* var. *zea*, *Rhizoctonia zea*, PCR-RFLP, rDNA-ITS sequence analysis

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın tüm aşamalarında ilgi, yardım ve desteğini sakınmayan, önerileriyle çalışmalarına yön veren değerli Hocam Sayın Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ'a,

Tez çalışmam sırasında değerli bilgilerinden yararlandığım Doç. Dr. İslam GÜNDÜZ'e,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocalarım Araş. Gör. Melike ÇEBİ KILIÇOĞLU ve Araş. Gör. Cem Tolga GÜRKANLI'ya,

Eğitim yaşamım boyunca benden maddi ve manevi her türlü fedakârlığı esirgemeyen ve her zaman yanımda olan annem Yüksel KİBAROĞLU ve babam Beşir KİBAROĞLU'na,

Çalışmalarım süresince ilgi ve desteklerini gördüğüm arkadaşlarım Arş. Gör. Esra KARA ve Nuray ÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Funguslar.....	3
2.1.1. Fungusların Genel Özellikleri.....	3
2.1.2. Fungusların Tarihçesi.....	4
2.2. <i>Rhizoctonia</i> Form Cinsi.....	6
2.2.1. <i>Rhizoctonia</i> spp. Üzerine Çalışmaların Sonuçları.....	7
2.3. Teleomorf: <i>Waitea circinata</i> Hakkında Genel Bilgi.....	8
2.4. <i>Rhizoctonia zea</i> ve Oluşturduğu Hastalıklar.....	9
2.5. <i>Rhizoctonia</i> Sistematğinde Kullanılan Yöntemler.....	10
2.6. <i>Rhizoctonia</i> Sistematğinde Kullanılan Genetik Markerlar.....	12
2.6.1. Total DNA.....	12
2.6.2. Mitokondriyal DNA.....	13
2.6.3. Protein Genleri.....	14
2.6.4. Nüklear rDNA.....	14
2.6.5. Biyokimyasal Yöntemler.....	17
2.6.5.1. İzozim Analizi.....	17
2.6.5.2. Yağ Asidi Analizleri.....	18
2.6.5.3. Elektroforetik Karyotiplendirme.....	18
2.7. Genomik Parmakizi Analizi.....	19
2.7.1. RAPD Yöntemi.....	19
2.7.2. AFLP Yöntemi.....	19
2.7.3. RFLP Yöntemi.....	20
2.7.5. PCR – RFLP Yöntemi.....	20
2.7.6. rDNA Dizi Analizleri.....	21
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Kullanılan <i>Rhizoctonia</i> İzolatları.....	23
3.2. Yöntemler.....	23
3.2.1. İzolatların Aktifleştirilmesi.....	23

3.2.1.1. Kullanılan Besiyeri.....	23
3.2.1.2. Stok Kùltürlerin Patates Dekstroz Agar Besi Ortamına Ekimi.....	23
3.2.2. İzolatların Kültürel Olarak İncelenmesi.....	25
3.2.3. İzolatların Makroskobik Anastomoz Durumlarının Tespiti.....	25
3.2.3.1. Makroskobik Anastomoz Durumunun Tespiti İçin Kullanılan Besiyeri.....	25
3.2.3.2. PDCA Besiyerine İzolatların Ekimi ve İncelenmesi.....	25
3.2.4. <i>Rhizoctonia</i> İzolatlarından DNA İzolasyonu.....	26
3.2.4.1. DNA İzolasyonu İçin Kuru Misel Elde Edilmesi.....	26
3.2.4.2. DNA İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı.....	27
3.2.4.3. DNA İzolasyonu.....	30
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	31
3.2.5.1. Agaroz Jelin Hazırlanması.....	31
3.2.5.2. Agaroz Jelin Yürütülmesi.....	32
3.2.5.3. Agaroz Jeldeki DNA'nın Görüntülenmesi.....	32
3.2.6. PCR ile ITS1-5.8S-ITS2 Bölgesinin Çoğaltılması.....	33
3.2.6.1. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	34
3.2.7. PCR-RFLP.....	35
3.2.7.1. RFLP Verilerinin Analizi.....	36
3.2.8. ITS1-5.8S-ITS2 Bölgesi DNA Dizileme.....	36
3.2.8.1. Dizileme Verilerinin Analizi.....	36
3.2.9. Dizileme Verilerinin Arasındaki Filogenetik İlişkinin İncelenmesi.....	36
3.2.9.1. "Neighbor Joining – Bootstrap" Analizi.....	37
3.2.9.2. Parsimoni Analizi.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Çalışılan <i>Rhizoctonia</i> İzolatlarının Kültürel Morfolojisi.....	38
4.2. İzolatların Makroskobik Anastomoz Durumlarının İncelenmesi.....	43
4.3. PCR-RFLP Sonuçlarının İncelenmesi.....	46
4.4. DNA Dizi Analizi Sonuçlarının İncelenmesi.....	50
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	57
7. KAYNAKLAR.....	59
8. ÖZGEÇMİŞ.....	62

SİMGE ve KISALTMALAR LİSTESİ

AFLP	Çoğaltılmış fragmentlerin uzunluk polimorfizmi (amplified fragment length polymorphism)
AG	Anastomoz grubu
bç	Baz çifti
BNR	İki çekidekli <i>Rhizoctonia</i>
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
<i>HhaI</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i> (ATCC 10014)'dan elde edilen bir restriksiyon endenükleaz
IGS	Genler arası bölge (intergenic spacer)
ITS	Ara transkripsiyon bölgesi (internal transcribed spacer)
kb	Kilobaz
M	Merge (birleşme) reaksiyon
MNR	Çok çekirdekli <i>Rhizoctonia</i>
<i>MseI</i>	<i>Micrococcus</i> türlerinden (R. Morgan) elde edilen bir restriksiyon endenükleaz
NJ	Komşu birleştirme (neighbor joining)
<i>nuc-lsu</i>	Çekirdek büyük alt birim (nuclear large subunit)
<i>nuc-ssu</i>	Çekirdek küçük alt birim (nuclear small subunit)
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction)
PDA	Patates dekstroz agar besiyeri
PDB	Patates dekstroz broth besiyeri
PDCA	Patates dekstroz kömür agar besiyeri
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
RAPD	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (random amplification of polymorphic DNA)
rDNA	Ribozomal DNA
RFLP	Restriksiyon fragmentlerinin uzunluklarının polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism)
rRNA	Ribozomal RNA

SDS	Sodyum dodesil sülfat
T	Tuft reaksiyon
Taq⁹¹	<i>Escherichia coli</i> (NEB)'den elde edilen bir restriksiyon endenükleaz
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris (hidroksimetil) amino metan
UNR	Tek çekirdekli <i>Rhizoctonia</i>
UPGMA	Ağırlıklı olmayan çift grup yöntemin algoritması (Unweighted pair group method with averages)
WAG-O	<i>W. circinata</i> var. <i>oryzae</i> anastomoz grubu (o)
WAG-Z	<i>W. circinata</i> var. <i>zeae</i> anastomoz grubu (z)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. rDNA bölgeleri.....	15
Şekil 4.1. <i>W. circinata</i> var. <i>zeae</i> izolatlarının PDA’da gelişimi.....	41
Şekil 4.2. <i>W. circinata</i> var. <i>oryzae</i> izolatlarının PDA’da gelişimi.....	42
Şekil 4.3. <i>W. circinata</i> var. <i>circinata</i> izolatının PDA’da gelişimi.....	43
Şekil 4.4. PDCA agarda izolatlarda görülen T-C2 anastomoz durumu.....	43
Şekil 4.5. PDCA agarda izolatlarda görülen M-C3 anastomoz durumu.....	44
Şekil 4.6. <i>HhaI</i> enzimiyle kesim.....	47
Şekil 4.7. <i>MseI</i> enzimiyle kesim.....	47
Şekil 4.8. <i>Taq^αI</i> enzimiyle kesim.....	48
Şekil 4.9. RFLP ürünlerinin UPGMA ağacı.....	49
Şekil 4.10. <i>W. circinata</i> ITS2 bölgesinin Neighbor Joining ağacı	51
Şekil 4.11. <i>W. circinata</i> ’nın Parsimoni ağacı.....	53

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 3.1. Kullanılan <i>Rhizoctonia</i> izolatları, kaynağı ve kökenleri.....	24
Çizelge 3.2. RFLP karışımının hazırlanması.....	35
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan <i>Rhizoctonia</i> spp. izolatlarının kültürel morfolojisi.....	39
Çizelge 4.2. <i>Rhizoctonia</i> spp. izolatlarının makroskobik anastomoz sonuçları.....	45

1. GİRİŞ

Funguslar ekosistemler üzerinde çok güçlü bir etkiye sahiptirler. Buldukları habitatları önemli ölçüde değiştirirler ve dolayısıyla fungal populasyonlar birçok ekosistemin temel elemanlarını oluştururlar. Özellikle toprak fungusları çevrelerindeki besinleri yeniden kullanılabilir hale getirirler. Ürünlerimize zarar verirken etanol ve antibiyotikler gibi değerli biyokimyasalları da üretirler. Fungal organizmaların istenilen şekilde kontrolü için etmenlerin doğru teşhisi ve sınıflandırmaları son yıllarda gelişen moleküler filogenetik çalışmalarla daha gerçekçi şekilde yapılabilir hale gelmiştir (Blackwell ve ark., 2006).

Fungal türlerin tanımlanmasında mikologlar farklı yaklaşımlardan yararlanmaktadır. Morfolojik (fenetik ve fenotipik) yaklaşım mikologlar tarafından kullanılan klasik bir uygulamadır; bu uygulamada morfolojik karakterler temelinde ve ideal olarak birbirleri arasındaki farklılıklara bağlı olarak tanımlama yapılır. Politetik yaklaşım karakterlerin kombinasyonlarına bağlıyken her bir suş aynı kombinasyona sahip olmak zorunda değildir. Üreme ayırımından ziyade belirli habitatlara adaptasyona dayanan ekolojik yaklaşım çoğunlukla bitki patojeni funguslar için kullanılmaktadır. Modern filogenetik analizlerin öncesinde gelişen biyolojik yaklaşım türler içindeki gen değişimi (örneğin eşeyli ve paraseksüel üreme) üzerinde durmaktadır (Guarro ve ark., 1999; Davis (1995)'den). İki güncel ve önemli gelişme sistematikteki geleneksel yaklaşımları etkilemiş ve önemli değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bunlar, modern sistematik içerisindeki filogenetik yaklaşımlar ve bu yaklaşımın moleküler tekniklerle birleştirilmesidir. Buna örnek olarak DNA nükleotid dizileri kullanılarak filogenetik ilişkilerin belirlenmesidir. Bu yeni yaklaşım özellikle eşeyli üremenin gözlenmediği (*Deuteromycetes*) fungal grupların sistematikinde önemli katkılar sağlamaktadır (Guarro ve ark., 1999).

Funguslar eşeyli ve eşeysiz üreme döngülerini dönüşümlü olarak gerçekleştirirler. Fungal populasyonların genetik yapısı her bir nesildeki eşeyli ve eşeysiz üremenin katılımıyla şekillenmektedir (Chen ve McDonald, 1996). Ancak yaşam döngüsü içinde eşeyli dönemi tespit etmek her zaman mümkün olmamaktadır. Bu nedenle funguslarda eşeysiz üreme yapılarına göre anamorfik formları çalışmak pratik bir uygulama olmuştur.

Teleomorfik durumu değişik cinsler (*Thanatephorus*, *Waitea*, *Ceratobasidium* vs.) içinde değerlendirilen fungusların anamorfik formu olan *Rhizoctonia* form cins de

Condolle (1815) tarafından kurulmuştur. Kühn tarafından 1858 yılında bilim dünyasına tanıtılan *Rhizoctonia solani* Kühn [teleomorf: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] türü en çok çalışılan türdür (Sneh ve ark., 1991). *Rhizoctonia* cinsinin karakteristik özellikleri: a) kahverengi hifal pigmentli, b) genç vejetatif hif hücrelerinin merkezden uzak septumlarının yakınlarında dallanma, c) hif dallarının orijin noktasından kısa bir uzaklıkta hif daralması ve septum oluşumu, d) dolipore septa, e) genç vejetatif hiflerde çok çekirdekli hücrelerdir (Sneh ve ark., 1991; Parmater ve Whitney (1970)'den).

Rhizoctonia form cinsi içinde değerlendirilen *R. solani*'ye göre çok az çalışma yapılmış olan *Waitea circinata* var. *zeae* (*Rhizoctonia zeae*) ise Voorhees tarafından mısırın çürümüş olgun başaklarından izole edilmiştir (Voorhees, 1934). Pirinçte, İtalyan darısında ve *Agrostis palustris*'de (Lee, 2004) fasulye ve soya fasulyesi bitkilerinde (Erper ve ark., 2005), İngiliz çiminde, *Agrostis*, *Beta*, *Cucumeris*, *Daucus*, *Fescuta*, *Helianthus*, *Oryza*, *Sorghum*, *Triticum* ve *Zea* türlerini içine alan birçok bitkide (Vajna ve Oros, 2005), şeker pancarı ve soğanda (Erper ve ark., 2006) hastalık oluşturmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, birçok bitkide hastalık oluşturan patojen fungus *Waitea circinata* var. *zeae*'nin dünyanın birçok farklı yöresinden (ABD, Brezilya, Japonya, Macaristan, Tayvan ve Türkiye) elde edilen izolatlarının moleküler teknikler kullanılarak genetik çeşitliliğinin belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Funguslar

2.1.1. Fungusların Genel Özellikleri

Funguslar Eucarya domaini içinde yedi bölümden oluşan büyük bir gruptur (Hibbett ve ark., 2007). Fungi alemi hifal veya hifal yapılarla ilişkili türleri içermektedir (Carlile ve ark., 2001). Hücre duvarları kitinden oluşmaktadır. Fotosentetik pigment içermezler, dolayısıyla besinlerini diğer canlıların hazırladığı organik maddelerden absorpsiyonla alırlar. Büyük bir çoğunluğu toprakta ve ölü bitkisel atıklar üzerinde yaşarlar. İnsan, hayvan ve bitkiler üzerinde parazit olabilen funguslar çoğunlukla aerob canlılardır (Madigan ve Martinko, 2006).

Eşeyli ve eşeysiz üreme davranışları fungusların sınıflandırılmasında kullanılan önemli bir karakterdir. Yaşam döngüsünün eşeyli safhası teleomorf, eşeysiz safhası anamorf olarak adlandırılır. Eşeyli üreme yapılarını tamamen kaybetmiş ve eşeysiz üreyen gruplar bulunmaktadır (Carlile ve ark., 2001). Bazıları sadece anamorfik durum yani aseksüel üreme gösterir. Örneğin, mitosporik funguslar anamorfik safhaya göre sınıflandırılırlar (Burnett, 2003). Eşeyli üreme, farklı gruplarda karakteristik sporların üretimine de yol açmaktadır. Buna göre zigospor oluşturan funguslar *Zygomycetes*, askospor oluşturan funguslar *Ascomycetes* ve basidiospor oluşturanlar *Basidiomycetes* olarak adlandırılırlar (Carlile ve ark., 2001). Bazı funguslarda ise bu iki safha aynı yaşam döngüsünde bulunabilir, bu durum holomorf olarak adlandırılır (Burnett, 2003).

Ascomycetes ve *Basidiomycetes* gibi gelişmiş fungusların hifleri çok sayıda septuma sahiptir. Bununla birlikte *Ascomycetes* ve *Basidiomycetes*'in diğer bir genel özelliği, fungal koloni içindeki bir hifin diğer bir hifle temas ettiğinde birleşebilmesidir. Hifal anastomoz olarak adlandırılan bu olay aynı zamanda büyük frutifikasyon organları oluşturmak için bazı *Ascomycetes* ve *Basidiomycetes* miselyumlarının kontrolündeki önemli bir etken olabilmektedir. Septumlar ve hifal anastomoz çoğunlukla *Zygomycetes* ve *Chytridiomycetes* üyelerinde görülmemektedir. Bu organizmalar 'ilkel funguslar' olarak isimlendirilirken, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* ve ilgili formlar 'gelişmiş funguslar' olarak isimlendirilmektedir (Carlile ve ark., 2001).

Eşeyli dönemlerinde oluşturulan spora ek olarak, birçok *Ascomycetes* ve *Basidiomycetes* eşeysiz spor tipleri de oluşturmaktadırlar. Eşeyli dönemi olmayan sadece eşeysiz sporlar üreten birçok tür vardır. Fakat hiflerinde enine septumların bulunması, onları gelişmiş funguslar olarak değerlendirmemizi sağlar. Bu organizmalar mitosporik fungus olarak bilinmekte ve sporları mayozla değil mitozla oluşmaktadır. Önceden bu funguslar *Deuteromycetes* veya Fungi Imperfecti olarak isimlendiriliyor ve eşeyli dönemi keşfedildiğinde bir *Ascomycetes* ve *Basidiomycetes* olarak yeniden sınıflandırılabilirlerdi. Ancak şu anda DNA dizi analizleri bu grupların en yakın eşeyli akrabalarıyla birlikte sınıflandırılmalarını olanaklı hale getirmektedir (Carlile ve ark., 2001).

Eşeyli üreme döngülerini kaybeden fungus gruplarında genetik rekombinasyon anastomoz aracılığıyla sağlanır. Anastomoz reaksiyonuyla genetik rekombinasyonun meydana gelmesi paraseksüalite olarak adlandırılmaktadır. Bu durum daha öncede belirtildiği gibi hifal anastomoz yapan bazı *Ascomycetes* ve *Basidiomycetes* gruplarında görülmektedir (Kendrick, 2000).

2.1.2. Fungusların Tarihçesi

Basidiomycetes ve *Ascomycetes*'in büyük frutifikasyon organları eski zamanlardan beri insanların dikkatini çekmiş ve çoğunlukla tecrübeye dayalı olarak şarap, bira fermentasyonunda ve ekmek yapımında fungusları kullanmışlardır. İlk olarak Charles de L'Ecluse 16. yüzyılda çok sayıda fungusu, biçim, görünüş ve faydası bakımından tanımlanmıştır. Joseph Pitton de Tournefort 17. yüzyılda cinsleri detaylı tanımlayarak bir hiyerarşik sistem oluşturmuştur. Fungusları: (a) şapkalı merkezi saplı; (b) şapkasız merkezi saplı; (c) yandan saplı; (d) myxomycetes içeren sapsız yuvarlak; (e) toprakaltı formları ve (f) koraloid (coralloid) formları olarak altı grup içinde ayırmıştır. Fungusların nasıl ürediği ise bu dönemde bilinmemekteydi ve çürüyen maddelerden kaynaklandıklarına inanılmaktaydı. Deneysel çalışmalara dayanan fitopatoloji ise Mathieu Tillet tarafından 18. yüzyılda başlatılmıştır. Funguslarda ilk sistematik çalışmalar morfolojik verilere dayandırılmıştır. Heinrich Anton de Bary tarafından 19. yüzyılda eşeyli ve eşeysiz üreme, gelişme ve fungusların parazitizmi konusunda önemli belgelerin yayınlanmasıyla mikolojik araştırmalarda yeni bir dönem başlamıştır (Drews, 2000).

1893'te Pierre Dangeard bir pas fungusunda ve 1894'de *Peziza* teleutosporlarında nükleer füzyonu gözlemlemiştir. Gelişimsel biyolojideki bu ilerleme fungusların modern taksonomisinin temelini oluşturmuştur (Drews, 2000).

Fungusların ilk sistematigi Christian Persoon tarafından 19. yüzyılda yayınlanmıştır. Bu ilk sistematik çalışma sadece morfolojik veriye dayanmaktaydı. De Bary fungusların sınıflandırması için gelişme safhaları ve eşeyin önemine vurgu yapmıştır. (Drews, 2000). Mikroskopik karakterler yüksek çözünürlüklü elektron mikroskopuyla 1960'larda incelenmeye başlamış ve bu sayede yeni yapılar ve ilişkiler ortaya çıkarılmıştır (Celio ve ark., 2006; Bracker (1967)'dan).

Elektron mikroskopuyla çalışılan ultrastructure (ince yapı) ve konak-parazit etkileşimleri gibi yeni teknikler de bazı fungal grupların (Örneğin, *R. solani*) araştırmalarında kullanılmıştır (Sneh ve ark., 1996; Naiki ve Ui (1974) ve Lisker ve ark. (1976)'dan).

1990'lı yılların başlarında PCR'la çoğaltılmış ribozomal RNA genlerinin analizleriyle fungal taksonomide moleküler devrim yaşanmıştır (White ve ark., 1990). Bu süreçte ribozomal DNA polimorfizmi (Sneh ve ark., 1996; Liu ve ark. (1993)'dan), RAPD analizi (Sneh ve ark., 1996; Duncan (1993)'dan) ve diğer moleküler teknikler ortaya çıkmıştır. Moleküler veri setlerinin analiziyle birçok beklenmeyen ve açıklanamayan ilişkiler ortaya çıkarılmıştır (Celio ve ark., 2006; James ve ark. (2000)'dan). Günümüzde fungal moleküler sistematik, multilokus veri setlerinin kullanıldığı, yaygın takson örneklemelerinin yapılabildiği standart bir işlem haline gelmiştir. Moleküler analizler aynı zamanda daha önce funguslar içinde sınıflandırılan bazı heterotropik ökaryotların da gruptan çıkarılmasına neden olmuştur. (Lutzoni ve ark., 2004).

Bu gelişmeler ışığında geleneksel olarak botanığın bir alt dalı gibi görülen mikoloji (Lutzoni ve ark., 2004) *Plantae* aleminden tamamen ayrılmıştır (Cavalier-Smith, 1998; Whittaker (1969) ve Carlile ve Watkinson (1994)'dan). *Fungi* alemi için tek tip bir sınıflandırma oluşturma çabaları oldukça eski olmakla birlikte, 2004 yılında gerçekleştirilen "Deep Hypha 2004 Arizona" konferansı bir başlangıç olmuş ve 2006 yılında bu çalışma ortak bir filogeni konusunu ciddi bir şekilde gündeme getirmiştir (Blackwell ve ark., 2006).

Bu süreç, AFTOL adı verilen şu anda da devam eden büyük bir projenin de başlamasına neden olmuştur. 200 tür ile yapılan çalışmada altı gen (*nuc-ssu* (çekirdek

küçük alt birim - nuclear small subunit), *nuc-lsu* (çekirdek büyük alt birim - nuclear large subunit) ve 5.8S rRNA, *rpb1*, *rpb2* ve *tefl*) örneğinin veri setleri değerlendirilerek filogeni gözden geçirilmiştir. AFTOL projesiyle devamlı yenilenen veri tabanı da dünya çapında internet ortamında ulaşabilen moleküler ve moleküler olmayan (örneğin morfolojik) karakterlerin geniş bir veri setini kullanıma sunmaktadır (Hibbett ve ark., 2007).

Moleküler tekniklerdeki gelişmeler organizmaların genom analizini de olanaklı hale getirmiştir. Bu çerçevede diğer organizmalarla birlikte birçok fungal organizmanın genomu büyük ölçüde çözülmüştür. Fungal organizmalarla ilgili bu genom verileri birbirleriyle ve bireysel gen çalışmalarında elde edilen veri setleriyle karşılaştırılmaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar da gen seviyesindeki filogenetik çalışmaların sonuçlarını doğrular niteliktedir (Wapinski, 2007).

2.2. *Rhizoctonia* Form Cinsi

Rhizoctonia cinsi 1815’de de Candolle tarafından tanımlanmıştır. *Rhizoctonia*’nın en önemli türü olan *R. solani* 1858’de Kühn tarafından tanımlanmasına karşın, tip tür olarak *R. crocorum* (Pers) D.C. belirlenmiştir. *R. solani*’nin tarihi neredeyse bitki patolojisinin tarihi kadar uzundur. İlk yayın, İrlanda’da ciddi bir patates kıtlığına yol açan patates geç yanıklığının Avrupa’da patlak verdiği dönemde yayınlanmıştır. İlk rapordan bu yana *Rhizoctonia*’nın patolojisi, taksonomisi, ekolojisi ve hastalık kontrolü geniş bir şekilde tartışılmıştır. *Rhizoctonia* raporları bitki patolojisiyle ilgili tüm raporların %3’ünü oluşturmaktadır (Sneh ve ark., 1996).

Rhizoctonia cinsinin sınıflandırılmasında *Rhizoctonia solani*’nin özellikleri cins seviyesine yükseltilerek kullanılmıştır. Buna göre: (1) genç vejetatif hiflerdeki dallanmanın distal bölmenin yanında meydana gelmesi, (2) hifal dalların orijin noktasına yakın bir bölgede bir bölme oluşturması ve dallanma noktasında hifin boğumlanması, (3) sklerosyumların rind ve medulla olarak farklılaşmaması, (4) kanca yapısı (clamp connection), konidium ve rhizomorf bulunmaması, (5) dolipor bölme bulunması *Rhizoctonia* form cinsinin genel özellikleridir (Sneh ve ark., 1991).

Besinsel (Priyatmojo ve ark., 2002; Ogoshi ve Ui (1979)’dan), moleküler (Priyatmojo ve ark., 2002; Jabaji-Hare ve ark. (1990), Duncan ve ark. (1993) ve Keijer ve ark. (1996)’dan), biyokimyasal teknikler (Priyatmojo ve ark., 2002; Kelens ve Peumans

(1991), Stevens-Johnk ve Jones (1993) ve Matsumoto ve Matsuyama (1999)'dan) ve yağ asidi kompozisyonlarında nicel ve nitel farklılıkların analizini (Priyatmojo ve ark., 2002; Stevens-Johnk ve ark. (1993), Stevens-Johnk ve Jones (1994), Matsumoto ve ark. (1997) ve Baird ve ark. (2000)'dan) içeren birçok yöntem *Rhizoctonia* spp.'nin ayırt edilmesinde kullanılmıştır.

Rhizoctonia cinsi, *Basidiomycetes*'in farklı takımlarına ait taksonomik olarak çeşitlilik gösteren bir grup anamorfik fungus içerir (Sen ve ark., 1999). Buna göre çoğu *Rhizoctonia* türü vejetatif hifal hücrelerindeki çekirdek sayısına göre üç gruba ayrılmaktadır. Her bir hücresinde ikiden fazla çekirdek içeren (multinükleat) türler: *R. solani* (teleomorf: *Thanatephorus cucumeris* (A. B. Frank) Donk), *R. oryzae* Ryker ve Gooch (teleomorf: *Waitea circinata* var. *oryzae* Warcup ve Talbot), *R. zae* Voorhees (teleomorf: *Waitea circinata* var. *zae*) (Ogoshi, 1987) ve *R. agrostis* Toda (teleomorf: *Waitea circinata* var. *agrostis*) (Toda ve ark., 2007) içinde yer alırlar. Her bir hücresinde iki adet çekirdek içeren (binükleat) türler: *Ceratobasidium* D. P. Rogers ve *Tulasnella* J. Schröt cinslerindeki teleomorfların bazılarıyla 40'dan fazla taksondan meydana gelmektedir (Ogoshi, 1987). Her bir hücresinde bir çekirdek içeren (uninükleat) tür ise *Ceratobasidium bicorne* türü ile temsil edilmektedir (Grönberg ve ark., 2003)

2.2.1. *Rhizoctonia* spp. Üzerine Çalışmaların Sonuçları

Rhizoctonia form cinsinin kurulmasını takiben 19. yy'da 32 takson rapor edilmiştir. Ama bunların çoğu *Rhizoctonia*'ya ait olmadığı ve bazılarının daha önce tanımlanan türlerin sinonimleri olduğu tespit edilmiştir. 19. yy'daki türlerden sadece ikisi (*R. crocorum* ve *R. solani*) şu anda genel kabul görmektedir (Sneh ve ark., 1996). *Rhizoctonia* spp.'nin anamorfları, çok çekirdekli olan *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia zae*, *Rhizoctonia oryzae* (Barnet ve Hunter, 1998) ve *Rhizoctonia agrostis* (Toda ve ark., 2007), iki çekirdekli *Rhizoctonia* ve tek çekirdekli *Rhizoctonia* form türleri içerisinde yer almaktadır (Barnet ve Hunter, 1998).

Çok çekirdekli *Rhizoctonia solani*'nin patojenik özellikleri, sklerosyum morfolojisi, besi ortamı üzerindeki kültürel özellikleri, fizyolojik karakteristikleri ve benzer özellikleri açısından varyasyon gösterdiği gözlemlendikten sonra, pek çok alt grubunun olduğu düşünülmüş ve *R. solani*'yi uygun gruplara yerleştirmek için pek çok araştırma yapılmıştır

(Ogoshi, 1987). Bununla birlikte günümüzde *R. solani* kompleksi içerisindeki geçerli olan sınıflandırma, büyük oranda izolatların anastomoz grupları içerisinde gruplandırılmasına dayanmaktadır (Cubeta ve Vilgalys, 1997).

Diğer çok çekirdekli *Rhizoctonia* türlerinden *R. zae* ve *R. oryzae* pirinç, mısır, buğday, arpa, çeşitli baklagillerin ve *Agrostis palustris*'in patojeni olan türlerdir (Kataria ve ark., 1991; Christensen (1979), Neate (1985), Wong ve Sivasithamparam (1985) ve Burton ve ark. (1988)'dan). *R. agrostis*'in ise *Agrostis stolonifera*'nın patojeni olduğu rapor edilmiştir (Toda ve ark., 2007).

İki çekirdekli *Rhizoctonia* spp. izolatlarının da anastomoz grupları şeklinde gruplandırıldığı rapor edilmiştir (Sneh ve ark., 1991). Bu grupta bulunan türler doğada genellikle *R. solani* grubunun üyeleri ile ilişki içerisinde dirler. Binükleat *Rhizoctonia*'ların patojen olmayan türleri içerisinde bazı gruplar orkidelerin mikorizal endofitleri ve diğer patojenik *Rhizoctonia*'ların biyolojik kontrol ajanları olarak önemlidirler (Vilgalys ve Cubeta, 1994).

Tek çekirdekli *Rhizoctonia* izolatların tek bir AG temsil eden yüksek oranda korunmuş anamorfik ve teleomorfik karakterler gösterdiği tespit edilmiştir. Bu anastomoz grubu Finlandiya ve Norveç fidanlıklarında kök geri ölümü (root dieback) hastalığının bulunduğu Sarı çam (*Pinus sylvestris*) ve Norveç ladini (*Picea abies*) fidelerinin açık köklerinden tanımlanmıştır (Grönberg ve ark., 2003).

2.3. Teleomorf: *Waitea circinata* Hakkında Genel Bilgi

Waitea circinata'yı Warcup ve Talbot koloni morfolojilerinin farklılıklarına dayanarak üç varyete içinde sınıflandırmıştır: *W. circinata* var. *circinata*, *W. circinata* var. *oryzae* ve *W. circinata* var. *zae* (Toda ve ark., 2005; Gunnell (1986)'den). Bununla birlikte *Agrostis stolonifera*'da hastalığa neden olan yeni bir varyete Toda ve ark. (2007) tarafından *W. circinata* var. *agrostis* olarak tanımlanmıştır. *W. circinata* var. *circinata*'nın anamorfik ismi atanmamasına rağmen, *R. oryzae*, *W. circinata* var. *oryzae*; *R. zae*, *W. circinata* var. *zae* (Toda ve ark., 2005; Gunnell (1986)'den); *R. agrostis* ise *W. circinata* var. *agrostis* teleomorfik isimleriyle kullanılmaktadır (Toda ve ark., 2007).

W. circinata var. *circinata* koyu kahverengi, *W. circinata* var. *oryzae* beyazdan turuncuya, *W. circinata* var. *zae* somon renginden turuncuya değişik renklerde ve *W.*

circinata var. *agrostis*'te ise açık sarı renke koloni rengi görülmektedir (Toda ve ark., 2007).

W. circinata var. *circinata* portakal renginden koyu kahverengine, çapı 2 mm kadar olabilen olabilen yuvarlak sklerosyumlar oluşturur; *W. circinata* var. *oryzae* portakal renginden somon rengine, değişen şekillerde sklerosyumlar oluşturur; *W. circinata* var. *zeae* portakal renginden kahverengine, çapı 1 mm'ye kadar değişen boyutlarda düzenli şekilli sklerosyumlar oluşturmaktadır (Toda ve ark., 2005; Leiner ve Carling (1994)'den) ve *W. circinata* var. *agrostis* açık sarıdan koyu kahverengine, 1-3 mm çapında değişen şekilli sklerosyumlar oluşturmaktadır (Toda ve ark., 2007).

W. circinata var. *oryzae* ve *W. circinata* var. *zeae* sırasıyla *Waitea* anastomoz grupları WAG-O ve WAG-Z olarak ayrılmıştır. Hifal füzyon her bir gruba ait izolatlar arasında sık sık meydana gelirken iki grup arasında nadiren görülmektedir (Toda ve ark., 2005; Oniki ve ark. (1985)'dan).

2.4. *Rhizoctonia zeae* ve Oluşturduğu Hastalıklar

R. zeae (*W. circinata* var. *zeae*) beyazdan turuncuya değişen koloni rengine (Toda ve ark., 2007), portakal renginden kahverengine yaklaşık 1 mm çapında düzenli şekilli sklerosyumlar oluşturmaktadır (Toda ve ark., 2005; Leiner ve Carling (1994)'den). *Waitea circinata* var. *zeae* anastomoz WAG-Z içinde yer almaktadır (Toda ve ark., 2005; Oniki ve ark. (1985)'dan).

1932'nin yazında mısırın çürümüş olgun başaklarından *W. circinata* var. *zeae* izole edilmiştir (Voorhees, 1934). Bir patojen olarak ilk defa 1934'de belgelenen *W. circinata* var. *zeae* pirinç ve İtalyan darısının sklerosyal hastalıklarına, çam fideleri ve legümlerin çökerten hastalıklarına (damping-off) neden olmaktadır (Lee, 2004; Saksena ve Vaartaja (1960); Wong ve Sivasithamparam (1985) ve Sneh ve ark. (1998)'dan).

Eremochloa ophiuroides, *Stenotapharum secundatum*, *Cynodon dactylon*, *Festuca arundinacea* ve *Agrostis palustris* hastalık oluşturmaktadır (Burpee ve Martin, 1992).

Fasulye ve soya fasulyesi köklerinde ve hipokotillerde superfisial kahverengi lezyonlar oluşumuna yol açmaktadır (Erper ve ark., 2005).

İngiliz çiminin yapraklarında kahverengi lezyonlara ek olarak kök ve gövde üzerinde nekrotik lezyonları oluşturmaktadır (Vajna ve Oros, 2005).

Şeker pancarı çürüklüğüne (Erper ve ark., 2006; Kuznia ve Windels (1994)'den), soğan köklerinde hastalık oluşumuna (Erper ve ark., 2006) neden olmaktadır.

Sıcak bölgelerde *Agrostis*, *Beta*, *Cucumeris*, *Daucus*, *Fescuta*, *Helianthus*, *Oryza*, *Sarghum*, *Triticum* ve *Zea* türlerini içeren birçok bitkide hastalık nedeni olarak yer almaktadır (Vajna ve Oros, 2005).

Semptom oluşumu konak türlere ve kültür yönetim uygulamalarına bağlı olmaktadır. Daha yüksek biçilen çimenlerde *W. circinata* var. *zeae* *R. solani*'nin neden olduğu lezyonlara benzer yaprak lezyonlarından izole edilmiştir. Sıcak mevsim çimlerinde *W. circinata* var. *zeae* tarafından oluşturulan yaprak lezyonları yaprak kınının daha aşağı taban kısmında yerleşmektedir. *W. circinata* var. *zeae* golf deliğinin çevresindeki *Agrostis palustris* üzerinde griden sarıya değişen renkte yay veya halka gibi bir görüntü oluşturmaktadır. Semptomlar *R. solani* tarafından oluşturulan 'kahverengi yama'ya benzerlik gösterir ve semptomlara dayanarak güvenilir ayırım yapılamamaktadır (Burpee ve Martin, 1992).

2.5. *Rhizoctonia* Sistematığında Kullanılan Yöntemler

Rhizoctonia form cinslerinin taksonomik olarak belirlenmesinde morfoloksonomik kriterler halen geçerli olmakla beraber daima doğru ve elverişli sonuçlar vermemektedirler (Sharon ve ark., 2006). *Rhizoctonia* spp'nin sınıflandırmasında ilk basamak hücrenin çekirdek durumunun (MNR (çok çekirdekli), BNR (iki çekirdekli) ya da UNR (tek çekirdekli)) belirlenmesi ve test izolatlarıyla karşılaştırılarak hiflerin anastomoz yeteneklerinin tespit edilmesidir (Sneh ve ark., 1991).

Anastomoz grupları içinde *Rhizoctonia* spp.'nin tayini veya sınıflandırılması için klasik hifal füzyon yöntemi sıkça kullanılmaktadır. Halen geçerliliğini korumakta olup son yıllarda DNA-temelli moleküler yöntemlerin kullanımıyla genetik olarak da desteklenmektedir. Fakat bazı *Rhizoctonia* spp. izolatlarının diğer izolatlarla, bazı izolatların da kendi kendine anastomoz yapma kabiliyetini kaybetmiş olmalarından dolayı, anastomoz reaksiyonları bir izolatın uygun AG içine yerleştirilmesinde ve doğru bir şekilde sınıflandırılmasında yeterli olmayabilmektedir (Sharon ve ark., 2008).

Hifal füzyon (anastomoz reaksiyonları) süreciyle ilişkili genler ve ilgili gen ekspresyonları henüz tam olarak tespit edilememiştir. Aynı AG'a ait izolatların tümünün

düşük sıklıkta füzyon oluşturmamasının veya füzyon yapmamasının nedeninin, farklı genetik ve evrimsel uzaklıktan kaynaklanmasından ziyade; bu genlerin bir veya birçoğunun geçirdiği bazı küçük mutasyonlar nedeniyle olabileceği düşünülmektedir (Sharon ve ark., 2008).

Hifal anastomoz reaksiyon tipleri 400x büyütmede gözlenme durumlarına göre dört kategorili (C0-C3) bir sistem oluşturmuştur. Buna göre: C3 tipi hifal anastomoz yapan hücrelerin duvarları ve hücre zarları kaynaşır. Anastomozun olduğu nokta çoğunlukla belirgin değildir. Anastomoz yapan hücreler ve komşu hücreler bazen ölebilir. Yakın ilişkili izolatlar yani aynı anastomoz grupları, aynı vejetatif olarak uyuşabilen populasyonlar ve aynı izolatlar arasında bu tip bir anastomoz görülmektedir. C2 tipi hifal anastomoz yapan hücrelerde ise hücre zarı birleşmesi kesin olarak olmazken, duvar teması oldukça açıktır. Anastomoz noktasının yeri bellidir. Anastomoz yapan hücreler ve komşu hücreler her zaman ölür. İlişkili izolatlar arasında yani anastomoz grupları aynı olan fakat vejetatif olarak uyuşabilen farklı populasyonlar arasında meydana gelen anastomoz tipidir. C1 tipi hifal anastomozda ise anastomoz yapan hifler ve hücre duvarları arasında temas vardır. Fakat hücre duvarı penetrasyonu ve membran-membran temasına dair bir kanıt yoktur. Bazen anastomoz yapan hücrelerden biri veya her ikisi de ölebilir. Uzak ilişkili izolatlar yani farklı veya aynı anastomoz grupları arasında olan hifal anastomoz reaksiyonlarını ifade eder. C0 tipi hifal anastomoz yapan hücreler arasında etkileşim yoktur. İlişkisiz, farklı anastomoz grupları arasında olan hifal anastomoz reaksiyonlarını ifade eder (Sneh ve ark., 1996; Carling ve ark. (1988) ve Macnish ve ark. (1993)'dan).

Anastomoz reaksiyonlarında bir diğer yöntem, makroskobik incelemedir. *R. solani*'nin genetik yapısının araştırıldığı bazı çalışmalarda patates dekstrozu kömür agar (PDCA) ortamında iki farklı homokaryotik izolat eşleştirildikten sonra aralarındaki temas bölgelerinde oluşan kümelerin (tuft) incelenmesi, heterokaryon oluşumunun iyi bir göstergesi olmuştur (Qu ve ark., 2008; Whitney ve Parmeter (1963), Adams ve Butler (1982), Anderson (1982) ve Julien ve ark. (1996)'dan). Makroskobik ve mikroskobik anastomozun birlikte uygulandığı çalışmalarda ise bu iki anastomoz şeklinin birbirleriyle ilişkisi şu şekilde belirlenmiştir: mikroskobik anastomoz C2 – makroskobik anastomoz tuft (T); mikroskobik anastomoz C3 – makroskobik anastomoz merge (M) (Macnish ve ark., 1997).

rRNA genlerinde kodlanan DNA dizileri özellikle ara transkripsiyon bölgeleri (ITS1 ve ITS2) ve aradaki 5.8S alt ünitesi fungal türlerdeki genetik çeşitliliğin belirlenmesi, filogenetik ve taksonomik akrabalığın değerlendirilmesinde oldukça kullanışlıdır (Bruns ve ark. 1991). *Rhizoctonia* spp. sınıflandırması için çeşitli moleküler sınıflandırma yöntemleri arasında rDNA-ITS dizi analizi günümüzde en uygun yöntem olarak görülmektedir (Sharon, 2008).

Anamorfik klasik taksonomide *Rhizoctonia* form cinsine ait üç büyük grup bulunur; MNR (teleomorf *Thanatephorus* ve *Waitea*), BNR (teleomorf *Cerataobasidium* ve *Tulasnella*), ve UNR (teleomorf *Cerataobasidium*). Aslında *Rhizoctonia* spp. hifal füzyon esas alınarak anastomoz grupları ve dahası alt gruplar içinde ayrılmıştır. PCR (polimeraz zincir reaksiyonu - polymerase chain reaction) ve çeşitli moleküler ve biyokimyasal veriler mevcut anastomoz grupları arasındaki genetik ilişkiyi, dolayısıyla sınıflandırmanın doğruluğunu büyük oranda doğrulanmıştır. Bu yöntemlerdeki çeşitlilik AG'ler ve alt gruplara ait izolatların doğru teşhisi için PCR temelli diagnostik özelliklerin gelişmesini sağlamıştır. Son yıllarda çeşitli moleküler markerların kullanımı ile doğal *Rhizoctonia* spp.'nin genetik yapısıyla ilgili önemli bilgiler elde edilmiştir. *Rhizoctonia* spp.'nin sınıflandırması için kullanılan çeşitli moleküler yöntemler; izoenzim analizi, total hücre yağ asidi analizi, elektroforetik karyotiplendirme, DNA-DNA hibridizasyonu, RAPD temelli DNA fingerprint, AFLP (çoğaltılmış fragmentlerin uzunluk polimorfizmi - amplified fragment length polymorphism), repetitif probe, AT'ce zengin DNA RFLP, "single-copy" nükleer RFLP, rDNA RFLP, ve rDNA dizi analizidir. İzolatlar arasındaki çeşitlilik ve genetik ilişkileri belirlemek için farklı moleküler yöntemlerin kullanım kolaylığı ve faydaları birbirinden farklı olmaktadır (Sharon ve ark., 2006).

2.6. *Rhizoctonia* Sistematğinde Kullanılan Genetik Markerlar

2.6.1. Total DNA

Mikolojide bir fungustaki DNA'nın özelliklerinin araştırılmasına yönelik ilk çalışmalar 1970'li yılların sonu ile 1980'li yılların başlarına rastlamaktadır (Bridge, 2002; de Bertoldi ve ark. (1973)'dan). İlk kullanımda % GC (Guanin-Sitozin) oranı olarak adlandırılan değerlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. *Humicola* ve *Rhizoctonia* grubu % GC

oranları bakımından araştırılmıştır (Bridge, 2002; de Bertoldi ve ark. (1973) ve Kuninaga ve Yokosawa (1980)'dan). Bu yöntemin en önemli sınırlayıcı yanı, % GC değerindeki farklılıkların organizmalar arasındaki farklılıkları kesin olarak ifade etmemesidir.

Total DNA kompozisyonlarını ele alan bir diğer yaklaşım DNA/DNA hibridizasyonudur ve burada DNA'nın çift zincirli/tek zincirliliğinin tersinirliği kullanılmaktadır. Öncelikle, iki organizmanın toplam DNA'sı elde edilir. Bu DNA'lar tek zincir haline getirildikten sonra karıştırılır. Bir organizmadan alınan DNA ipliği diğer organizmalardan alınan DNA ipliği bir araya getirildiğinde oluşan komplementasyonun derecesi iki organizma arasındaki DNA ilişkisini gösterir (Bridge, 2002).

Fungal genomlar yüksek bitkilerin genomlarından küçüktür ve bu nedenle DNA hibridizasyon çalışmaları için uygun bulunmaktadır. DNA-DNA hibritleme yönteminde kullanılan spektrofotometrik veya izotopik analizler *R. solani*'de 1980'lerin ortalarında uygulanmıştır (Sharon ve ark., 2006; Kuninaga ve Yokosawa (1985) ve Vilgalys (1988)'dan). Bu yöntemle doğrulanmış *R. solani* genomik DNA benzerlikleri, anastomoz gruplamasının ilk açık delilleri olabilir. AG (anastomoz grubu)'ları arasındaki izolatların DNA benzerliği sadece <math>< 30\%</math> iken, aynı AG içindeki izolatlar arasında >math>80\%</math> kabul edilmektedir (Sharon ve ark., 2006; Carling ve Kuninaga (1990) ve Kuninaga (1996)'dan). DNA hibritleşmesi kuşkusuz paralog ve ortolog genleri ihtiva eden melez (cross) dizilerin DNA benzerliklerinin ölçüsü olmaktadır. Dolayısıyla *R. solani*'de biyolojik türler olarak ayrılabilen AG'larının belirlenmesi için bu yöntemin uygun olduğu tespit edilmiştir (Sharon ve ark., 2006; Sneh ve ark. (1991) ve Kuninaga (1996, 2002)'dan). Fakat AG'larının hiyerarşisi, farklı anastomoz grupları arasındaki düşük hibridizasyon seviyeleri nedeniyle; karşılaştırmalı DNA hibridizasyon benzerlik değerleriyle çözülememektedir. 1990'dan itibaren ortaya çıkan daha uygun yöntemler sayesinde AG'larının ve onların alt gruplarının daha detaylı ve hiyerarşik filogenetik gruplamaları, başarılı bir şekilde yapılmaktadır (Sharon ve ark., 2006).

2.6.2. Mitokondriyal DNA

Mitokondriyal DNA, ya mitokondrilerin ekstraksiyonu (takiben DNA çıkarılması) ya da toplam DNA ekstraksiyonu ve kısımlarına ayrılması ile (genellikle yoğunluk gradient santrifüjleme) elde edilebilir. Restriksiyon enzimleriyle mitokondriyal DNA'nın

parçalanması nispeten az sayıda fragment oluşmasını ve böylece doğrudan RFLP şablonun oluşmasını sağlar (Bridge, 2002; Marriott ve ark. (1984)'dan). Funguslarda mitokondriyal DNA büyüklüğü oldukça değişken olup 30 kb ila 120 kb uzunluğunda olabilir. Mitokondriyal DNA bölgeleri genellikle funguslar arasında iyi korunan genler içermektedir. Fakat mitokondriyal DNA fazla miktarda kodlanmayan bölge de içerebilmektedir (Bridge, 2002; Bruns ve Szaro (1992) ve Charter ve ark. (1996)'dan). Mitokondriyal DNA farklılıklarının çoğu bu kodlanmayan bölge ve intronlarda bulunmuştur, dolayısıyla mitokondriyal analizler mikolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. Çok eski bir yöntem olmasına rağmen, halen yakın akraba izolatlar veya türlerin karakterizasyonunda kullanışlı bir yoldur (Bridge, 2002; Varga ve ark. (1993) ve Hedgedus ve Khachatorians (1993)'dan). Fakat unutulmamalıdır ki mitokondriyal DNA'nın evrimsel değişme oranı nükleer DNA'nınkinden oldukça farklıdır ve bu yüzden mitokondriyal dizilerden elde edilen sonuçlar nükleer DNA analizinden elde edilen sonuçlarla uyuşmayabilir (Bridge, 2002; Taylor (1986) ve Bruns ve ark. (1991)'dan).

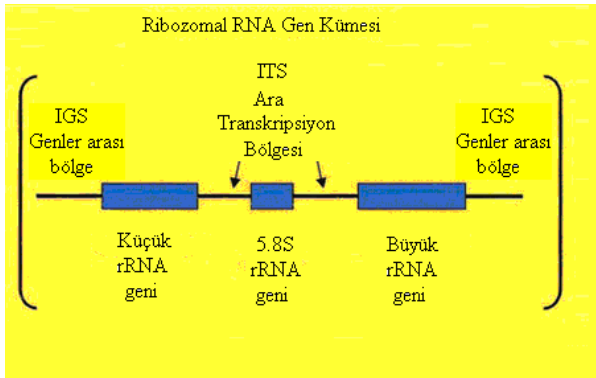
2.6.3. Protein Genleri

Dizi hizalamalarının daha kolay olması nedeniyle protein kodlayan genler rRNA genleri ve ara bölgelere göre bazı avantajları vardır. Aktin genleri, kitin sentez genleri, uzama faktörü-1a genleri, β -tubulin genleri ve orotidin 5'-monofosfat dekarboksilaz genleri fungal çalışmalarda kullanılmaktadır. Fakat kitin sentez geni hariç bunların hiçbiri PCR-aracılığıyla çalışılmamıştır. Bu genlerin çoğu için evrensel primerler henüz geliştirilmemiştir (Bridge ve ark., 1998).

2.6.4. Nükleer rDNA

rRNA genlerinin kodlandığı DNA dizileri funguslarda taksonomik ilişkilerin ve genetik varyasyonun belirlenmesi çalışmalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır. Funguslarda çekirdek rDNA'sı (rRNA gen kümesi) ardışık tekrarlanan rDNA birimleri olarak organize olmuştur (Salazar ve ark., 2000). rRNA gen kümesi hem çekirdek hem de mitokondrilerde bulunur ve oldukça korunmuş ve değişken bölgelerden meydana gelir (White ve ark., 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 ve küçük alt birim genlerinde bulunur. (Dahlman ve ark., 2000). Alt birimler arasındaki ara (spacer) bölgeleri, ITS (ara transkripsiyon bölgesi - internal transcribed spacer) ve IGS (genler arası bölge - intergenic spacer) olarak adlandırılır. Bunlar altbirim dizilerinden daha değişkendir ve tek bir cins içindeki türler arasındaki ya da tür içi (intraspesifik) populasyonlar arasındaki ilişkileri belirleyen çalışmalarda geniş oranda kullanılmaktadır (Şekil 2.1). 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 ya da bir cins içindeki fungal türlerin karşılaştırılması için kullanışlıdır. 28S rDNA'nın bazı bölgeleri de türler arasında değişkendir (Lee ve Taylor, 1992).



Şekil 2.1. rDNA bölgeleri (Bridge, 2002)

Nükleer rDNA spacer bölgeleri rRNA kodlayan bölgelerden daha hızlı evrimleşirler, çünkü spacer bölgelerindeki baz değişimi (substitution) organizmalarda yaşamsal bir etki yaratmamaktadır. Spacer bölgelerinde zorlama olmaksızın doğal mutasyonlar meydana gelmektedir. Bu da spacer bölgelerinin nispeten yüksek bir evrimsel değişim oranına sahip olmasını sağlar. Tersine rRNA'yı kodlayan DNA bölgelerindeki mutasyonlar protein sentez mekanizmasını olumsuz şekilde etkileyebilmektedir. Bu nedenle rRNA kodlayan bölgeler spacer bölgelerine nazaran daha fazla korunmuştur. Nükleer rDNA'nın farklı bölgeleri arasındaki evrimsel değişim oranındaki farklılıklar nedeniyle, nükleer rDNA'nın nükleotid dizisi geniş ölçekli filogenetik ilişkilerin anlaşılmasında kullanılmaktadır. Bu filogenetik ilişkiler, yaşamın temel soy hatları

arasındaki ilişkilerle yakın ilişkili türler veya populasyonlar arasındaki ilişkileri kapsamaktadır (Hwang ve Kim, 1999).

Nükleer SSU rDNA bölgesi en fazla korunmuş DNA bölgelerinden biridir ve alemler, bölümler, sınıflar ve takımları ihtiva eden büyük filogenetik dalların oluşturulmasında kullanılmaktadır (Hwang ve Kim, 1999; Field ve ark. (1988), Abele ve ark. (1989), Friedrich ve Tautz (1995), Aguinaldo ve ark. (1997) ve Whiting (1998)'den). Bununla birlikte, Prekambriyan (540 milyon yıl önce) dönemine ait filogenetik olayları ortaya çıkarmada çok başarılı olmuştur (Hwang ve Kim, 1999).

Kümenin en küçük nükleer rDNA bölümü olan 5.8S rDNA'nın nükleotid koruma derecesi SSU rDNA'nınki ile benzerlik gösterir, fakat uzunluğu (yaklaşık 150 bç) yeterli filogenetik bilgi içermeyecek kadar kısadır. 5.8S rDNA dizisi yeterli baz miktarına sahip olmadığı için filogenetik çalışmalarda bu bölgenin kullanımı tavsiye edilmemektedir. Nükleer LSU rDNA daha uzundur ve SSU rDNA ile karşılaştırıldığında farklı domainlerinin evrimsel değişim oranı bakımından daha fazla varyasyon göstermektedir. Birçok farklı domain veya büyük segmente sahiptir, böylece filumlar arasında dikkate değer gen çeşitliliği oluşturur. Nükleer LSU rDNA'nın takım veya familya gibi daha küçük kategorik seviyelerinde filogenetik ilişkilerin çalışılmasında kullanışlı olduğu bilinmektedir (Hwang ve Kim, 1999; Friedrich ve Tautz (1997), Hwang ve ark. (1998) ve Whiting (1998)'den).

Nükleer SSU ve LSU rDNA'lar birkaç domainden oluşmaktadır. Bunlardan bazıları oldukça korunmuşken, bazıları korunmamıştır. Hızlı gelişen bu çok değişken segmentler 'geniş segmentler' veya 'değişken bölgeler' olarak adlandırılmaktadır. Nükleer SSU ve LSU rDNA'larının büyüklük farklılıkları temel olarak değişken bölgelerin büyümesiyle meydana gelmiştir (Hwang ve Kim, 1999; Volger ve ark. (1997), Hwang ve ark. (1998, 2000) ve Choe ve ark., (1999a, 1999b)'dan). Dizileri uzak ilişkili türler (sınıf ve yukarı) tam bir hizalama yapılamayacak kadar çok değişkendir. Bu yüzden, nükleer SSU ve LSU rDNA'ların değişken bölgelerinin nükleotid dizileri bazen familya veya nadiren cinsler gibi nispeten daha düşük kategorik seviyeler için kullanılmaktadır (Hwang ve Kim, 1999).

Büyük ölçüde çeşitlik göstermelerinde dolayı, rDNA spacer bölgeleri (IGS ve ITS) cinsler, türler veya populasyonlar gibi daha düşük kategorik seviyelerde filogenetik problemlerin çözümünde kullanılır (Hwang ve Kim, 1999; Morgen ve Blair (1998), Navajas ve ark. (1998) ve Perera ve ark. (1998)'dan). IGS'in büyüklüğü (yaklaşık 4-5kb)

ITS bölgesinden (yaklaşık 1kb) çok daha fazladır. IGS'in daha büyük olmasına bağlı olarak ITS bölgeleri filogenetik uygulamalarda IGS'e göre tercih edilmektedir. Spacer bölgelerinin RFLP çalışmaları geçtiğimiz 50 milyon yıl içinde ayrılan yakın ilişkili taksonlar arasındaki filogeniyi anlamak için kullanılmaktadır (Hwang ve Kim, 1999; Hillis ve Dixon (1991)'dan). Son yıllarda uzun PCR (long PCR) teknolojisinin kullanılmasıyla oldukça büyük IGS'in PCR amplifikasyonu mümkün olmuştur, bu 28S rDNA 3'-ucundan ve 18S rDNA 5'-ucuna dizayn edilen iki primerle gerçekleştirilmektedir (Hwang ve Kim, 1999; Ryu ve ark.(1999)'dan). IGS alt tekrarlardan oluşur, dizi ve kopya sayısı değişiklik gösterir (Hwang ve Kim, 1999).

2.6.5. Biyokimyasal Yöntemler

2.6.5.1. İzozim Analizi

İzolatlar arasındaki karşılaştırmalarda, en etkili yöntemlerden biri de bir takım polimorfik enzim proteinlerinin linear elektroforezidir. Bu amaçla kullanılan enzimlerden biri izozim diğeri allozimdir. Bunlardan izozim aynı enzimin farklı moleküler formlarıdır (Burnett, 2003). Bir başka deyişle, izozimler genom üzerine dağılmış farklı alellerle veya çoklu moleküler formları olarak tarif edilmektedir. İzozimlerin elektroforetik ayrımı genetik polimorfizme dayanır, bu da elektroforetik jel üzerinde alellik formlar arasındaki nisbi değişiklikteki farklılıklardan sorumlu olan amino asit değişikliklerine neden olur. Potansiyel olarak izozim analizinde 1) bir fungal grup ya da altgrup içindeki yakın akraba izolatlar arasında yüksek seviyede varyasyon gösteren izozimler, genetik farklılık (çeşitlilik) indikatörü olduğu için; 2) çok sayıda izolatin eşzamanlı olarak tanımlanmasına olanak sağladığı için *Rhizoctonia* spp'nin populasyon biyolojisi çalışmalarında potansiyel olarak kullanılmaktadır (Sharon ve ark., 2006). İzozim analizleri, MNR'lerin (Sharon ve ark., 2006; Liu ve ark. (1990), Liu ve Sinclair (1992, 1993) ve Laroche ve ark. (1992)'dan) ve BNR'lerin (Sharon ve ark., 2006; Damaj ve ark. (1993)'dan) alt grupları ve farklı AG izolatları arasındaki çeşitlilik ve akrabalığı belirlemek için kullanılmaktadır. Genellikle izoenzim elektroforetik şablonu AG'ler arasındaki ve alt gruplar arasındaki genetik çeşitliliğin iyi birer belirleyicisi olmuş ve AG kavramının genetik temellerini güçlendirmiştir. 10 enzim sistemi kullanılarak, AG1 içinde en az 6 alt grup ve AG2 içinde

en az 5 alt grup ayırt edilmiştir (Sharon ve ark., 2006; Liu ve Sinclair (1992,1993)'den). Ancak bilinen AG1 alt gruplarının ön teşhisi için izoenzim analizi her zaman tek başına yeterli olmamaktadır (Sharon ve ark., 2006).

2.6.5.2. Yağ Asidi Analizleri

Yağ asidi metil ester analizi, yakın akraba maya ve bakteri suşlarının ayrımı ve karakterizasyonunda rutin olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem bilgisayarlı gaz-sıvı kromatografi sistemi yardımıyla yağ asidi metil esterlerinin analiz ve teşhisine dayanır. Küçük oranda modifiye olmuş bilgisayar programı paketiyle (Microbial Identification System; Microbial ID) MNR AG'larının karakterizasyonunda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bu yöntem kullanıldığında problem oluşturabilecek birçok teknik konu vardır. Kültür yaşı, sıcaklık, kültürel koşullar gibi kritik parametrelerin yağ asidi kompozisyonunu etkilediği bilinmektedir. Kültürel koşullardaki ve ekstraksiyon prosedürlerindeki farklılıklardan dolayı şu anda farklı laboratuarlardan elde edilen yağ asidi kompozisyonlarındaki sonuçlar birbirleriyle tutarsızlık göstermektedir. Daha tutarlı sonuçlar elde etmek için yöntemin standardize edilmesi gerekmektedir (Sharon ve ark., 2006).

2.6.5.3. Elektroforetik Karyotiplendirme

PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) çok büyük DNA (12Mb'den büyük) fragmentlerinin ayrılabilmesini mümkün kılan bir metottur. Agaroz matrisinde kromozomal DNA'yı ayıran PFGE uygulamaları fungal genomik araştırmalar için güçlü bir yöntem olarak kullanılmaktadır. İlk uygulamalarda, *Saccharomyces cerevisiae* kromozomlarını ayırmak için kullanılmıştır, fakat daha sonra *Rhizoctonia* spp'de içine alan birçok fungusta da oldukça yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Sharon ve ark., 2006).

Elektroforetik kromozom verisi özellikle özel kromozomlarda yerleşmiş spesifik lokusların RFLP'sinden elde edilen verilerle birleştirildiğinde, şüphesiz funguslar için kullanışlı genetik markerları ortaya çıkarmaktadır (Burnett, 2003).

2.7. Genomik Parmakizi Analizi

2.7.1. RAPD Yöntemi

RAPD (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA - random amplification of polymorphic DNA) analizi isteğe göre seçilmiş dizilerden oluşan tek zincirli kısa oligonükleotid primerleri kullanılarak genom boyunca rastgele dağılım gösteren DNA segmentlerinin amplifikasyonuna dayanan bir yöntemdir. Analiz edilecek genomla ilgili önceden bir bilgiye gerek duymayan hızlı ve basit bir tekniktir (Sharon ve ark., 2006). Bu teknikten bir tür içindeki suşlar veya izolatlar arasındaki genetik çeşitliliği belirlemek için yararlanılır (Bridge ve ark., 1998). RAPD markerları 1) genetik harita yapımı, 2) populasyon genetik yapı analizi, 3) bireysel parmakizi, 4) genomun spesifik bölgelerine ait hedef markerların belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Sharon ve ark., 2006).

Diğerlerine nazaran kolay kullanılmasına rağmen, RAPD analizinin birçok dezavantajı olabilmektedir. RAPD şablonlarının aynısının oluşturulması ve güvenilirliği için standart reaksiyon koşulları uygulanmasına rağmen farklı laboratuarlardan elde edilen sonuçlar her zaman uyumlu olmayabilmektedir. Ayrıca RAPD metodunda bazı analitik problemler de mevcuttur.

Ancak bu sınırlandırmalardan bazılarından, RAPD amplikonlarının dizi karakterizasyonlu amplifikasyon bölgesine (sequence-characterized amplified regions - SCAR) çevrilmesiyle üstesinden gelinebilmektedir (Sharon ve ark., 2006).

2.7.2. AFLP Yöntemi

AFLP herhangi bir kaynaktan ya da karmaşık bir numuneden elde edilen DNA'nın teşhisi için orijinal ve çok güçlü bir parmakizi yöntemidir. Toplam genomik DNA'nın kesilmesiyle elde edilen restriksiyon fragmentlerinin seçici PCR amplifikasyonuna dayanır. Tipik olarak 50-100 restriksiyon fragmenti çoğaltılır ve fragmentler poliakrilamid jelde denatürasyonla belirlenir. Bir reaksiyonda çok sayıda lokus taranabildiği için AFLP metodu DNA fingerprinti için kullanışlı olmaktadır (Sharon ve ark., 2006).

AFLP markerlarının en büyük dezavantajı allellerin kolay bir şekilde belirlenememesidir. Yine de AFLP analizleri *Rhizoctonia* spp. populasyon genetiği çalışmalarında önemli bir potansiyele sahiptir (Sharon ve ark., 2006).

2.7.3. RFLP Yöntemi

RFLP (restriksiyon fragmentlerinin uzunluklarının polimorfizmi - restriction fragment length polymorphism)'lerden elde edilen DNA parmakizleri funguslarda yaygın olarak kullanılmaktadır. AG8 ve AG3 spesifik parmakizi şablonları için tekrarlı problemler geliştirilmiştir. Bu metod RAPD'den daha güvenilir fakat teknik olarak daha yorucudur. Buna ilaveten RFLP analizleri klonlama gerektirmektedir. Her bir izolat için southern blot, problemlerle işaretleme ve diğerlerine nazaran daha büyük miktarda DNA gerektirir (Sharon ve ark., 2006).

Yöntem fungusun hif, spor veya rhizomorflarına ve üreme yapılarına ve bazı durumlarda mikorizal kökler (morfotip) veya likenlerdeki simbiyotik funguslar gibi herhangi bir kısmına uygulanabilmektedir. PCR teknikleriyle birleştirilerek de kullanılabilir (Burnett, 2003).

Bu teknikle ilgili karşılaşılan diğer sorunların yanı sıra yüzlerce kesim parçasının ortaya çıktığı durumlarda kompleks profillerin kıyaslanmasında zorluklar yaşanmaktadır (Yağcı, 2001).

2.7.5. PCR – RFLP Yöntemi

Çoğaltılmış elementlerin RFLP'si (PCR-RFLP) şu an hem fungal filogenide hem de taksonomide yaygın olarak kullanılmaktadır. PCR-RFLP'si basittir ve geleneksel RFLP'yle karşılaştırıldığında ucuz bir metottur ve blotlama, problema ve/veya dizilemeye ihtiyaç duymamaktadır (Bridge ve ark., 1998).

Bu yöntem PCR'la çoğaltılmış ürünlerin restriksiyon enzimiyle kesilmesini ve jel elektroforeziyle büyüklükleri bakımından DNA fragmentlerinin ayrılmasını içermektedir (Sharon ve ark., 2006). Bu yöntem temelde ITS ve IGS bölgelerinin PCR-RFLP'si için kullanışlıdır. Çünkü bu bölgeler yüksek oranda polimorfiktir ve evrensel primerler kullanılarak PCR ile kolayca çoğaltılabilmektedir (Bridge ve ark., 1998).

PCR'la oluşturulmuş rDNA-RFLP ilk olarak iki çekirdekli için kullanılmıştır (Sharon ve ark., 2006; Cubeta ve ark (1991)'dan). Aynı yöntem rDNA-ITS bölgesinde çok çekirdekli için uygulanmıştır (Sharon ve ark., 2006; Liu ve Sinclair (1992, 1993) ve Liu ve ark. (1993)'dan). Takip eden RFLP çalışmaları 28S rDNA ve rDNA-ITS kullanılarak çok çekirdekli (Sharon ve ark., 2006; Liu ve ark. (1995), Kanematsu ve Naito (1995), Keijer ve ark. (1996), Julian ve ark. (1996), Schneider ve ark. (1997), Hyakumachi ve ark. (1998), Meyer ve ark. (1998), Nicoletti ve ark. (1999), Priyatmojo ve ark. (2001) ve Godoy-Lutz ve ark. (2003)'dan) ve iki çekirdekli (Sharon ve ark., 2006; Mazzola (1997), Martin (2000), Sen ve ark. (1999), Toda ve ark. (1999b), Kasiamdari ve ark. (2002) ve Hyakumachi ve ark. (2005)'dan) grupların ayırımında da önemli olmuştur. PCR'la oluşturulmuş rDNA RFLP analizleri klasik anastomoz grup kavramının genetik temelini desteklemiştir.

2.7.6. rDNA Dizi Analizleri

1990'lı yılların ortalarından itibaren *Rhizoctonia* spp. için rDNA dizi analizleri sıkça kullanılmaktadır (Sharon ve ark., 2006; Boysen ve ark (1996), Kuninaga ve ark. (1997), Johanson ve ark. (1998), Boidin ve ark. (1998), Salazar ve ark. (1999; 2000b), Kuninaga ve ark. (2000a,b), Pope ve Carter (2001), Carling ve ark. (2002) ve Toda ve ark. (2004)'dan). Şu anda DNA dizi bilgisi *Rhizoctonia* spp.'nin taksonomik ve filogenetik ilişkilerinin oluşturulması için en uygun yol olarak görülmektedir. rDNA dizi analizlerinin kullanılmasının önemli avantajı, oluşturulan PCR primerlerinin teşhis amacıyla kullanımının uygun olmasıdır (Sharon ve ark., 2006).

Rhizoctonia spp. anastomoz grupları ve altgruplarının rDNA-ITS dizilerine dayanan küme (cluster) analizleri rapor edilmiştir (Sharon ve ark., 2006; Liu ve Sinclair (1992), Kasimadri ve ark. (2002), Kuninaga ve ark. (1997), Salazar ve ark. (2000a), Gonzalez ve ark. (2001), Carling ve ark. (2002) ve Toda ve ark. (2004)'dan). rDNA-ITS dizi analizlerinin filogenetik uygulamaları *Rhizoctonia* spp. hakkında bilginin artmasını sağlamıştır. Çünkü farklı araştırma grupları tarafından elde edilen dizi verilerinin karşılaştırılması olanaklı hale gelmiştir. rDNA-ITS dizilerinin yayınlanması ve veri bankalarında bu bölgelerin saklanması, yeni ya da mevcut *Rhizoctonia* spp.'nin AG grupları ile ilişkisinin tespiti ve doğrulanmasını kolaylaştırmıştır (Sharon ve ark., 2006).

R. solani AG'lerinin genetik ilişkileri Kuninaga ve ark. (1997) tarafından ayrıntılı olarak çalışılmıştır. ITS dizilerinde %96'dan daha fazla benzerlik yüzdesi bir AG altgrubu içindeki izolatları gösterirken, bir AG içindeki farklı altgrupların izolatları için bu değer %66-100 ve farklı AG'ları arasındaki izolatlar için %55-96 olduğu ifade edilmiştir (Sharon ve ark., 2006).

Genetik olarak farklı 31 grubun (21 çok çekirdekli ve 10 iki çekirdekli grup) ITS ve 28S rDNA dizilerinin kladistik analizleriyle, iki çekirdekli (*Ceratobasidium*) ve çok çekirdekli (*Thanatephorus*) grupların filogenetik ilişkilerinin önceden tanımlanmış AG'ları ve alt grup kavramlarıyla uyumlu olduğu gösterilmiştir (Gonzales ve ark., 2001). Filogenetik analizler ile bazı AG'larının monofiletik olmadığı ve bu analizlerin daha ziyade AG altgruplarını taksonomik olarak desteklediği belirlenmiştir (Sharon ve ark., 2006).

rDNA dizi analizinin kullanımında önemli avantajlardan biri, tanısal amaca yönelik olarak PCR primerlerinin tasarlanabilmesine imkan sağlamasıdır. Spesifik primerlerin oluşturulması için ITS bölgelerinin kullanımı, *R. solani* AG'ları içindeki altgrupların tanısal analizini geliştirme için mükemmel bir strateji oluşturmaktadır (Sharon ve ark., 2006; Kuninaga (2003)'dan).

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan *Rhizoctonia* İzolatları

Bu çalışmada daha önce yapılan çalışmalardan elde edilmiş olan izolatlar kullanıldı. İzolatların, konak ve kökenleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

3.2. Yöntemler

3.2.1. İzolatların Aktifleştirilmesi

3.2.1.1. Kullanılan Besiyeri

Tüpte yulaf tohumunda veya yatık PDA (patates dekstroz agar) kültüründe stoklanmış olan *Rhizoctonia* izolatlarının yeniden aktifleştirilmesi için hazır PDA (Oxoid) ortamı kullanıldı.

PDA (Oxoid)	39 g
Saf su	1000 ml

PDA Agar hassas terazide (Precisa XB 220A) verilen miktarda tartıldı ve 1000 ml saf suda çözüldü. Otoklavda (Nüve OT4060) 121⁰C’de 20 dakika steril edildi. Besi ortamının sıcaklığı 50°C’ye düştükten sonra steril kabin (Nüve LN090) içerisinde steril petri kaplarına, yaklaşık 30’ar ml olacak şekilde döküldü. İçinde besi ortamı bulunan petrilerin düz bir zeminde bırakılarak katılaşmaları sağlandı.

3.2.1.2. Stok Kültürlerin Patates Dekstroz Agar Besi Ortamına Ekimi

Stok kültürlerin aktifleştirilmesi için daha önce hazırlanan ve bir gün bekletilen PDA besi ortamına ekimler yapıldı. Bu işlem steril kabin içerisinde, tüplerde bulunan hem yulaf tohumundan hem de stok yatık kültürlerden alınan inokulumlarla gerçekleştirildi.

Çizelge 3.1. Kullanılan *Rhizoctonia* izolatları, kaynağı ve kökenleri

İzolat No	İzolatın Kodu	İzolatın Türü	Kaynak	Köken	Literatür ya da Temin Edildiği Kişi
1	M 003	<i>W. c. var. zeae</i>	Toprak	Aichi, Japonya	Toda ve ark.,2007
2	As7s11A	<i>W. c. var. zeae</i>	-	Japonya	Mghalu ve ark., 2004
3	C504	<i>W. c. var. zeae</i>	Toprak	Ishikawa, Japonya	Toda ve ark.,2007
4	Bre	<i>W. c. var. zeae</i>		Brezilya	Poltronieri
5	Rcl246	<i>W. c. var. zeae</i>	Mısır	Tayvan	Hsieh
6	Rss318	<i>W. c. var. zeae</i>	Sorgum	Tayvan	Hsieh
7	Rss319	<i>W. c. var. zeae</i>	Sorgum	Tayvan	Hsieh
8	Ağrlar	<i>W. c. var. zeae</i>	-	Samsun, Türkiye	Erper, 2003
9	Sarıyurt	<i>W. c. var. zeae</i>	-	Samsun, Türkiye	Erper, 2003
10	Yakıntaş	<i>W. c. var. zeae</i>	-	Samsun, Türkiye	Erper, 2003
11	ÇrT2-P2a	<i>W. c. var. zeae</i>	Tütün toprağı	Samsun, Türkiye	Gürkanlı, 2005
12	ÇrT21-P2b	<i>W. c. var. zeae</i>	Tütün toprağı	Samsun, Türkiye	Gürkanlı, 2005
13	Yakakent	<i>W. c. var. zeae</i>	Tütün toprağı	Samsun, Türkiye	Gürkanlı, 2005
14	ED100	<i>W. c. var. zeae</i>	-	Türkiye	Demirci
15	ED153	<i>W. c. var. zeae</i>	-	Yusufeli, Türkiye	Demirci, ve Eken, 1999
16	ÇHTS1-ABC	<i>W. c. var. zeae</i>	-	Türkiye	-
17	USA06	<i>W. c. var. zeae</i>	-	ABD	Paulitz
18	Macar	<i>W. c. var. zeae</i>	-	Macaristan	Vajna ve Oros, 2005
19	ED146	<i>W. c. var. circinata</i>	Arpa	Erzurum, Türkiye	Demirci, 1998
20	GH-700	<i>W. c. var. oryzae</i>	Japon çimi	Gifu, Japonya	Toda ve ark., 2007
21	801387	<i>W. c. var. oryzae</i>	Arpa	Mockenema, WA, ABD	Paulitz ve ark., 2003
22	Mm 4-3	<i>W. c. var. oryzae</i>	Japon çimi	Japonya	Mghalu ve ark., 2004

3.2.2. İzolatların Kültürel Olarak İncelenmesi

Aktifleştirilen izolatlar kültür altı ve kültür üstü pigmentasyonunun, sklerosyum renginin ve hava hiflerinin olup olmayışının araştırılması amacıyla kültürel olarak incelendi. Aktifleştirilmesi için PDA'ya ekilen kültürler 25°C'de 2 gün karanlıkta bekletildi. Taze hazırlanmış olan ve içinde PDA (Oxoid) ortamı bulunan petrilerin merkezine, aktifleştirilen izolatların uç bölgelerinden alınan 5 mm çapındaki agar diskleri yerleştirildi. Karanlıkta 25°C'de inkübe edildi (Carling ve ark., 1987). Bir ay boyunca kültürler 5 günde bir kontrol edildi. Denemeler, her izolat için üç tekrarlı olarak yapıldı. İzolatların kültür altı, kültür üstü pigmentasyonları ve sklerosyum renkleri Londra Royal Horticultural Society renk kataloğuna göre belirlendi.

3.2.3. İzolatların Makroskobik Anastomoz Durumlarının Tespiti

3.2.3.1. Makroskobik Anastomoz Durumunun Tespiti İçin Kullanılan Besiyeri

Yirmi iki izolatın her birinin kendisiyle ve kendi aralarındaki anastomoz durumunu karşılaştırmak amacıyla PDCA (Qu ve ark., 2008; Julian ve ark. (1996)'dan) hazırlandı.

PDA (Oxoid)	39 g
Aktif Kömür	5 g (%0.5)
Saf su	1000 ml

Besi ortamının hazırlanması için önerilen miktarlar hassas terazide tartıldı. 1 litre saf su içerisinde karışım çözüldükten sonra besi ortamı otoklavda 121°C'de 20 dakika steril edildi. Steril edilen ortamın sıcaklığı 50°C'ye düştükten sonra steril kabin içerisinde 9 cm'lik steril petri kaplarına döküldü. Besi ortamının petri kaplarına dökülmesinden sonra petriler düz bir zeminde soğumaya bırakıldı.

3.2.3.2. PDCA Besiyerine İzolatların Ekimi ve İncelenmesi

İçerisinde PDCA bulunan 9 cm'lik petri kaplarına, kenarlarından 3'er cm olacak şekilde karşılıklı olarak her bir izolatın PDA agar parçaları yerleştirildi. 25°C'de

karanlıkta 3-4 gün inkübe edildikten sonra iki izolat arasındaki bağlantı eşeysel uyumluluk açısından incelendi (Qu ve ark., 2008; Julian ve ark. (1996)'dan).

Eğer iki izolat arasında bir koyu çizgi veya ince bir miselyum bölgesi görülüyor ise bu uyumlu reaksiyon merge (M) veya C3 reaksiyonu değerlendirildi. İki izolat arasında bir reaksiyon çizgisi görülmesi durumunda ise bu uyumsuzluk reaksiyonu tuft (T) veya C2 (-) olarak değerlendirildi (Mahmoud ve ark., 2006 ve Macnish ve ark., 1997).

3.2.4. *Rhizoctonia* İzolatlarından DNA İzolasyonu

3.2.4.1. DNA İzolasyonu İçin Kuru Misel Elde Edilmesi

İzolatların kuru misellerini elde etmek için ilk olarak PDB (patates dekstroz broth) besiyeri hazırlandı.

PDB (Acumedia)	24 g
Saf su	1000 ml

kullanıldı.

Hazırlanan besiyeri 100ml'lik erlenlere 40 ml olacak şekilde paylaştırıldı. Erlenler önce pamuk daha sonra alüminyum folyo ile açıklık kalmayacak şekilde kapatıldı. Otoklavda (121°C'de 20 dakika) steril edilen besi ortamı kontaminasyon riskinin olmaması için 1 gün daha bekletildi. Daha önce PDA besi ortamındaki kültürlerden PDB besi ortamına aşılama yapıldı. Çalkalayıcı su banyosunda 25°C'de 3-5 gün inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresi sonunda steril kabin içinde ucu alkole batırıldıktan sonra yakılarak steril edilmiş pens yardımıyla gelişen fungus miselleri alındı ve petri içinde hazırlanmış steril kurutma kağıtlarına konularak kurutuldu. Tamamen kurutulan miseller steril bir havan içerisinde sıvı azot yardımıyla toz haline gelinceye dek dövüldü. Toz haline gelen miseller steril 1.5 ml'lik ependorflar içine konarak -50 °C'de saklandı (Carling ve ark., 1987).

3.2.4.2. DNA İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı

DNA izolasyonu sırasında kullanılan solüsyonlar aşağıdaki gibi hazırlandı:

5 M LiCl Stok solüsyon

LiCl (Amresco)	21.19 g
Saf su	100 ml

kullanıldı.

Toz haldeki LiCl hassas terazide tartıldıktan sonra ve beherlere transfer edildi. Toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı ve manyetik karıştırıcı (Labart SH-5) ile karıştırılarak çözülmesi sağlandı. Solüsyon cam kapaklı 100 ml'lik şişelere aktararak otoklavda 121⁰C'de 20 dakika boyunca steril edildi. Steril edilen solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

0.5M EDTA Stok, pH 8

EDTA (Sigma)	18.61 g
Saf su	100 ml

Hassas terazide tartılan EDTA (etilen diamin tetra asetik asit), 80 ml saf su bulunan bir erlen içine konularak manyetik karıştırıcıda çözülmesi sağlandı. 2M NaOH (Carlo Erba) kullanılarak pH metrede (Hanna pH 211) pH'sı 8'e ayarlandı. Daha sonra son hacim 100 ml olacak şekilde saf su ilave edildi. 100 ml'lik kapaklı cam bir şişeye aktarılan solüsyon otoklavda 121⁰C'de 20 dakika steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı (Sambrook ve Russell, 2001).

0.5 M Tris-HCl Stok, pH 8

Trizma baz [Tris (hydroxymethyl) aminomethane) - (Sigma)]	121.1 g
Saf su	100 ml

İçinde 70 ml saf su bulunan erlene trizma base ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözüldü. pH metre kullanılarak, %37'lik hidroklorik asit (Merck) çözeltisi ile pH'ı 8'e ayarlandı. Son hacmi 100 ml olacak şekilde solüsyona saf su ilave edildi. Otoklavda 121°C'de 20 dakika steril edilen solüsyon oda sıcaklığında saklandı (Sambrook ve Russell, 2001).

%10'luk SDS Stok

SDS (Amresco)	10 g
Saf su	100 ml

Hassas teraziyle tartılan SDS (sodyum dodesil sülfat) bir miktar saf su ile çözüldükten sonra toplam hacmi 100 ml olacak şekilde saf su ilave edildi. 100 ml'lik kapaklı cam şişeye konulan solüsyon, otoklavda 121°C'de 20 dakika steril edildi. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Ekstraksiyon Tamponu

5 M LiCl	2 ml
0.5 M EDTA, pH 8	2 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 8	2 ml
% 10'luk (SDS)	5 ml

Son konsantrasyonları 100 mM LiCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, % 0.5 SDS olacak şekilde ayarlanarak belirtilen miktarlarda çözelti mikropipet yardımıyla 100 ml'lik kapaklı cam bir şişe içerisine transfer edildi. Son hacmin 100 ml olmasını sağlayacak kadar saf su ilave edilerek otoklavda 121°C'de 20 dakika steril edildi. Steril edilen solüsyon oda sıcaklığında muhafaza edildi (Pascual ve ark., 2000).

TE tamponu, pH 8

0.5 M EDTA, pH 8	2 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 8	0.2 ml
Saf su	97.8 ml

Stok solüsyonlardan belirtilen miktarlarda alınarak son konsantrasyonları 10 mM Tris-HCl ve 1 mM EDTA olacak şekilde mikropipet yardımıyla ağız kapaklı 100ml'lik cam şişeye transfer edildi. Son hacim 100 ml olacak şekilde saf su ilave edildi ve otoklavda 121⁰C'de 20 dakika steril edildi. Steril edilen solüsyon oda sıcaklığında muhafaza edildi (Sambrook ve Russell, 2001).

%70'lik etanol

100 ml'lik %70'lik etanol hazırlanması için;

Absolute alkol (J.T Baker)	70 ml
Saf su	30 ml

kullanıldı.

Steril edilmiş cam pipetler yardımıyla alınan absolute alkol ve su, steril 100 ml'lik ağız kapaklı cam şişe içine konularak hazırlandı. +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi.

RNase (1 mg/ml)

RNase (Sigma)	10 mg
TE tamponu	10 ml

TE tamponu içerisinde Ribonükleaz A çözüldü. 0.2µm'lik membran filtreden (Schleicher&Schuell) geçirilerek steril edilen RNase, steril 1.5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldıktan sonra -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.4.3. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu Carling ve ark. (1987) tarafından önerilen şekilde yürütüldü:

1. Daha önce her bir izolat için hazırlanan kuru misellerden hassas terazi kullanılarak 50 mg tartıldı. Kuru misel steril bir havan içerisinde 1.5 ml ekstraksiyon tamponuyla ezildikten sonra ezilen karışım 1.5 ml'lik steril eppendorf içerisine konuldu. Eppendorflar 65°C'de su banyosunda 30 dakika bekletildi.
2. 30 dakika sonunda eppendorflar 5000 g'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant mikropipetle başka bir eppendorfa alındı. Eppendorftaki süpernatantın yarısı bir başka steril eppendorfa alındı. Süpernatantların üzerlerine eppendorftaki hacimle aynı olacak şekilde fenol-kloroform-izoamilalkol (25:24:1, Amresco) eklendi. Eppendorflar alt üst edilerek içindeki sıvı süt kıvamına getirildi. Daha sonra eppendorflar 12000 g'de 5 dakika santrifüjlenerek oluşan iki fazlı sıvının üst fazı alındı.
3. Üstüne eppendorftaki hacmin iki katı hacimde olacak şekilde mutlak alkol (J.T Baker) eklendi. Eppendorflar alt üst edilerek sıvılar karıştırıldı. -20°C'de 30 dakika bekletildi. 30 dakikanın sonunda 12000 g'de 20 dakika santrifüj edildi ve üstteki alkol döküldü.
4. Eppendorflara 400µl %70'lik alkol eklendi. Eppendorflar alt üst edilerek yıkandı. 12000 g'de 5 dakika santrifüjleme işlemi uygulandı. Etanol uzaklaştırıldı. Alkolün uçması için eppendorflar desikatüre konuldu ve 30 dakika beklendi.
5. Desikatörden çıkarılan eppendorflara 50 µl TE tamponu ve 0.5 mg RNase (5 µl) eklendi ve 30 dakika 37°C'de bekletildi. Daha sonra eppendorflara 345 µl TE eklenerek T.E. tamponu 400 µl'ye tamamlandı.
6. Eppendorftaki hacimle aynı miktarda fenol-kloroform-izoamilalkol ikinci kez uygulandı. Eppendorf alt üst edildikten sonra 12000 g'de 5 dakika santrifüjlendi. İki fazlı sıvının üst fazı alındı.
7. Üzerine eppendorftaki hacmin iki katı olacak şekilde mutlak alkol eklendi. Eppendorflar alt üst edilerek sıvılar karıştırıldı. Tekrar -20°C'de 30 dakika bekletildi. Sonrasında 12000 g'de 20 dakika santrifüj yapıldı ve üstteki alkol döküldü.

8. 400 µl %70'lik alkol ependorflara eklendi. Ependorflar alt üst edilerek tekrar yıkandı. 12000 g'de 5 dakika santrifüjleme işlemi uygulandıktan sonra etanol uzaklaştırıldı. Alkolün uçması için ependorflar desikatöre konuldu ve 30 dakika beklendi
9. Alkol tamamen uçtuktan sonra ependorfa 40 µl T.E. tamponu eklendi ve elde edilen DNA izolatu -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.5. Agaroz Jel Elektrofözezi

DNA'nın izolasyonundan sonra DNA'ların varlığını doğrulamak amacıyla agaroz jel elektrofözezi (Max fill HU13, HU6) yapıldı. %1'lik agaroz (Amresco) jel kullanıldı. Agaroz jelin hazırlanmasında stok olarak kullanılan 10X TBE (Tris-borik asit-EDTA) 'den elde edilen 1X TBE tamponu kullanıldı.

Trizma baz	108 g
Borik asit (Merck)	55 g
0.5M EDTA (pH:8)	40 ml

Kapaklı bir cam şişe içinde karışım hazırlandıktan sonra son hacim saf su ile 1000 ml olacak şekilde ayarlandı. Otoklavda 121°C'de 20 dakika steril edildi. Oda sıcaklığında saklandı (Sambrook ve Russell, 2001).

1X TBE:

10X TBE tamponu	100 ml
Saf su	900 ml

Karışım 1000ml'lik cam şişe içerisinde karıştırıldı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.2.5.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

100 ml 1X TBE ile 1 g agaroz ocak kullanılarak agaroz tamamen eriyinceye kadar karıştırılarak ısıtıldı. Berrak bir görüntü elde edilip jelin sıcaklığı 50°C'ye düştükten sonra taraklı elektrofözez tablasına döküldü ve soğumaya bırakıldı.

3.2.5.2. Agaroz Jelin Yürütülmesi

Hazırlanan jel soğuduktan sonra içine 1X TBE tamponu konulan elektroforez seti içine yerleştirilip taraklar çıkarıldı. DNA örnekleri yüklenirken;

DNA örneği 2ml

6x Yükleme Tamponu 1ml

(%0.25 ksilensiyanol, %0.25 bromofenol mavisi ve % 40 sükröz)

Su 3ml

olacak şekilde karışım hazırlandıktan sonra jelin oyuklarına yükleme yapıldı. Yükleme işleminden sonra jel 80 voltda 30 dakika yürütüldü (Sambrook ve Russell, 2001).

3.2.5.3. Agaroz Jeldeki DNA'nın Görüntülenmesi

Agaroz jeldeki DNA bantlarının gözlenmesi için ethidium bromid (10 mg/ml stok) kullanıldı.

Ethidium Bromid (Sigma) 1 g

Saf su 100 ml

Karışım 100 ml'lik kapaklı cam şişe içerisine konularak manyetik karıştırıcıda birkaç saat karıştırıldı. Şişenin etrafı ışığı geçirmeyecek şekilde alüminyum folyo ile sarıldı ve +4⁰C'de saklandı.

Çeker ocak içinde bulunan küvete 500 ml saf su ve 50 µl etidyum bromid ilave edildi. Küvet içine yerleştirilen agaroz jel 20 dakika boyandıktan sonra saf su içine konularak 10 dk bekletildi. Syngene Gene Genius Bio imaging System görüntüleme sisteminde DNA bantlarının görüntüleri fotoğraflandı.

3.2.6. PCR ile ITS1-5.8S-ITS2 Bölgesinin Çoğaltılması

DNA'sı izole edilen 22 izolatın ITS1-5.8S-ITS2'i kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için ITS-1 ve ITS-4 primerleri kullanıldı (White ve ark., 1990). PCR, Thermal Cycler (Primus 25) ve 0.2 ml'lik PCR tüpleri kullanılarak yapıldı.

PCR uygulamalarının hepsi buz üzerinde gerçekleştirildi. İlk olarak kullanılacak olan Primer ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) (Qiagen), Primer ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Qiagen) (White ve ark., 1990), dNTP karışımı (her birinden 25 mM olmak üzere dATP, dCTP, dGTP ve dTTP) (promega), 10X *Taq* tampon (Promega) ve MgCl₂ (Promega) buz üzerine konarak çözüldü ve karışması için vortekslendi. *Taq* DNA polimeraz ise enzim ekleme aşamasında -20°C'den çıkarılarak eklendi.

Her bir örnek için reaksiyon reaksiyon karışımı (50 µl):

10X PCR tampon	5 µl
Primer 1 (ITS1) (50pmol)	0.8 µl
Primer 2 (ITS4) (50pmol)	0.5 µl
Kalıp DNA	0.8 µl
MgCl ₂ (1.5 mM)	3 µl
dNTP mix (2.5 mM)	1 µl
ddH ₂ O	38.6 µl
<i>Taq</i> polimeraz (5U)	0.25 µl
Toplam hacim	50 µl

Taq DNA polimeraz ve kalıp DNA hariç malzemeler örnek sayısı kadar arttırılarak buz üzerine bulunan soğutulmuş 1.5ml'lik steril eppendorf tüpünün içine koyularak "master mix" hazırlandı. Karışmanın sağlanması için "master mix" vortekslendi. Buz üzerinde bekleterek soğutulan PCR eppendorflarına "master mix" karışımından 48.95 µl koyuldu. Sonra kalıp DNA'lar eklendi. Negatif kontrol eppendorfu hazırlanırken steril eppendorf içerisine 0.8 µl kalıp DNA yerine aynı

miktarda ddH₂O kondu. En son olarak *Taq* DNA polimeraz eklenerek karışım vortekslendi.

PCR tüpleri ısınmadan Thermal Cycler'a yerleştirilerek aşağıdaki program uygulandı.

94 ⁰ C	3 dk	⇒	Başlangıç denatürasyonu
94 ⁰ C	1 dk	}	30 döngü
49 ⁰ C	2 dk		
72 ⁰ C	3 dk		
72 ⁰ C	7 dk	⇒	Son sentez

3.2.6.1. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

RFLP analizlerini yapmadan önce Qiagen QIAquick PCR Purification kiti kullanılarak PCR ürünleri saflaştırıldı. Bunun için steril ependorf içine 1 hacim PCR ürününe karşılık firmanın temin ettiği PB tamponundan 5 hacim ilave edilip, karıştırıldı. Karışım yine firma tarafından sağlanan 2 ml'lik QIAquick spin kolona aktarıldı. DNA'nın membrana bağlanması için 13 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Koleksiyon tüpünde biriken çözelti uzaklaştırıldı ve koleksiyon tüpü tekrar yerleştirildi. Firma tarafından sağlanan PE tamponu yıkama amacıyla 750 µl koyularak tekrar 13 000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Koleksiyon kısmında kalan çözelti tekrar döküldü. Koleksiyon tüpü yeniden takıldı ve iyice kuruması için 13 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Bu işlem sonunda kolon kısmı tüpten çıkarılarak steril başka bir 1.5 ml'lik eppendorfa yerleştirildi. Yine firma tarafından sağlanan EB tampon kolon kısmına 50 µl ilave edilerek 13 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlemin sonunda koleksiyon tüpü atıldı. Eppendorf ise etiketlenerek -20°C'de saklandı.

Eppendorf tüpündeki saf PCR ürünün varlığını saptamak amacıyla, PCR ürünü %1'lik agaroz jelde;

Saf PCR Ürünü	2 µl
6X Yükleme Tamponu	1 µl
ddH ₂ O	3 µl

yürütülerek boyandıktan sonra görüntüleme sisteminde varlığı kontrol edildi.

3.2.7. PCR-RFLP

PCR ürünlerinin saflaştırılmasından sonra restriksiyon enzimleriyle kesilmesi işlemi olan PCR-RFLP (restriksiyon fragmentlerinin uzunluklarının polimorfizmi) için *HhaI* (*Haemophilus haemolyticus* - ATCC 10014), *MseI* (*Micrococcus* türleri - R. Morgan) ve *Taq^αI* (*Escherichia coli* - NEB) (New England BioLabs) enzimleri kullanıldı. Bu işlem çoğaltılan ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesinin, izolatlar arasındaki genetik farklılığını belirlemek amacıyla yapıldı.

Enzimler firmanın önerdiği şekilde 5U kullanılacak şekilde toplamda 10 µl hazırlandı (Çizelge 3.2). *HhaI* ve *MseI* enzimleri 37°C’de gece boyu ve daha sonra 65°C’de 20 dakika ise enzim inaktivasyonu için bekletildi. Fakat *Taq^αI* enzimi 65°C’de 5 saat inkübe edildikten sonra inaktivasyonu için 80°C’de 20 dakika bekletildi.

Çizelge 3.2. RFLP karışımının hazırlanması

	<i>HhaI</i>	<i>MseI</i>	<i>Taq^αI</i>
PCR ürünü	6 µl	6 µl	6 µl
100XBSA	0.1 µl	0.1 µl	0.1 µl
NEBuffer	1 µl(Buffer4)	1 µl(Buffer4)	1 µl(Buffer3)
Enzim	0.25 µl	0.5 µl	0.5 µl
Ultra ddH₂O	2.65 µl	2.4 µl	2.4 µl
Toplam	10 µl	10 µl	10 µl

Oluşan şablonları görmek için %2’lik hazırlanan metafor agaroz jeldeki oyuklara;

Metafor agaroz jel (Lonza Rockland, ME USA) 2.4 g

1X TBE 120 ml

10 µl PCR-RFLP ürünü ve marker (*HhaI* ve *MseI* için Amresco ve *Taq^αI* için Fermentas 100bp DNA Ladder) yüklendikten sonra, 70 voltta 4 saat koşturuldu. Koşturma işlemi bittikten sonra ethidium bromid ile boyanan jel görüntüleme sisteminde incelendi.

3.2.7.1. RFLP Verilerinin Analizi

HhaI, *MseI* ve *Taq^I* enzimleriyle kesildikten sonra incelenen ITS1-5.8S-ITS2 rDNA bölgesine ait PCR amplifikasyon ürünlerinin fragment büyüklükleri belirlendi. Oluşan her bir fragment için bir veri matrisi oluşturuldu. Analiz için BioEdit 7.0.5.3. (Hall, 1999), PHYLIP 3.67 (Felsenstein, 2005) ve TreeView 1.6.6 (Roderic, 1996) paket programları kullanılarak UPGMA (ağırlıklı olmayan çift grup yöntemin algoritması - unweighted pair group method with averages) ağacı oluşturuldu.

3.2.8. ITS1-5.8S-ITS2 Bölgesi DNA Dizileme

ITS-1 ve ITS-4 primerleri kullanılarak izolatların ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesi PCR'la çoğaltıldı. Çoğaltılan her bir PCR ürünün 3 µl'si hazırlanan %1'lik agaroz jelde 80 voltta 30 dakika koşturularak ürün varlığı doğrulandı. Çoğaltılmış ürünler sekans işlemleri için Macrogen firmasına gönderildi. Macrogen tarafından automatic sequencer 3730XL kullanılarak ABI 1.6.0 analizi ile elde edilen dizileme verileri internet ortamında gönderildi.

3.2.8.1. Dizileme Verilerinin Analizi

İzolatların iki yönlü okunan ham sekans verilerinin konsensusunu elde etmek amacıyla Sequencher 4.7 Demo programı kullanıldı. Programda sekanslar kontrol edildikten sonra konsensus sekansları oluşturup oluşturmadıklarına bakıldı. Oluşan sekanslar SeqMan programıyla bir araya getirildi. CLUSTAL X (2.0) programında sekanslar otomatik olarak hizalandıktan (alignment) sonra elle düzeltildi.

3.2.9. Dizileme Verilerinin Arasındaki Filogenetik İlişkinin İncelenmesi

İzolatlar arasındaki filogenetik ilişkileri ortaya koymak amacıyla Neighbor Joining (NJ) ve Parsimoni algoritmaları kullanılarak ağaç oluşturuldu.

3.2.9.1. “Neighbor Joining – Bootstrap” Analizi

NJ ağacının oluşturulması amacıyla Phylip v3.68 programı kullanıldı. İlk önce uzaklık matriksinin oluşturulması için dnadist, oluşan matriksten ağaç oluşturmak için ise neighbor opsiyonundan yararlanıldı. Baz değişim modeli olarak F84 (Felsenstein) kullanıldı. Ağaç eldesi için Treeview ağaç çizim programı kullanıldı.

Elde edilen NJ ağacının istatistiksel güvenilirliğini belirlemek için bootstrap analizi yapıldı. Bunun için Phylip v3.68 versiyonun seqboot ve consense opsiyonları kullanıldı. Analizlerde tekrar F84 baz değişim modeli kullanıldı ve işlem 1000 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.2.9.2. Parsimoni Analizi

Parsimoni analizleri için Phylip v3.68 programının dnapars opsiyonu kullanıldı. Analizde en tutumlu-parsimoni 10000 ağaç tutuldu ve consens opsiyonu (majority rule) kullanılarak konsensus ağaç oluşturuldu.

4. BULGULAR

4.1. Çalışılan *Rhizoctonia* İzolatlarının Kültürel Morfolojisi

Kültürel morfolojilerini belirlemek amacıyla 22 *Rhizoctonia* spp. izolatu PDA'ya ekildi ve 25°C'de 1 ay süreyle inkübe edildi. Bu süreçte hif rengi, sklerosyumlarının yoğunluğu ve rengi, hava hiflerinin yoğun olarak bulunup bulunmaması ve petri altı pigmentasyonları gibi özellikler belirlendi (Çizelge 4.1).

Waitea circinata var. *zeae* (*Rhizoctonia zeae*) izolatlarının kendi içlerinde; hif rengi, sklerosyumlarının yoğunluğu ve rengi, hava hiflerinin yoğun olarak bulunup bulunmaması ve petri altı pigmentasyonları bakımından oldukça farklı oldukları gözlemlendi. *W. circinata* var. *zeae* izolatlarında hif rengi genel olarak turuncu gözlemlendi. Hif renklerindeki farklılıklara göre; hifleri daha koyu turuncu pigmentasyona sahip olan izolatlar: Ağırlar, As7s11A, Bre ve C504 iken; hifleri turuncu pigmentasyona sahip olan izolatlar: Çrt21-P2b, ED100, Rcl246, Yakakent ve Yakıntaş; hifleri açık turuncu olan pigmentasyona sahip izolatlar ise, ÇHTS1-ABC, Çrt2-P2a, ED153, M-003, Macar, Rss318, Rss319, Sarıyurt ve USA06 olarak ayrıldı.

W. circinata var. *zeae* izolatları sklerosyum oluşturma şekillerine göre; çok sayıda sklerosyum oluşturanlar: ÇHTS1-ABC, Çrt2-P2a, Çrt21-P2b, ED100, M-003, Rcl246, Rss319, Yakakent ve Yakıntaş; orta sıklıkta sklerosyum oluşturanlar: As7s11A, C504, ED153, Macar, Rss318 ve USA06; az sayıda sklerosyum oluşturan izolatlar: Ağırlar, Bre ve Sarıyurt olarak ayrıldı.

Waitea circinata var. *zeae* (*Rhizoctonia zeae*) izolatlarının kendi içlerinde; hif rengi, sklerosyumlarının yoğunluğu ve rengi, hava hiflerinin yoğun olarak bulunup bulunmaması ve petri altı pigmentasyonları bakımından oldukça farklı oldukları gözlemlendi. *W. circinata* var. *zeae* izolatlarında hif rengi genel olarak turuncu gözlemlendi. Hif renklerindeki farklılıklara göre; hifleri daha koyu turuncu pigmentasyona sahip olan izolatlar: Ağırlar, As7s11A, Bre ve C504 iken; hifleri turuncu pigmentasyona sahip olan izolatlar: Çrt21-P2b, ED100, Rcl246, Yakakent ve Yakıntaş; hifleri açık turuncu olan pigmentasyona sahip izolatlar ise, ÇHTS1-ABC, Çrt2-P2a, ED153, M-003, Macar, Rss318, Rss319, Sarıyurt ve USA06 olarak ayrıldı.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan *Rhizoctonia* spp. izolatlarının kültürel morfolojisi

İzolatlar	Hif Rengi	Sklerosyum	Sklerosyum Rengi	Hava Hif	Petri Altı
Bre	Gri - turuncu	Çok az	Gri - turuncu	Yok	Sarı - turuncu
ED153	Turuncu - beyaz	Orta	Gri - turuncu	Az	Gri - sarı
Rcl246	Gri - turuncu	Çok	Gri - turuncu	Az	Gri - turuncu
ED100	Gri - turuncu	Çok fazla	Gri - turuncu	Yok	Gri - turuncu
Rss318	Sarı - turuncu	Az	Turuncu - kırmızı	Yok	Sarı - turuncu
M 003	Sarı - turuncu	Çok fazla	Turuncu - kırmızı	Yok	Gri - sarı
Ağırlar	Gri - turuncu	Az	Gri - turuncu	Yok	Gri - turuncu
As7s11A	Gri - turuncu	Çok	Gri-turuncu	Orta	Sarı - turuncu ve gri - turuncu
USA06	Gri - sarı	Orta	Gri - turuncu	Çok	Gri - sarı
Rss319	Gri - sarı	Çok fazla	Gri - turuncu	Yok	Gri - sarı
ÇrT2-P2a	Sarı - turuncu	Çok	Gri - turuncu	Yok	Gri - turuncu
Sarıyurt	Turuncu	Orta	Gri - turuncu	Yok	Sarı - turuncu
Yakakent	Turuncu	Çok fazla	Gri - turuncu	Orta	Tabanı gri - turuncu ve koyu gri - turuncu çizgili
ÇHTS-1ABC	Turuncu - beyaz	Çok fazla	Gri - turuncu	Az	Gri - turuncu
ÇrT21-P2b	Turuncu	Çok fazla	Gri - turuncu	Orta	Ortası sarı - turuncu ve kenarları turuncu
Macar	Sarı - turuncu	Çok	Gri - turuncu	Çok az	Sarı - turuncu
C504	Turuncu - kırmızı	Orta	Turuncu - kırmızı	Orta	Tabanı gri - turuncu ve gri - turuncu çizgili
Yakıntaş	Gri - turuncu	Çok fazla	Gri - turuncu	Yok	Gri - turuncu
ED146	Gri - turuncu (kenarlar gri - sarı)	Orta büyük	Gri - turuncu	Yok	Gri - turuncu
801387	Gri - turuncu	Çok	Kahverengi	Orta	Gri - sarı
GH 700	Beyaz	Orta	Turuncu	Az	Beyaz
Mm 4-3	Turuncu	Az	Turuncu - kırmızı	Yok	Sarı - turuncu

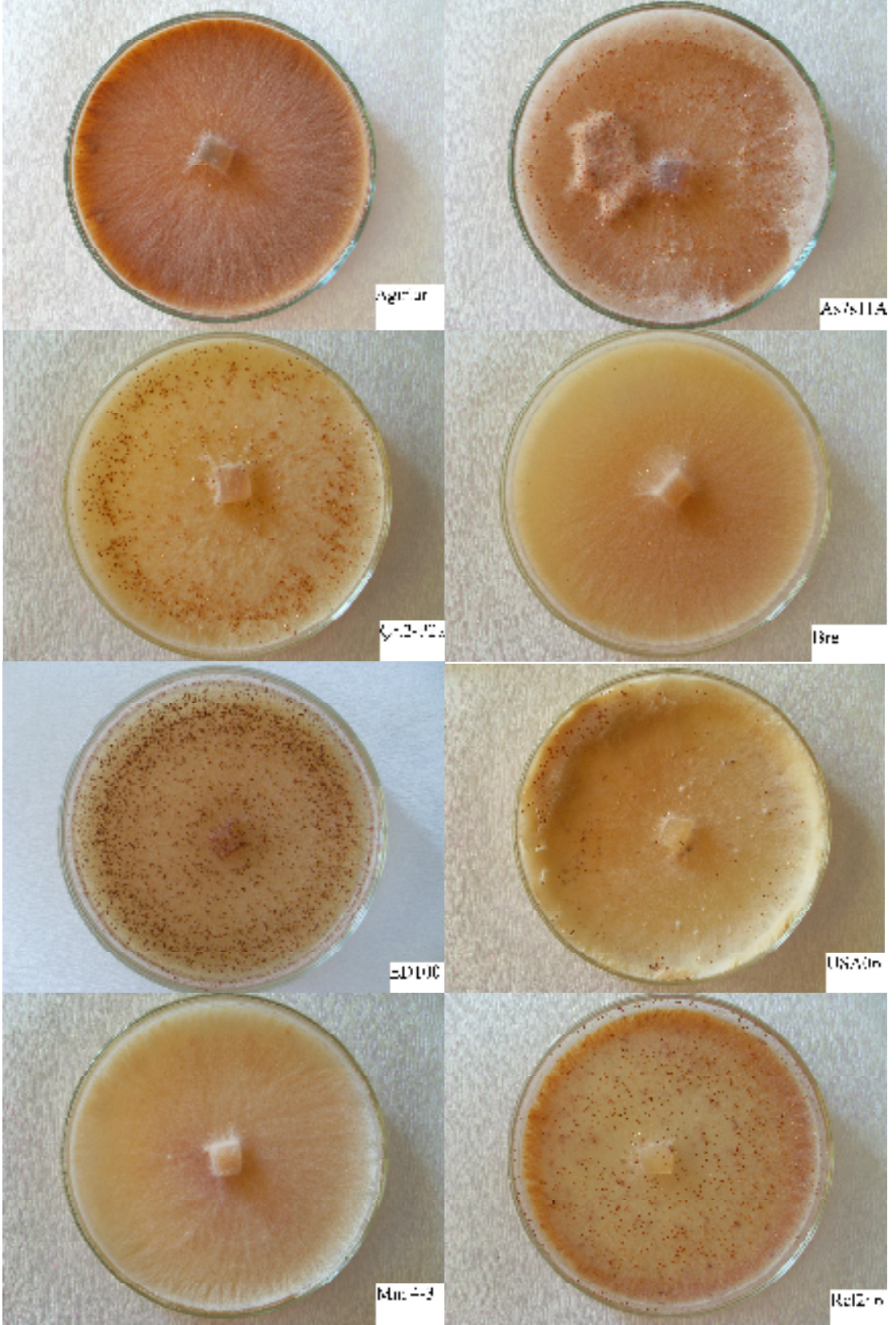
Waitea circinata var. *zeae* (*Rhizoctonia zeae*) izolatlarının kendi içlerinde; hif rengi, sklerosyumlarının yoğunluğu ve rengi, hava hiflerinin yoğun olarak bulunup bulunmaması ve petri altı pigmentasyonları bakımından oldukça farklı oldukları gözlemlendi. *W. circinata* var. *zeae* izolatlarında hif rengi genel olarak turuncu gözlemlendi. Hif renklerindeki farklılıklara göre; hifleri daha koyu turuncu pigmentasyona sahip olan izolatlar: Ağırlar, As7s11A, Bre ve C504 iken; hifleri turuncu pigmentasyona sahip olan izolatlar: Çrt21-P2b, ED100, Rcl246, Yakakent ve Yakıntaş; hifleri açık turuncu olan pigmentasyona sahip izolatlar ise, ÇHTS1-ABC, Çrt2-P2a, ED153, M-003, Macar, Rss318, Rss319, Sarıyurt ve USA06 olarak ayrıldı.

W. circinata var. *zeae* izolatları sklerosyum oluşturma şekillerine göre; çok sayıda sklerosyum oluşturanlar: ÇHTS1-ABC, Çrt2-P2a, Çrt21-P2b, ED100, M-003, Rcl246, Rss319, Yakakent ve Yakıntaş; orta sıklıkta sklerosyum oluşturanlar: As7s11A, C504, ED153, Macar, Rss318 ve USA06; az sayıda sklerosyum oluşturan izolatlar: Ağırlar Bre ve Sarıyurt olarak ayrıldı.

Yoğun miktarda hava hifi bulunduran *W. circinata* var. *zeae* izolatları ise As7s11A ve USA06 olarak tespit edildi.

Petri altı pigmentasyonu bakımından *W. circinata* var. *zeae* izolatları incelendiğinde genel olarak sarımsı turuncu veya grimsi turuncu olarak ayrıldıkları gözlemlendi. Buna göre sarı turuncu olanlar Bre, Çrt21-P2b, Rss318 ve Sarıyurt; grimsi turuncu olanlar Ağırlar, C504, ÇHTS1-ABC, Çrt2-P2a, ED100, Macar, Rss319, Yakıntaş ve Yakakent izolatları idi. Bunların dışında hem grimsi hem de sarımsı turuncu bulunduranlar As7s11A, Rcl246 ve USA06 iken, grimsi sarı pigmentasyona sahip olanlar ise M 003 ve ED153 izolatları idi.

W. circinata var. *zeae* izolatları kendi aralarında gerek hif ve sklerosyum pigmentasyonu gerekse hava hifi yoğunlukları bakımından morfolojik olarak farklılıklar gösterdi (Şekil 4.1).



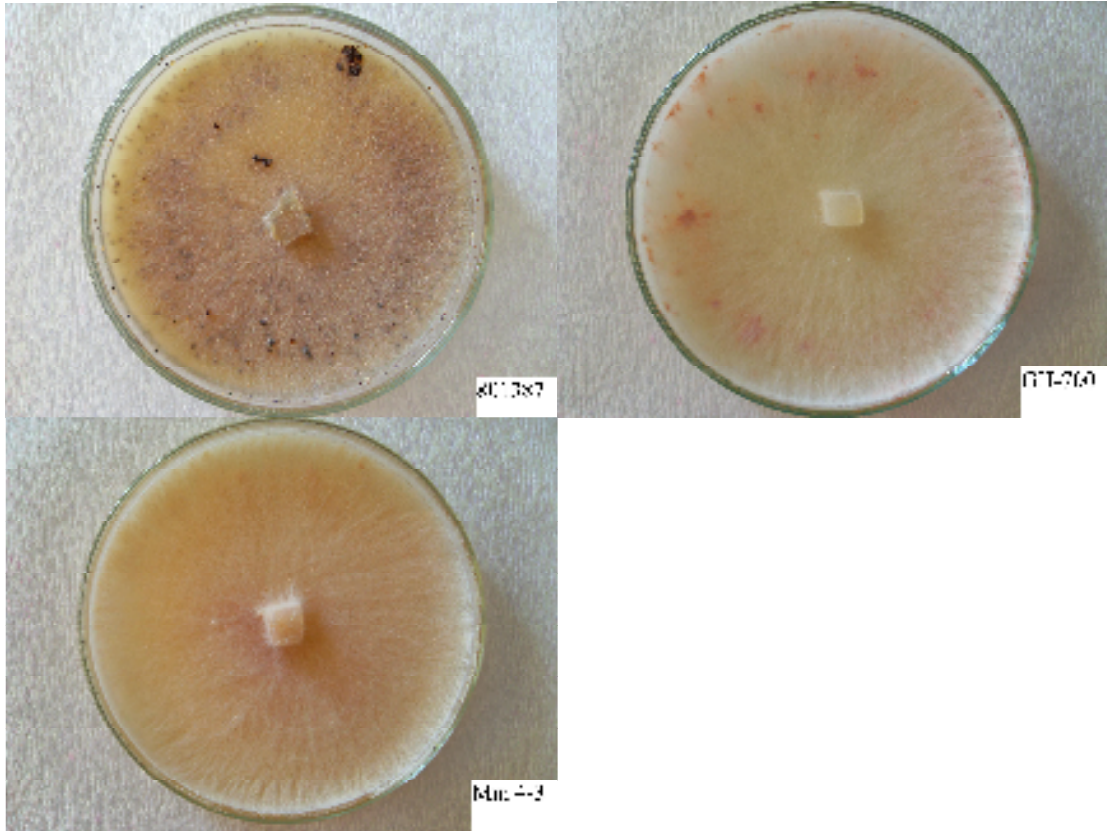
Şekil 4.1. *W. circinata* var. *zae* izolatlarının PDA'da gelişimi

PDA'da gelişen *W. circinata* var. *oryzae* izolatlarının hif pigmentasyonu bakımından oldukça çeşitli oldukları gözlemlendi. Bunlardan 801387 grimsi turuncu, GH-700 beyaz ve Mm 4-3 turuncu renkte idi.

W. circinata var. *oryzae* izolatları sklerosyum yoğunluklarına göre de değişken olmakla birlikte sklerosyum oluşturan 801387 ve GH-700 izolatlarının sklerosyum renkleri de birbirinden farklı idi. 801387'nin sklerosyum pigmentasyonu kahverengiyken, GH-700'ün rengi turuncu oldu.

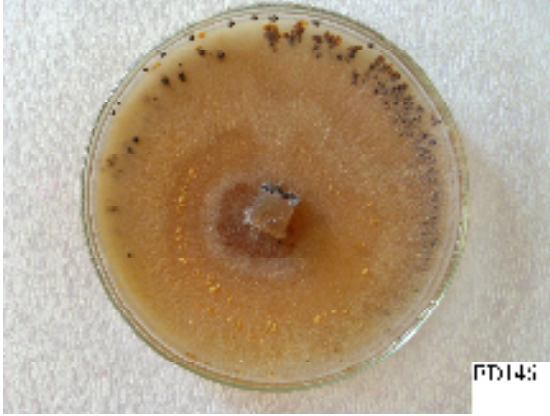
Petri altı pigmentasyonu bakımından *W. circinata* var. *oryzae* izolatlarından 801387 grimsi sarı, GH 700 beyaz ve Mm 4-3 sarımsı turuncu renkli idi.

W. circinata var. *oryzae* izolatları arasında da kültürel morfoloji yüzünden farklılık gözlemlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *W. circinata* var. *oryzae* izolatlarının PDA'da gelişimi

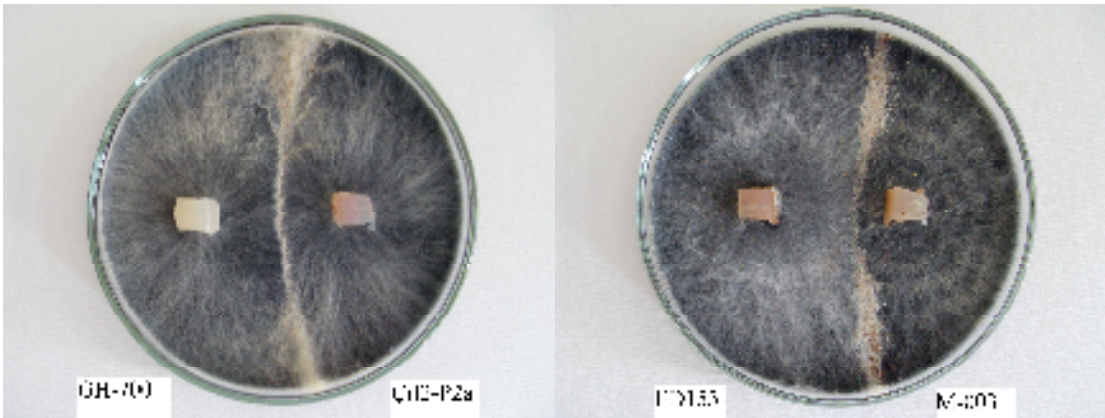
W. circinata var. *cirrinata* izolatu ED146'nın hif pigmentasyonu kenarlarda grimsi sarı ve petrinin ortalarında grimsi turuncu olarak, orta sıklıkta bulunan sklerosyumlarının rengi grimsi turuncu olarak ve petri altı hif rengi ise yine grimsi turuncu olarak gözlemlendi (Şekil 4.3).



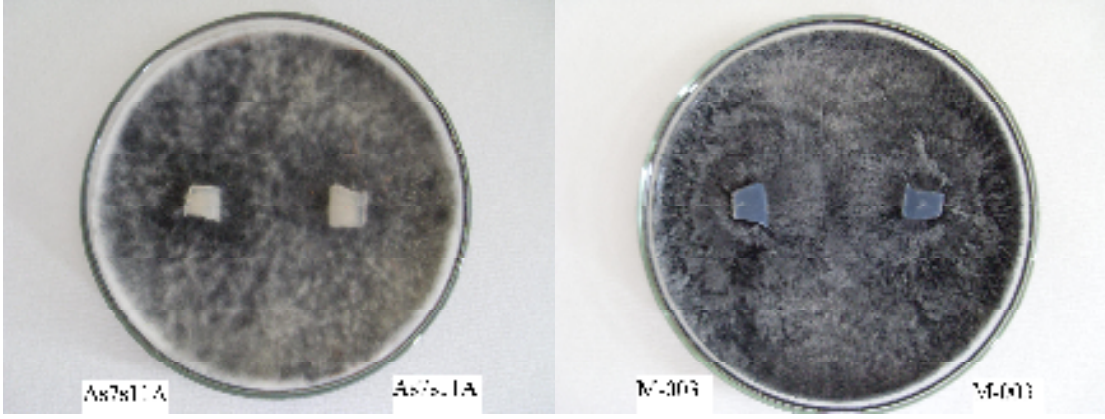
Şekil 4.3. *W. circinata* var. *circinata* izolatının PDA'da gelişimi

4.2. İzolatların Makroskopik Anastomoz Durumlarının İncelenmesi

PDCA (patates dekstroz kömür agar) agarda yapılan makroskopik anastomoz testlerinde izolatlar arasında çizgi şeklinde bir hat oluşması durumu izolatların hifleri arasında C2 tipi anastomoz yani tuft reaksiyonunun (T) oluştuğunu (Şekil 4.4), çizginin görülmemesi ve hiflerin birbirine karışması durumu ise izolatların hifleri arasında merge reaksiyonunu (M) yani C3 reaksiyonunun varlığını gösterdi (Şekil 4.5).



Şekil 4.4. PDCA agarda izolatlarda görülen T-C2 anastomoz durumu



Şekil 4.5. PDCA agarda izolatlarda görülen M-C3 anastomoz durumu

Rhizoctonia izolatlarının kendileriyle ve birbirleriyle yaptıkları makroskobik anastomoz sonucunda Çizelge 4.2’de gösterilen sonuçlar elde edildi.

Çizelge 4.2. *Rhizoctonia* spp. izolatlarının makroskobik anastomoz sonuçları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
22	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
21	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
20	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C3		
19	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C3			
18	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2				
17	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2					
16	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2							
15	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C3							
14	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2									
13	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2										
12	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2											
11	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C3											
10	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C3												
9	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2													
8	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C3														
7	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2															
6	C2	C2	C2	C2	C2	C3																
5	C2	C2	C2	C2	C3																	
4	C2	C2	C2	C2																		
3	C2	C2	C3																			
2	C2	C3																				
1	C3																					

1. MOO3
2. AS7S11A
3. C504
4. Bre
5. Rcl246
6. Rss318
7. Rss319
8. Ağırlar
9. Sarıyurt
10. Yakıntaş
11. Çrt2 - P2a

12. Çrt21 - P2b
13. Yakakent
14. ED100
15. ED153
16. ÇHTS1-ABC
17. USA06
18. Macar
19. ED146
20. 801387
21. GH 700
22. Mm 4-3

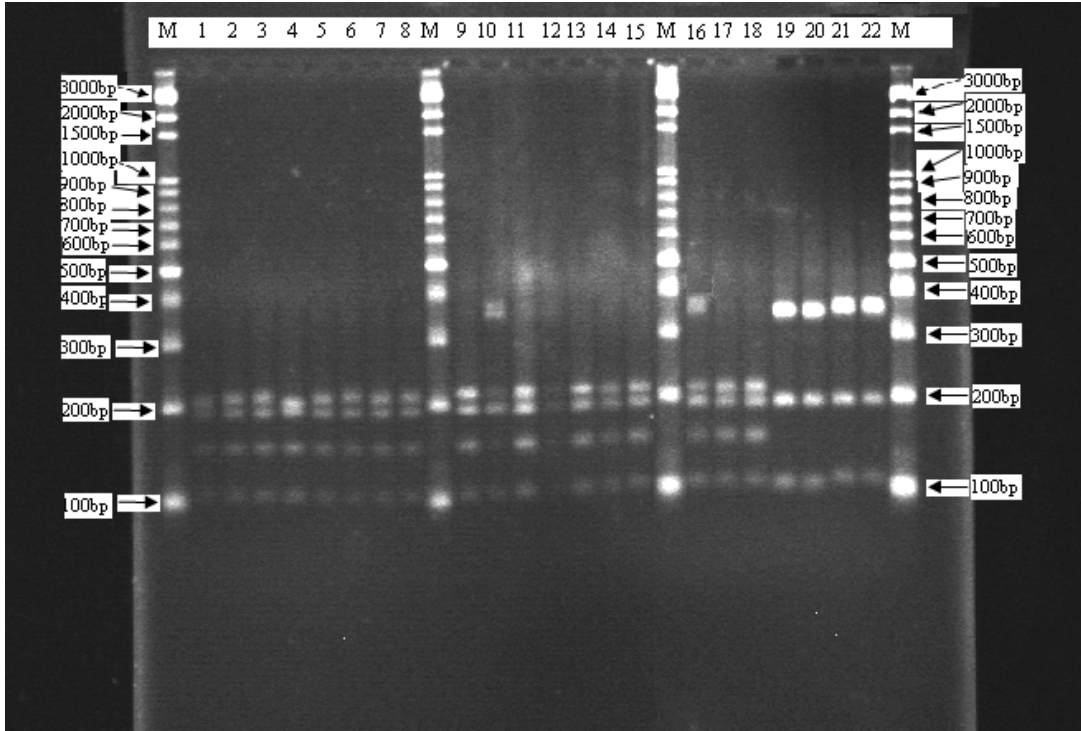
Dip Not: C2'ler T (turf) reaksiyonu, C3'ler ise M (merge) reaksiyonu göstermektedir.

Anastomoz durumları incelendiğinde hiçbir izolatin birbirleriyle C3-M anastomoz yapmadığı gözlemlendi. Kendi kendine C3-M anastomoz yapmayan izolatlarda mevcuttu. Buna göre M-003, As7s11A, Rcl246, Rss318, Ağrılar, Yakıntaş, Çrt2-P2, ED153, ED146 ve 801387'nin kendileriyle anastomoz yaptığı görüldü. Bu sonuçlar izolatların birbirleriyle ilişkili olduklarını gösterdi, fakat bu sonuçlarla daha ileri seviyede bir ayırım yapılamadı.

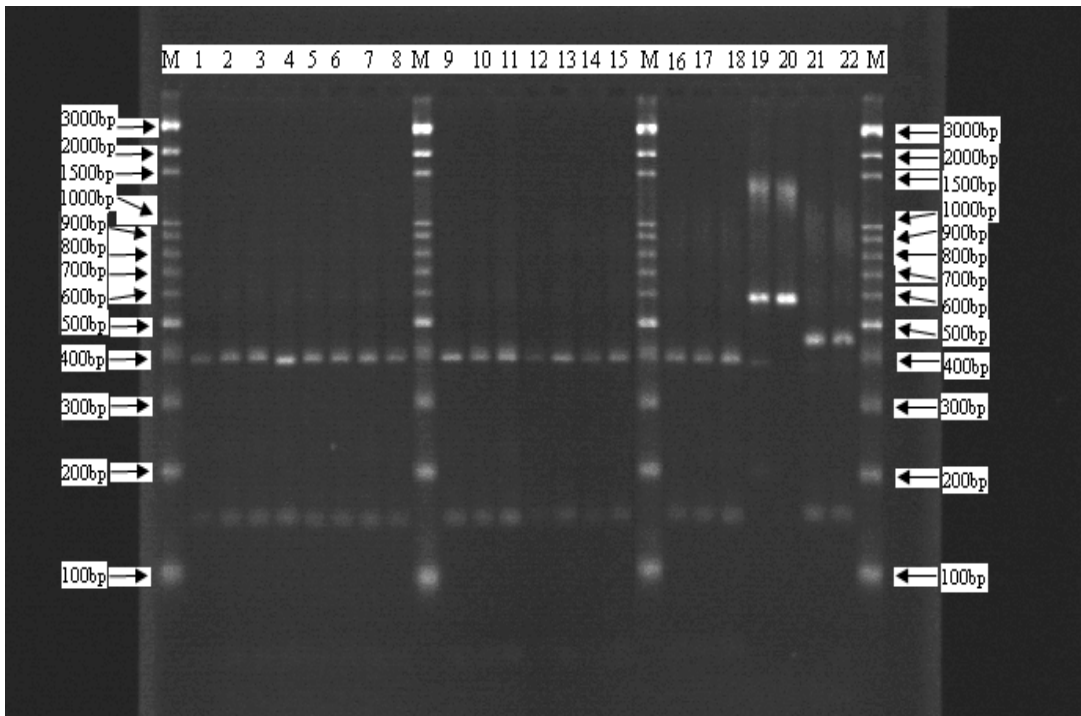
4.3. PCR-RFLP Sonuçlarının İncelenmesi

ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesi çoğaltılan ürünler *HhaI*, *MseI* ve *Taq^αI* enzimleri ile kesildi ve jel elektroforezinde yürütüldükten sonra görüntüldü. *HhaI*, *MseI* ve *Taq^αI* ile yapılan enzim kesimlerinin elektroforez görüntüleri sırasıyla Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8 de verildi. *Rhizoctonia* izolatlarının PCR ürünleri aşağıdaki verilen sırayla yüklendi:

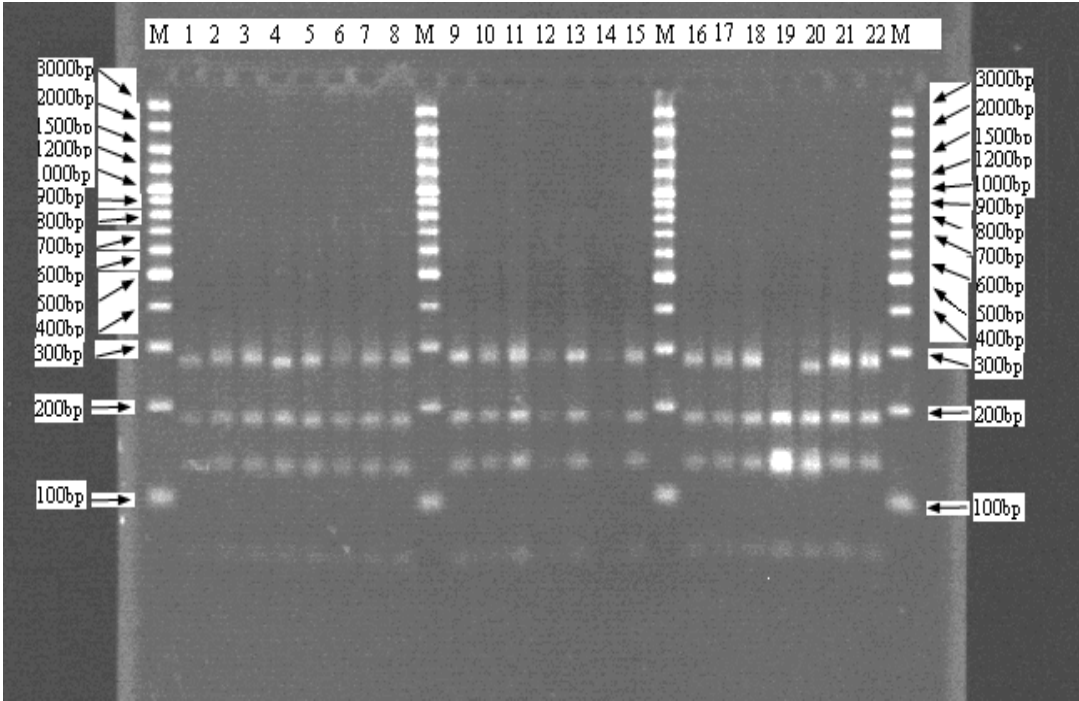
- | | |
|-----------------|------------|
| 1. MOO3 | 19. ED146 |
| 2. AS7S11A | 20. 801387 |
| 3. C504 | 21. GH700 |
| 4. Bre | 22. Mm4-3 |
| 5. Rcl246 | |
| 6. Rss318 | |
| 7. Rss319 | |
| 8. Ağrılar | |
| 9. Sarıyurt | |
| 10. Yakıntaş | |
| 11. Çrt2 - P2a | |
| 12. Çrt21 - P2b | |
| 13. Yakakent | |
| 14. ED100 | |
| 15. ED153 | |
| 16. ÇHTS1-ABC | |
| 17. USA06 | |
| 18. Macar | |



Şekil 4.6. *HhaI* enzimiyle kesim

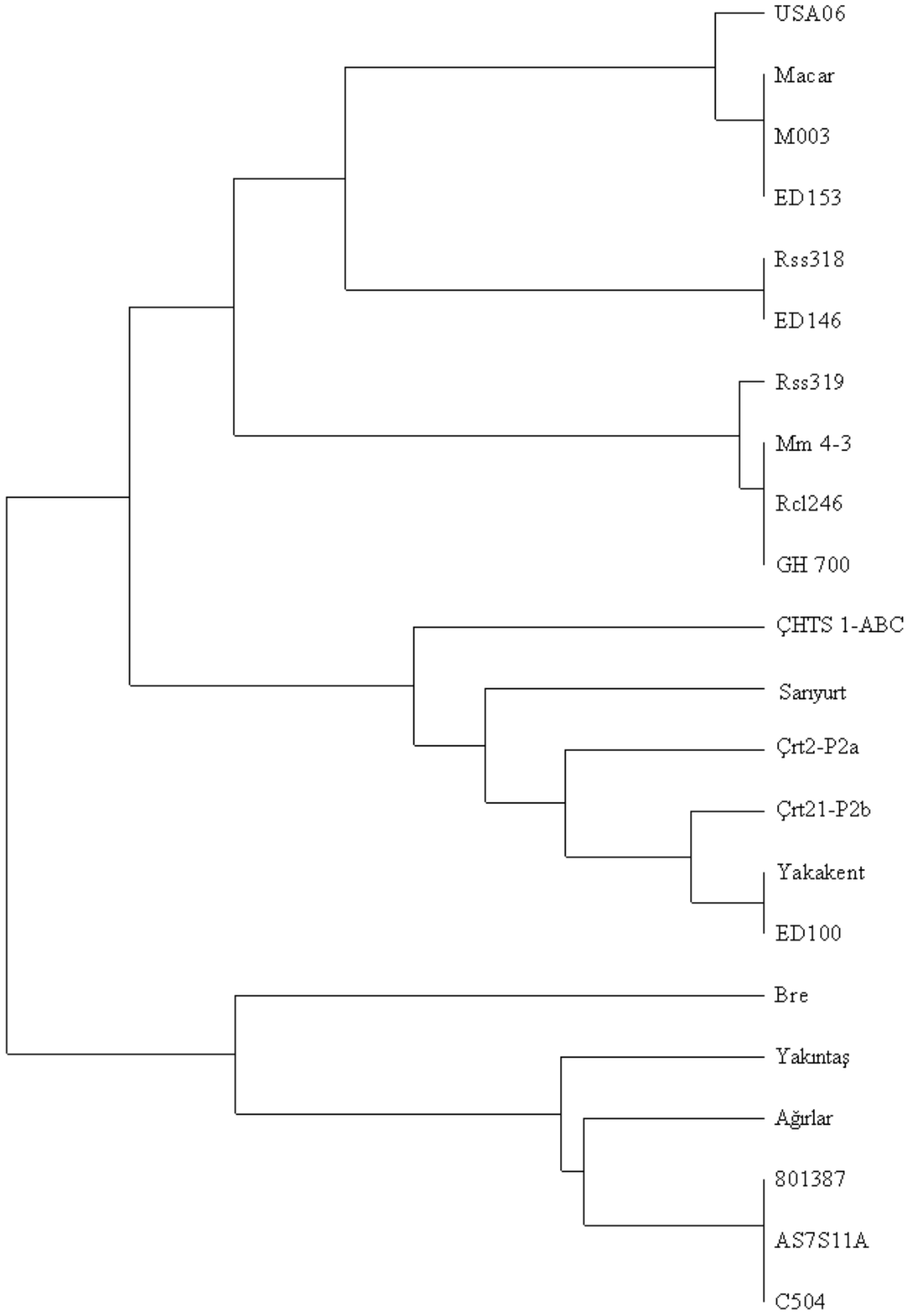


Şekil 4.7. *MseI* enzimiyle kesim



Şekil 4.8. *Taq*^I enzimiyle kesim

ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesi PCR ürünleri enzimlerle kesildikten sonra oluşan fragmentler, bu fragmentlerin bulunup bulunmama durumlarına göre 1 ve 0 olarak kodlandı. Kodlama sonuçları kullanılarak Phylip v3.68 programında UPGMA ağaçları elde edildi (Şekil 4.9).



0.01

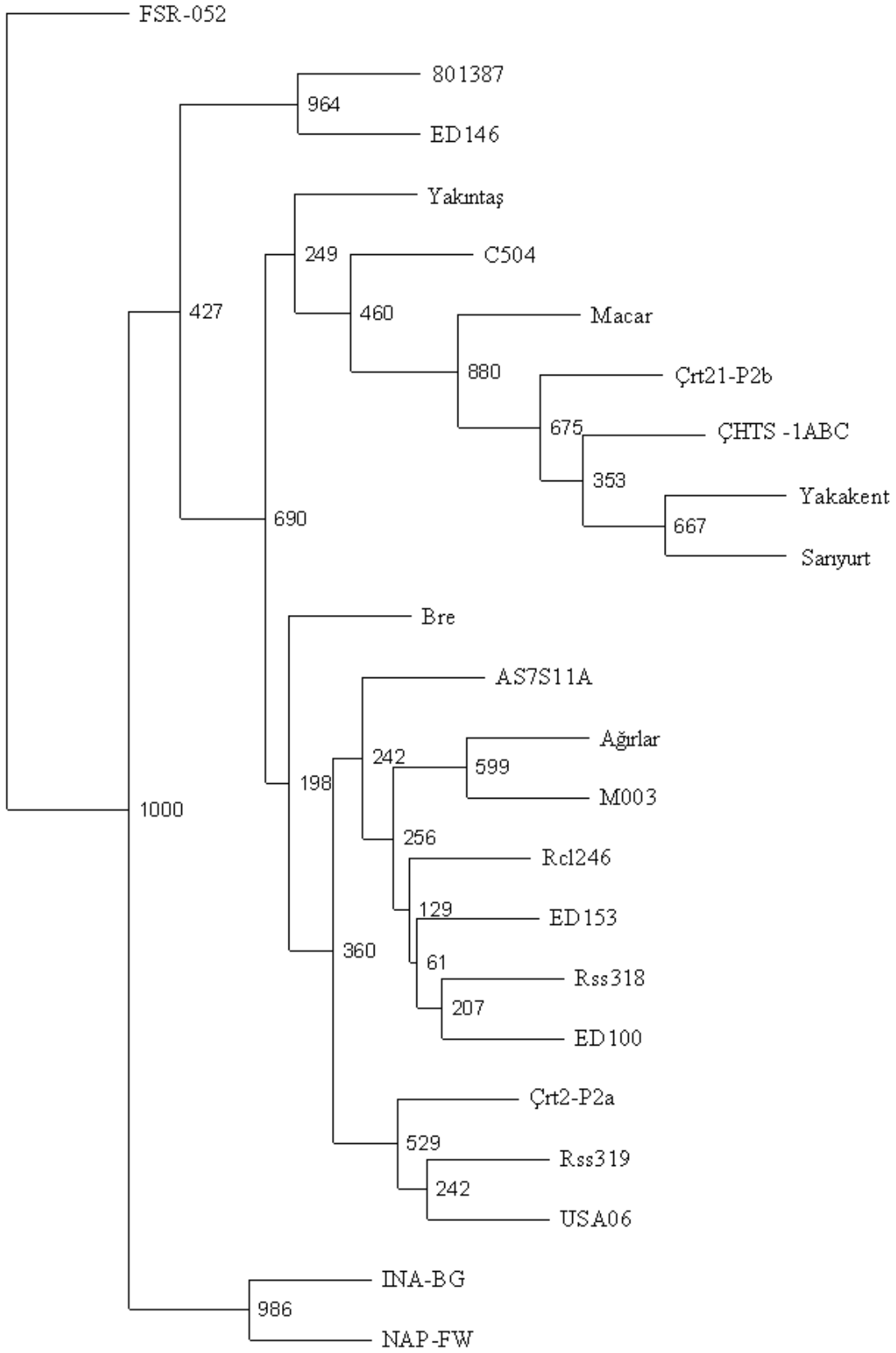
Şekil 4.9. RFLP ürünlerinin UPGMA ağacı

Ağaçta görüldüğü gibi *W. circinata* var. *zeae* izolatları *W. circinata* var. *oryzae* ve *W. circinata* var. *circinata* izolatlarından kesin bir şekilde ayrılamadı. İzolatlar 2 dala bölündü ve her dalda karışık bir dağılım gösterdi. *W. circinata* var. *zeae* izolatları ise genel olarak diğer izolatlardan ayrılabilirdi.

4.4. DNA Dizi Analizi Sonuçlarının İncelenmesi

ITS1 ve ITS4 primerleriyle çoğaltılan *Rhizoctonia* spp. ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesi ürünlerinin dizi analizi Macrogen firması tarafından yapıldı. Analiz sonuçları alındıktan sonra, SeqMan programında diziler birleştirilmeye çalışıldı fakat bazı diziler birleştirilemedi. Bunun sonucunda genel olarak iyi olan ve ITS4 primeri ile dizilenen ITS2 gen bölgelerine ait diziler ağaç yapımında kullanıldı.

Önceki çalışmalarda kullanılan ve izolat numarası AY684917 ve kodu FSR-052 olan *Athelia (Sclerotium) rolfsii* izolatı dış grup olarak kullanıldı (Sharon ve ark., 2006). *W. circinata* var. *oryzae* izolatları GH-700 ve Mm 4-3'nin ITS2 dizileri çok kısa olmalarından dolayı kullanılamadı. Ek olarak NCBI'nin sitesinden alınan AB213570 ve AB213576 numaralı NAP-FW ve INA-BG kodlu *W. circinata* var. *agrostis (Rhizoctonia agrostis)* izolatları da ağaç yapımında kullanıldı. Bu diziler kullanılarak Phylip v3.68 programında elde edilen Neighbor Joining-Bootstrap ağacı Şekil 4.10'de verildi.

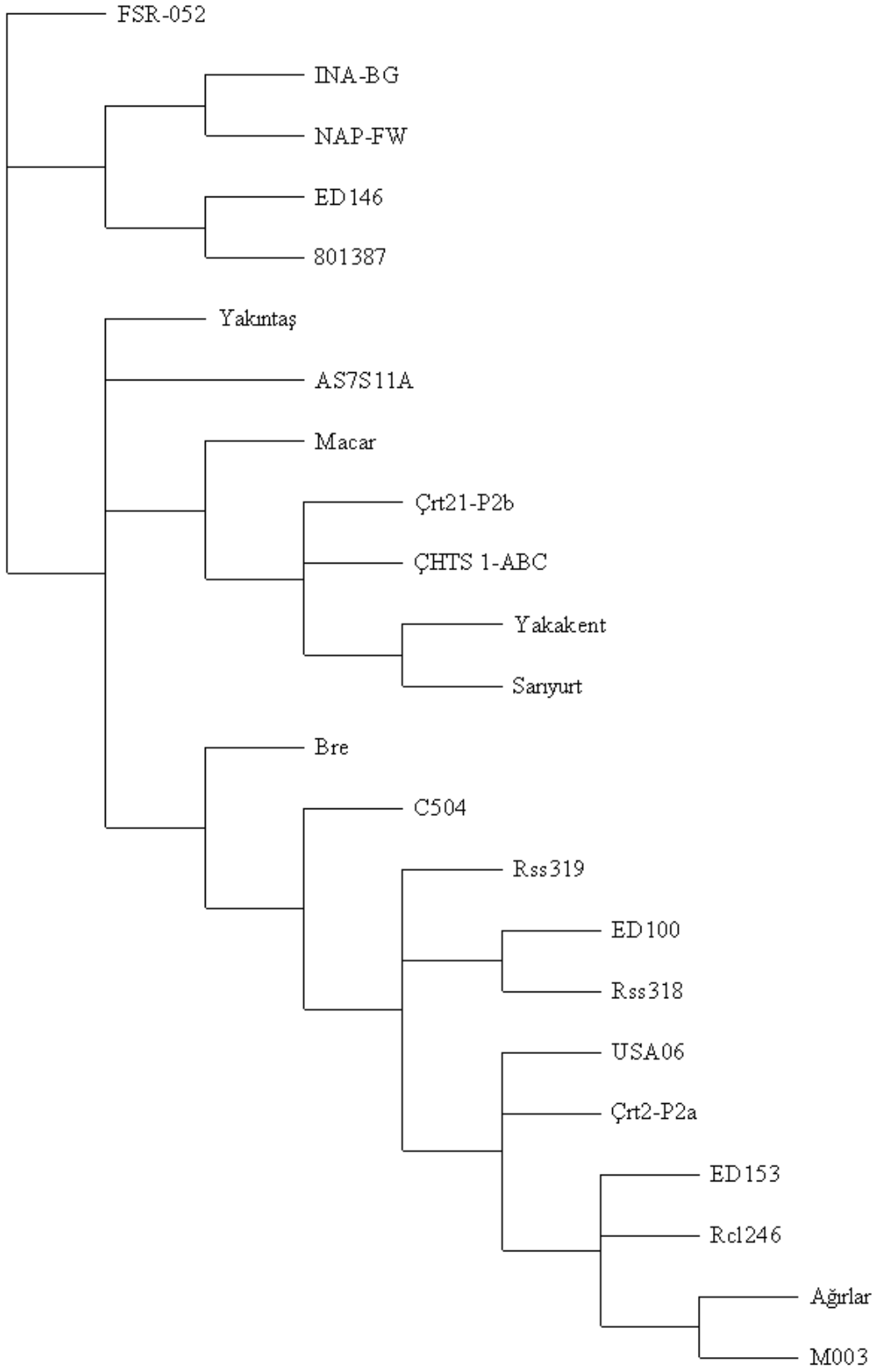


_100

Şekil 4.10. *W. circinata* ITS2 bölgesinin Neighbor Joining ağacı

Ağaçta görüldüğü gibi bütün *W. circinata* var. *zeae* izolatları, *W. circinata* var. *oryzae*, *W. circinata* var. *agrostis* ve *W. circinata* var. *circinata* izolatlarından ayrıldı. *W. circinata* var. *zeae* izolatları ise 691 (yaklaşık %70) bootstrap değeriyle iki alt dala ayrıldı.

Phylip programında elde edilen parsimoni ağacı ise Şekil 4.11'da verildi. Buna göre:



_0.1

Şekil 4.11. *W. circinata*'nın Parsimoni ağacı

İncelenen *W. circinata* var. *zeae* izolatlarının rDNA-ITS dizilerinin homojen olmadığı görüldü. Neighbor-Joining ve Parsimoni ağaçları topolojik olarak birebir aynı olmamakla birlikte, *Waitea circinata* var. *zeae* (*R. zeae*) izolatlarının iki alt gruba ayrılmasını sağlandı.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada dünyanın çeşitli ülkelerinden (ABD, Brezilya Japonya, Macaristan, Tayvan ve Türkiye) elde edilen *Waitea circinata* var. *zeae* izolatları karşılaştırılarak, bu izolatlar biyolojik çeşitlilik yönünden değerlendirilmiştir. *Waitea circinata* türüne ait 18 adet *Waitea circinata* var. *zeae* (*R. zae*), 1 adet *Waitea circinata* var. *circinata* ve 3 adet *Waitea circinata* var. *oryzae* (*R. oryzae*) izolatu morfolojik, makroskopik anastomoz ve genetik farklılıkları bakımından incelenmiştir.

Otuz günlük inkübasyon süresinde *Waitea circinata* var. *zeae* izolatlarının koloni renklerinin beyazdan turuncuya doğru değiştiği belirlenmiştir. Bu sonuç, Voorhees (1934)'in *Waitea circinata* var. *zeae* için belirttiği “genç dönemlerinde şeffaf ve tanecikli, olgun dönemlerinde ise kırmızımsı kahverengi” tanımından daha ziyade Toda ve ark., (2005)'nin *Waitea circinata* var. *zeae* için belirttiği pigmentasyon seyri ile uyumludur. Sklerosyumlarının renginin ise turuncudan kahverengimsi turuncuya doğru değiştiği saptanmıştır. Kültürel morfoloji çalışmaları sonucunda *Waitea circinata* var. *zeae* izolatları arasında morfolojik özellikleri açısından bazı farklılıklar gözlenmiş fakat bu özelliklerle *Waitea circinata* var. *zeae* izolatları içinde anlamlı gruplar oluşturulamamıştır.

Makroskopik anastomoz testleri sonucunda izolatların birbirleriyle M (C3) anastomoz yapmadıkları gözlemlenmiştir. Buna karşılık, kendi kendisiyle M (C3) tipi anastomoz yapan izolat sayısı da oldukça azdır. *Waitea circinata* var. *zeae* WAG-Z içerisinde anastomozun sık sık meydana geldiğinin bildirilmiş olmasına rağmen (Toda ve ark.,2005; Oniki ve ark. (1985)'dan), makroskopik anastomoz analizi ile *Waitea circinata* içinde anastomoz grup ayrımının yapılması mümkün olmamıştır.

Waitea circinata var. *zeae* izolatları arasındaki genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla yapılan rDNA-ITS RFLP çalışmasından elde edilen sonuçlar daha önce Toda ve ark. (2005) tarafından yapılan RAPD-PCR çalışmasında elde edilen sonuçlara benzer şekilde *Waitea circinata* var. *zeae* izolatlarının homojen bir grup olmadığını, bir takım alt grupları içerebileceğini göstermiştir. Ancak, örneklere ait RFLP şablonları ile *Waitea circinata* var. *circinata* ve *Waitea circinata* var. *oryzae* izolatlarının ayrımı tam olarak yapılamamıştır. Bunun nedeni olarak, *Waitea circinata* var. *zeae*'nin rDNA-ITS bölgesindeki varyasyonu göstermek için kullanılan enzim setinin yeterli olmadığı söylenebilir.

Waitea circinata var. *zeae* içerisindeki genetik varyasyonu daha açık bir şekilde gösterebilmek için ITS2 bölgelerinin moleküler dizi analizleri de yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda RFLP analizine göre daha net bir ayırım ortaya çıkmıştır. Buna göre Neighbor Joining-Bootstrap analizi *Waitea circinata* var. *zeae* izolatlarını, *Waitea circinata* var. *oryzae*, *Waitea circinata* var. *circinata* ve *Waitea circinata* var. *agrostis* izolatlarından belirgin bir şekilde ayırmıştır. Bu durum Sharon ve ark. (2006) tarafından yapılan rDNA-ITS dizi analizi sonuçları ile uyumlu olmakla birlikte, bizim çalışmamız *Waitea circinata* var. *zeae* içinde yaklaşık olarak %70 bootstrap değeriyle ayrılan iki alt grubun varlığını göstermektedir. Bu durum çalışmamızda Neighbor-Joining ve Parsimoni ağaçlarında birebir uyumlu olmasa da, dallanma durumu büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Coğrafik olarak oldukça farklı yerlerde olmalarına rağmen Japonya, Macaristan ve Türkiye izolatları aynı dalda yer almıştır. Diğer dalda ise ABD, Brezilya, Japonya, Tayvan ve Türkiye izolatları bulunmaktadır. Bu çalışma *Waitea circinata* var. *zeae* içinde yer alan izolatların iki alt gruba ayrılabilceğini gösteren ilk çalışmadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmada dünyanın çeşitli ülkelerinden (ABD, Brezilya Japonya, Macaristan, Tayvan ve Türkiye) elde edilen *Waitea circinata* var. *zeae* karşılaştırılarak filogenetik ilişkileri değerlendirilmiştir. Deneme dört aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir: Birinci aşamada, stokta bulunan izolatların aktifleştirilerek kültürel morfolojilerinin incelenmesi; ikinci aşamada, makroskopik anastomoz durumlarının belirlenmesi; üçüncü aşamada, izolatların DNA izolasyonlarının yapılması ve PCR-RFLP şablonlarının tespiti ve değerlendirilmesi; dördüncü ve son aşamada, ITS1-5.8S-ITS2 dizi verilerinin oluşturulması ve filogenetik değerlendirmeler yapılmıştır.

(1) Çizelge 4.1.'de gösterilen *Rhizoctonia* izolatlarının kültürel morfolojilerinin değişiklik göstermekle birlikte Toda ve ark. (2005)'lerinin belirttiği karakteristik özelliklerle uyumlu oldukları görülmüştür.

(2) Makroskopik anastomoz çalışmaları Mahmoud ve ark. (2006) ve Macnish ve ark. (1997)'a göre yapılmıştır. Genel olarak izolatların birbirleriyle ilişkili oldukları ancak bu yöntemle izolatların ayrımının mümkün olmadığı görülmüştür.

(3) DNA izolasyonları yapılan izolatların ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bölgeler *HhaI*, *MseI* ve *Taq^αI* enzimleriyle kesildikten sonra elde edilen UPGMA ağacında (Şekil 4.9) bazı izolatlar hariç grupların birbirinden ayrıldığını fakat bazı izolatların diğer gruplarla birlikte grup oluşturduğu görülmüştür. RFLP-PCR çalışması *Waitea circinata* var. *zeae* dışındaki izolatlardan daha çok örnekle ve başka enzim setleri ile çalışma yapıldığında daha iyi sonuç verebilir.

(4) ITS2 dizi bölgesinin dizi analizi sonucunda, oluşturulan ağaçlarda *Waitea circinata* var. *zeae*'nin, *Waitea circinata* var. *oryzae*, *Waitea circinata* var. *circinata* ve *Waitea circinata* var. *agrostis* izolatlarından belirgin şekilde ayrıldığı gözlenmiş ve *Waitea circinata* var. *zeae* izolatlarının kendi içlerinde iki alt dala ayrıldıkları gösterilmiştir.

Yaptığımız çalışmada kültürel özelliklerin izolatların ayrımında yetersiz olduğunu, moleküler çalışmaların gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Dünyanın çeşitli yörelerinden elde edilen izolatların yapılan moleküler çalışma sonucunda iki alt gruba ayrılabilceği tespit edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda (Sharon ve ark., 2006) bu şekilde bir ayrımın olmamasının nedeni önceki çalışmalarda kullanılan izolat sayısının az olması ve aynı bölgeye ait olan izolatlarla yapılmış olmasıdır.

Dolayısıyla bu çalışma ile *Waitea circinata* var. *zeae* türü içerisinde homojenlik olmadığı, grup içinde iki alt grubun var olabileceğini ilk kez ortaya çıkarılmıştır.

7. Kaynaklar

- Barnet, H.L., Hunter, B.B., 1998. *Illustrated Genera Of Imperfect Fungi*, APS Press, The American Phytopathological Society St. Paul, 218 s, Minnesota.
- Blackwell, M., Hibbett, D.S., Taylor, J.W., Spatafora, J.W., 2006. Research Coordination Networks: a phylogeny for kingdom Fungi (Deep Hypha). *Mycologia*, 98(6), 829–837.
- Bridge, P., 2002. The history and application of molecular mycology. *Mycologist*, 16, Part 3.
- Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A., Elander, R.P., 1998. *Applications of PCR in Mycology*. CAB INTERNATIONAL, 357 s, New York.
- Burnett, J., 2003. *Fungal Population and Species*, Oxford University Press, 348 s, New York.
- Burpee, L., Martin, B., 1992. Biology of *Rhizoctonia* Species Associated with Turfgrasses. *Plant Disease*, 76(2), 112-117.
- Carling, D.E., Leiner, R.H., Kebler, K.M., 1987. Characterization of a New Anastomosis Group (AG-9) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 77, 1609-1612.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W., 2001. *The Fungi*, Academic Press, 588 s, London.
- Cavalier-Smith, T., 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev.*, 73, 203-266.
- Celio, G.J., Padamsee M., Dentinger B.T.M., Bauer R., McLaughlin D.J., 2006. Assembling the Fungal Tree of Life: Constructing the Structural and Biochemical Database. *Mycologia*, 98(6), 850–859.
- Chen, R.S., McDonald, B.A., 1996. Sexual Reproduction Plays a Major Role in the Genetic Structure of Populations of the Fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Genetics*, 142, 1119-1127.
- Cubeta, M.A., Vilgalys, R., 1997. Population Biology of the *Rhizoctonia solani* Complex. *Phytopathology*, 87(4), 480-484.
- 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.
- Demirci, E., 1998. *Rhizoctonia* species and anastomosis groups isolated from barley and wheat in Erzurum, Turkey. *Plant Pathology*, 47(1), 10-15.
- Demirci, E. ve Eken, C., 1999. First report of *Rhizoctonia zea* in Turkey. *Plant Disease*, 83 (2), 200.
- Drews, G., 2000. The roots of microbiology and the influence of Ferdinand Cohn on microbiology of the 19th century. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 225-249.
- Erper, I., Karaca, G., Ozkoc, I., 2006. First Report of Root Rot of Bean and Soybean Caused by *Rhizoctonia zea* in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 154 (2), 75-79.
- Erper, I., Karaca, G.H., Turkkan, M., Ozkoc, I., 2005. Characterization and Pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. from Onion in Amasya, Turkey. *J. Phytopathology*, 154, 75–79.
- Erper, İ., 2003. Samsun İlinde Bazı Baklagil Bitkilerinde Saptanan *Rhizoctonia* Grubu Fungusların Anastomosis Grupları, Karakteristik Özellikleri ve Patojeniteleri. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 106 s.
- 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.

- Grönberg, H., Paulin, L., Sen, R., 2003. ITS probe development for specific detection of *Rhizoctonia* spp. and *Suillus bovinus* based on Southern blot and liquid hybridization-fragment length polymorphism, *Mycol. Res.*, 107 (4), 428-438.
- Guarro, J., Gené, J., Stchigel, A.M., 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(3), 454–500.
- Gürkanlı, C.T., 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.
- Hall T.A., 1999. BioEdit: a user- friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41, 95-98.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson O.E., et. all. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, III, 509-547.
- Hwang, U.W., Kim, W., 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology*, 37 (4), 215-228.
- Kataria, H.R., Hugelshofer, U., Gisi, U., 1991. Sensitivity of *Rhizoctonia* species to different fungicides. *Plant Pathology*, 40, 203-211.
- Kendrick, B., 2000. *The Fifth Kingdom*. Focus Publishing, 373 s, Newburyport MA.
- Lee, D.J., 2004. Population Dynamics of *Rhizoctonia* Species in Tall Fescue and Creeping Bentgrass in Response To Disease Control Programs. Doktora tezi, North Carolina State Üniversitesi, North Carolina, 100 s.
- Lee, S.B., Taylor, J.W., 1992. Phylogeny of five funguslike protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 636-653.
- Lutzoni, F., Kauff, F., Cox C.J., Mclaughlin D., Celio G., et. all, 2004. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany*, 91(10), 1446–1480.
- Macnish, G.C., Carling, D.E., Brainard, K.A., 1997. Relationship of microscopic and macroscopic vegetative reactions in *Rhizoctonia solani* and the occurrence of vegetatively compatible populations (VCPs) in AG-8. *Mycol. Res.*, 101 (1), 61-68.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., 2006. *Biology of Microorganisms*. Pearson Prentice Hall, 992 s, London.
- Mghalu, M.J., Kobayashi, Y., Kawagishi, H., Hyakumachi, M., 2004. Lectin Variation in Members of *Rhizoctonia* Species. *Microbes Environ.*, 19(3), 227-235.
- Ogoshi, A., 1987. Ecology and Pathogenicity of Anastomosis and Intraspecific Groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 25, 125-143.
- Qu, P., Aratani, A., Syoji, T., Toda, T., Kubota, M., Hyakumachi, M., 2008. Use of single-protoplast isolates in the study of the mating phenomena of *Rhizoctonia solani* (*Thanatephorus cucumeris*) AG-1 IC ve IA. *Mycoscience*, 49, 132-137.
- Qu, P., Yamashita K., Toda T., Priyatmojo, A., Kubota, M., Hyakumachi M., 2008. Heterokaryon formation in *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) AG-1 IC. *Mycological Research*, 112, 1088-1100.
- 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.
- Paulitz, T.C., Smith, J:D., Kidwell, K.K., 2002. Virulence of *Rhizoctonia oryzae* on Wheat and Barley Cultivars from the Pacific Northwest. *Plant Dis.* 87, 51-55.

- Priyatmojo, A., Yamauchi, R., Carling, D.E., Kageyama, K., Hyakumachi, M., 2002. Differentiation of Three Varieties of *Rhizoctonia circinata*; var. *circinata*, var. *oryzae* and var. *zeae* on the Basis of Cellular Fatty Acid Composition. *J. Phytopathology*, 150, 1-5.
- Roderic, D.M., 1996. Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12, 357-358.
- 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.
- Sambrook, J., Russell, D., W., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Volume 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, New York.
- Sen, R., Hietala, A.M., Zelmer, C.D., 1999. Common anastomosis and internal transcribed spacer RFLP groupings in binucleate *Rhizoctonia* isolates representing root endophytes of *Pinus sylvestris*, *Ceratorhiza* spp. from orchid mycorrhizas and a phytopathogenic anastomosis group. *New Phytol.*, 144, 331-341.
- 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.
- 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., Jabaji-Hare, S., Neate, S., Dijst, G., 1996. *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*. Kluwer Academic Publishers, 578 s, AA Dordrecht.
- Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A., 1991. *Identification of Rhizoctonia Species*. APS PRESS The American Phytopathological Society, 133 s, St. Paul, Minnesota.
- Toda, T., Hayakawa, T., Mghalu J.M., Yaguchi, S., Hyakumachi, M., 2007. A new *Rhizoctonia* sp. closely related to *Waitea circinata* causes a new disease of creeping bentgrass. *J Gen Plant Pathol*, 73, 379–387.
- Toda, T., Mushika, T., Hayakawa, T., Tanaka, A., 2005. Brown ring patch: a new disease on bentgrass caused by *Waitea circinata* var. *circinata*. *Plant Disease, ProQuest Agriculture Journals*, 89 (6), 536-542.
- Vajna, L., Oros, G., 2005. First report of *Rhizoctonia zeae* on *Lolium perene* and *Festuca* sp. in Hungary. *Plant Pathology*, 54, 250.
- Vilgalys, R., Cubeta, M.A., 1994. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32, 135-155.
- Voorhees, R.K., 1934. Sclerotial rot of corn caused by *Rhizoctonia zeae*, n. sp. *Phytopathology*, 24, 1290-1303.
- Wapinski, I., Pfeffer, A., Friedman, N., Regev, A., 2007. Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi. *Nature*, 449.
- White, T.J, Bruns, T.D., Lee, S., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. (Editörler: D.H. Gelfand, , J. Sninsky, T.J. White), Academic Press, 315–322, San Diego.
- Yağcı, A., 2001. Restriction fragment length polymorphisim ve polimeraz zincir reaksiyonu bazlı tiplendirme yöntemleri. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. (Editör: R. Durmaz), İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, 150-171, Malatya.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Emine Banu KİBAROĞLU

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 20.12.1982

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Cumhuriyet Lisesi (Ankara) 1996-1999

Lisans: Gazi Üniversitesi (Ankara) 2000-2004

İletişim Bilgileri:

Adres: Fevzi Çakmak Mah. Tayfun Sok. No:15/4 Samsun

Tel: 0362 233 80 44/0535 628 17 37