

Haşhaş (*Papaver somniferum*) Kök Boğazı ve Kapsül Yanıklığı Etmeni *Alternaria papavericola*'nın Moleküler Karakterizasyonu

Cafer EKEN*

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Isparta; ORCID: 0000-0002-0454-8124
Gönderilme Tarihi: 9 Eylül 2024 Kabul Tarihi: 30 Aralık 2024

ÖZ

Hem dünyada hem de ülkemizde önemli tıbbi ve aromatik bitkiler arasında yer alan haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinin tohumlarından ve yağından da gıda olarak yararlanılmaktadır. Bu çalışmada Isparta ilinden toplanan haşhaş tohumlarından izole edilen, haşhaşta kök boğazı ve kapsül yanıklığına neden olan *Alternaria papavericola* Woudenb. & Crous'nın moleküler karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Bu amaçla rDNA'nın ITS (internal transcribed spacer) gen bölgesi ITS1 ve ITS4 evrensel primerleri kullanılarak çoğaltılmış ve dizilenmiştir. DNA nükleotid dizisi, NCBI GenBank veri tabanında BLAST işlemine sokulmuş ve veri tabanındaki diğer ilgili diziler ile karşılaştırılmıştır. Microsoft Office Word programı yardımı ile FASTA formatına çevrilen *A.papavericola*'nın DNA dizileri, MEGA 6.0 programı kullanılarak Tamura-Nei modellemesiyle Maximum Likelihood (ML) metodu kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Alternaria papavericola*, haşhaş, moleküler karakterizasyon

Molecular Characterization of *Alternaria papavericola*, the Causal Agent of Crown and Capsule Blight of Poppy (*Papaver somniferum*)

ABSTRACT

Both globally and in our country, the poppy (*Papaver somniferum* L.) is a significant medicinal and aromatic plant, with its seeds and oil serving as food. This work aimed to molecularly characterize *Alternaria papavericola* Woudenb. & Crous, the fungus that causes crown and capsule blight in poppies. The fungus was isolated from poppy seeds that were collected from the province of Isparta. For this purpose, the ITS (internal transcribed spacer) gene region of rDNA was amplified and sequenced using ITS1 and ITS4 universal primers. The DNA nucleotide sequence was BLASTed in the NCBI GenBank database and compared with other related sequences in the database. The DNA sequences of *A.papavericola* were converted to FASTA format with the help of the Microsoft Office Word program, and a phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood (ML) method with Tamura-Nei modeling using the MEGA 6.0 program.

Keywords: *Alternaria papavericola*, poppy, molecular characterization

GİRİŞ

Ranunculales takımı, *Papaveraceae* familyasına ait olan haşhaş (*Papaver somniferum* L.), hem dünyada hem de ülkemizde önemli tıbbi ve aromatik bitkiler arasında yer alan tek yıllık bir kültür bitkisidir. Haşhaşın kapsülünde ihtiva ettiği alkaloidlerinden (tebain, morfin, kodein vb.), %44-54 arasında yağ ihtiva eden tohumundan (pasta ve bök yapımında, çerez olarak, yağ endüstrisinde), küspesinden (hayvan yemi) ve sapından (yakacak olarak) faydalanılmaktadır [1].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda haşhaşta çeşitli fungal, bakteriyel ve viral etmenlerin sebep olduğu hastalıklar nedeniyle verim ve ürün kayıplarının oluştuğu bildirilmektedir [2]. *Alternaria* cinsinin

yeniden tanımlanması ile ilgili yapılan çalışmada *Alternaria papavericola* Woudenb. & Crous, 2013 (*Helminthosporium papaveris* Sawada, 1917; *Dendryphion papaveris* (Saw.) Sawada, 1959; *Brachycladium papaveris* (Saw.) Shoemaker & Inderb., 2006) olarak tanımlanan etmenin [3], haşhaşta kök boğazı ve kapsül yanıklığına sebep olarak önemli ürün ve verim kayıplarına neden olduğu bildirilmiştir [4-6].

Mraz [4], bu hastalığın Rusya'da, özellikle çok yağışlı ve sıcak zamanlarda haşhaşta %98 oranında saptandığını, 1000 kg/ha verim beklenirken hastalıktan dolayı 655 kg/ha ürün alındığını ve etmenin tohumla taşındığını bildirmiştir. Ülkemizde de, Afyonkarahisar ilinde, kök boğazı yanıklığı zararının 1976 yılında yaygın olarak görüldüğü ve

*Sorumlu yazar / Corresponding author: cafereken@hotmail.com

etmenin (*A.papavericola*) yüksek oranda tohumla taşındığı tespit edilmiştir [6]. Yine, Inderbitzin vd. [7]'da Türkiye'deki haşhaş tohumlarından *A.papavericola*'yı izole etmişlerdir. Uşak ilinde, haşhaş bitkisinde kapsül yanıklığına neden olan hastalık etmenlerini saptamak amacıyla hastalıklı bitkilerin tohum, gövde ve kapsül kısmından izolasyonlar yapılmış ve izolasyonlarda *A.papavericola*, *Alternaria* spp. ve *Cladosporium* spp. elde edilmiştir [8].

Birçok fungus hem eşeysiz hem de eşeyli üreme özelliğine sahiptir ve günümüzde funguslar üreme durumlarına göre iki şekilde sınıflandırılmaktadır. Bunlardan birincisi, fungusların yaşam döngülerinin eşeyli (seksüel) üreme safhalarında oluşturdukları eşeyli sporları, tallus yapıları ve fruktifikasyon yapıları kriter alınarak gerçekleştirilen teleomorfik sınıflandırmadır. İkinci sınıflandırmada ise eşeyli üreme yapıları tespit edilemediği için, bazı funguslar eşeysiz sporları ve tallus yapıları göz önüne alınmaktadır ve bu sınıflandırma biçimi de anamorfik sınıflandırma olarak adlandırılmaktadır [9]. Anamorfik sınıflandırma gözlemlere dayalıdır, fazla zaman almaktadır ve hata yapma olasılığı daha fazladır. Morfolojik olarak yapılan sınıflandırmada bazen aynı taksona iki farklı isim verilebilmekte ve hatta farklı organizmalara aynı ismin verilmesi mümkün olabilmektedir. Böyle karışıklıkların önlenmesi için güvenilirliğinden dolayı moleküler yöntemler günümüzde sıklıkla kullanılmaya başlamıştır. Moleküler yöntemlerde çoğunlukla kullanılan molekül DNA'dır ve DNA ile yapılan araştırmalar daha hızlı ve güvenilir sonuçlara ulaşmamızı sağlayabilmektedir [10]. Kary Mullis tarafından 1980'ler de Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) keşfedilmesiyle birlikte [11], funguslarla ilgili moleküler çalışmalar hız kazanmış ve fungal taksonomi ile ilgili son derece önemli yeni bilgiler ortaya çıkmıştır. Moleküler çalışmalar, fungal taksonomik sorunları tamamen çözmekle birlikte çok önemli katkılar yapmıştır. Bu çalışmalar sonucunda yeni taksonlar (şube, sınıf, takım, familya, cins) önerilmektedir. Fungal türler arasındaki polimorfik DNA dizilerinden biri olan ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesi, bir türün doğru olarak tespiti açısından oldukça iyi bir aday olarak görülmekte ve bu uygulama ile diğer tüm türlerden büyük ölçüde ayrılabilirlerdir. Nispeten küçük (500-800 bp) olan ITS bölgesi ve evrensel tek bir primer çifti kullanılarak PCR ile kolaylıkla çoğaltılabilmektedir. Yine ribozomal DNA (rDNA) birimlerinin çok sayıda tekrarlarının olması nedeniyle, seyreltik ya da oldukça degrade olmuş DNA örneklerinden bile ITS bölgesi kolaylıkla çoğaltılabilmektedir. Ayrıca, farklı türler arasında

ITS bölgesi yeterince değişken olabilmekte ve bu nedenle nükleotit dizi verileri genetik uzaklığı tahmin etmek için kullanılabilen ve bu yüzden filogenetik ve sistematik analizler için oldukça kullanışlıdır. Belirtilen bu nedenlerden dolayı fungusların moleküler karakterizasyon çalışmalarında ITS bölgesi kullanılmaktadır [12, 13].

Bu araştırmada, önemli haşhaş üretim alanına sahip Isparta ilinde haşhaş tohumlarından izole edilen *Alternaria papavericola*'nın moleküler karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Çalışmanın materyalini, Isparta ilindeki haşhaş yetiştiricilerinden temin edilen haşhaş tohum örnekleri ile onlardan izole edilen *Alternaria papavericola* oluşturmuştur.

Metot

Çalışmada, 2016 yılında haşhaş yetiştiriciliği yapılan Isparta ilinden 3 farklı haşhaş tohum örneği toplanmış ve bu tohumlar izolasyon yapıncaya kadar buzdolabında +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Haşhaş tohumlarında fungal floranın saptanmasında Eken vd. [14]'nin kullandığı agar yöntemi kullanılmıştır. Her örnekten rastgele seçilen 100 adet haşhaş tohumu iki dakika %2'lik NaOCl ile yüzey dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra üç kez steril saf su ile durulanıp kurutma kağıtları arasında steril kabinde kurutulmuş ve Patates Dekstroz Agar (PDA) ortamı bulunan her bir petriye 10'ar adet haşhaş tohumu eşit aralıklarla yerleştirilmiştir. Petriler iki gün inkübatörde bırakılıp, daha sonra bir hafta süre ile 18-22°C'de 12 saat aydınlık 12 saat karanlık şartlarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon periyodu sonunda, gelişen *Alternaria* kolonileri preparat yapmak sureti ile ışık mikroskopunda incelenerek, mevcut literatüre [3] göre tür düzeyinde tanıları yapılmıştır. Tanısı yapılmış fungus kültürleri PDA içeren test tüplerine aktarılıp, +10°C'de muhafaza edilmiştir.

PDA ortamında 10 gün süreyle geliştirilmiş *A.papavericola*'nın temsili (H7-4) izolatından steril bistöri ile miselyumlar kazanarak tüm DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu amacıyla 100 mg miselyum, sıvı azot kullanılarak toz haline getirilmiş ve EurX GeneMATRIX Plant & Fungi DNA kitleri (Polonya) kullanılarak üretici firma protokolüne göre izole edilmiştir. İzole edilen DNA'lardan, rDNA'nın ITS bölgesi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [12] primer çiftleri kullanılarak amplifiye edilmiştir. ITS rDNA

amplifikasyonu 95°C'de 5 dk; 40 döngü 95°C'de 45s, 57°C'de 45s ve 72°C'de 1 dk; sonra 72°C'de 5 dk; son sıcaklık 4°C şeklinde uygulanmıştır. Örneğin dizilenmesi için BM Labosis (Ankara) firmasından hizmet alımı yapılmıştır. Primerlerden elde edilen okumalar, bir konsensüs dizisi oluşturmak için bitişik olarak oluşturulmuştur. Bu işlemi gerçekleştirmek için BioEdit [15] yazılımındaki CAP contig algoritması kullanılmıştır. Fungus moleküler tanısında, elde edilen contig dizileri NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank'da BLAST işlemine sokulmuş ve moleküler olarak tür tayini yapılmıştır.

Bu çalışmada dizileri elde edilen *A.papavericola* izolatu ve NCBI GenBank'dan dizileri alınan *A.papavericola* izolatlarının (Çizelge 1) filogenetik ilişkilerini ortaya çıkarmak için tüm dünyada yaygın olarak kullanılan MEGA 6.0 [16] filogenetik analiz yazılımının uygun parametreleri kullanılmıştır. Bu parametrelerden Maximum Likelihood (ML) seçilmiştir. Verilen sınıflar için destek derecesini değerlendirmek için bir bootstrap analizi (1.000 tekrar) uygulanmıştır [17]. Filogenetik ağaçta dış grup olarak kullanılan *Exserohilum turcicum* (OR053748.1) türünün ITS dizisi NCBI GenBank'dan alınmıştır. Ayrıca belirtilen program ile *A.papavericola* izolatları arasındaki genetik uzaklık, nükleotid içeriği, nükleotid çeşitliliği gibi veriler elde edilmiştir.

Çizelge 1. Filogenetik analizlerde referans olarak NCBI GenBank'tan sekans dizilimleri alınan izolatlar ve GenBank erişim numaraları

İzolat Kodu	Ülke	GenBank Erişim Numarası
CBS 116606	ABD	MH862999.1
P351	ABD	FJ357310.1
Unk3-s HU	Macaristan	JQ403622.1
Bot-s HU	Macaristan	JQ403618.1
1S T2	Türkiye	MZ520712.1
M6 K4	Türkiye	MZ520711.1
KC122	Çek Cumhuriyeti	LN868505.1

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışma süresince, Burdur ilinden temin edilen 300 adet haşhaş tohumundan izolasyon yapılmış ve 19 *Alternaria papavericola* izolatu elde edilmiştir. Haşhaş tohumlarından *A.papavericola* izolasyon sıklığı yani bulaşıklık oranı %6.33 olarak saptanmıştır.

Alternaria papavericola izolatlarından temsili olarak seçilen H7-4 izolatının moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. H7-4 izolatının ITS bölgesinin dizilenmesi sonucu 611 baz nükleotid dizisi elde edilmiştir (Çizelge 2). Bu dizilerin NCBI GenBank'da BLAST analizi yapıldığında H7-4 no.lu izolatın ITS bölgelerine ait nükleotid dizileri daha önce NCBI GenBank'a kaydedilen

A.papavericola'nın tip türü CBS 116606 izolatu ile %99.13 (Erişim No: MH862999.1) benzerlik göstermiştir. *Alternaria papavericola* H7-4 izolatının DNA dizilimleri NCBI GenBank veri tabanına yüklenerek erişim numarası alınmıştır. İlgili izolatın erişim numarası MN503269.1'dir. Ortalama nükleotit oranı Timin (%28.2), Sitozin (%23.9), Adenin (%23.6) ve Guanin için (%24.4) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2). MEGA 6.0 programı kullanılarak oluşturulan genetik uzaklık matrisinde en düşük mesafe 0.000 en yüksek mesafe 0.004 tespit edilmiştir (Çizelge 3).

Çizelge 2. *Alternaria papavericola* izolatlarının nükleotid kompozisyonları

İzolat Kodu	T(U)	C	A	G	Toplam
H7-4	28,2	23,9	23,6	24,4	611,0
CBS 116606	28,0	24,5	23,3	24,3	576,0
P351	28,3	24,9	22,6	24,2	579,0
Unk3-s HU	25,9	23,2	24,0	26,9	1154,0
Bot-s HU	25,9	23,2	24,5	26,4	1099,0
1S T2	25,7	23,1	24,5	26,7	1116,0
M6 K4	25,6	23,1	24,6	26,7	1116,0
KC122	28,5	24,6	22,8	24,1	569,0
Ortalama	26,6	23,6	23,9	25,8	852,5

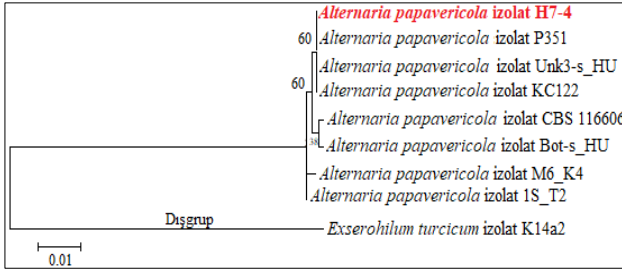
Çizelge 3. ITS dizi sekansları kullanılarak oluşturulan genetik uzaklık matrisi

H7-4	-						
CBS 116606	0,002						
P351	0,000	0,002					
Unk3-s HU	0,000	0,002	0,000				
Bot-s HU	0,002	0,002	0,002	0,002			
1S T2	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002		
M6 K4	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,002	
KC122	0,000	0,002	0,000	0,000	0,002	0,002	0,004

Alternaria papavericola H7-4 izolatu ile NCBI GenBank veri tabanından alınan *A.papavericola* izolatları arasındaki akrabalık ilişkilerini belirlemek için ITS dizileri, MEGA 6.0 programı kullanılarak Tamura-Nei modellemesiyle Maximum Likelihood (ML) metodu kullanılarak oluşturulan filogenetik ağacında dış grup *Exserohilum turcicum* (OR053748.1) hariç bütün *A.papavericola* izolatları aynı monofiletik grupta yer almıştır (Şekil 1). Çalışma sonuçları, izolatların tanılanmasında ITS gen bölgesinin oldukça yararlı bilgiler sağladığını göstermiştir.

Funguslarda morfolojik tanılama; konukçu özelleşmesi, besi ortamı, konidi büyüklüğü ve şekli, kültür gelişimi ve rengi, eşeyli üreme yapısının olup olmamasına ve diğer özelliklerine göre yapılmaktadır. Morfolojik tanılama stabil değildir, çevre koşullarına göre değişebilmektedir. Moleküler tekniklerin çoğu, çeşitli seviyelerde genomik polimorfizmlerin saptanması ve tiplendirilmesine dayanmaktadır. Fungal sistematiğe en çok tercih edilen bölge rDNA birimi içinde yer alan ITS bölgesidir. Kodlanmayan bölge olan ITS daha hızlı

evrim geçiren bir bölge olup bir tür içindeki suşların ya da bir cins içindeki fungal türlerin karşılaştırılması için oldukça kullanışlıdır [18]. rDNA ITS gen bölgesinin fungal taksonomide kabul gören resmi bir moleküler barkod haline gelmesiyle moleküler tanılama hızlı ve daha doğru sonuçlar vermektedir [19]. Günümüzde, birçok fungus türünün ve alt gruplarının sınıflandırılmasında moleküler yöntemlerden en uygun yöntemin rDNA-ITS dizi analizinin olduğu kabul görmekte ve filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi için uygun bir moleküler yöntem olarak kullanılmaktadır [8, 20-27]. Bununla birlikte, bazen tanı için sadece bu gen bölgesi yeterli olmamakta ve TEF1- α , TUB2 [28-32] gibi başka gen bölgelerinin tanılama ve taksonomik çalışmalara dâhil edilmesi kabul görmektedir.



Şekil 1. *Alternaria papavericola* izolatlarının ITS gen bölgesinin Tamura-Nei modellemesiyle Maximum Likelihood (ML) metodu kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç (çalışmada elde edilen izolat kırmızı renkli gösterilmiştir)

SONUÇ

Fungal sınıflandırma çalışmalarında, yeterli ve güvenilir sonuçlara ulaşmak için sadece geleneksel yöntemlerin (morfolojik, biyokimyasal vb.) kullanılması günümüzde kabul gören bir uygulama olmaktan çıkmaktadır. Bu araştırmada, fungal taksonomide yaygın olarak kullanılan, nükleer ribozomal RNA (rRNA) gen kompleksi olan Internal Transcribed Spacer (ITS) gen bölgesi kullanılmıştır. rDNA ITS gen bölgesi fungus taksonomisi çalışmalarında tür tespiti ve türler arası ilişkilerde sıklıkla kullanılmaktadır. Funguslarda morfolojik tanımlama; konukçu özelleşmesi, besi ortamı, konidi büyüklüğü ve şekli, kültür gelişimi ve rengi, teleomorf yapısının olup olmamasına ve diğer özelliklerine göre yapılmaktadır. Fungusların morfolojik olarak tanımlanmasında kullanılan bazı yapıları çevre koşullarına göre değişiklik gösterebilmektedir. Bu nedenle fungusların sadece morfolojik olarak tanınması her zaman doğru olmayabileceğinden, tanılamamın hem morfolojik hem de moleküler düzeyde olması daha uygundur.

Morfolojik ve moleküler tanılamamın birbirini desteklemesi gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TENMAK-NÜKEN imkânlarıyla yürütülen A2.H1.P16 numaralı projenin bir bölümüdür. Desteklerinden dolayı TENMAK'a teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. İşler, N. 2024. Haşhaş Tarımı. <https://www.mku.edu.tr/files/898-595293aa-9378-4c9f-8650-e3066e00eaab.pdf>.
2. Scott, J., Quarrell, S. 2016. Potential biosecurity risks associated with poppy straw and pellet importation. Tasmanian Institute of Agriculture, University of Tasmania, pp:31.
3. Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder, M., Crous, P.W. 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* 75:171-212.
4. Mraz, F. 1960. Influence of the harmful effect of the fungus *Helminthosporium papaveris* on poppy yields in the region Karlovy Vary in the years 1957 and 1958. *Sbornik Cesk Akad Zemedelske* 33:1083-1094.
5. Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
6. Karahan, O., Maden, S. 1978. Haşhaşa kök boğazı yanıklığı hastalığı (*Dendryphion papaveris* (Saw.) Sawada), tohumla taşınma durumu ve tohum ilaçlarının bu etmene etkisi üzerinde çalışmalar. *Bitki Koruma Bülteni* 18:1-9.
7. Inderbitzin, P., Shoemaker, R.A., O'Neill, N.R., Turgeon, B.G., Berbee, M.L. 2006. Systematics and mating systems of two fungal pathogens of opium poppy: the heterothallic *Crivellia papaveracea* with a *Brachycladium penicillatum* asexual state and a homothallic species with a *Brachycladium papaveris* asexual state. *Canadian Journal of Botany* 84:1304-1326.
8. Gülcan, C. 2021. Uşak ilinde haşhaş (*Papaver somniferum* L.) üretiminde kapsül yanıklığına neden olan fungal etmenlerin belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Uşak Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tarım Bilimleri Anabilim Dalı, Uşak, 97s.
9. Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press, Minnesota, USA, pp:133.
10. Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., Fisher, M.C. 2000. Phylogenetic species recognition and

- species concepts in fungi. *Fungal Genetic and Biology* 31:21-32.
11. Kaunitz, J.D. 2015. The discovery of PCR: ProCuRement of divine power. *Digestive Diseases and Sciences* 60(8):2230-2231.
 12. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (Eds.): *PCR protocols: A guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, pp:315-322.
 13. Bruns, T.D., Vilgays, T.J., Taylor, J.W. 1991. *Fungal molecular systematics*. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22:525-564.
 14. Eken, C., Hasenekoğlu, İ., Genç, T., Eryücel, D. 2014. Erzurum ilinde fiğ (*Vicia sativa* L.) tohumlarından izole edilen *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri. *Uluslararası Katılımlı Türkiye 5. Tohumculuk Kongresi ve Sektörel İş Forumu*, 19-23 Ekim 2014, Diyarbakır, s:657-660.
 15. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
 16. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12):2725-2729.
 17. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
 18. Kılıçoğlu, M.Ç., Özkoç, İ. 2008. Fungal sistematikteki moleküler gelişmeler. *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi* 23(1):65-72.
 19. Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., André Levesque, C., Chen, W. 2012. Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(16):6241-6246.
 20. Carling, D.E., Baird, R.E., Gitaitis, R.D., Brainard, K., Kuninaga, S. 2002. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 92(8):893-899.
 21. Hyakumachi, M., Priyatmojo, A., Kubota, M., Fukui, H. 2005. New anastomosis groups, AG-T and AG-U of binucleate *Rhizoctonia* spp. causing root and stem rot of cut-flower and miniature roses. *Phytopathology* 95:784-792.
 22. García, V.G., Onco, M.P., Susan, V.R. 2006. *Biology and systematics of the form genus Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research* 4(1):55-79.
 23. 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(2):93-114.
 24. Kılıçoğlu, M.Ç., Özkoç, İ. 2013. Phylogenetic analysis of *Rhizoctonia solani* AG-4 isolates from common beans in Black Sea coastal region, Turkey, based on ITS-5.8 S Rdna. *Turkish Journal of Biology* 37(1):18-24.
 25. Aiello, D., Guarnaccia, V., Formica, P.T., Hyakumachi, M., Polizzi, G. 2017. Occurrence and characterization of *Rhizoctonia* species causing diseases of ornamental plants in Italy. *European J. of Plant Pathology* 148(4):967-982.
 26. Eken, C., Demir, D., Uysal, G., Çalışkan, S., Sevindik E., Çağlayan, K. 2024. Isolation, identification, and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. recovered from soil samples of the greenhouse tomato growing area of the West Mediterranean Region, Türkiye. *Journal of Phytopathology* 172:e13297.
 27. Eken, C., Demir, D., Uysal, G., Çalışkan, S., Sevindik E., Çağlayan, K. 2024. First report of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys thaumasia* in Türkiye and its biocontrol potential against *Meloidogyne incognita*. *Journal of Phytopathology* 172:e13354.
 28. Keeling, P.J., Luker, M.A., Palmer, J.D. 2000. Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Molecular Biology and Evolution* 17(1):23-31.
 29. Mohammed, A.S., Kadar, N.H., Kihal, M., Henni, J.E., Sanchez, J., Gallego, E., Garrido-Cardenas, J.A. 2016. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from tomato plants in Algeria. *African Journal of Microbiology Research* 10(30):1156-1163.
 30. Tuney, E., Asan, A., Şen, B. 2018. Saf kültür olarak stoklanmış bazı mikrofungusların ITS, β -tubulin ve Aktin gen dizilerine göre moleküler tanısı. *Mantar Dergisi* 9(1):1-17.
 31. Huang, S.K., Jeewon, R., Hyde, K.D., Bhat, D.J., Chomnunti, P., Wen, T.C. 2018. Beta-tubulin and Actin gene phylogeny supports *Phaeoacremonium ovale* as a new species from freshwater habitats in China. *MycKeys* 41:1-15.
 32. Pothiraj, G., Hussain, Z., Singh, A.K., Solanke, A.U., Aggarwal, R., Ramesh, R., Shanmugam, V. 2021. Characterization of *Fusarium* spp. inciting vascular wilt of tomato and its management by a Chaetomium-based biocontrol consortium. *Frontiers in Plant Science* 12:748013.