

**Araştırma Makalesi**  
(Research Article)

Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg., 2018, 55 (3):281-289  
DOI: 10.20289/zfdergi.392047

Asuman SAĞLAM<sup>1</sup>

Necip TOSUN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> İzmir Ziraat Karantina Müdürlüğü, 35230, İzmir / Türkiye

<sup>2</sup> Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 35100, İzmir / Türkiye

sorumlu yazar: asuman.ergun@tarim.gov.tr

**Çiçek Soğanlarında *Fusarium oxysporum* Schldl 'nin Moleküler Yöntemlerle Saptanması**

Determination of *Fusarium oxysporum* Schldl by Molecular Methods on Flower Bulbs

Alınış (Received): 08.02.2018

Kabul tarihi: (Accepted): 08.03.2018

**Anahtar Sözcükler:**

Çiçek soğanı, *Fusarium* spp., real-time PCR, PCR, sekans

**Key Words:**

Flowerbulb, *Fusarium* spp., real-time PCR, PCR, sequence

**ÖZ**

**Amaç:** Bu araştırmada, soğanlı süs bitkilerinde en yaygın görülen hastalıkların başında gelen *Fusarium* solgunluğu etmeni *Fusarium oxysporum*'un PCR temelli tekniklerle tanısı gerçekleştirilmiştir. Böylece, rutin analizlerde söz konusu etmen için geçerli bir protokol hazırlanarak pratikte kullanılması sağlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Araştırmanın materyalini çiçek soğanlarından izolasyon ile tespit edilen *Fusarium oxysporum* izolatları, referans *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae* izolatı, TEF1 ve FOW1 primer çiftleri oluşturmaktadır. Çalışmada çiçek soğanlarından izolasyon neticesinde PCR çalışması için seçilen *Fusarium* izolatları ve referans izolatın DNA izolasyonları gerçekleştirilmiş, geleneksel PCR, gerçek zamanlı (Real-Time) PCR ve sekans yöntemi ile *Fusarium oxysporum* varlığı teyit edilmiştir.

**Bulgular:** Çalışma bulgularına baktığımızda TEF1 primerinin 20. döngü itibari ile reaksiyona girdiği ve *F.oxysporum* varlığının tespit edildiğini ancak FOW1 primerinin ise reaksiyona girmediğini görmekteyiz. Negatif kontrollerimizde herhangi bir bulaşma görülmemektedir. Sekans analizi neticesinde örneklerin *Fusarium oxysporum* olduğu doğrulanmıştır.

**Sonuç:** *Fusarium* solgunluğuna neden olan etmenlerin saptanmasında uygulanan mevcut tanılama çalışmaları yaklaşık bir hafta sürmekte ve tür bazında teşhisleri oldukça zor olmaktadır. Ayrıca, patojenite testleri ile bu süre daha da uzamaktadır. Bu çalışma ile, hem geleneksel PCR hem de Real-Time PCR yöntemi ile soğanlı süs bitkilerinde en yaygın görülen hastalık olan *Fusarium* solgunluğu etmeni *Fusarium oxysporum*'un hızlı ve doğru şekilde tespiti gerçekleştirilmiş ve sekanslama ile yöntemin geçerliliği ortaya konulmuştur. Böylece, rutin analizlerde söz konusu etmen için geçerli bir protokol hazırlanarak pratikte kullanılması sağlanmıştır. Patojenlerin saptanmasında daha hassas, güvenilir ve hızlı olan PCR tekniklerinin kullanılmasının büyük avantajlar sağlayacağı aşikardır.

**ABSTRACT**

**Objective:** In this study, diagnoses of *Fusarium oxysporum* which is casual agent of the most common disease on flower bulbs *Fusarium* wilt have been carried out by using PCR-based techniques. Thereby, a valid protocol is prepared for the pathogen to use in practice.

**Material ve Methods:** The material of the research consists of isolates of *Fusarium oxysporum* which is isolated from flower bulbs, reference isolate *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae* and TEF1 ve FOW1 primer pairs. In the study DNA isolation was carried out with *Fusarium* isolates, which are isolated from flower bulbs, and reference isolate. The presence of *Fusarium oxysporum* was determined by Real-Time PCR and sequencing.

**Results:** As a result of the study, TEF1 primer pairs amplified on the 20th cycle and demonstrated the presence of *F.oxysporum*. On the other hand, FOW1 primer pairs didn't amplified. There is no contaminaton on the negative controls. As a result of the sequence, samples were justified that they are *Fusarium*.

**Conclusion:** Current diagnostic methods in the determination of the *Fusarium* wilt have been lasting approximately for a week, and their diagnosis on the basis of species have been difficult. Besides, this period extends because of pathogenicity. With this study, *Fusarium oxysporum* which is casual agent of the most common disease on flower bulbs *Fusarium* wilt, was determined in a fast and correct way by conventional and real-time PCR and validity of the method has been pointed out with sequencing. Thereby, a valid protocol is prepared for the pathogen to use in practice. When we consider these reasons, preference of PCR techniques which are more sensitive, more reliable and faster will lead advantages.

## GİRİŞ

Dünya üzerinde 20. yüzyıl başlarında önem kazanmaya başlayan süs bitkileri üretimi günümüzde hızlı değişim görülen bir sektör olarak nitelendirilebilir. Küreselleşme ve bunun değişik bölgelerdeki gelire olan etkisine bağlı olarak çoğu ülkede kişi başına düşen süs bitkileri tüketiminin arttığı görülmektedir. Kalkınma çabası içerisinde bulunan ülkemizde süs bitkileri ihracatına duyulan gereksinim artmaktadır. Süs bitkileri sektörü içerisinde yer alan doğal kaynaklar içerisinde en önemlilerinden biri olan ve ulusal ekonomideki değerleri gün geçtikçe artan soğanlı süs bitkilerinin geliştirilmesi ve korunması ise kaçınılmaz bir zorunluluk haline gelmiştir (Hekimoğlu ve Altindeğer 2012). Geçmişteki hatalı uygulamalar nedeniyle niteliği bozulan ve birçok bölgede harap bir duruma gelmiş olan soğanlı süs bitkilerinin durumunun iyileştirilmesi, korunması ve yeni üretim alanlarının kurulması gerekmektedir (Karagüzel ve ark., 2011). Bu anlamda çiçek soğanlarında ekonomik kayıplara neden olan etmenlerin tanısı önem arz etmektedir. Soğanlı süs bitkilerinde yaygın olarak görülen fungal patojenler yanıklık ve yaprak lekeli etmenleri, kök çürüklüğü ve solgunluk etmenleri, soğanımsı gövde ve yumruda çürüklük, külleme, pas ve sürme etmenleri olarak 6 grup altında toplanmaktadır (Hertog and Le Nard, 1993). Çiçek soğanlarında en yaygın görülen fungal patojen *Fusarium oxysporum*'dur (Özer ve Soran 1989, Boyraz ve Yaşar 2005). *Fusarium*'un yaklaşık 80 adet f.spp'in tanımlandığı, bunların da kendi içlerinde değişik ırklara sahip olduğu bildirilmektedir (Turhan 2010). Straathof et al. (1997), zambak, nergis, glayöl ve lale gibi soğanlı çiçekli bitkilerin pek çoğu toprak kökenli bir fungus olan *Fusarium oxysporum*'un tehidi altında olduğunu, bu etmenle enfekteli bitkilerde soğan veriminde oldukça

düşüşün yanında, soğan ve kesme çiçek ihracatında önemli problemler oluşturduğunu bildirmişlerdir. Etmenin oluşturduğu klamidosporeler inaktif formda yıllarca canlı kalmakta ve koşullar uygun hale geldiğinde konukçunun genç köklerinden aldığı besin uyarısıyla çimlenmektedir. Bu şekilde tekrar aktif hale geçen klamidosporeler önce miselyum, sonra konidya ve yeni klamidospore oluşturmaktadır. Penetrasyon kök dokusundan gerçekleşmekte, *Meloidogyne* genusuna ait nematod türleri açtıkları yaralarla penetrasyonu kolaylaştırmaktadır. Etmen, soğanların dip kısmında çürüklük meydana getirmekte ve çiçeklenmeden önce soğanı soldurarak çürütmektedir (Şekil 1). Bunun sonucu olarak, dikim yapılan alanlarda boşluklar oluşmakta, böylece yeniden dikim gündeme geldiğinden maliyet daha da artmaktadır. Yüksek rutubet ve sıcaklık depo şartlarında uygun olduğu için hastalığın gelişimini teşvik etmektedir. Bu durum yumruların yeniden dikilmesini gerektirmektedir. Hastalık yeniden dikimi gerektirecek seviyede olmadığı zamanlarda ise fidan eksilişi nedeniyle üretim alanlarında bazı boş alanların kalmasına sebep olmaktadır. Bu olasılığı karşılamak için de gerektiğinden fazla soğan kullanılmaktadır. Bu suretle tohum, ilaç ve işleme masraflarının yükselmesine ve geç dikimden dolayı ihtiyaç duyulan sağlıklı fidan kaybına neden olmak suretiyle büyük ekonomik zararlar oluşturmaktadır. Bu sorunun çözümü için üreticiler arayış içerisinde. Ancak şu anda kullanılan metodlara baktığımızda çok fazla zaman, emek ve taksonomik uzmanlık gerektirdiğini görmekteyiz. Bu anlamda bu çalışmamızda, ithal edilen ve ülkemizde üretilen çiçek soğanlarında yaygın olarak görülen *Fusarium* spp.'nin hızlı ve doğru biçimde tanınması amaçlanmış ve PCR temelli yöntemlere başvurulmuştur.



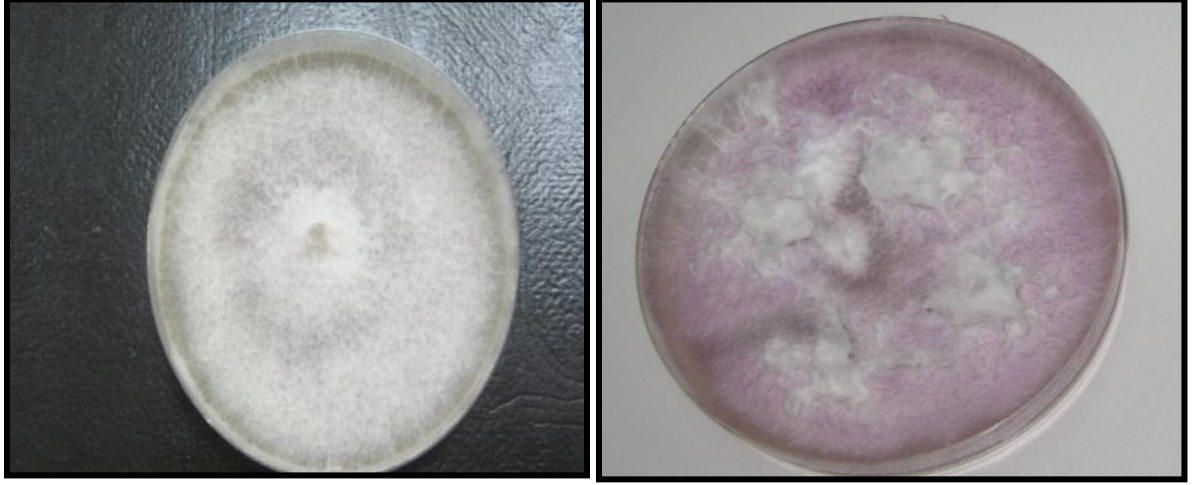
Şekil 1. *Fusarium* ile enfekteli lale soğanları (Miller, 2002)

Figure 1. Flower bulbs infected with *Fusarium*

**MATERYAL ve YÖNTEM****Materyal**

Denemede çiçek soğanlarından izolasyon ile tespit edilen ve doğruluğu Prof Dr. Gülay Turhan tarafından onaylanan *Fusarium oxysporum* Schldl izolatları ile referans *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae* W.C.Snyder & H.N. Hansen (Şekil 2) izolatı kullanılmıştır. DNA izolasyonu için ZR Fungal/Bacterial

DNA Kit™ kullanılmıştır. Çalışmada Genmar Teşhis Ürünleri firması tarafından sentezlenen iki primer seti TEF1-AF/TEF1-AR (David et al.,2004) ve yeni dizayn edilen FOW1-F/ FOW1-R ile çalışılmıştır. PCR analizi için sentezlenen primerlerin nükleotid dizilimleri ve bant büyüklükleri Çizelge1'de verilmektedir. Sekans analizi Altigenbio Life Science tarafından gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 2.** *F.oxysporum* (solda) *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae* (sağda) izolatları  
**Figure 2.** Isolates of *F.oxysporum* (on the left) *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae* (on the right)

**Çizelge 1.** PCR analizi için sentezlenen TEF 1 ve FOW 1 primer çiftleri. (David et. al., 2004)

**Table 1.** TEF 1 ve FOW 1 primer pairs designed for PCR analysis

Primer	Baz Dizilimi (5'3')	Uzunluk	Bant Büyüklüğü
TEF1-AF	5'ATCGACTTCCCCTACGACTCGA	22	
TEF1-AR	5'TTAGTGACTGCTTGACACGTGAC	23	221bp
FOW1-F	5'TTTCTGCACCTGCATGAAGAC	21	
FOW1-R	5'ATGCCAGTGCTCTTGGTG	19	284bp

**Yöntem****Çiçek soğanlarından izolasyonların gerçekleştirilmesi**

İthalat işlemi gerçekleştirilen çiçek soğanlarından parti bazında ve Zirai Karantina Numune Alma ve Analiz Yönetmeliği uyarınca numuneler alınarak laboratuvar ortamına getirilmiştir. Laboratuvara getirilen örnekler mikroskopik olarak ön incelemeye tabi tutulmuş, hastalık belirtisi gösteren lilyum soğanlarının kök ve soğanlarından lale, glayöl, iris ve sümbül soğanlarının ise sadece hastalık belirtisi gösteren soğan kısmından ayrı ayrı olmak üzere 3-4 mm' lik hastalıklı parçalar bistirü ile kesilmiş, izolasyon işlemi için ise saprofitlerin gelişimini önlemek amacıyla yapılan çeşitli denemelerden sonra hastalıklı bitki kısımlarından alınan 3-4 mm ebatında doku parçalarının 3 dakikalık süre ile % 0.05'lik sodyum hipokloritten geçirilmesinin uygun olduğu görülmüştür. Yüzey dezenfeksiyonuna tabii tutulan parçalar 2 defa

steril saf sudan geçirildikten sonra steril kurutma kağıtlarında 30 dk süre ile kurutulmuş ve PDA besiyeri içeren petri kaplarının her birine ortalama 4 adet doku örneği gelecek şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 3). Petri kapları +24°C'de inkübatöre konularak 7 günlük sürede gelişmeleri sağlanmıştır. İnkübatörde koloni gelişimi sonucunda *Fusarium* ve diğer bazı türlerin teşhisi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon dönemi sonunda (+24 °C'de 7 gün) besiyerinde gelişen fungal koloniler öncelikle makroskopik olarak incelenmiş ve cam tüplere saf kültür olarak aktarılması gerekenlere karar verilmiştir. Çalışmalarda sterilizasyona azami dikkat edilerek bütün çalışmalar steril kabinde gerçekleştirilmiştir. Cam tüplerde saf kültür olarak ekilen fungus kolonileri tekrar +24 °C'de inkübatöre yerleştirilerek koloni gelişmesi sağlanmıştır. Elde edilen saf kültürler daha sonraki çalışmalar için +4 °C'deki buzdolabında muhafaza altına alınmıştır.



**Şekil 3.** Çiçek soğanlarında izolasyon işlemleri  
**Figure 3.** Isolation process on flower bulbs

### DNA izolasyon protokolü

İzolasyonlar neticesinde PCR çalışması için seçilen iki adet *Fusarium* izolatından DNA izolasyonu ZYMO RESEARCH Fungal/Bacterial DNA Kit ile hızlı ve hatasız şekilde gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu sırasında izolasyon solüsyonlarını ve ortamdan kaynaklı bulaşmayı kontrol için negatif kontrol çalışmaya dahil edilmiştir. Elde edilen DNA'lar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. İzole edilen DNA reaksiyon başına en fazla 10 pmol/µL olacak şekilde seyreltilmiştir.

### Konvansiyonel PCR çalışmaları

Amplifikasyon sırasında reaksiyona girecek bileşenlerin optimum konsantrasyonlarının belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmış PCR reaksiyonundaki bileşenlerin miktarları 50 µl'lik reaksiyon hacmi için optimize edilmiştir. Reaksiyonlarda 1X polimeraz zincir reaksiyon (PCR) tüpü içerisinde 40 µl Master mix (1 µl dNTP, 5 µl Buffer, 0.4 µl Taq DNA polimeraz, 33.6 µl distile su) , 5 µl Primer (2.5 µl F+

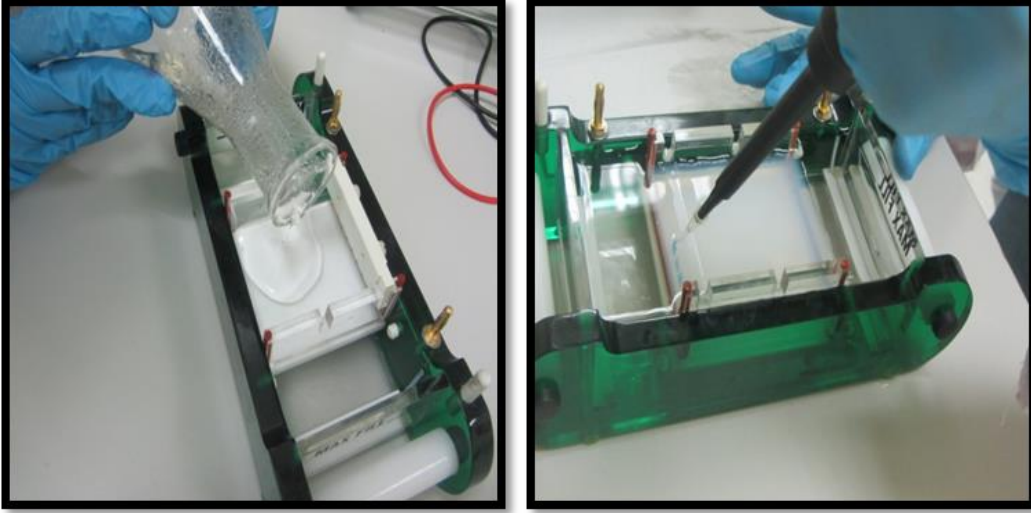
2.5 µl R ) ve 5 µl genomik DNA olmak üzere toplam 50 µl hacim oluşturulmuştur. Reaksiyonlar steril koşullarda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımını içeren PCR tüpleri Eppendorf Mastercycler Gradient PCR Thermocycler'a yerleştirilerek cihaz programlanmıştır. İlk aşamada, kullanılan iki set primer 10 pmol/µl'a sulandırılmıştır. Denatürasyon 95°C'de 4dk, 1 döngü ve 95°C'de 59sn, 1 döngü; bağlanma (annealing) 59°C'de 30sn 1 döngü; uzama (extention) 72°C'de 10sn, 1 döngü olmak üzere toplam 40 döngüde gerçekleştirilmiş, agaroz jel elektroforez yöntemi ile UV ışık altında görüntülenmiştir.

Reaksiyon ürünlerini görüntülemek ve sonuçları değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen agaroz jel elektroforez işlemi aşağıda belirtilen sıraya göre yürütülmüştür.

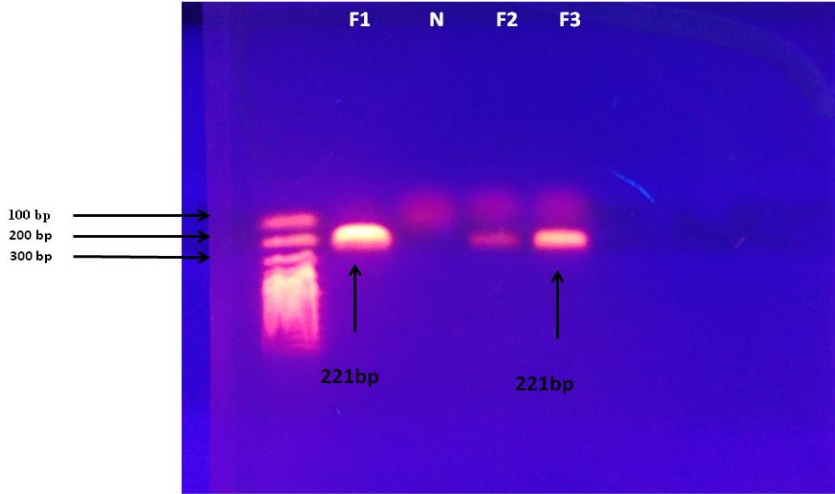
Cam erlen içerisine 1 gr agaroz tartılarak üzerine 100 ml 1X TAE tampon ilave edilmiştir. %1'lik Agaroz TAE buffer karışımı mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyinceye kadar kaynatılmıştır. Elle dokunulabilir sıcaklığa

gelen karışıma 2µL Gel red eklenmiştir. Agaroz jel tankına tarak takılmış ve hazırlanmış olan karışım 3-4mm kalınlığında dökülerek donmaya bırakılmıştır. Örnekler 10 µl PCR ürünü ile 2 µl 6X yükleme tamponu olacak şekilde toplam 12 µl'lik karışım jelde açılmış kuyucuklara mikropipetle yerleştirilmiştir (Şekil 4). Jel Tankı güç kaynağına bağlanarak 35 dakika 50-70 V elektrik akımı verilmiştir. Yükleme boyası jelin 2/3'ü kadar yürüdüğünde yürütme durdurulmuştur (Woodhall

J.,2015, sözlü görüşme). Jel UV-Transiluminatör cihazına yerleştirilmiştir. UV ışık altında reaksiyona giren ve boyanan DNA bantları var/yok olarak değerlendirilmiş ve bilgisayar ortamında görüntülenerek kayıt altına alınmıştır (Şekil 5). Jel elektroforez sonrası her bir örneğin DNA moleküler ağırlığı belirlenerek bunlara forward ve reverse primerler ilave edilmiştir. Örnekler Altigenbio firmasına (İzmir) gönderilerek baz dizisi analizleri yaptırılmıştır.



Şekil 4. Konvansiyonel PCR işlemleri  
Figure 4. Conventional PCR process



Şekil 5. DNA bantlarının UV kamerada görüntülenmesi [M:DNA Ladder (100bp), F1: *F. oxysporum* f. sp. *tulipae* (referans izolat), F2: *F.oxysporum* , F3: *F.oxysporum*, N:Negatif].

Figure 5.View DNA bands on UV lights. [M:DNA Ladder (100bp), F1: *F. oxysporum* f. sp. *tulipae* (reference isolate), F2: *F.oxysporum* , F3: *F.oxysporum*, N:Negative].

#### Gerçek zamanlı (Real-time) PCR çalışmaları

Real-Time PCR'da çeşitli floresan teknikler kullanılmaktadır. Bunlar SYBR Green, hibridizasyon probu, hidroliz probu, simple prob vb. gibi tekniklerdir.

Çalışmamızda floresan işaretli problara ihtiyaç göstermediği için maliyeti düşük bir metod olan ve bu nedenle tercih ettiğimiz teknik SYBR Green I olup floresan boyanın (SYBR Green) DNA'ya bağlanması

temeline dayanmaktadır. Floresan boya DNA'ya bağlandığında 530 nm dalga boyunda yayılım meydana getirmektedir. Polimerizasyon basamakları boyunca ekrandan artan floresan sinyali gözlemlenmektedir. Çoğalan DNA'nın artan miktarlarını izlemeye her PCR döngüsünün 'uzama basamağı'nın sonunda floresan ölçümler gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem optimize edilmiş PCR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak vermekte ve yalnızca tarama amacıyla kullanılmaktadır (Külen ve ark., 2011).

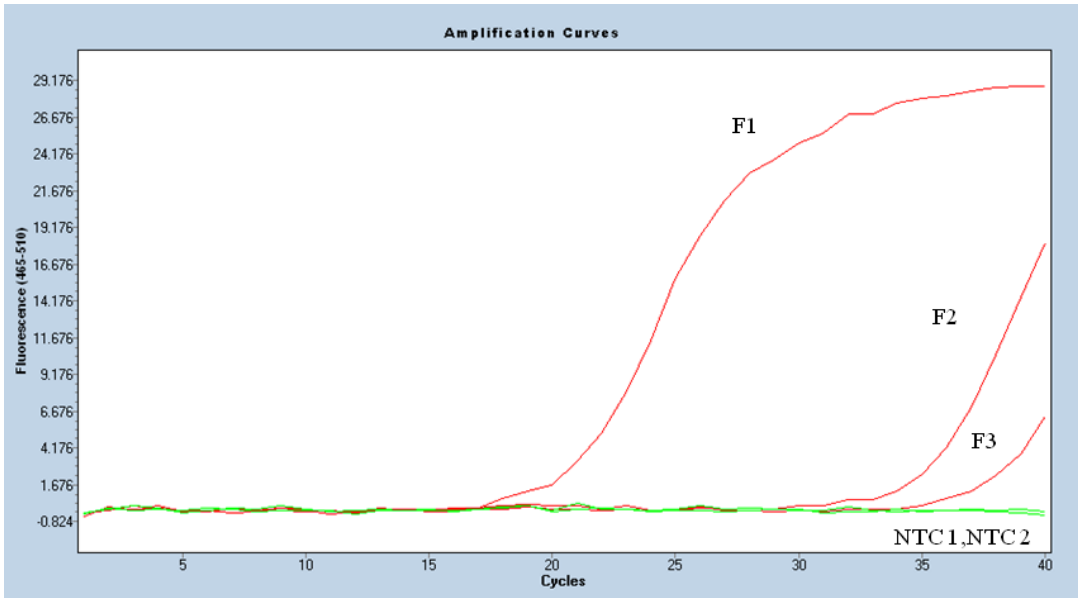
Çalışmada PCR reaksiyonundaki bileşenlerin miktarları 10 µl'lik reaksiyon hacmi için optimize edilmiştir. Reaksiyonlarda 1X polimeraz zincir reaksiyon (PCR) tüpü içerisinde 5 µl Master mix, 1.9 µl distile su, 0.6 µl Primer (0.3 µl F+ 0.3 µl R) ve 2.5 µl genomik DNA olmak üzere toplam 10 µl hacim oluşturulmuştur. Reaksiyonlar steril koşullarda hazırlanmıştır. Plate'in her bir kuyucuğuna yerleştirilen PCR ürünleri, Light Cycler® 480 II cihazında başlangıç denatürasyonu 95°C'de 10 dk, çoğalma 95°C'de 10 sn, 64°C'de 10 sn, 72°C'de 10 sn ve takiben 95°C'de 5 saniye, 60°C'de 10 saniye 99 °C'de

devamlı olarak 42 döngüde çalıştırılmış toplam final inkubasyonu 40°C'de 30 sn'de gerçekleştirilmiştir. Veriler cihaza entegre software ile incelenerek fungal patojenlerin varlığı analiz edilmiştir.

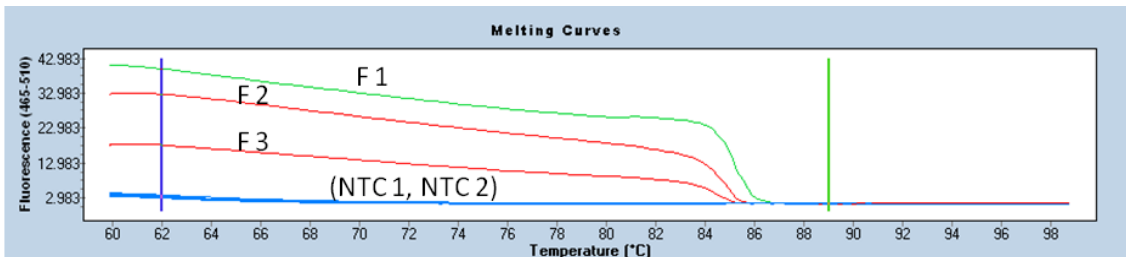
## ARAŞTIRMA BULGULARI

### *Fusarium oxysporum* İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu

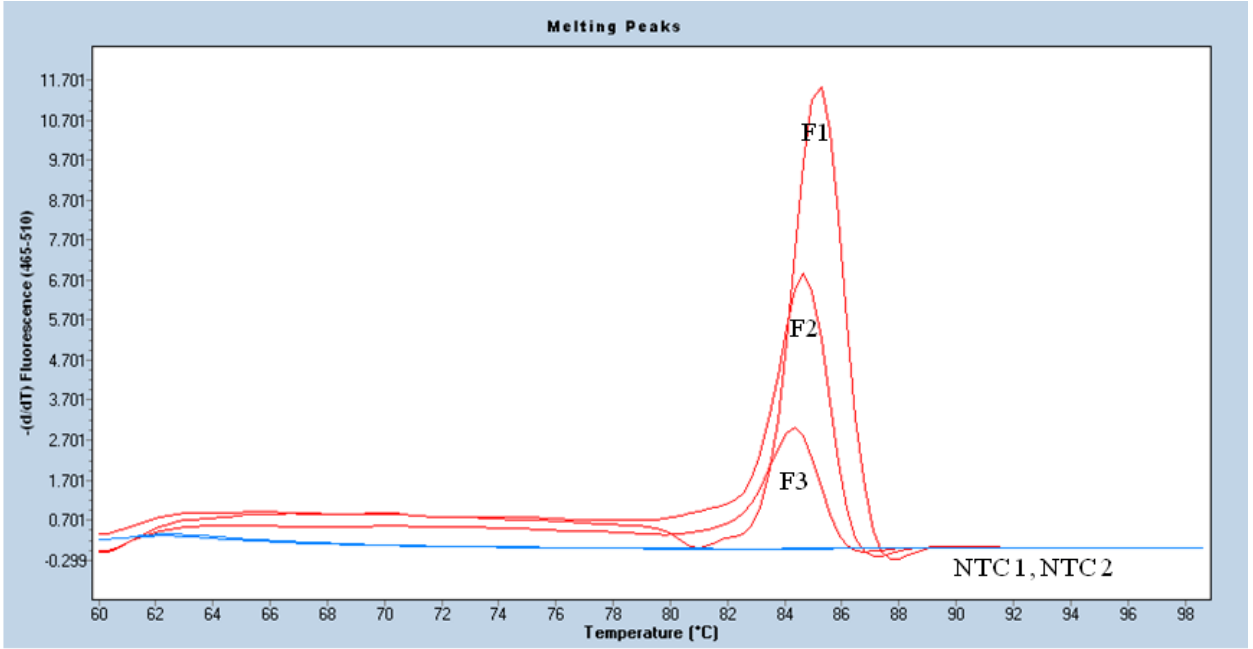
Çalışma bulgularına baktığımızda TEF1 primer çifti ile *F.oxysporum* varlığının tespit edildiğini ancak FOW1 primer çiftinin ise çalışmadığını görmekteyiz. TEF1 primerinin 20. döngü itibarı ile reaksiyona girdiği FOW1 primer setinin ise reaksiyona girmediğini görmekteyiz. Negatif kontrollerimizde herhangi bir bulaşma görülmemektedir. Çoğalma ve erime eğrilerine ve erime değerlerine dair sonuçlar Şekil 6, 7 ve 8'de verilmektedir. DNA konsantrasyonu ve saflık derecelerinin tespitine dair Picodrop cihazı ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2'de verilmektedir. Sekans analizi neticesinde örneklerin *Fusarium oxysporum* olduğu doğrulanmıştır.



Şekil 6. *Fusarium oxysporum* izolatlarına dair çoğalma eğrileri  
Figure 6. Amplification curves of *Fusarium oxysporum* isolates



Şekil 7. *Fusarium oxysporum* izolatlarına dair erime eğrileri  
Figure 7. Melting curves of *Fusarium oxysporum* isolates



Şekil 8. *Fusarium oxysporum* izolatlarına dair erime pikleri  
Figure 8. Melting peaks of *Fusarium oxysporum* isolates

Çizelge 2. DNA konsantrasyonu ve saflık dereceleri  
Table 2. DNA concentration and purification ratings

	F1: <i>F. Oxysporum</i> f. sp. <i>tulipae</i> (referans izolat)	F2: <i>F.oxysporum</i>	F3: <i>F.oxysporum</i>
DNA miktarı (ng/µL)	33,3	21,2	37,7
DNA saflığı (260/280)	2,02	1,94	2,32
DNA saflığı (260/230)	0,32	0,22	0,20

## SONUÇ ve TARTIŞMA

Hava sirkülasyonunun iyi olmadığı koşullar, sıcak ortamlar, dikim sonrası drenajın iyi olmaması ve ağır topraklar çeşitli hastalıkları ortaya çıkarmaktadır. Ekonomik kayıplara yol açan bu hastalıklar arasında *Fusarium solgunlukları* Gramineae familyası dışındaki bütün kapalı tohumlu (Angiosperm) bitki familyalarında ekonomik öneme sahiptir (Turhan, 2010). Çiçek soğanlarının yetiştiği hemen her yerde görülen bu etmenin inokulum kaynağı hastalıklı bitki artıkları ve topraklardır. Etmen, soğanların dip kısmında çürüklük meydana getirmekte ve çiçeklenmeden önce soğanı soldurarak çürütmektedir. Bunun sonucu olarak, ürün kayıpları oluşmakta, böylece maliyet daha da artmaktadır. Bu nedenle etmenin henüz depo aşamasında doğru teşhisinin yapılması gerekmektedir. Ancak *Fusarium* cinsi oldukça heterojen bir gruptur, morfolojik ve biyokimyasal kriterlere göre türlerin teşhisi zor ve karışıktır. Bu durum çalışmamızda PCR yönteminin tercih edilmesine neden olmuştur.

Dünyada bu konuda yürütülen çalışmalara baktığımızda 28S rDNA ve ITS bölgesinin RFLP

analizleriyle tür seviyesinde birkaç *F. oxysporum* suşunun ayırt edildiğini görmekteyiz (Edel et al., 1995; Çolak 2011). Yine son dönemlerde *F. avenaceum*, *F. culmorum* ve *F. graminearum* türlerini ayırt edebilmek için ITS bölgesinin dizi varyasyonlarından yararlanılmıştır. *F. culmorum* ve *F. graminearum*'da ITS bölgesi türe özgü primerler elde etmeye olanak sağlayacak derecede polimorfik iken *F. culmorum* ve *F. graminearum*'u *F. avenaceum*'dan ayırt etmek için ITS1 ve ITS2 bölgelerindeki dizi varyasyonunun yeterli olmadığı belirlenmiştir (Schilling et al., 1996).

2008 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada 7 *Fusarium* izolatı olan *F. semitectum*, *F. culmorum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* and *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*'un rastgele amplifiye olmuş polimorfik DNA yöntemi (RAPD-PCR) ile patolojik ve morfolojik karakteristiklerine dayanarak tespitine gidilmiştir. Söz konusu çalışmada 8 primer kullanılmıştır. RAPD tekniğinin *Fusarium* türlerinin morfolojik ve patolojik karakteristiklerine dayanarak ayırt edilmesi için kullanışlı bir yöntem olduğu ortaya konulmuştur (Fadly et al., 2008).

Pamukta solgunluk hastalığına neden olan *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*'un, farklı coğrafik orijinlerden izole edilen 46 izolatu arasındaki genetik farklılığı belirlemede patojenite ve RAPD teknikleri kullanılmıştır. Patojenite denemelerinde bu izolatlar, virulensliklerine ve kullanılan farklı çeşitlere göre üç farklı gruba ayrılmıştır. Bu izolatlardan 25 tanesinin, *Gossypium hirsutum* ve *G. barbadense* çeşitlerinde yüksek virulenslik gösterdiği gözlenmiştir. Bu izolatlar arasındaki genetik varyasyon, tesadüfi 11 adet 10 bazlık primer setiyle polimeraz zincir reaksiyon yöntemi ile amplifiye edilerek belirlenmiştir. Polimorfizm gösteren 83 DNA bantı kaydedilerek (1/0) cluster analizi ile izolatlar arasındaki genetik yakınlığı gösteren bir dendrogram oluşturulmuştur. OPF-06 primeriyle oluşturulan amplifiye DNA fragmentlerinin büyüklüklerinin 0.2-2.1 kb arasında değiştiği bildirilmiştir. Oluşturulan dendrogramın patojenite sonuçlarıyla benzerlik göstermediği ve *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* izolatlarının moleküler karakterizasyonunda, RAPD yönteminin hızlı ve güvenilir olduğunu bildirilmiştir (Assigbetse et al., 1994; Altınok 2006).

*F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* ile yapılan bir çalışmada, ırk ayırımında ve izolatların genetik karakterizasyonunda patojenite denemesi yanında, VCG, RFLP ve RAPD gibi tekniklerin de kullanılabileceği ortaya konmuştur (Woo et al., 1996). Soyada ani ölüme neden olan *F. solani* izolatlarının patojen olup olmadığı ve patotiplerinin belirlenmesinde RAPD marker'ları kullanılmış ve oldukça duyarlı ve güvenilir bir metod olduğu belirtilmiştir (Achenbach et al., 1996).

Peru'da Huallaga vadisinde, coca bitkisi yetiştirilen alanlarda *Erythroxylum coca* var. *coca*'dan izole edilen *Fusarium* spp.'lerin RAPD analizi ile genetik yakınlıkları araştırılmıştır. Coca bitkisi yetiştirilen 10 farklı bölgeden 200 *Fusarium* izolatu elde edilmiştir. Kök daldırma yöntemi ile yapılan patojenite denemelerinde, bu izolatlardan 143'ünün *Erythroxylum coca* var. *coca*'da patojen olduğu belirtilmiştir. RAPD analizleriyle iki alt gruba ayrılan bu patojenik izolatlar arasında polimorfizm gözlenmemiştir. Alt populasyon l'in hastalığın en yaygın olduğu bölgeyi temsil ettiği bildirilmiştir. Ayrıca RAPD analizi ile patojen ve patojen olmayan izolatların kolayca ayırt edilebildiği belirtilmiştir (Nelson et al., 1997; Altınok 2006).

Hıyardan izole edilen *Fusarium* izolatlarının RAPD analiziyle genetik yakınlıklarının belirlendiği diğer bir çalışmada OPA-01, OPB-01'den OPB-20'ye kadar ve OPF-05 primerleri kullanılmış ve bu primerlerden 10 tanesi verdikleri bant görünümüne göre RAPD-PCR çalışmaları için seçilmiştir. Amplifikasyonların sonucunda, 121 *Fusarium oxysporum* izolatu RAPD

profilleri oluşturulmuş ve 107 amplifiye DNA bantının 97'sinin polimorfik olduğu belirlenmiştir. Amplifiye bantların büyüklüklerinin 0.2-2.3 kb arasında değiştiği bildirilmiştir (Vakalounakis and Fragkiadakis, 1999). tarafından yapılan benzer bir çalışmada, kök ve gövde çürüklüğü gösteren hastalıklı hıyar bitkilerinden izole edilen 106 *F. oxysporum* izolatu RAPD analizleriyle karakterize edilmiştir (Altınok, 2006).

Patojenite çalışmalarında, 68 izolat *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, izolat *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ve 6 izolat da patojen bulunmamıştır. *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*'un 68 izolatu RAPD analizleriyle oluşturulan genetik ağaçta tek bir RAPD grubuna dahil olmuştur. *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'un izolatu, 8 farklı VCG ve 2 farklı RAPD grubu oluştururken, iki izolat ise vejetatif olarak uyumsuz bulunmuştur. RAPD analizleri ile patojenite sonuçları birbirlerine paralellik göstermiş, *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* ve *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'lar oluşturulan genetik ağaçta tamamen farklı dallarda yer almışlardır. VCG ve RAPD çalışmalarının *F. oxysporum* f. sp. *radiciscucumerinum* ve *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* izolatlarının farklılığını ortaya koymada etkin yöntemler oldukları belirtilmiş, Polonya, İngiltere, Yeni Zelanda, İtalya ve Kanada'dan izole edilen *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. crookwellense* ve *F. avenaceum* toksigenik hububat patojenlerinin, RAPD-PCR ve Dizi Analizi yöntemleri ile moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca bu izolatların morfolojileri ve laboratuvar koşullarında toksin üretimleri belirlenmiştir. Üç adet 20 bazlık primerlerle yapılan RAPD-PCR çalışmaları sonucunda *F. avenaceum* izolatlarının türe spesifik bant dizaynı sergiledikleri ve bu izolatların genetik olarak birbirlerine çok yakın oldukları belirtilmiştir. *F. culmorum* ve *F. graminearum*'un tanımlanmasında, RAPD-PCR yönteminin hızlı ve güvenilir sonuç verdiği bildirilmiştir. RAPD sonuçlarının, morfolojik özelliklerine göre tanısı yapılan *F. culmorum* ve *F. graminearum* türlerinin sonuçlarını desteklediği bildirilmiştir (Chelkowski et al., 1999; Altınok 2006).

Cezayir'de mercimek yetiştiriciliği yapılan alanlarda, solgun mercimek bitkilerinden 32 adet *F. oxysporum* f. sp. *lentis* izole edilmiştir. İzolatlar arasındaki genetik varyasyon, RAPD-PCR ve AFLP analiz yöntemleriyle belirlenmiştir. İzolatlar arasındaki genetik yakınlık, Jaccard'ın coefficient formülü ve cluster analizleri ile hesaplanmıştır. Bu izolatlar her iki analiz yönteminde de iki alt populasyona ayrılmıştır (Belabid et al., 2003; Altınok 2006).



Günümüzde patojen tespitinde çok fazla emek ve taksonomik uzmanlık gerektiren klasik yöntemler kullanılmakta, bu durum zaman ve ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu çalışmamızda, ithal edilen ve ülkemizde üretilen çiçek soğanlarında potansiyel söz konusu hastalık etmenlerinden

*Fusarium oxysporum*'un hızlı ve doğru biçimde tanınması moleküler yöntemlerle gerçekleştirilmiş olup ürün kayıplarının önüne geçilmesi hususunda önemli bir adım atılmış ve çeşitli özel, resmi araştırma kuruluşlarının çalışmalarına katkı sağlanmıştır.

## KAYNAKLAR

- Achenbach L.A., Patrick J. and Gray L. 1996. Genetic variation of *Fusarium solani* isolates that cause soybean sudden death syndrome, *Phytopathology* 86 (11 suppl.), 10p.
- Altınok, H. 2006. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Patlıcanda *Fusarium* Solgunluğu Hastalığı (*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *melongenae* Matuo and Ishigami)'nın Yaygınlığı, Etmenin Moleküler Karakterizasyonu ve Bitkide Hastalığa Karşı Dayanıklılığının Uyarılması, Çukurova Üniversitesi, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 29s.
- Assigbetse, K.B., Fernandez, D., Dubois, M.P. and Geigern, J.P. 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Races on Cotton by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. *Phytopathology*, 84: 622-626pp.
- Belabid, L., Baum, M., Fortas, Z., Bouznad, Z. and Eujay, I. 2003. Pathogenic and genetic characterization of algerian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lenticis* by RAPD and AFLP analysis. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 3 (1): 25-31pp.
- Boyras, N. ve Yaşar, A. 2005. Lale soğanlarında *Fusarium* çürüklüğünün oranı ve kimyasal mücadelesi. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 19(37), Konya, 125-134s.
- Chelkowski, J., Batemen, G.L. and Mirocha, C.H.J. 1999. Identification of Toxigenic *Fusarium* Species Using PCR Assay. *J. Phytopathology*, 147: 307-311pp.
- Çolak, A. 2011. Doğu Akdeniz Bölgesi Örtü Altı Domates Yetiştiriciliğinde *Fusarium oxysporum* Spesyal Form ve Irklarının Yaygınlığı, Moleküler Yöntemlerle Ayrımı İle Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü (*F.oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* Jarvis&Shoomaker) Hastalığının Entegre Yönetimi). Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi.
- David M. G. , Mari'a del M J.G. , Seogchan K. , Izabela M. , Narayanan V., Todd J. W. , Ning Z. , Gretchen A. K. and Kerry O.D.2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 473-479,. 2004 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Edel,V, Stenberg, C., Avelange I, Laguerre, G. and Ala Bouvette, C. 1995. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology* 85:579-585pp.
- Fadly, E, G.B., El-Kazzaz, M.K., Hassan, M.A.A. and El-Kot, G.A.N. 2008. Identification of some *Fusarium* spp.using RAPD-PCR Technique. *J. Phytopathol*, Vol. 36 (1-2), 71-80 pp.
- Hekimoğlu B. ve Altındeğer M. 2012. Süs Bitkileri (Endüstri) Sektör Raporu, Samsun Tarım İl Müdürlüğü Yayını.
- Hertog, A. and Le Nard, M.1993. *The Physiology of Flower Bulbs*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, London, New York , Tokyo, 10-88 pp.
- Karagüzel Ö., Aydınşakir, K., Kaya, AS. 2011. Batı Akdeniz Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü Dünyada ve Türkiye'de çiçek soğanları sektörünün durumu' [www.batem.gov.tr](http://www.batem.gov.tr) .Erişim :Temmuz 2011.
- Külen, O., Keskin B., Yüksel B., Onarıcı S. ve Baykal A. 2011. Bitki Moleküler Genetiğinde Son Teknikler Uygulamalı Eğitimi, Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, TÜBİTAK, 24-46 s.
- Miller, B., 2002. *Fusarium* in tulips, ethylene gum and aborted flowers, Cornell University Greenhouse Product News , 12(13): 36-39 pp.
- Nelson AJ, Elias KS, Arévalo G E, Darlington LC. and Bailey BA. 1997. Genetic characterization by RAPD analysis of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *erythroxyli* Associated with an Emerging Epidemic in Peru. *Phytopathology*, 87(12):1220-5pp.
- Özer, N. ve Soran, H. 1989. İstanbul ve çevresinde bazı kesme çiçek türlerinde görülen *Fusarium* türlerinin tespiti, dağılımları, morfolojik özellikleri ve patojenisiteleri üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni* 29 (3-4): 195-209s.
- Schilling, AG., Möller, EM. and Geiger, HH. 1996. Polymerase chain-reaction based assays for species specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*, *Phytopathology* 86:515-522pp.
- Straathof TP., Jansen, J., Roebroek, E.J.A. and Löffler, H.J.M. 1997. *Fusarium* resistance in *Gladiolus*: Selection in seedling populations. *Plant breeding*, 116, 283,286pp.
- Turhan, G..2010. Sebzelelerde Görülen Önemli Fungal Hastalıklar, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Lisans Programı Ders Kitabı , 44-45s.
- Vakalounakis, D.J., and Fragkiadakis, G.A. 1999. Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* Isolates from Cucumber: Differentiation by Pathogenicity, Vegetative Compatibility and RAPD Fingerprinting. *Phytopath.*, 89:161-168pp.
- Woo, S. L., Zoina, A., Del Sorbo, G., Lorito, M., Nanni, B., Scala, F. and Novello, C. 1996. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic Races, VCGs, RFLPs and RAPD. *Phytopathology*, 86:966-973pp.
- Woodhall, J.,2015. Programme of work on fungal taxonomy and molecular identification at Fera, York, UK .