

Tahıl Patojeni *Fusarium culmorum*'da Genetik Tiplendirme Yaklaşımları

Işıl Melis Zümrüt¹, Elif Sedef Develi¹, Özlem Sefer¹, Emre Yörük^{*2}

ÖZET

Fusarium culmorum global düzeyde karantinaya alınmış bir bitki patojeni olup; dünya genelinde pek çok bölgede tahıllarda başak yanıklığı ve kök çürüklüğü hastalıklarının esas etmenidir. *F. culmorum* ekinlerin kalite ve miktarlarında ciddi düşüşe neden olmaktadır. Ayrıca patojen; ürettiği mikotoksinlerin tahıllarda birikmesi ve kontamine tahıl ve tahıl ürünleriyle beslenme sonucunda insan ve hayvan sağlığını da doğrudan veya dolaylı olarak tehdit etmektedir. Patojen ve ilgili hastalıklarıyla mücadelede patojenin karakterizasyonu önemli bir basamak oluşturmaktadır. Patojenin genetik tiplendirmesi bu bağlamda başarılı veriler sağlayabilmektedir. Özgün veya özgün olmayan genom bölgelerinin hedeflendiği polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli amplifikasyon çalışmaları son yirmi yılda popüleritesini korumaktadır. Bu derlemede, PZR temelli araçların *F. culmorum* tiplendirmesindeki kullanımı hakkında bilgiler aktarılmıştır. Mevcut çalışmalara ilaveten lokal örnekleri ihtiva eden yeni çalışmaların gerekliliğine değinilmiştir

Anahtar Kelimeler: *Fusarium culmorum*, genetik tiplendirme, başak yanıklığı, kök çürüklüğü, PZR

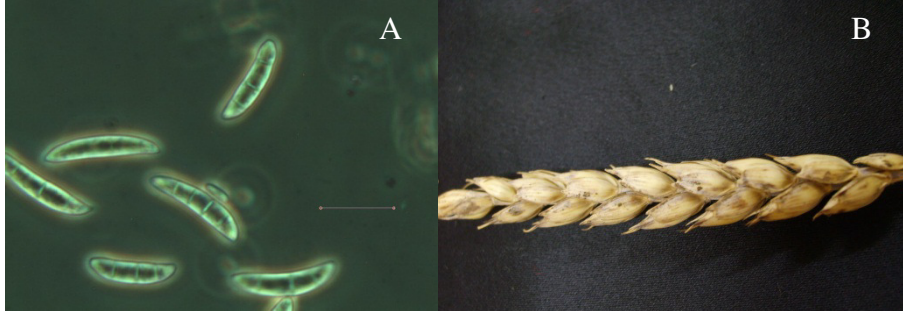
GİRİŞ

Tahıl Patojeni Olarak *Fusarium culmorum*

Fusarium culmorum Mitosporik Hypocreales ailesine ait asklı bir mantardır. *F. culmorum* tanısı güncel olarak morfolojik ve DNA markırları temelli olarak gerçekleştirilebilmektedir. Morfolojik tanısı makrokonidlerin biçimsel özelliklerine göre gerçekleştirilmekteyken, polimeraz zincir reaksiyonu temelli tanı ise SCAR (ing., 'sequence characterized amplified region') markırları temelli yapılmaktadır. Makrokonidleri nispeten kısa, küt uçlu ve geniştir. Makrokonidler zayıf çeperli ve kavislidir, genelde 3-5 bölme içerir (Şekil 1.A) ve 30-50 x 5-7.5 µm ebatlardadır [1-5]. Eşeyli üreme rapor edilmemiş olup, mikrokonidleri mevcut değildir. Ancak eşem tipi analizleri ve genetik çeşitlilik araştırmaları paraseksüel üremeyi desteklemektedir [3, 6, 7]. Patates dekstroz agar besi ortamında oda sıcaklığında 16-22 mm/gün koloni

*¹ Lisans ögr., ²Yrd. Doç. Dr. İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Zeytinburnu, İstanbul. *Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: emre.yoruk@yeniyuzuil.edu.tr

gelişimi göstermektedir. Rubrofusarin ve aurofusarin üretimi ve diğer bazı sekonder metabolit üretimi sebebiyle sarıdan tan rengine kadar geniş bir pigmentasyon gösterir [5, 8, 9].



Şekil 1: (A) *F. culmorum* makrokonidleri. 40X büyütme, bar: 20 µm. (B) *Fusarium* başak yanıklığının etkilediği buğday başağı. (Fotoğraflar Dr. Emre Yörük tarafından çekilmiştir. Örneklemeler araştırmacının kendisi tarafından toplanan hastalıklı başak ve bu başaklardan elde edilen spora aittir.)

F. culmorum esas habitatı toprak olan bir bitki patojeni organizmadır. Bitki enfeksiyonun başlangıcında kısa bir biyotrofik süreci ayrı tutarsak; canlı nekrotrofik yaşam döngüsüne sahiptir [5, 10]. *F. culmorum* tahıllarda başta olmak üzere çok farklı bitki türlerine bulaşıp başak yanıklığı, solgunluk, kök ve kök boğazı çürüklüğü ve külleme gibi çeşitli hastalıklara yol açmaktadır [4, 5, 11, 12]. Bu fitopatogenik tür buğday, arpa, pirinç, yulaf, mısır, sorgumu içeren tahılların yanı sıra yabancı çimler, şeker pancarı, keten, karanfil, fasulye, çilek ve patatesten de izole edilmiştir. Bu tür, dünya genelinde çoğunlukla ılıman iklim koşullarına sahip bölgelerde yaygındır. Avustralya, Avrupa, Batı Asya ve Kuzey Amerika'da türün varlığı rapor edilmiştir [1, 4, 6, 13, 14]. Türün varlığı ülkemizde de Marmara, İç Anadolu, Ege, Karadeniz ve Akdeniz bölgelerinde rapor edilmiştir [4, 14-19]. Ancak son yıllarda daha sıcak bölgelerde görülen *F. graminearum* ve nispeten daha ılıman bölgelerde görülen *F. culmorum* türlerinin iklimsel değişiklikler, ekin rotasyonları, genom plastisitesi ve benzeri nedenler dolayısıyla farklı iklim koşullarına adapte oldukları belirlenmiştir [5, 20, 21].

***F. culmorum* Genom Bilgisi**

Haploid kromozom sayısı $n=4$ olan *F. culmorum* genom projesi resmi olarak tamamlanmamış ancak toplamda farklı izolatların genom dizilerine ait veriler toplanmaktadır. Güncel olarak 3-ADON kemitipindeki *F. culmorum* FcUK99 (NRRL 54111) izolatının tüm genom dizilim bilgisine ait ilk veriler toplanmış ve bu veriler veritabanlarına yüklenmeye başlanmıştır [5, 22]. Toplamda genom boyutu 39 Mbp olarak hesaplanmıştır. Ayrıca çalışmalar sonucunda özgün bazı genlere ait nükleotid dizilim bilgileri veritabanlarında etkin olarak paylaşılmaktadır. NCBI veritabanında kayıtlı 100'ün üzerinde gen dizilim bilgisi mevcuttur. Annotasyonu yapılmış proteinler arasında uzama faktörü 1 α , RNA polimeraz II, fosfat permeaz, topoizomeraz I ve trikotesen üretimi ile ilgili enzimler ve patojenite ilişkili proteinler (ABC transporter proteini vb.) yer almaktadır. Ancak özellikle de bir diğer başak yanıklığı ve kök

çürüklüğü esas etmeni *F. graminearum* ile karşılaştırıldığında patojenite ve konak-patojen ilişkisi ile ilgili yeterli bilgi mevcut değildir [5].

***F. culmorum*'un Neden Olduğu Hastalıklar**

F. culmorum türü arpadan çileğe kadar geniş bir yelpazede bitkileri enfekte edebilmektedir. Ancak türün karantinaya alınmış patojen olarak anılmasının esas nedeni başak yanıklığı ve kök çürüklüğü hastalıklarıdır. *F. culmorum* her iki hastalık için de dünya genelinde üç esas patojenden birisidir [4].

Başak yanıklığı, özellikle, ekonomik değere sahip tahıl bitkilerinden arpa ve buğday görülen önemli bir hastalıktır [15, 23]. Hastalık nemli ve yarı nemli bölgelerde tahıllarda ürün miktar ve kalitesinde büyük kayıplara neden olur [24, 25]. Hastalığın görülme frekansı küresel iklim değişikliği, yağış miktarı ve nem oranındaki artışa bağlı olarak artış göstermektedir [20, 26, 27].

17 *Fusarium* türü tarafından oluşturulan hastalığın yaklaşık 150 yıllık bir geçmişi olmakla birlikte özellikle; [23] son 20 yılda yapılan çalışmalar, bu hastalığın Amerika [28, 29], Asya [19, 30] ve Avrupa kıtasında [14, 31, 32] çok sayıda ülkede yaygın hale geldiğini ortaya koymuştur. Kuraklık ve nem ile birlikte ürün kayıplarına % 70'e kadar varabilmektedir [24, 33]. Günümüzde *Fusarium* başak yanıklığı hastalığı dünya ekonomisi için önemli bir tehdit haline gelmiştir.

Tahıllar antez döneminde başak yanıklığı patojeni *F. culmorum* ile enfekte olabilir ve mahsul toplanana kadar da yayılma gerçekleşebilir [5]. Özellikle çiçeklenme ve tohum oluşumunun görüldüğü generatif evrede nemli ortam koşulları, hastalık riskini daha da arttırmaktadır ki *F. culmorum*'un diğer başak yanıklığı etmenlerine göre daha az neme ihtiyaç gösteren bir tür olması durumun ciddiyetini ortaya koymaktadır [25, 34, 35]. Hastalık belirtileri neredeyse tüm tahıl bitkilerinde benzerlik gösterir. İnfeksiyon ilk olarak eksende ve başakçıkların kabuklarında oluşan kahverengi spotlar (Şekil 1.B) şeklinde meydana gelir. Su çekilir ve tohumda meydana gelen büzüşme ve solma ileri zaman zarfında tüm başağı kaplar. Sonrasında fungal üreme başak dibinde veya başak kabuğunun uç kısımlarında pembemsi-kırmızı renkte gözlenir. Sonuçta bitkide başaklar beyazlaşır, tohumlar kuruyup büzülür ve hatta başaklarda tohum oluşmayabilir [5, 15].

F. culmorum tarafından oluşturulan bir diğer hastalık kök çürüklüğüdür. Hastalığın semptomları enfeksiyon zamanına göre değişkenlik gösterir. Mantar erken gelişim basamağında bitkide enfeksiyona neden oluyorsa, filizlerin ilk çıkışları esnasında ölüm meydana gelir, koleoptiller, yalancı sap ve kökler kahverengi renk alır (renksizleşir). Eğer enfeksiyon ileriki süreçlerde meydana geliyorsa, ana sapın ilk birkaç internodunda kahverengi lezyonlar meydana gelir ve kök filizi/yeni sürgünler çıkamaz hale gelir. Yüksek nem varsa nodlar pembeye yakın renk alır ve miselyumlar yüzeyi kaplar. Büzümüş tohumlar ve beyazlaşmış başakçıklar oluşur hatta tohum oluşumu gözlemlenmeyebilir [36].

F. culmorum Mikotoksinleri

Fusarium spp. mikotoksin üreten en önemli dört mantar cinsi içerisinde yer almaktadır [15, 37, 38]. *Fusarium* türleri trikotesen, fumonisin, zearalenon, fusarin C, butenolid gibi çeşitli mikotoksin üretirler. Bu mikotoksinler infeksiyon sürecinin başlamasında işlevsel olmasalar da; infeksiyonun ilerlemesi ve yayılmasında etkilidirler [39]. *F. culmorum* türünün ürettiği, bitkilerde ciddi hasarlara yol açan en önemli mikotoksinleri B sınıfı trikotesenler, zearalenon, fusarin C, butenolid'dir [40-42]. Ancak son yıllarda *F. culmorum* ile ilgili yapılan çalışmalar B tipi trikotesenlerin moleküler düzeyde analizi üzerine yoğunlaşmıştır. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* deneylerde trikotesenlerin düşük konsantrasyonlarda bile immünobaskılayıcı etkiye sahip olduğu ve ribozoma bağlanarak ökaryotik protein sentezini engellediği rapor edilmiştir [37, 43]. Gıda zehirlenmesi, diare, kusma, sindirim sistemiyle ilgili kanamalar, mide bulantısı, iştahsızlık, lökosit sayısında azalma muhtemel olumsuz sağlık problemleri arasında yer almaktadır. Ayrıca bitkilerde biriken trikotesenler besin piramidi aracılığıyla bulaştığı insan ve hayvanlar için de önemli bir tehdit oluşturmaktadır.

B tipi trikotesen üreten *F. culmorum* çalışmalarında patojenin ürettiği ve üretme yeteneğinde olduğu mikotoksin alt tipleri belirlenmekte (kemotiplendirme), mikotoksin sentezi ile ilgili genlerin genomdaki lokasyonları ve anlatım profilleri ortaya konulmakta hatta gen susturma teknolojileri uygulanmaktadır [17, 30, 44-46]. *Fusarium* izolatlarında kemotiplendirmede kromatografik teknikler ve PZR temelli uygulamalar sıklıkla tercih edilmektedir [47-49]. Analitik uygulamalarda 214-254 nm dalga boylarında yapılan taramalarla kemotip saptanmaktadır [50, 51]. PZR temelli uygulamalarda ise *tri5* gen kümesindeki genlerin dizisel, boyutsal ve anlatım düzeyindeki farklılıkları temel alınmaktadır [52-54].

F. culmorum'un Moleküler Markır Aracılı Genetik Tiplendirilmesi

Fusarium türleri alem seviyesinden alt tür düzeyine kadar; çeşitli düzeylerde moleküler yaklaşımlar kullanılarak tanımlanabilmektedir. Genetik karakterizasyon çalışmalarında genomda varlığı belirlenmiş olan SCAR (ing., "sequence characterized amplified region") markırları, 18S-5.8S-28S rDNA (ribozomal DNA), ITS (ing., "internal transcribed spacer") ve IGS (ing., "intergenic spacer") bölgeleri PZR'nda çoğaltılarak hedef olarak seçilebilmektedir [1, 55-57]. Günümüzde *F. culmorum*'un görüldüğü veya tespit edilemeyen coğrafik bölgelerde, hastalık etmenlerinin genetik tiplendirmelerinin yapılmamış olması önemli bir olumsuzluktur. Bu kapsamda denizaşırı ortak çalışmalar yürütülmekte ancak yine de çalışma sayısının yetersiz olduğu aşikardır. Buna karşın genetik çeşitliliğin belirlenmesinde ise günümüze kadar açık bir uygulama çeşitliliği söz konusudur. PZR temelli gerçekleştirilen uygulamaları kendi içinde farklı alt başlıklar içerebilmektedir. Restriksiyon endonukleazları kesimi, dizileme uygulaması ve tek primer temelli uygulamalar dikkat çeken üç farklı stratejidir. Bu bağlamda *F. culmorum* genetik tiplendirmesinde sıklıkla tercih edilen uygulamalar; SCAR/RAPD-PZR (Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA-PZR), ISSR (ing., "inter simple sequence repeat"), mikrosatellit PZR, RFLP (ing., "restriction fragment length polymorphisms") ve PZR-RFLP/CAPS (Kesilmiş çoğaltılmış polimorfik dizi), Lokus-Multilokus genotiplendirme, AFLP (ing., "amplified fragment length polymorphism"), SSCP

(ing., 'single strand conformation polymorphisms') ve SRAP (ing., 'sequence related amplified polymorphisms') yöntemleri ise bu türün genotiplendirmede fazla tercih edilmemiş diğer uygulamalar arasında yer almaktadır.

SCAR ve RAPD yöntemlerin geçmişten günümüze en sık tercih edilen *F. culmorum* tanı ve tiplendirme uygulamaları arasındadır. SCAR markırları çoğunlukla RAPD (sınırlı sayıda çalışmalarda ise ISSR ve AFLP) markırlarından türetilmiş amaca göre monomorfik veya polimorfik bantlardan elde edilir. Safılaştırılan bantlar dizileme işlemine tabi tutulduktan sonra tekrar primer molekülleri tasarlanır ve özgün bantların çoğaltılmasıyla SCAR markırları elde edilir [58]. *F. culmorum* tanısında iki farklı araştırma grubunun geliştirdiği SCAR markırları bu patojenin genetik karakterizasyon çalışmalarında adeta bir devrim niteliğindedir. Schilling ve diğ. [1] ve Nicholson ve diğ. [2] tarafından geliştirilen OPT18 ve Fc01 SCAR markırları RAPD türevli olarak geliştirilmiş monomorfik bantlardır. Bu markırlar günümüze kadar yüzlerce çalışmanın birincil moleküler genetik basamağında kullanılmış ve morfolojik tanı çalışmalarını doğrular veya tenkit eder nitelikte verilerin eldesini sağlamışlardır [59]. RAPD tekniği ise *F. culmorum* genetik tiplendirmesinde günümüze kadar en sık tercih edilen uygulama niteliğindedir. Bu teknik ilk kez Williams ve diğ. [60] tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde çoğaltım yapılacak bölgenin dizi bilgisine gerek yoktur. 10 nükleotid uzunluğundaki tek oligonükleotid primeri kullanılır (Operon, ABD). Setler halinde geliştirilmiş primerler farklı (%GC : %50, 60 ve 70) %GC içerikleri baz alınarak farklı amaçlarda kullanılabilir. Standart PZR uygulamasına göre düşük bir bağlanma sıcaklığı (36-40°C) ve farklı siklus parametrelerine (sıklıkla uzun süreli ön çoğaltım basamağı) sahip olan uygulama alt tür ayrımı ve tür ayrımında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır [61, 62]. Yöntem özellikle markır aracılı seleksiyon uygulamalarında da kullanılabilir, ayrıca tür içi yüksek düzeydeki genetik çeşitliliği (Tablo 1) ortaya koyabilmektedir [1, 3, 62]. Tek primerin kullanıldığı bir diğer genotiplendirme uygulaması ise ISSR tekniğidir. Teknikte primerin kendisi mikrosatellit motifi içerir. 2-6 nükleotidlik motifler içerilir ki en sıklıkla (NN)8, (NNN)6 ve (NNNN)4 motifleri tercih edilmektedir. İki nükleotidlik çıpa eklenmesi ise daha özgün amplifikasyon profilleri ile sonuçlanabilmektedir [63]. Teknik uzun süre içeren termal basamaklar bakımından RAPD'e benzerlik göstermekle birlikte, bağlanma sıcaklığı (45-65°C) primer boyutu/motife göre değişkenlik gösterebilir. RAPD yönteminde olduğu gibi 1.5-2X oranda arttırılmış dNTP ve *Taq* DNA polimeraz konsantrasyonları başarı oranını arttırabilmektedir. RAPD yöntemi gibi ko-dominant markır temin etmemekle birlikte, güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği RAPD'e nispeten daha yüksektir. Ancak RAPD yöntemi gibi yüksek düzeydeki genetik çeşitlilik içeren örneklerin karakterizasyonunda (Tablo 1) etkili bir uygulamadır [64-67].

F. culmorum izolatlarının genetik tiplendirmesinde kullanılan bir diğer uygulama mikrosatellit PZR dir. Mikrosatellitler DNA dizilerinde tekrar edilen en küçük birimlerdir ve bu tekrar motifleri 1-6 bç arasında olabilmektedir. Mikrosatellitleri çevreleyen dizilerin bilgileri biliniyorsa bu dizilere özgü primer tasarlanabilir. Genelde 20-25 bç uzunluğunda olur. En sonunda PCR ile çoğaltımı yapılabilir. Mikrosatellit markerler, az sayıda DNA ihtiyacı duyar, polimorfizm çoktur, genomda bol ve dağınık bulunur. Fakat mikrosatellit bölgelerin mutasyona açık olması bu yöntemin önemli bir dezavantajıdır. Birden fazla alt strateji içeren tekniğin temel prensibi özgün tekrarlı bölgeler etrafındaki korunmuş bölgelerin PZR ile çoğaltılmasıdır. Tekrar motif sayısı ve içeriğindeki farklılık allelik varyasyonlarla sonuçlanır ve çeşitlilik fenotipte gözlemlenebilir.

Tablo 1: Farklı markır teknikleri ile *F. culmorum*'da gerçekleştirilen bazı tiplendirme çalışmaları

Kaynak	Ülke/Kıta	Yöntem	Örnek Sayısı	Önemli Notlar
Schilling ve diğ. [1]	Avrupa, Amerika	RAPD	32	25 primer, <i>F. culmorum</i> tanı markırı
Nijs ve diğ. [61]	Holanda	RAPD	18	3 primer, 3 farklı RAPD profili
Gargouri ve diğ. [84]	Tunus	RAPD	108	14 primer, 25 polimorfik bant
Toth ve diğ. [13]	Macaristan	RAPD	37	30 primer, 162 bant
Irzykowska ve diğ. [85]	Polonya	RAPD	35	23 primer, 0.2-3.0 kb bant boyutu
Arici ve diğ. [86]	Türkiye	RAPD	32	10 primer, 27/134 polimorfik bant,
Yörük ve Albayrak [62]	Türkiye	RAPD	12	60 primer, %65 ortalama genetik benzerlik
Miedaner ve diğ. [87]	Avrupa, Asya	Mikrosatellit-PZR	186	10 markır, en yüksek varyasyon %81
Pouzeshimiab ve diğ. [88]	İran	Mikrosatellit-PZR	88	8 primer, 33 allel
Rebib ve diğ. [89]	Tunus	Mikrosatellit-PZR	82	5 primer, gen çeşitliliği Hs= 0.497
Naef ve diğ. [69]	İsviçre	Mikrosatellit-PZR	20	Mg103 markırı, amplikon elde edilmedi
Giraud ve diğ. [68]	Fransa	Mikrosatellit-PZR	21	8 primer, markır başına 2-13 allel
Vogelgsang ve diğ. [90]	İsviçre	Mikrosatellit-PZR	3	15 primer, markır başına 4-20 allel
Llorens ve diğ. [75]	İspanya	PZR-RFLP	5	IGS-rDNA, toksin üretimi ile ilişkilendirim
Mishra ve diğ [91]	Belirsiz	PZR-RFLP	75	IGS ve 28S rDNA, 29 IGS haplotipi
Nitschke ve diğ. [92]	İsveç, Almanya	PZR-RFLP	10	<i>TEF1α</i> geni, %99-100 dizisel benzerlik
Çepni ve diğ. [7]	Türkiye	PZR-RFLP	24	IGS-rDNA, 23 haplotip
Yli-Mattila ve diğ. [74]	Rusya, Finlandiya	PZR-RFLP	Belirsiz	β -tubulin, IGS and ITS, tanı markırı
Toth ve diğ. [13]	Macaristan	PZR-RFLP	37	IGS-rDNA, 6 haplotip
Bayraktar ve Dolar [93]	Türkiye	ISSR	4	Türler arası yüksek genetik çeşitlilik
Mishra ve diğ. [64]	Avrupa, Asya, Amerika, Avustralya	ISSR	75	3 primer, 59 genotip, %81 polimorfik bant
Albayrak ve diğ. [67]	Türkiye	ISSR	20	0.2-3.5 kb, 405 bant,
Obanor ve diğ. [6]	Amerika, Avrupa, Avustralya	Multilokus-tiplendirme	100	<i>TEF-1α</i> , <i>RED</i> and <i>PHO</i> , tek-filogenetik tür
Kim ve diğ. [94]	Kore	Multilokus-tiplendirme	2	<i>TEF-1α</i> , <i>RED</i> , histon H3, <i>PHO</i> , <i>URA</i>
Kristen ve diğ. [95]	İsveç	SNP-tiplendirme	19	<i>TEF-1α</i> , 3 haplotip
Balmas ve diğ. [96]	İtalya	SNP-tiplendirme	67	<i>TEF-1α</i> , iki haplotip

Standart PZR uygulamasıyla elde edilen amplikonlar klonlanıp dizilenebildikleri gibi (Tablo 1); kapiller elektroforez ve lazer-aracılı-florasans teknikleri ile de varyasyonlar analiz edilebilir [68-70]. Allel spesifik ayırım yapılabildiği için genotipik çeşitliliğin fenotiple ilişkilendirilmesinde kuvvetli bir uygulamadır. Ancak şu ana kadarki mikrosatellit markır sayısının düşük olması; bu markır tekniğinin daha fazla araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Enzim kesimi temelli iki önemli uygulama prensipleri çok bezer olan PZR-RFLP ve CAPS-dCAPS teknikleridir. Her iki uygulamanın temeli RFLP'ye dayanmaktadır. RFLP, restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri tarafından DNA'nın kesilmesi temeline dayanmaktadır. Bu yöntemle dizilim farklılıkları kolayca tespit edilebilir. RFLP yöntemi tür içi genetik çeşitlilik, gen haritalama, filogenetik çalışmalar, gen akışı tespitleri ve aile ağacı araştırmalarında tercih edilen bir yöntemdir [71, 72]. RE kesimi sonucu oluşan farklı uzunluktaki DNA parçaları oluşabilir. Bu DNA parçaları agaroz jel elektroforezi yöntemi ile büyüklükleri açısından ayrılır. Elde edilen DNA parçaları Southern emdirim yoluyla nitroselüloz membrana aktarılır [73]. DNA parçalarını içeren membran, proplar yardımı ile hibridizasyona uğratarak DNA parçaları ve profilleri ortaya çıkmış olur [71, 72]. RFLP yönteminin olumlu yanları arasında özgün diziyeye ihtiyaç duyulmaması, polimorfizm oranının yüksek olması ve tekrar edilebilirlik gösterilebilir. Yüksek miktarda DNA'ya ihtiyaç duyulması, problemlerin pahalı olması, deneyim ve uzun iş gücü gerektirmesi ise yöntemin olumsuz noktalarındandır. PZR-RFLP ya da lokusa özgü RFLP tekniği ise özgün bir lokusta polimorfizm tespit etmek için geliştirilmiştir. Bu yöntemde standart PCR işlemi ile üzerinde durulan lokus çoğaltılmakta ve çeşitli restriksiyon endonükleaz enzimleri ile elde edilen PCR ürünü kesilmektedir. Bu yöntemde rutin PCR reaksiyonunda olduğu gibi uzun oligonükleotid primerler kullanılır. Çoğu PZR-RFLP markırı ko-dominant olarak temin edilebilir. Ancak gen hakkında önceden bilgi sahibi olunması bir dezavantaj olarak kabul edilebilir. PZR-RFLP temelli genotiplendirmede tercih edilen hedef genler arasında *TEF1-α*, IGS-rDNA, ITS ve *β-tubulin* yer almaktadır (Tablo 1). Allel spesifik tiplendirme yapılabildiğinden güvenilirliği yüksek ve tekrarlanabilirliği yüksek markırlar aracılığıyla fenotipik karakterler ile ilişkilendirim başarı ile sonuçlanır [7, 74, 75]. Bir diğer PZR ve enzim kesimi temelli tekli nükleotid polimorfizm (SNP) ayırımını sağlayan uygulama CAPS yöntemidir. Yöntemde özgün bölgelerin PZR ile çoğaltımı ve ardından restriksiyon endonükleazları ile kesimine gerçekleştirilir [76, 77]. CAPS kapsamında uygulanan dizileme uygulaması, SNP belirlemede etkili sonuçlar vermektedir. Nihayetinde ko-dominant markırlar elde edilebilir ve heterozigot bireyler ayırt edilebilir. Düşük miktarda DNA gerektirmesi (her bir reaksiyon için 2-50 ng) RFLP ve AFLP gibi tekniklere göre önemli bir avantajdır.

Genomda meydana gelen tek nükleotidlik dizilim farklılığı, tek nükleotid polimorfizmi SNP olarak bilinmektedir. Genomda oldukça yaygın ve pek çok canlı türünde görülebilen varyasyon tipidir. Örneğin, mısır bitkisinde genelde 60-120 bazda bir SNP görülürken tahmini olarak insanda 1000 bazda bir SNP görülmektedir [78]. SNP belirlenmesi için PCR, jel elektroforezi, RFLP ve dizileme yöntemlerinden faydalanılmaktadır. SNP oluşumunda genellikle en önemli nedenler olarak transizyon, transversiyon, insersiyon ve delesyon gösterilmektedir. SNP sıklıkla genomda intronda saptansa da kodlama yapan bölgelerde de görülürler ve fenotipte etkili olabilirler. SNP analizi ekonomik ve hızlı olmasından dolayı popülasyon incelemelerinde, genetik çeşitlilik analizinde gen haritalama çalışmalarında tercih

edilen bir yöntemdir. Fakat incelenen polimorfizm için o bölge hakkında daha önceden dizi bilgisine ihtiyaç olması SNP yöntemi için bir olumsuzluktur [79].

Son 20 yıl içerisinde *F. graminearum* türünün multilokus (gen sayısı $2 < x < 13$) genotiplendirmesiyle tür kompleksi olarak ifade edilmesi ve 16 ayrı üyesinin varlığının ortaya konulması özellikle başak yanıklığı ile mücadelede yeni yaklaşımların geliştirilmesini elzem kılmıştır [80- 82]. Benzer bir durumun *F. culmorum*'da geçerli olup olmadığına dair en önemli araştırma Obanor ve diğ. [6] tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada *Tef1-α*, *Red* ve *Pho* genlerinin çoklu hizalama analizleri gerçekleştirilmiş ve çeşitli ülkelerden temin ettikleri izolatlarda hat ayrımı saptanmamıştır. Araştırmacılar *F. culmorum*'u tek filogenetik bir tür olarak rapor etmişlerdir. Ancak 3 gen ile tanımlanan bu tekli filogenetik türün arttırılmış lokus taraması ve ilave coğrafik bölgelerden kökenlenen izolatların çalışılması ile tür kompleksi olarak tanımlanma ihtimali de göz ardı edilmemelidir. Multilokus çalışmalarının dışında tekli lokus genotiplendirme çalışmalarında (Tablo 1) RAPD, ISSR ve PZR-RFLP çalışmalarına nispeten daha düşük oranda genetik çeşitlilik verileri elde edilmiştir [13, 74, 83].

F. culmorum genotiplendirmesinde etkinli veriler sağlayabilecek diğer bazı potansiyel uygulamalar ise AFLP, RFLP, SSCP ve SRAP uygulamalarıdır. Enzim kesimi temelli AFLP ve RFLP uygulamaları yüksek kalitede tekrarlanabilirlik ve güvenilirlik içermektedir. Ancak işaretleme içermesi, yüksek kalite ve miktarda DNA gereksinimi ve yüksek teknik bilgi gerektirmeleri sebebiyle *F. culmorum* genotiplendirmesinde günümüze kadar özellikle tek primer temelli genotiplendirme uygulamalarıyla karşılaştırıldıklarında sıklıkla tercih edilmemiştir. SSCP tekniğinde ise başlangıç denatürasyonu sonrası tekrar birleşme olasılığı ve tek PZR ürününden birden fazla bant saptanmasıdır. Ayrıca nispeten daha ileri düzeyde teknik uzmanlık gerektirmektedir [97]. SRAP tekniği ise özgün kodlama yapan bölgelerdeki korunmuş bölgelere göre tasarlanmış primer çiftlerinin kullanıldığı PZR temelli bir uygulamadır. Ancak rutinde kullanılan korunmuş bölge primerleri sıklıkla bitki genomlarından türevli olup tür içi ve/veya türler arası çeşitliliği ortaya koymada yeterli olmayabilir [98, 99].

SONUÇ

Moleküler markır yöntemleri canlıların kalıtsal materyallerinde (kısmen de olsa) genom boyunca veya lokal bölgelerdeki farklılıkları belirlemede güçlü yaklaşımlar olarak görülmektedir. Özellikle günümüzde birden fazla stratejinin kombine edilmesi sonucu fenotipik karakterler ile ilişkilendirim süreçlerinde daha verimli sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu tekniklerin en önemli avantajları arasında çoğunlukla laboratuvar iş gücünün yüksek seviyede olmaması, yüksek miktarda nükleik asit materyaline gerek duyulmaması, günümüz imkanları düşünülürse kısmen ucuz olması, kısa sürede güvenilir ve tekrarlanabilir verilere ulaşılması sıralanabilir. Buna karşın uzmanlık gerektirmesi, kısmen tekrarlanabilirlikte sıkıntı yaşanması ve her zaman heterozigot bireyleri ayırt edilememesi ise moleküler markır tekniklerinin genel olumsuzlukları arasında yer almaktadır. Ancak yüksek düzeyde tür içi çeşitliliğine sahip olan *F. culmorum* izolatları arasındaki genotipik farklılıkların belirlenmesi patojenle mücadele bize önemli ön bilgiler sunacağından; global ve lokal anlamda *F. culmorum* genotiplendirme çalışmalarının arttırılması önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Schilling, A.G., Möller, E.M., Geiger, H.H. 1996. Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum*. *Molecular Plant Pathology* 86(5):515-522.
2. Nicholson, P., Simpson, D.R., Weston, G., Rezanoor, H.N., Lees, A.K. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays, *Physiological And Molecular Plant Pathology* 53:17-37.
3. Miedaner, T., Schilling, A.G., Geiger, H.H. 2001. Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries,. *Journal of Phytopathology* 149:641-648.
4. Miedaner, T., Cumagun, C.J.R., Chakraborty, S. 2008. Population genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*. *Journal of Phytopathology*, 156:129-139
5. Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, G., Migheli Q. 2013. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology* 14 (4):323-341.
6. Obanor, F., Erginbas-Orakci, G., Tunalı, B., Nicol, J.M., Chakraborty, S. 2010. *Fusarium culmorum* is a single phylogenetic species based on multilocus sequence analysis. *Fungal Biology* 114:753-765.
7. Çepni, E, Tunalı, B, Gürel, F. 2013. Genetic diversity and mating types of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* originating from different agro-ecological regions in Turkey. *Journal of Basic Microbiology* 53:686-694.
8. Leeper, F.J., Andstaunton, J. 1984. The biosynthesis Of Rubrofusarin, A Polyketide naphthopyrone from *Fusarium culmorum*: 13c N.M.R. assignments and incorporation of 13c- and 2h-Labelled acetates. *Journal of the Chemical society Perkin Transactions* 12: 2919–2925.
9. Irzykowska, L., Bocianowski, J., Baturó-Cieśniewska, A. 2013. Association of mating-type with mycelium growth rate and genetic variability of *Fusarium culmorum*. *Central European Journal of Biology* 8(7):701-711.
10. Hornok, L., Waalwijk, C., Leslie, J.L. 2007. Genetic Factors affecting sexual reproduction in toxigenic *Fusarium* species. *International Journal Of Food Microbiology* 119: 54-58.
11. Özer, N., Soran, H. 1991. *Fusarium* species of Turkey, Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi, 6:259-271.
12. Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, C., Wettstein, D.V., Franken, P., Kogel, K.H. 2005. The endophytic fungus *piriformosporaindica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings Of The National Sciences* 102:13386-13391.
13. To'th, B., Mesterhazy, A., Nicholson, P., Teren, J., Varga, J. 2004. Mycotoxin production and molecular variability of european and american isolates of *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology* 110:587-599.
14. Yli-Mattila T, Hietaniemi R., Hussien Carlos-Lopez, A., Cumagun, C.Jr. 2013. Molecular quantification and genetic diversity of toxigenic *Fusarium* species in

Northern Europe as compared to those in Southern Europe. *Microorganisms* 1:162–174.

15. Parry, D.W., Jenkinson, P., McLeod, L. 1995. *Fusarium* Ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathology* 44:207-238.
16. Tunali, B., Nicol, J., Erol, F.Y., Altiparmak, G. 2006. Pathogenicity of Turkish crown and head scab isolates on stem bases on winter wheat under greenhouse conditions. *Plant Pathology Journal*. 5(2):143-149.
17. Yörük, E, Gazdağlı, A, Albayrak, G. 2014. Class B trichothecene chemotyping in *Fusarium* species by PCR assay. *Genetika* 46(3):661–669.
18. Mert-Türk, F., Gencer, G. 2013. Distribution of the 3-AcDon, 15-AcDon, And NIV chemotypes of *Fusarium culmorum* in the North-West Of Turkey. *Plant Protection Science* 49(2):57-64.
19. Tok, F.M., Arslan, M. 2016. Distribution and genetic chemotyping of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* populations in wheat fields in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Biotechnology And Biotechnological Equipment* 30(2): 254-260.
20. Saharan, M.S., Kumar, J., Nagarajan, S. 2004. *Fusarium* Head Blight (FHB) or Head Scab of Wheat- A Review. *Proceeding of the Indian National Academy of Sciences* 3:255-268.
21. Raffaele, S., Andkamoun, S. 2012. Genome evolution in Filamentous plant pathogens: Why bigger Can Be Better. *Nature Reviews Microbiology* 10:417–430.
22. Baldwin, T.K., Urban, M., Brown, N. and Hammond-Kosack, K.E. 2010. A role for topoisomerase I in *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* pathogenesis and sporulation, *Molecular Plant–Microbe Interactions* 23:566–577.
23. Goswami, R.S., Kistler, H.C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crop. *Molecular Plant Pathology* 5(6):515-525.
24. Windels, C.R. 2000. Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: changing farms and rural communities in the Northern great plains. *Phytopathology* 90(1):17-21.
25. Bai, G., Shaner, G. 2004. Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight. *Annual Review of Phytopathology* 42:135-161.
26. Saharan, M.S., Naef, A., Kumar, J., Tiwari, R. 2007. Characterization of variability among isolates of *Fusarium graminearum* associated with head scab of wheat using DNA markers. *Current Science* 92:230-235.
27. Saharan, M.S., Naef, A. 2008. Detection of genetic variation among Indian wheat head scab pathojens (*Fusarium spp./isolates*) with microsatellit markers. *Crop Protection* 27:1148-1154.
28. Walker, S.L., Leath, S., Hagler, W.M.Jr., Murphy, J.P. 2000. Variation among isolates of *Fusarium graminearum* associated with *Fusarium* head blight in North Carolina. *Plant Diseases* 85:404-410.
29. Demeke, T., Clear, R.M., Patrick, S.K., Gaba, D. 2005. Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *International Journal of Food Microbiology* 103:271-284.

30. Haratian, M., Sharifnabi, B., Alizadeh, A., Safaie, N. 2008. PCR analysis of the *tri13* gene to determine the genetic potential of *Fusarium graminearum* isolates from Iran to produce nivalenol and deoxynivalenol. *Mycopathologia* 166:109-116.
31. Bakan, B., Delville, C.G., Pinson, L., Richard-Molard, D., Fournier, E., Brygoo, Y. 2002. Identification of *Fusarium culmorum* strains producing large and small amounts of deoxynivalenol. *Applied and Environmental Microbiology* 68(11):5472-5479.
32. Tomczak, M., Wisniewska, H., Stepień, L., Kostecki, M., Chelkowski, J., Golinski, P. 2002. Deoxynivalenol, Nivalenol and moniliformin in wheat samples with head blight (scab) symptoms in Poland (1998–2000). *European Journal of Plant Pathology* 108:625-630.
33. Bateman, G.L. 2005. The contribution of ground-level inoculum of *Fusarium culmorum* to ear blight Of winterwheat. *Plant Pathology* 54:299–307.
34. Rossi, V., Ravanetti, A., Pattor, E. Andgiosuè, S. 2001. Influence of temperature and humidity on the infection of wheat spikes by some fungi causing fusarium head blight. *Journal of Phytopathology* 83:189–198.
35. Carter, J.P., Rezanoor, H.N., Holden, D., Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Nicholson, P. 2002. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology* 108:573-583.
36. Chakraborty, S., Liu, C.J., Mitter, V., Scott, J.B., Akinsanmi, O.A., Ali, S., Dill-Macky, R., Nicol, J., Backhouse, D., Simpfendorfer, S. 2006. Pathogen population structure and epidemiology are keys to wheat crown rot and Fusarium head blight management. *Australasian Plant Pathology* 35:643-655.
37. Gutleb, A.C., Morrison, E., Murk, A.J. 2002. Cytotoxicity Assay for mycotoxins produced by *Fusarium* strains. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11:309-320.
38. Niessen, L. 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology* 19:38-46.
39. Bai, G., Desjardins, A.E., Plattner, R.D. 2001. Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* 153:91-98.
40. Foroud, N.A., Eudes, F. 2009. Trichothecenes in cereal grains. *International Journal of Molecular Sciences* 10:147–173.
41. Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., Fujimura, M. 2007. Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecen pathways gene and evolution. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry* 71:2105-2123.
42. Desjardins, A.E., Proctor, R.H. 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 119:47-50.
43. Rotter, B., Prelusky, D.B., Pestka, J.J. 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Environmental Science and Health* ,48:1-34.
44. Doohan, F.M., Weston, G., Rezanoor, H.N., Parry D.W., Nicholson, P. 1999 Development and use of a reverse transcription-PCR Assay to study expression of *tri5* by *Fusarium* species *in vitro* and in planta. *Applied and Environmental Microbiology* 65(9):3850-3854.

45. McDonald, T., Brown, D., Keller, N.P., Hammond, T.M. 2005. RNA Silencing of mycotoxin production in *Aspergillus* and *Fusarium* species. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18(6):539-545.
46. Scherm, B., Orru, M., Balmas, V., Spanu, F., Azara, E., Delogu, G., Hammond, T.M., Keller, N.P., Migheli, Q. 2011. Altered trichothecene biosynthesis in tri6-silenced transformants of *Fusarium culmorum* influences the severity of crown and foot rot on durum wheat seedlings. *Molecular Plant Pathology* 12(8):759-771.
47. Chandler, E.A., Simpson, D.R., Thomsett, M.A., Nicholson, P. 2003. Development of pcr assays to *Tri7* And *Tri13* Trichothecene biosynthetic and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62:355-367.
48. Kimura, M., Tokai, T., O'donnell, K., Ward, T.J., Fujimura, M., Hamamoto, H., Shibata, T., Yamaguchi, I. 2003. The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. *FEBS Letters* 539:105-110.
49. Yörük, E., Tunali, B., Kansu, B., Ölmez, F., Uz, G., Zümrüt, I.M., Sarıkaya, A., Meyva, G. 2016. Characterization of high-level deoxynivalenol producer *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates caused head blight and crown rot diseases in Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection* 123:177–186.
50. Jennings, P., Coates, M.E., Walsh, K., Turner, J.A., Nicholson, P. 2004. Determination of deoxinivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. *Plant Pathology* 53:643-652.
51. Monds, R.D., Cromey, M.G., Denis, R., Lauren, M.M., Marshall, J. 2005. *Fusarium graminearum*, *F. cortaderiae* and *F. pseudograminearum* in New Zealand: molecular phylogenetic analysis, mycotoxin chemotypes and co-existence of species. *Mycological Research* 109 (4):410–420.
52. Lee, T., Han, Y.K., Kim, K.H., Yun, S.H., Lee, Y.-W. 2002. *Tri13* and *Tri7* Determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology* 68:2148-2154.
53. Ji, L., Cao, K., Hu, T., Wang, S.. 2007. Determination of deoxinivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium graminearum* isolates from China by pcr assay. *Journal of Phytopathology* 155:505-512.
54. Marin, P., Jurada, M., Magan, N., Vazquez, C., Jaen, M. T.G. 2010. Effect of solute stress and temperature on growth rate and *Tri5* gene expression using real time Rt-PCR in *Fusarium graminearum* from Spanish wheat. *International Journal of Food Microbiology* 140:169-174.
55. Wu, Z., Wang, X.R., Blomquist, G. 2002. Evaluation of pcr primers pcr conditions for specific detection of common airborne fungi, *The Royal Society of Chemistry* 4:377-382.
56. Paetkau, D., Slade, R., Burden, M., Estoup, A. 2004. Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology Notes* 13:55–65.
57. Sumida, M., Kato, Y., Kurabayashi, A. 2004 Sequencing and analysis of the internal transcribed spacers (itss) and coding regions in the EcoRI fragment of the

ribosomal DNA of the Japanese pond frog *Rana nigromaculata*. *Genes & Genetic Systems* 79 (2):105-118.

58. Paran, I., Michelmore, R.W., 1993, Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85(8):985-993.
59. Yörük, E., Yli-Mattila, T. 2015. 4. Sequence characterized amplified region marker usage in identification of phytopathogenic *Fusarium* species. *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, 21-24 Ağustos, Afyon, Türkiye, s 106.
60. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 18 (22):6531-6535.
61. Nijs de M., Larsen J.S., Gams W., Rombouts F.M., Wernars K., Thrane U., Notermans, S.H.W. 1997. Variation in random amplified polymorphic DNA patterns and secondary metabolic profiles within *Fusarium* species from cereals from various parts of the Netherlands. *Food Microbiology* 14:449-457.
62. Yörük, E. ve Albayrak, G. 2013. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by using random-amplified polymorphic DNA. *Genetics and Molecular Research* 12 (2):1360-72.
63. Bornet B. and Branchard, M. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) Markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:209-215.
64. Mishra, P.K., Fox, R.T.V., Culham, A. 2003. Inter simple sequence repeat and aggressiveness analysis revealed high genetic diversity, recombination and long-range dispersal in *Fusarium culmorum*. *Annals of Applied Biology* 143:291-301.
65. Baysal, Ö., Siragusa, M., Gümrükcü, E., Zengin, S., Carimi, F., Sajeva, M., Teixeira da S.J.A. 2010. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* *F. melongenae* by ISSR and RAPD markers on eggplant. *Biochemical Genetics* 48:524-537.
66. Dinolfo, M.I., Stenglein, S.A., Moreno, M.V., Nicholson, P., Jennings, P., Salerno, G.L. 2010. ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. *European Journal of Plant Pathology* 127:483-491.
67. Albayrak, G., Yörük, E., Gazdagli, A., Sharifnabi, B. 2016. Genetic diversity among *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates based on ISSR markers. *Archives of Biological Sciences* 68(2): 333-343.
68. Giraud, T., Fournier, E., Vautrin, D., Solignac, M., Vercken, E., Bakan, B., Brygoo, Y. 2002. Isolation of eight polymorphic microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum*. *Molecular Ecology Notes* 2:121-123.
69. Naef, A., Senatore M., D'Efago G.A. (2006). Microsatellite based method for quantification of fungi in decomposing plant material elucidates the role of *Fusarium graminearum* on production in the saprophytic competition with *Trichoderma atroviride* in maize tissue microcosms. *Fems Microbiology Letters* 655: 211-220.

70. Yörük, E., Gazdağlı, A., Albayrak, G. 2012. Geliştirilen yeni genik mikrosatellit markırlarının *Fusarium graminearum* ve *Fusarium culmorum* izolatlarında analizi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül, İzmir, S 314-315.
71. Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics* 32:314–331.
72. Beckmann, J.S. ve Soller, M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theoretical and Applied Genetics*, 67:35-43.
73. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98:503-517.
74. Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala S., Parikka, P., Konstantinova P., Gagkaeva T.Y. 2004. Molecular and morphological diversity Of *Fusarium* species in Finland and northwestern Russia. *European Journal of Plant Pathology* 110: 573–585.
75. Llorens, A., Hinojo, M.J., Mateo, R., Medina, A., Valle-Algarre, F.M., Gonzalez-Jaen, M.T., Jimenez, M. 2006. Variability and characterization of mycotoxin producing *Fusarium spp.* isolates by pcr-rflp analysis of the IGS-rDNA region. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89:465-478
76. Konieczny, A. and Ausubel, F.M. 1993. A Procedure for mapping *Arabidopsis* is mutations using co-dominant ecotype-specific pcr-based markers. *The Plant Journal* 4:403-410.
77. Michaels, S.D., Amasino, R.M. 1998. A Robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by pcr. *The Plant Journal* 14:381–385.
78. Ching, A.D.A., Caldwell, K.S., Jung, M., Dolan, M., Smith, O.S., Tingey, S., Morgante, M., Rafalski, A.J. 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genetics* 3:19.
79. Beuzen, N.D., Stear, M.J. and Chang, K.C. 2000. Molecular markers and their use in animal breeding. *Veterinary Journal*, 160; 42-52.
80. Starkey, D.E., Ward, T.J., Aoki, T., Gale, L.R., Kistler, H.C., Geiser, D.M., Suga, H., Tóth, B., Varga, J., O'Donnell, K. (2007). Global molecular surveillance reveals novel fusarium head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genetics and Biology* 44:1191–1204.
81. Yli-Mattila, T., Gagkaeva, T., Ward, T.J., Aoki, T., Kistler, H.C., O'Donnell K. (2009). A Novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia* 101: 841–852.
82. Sarver, B.A.J., Ward, T.J., Gale, L.R., Broz, K., Kistler, H.C., Aoki, T., Nicholson, P., Carter, J., O'Donnell K. (2011). Novel fusarium head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal Genetics Biology* 48:1096–1107.
83. Gagkaeva, T. and Mattila, T.Y. 2004. Genetic diversity of *Fusarium graminearum* in Europa and Asia. *European Journal of Plant Pathology* 110:551-562.

84. Gargouri, S., Bernier, L., Hajlaoui, M.R., Marrakchi, M. 2003. Genetic variability and population structure of the wheat foot rot fungus, *Fusarium culmorum*, in Tunisia. *European Journal of Plant Pathology* 109:807-815.
85. Izrkowski, L., Batur, A. 2008. Genetic polymorphism of *Fusarium culmorum* isolates originating from roots and stem bases of barley. *Journal of Plant Protection Research* 48(3):303-312.
86. Arici, Ş.E., Koç, N.K. 2010. RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* from wheat in Adana region. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 1-5.
87. Miedaner, T., Caixeta, F., Talas, F. 2013. Head-blighting populations of *Fusarium culmorum* from Germany, Russia and Syria analyzed by microsatellite markers show a recombining structure. *European Journal of Plant Pathology* 137:743-752.
88. Pouzeshimiab, B., Razavi, M., Zamanizadeh, H.R., Zare, R., Rezaee, S. 2014. Assessment of genotyping diversity among *Fusarium culmorum* populations on wheat in Iran. *Phytopathologia Mediterranea* 53(2):300-310.
89. Rebib, H., Bouraoui, H., Rouassi, M., Brygoo, Y., Boudabbous, A., Hajlaoui, M.R., Zouaoui, N.S. 2014. Genetic diversity assessed by SSR markers and genotyping of *Fusarium culmorum* causal agent of foot and root rot of wheat collected from two different fields in Tunisia. *European Journal of Plant Pathology* 139:481-495.
90. Volgelsang, S., Widmer, F., Jenny, E., Enkerli, J. 2009. Characterization of novel *Fusarium graminearum* microsatellite markers in different *Fusarium* species from various countries. *European Journal of Plant Pathology* 123:477-482.
91. Mishra, P.K., Fox, R.T.V., Culham A. 2002. Restriction analysis of PCR amplified nrDNA regions revealed intraspecific variation within populations of *Fusarium culmorum*. *FEMS Microbiology Letters* 215:291-296.
92. Nitschke, E., Nihlgard, M. and Varrelmann, M. 2009. Differentiation of eleven *Fusarium spp.* isolated from sugar beet, using restriction fragment analysis of a polymerase chain reaction– amplified translation Elongation Factor 1 α Gene fragment. *Mycology* 99(8):921-929.
93. Bayraktar, H. and Dolar, F.S. 2010. Molecular identification and genetic diversity of *Fusarium* species associated with onion fields in Turkey. *Journal of Phytopathology* 159:28-34.
94. Kim, D.W., Kim, G.Y., Kim, J., Jeon, S.J., Lee C.W., Lee H.B., Yun S.H. 2016. Characterization of nivalenol-producing *Fusarium culmorum* isolates obtained from the air at a rice paddy field in Korea. *The Plant Pathology Journal* 32(3):182-186
95. Kristen, R., Torp, M., Kosiak, B., Holst-Jensen, A. 2008. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycological Research* 109(2): 173-186.
96. Balmasa, V., Scherma, B., Marcelloa, A., Beyerb, M., Hoffmannb, L., Mighelia, Q. and Pasqualib, M. 2015. *Fusarium* species and chemotypes associated with fusarium head blight and fusarium root rot on wheat in Sardinia. *Plant Pathology* 64:972-979.

97. Schwieger M., F. and Christoph, C.T. 1998. A New approach to utilize pcr–single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 64(12): 4870-4876
98. Li, G., Quiros, C.F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics* 103:455–461.
99. Irzykowska, L., Weber, Z., Bocianowski, J. 2012. Comparision of *Claviceps purpurea* populations originated from experimental plots or fiedls of rye. *Central European Journal of Biology* 7:839-849