

## SOĞAN ÜRETİMİ İLE İLİŞKİLİ FARKLI FUSARIUM TÜRLERİNİN PCR-RFLP ANALİZİ

Harun BAYRAKTAR<sup>1\*</sup> Kübra TEKİN<sup>1</sup> Göksel ÖZER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Ankara

<sup>2</sup>Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bolu

\*email: bayrakta@agri.ankara.edu.tr

Geliş Tarihi: 20.06.2014

Kabul Tarihi: 28.10.2014

**ÖZET:** Bu çalışma kapsamında ülkemizde soğan üretimi ile ilişkili farklı Fusarium türleri arasındaki genetik akrabalık PCR-RFLP yöntemi ile araştırılmıştır. *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. redolens* ve *F. culmorum* u temsil eden 42 fungus izolatının ribozomal DNA ITS bölgesi ITS1/4 primerleri ile çoğaltıldıktan sonra *Hinf*I, *Alu*I, *Msp*I, *Eco*RI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. PCR analizi sonucunda tüm izolatlardan 550-570 bp büyüklüğünde tek bir DNA fragmenti çoğaltılmıştır. Enzim kesimleri ise Fusarium türlerinin birbirinden ayrılmasını sağlayan 17 farklı enzim profili oluşturmuştur. ITS bölgesinin RFLP analizi ile oluşturulan dendogramda tüm Fusarium türleri farklı gruplar içerisinde yer almıştır. Fusarium türleri arasındaki benzerlik oranının ise 0.70-0.13 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar enzim profillerinin soğan üretim alanlarında ekonomik olarak önemli kayıplara yol açan Fusarium türlerinin ayrılmasında oldukça faydalı olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Soğan, *Fusarium* spp., ITS, PCR-RFLP

### PCR-RFLP ANALYSIS OF DIFFERENT FUSARIUM SPECIES ASSOCIATED WITH ONION PRODUCTION

**ABSTRACT:** The study analyzed genetic relationships among different Fusarium species associated with onion production of Turkey using PCR-RFLP technique. ITS region of ribosomal DNA of 42 fungal isolates, representing *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. redolens*, and *F. culmorum* was amplified with primer pairs ITS1/4 and digested with *Hinf*I, *Alu*I, *Msp*I, *Eco*RI enzymes. PCR amplification yielded a single DNA fragment ranging in size from 550-570 bp from all isolates. Restriction digests revealed 17 restriction patterns, providing the differentiation of Fusarium species from each other. All Fusarium species clustered into different groups in the dendogram derived from the data of PCR-RFLP. Similarity index ranged from 0.70 to 0.13 among Fusarium species. The results revealed that restriction patterns were very useful in the discrimination of Fusarium species, causing economically significant losses in onion production areas.

**Keywords:** Onion, *Fusarium* spp., ITS, PCR-RFLP

### 1. GİRİŞ

Ülkemizde başta İç Anadolu, Akdeniz'in Doğusu, Orta Karadeniz ve Marmara Bölgeleri olmak üzere farklı bölgelerdeki illerde yoğun olarak soğan (*Allium cepa* L.) tarımı yapılmaktadır. Soğan gerek üretim gerekse ihracat açısından ülke ekonomisinde önemli bir yer tutmasına rağmen üretim ve verimde önemli kayıplar yaşanmaktadır. Soğan üretimini sınırlayan nedenler arasında kök çürüklüğü etmenleri, oldukça önemli problemlere sebep olmaktadır (Hartman ve Datnoff, 1997). Ülkemizdeki soğan ekim alanlarının ise *Fusarium oxysporum* başta olmak üzere *F. solani*, *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. redolens* ve *F. culmorum* ile bulaşık olduğu bilinmektedir (Özer ve Ömeroğlu, 1995; Kordalı ve Demirci, 1998; Bayraktar ve Dolar, 2011).

Fusarium dünyanın her tarafında bulunan ve birçok önemli bitki patojenini kapsayan heterojen bir cinstir. Fusarium taksonomisi ise oldukça karmaşık olup sürekli olarak değişmektedir. Bu sebeple Fusarium türlerinin gelişme koşullarındaki değişimlere tepkisi sonucu oluşan morfolojik

varyasyonu yansıtan birçok farklı sınıflandırma sistemi önerilmiştir (Booth, 1977; Nelson ve ark., 1983; Leslie ve Summerell, 2006). Özellikle yakın olarak ilişkili olan *F. oxysporum* ve *F. redolens* gibi bazı Fusarium türlerinin morfolojik karakter kullanılarak ayırımında problemlerle karşılaşmaktadır (Baayen ve ark., 2000). Klasik yöntemlerle yapılan teşhislerin hem zaman alıcı hem de bazı funguslarda güvenilir sonuçlar vermemesi nedeniyle morfolojik karakterler kullanılmadan patojenlerin tespit ve ayırımını sağlayan basit, hızlı ve güvenilir metotlar için sürekli bir talep olmuştur. Bu güne kadar fungusların ayırımı ve tespiti için pek çok moleküler teknik kullanılmıştır. Bu çalışmaların çoğunda fungusların taksonomik ayırımı için ribozomal DNA üzerindeki genetik farklılıklardan yararlanılmıştır. Bitki patojeni Fusarium türlerinin tespitinde de ribozomal DNA üzerindeki ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesinin sekans varyasyonunun oldukça faydalı olduğu görülmüş ve bu bölgedeki polimorfizimlerden yararlanarak pek çok Fusarium türü birbirinden ayrılabilmiştir (Edel ve ark., 1996; Baayen ve ark., 2000; Latiffah ve ark., 2009; Chehri

ve ark., 2011). Bu çalışma da soğan ekimi yapılan alanlarda önemli ekonomik kayıplara neden olan *Fusarium* türlerini ayrılmasında, ribozomal DNA bölgesinin PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism) tekniği ile filogenetik analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

Çalışmalarda materyal olarak 2007 yılı Haziran-Temmuz aylarında Bursa, Ankara, Eskişehir, Yozgat, Çorum, Tokat ve Amasya illerindeki farklı soğan ekim alanlarından elde edilen ve *Fusarium oxysporum* (10 adet), *F. solani* (7 adet), *F. acuminatum* (5 adet), *F. equiseti* (6 adet), *F. proliferatum* (7 adet), *F. redolens* (5 adet), ve *F. culmorum*' u (2 adet) temsil eden fungus izolatları kullanılmıştır (Bayraktar ve Dolar, 2011). Kullanılan tüm izolatların teşhisi morfolojik olarak ve türe özgü PCR primerleri kullanılarak tespit edilmiştir (Nelson ve ark., 1983; Leslie ve Summerell, 2006; Bayraktar ve Dolar, 2011). Tüm izolatlar patates dekstroz agar (PDA) ortamı üzerinde  $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 10 gün süreyle geliştirilmiştir.

### 2.2. Yöntem

#### 2.2.1. Fungus izolatlarından DNA izolasyonu

DNA izolasyonu Reader ve Broda (1985) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla fungus izolatları Potato Dextrose Broth (PDB) ortamı içeren erlenmayerlerde inkübatörlü orbital shaker (170 rpm) üzerinde ( $23\pm 1^\circ\text{C}$ ) 7 gün süreyle geliştirilmiştir. PDB ortamında geliştirilen funguslar tülbent kullanılarak süzölmüş ve sıvı azot içeren porselen havanlarda iyice ezilmiştir. Sonra her tüpe 500 µl ekstraksiyon solüsyonu (200 mM Tris-HCl pH:8.5, 25 mM NaCl, 25 mM EDTA, % 0.5 SDS) konularak iyice süspanse oluncaya kadar karıştırılmıştır. Daha sonra elde edilen ekstrakt nükleik asitleri parçalamak amacıyla  $65^\circ\text{C}$ ' de 30 dk. inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon periyodundan sonra eppendorf tüplere eşit hacim fenol:kloroform (25:24 v/v) eklenerek 12.000 rpm' de 10 dk. santrifüj yapılmıştır. Üste toplanan sıvının 400 µl' si yeni eppendorf tüplere aktararak üzerine RNase A ilave edilerek inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra eppendorf tüplere 250 µl kloroform: isoamilalkol (24:1 v/v) ilave edilerek tekrar 15 dk. santrifüj edilmiştir. Üste toplanan sıvı yeniden temiz eppendorf tüplere alınarak üzerine eşit hacim isopropanol eklenmiş ve 1 saat  $-20^\circ\text{C}$ 'de inkübasyondan sonra 5 dk. santrifüj uygulanarak tüpün dip kısmında toplanmıştır. Daha sonra elde edilen DNA pelleti % 80'lik ethanol ile yıkanarak kurutulmuş ve 25-50 µl steril bi-destile su ile süspanse edilerek  $-20^\circ\text{C}$ ' de saklanmıştır.

#### 2.2.2. *Fusarium* türlerinin ITS bölgesinin (ITS1, 5.8S rDNA geni, ITS2) çoğaltılması ve enzim kesimi

*Fusarium* türlerinin ribozomal DNA üzerindeki ITS bölgesinin amplifikasyonu için White ve ark.

(1990) tarafından belirlenen ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') ve ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') primerleri kullanılmıştır. Farklı *Fusarium* türlerine ait genomik DNA bu spesifik primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonları 200 µM dNTPs, 0.4 µM primer, 10X reaksiyon buffer, 1.5 U Taq DNA polimeraz, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  ve 30-50 ng fungal DNA içeren 50 µl'lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir. DNA amplifikasyonları ise  $94^\circ\text{C}$  2 dk. başlangıç denatürasyonu,  $94^\circ\text{C}$  1 dk.,  $57^\circ\text{C}$  30 sn.,  $72^\circ\text{C}$  30 sn. 35 döngü ve  $72^\circ\text{C}$  10 dk. olacak şekilde programlanan PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen PCR ürünleri kontrol amacıyla, %1' lik agaroz jelde elektroforetik olarak ayrılmıştır (Sambrook ve ark., 1989).

Enzim kesimi ise *HinfI*, *AluI*, *MspI* ve *EcoRI* restriksiyon enzimleri kullanılarak üretici firmanın protokolüne (MBI, Fermentas) göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yaklaşık olarak 10 µl PCR ürünü 5 U enzim ile inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra restriksiyon fragmentleri %2' lik agaroz jelde elektroforetik olarak ayrılmıştır. Elde edilen bant büyüklükleri kullanılan marköre dayanılarak Gene Tools bio-imaging sistemi (SynGene, Cambridge, England) kullanılarak belirlenmiştir.

#### 2.2.3. *Fusarium* türlerinin arasındaki genetik akrabalığın belirlenmesi

Her bir izolatın farklı restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu oluşan ve farklı moleküler ağırlığa sahip olan bantlar var (1) veya yok (0) şeklinde değerlendirilmiştir. Daha sonra elde edilen restriksiyon profilleri NTSYS ver. 2.02 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis) software programına aktarılmış (Rohlf, 1998) ve belirli moleküler ağırlığa sahip bantlar rectangular matrisi kullanılarak Jaccard yöntemine göre benzerlik matrisi oluşturulmuştur UPGMA (Unweighed Pairgroup Method with Arithmetic Average) yardımıyla dendrogram oluşturularak izolatlar arasındaki genetik akrabalık değerlendirilmiştir.

## 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

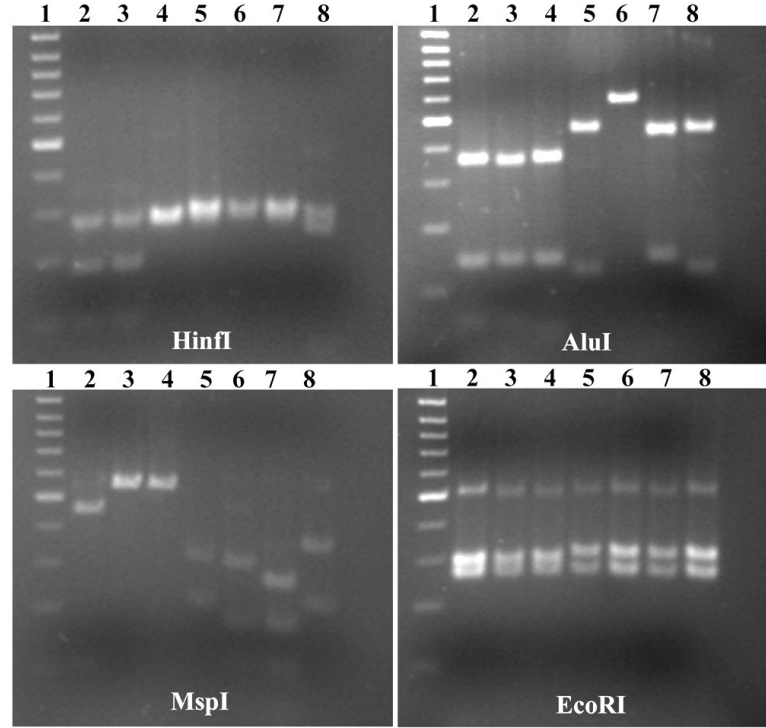
Soğan üretiminde sorun olan hastalık etmenleri içerisinde *Fusarium* türleri oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Bu kapsamda ülkemizde yapılan çalışmalarda soğan üretim alanlarının farklı *Fusarium* türleri ile yaygın olarak bulaşık olduğu tespit edilmiştir (Kordalı ve Demirci, 1998; Türkkan ve Karaca, 2006; Bayraktar ve Dolar, 2011). Bu çalışma kapsamında ise soğan üretimi ile ilişkili olan farklı *Fusarium* türlerinin ribozomal-DNA ITS bölgesindeki genetik farklılıklar PCR-RFLP yöntemi ile incelenmiştir.

Soğandan elde edilen *Fusarium* türlerinin ITS1/4 primerleri kullanılarak yapılan PCR analizi sonucunda tüm izolatlardan yaklaşık 550-570 bp büyüklüğünde tek bir bant çoğaltılmıştır. PCR amplifikasyonları sonucunda *F. oxysporum* ve *F. equiseti* izolatlarından

## Soğan üretimi ile ilişkili farklı *Fusarium* türlerinin PCR-RFLP analizi

550 bp büyüklüğünde; *F. redolens* ve *F. culmorum* izolatlarından 560 bp büyüklüğünde; *F. solani*, *F. acuminatum* ve *F. proliferatum* izolatlarından ise 570 bp büyüklüğünde spesifik PCR bantları elde edilmiştir. Benzer şekilde ITS bölgesinde büyüklük farklılıkları değişik konukçularda bulunan *Fusarium* türlerinde de tespit edilmiştir (Young-Mi ve ark., 2000; Chehri ve ark., 2011).

PCR ürünlerinin *Hinf*I, *Alu*I, *Msp*I, *Eco*RI restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucunda ise test edilen farklı *Fusarium* türlerinin tür içerisinde benzer enzim profilleri gösterdiği buna karşın kullanılan enzimlere bağlı olarak türler arasında yüksek derecede bir polimorfizm olduğu gözlenmiştir (Şekil 1). Enzim kesimi sonucunda elde edilen bant profilleri ve büyüklükleri Çizelge 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Farklı *Fusarium* türlerinin ITS1-5.8S rDNA-ITS2 bölgesinin PCR-RFLP profilleri. (1: 100 bp DNA Markör, 2: *F. oxysporum*, 3: *F. equiseti*, 4: *F. culmorum*, 5: *F. acuminatum*, 6: *F. redolens*, 7: *F. proliferatum*, 8: *F. solani*).

Çizelge 1. Farklı *Fusarium* türlerinin, ITS1-5.8S rDNA-ITS2 bölgesinin *Hinf*I, *Alu*I, *Msp*I, *Eco*RI enzimleri ile kesimi sonucunda elde edilen bant profili

Fungus türleri	ITS bölgesi (bp)	<i>Hinf</i> I	<i>Msp</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Eco</i> RI	ITS tipi
<i>F. oxysporum</i>	550	280.180.90	450.100	370.130	300.250	1
<i>F. solani</i>	570	280.250	360.210	460.110	320.250	2
<i>F. acuminatum</i>	570	290.280	320.220	460.110	320.250	3
<i>F. equiseti</i>	550	280.180.90	550	370.130	300.250	4
<i>F. proliferatum</i>	570	290.280	250.180.100	440.130	320.250	5
<i>F. redolens</i>	560	290.280	290.170.100	560	320.250	6
<i>F. culmorum</i>	560	290.280	560	380.130	300.250	7

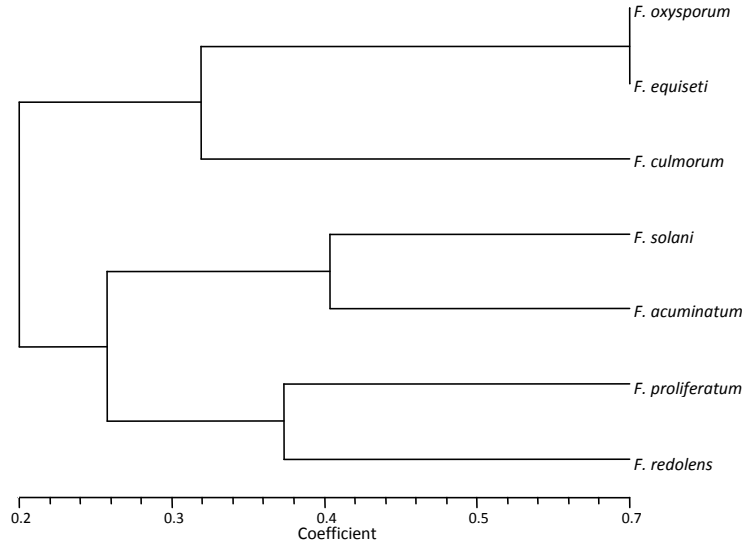
Yapılan değerlendirmeler sonucunda test edilen *Fusarium* türleri arasında 17 farklı enzim profili tespit edilmiştir. *Hinf*I enzimi ile kesim sonucunda *Fusarium* türleri arasında 3 farklı bant profilinin ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Bu enzim ile kesim sonucunda *F. oxysporum* ve *F. equiseti* izolatları farklı büyüklükte (280, 180, 90 bp) 3 bant oluştururken *F. acuminatum*, *F. proliferatum*, *F. culmorum* ve *F. redolens* izolatları 290, 280 bp büyüklüğünde iki bant

oluşturmuştur. *Msp*I enzimi ise izolatlar arasında 5 farklı kesim bölgesine sahiptir. Ayrıca bu enzimin *F. culmorum* ve *F. equiseti* izolatlarında kesim bölgesine sahip olmadığı buna karşın diğer *Fusarium* türleri arasında farklı enzim profilleri ortaya çıkardığı görülmüştür. Benzer şekilde *Alu*I enzimi de *F. redolens* izolatlarında kesim bölgesine sahip olmamakla birlikte diğer izolatlar arasında 4 farklı enzim profili ortaya çıkarmıştır. Ayrıca bu enzim

kesimi ile *F. oxysporum* ile *F. equiseti* izolatlarının (370, 130 bp); *F. solani* ile *F. acuminatum* izolatlarının (460, 110 bp) benzer enzim profilleri gösterdiği tespit edilmiştir. *EcoRI* ise izolatlar arasında iki farklı bant profili ortaya çıkarmıştır. Buna göre *F. oxysporum*, *F. equiseti* ve *F. culmorum* izolatları 300, 250 bp büyüklüğünde enzim profilleri gösterir iken *F. solani*, *F. acuminatum* *F. proliferatum* ve *F. redolens* izolatları 320, 250 bp büyüklüğünde enzim profilleri göstermiştir. *Fusarium* türleri arasında 17 farklı enzim profilinin tespit edildiği bu çalışma sonuçlarına benzer şekilde 18 *Fusarium* türüne ait 97 izolatının ITS bölgesini PCR-RFLP analizi ile inceleyen Edel ve ark. (1996) bu izolatlar arasında 23 farklı enzim profili tespit etmiştir. Enzim kesimi ile tüm *Fusarium* türlerini farklı gruplar içerisinde sınıflandıran bu araştırmacılar PCR-RFLP metodunun tür seviyesinde *Fusarium* izolatlarının ayırımı için oldukça basit ve hızlı bir metot olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada da tüm izolatlar PCR-RFLP yöntemi ile farklı gruplar içerisinde sınıflandırılmış olup bu yöntemin soğan ile ilişkili *Fusarium* türlerinin ayırımında oldukça faydalı olduğu görülmüştür. Baayen ve ark. (2000) kuşkonmaz (*Asparagus* sp.) bitkisinde hastalığa sebep olan ve birbiriyle yakın olarak ilişkili *Fusarium* türlerinin ayırımında PCR-RFLP metodunun oldukça faydalı

olduğunu belirtmiştir. *HinI*, *AluI*, *MunI* ve *RsaI* enzimleri ile kesim sonucunda *F. oxysporum*, *F. redolens* ve *F. proliferatum* izolatları birbirinden ayrılabilmiştir. *HinI* enzimi *F. oxysporum* (265, 180, 90 bp) izolatlarının *F. redolens* ve *F. proliferatum* (290, 265 bp) izolatlarından ayrılmasını sağlar iken; *AluI* enzimi *F. oxysporum* (350, 135, 60 bp), *F. redolens* (560 bp) ve *F. proliferatum* (420, 140 bp)' un birbirinden ayrılmasını sağlamıştır. Bu çalışmada da kullanılan *HinI* ve *AluI* enzimleri benzer bant profilleri oluşturarak birbiriyle morfolojik olarak yakın ilişkili olan bu izolatların kolaylıkla birbirinden ayrılabilmesini sağlamıştır. *Fusarium* cinsinin farklı tür ve formae specieslerine ait 12 izolatı arasındaki genetik farklılıkları inceleyen Young-Mi ve ark. (2000) ise ITS bölgesinin 7 restriksiyon enzimi ile kesimi sonucunda elde edilen 5 farklı enzim profilinin bu izolatların tür seviyesinde, bazı izolatların ise formae speciales seviyesinde ayırımı sağladığı bildirmiştir.

Her bir izolatın farklı restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu oluşan ve farklı moleküler ağırlığa sahip olan bantların Jaccard yöntemine göre değerlendirilmesiyle oluşan dendogramda ise tüm izolatlar birbirinden ayrı olarak gruplanmışlardır (Şekil 2).



Şekil 2. Farklı *Fusarium* türlerine ait enzim profillerinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendogram

İzolatlar arasındaki benzerlik oranının 0.70 (*F. oxysporum*-*F. equiseti*)-0.13 (*F. oxysporum*-*F. solani*, *F. acuminatum*) arasında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 2). Ayrıca morfolojik olarak birbirine oldukça benzerlik gösteren *F. oxysporum*' un *F. proliferatum* ve *F. redolens* izolatlarından oldukça farklı olduğu ve bu izolatlar arasındaki benzerlik oranlarının 0.28 (*F. oxysporum*-*F. proliferatum*) ile 0.21 (*F. oxysporum*-*F. redolens*) arasında değiştiği elde edilen dendogramda tespit edilmiştir. *Dendrobium* orkidesinde kök ve gövde çürüklüğüne sebep olan *F. oxysporum*, *F. solani* ve *F. proliferatum* izolatlarını *EcoRI*, *Eco881*, *BsuI* ve *MspI* enzimleri

kesen Latiffah ve ark. (2009) *F. oxysporum* ve *F. solani* izolatlarını iki alt grup, *F. proliferatum* izolatlarını ise ayrı bir grup olarak sınıflandırmıştır. Bu izolatlar arasında ait ana gruplar arasındaki benzerlik oranı ise 0.45 olarak tespit edilmiştir. Kabakgillerde sorun olan *Fusarium* türlerini inceleyen Chehri ve ark. (2011) ise hastalıklı bitkilerden izole ettikleri *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. equiseti*, *F. semitectum* ve *F. solani* izolatlarının 7 restriksiyon enzimi ile kesimi sonucunda oluşturulan dendogramda tüm izolatların ayrı gruplar içerisinde yer aldıklarını tespit etmiştir. Bu araştırmacıların sonuçlarına benzer şekilde, bu çalışmada ülkemizde soğan üretimi ile ilişkili

Çizelge 2. Jaccard yöntemine göre izolatlar arasında belirlenen benzerlik matrisi oranları

Fungus türleri	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. acuminatum</i>	<i>F. equiseti</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. redolens</i>
<i>F. solani</i>	0.13	-	-	-	-	-
<i>F. acuminatum</i>	0.13	0.45	-	-	-	-
<i>F. equiseti</i>	0.70	0.14	0.14	-	-	-
<i>F. proliferatum</i>	0.28	0.21	0.30	0.21	-	-
<i>F. redolens</i>	0.21	0.23	0.33	0.14	0.41	-
<i>F. culmorum</i>	0.33	0.15	0.25	0.363	0.33	0.25

olduğu bilinen farklı *Fusarium* türlerinin genetik olarak birbirinden oldukça farklı olduğu ve dendogramda ayrı gruplar içerisinde yer aldıkları gözlemlenmiştir.

#### 4. SONUÇ

*Fusarium* cinsi çok sayıda konukçuyu hastalandıran heterojen bir grup olup sınıflandırılmasında kolaylıkla ayırt edilemeyen pek çok morfolojik kriter kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan taksonomik çalışmalarda ise morfolojik kriterler ile ayrılamayan ve genetik olarak farklı olan pek çok yeni tür ortaya çıkmıştır. Bu sebeple morfolojik kriterlerden bağımsız olarak ülkemizdeki soğan ekim alanlarında bulunduğu tespit edilen *Fusarium* türlerinin ayırımı için basit ve hızlı bir metodun geliştirilmesi bu çalışma kapsamında amaçlanmıştır.

Bu çalışmada soğan ekim alanlarından *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. redolens* ve *F. culmorum*' u temsil eden fungus izolatları 4 farklı restriksiyon enzimi kullanılarak PCR-RFLP yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar *Fusarium* türleri içerisinde oldukça homojen bir yapının olduğunu buna karşın türler arasında yüksek derecede genetik farklılıkların olduğunu göstermiştir. Enzim kesimi sonucunda elde edilen restriksiyon profilleri ise ülkemiz soğan ekim alanlarında bulunan bu *Fusarium* türlerine ait izolatların birbirinden kolaylıkla ayrılabilirliğini göstermiştir. Özellikle morfolojik karakterler bakımından birbirine oldukça benzerlik gösteren *F. oxysporum*, *F. proliferatum* ve *F. redolens* izolatları gerek enzim profili gerekse de oluşturulan dendogramda birbirinden kolaylıkla ayrılabilmiştir.

#### 5. KAYNAKLAR

Baayen, R.P., van den Boogert, P.H.J.F., Bonants, P.J.M., Poll, J.T.K., Blok, W.J., Waalwijk, C. 2000. *Fusarium redolens* f. sp. *asparagi*, causal agent of asparagus root rot, crown rot and spear rot. Eur. J. Plant Pathol., 106: 907-912.

Bayraktar, H., Dolar, F.S. 2011. Molecular identification and genetic diversity of *Fusarium* species associated with onion fields in Turkey. J. Phytopathol., 159: 28-34.

Booth, C. 1977. *Fusarium* a laboratory guide to the identification of the major species. C.M.I. Kew surrey,

p.58. England.

Chehri, K., Salleh, B., Yli-Mattila, T., Reddy, K.R.N., Abbasi, S. 2011. Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. Saudi J Biol Sci., doi: 10.1016/j.sjbs.2011.01.007.

Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N., Alabouvette, C. 1996. Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplifies ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. Mycol. Res. 101 (2): 179-187.

Hartman, G.L., Datnoff, L.E. 1997. Vegetable Crops. In: Soilborne Diseases of Tropical Crops. Eds, R.S. Hollocks and J.M. Waller, CAB International, Wallingford, Oxon, p. 151-170.

Kordalı, Ş., Demirci, E., 1998. *Fusarium* species from various vegetables in Erzincan. J. Turk. Phytopath., 27(2-3): 131-136.

Latiffah, Z., Nur Hayati, M.Z., Baharuddin, S., Maziah, Z. 2009. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with root rot and stem rot of dendrobium. Asian J. Plant Pathol., 3(1): 14-21.

Leslie, J.F., Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell, Ames, p.388.

Nelson, P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O. 1983. *Fusarium* Species. An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, pp. 193.

Özer, N., Ömeroğlu, M. 1995. Chemical control and determination of fungal causal agents of wilt disease of onion in Tekirdağ province. J. Turk. Phytopath., 24(2): 47-55.

Reader, U., Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett. Appl. Microbiol., 1: 17-20.

Rohlf, F.I. 1998. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0. Applied Biostatistics, New York, USA.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory manual, 2nd edn. (pp 1659). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Türkkan, M., Karaca, G. 2006. Determination of fungal root rot disease agents associated with onion fields in Amasya province. Tar. Bil. Der., 12(4): 357-363.

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego, CA, USA: Academic Press, pp. 315-22.

Young-Mi, L., Choi, Y.K., Min, B.R. 2000. PCR-RFLP and Sequence Analysis of the rDNA ITS Region in the *Fusarium* spp. J. Microbiol., 38(2): 66-73.