



Molecular Identification and Phylogeny of Some *Hypocreales* Members Isolated from Agricultural Soils

Rasime DEMİREL

Department of Biology, Faculty of Science,
Anadolu University, TR26470 Eskişehir, Turkey

Abstract: *Hypocreanlean* fungi are include important plant pathogens around the world. Head blight and crown rot disease of cereals caused by these species are responsible for large economic losses due to reduction in seed quality and contamination of grain with their mycotoxins. Although morphological and biochemical tests are still fundamental there is an increasing more towards molecular diagnostics of these fungi. This paper reviews to PCR identification of *Hypocreanlean* fungi isolated from agricultural soil from Eskişehir City. Five *Hypocreanlean* fungi belong to 4 different genera as *Bionectria*, *Fusarium*, *Gibberella* and *Nectria* were isolated from 56 soil samples. DNA of these strains were isolated by glass beads and vortexing extraction method and used for PCR amplification with universal fungal specific primers. The internal transcribed spacer (ITS) regions of fungal ribosomal DNA (rDNA) were sequenced by CEQ 8000 Genetic Analysis System. The ITS-5.8S sequences obtained in this study were compared with those deposited in the GenBank Database. Phylogenetic position of investigated closely related *Hypocreanlean* fungi was determined.

Key words: *Hypocreanlean*; PCR; ITS; Phylogeny; Eskişehir

Tarımsal Topraklardan İzole Edilen Bazı *Hypocreales* Üyelerinin Moleküler Teşhisi ve Filogenisi

Öz: *Hypocreanlean* mantarları Dünya'daki önemli bitki patojenleridir. Bu türlerin sebep olduğu baş tahribat ve tahıl hasar hastalığı, tohum kalitesinde azalma ve tahılın mikotoksinler ile bulaşması nedeniyle büyük ekonomik kayıplardan sorumludur. Morfolojik ve biyokimyasal testler hala temel olsa da, bu mantarların moleküler teşhisine yönelim giderek artmaktadır. Bu makale, Eskişehir'deki tarım topraklarından izole edilmiş olan *Hypocreanlean* mantarlarının PCR ile identifikasyonunu incelemektedir. *Bionectria*, *Fusarium*, *Gibberella* ve *Nectria* olmak üzere 4 farklı cinsine ait 5 *Hypocreanlean* mantarı 56 farklı toprak numunesinden izole edilmiştir. Bu suşların DNA'sı, cam boncuklar ve vorteks ekstraksiyon yöntemi ile izole edilmiş ve üniversal fungal spesifik primerler ile PCR amplifikasyonu için kullanılmıştır. Fungal ribozomal DNA'nın (rDNA) iç transkripsiyonlu ayırıcı (ITS) bölgeleri, CEQ 8000 Genetik Analiz Sistemi ile dizilenmiştir. Bu çalışmada elde edilen ITS-5.8S dizileri, GenBank veri tabanında depolanan dizilerle karşılaştırılmıştır. İncelenen birbirine yakın akraba *Hypocreanlean* mantarlarının filogenetik konumu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Hypocreanlean*; PCR; ITS; Filogeni; Eskişehir

Introduction

The best-known *Hypocreanlean* fungi are a broad order that are include members of *Fusarium* and *Acremonium* genera. They are anamorphs of teleomorph genera, such as

Gibberella, *Nectria* and *Bionectria* that are mainly seen in agricultural, ecological, or biodiversity studies (Howard, 2002; Stone et al., 2004).



These genera are widely distributed in soil and on organic substrates and have been isolated from permafrost in the arctic and from the sand of Sahara. They are amongst the fungi most frequently isolated by the plant pathologist. The predominant interest the genus has been and still is in their role as plant pathogens (Booth, 1971; Ismail et al., 2015) as well as there are species which are highly mycotoxigenic, producing a range of toxins affecting wildlife, livestock and humans (Antonissen et al., 2014). The current fungal taxonomic systems have been still identified by macroconidia and microconidia in the asexual stage, morphological character of chlamyospore, host range, and secondary metabolites. However, the plasticity and intergradations of the phenotypic traits offered difficulty in identifying the filamentous fungi (Ismail et al., 2015; Young et al., 2000). In addition, because of their capacity for rapid change, species identification presents certain problems (Booth, 1971; Hsuan et al., 2011). For these reasons, the molecular biological method has been recently introduced in *Hypocreanlean* fungi systematic and the molecular variation at the DNA level has been studied in many works (Young et al., 2000). In addition to DNA sequencing, phylogenetic analyses have been supported strong information about genetic relationship of closely related *Hypocreanlean* fungi (Hsuan et al., 2011). This paper evaluates the use of ITS sequences for identification and phylogenetic analysis of closely related *Hypocreanlean* fungi isolated from agricultural soils in Eskisehir province.

Material and Method

Fungal Strains

All of the strains used in this study were obtained from agricultural soils in Eskisehir province and identified using traditional methods according to the Booth (1971), Gerlach & Nirenberg (1982) and Nelson et al. (1983). Additional information on these and related strains can also be found elsewhere (Demirel et

al., 2005). All strains were stored in suitable conditions at the Culture Collections of KUKENS (WDCM101), the Centre for Research and Application of Culture Collections of Microorganisms. Cultures were maintained at 4°C on potato dextrose agar (PDA) for use in the present study.

DNA Extraction, PCR Amplification and Sequencing

Genomic DNA extraction were conducted with strains grown on PDA for 7 days at 25°C using a modified method of Van Burik et al. (1998). DNA concentration were estimated visually in 1% agarose gels containing 5 µg/mL ethidium bromide by comparing band intensity with known quantities of DNA high range markers and the extracted DNA was stored at -20°C. To examine the phylogenetic relationship among the test strains of *Fusarium*, the nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 region was amplified with primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). PCRs were performed using Techne Thermal Cycler (Techgene, Techne, UK) in 25-µL solution containing 1 µL of genomic DNA, 2.5 µL of 2.5-µM forward and reverse primers, 2.5 µL of Taq buffer + KCl-MgCl₂ (Fermentas), 2.5 µL of 25-mM MgCl₂ (Fermentas), 2 µL of 2.5-mM dNTPmix, 0.25 µL of 5-U/µL Taq DNA polymerase (Fermentas) and 11.75 µL of sterile deionised water. The amplification conditions consisted of initial denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 45 s, extension at 72 °C for 1.30 s and final extension at 72 °C for 5 min. To confirm the amplification, 5 µL of the PCR product together with marker (GeneRuler DNA Lader 50 bp Fermentas) was resolved by gel electrophoresis on 1% agarose gel containing 5 µg/mL ethidium bromide in 1X TAE buffer. Gel were photographed by Gel Documentation system (Uvitec M02 4611) (Demirel, 2016).



After agarose gel blocks containing DNA fragment were cut out and purified with Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Cycle sequencing products were purified with Dynabeads® Sequencing Clean-Up to remove unincorporated dye-labeled nucleotides. Then, all the sequencing reactions were performed using CEQ™ DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter) by CEQ 8000 Genetic Analysis System.

Data Analysis

The ITS sequences were blasted with GenBank sequences (Altschul et al., 1990) to verify their identity; the closest Blast results are reported for each taxon (Table 1). The alignments were performed using the Muscle in MEGA 6.0 software package, together with the other sequences of morphologically and phylogenetically related species that were obtained from NCBI GenBank (Tamura et al., 2013). The aligned data sets were investigated using ML analysis based on the Tamura–Nei model (Tamura and Nei, 1993) as implemented in the MEGA 6.0 with 1000 bootstrap replications. All the positions containing gaps and missing data were eliminated. *Fusarium oxysporum* (KT794176) was used as the out group. The obtained sequence data have been deposited in GenBank with accession numbers.

Results and Discussion

The PCR products (570 bp) were obtained from all of the species by using the universal fungal primers (ITS1/ITS4), Figure 1 shows that the sizes obtained for the full ITS region amplified of all of the strains. The rDNA base sequences belong to investigated strains are presented in Table 1 together with closest Blast results. When each of this sequences were investigated by Blast, identity and coverage values were found between 98-100% and 97-100%, respectively (Table 1). The phylogenetic trees were obtained by comparison to all sequences with Genbank nucleotide sequence database that have ITS1-5.8S rRNA-ITS2 sequences (Figure 2). Figure 2 shows that the members of genera *Bionectria*, *Fusarium*, *Gibberella* and *Nectria* have almost identical topology with respect to the ITS locus. A

phylogenetic tree based on ITS region was structured at higher divergence levels. For investigated mainly closely related members, identical positions and four sections for specific clades such as *Bionectria*, *Fusarium*, *Gibberella* and *Nectria* genera were found.

The genus *Fusarium* is the anamorph stage of *Gibberella* genus (Samuels et al., 2001). The members of these genera are known as main and wide plant pathogens (Howard, 2002; Stone et al., 2004; Dragich and Nelson, 2014; Chehri, 2016). These two genera have been distinguished with especially teleomorph structures of *Gibberella* genus. The complexity about the their morphologic and microscopic identification has been related with varies problems such as depending on the host, loosing of stock cultures, limitations associated with morphological characters (Summerell et al., 2003; Hsuan et al., 2011; Antonissen et al., 2014). The findings of this study demonstrated the efficiency of ITS region and phylogenetic analysis of belong to these two genera. Figure 2 shows that *Fusarium* and *Gibberella* genera have considerably identical topology with the ITS locus. The genus *Gibberella* occurred in two main clades and two clear divergences, namely *Gibberella avenacea* and *Gibberella tricincta*, were noted. Furthermore, investigated members of *Fusarium* and *Gibberella* genera are polyphyletic.

The genus *Nectria* is a big genus with about 650 members and many species of *Nectria* genus are known as plant pathogens, and some of them are toxigenic to animals and humans (Schroers and Samuels, 1997). The genus *Bionectria* is one of the other plant pathogenic *Hypocreanlean* fungi and very similar to *Nectria* member (Schroers, 2001; Samaga et al., 2014; Melo et al., 2014). These two genera have some differences about their morphologic and chemical structure. However, *Bionectria* and *Nectria* genera have very similar morphologic and microscopic properties and distinguish of them has been very problematic for mycologist (Schroers and Samuels, 1997; Schroers, 2001).

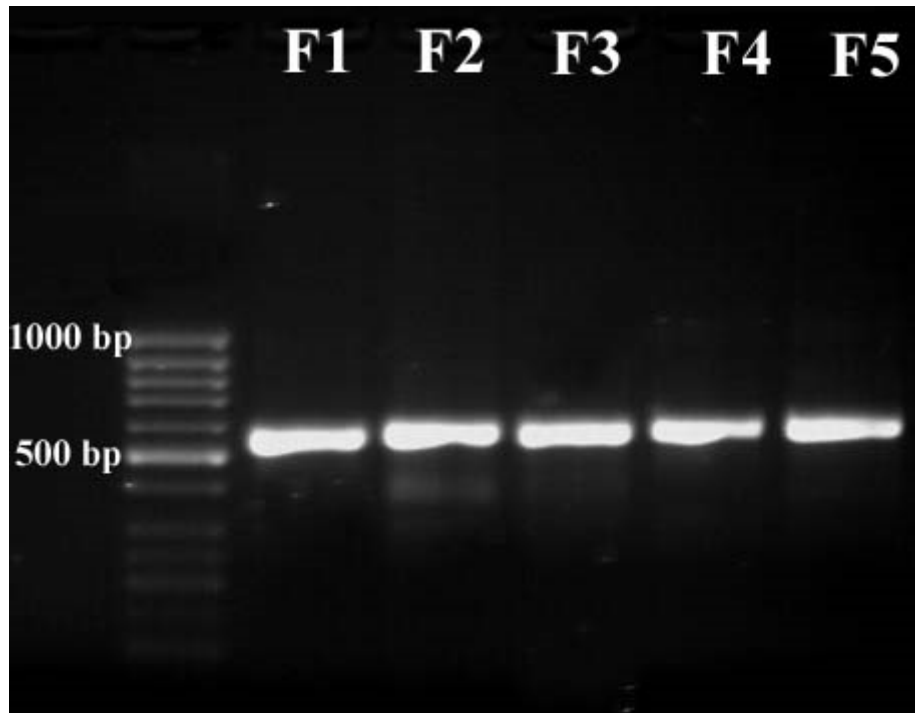


Figure 1. Full ITS PCR products amplified from all of the strains with ITS1/ITS4 primers. M, molecular-weight markers (50 bp GeneRuler DNA Lader, Fermentas)

Phylogeny based on the ITS region in this study showed a successfully topology for these genera and indicated main phylogenetic position of them as closely related but distinctly different members (Figure 2).

Table 1. Newly generated ITS sequences with their closest GenBank sequences (according to Blast searches)

| Species | Collection | GenBank accession number | Closest Blast hit (% identity/%coverage) |
|--|------------|--------------------------|--|
| <i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. | F1 | KX958415 | <i>Fusarium solani</i> KP992939 (99/100) |
| <i>Gibberella tricineta</i> El-Gholl, McRitchie, Schoult. & Ridings 1978 | F2 | KX958416 | <i>Fusarium tricinatum</i> KU556038 (98/97) |
| <i>Gibberella avenacea</i> R.J. Cook 1967 | F3 | KX958417 | <i>Fusarium avenaceum</i> KX839156 (99/99) |
| <i>Bionectria ochroleuca</i> (Schwein.) Schroers & Samuels | F4 | KX958418 | <i>Bionectria ochroleuca</i> AF358237 (99/100) |
| <i>Nectria inventa</i> Pethybr. | F5 | KX958419 | <i>Nectria inventa</i> KR709185 (100/100) |

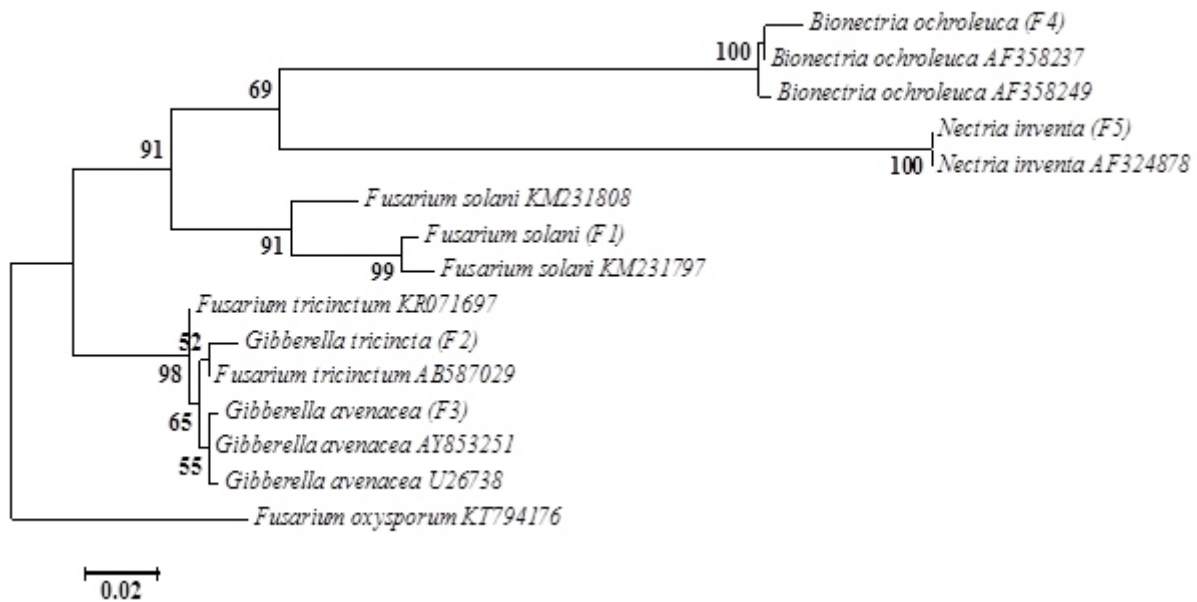


Figure 2. Best-scoring maximum likelihood tree based on the Tamura–Nei model calculated using MEGA 6.0 based on ITS sequences showing the relationships of the newly generated sequences in this study with previously known taxa in the NCBI GenBank. The scale bar denotes 0.02 substitutions per position. The tree with the highest log likelihood (-1499.8212) is shown. Initial tree for the heuristic search were obtained by applying the neighborjoining method to a matrix of pairwise distances estimated using the maximum composite likelihood approach. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 15 nucleotide sequences. All positions with less than 50% site coverage, containing gaps, or missing data were eliminated. There were a total of 374 positions in the final dataset. The tree is rooted with *Fusarium oxysporum* (KT794176) (bootstrap 1000).

Conclusions

The results of this study demonstrated the efficiency of rDNA region and phylogenetic analysis in taxonomic studies of closely related members of *Hypocreanlean* fungi. In particular, ITS region was found to be success because of its high performance with regard to easy

application, topology, identification and clearly discrimination. In addition, high quality sequences of the ITS locus obtained in the present study have been deposited in the NCBI database for bridge over to other taxonomic studies of *Hypocreanlean* fungi.

References

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., *Basic Local Alignment Search Tool*, J Mol Bio, 215: 403-410 (1990).
- Antonissen G., Martel A., Pasmans F., Ducatelle R., Verbrugghe E., Vandenbroucke V., Li S., Haesebrouck F., Immerseel F.V., Croubels S., *The Impact of Fusarium Mycotoxins on Human and Animal Host Susceptibility to Infectious Diseases*, Toxins (Basel), 6(2): 430–452 (2014).
- Booth C., *The genus Fusarium*, CAB, Kew, UK; 237 p. (1971).
- Chehri K., *Molecular Identification of Pathogenic Fusarium Species, The Causal Agents of Tomato Wilt in Western Iran*, J Plant Prot Res, 56(2): 143-148 (2016)
- Demirel R., *Comparison of rDNA Regions (ITS, LSU, and SSU) of Some Aspergillus, Penicillium, and Talaromyces spp.*, Turk J Bot. 40:576-583 (2016).



- Demirel R., İlhan S., Asan A., Kınacı E., Oner S., *Microfungi in Cultivated Fields in Eskişehir Province (Turkey)*, J Basic Microbiol, 45: 279-293 (2005).
- Demirel R., Sariozlu N.Y., İlhan S., *Polymerase Chain Reaction (PCR) Identification of Terverticillate Penicillium Species Isolated from Agricultural Soils in Eskişehir Province.*, Braz Arch Biol Technol, 56 (6): 980-984 (2013).
- Dragich M., Nelson S., *Gibberella and Fusarium Ear Rots of Maize in Hawai'i*, Plant Dis, 102: 1-8 (2014).
- Gerlach W., Nirenberg H., *The Genus Fusarium a Pictorial Atlas*, Biologische Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft Institut für Microbiologie, 406 p. (1982).
- Howard D.H., *Pathogenic fungi in Humans and Animals*, In: Mycology Series, Volume 16, and Second Edition, CRC Press, 800 p., New York (2002).
- Hsuan H.M., Salleh B., Zakaria L., *Molecular Identification of Fusarium Species in Gibberella Fujikuroi Species Complex from Rice, Sugarcane and Maize from Peninsular Malaysia*, Int J Mol Sci, 12: 6722-6732 (2011).
- Ismail M.A., Abdel-Hafez S.I.I., Hussein N.A., Abdel-Hameed N.A., *Contributions to the Genus Fusarium in Egypt with Dichotomous Keys for Identification of Species*, Tomasz M. Karpiński Publisher, 175 pp., Poland (2015).
- Melo I.S., Valente A.M.M.P., Kavamura V.N., Vilela E.S.D., Faull J.L., *Mycoparasitic Nature of Bionectria sp. Strain 6.21*, J Plant Prot Res, 54(4): 327-333 (2014).
- Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O., *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*, The Pennsylvania State University Press, 193 p. (1983).
- Samaga P.V., Rai V.R., Rai K.M.L., *Bionectria ochroleuca NOTL33—An Endophytic Fungus from Nothapodytes Foetida Producing Antimicrobial and Free Radical Scavenging Metabolites*, Ann Microbiol, 64: 275–285 (2014).
- Samuels G.J., Nirenberg H.I., Seifert K.A., *Perithecial Species of Fusarium*, In: Summerell B.A., Leslie J.F., Backhouse D., Bryden W.L., *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*, APS Press, St. Paul, MN, USA, 1-14 (2001).
- Schroers H.J., Samuels G.J., *Bionectria: A Genus for Species of the Nectria Ochroleuca Group*, Zeitschrift Für Mycologia, 63(2): 149-154 (1997).
- Schroers H.J., *A monograph of Bionectria (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and Its Clonostachys anamorphs*, Stud Mycol, 46: 1-96 (2001).
- Stone J.K., Polishook J.D., White J.F., *Endophytic Fungi in Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*, Academic Press, p. 241-270, Burlington (2004).
- Summerell B.A., Salleh B., Leslie J.F., *A Utilitarian Approach to Fusarium Identification*, Plant Dis, 87(2): 117-128 (2003).
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729 (2013).
- Tamura K., Nei M., *Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees*, Mol Biol Evol, 10: 512-526 (1993).
- Van Burik J.A., Schreckhise R.W., White T.C., Bowden R.A., Myerson D., *Comparison of Six Extraction Techniques for Isolation of DNA from Filamentous Fungi*, Med Mycol, 36(5): 299–303 (1998).
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, 315–322 (1990).
- Young-Mi L., Choi Y., Min B., *PCR-RFLP and Sequence Analysis of the rDNA ITS Region in the Fusarium spp.*, J Microbiol., 38(2): 66–73 (2000).



Bitki Patojeni Funguslarda Virülans Faktörleri

Özlem Abacı GÜNYAR

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Bornova, İZMİR

Öz:Bu derlemede, bitki- fungus etkileşimini takiben hastalık gelişimi ve hastalık gelişiminde rol oynayan fungal virulans faktörleri özetlenmiştir. Tanımlanan fungus türlerinin yaklaşık %10' u 10,000' den fazla bitkide hastalıklara neden olmaktadır. Bu şekilde funguslar bitkilerde ciddi anlamda ekonomik kayıplara neden olurlar. Bitki patojeni funguslar enfeksiyon şekilleri, enfeksiyon yapısının farklılaşması ve işlevleri ve beslenme stratejileri açısından büyük farklılıklar göstermektedirler. Bitki, patojen fungus saldırılarına karşı yaşamını devam ettirebilmek adına bir tanıma mekanizması ve zamanında ve etkili bir şekilde bir savunma cevabı oluşturmaktadır. Bitki patojenik fungusların virulansı, birlikte çalışan ve enfeksiyonu ortak tarzda oluşturan çok sayıda parametrenin sonucudur.

Anahtar Kelimeler: Bitki patojeni funguslar, virulans.

Virulence Factors in Plant Pathogen Fungi

Abstract:In this review, disease development following plant-fungus interaction and fungal virulence factors that play a role in disease development and are summarized. Approximately 10% of the identified fungus species cause diseases over 10,000 plants. In this way fungi cause serious economic losses in plants. Plant pathogenic fungi show great differences in terms of infection patterns, differentiation and function of infection structure and nutrition strategies. The plant forms a recognition mechanism and a defense response in a timely and effective manner in order to survive against pathogenic fungus attacks. The virulence of plant pathogenic fungi is the result of numerous parameters that work together and make the infection common.

Key words: Plant pathogenic fungi, virulence

Giriş

1.Bitki patojeni fungusların enfeksiyon stratejileri

Bitki paraziti funguslar adezyon, konak tanıma, penetrasyon, çoğalma ve beslenme dahil olmak üzere patogenezin en önemli aşamalarını başararak enfeksiyon yapıları oluştururlar. Bitki patojeni fungus oluşturduğu enfeksiyon yapıları ile bitki dokusuna mekanik güç uygular. Enfeksiyon yapılarının oluşumu, kompleks düzenleyici yol izleri tarafından kontrol edilen ve düzenlenen gen ifadesi

eşliğinde gerçekleşir (Vadlapudi ve Naidu, 2011; Selin ve Kievit, 2016).

Bitki patojeni funguslar farklı yaşam şekilleri ve konukçu bitkileriyle etkileşim yolları geliştirmiştir. Bazı patojenler bitkiye girişin ardından konukçu hücreyi enzimler, reaktif oksijen türleri (ROS) ve/veya toksinlerinin kombinasyonu ile öldürmektedir ve onların organik bileşikleri üzerinde yaşarlar(Horbach ve ark. 2011; Pawlowski ve Hartman, 2016; Gebrie, 2016).



Bunlar nekrotrofik patojenler olarak bilinirler. Nekrotrofik patojenler geniş konukçu spektrumuna sahiptir ve hızlı bir şekilde doku hasarına neden olmaktadır. Biotrofik patojen ise tersine, obligat parazittir ve toksin üretmezler. Biotroflar yalnızca yaşayan konukçu hücrede hayat döngülerini tamamlarlar.(Horbach ve ark. 2011; Pawlowski ve Hartman, 2016; Gebrie, 2016).

Biotrofik patojenlerde bitki hücre duvarını aşarak konukçu hücreleri içerisine girmek için, özel enfeksiyon yapıları oluşturulmaktadır. Ektoparazitik funguslarda, bitki kütikülü üzerinde primer ve aressorial çimlenme tüpleri oluşturulur, appressorial germ tüpü aressoryum adı verilen enfeksiyon hücrelerine dönüşür (Gebrie, 2106). *Blumeria (=Erysiphe) graminis* f. sp. *hordei* DC. Merat Em. Marchal (*Bgh*) arpalarda külleme hastalığına neden olan zorunlu biotrofik fungal patojende aressoryum oluşumunun ardından aressoryum altından bir penetrasyon kancası çıkar, konukçu kutikülüne ve epidermal hücre duvarına penetre olmaya çalışır. Eğer penetrasyon başarılı olursa, kanca uçları hostoryuma farklılaşır. Hostoryum canlı bitki hücresi içerisinde besin eldesi için oluşturulan özelleşmiş yapılardır (Pawlowski ve Hartman, 2106).

Nekrotrofik funguslar ise fitotoksinler, hücre duvarı degrade edici enzimler üreterek konukçu bitki dokusunu öncelikle öldürürler. Nekrotrofik enfeksiyon konidyum çimlendiğinde başlar; direkt olarak penetre olmak için enfeksiyon hifi oluşturur veya epidermise penetre olmak için penetrasyon ayaklarını oluşturan aressoryum gelişir (Zeilinger ve ark., 2016; Horbach ve ark., 2011; Pawlowski ve ark., 2016; Gebrie 2016). Aressoryum oksidaz, kütinaz, lipaz gibi konukçu kütikülünü ve yapışkan tabakayı degrade etmek için degrade edici enzimler salgılar. Penetrasyon ayakları dallanarak ve hücre duvarı degrade edici enzimler üreterek hücreleri öldürür ve nekrotik lezyonların oluşumuna neden olarak ilerler. Nekrotroflar genellikle kolonizasyonu kolaylaştırmak için fitotoksinler üretirler.

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. tarafından üretilen botryodiplodin ve phaseolinone gibi geniş konukçu spektrumuna neden olan metabolitler veya *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. tarafından üretilen domates spesifik olan AAL toksin gibi konukçu spesifik toksinler nekrotrofik rol oynar (Zeilinger ve ark., 2016; Pawlowski ve ark., 2016; Gebrie 2016). Bununla birlikte, bu yaşam tarzları ve beslenme stratejilerinin kombinasyonları da bulunmaktadır ve patojenler ilk olarak geçici biyotrofik ardından nekrotrofik yaşam şekli gösterirler, bu patojenler hemibiyotroflar olarak adlandırılırlar (Horbach ve ark., 2011). Hemibiotrof tipte gelişim gösteren, soyada antraknoz etkeni olan *Colletotrichum truncatum*(Schwein.) Andrus & W.D. Moore bitki atıklarında aseksüel üreme yapıları olan misel ya da acervul olarak kalabilir. Acervulus konidyofor ve bol miktarda konidyum üretir. Konidyumlar, sıklıkla yağmurlarla bitki dokuları üzerine düşer. Enfeksiyon, konidyumun bitki dokusunda çimlenmesi ile başlar. Ardından melanize bir aressoryum oluşur. Subkütiküler tabakanın içinde, aressoryum, konukçu tarafından tanınmayan, hücre duvarları boyunca büyüyen ve hücre-içi boşluğun kolonizasyonu için bol miktarda dallanan primer enfeksiyon hiflerini oluşturur. Nekrotrofik evre patojenin primer hiften sekonder hifi oluşturmasının ardından başlar. Sekonder hif kolaylıkla epidermal ve mezofil hücrelere penetre olur. Hücreler yıkılır ve nekrotik lezyonlar oluşur. Enfeksiyondan 36 saat sonra acervulus gelişir. Bu yapı kış boyunca bitki atıkları üzerinde kalır ve baharda döngü tekrarlanır (Pawlowski ve Hartman, 2016).

2.Konukçu-fungus etkileşimi

2.1.Gene karşı gen hipotezi (gene for gene resistance)

Bitki patojenleri sağlıklı konukçu bitki savunma mekanizmalarını aşmak için çok fazla mekanizma geliştirmişlerdir. Patojen organizmanın sahip olduğu ve patojenitesinde rol oynayan proteinleri kodlayan genler avirulence geni (Avr geni) olarak tanımlanır.



Avirulans genlerinin ürünü proteinler patojenite ile ilgili efektör moleküllerdir. Bu moleküller bitkide immunitiyi tetikleyen moleküllerdir (Van der Does ve ark., 2007; Rouxel ve Balesdent 2010; Zeilinger ve ark., 2010). Efektörler konukçu hücre yapısını ve fonksiyonunu değiştiren, enfeksiyonu kolaylaştıran (virulans faktörleri veya toksinler) ve/veya savunma cevabını tetikleyen (avirulans faktörleri: Avr) moleküller olarak tanımlanmaktadır. (Zeilinger ve ark., 2016; Selin ve Kievit,2016).

Konak bitki ve patojen arasındaki sinyalleşmede ve tanışmada görevli moleküllerin tanımlanması ve karakterizasyonu, son on yıl boyunca araştırmaların odağı olmuştur.Bitkinin hastalığa karşı savunma mekanizmalarından en önemlisi R (resistant=dayanıklılık) genleridir. R genlerinin ürünü olan PR proteinleri (Pathogen Related Proteins) patojene karşı dayanıklılığı sağlayan yapısal proteinlerdir. PR proteinleri patojen organizmanın bitkiye girmesi sırasında salgıladığı avirulan genlerinin ürünü olan sinyal moleküllerini tanır ve bu şekilde uyarılır. Bu mekanizmaya gene karşı gen hipotezi (gene for gene resistance) denir. Avr geni tarafından sentezlenen efektör moleküller, R geninin ürününe bağlanarak aktive eder. Aktif duruma geçen R geninin ürünü de savunma yanıtını başlatacak olan sinyallerin iletimini sağlar. Bu etkileşim sonucu enfekte olan hücrenin etrafındaki komşu hücrelerde hızlı bir şekilde apoptoz (programlanmış hücre ölümü) gözlenir. Bu şekilde patojenin konukçu bitkide yayılması engellenir. Buna Hipersensitif Tepki (HR) adı verilir (Van der Does ve ark., 2007; Zeilinger ve ark., 2010; Sexton ve Howlett, 2006; Gonzalez-Fernandez, 2010). Patojen ile etkileşime giren konukçu hücre ne kadar hızlı ölürse, bitki enfeksiyona o kadar dayanıklı olur (Van der Does ve ark., 2007; Zeilinger ve ark., 2010; Sextonve Howlett,2006).

Bitki direnç genleri ve patojenin avirulan genleri arasındaki etkileşim bitkide ırk spesifik direnci etkileyen sinyal transdüksiyon kaskadını

başlatmaktadır. Domates-*Cladosporium fulvum* Cooke patosistemi içindeki *Cf9* ve *avr9* genleri en iyi bilinen örnektir. Bu patosistemde fungal ırk spesifik *avr9 geni* ürünü direnç geni olan *Cf9* genini taşıyan domateste HR' yi indüklemektedir. Tersine bu genotipteki domateste bulunan fungal ırk *avr9* genini taşıyor ise efektörler üretilmemektedir.R protein veya Avr proteinlerinin üretilmediği koşullarda etkileşim olmadığı için patojen bitki tarafından tanınmaz ve patojen bitkide yayılmaya başlar (Zeilinger ve ark., 2010).

2.2.Bitkilere Karşı Fungal Patojenin Evrimi

Avirulans genleri ve R genlerindeki mutasyon oranı infeksiyonda rol almayan genlere göre yüksektir (Van der Does ve ark., 2007).Bu yüksek mutasyon oranının nedeni patojenin virulans faktörleri ve konukçunun üzerindeki patojen için hedef olan bölgeler arasındaki silahlanma yarışından kaynaklanmaktadır. Patojenin virulans faktörlerinin etkisini nötralize etmekadına fungal saldırı için hedef olan konukçu proteinlerinde değişiklikler oluşmaktadır. Patojen ise bu değişen hedef proteinlere saldırı yeteneğini devam edebilmek için virulans faktörlerinde değişikliğe gitmek zorundadır. Sonuç olarak patojenin virulans genleri ve bitkideki patojen için hedef bölgelerde hızlı bir şekilde evrimleşmektedir (Van der Does ve ark., 2007).

Konukçu bitki hastalık etmeninden başarılı bir şekilde korunduktan sonra (yani potansiyel tanıma hedeflerinin kaybı ile), hastalık etmeni doğal seleksiyona tabi olur ve hastalık yapabilmek için yeni mekanizmalar geliştirmeye çalışır. Bu sırada hedefleri ile bağlantıyı kesmemek adına virulans ile ilgili olan salgısal proteinlerde yüksek mutasyon gözlenir. Aynı zamanda meydana gelen horizontal gen transferi ile türler arasında veya farklı vejetatif olarak incompatible aseksüel türlerin klonları arasında horizontal gen transferi ile bir veya birkaç gen aktarımı gerçekleşir. Bu şekilde fungus yeni virulans geni kazanabilir (Van der Does ve ark., 2007).



Evrimsel süreçte horizontal olarak alınmış genler saptanabilir. Bu genlerin farklı GC oranları ve kodon eğilimleri olur. Horizontal olarak kazanılan genler replikasyon, transkripsiyon ve translasyon gibi temel moleküler işlem genlerini değil, metabolik ve virülens genleri kapsar (Mehrabi ve ark., 2011). Bunun bitki patojenik funguslar içerisinde en iyi örneği *Nectria haematococca* Berk. & Broome'nın (anamorfu *Fusarium solani*) bezelyede hastalık yapması için gerekli olan *PEP* ve *PDA* genleri (patojenite genleri) 1,6 Mb'lık CD (conditionally dispensable chromosome) kromozomu üzerinde bulunmaktadır. Bakterilerdeki patojenite adaları gibi CD kromozomu virulans ile ilgili genleri ve yüksek oranda yer değiştirebilen genetik elementler (*Transposable* genetik elementler) içermektedir ve genomun diğer kısımları ile karşılaştırıldığında farklı GC içeriğine sahip olduğu görülmektedir. Farklı *Nectria* türlerinden horizontal gen transferi ile gelmiştir. CD kromozomu içermeyen bir süşü virulans genlerini içeren kısım aktarıldığında bezelyede organizmanın virulansının arttığı gözlenmiştir (Van der Does ve ark., 2007; Mehrabi ve ark., 2011).

Yine diğer bir önemli bitki patojeni tür *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder and H.N. Hans domates yanıklığı hastalığı etkenidir. Six1 proteini sistein bakımından zengin bir proteindir ve virulansa katkı sağlamaktadır. *SIX1* geni avirulans genidir ve domatesteki *I-3* direnç geni ile eşleşmektedir ve 2 Mb'lık en küçük kromozom üzerinde yer almaktadır. *SIX2* geni ürünü infeksiyon sırasında salgılanmaktadır. Six1 ve Six2' ye ilave olarak enfekte bitkinin ksilem özsuğunda 8' den fazla fungal protein saptanmıştır. Ve bu proteinleri kodlayan genler aynı kromozom üzerinde bulunmaktadır. *Fusarium oxysporum* E.F. Sm. & Swingle geniş konukçu aralığına sahip olmasına rağmen, bu türün tek bir izolatu bir ve birkaç bitki türünü infekte edebilmektedir. Bu nedenle türler konukçu spesifikliğine dayanarak formae speciales olarak sınıflandırılmıştır. *SIX1*, *SIX2* ve salisilat hidrosilaz kodlayan gen tüm

F.oxysporium f. sp. *lycopersici* izolatlarında bulunur, fakat diğer formae speciales veya diğer patojenik olmayan türlerde bulunmaz (Van der Does ve ark., 2007; Mehrabi ve ark., 2011).

2.3. Konukçu- Patojen Etkileşiminde Eftörlerin Rolü

Bitki patojenik funguslarda başarılı bir kolonizasyon ve infeksiyon, kendileri için gerekli besini temin etmek adına canlı bitki konukçusunu modifiye etme yeteneğine bağlıdır. Salgılanan virulans determinantlarına eftörler denilmektedir. Bitkilerde hastalık gelişiminde patojenler tarafından salgılanan enzimler, toksinler, büyüme regülatörleri gibi eftör moleküller direk veya indirek rol almaktadır. Bu moleküllerin patojenitedeki önemi ise hastalıklara göre değişmektedir.

2.3.1. Bazı fungal eftör moleküller

2.3.1.1. Sekonder metabolitler:

Sekonder metabolitler farklı mikroorganizmalar (funguslar ve aktinobakteriler ve diğerleri) tarafından üretilen küçük organik moleküllerdir. Nonribosomal peptid sentetaz ve poliketid sentaz (PKS) veya dimetilallyl transferaz ve preniltransferazlar gibi enzimlerin fonksiyonu ile üretilirler. Bu özel metabolitler genelde büyüme için gerekli değildir. Fakat belli koşullar altında ve belli habitatlarda üretici organizma için avantaj sağlamaktadır. Funguslarda, sekonder metabolit üretiminden sorumlu genler genellikle kromozomların ucunda subtelomerik bölgede kümeler oluşturur (McDonagh ve ark. 2008; Scharf ev ark., 2014). Subtelomerik DNA sekanslarının korunmuş bir özelliği, aktif transpozable elementlerden veya transpozon kalıntılarında oluşan tekrarlayan elementlerin (RE) varlığıdır. Örneğin penisilin sentezinden sorumlu gen kümesi sadece üç gen içerir ve kromozom VI'nın telomerinden yaklaşık Kb uzaklıkta bulunur (Palmer ve Keller 2010).

Örneğin *Aspergillus fumigatus* Fresen.' ta sekonder metabolitlerin üretiminden sorumlu genlerin kromozomların subtelomerik bölgelerinde dağıldığı gösterilmiştir.



Melanin sekonder metabolitlere iyi bir örnektir. Fenolik öncüllerden oksidatif polimerizasyon ile türevlenen yüksek moleküler ağırlıklı koyu renkli pigmentlerdir. Funguslarda, iki tip melanin bulunmaktadır. Dihidroksinaftalen (DHN) melanin ve dihidroksi fenilalanin (DOPA) melanin ve türevleri virulansa fayda sağlamaktadır. Melanin fonksiyonu çok geniştir. Organizmayı çevresel streslere karşı korumada rol oynamaktadır. Yine birçok bitki ve insan patojenik fungusta patojeniteye yardım etmektedir (Scharf ve ark., 2014; Ludwig-Müller, 2015; Ryder ve Talbot, 2015).

Bitki patojeni fungus *Magnaporthe oryzae* önemli pirinç patojenidir ve pirinç bitkisinin yapraklarının infeksiyonu için bitki hücre duvarına fungusun penetrasyonu gerekmektedir. Bu proses için gerekli olan yüksek turgor basıncı DHN içeren özelleşmiş fungal yapı olan appressorium tarafından üretilmektedir. Appressorium gliserol ve diğer biyoyumlu moleküller biriktirerek çiğ damlasından su almayı başarır. Appressoriumun hücre duvarında bulunan melanin tabakası gliserol ve diğer biyoyumlu moleküller gibi ozmotik aktiviteye sahip maddelerin geçişine izin vermez. Bu nedenle appressorium içindeki turgor basıncı artar ve oluşan bu basınç ile penetrasyon çivisi bitkinin fiziksel penetrasyonunu gerçekleştirir (Scharf ve ark., 2014; Ludwig-Müller 2015; Ryder ve Talbot, 2015; Goriely ve Tabor, 2006). Melanin kusurlu *Magnaporthe oryzae* B.C. Couch mutantları pigmentless appressorium üretir ve yaprak kütikülünün epidermal hücrelerine penetre olamaz (Scharf ve ark., 2014).

Sekonder metabolitlerden birisi de sideroforlardır. Demir ökaryotik organizmalar için kaçınılmaz bir besindir. Demir sınırlaması ile baş edebilmek patojenite için ön koşuldur. Demir çevrede okside formda bol miktarda bulunmasına rağmen bitki ve hayvan konukçusunda nisbeten daha az miktarda bulunmaktadır. Fungal patojenler demir bağlamak için sideroforlar üretmek şeklinde farklı stratejiler geliştirmişlerdir. Sideroforlar

küçük salgısal moleküllerdir. Fungal patojenin demir bağlamasını sağlar. Sideroforlar sekonder metabolittir çünkü sentezleri nonribozomal peptid sentaz yol izi ile ilgilidir ve insanlarda bu enzim olmadığı için fungusun kontrolü için kullanılan ilaçlar için ideal hedeflerdir. Bu nedenle siderofor üretimi virulans için gereklidir. *M. oryzae*'nin ürettiği tek hücre içi siderofor ferricrocin melaninde olduğu gibi bitki infeksiyonu için gerekli olan appressoriumda turgor basıncı oluşumu ile ilgili olarak patojeniteye yarar sağlar (Scharf ev ark., 2014).

Bitki patojeni fungusların hastalandırdıkları bitkilerde fitotoksin olarak adlandırılan toksik maddeler ürettikleri bilinmektedir. Bu toksik moleküllerin de çoğu sekonder metabolit olup düşük molekül ağırlıkta küçük moleküllerdir ve bundan dolayı enfeksiyon bölgesinden çok daha uzak bölgelere yayılabilir ve taşınabilirler. Fitotoksinler konukçuya spesifik toksinler (patojene hassas yalnızca bir bitkiyi etkiler) ve konukçuya spesifik olmayan toksinler (daha geniş bir konukçu dizinini etkiler) olarak sınıflandırılabilirler. *Cochliobolus*, *Alternaria*, ve bazı *Pyrenophora* türleri tarafından üretilen konukçu spesifik toksinler, *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg' in fuminosin mikotoksini, *M. oryzae*'nin pyrichalasin H ve Ace1'i iyi bilinen toksik sekonder metabolitlerdir. ACE1 geni hem poliketid sentaz hem de non-ribozomal peptid sentaz domaini (PKS-NRPS) ile sitoplazmik hibrit protein kodlar ve penetrasyon sırasında spesifik olarak eksprese edilir. Ace1 pirinç direnç geni Pi33 tarafından tanınan hala bilinmeyen bir sekonder metabolit kodlar. Patojene ait bazı kodlama yapmayan küçük (small) RNA moleküllerinin bitki bağışıklık sistemini baskıladığı gözlenmiştir. *Botrytis cinerea* Pers. ' da bazı küçük RNA' ların *Arabidopsis* ve domates genleri üzerinde konukçu RNA interferans makinesini bertaraf ederek konukçu bağışıklığını baskıladığı gözlenmiştir (Zeilinger ev ark., 2016).



2.3.1.2.Enzimler: Bitki hücre duvarı polisakkaritler, proteinler, aromatik polimerlerden oluşan heterojenik bir yapıdır. Hücre duvarının yapısı ve kompozisyonu bitki türleri arasında değişiklik gösterse de hepsi pektin, hemiselüloz, lignin ve yapısal proteinlerden oluşan bir matriks içinde gömülü selüloz mikrofibriller içermektedir. Bunların miktarı farklı bitki gruplarında farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle fitopatojenik funguslar bitki hücre duvarı bariyerini aşmak için hücre duvarı degrade edici enzimler salgırlar. Bu enzimler özellikle özelleşmiş penetrasyon yapısı oluşturmeyen fitopatojenik funguslar için önemlidir (Zeilinger ev ark., 2016; Zhao ve ark., 2013).

Karbonhidrat aktif enzimler (CAZymes) oligo ve polisakkaritler (sellüloz ve hemisellülozda dahil olmak üzere) olan glikokonjugatların glikosidik bağlarını hidrolitik olarak parçalama yeteneğindedir (Kubicek ve ark., 2014). Patojen funguslar tarafından üretilen bu enzimler bitki hücre duvarının yıkımında önemli rol oynamaktadırlar. Karbonhidrat aktif enzimler temelde glikozit hidrolazlar (GHs), glikosiltransferazlar (GTs), polisakkarit liyazlar (PLs), karbonhidrat esterazlar (CEs) olarak 4 fonksiyonel gruba ayrılırlar. Bunların arasında karbonhidrat esterazlar, glikozit hidrolazlar, polisakkarit liyazlar hücre duvarı degrade edici enzimler (cell wall degrading enymes (CWDEs) olarak bilinirler (Zhao ev ark., 2013).

Bitki hücre duvarı selüloz, hemisellüloz, pektin ve lignin içermektedir. Dolayısı ile fungusların lignosellüloz-degrade edici enzim sistemleri temel olarak; lignin degradasyonu için peroksidaz ve lakkazlar, selüloz degradasyonu için selülaz, hemisellüloz degradasyonu için hemisellülaz ve pektin degradasyonu için pektinaz gibi glikozit hidrolazlar içermektedir. 103 fungus ile yapılan genomik analizler bu fungusların karbonhidrat esteraz ve PL1 pektat liyaz gibi çok sayıda karbonhidrat aktif enzime (CAZymes) sahip olduklarını göstermiştir ve bu enzimler hücre duvarı degrade edici enzimler (cell wall degrading enymes (CWDEs) olarak

bilinirler (Zeilinger ve ark., 2016; Zhao ve ark., 2013). *Saccharomyces* ve *Schizosaccharomyces* hariç çoğu fungus çok sayıda hücre duvarı degrade edici enzimleri kodlayan genlere sahiptir. Ve çoğu bitki patojenik funguslardır (Zhao ve ark., 2013). Bu fungusların saprofitik funguslar ile kıyaslandığı zaman ölü lignosellülozik materyali daha etkili bir şekilde parçaladığı görülmektedir. Hemibiotrofik *Fusarium graminearum* Schwabe ve *M. oryzae* hücre duvarı degrade edici enzimleri kodlayan genlerin konukçunun enfeksiyonu sırasında upregüle edildiği gözlenmektedir. Nekrotrofik patojen *B. cinerea*' da virulans ve pektinaz ve ksilanaz gibi enzimlerin üretimi arasında korelasyon görülmektedir. Fungal nekrotrof ve hemibiotrofların tersine beslenmesi için canlı bitki dokularına ihtiyaç hisseden çoğu biotrofların genomlarında hücre duvarı degrade edici enzim kodlayan gen bölgesi daha azdır. Ve hatta glikozit hidrolaz ailesi 6 (GH6) endoglukanaz ve sellobiohidrolaz aktivitesi yoktur (Zhao ve ark., 2013).

Obligat bitki patojeni funguslar tarafından hastalık gelişimi konukçuya başarılı bir şekilde penetrasyon gerektirmektedir. Bu şekilde patojen gelişir. Bitki kütikülü bu patojenlerin penetrasyonunda rol oynar. Kütikülün asıl kompananetleri kütin ve yapışkan tabakadır. Kütin ve yapışkan tabakayı hidroliz eden fungal esteraz ve kütinazlar hastalık gelişiminde önemli role sahiptir (Feng ve ark., 2009).

Zhao ve ark.'nın 2013'de yaptıkları çalışmada 103 fungustan 83'ünde kütinaz aktivitesi saptanmıştır. İki nekrotrofik fungus *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx & D.L. Olivier ve *Verticillium albo-atrum* Reinke&Berhhold' da kütinaz aktivitesi saptanmıştır. Tüm biotrofik funguslarda kütinaz saptanırken, simbiyotik funguslar olan *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. ve *Paxillus rubicundulus* P.D. Orton' ta kütinaz saptanmamıştır (Zhao ve ark., 2013). Fungus doku ile temas ettikten ve dokuya girdikten sonra öncekinden 1000 kat daha fazla kütinaz üretmektedir.



Fungusun çimlenme tüpünün bitki dokusuna giriş noktasında ve penetrasyon çivisinde enzim konsantrasyonunun en yüksek seviyeye ulaşması bu enzimin penetrasyonda rol oynadığının önemli bir göstergesidir. Yapılan çalışmalar *Pyrenopeziza brassicae* B. Sutton & Rawl.'deki kütinaz geni *PBC1* ve *M. grisea*'daki *CUT2*'deki gen bozma çalışmaları kütinazın konak penetrasyonunda rol oynayan çok önemli bir virulans determinantı olduğunu göstermektedir (Feng ve ark., 2009). *B. graminis* f.sp. *hordei* ile epidermal hücre penetrasyonu hem enzimatik yumuşama hem de mekanik güç uygulaması içermektedir. Çimlenmiş ve çimlenmemiş her iki sporda hidrolitik esteraz, kütinaz ve lipaz enzimlerini salgılamaktadır. Esterazlar spor adezyonu, primer germ tüpü oluşumu ve penetrasyonda rol oynamaktadır (Feng ve ark., 2009).

Hücre duvarının orta lamelinde yer alan pektin; pektin liyaz, pektin esteraz ve poligalakturonaz enzimleri tarafından parçalanır. Fungal patojenlerde pektin degradasyonunda poligalakturonazların kritik rol oynadığı belirtilmektedir. Nekrotrofik *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel poligalakturonazları ürettiği bilinmektedir ve pektin degradasyonunda yüksek kapasiteye sahiptirler (Zhao ve ark., 2013).

Pektin parçalayıcı enzimler dokularda yumuşak çürüklük olarak karakterize edilen hastalıklarda rol oynamaktadırlar. Pektinin parçalanması sonucunda dokuda erime, yumuşama ile bitki dokularındaki hücrelerin tek tek ayrılması ve ölüm görülür. Primer hücre duvarının pektolitik enzimler tarafından zayıflatılması sonucu hücrelerin öldüğü düşünülmektedir. Bu enzimler enfekteli dokulardaki patojenlere besin de tedarik eder. Pektolitik enzimlerin vasküler solgunluk hastalıklarında da rolü vardır (Zhao ve ark., 2013).

Bitki hücrelerinin iskeleti durumunda olan selüloz patojenin ürettiği enzimlerle (beta-glikosidaz, sellobiaz) parçalanarak glikoza dönüştürülür (Kubicek ve ark., 2014).

Lignoselluloz; selüloz, hemisellüloz ve ligninden oluşan sıkı bir komplekstir. Lignoselluloz degradasyonu heterojenik enzim grubunun birlikte iş gördüğü bir prosestir. Örneğin selülozun degradasyonu endoglukanazlar, sellobiohidrolazlar ve β -1, 4- glukosidazların birlikte iş görmesi ile sağlanır. GH1, GH3, GH5, GH45 ve GH74 ailelerindeki sellülazlar, GH3, GH10, GH11 ve GH39 ailelerindeki ksilanazlar gibi GH sınıfı enzimler lignosellülozun degradasyonunda görev almaktadır. GH3 ailesi enzimleri substrat spesifikliğine göre β -D-glukosidaz, α -Larabinofuranosidaz, β -D-ksilopiranosidaz, ve N-asetil- β -D-glukozaminidaz olarak sınıflandırılmaktadır. GH ailelerinin en büyüklerinden birisi olan GH5 farklı substratlar üzerinde en genel form olan ekzo/endo glukonazlar ve endomannazlar ile faaliyet göstermektedir. Ve araştırılan funguslar arasında en önemlisi ve en sık bulunanı GH5 ailesidir ve lignosellülazın degradasyonunda önemli rol oynamaktadır (Zhao ve ark., 2013).

2.3.1.3. Büyüme regülatörleri: Doğal olarak bitki tarafından üretilen bitki gelişimini düzenleyen maddelere büyüme düzenleyicileri denilmektedir. Bunların en önemlileri oksinler (auxin), gibberellinler, sitokininler, etilen ve absisik asittir. Büyüme düzenleyicilerinin normal konsantrasyonlarındaki çok küçük değişiklikler bile bitki gelişiminde farklılık yaratır. Birçok bitki patojeni organizma bu bileşikler sentezleyerek doku anormalliklerine, yaprak dökümüne neden olur. Oksin bitki dokusunda bulunan hormonların dengesinin değişmesine, sonuçta doku anormalliklerine neden olur. *Ustilago maydis* (DC.) Corda oksinleri iyi bilinmektedir. Gibberillin tohumda depolanan nişastanın parçalanması, endospermdeki proteinlerin parçalanması, tohum çimlenmesini teşvik etmesi gibi rollere sahiptir. *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw. tarafından üretilen gibberillin çeltik fidelerinin aşırı uzaması olarak bilinen pirinç bakanae hastalığına neden olur (Ludwig-Müller, 2015; Troncoso ve ark., 2010).



Tartışma

Bu derleme çalışmasında bitki- fungus etkileşimi, sonucunda hastalık gelişimi sırasında rol oynayan fungusa ait virulans faktörleri üzerinde durulmuştur. Patojenik funguslar, yaygın olan kolonizasyon mekanizmalarını kullanarak bitkinin zarar gördüğü ilişkiler kurarlar. Bu sırada fungus, kolonizasyonu kolaylaştıran ve patojenik ilişkilere katkıda bulunan küçük peptid efektörler, enzimler ve sekonder metabolitler gibi biyoaktif molekülleri salgılar. Son yıllarda moleküler biyolojide meydana gelen gelişmeler, patojen fungusların ve konukçu bitkilerin etkileşiminde yer alan genlerin tanımlanmasına ve ayrıntılı fonksiyonel analizine izin vermiştir.

Lu ve ark. tarafından, 85 fungal genusa ait 228 adet suşun içerdiği 2058 adet virulans faktörünü kodladığı bilinen genleri içeren kapsamlı bir çevrimiçi veritabanı oluşturulmuştur. Araştırmacılar bu şekilde herhangi bir fungal patojen için varsayılan virulans faktörlerini tahmin etmek için yeni bir algoritma geliştirmeyi amaçlamışlardır. Bu veri tabanının fungal patojenlerle ilgili çalışmalarını teşvik edecek ve kolaylaştıracak önemli bir platform oluşturduğu vurgulanmaktadır. Enfeksiyon ve kolonizasyon süreçlerinin tüm aşamalarına eşlik eden ve kontrol eden olayların bilinmesi bitki patojeni fungusların kontrol edilmesi çalışmalarında önem arz etmektedir.

Kaynaklar

- Feng J., Wang F., Liu G., Greenshields D., Shen W., Kaminskyj S., Hughes G.R., Peng Y., Selvaraj G., Zou J., Wei Y., *Analysis of a Blumeria graminis-Secreted Lipase Reveals the Importance of Host Epicuticular Wax Components for Fungal Adhesion and Development*, Mol Plant Microbe Interact., 22 (12): 1601–1610 (2009).
- Gebrie S.A., *Biotrophic Fungi Infection and Plant Defense Mechanism*, J Plant Pathol Microbiol, 7(9), 1-6 (2016).
- Gonzalez-Fernandez R., Prats E., Jorriñ-Novo J.V.J., *Proteomics of Plant Pathogenic Fungi*, Journal of Biomedicine and Biotechnology, (Article ID 932527): 1-36 (2010).
- Goriely A., Michael Tabor M., *Estimates of biomechanical forces in Magnaporthe grisea*, Mycological research 110(Pt 7):755-9 (2006).
- Horbach R., Navarro-Quesada A.R., Wolfgang Knogge W., Deising H.B., *When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi*, Journal of Plant Physiology, 168: 51–62 (2011).
- Kubicek C.P., Starr T.L., Glass N.L., *Plant Cell Wall-Degrading Enzymes and Their Secretion in Plant-Pathogenic Fungi*, Annu. Rev. Phytopathol., 52: 427–51 (2014).
- Lu T., Yao B., Zhang C., *DFVF: database of fungal virulence factors*, Database, 2012,: 1-4 (2012).
- Ludwig-Müller J., *Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: Balance between development and defense*, journal of Plant Physiology, 4-12(2015).
- McDonagh A., Fedorova N.D., Crabtree J., Yu Y., Kim S., Chen D., Loss O., Cairns T., Goldman G., Armstrong-James D., Haynes K., Hubertus H., Schrettl M., May G., Nierman W.C., Bignell E., *Sub-Telomere Directed Gene Expression during Initiation of Invasive Aspergillosis*, PLoS Pathogens, 4 (9) 1-11 (2010).
- Mehrabi R., Bahkali A.H., Abd-Elsalam K.A., Moslem M., M'Barek S.B., Gohari A.M., Jashni M.K., Stergiopoulos I., Kema G.H.J., de Wit J.G.M., *Horizontal gene and chromosome transfer in plantpathogenic fungi affecting host range*, FEMS Microbiol Rev, 35: 542–554 (2011).
- Palmer J.M., Keller N.P., *Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter?*, Curr Opin Microbiol. 13(4): 431–436 (2010).



- Pawlowski M.L., Hartman G.L., *Infection Mechanisms and Colonization Patterns of Fungi Associated with Soybean*, Fungal Pathogenicity, Sultan, S. (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/62305. Available from: [https://www.intechopen.com/books/fungal-pathogenicity/infection-mechanisms-and-colonization-patterns-of-fungi-associated-with-soybean\(2016\)](https://www.intechopen.com/books/fungal-pathogenicity/infection-mechanisms-and-colonization-patterns-of-fungi-associated-with-soybean(2016)).
- Rouxel T., Balesdent M., *Avirulence Genes*, *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley& Sons, Ltd: Chichester., 1-13 (2010).
- Ryder L.S., Talbot N. J., *Regulation of appressorium development in pathogenic Fungi*, *Current Opinion in Plant Biology*, 26:8–13 (2015).
- Scharf D.H., Heinekamp T., Brakhage A.A., *Human and Plant Fungal Pathogens: The Role of Secondary Metabolites*, *PLOS Pathogens*, 10 (1): 1-3 (2014).
- Selin C., Kievit T., *Elucidating the Role of Effectors in Plant-Fungal Interactions: Progress and Challenges*, *Frontiers in Microbiology*, 7(Article 600): 1-21 (2016).
- Sexton A.C., Howlett B.J., *Parallels in Fungal Pathogenesis on Plant and Animal Hosts*, *Eukaryotic Cell*, 5(12): 1941–1949 (2006).
- Troncoso C., González X., Bömke C., Tudzynski B., Gong F., Hedden P., Rojas C., *Gibberellin biosynthesis and gibberellin oxidase activities in Fusarium sacchari, Fusarium konzum and Fusarium subglutinans strains*, *Phytochemistry*, 71: 1322–1331 (2010).
- Vadlapudi V., Naidu K.C., *Fungal pathogenicity of plants: Molecular approach*, *European Journal of Experimental Biology*, 1 (1): 38-42 (2011).
- Van der Does H.C., Martijn Rep M., *Virulence Genes and the Evolution of Host Specificity in Plant-Pathogenic Fungi*, *Mol Plant Microbe Interact*, 20(10):1175-82 (2007).
- Zeilinger S., Gupta V.K., Dahms T.E.S., Silva R.N., Singh H.B., Upadhyay R.S., Gomes E.V., Tsui C.K., Nayak S. C., *Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants*, *FEMS Microbiology Reviews*, 40(2):182-207 (2016).
- Zhao Z., Liu H., Wang C., Xu J., *Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi*, *BMC Genomics*, 14:1-15 (2013).