



Bartın Üniversitesi Mühendislik ve Teknoloji Bilimleri Dergisi



Buğdaylardaki Sürme Hastalığı *Tilletia Foetida*'nın Spesifik ISSR Markörler ile Erken Tespiti

Ahmet Umay^{1*}, İsmail POYRAZ¹, Gülçin AKGÖREN PALABIYIK², Fahri ALTAY¹

¹Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bilecik / TÜRKİYE

²Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Pazaryeri Meslek Yüksek Okulu, Organik Tarım Programı, Bilecik / TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 18.02.2015 Düzeltme Tarihi: 18.03.2015 Kabul Tarihi: 20.03.2015

Özet

Tilletia foetida, ülkemizde yaygın olarak görülen ve büyük oranlarda ekonomik kayıplara neden olan sürme hastalığının etmenidir. Hastalıkla mücadelede, her ne kadar kimyasal tarım ilaçları ve dayanıklı buğday çeşitlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar bulunsada, günümüzde hastalık etmeninin zamanla direnç kazandığı rapor edilmektedir. Bu nedenle, hastalıkla mücadelede hastalık bulaşmış (kontamine) tohumların erken tespitine yönelik çalışmaların önemi artmıştır. Bu çalışmada, *T. foetida*'ya özgü bir ISSR (inter-simple sequence repeat) markörünün geliştirilmesi amaçlanmıştır. 13 farklı *T. foetida* izolatu kullanılarak PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemiyle 25 farklı ISSR markörü denenmiş ve aralarından spesifik monomorfik bant veren markörler tespit edilmiştir. Karşılaştırma amacıyla ayrıca çalışmada bir *T. caries* izolatu da kullanılmıştır. 25 ISSR markörü arasından ISSR-847 kodlu markörün tüm izolatlar için spesifik 3 band verdiği gözlenmiştir. ISSR-847 markörü ile konakçı DNA kontaminasyonuna karşı ayrıca 10 farklı buğday çeşidine ait DNA ile PCR yapılmış ve farklı bant oluşumu gözlenmiştir. Sonuç olarak ISSR-847 markörünün, tohumlardaki sürme hastalığının erken tespitinde etkin olarak kullanılabilceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Tilletia foetida*, Sürme, ISSR Markörü, Erken Tespit

Development of Sepcific ISSR Markers for Early Detection of Common Bunt in Wheat Caused by *Tilletia Foetida*

Abstract

Tilletia foetida, the agent of common bunt is frequently seen in our country and causes serious economic loses. There are chemical pesticides for the protection of crops and studies in order to develop the disease-resistant wheat varieties, but the problem now is that there are reports recently published about gaining of the disease resistance by the time. Therefore, the studies which are carried out to detect contaminated seeds have become more important in fighting with the disease. In this study, the aim is to develop an ISSR marker which is particular to *T. foetida*. For this, 25 different ISSR markers were utilized using 13 different *T. foetida* isolates with PCR technique and specific monomorphic markers were determined among them. *T. caries* isolate was also used in order to make a comparison in this work. Among 25 markers, the ISSR-847-coded marker was found to produce 3 DNA fragments specific for *T. foetida* detection. DNA and PCR products which are related to 10 different wheat varieties were analyzed against host DNA contamination using ISSR-847 marker and different fragment formations were observed. As a result, it was determined that ISSR-847 marker could be used in the early detection of common bunt in seeds.

Keywords: *Tilletia foetida*, Common Bunt, ISSR Marker, Early Detection

1. Giriş

Sürme, ülkemizde buğdaylarda % 90 oranına kadar ürün kaybına sebep olan ve halk arasında Kör, Karamuk ve Karadoğu gibi isimlerle bilinen en önemli buğday hastalıklarından biridir (1, 2). Hastalığa başlıca iki mantar türü *Tilletia caries* (Bjerk.) Wint. (syn. *T. tiritici* (DC) Tul) and *T. foetida* Kuhn (syn. *T. levis*, *T. laevis* (Wallr.) Liro, *T. foetens* (Berk. & Curt.) Schoert.) neden olmaktadır (3, 4). Bu türler için yapılan tayin çalışmaları sonucunda, Türkiye'de *T. foetida*'nın % 88.06 oranında, *T. caries*' in ise % 11.94 oranında yaygınlık gösterdiği saptanmıştır (5, 6). Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere, Kanada, Kuzey Afrika ve Kuzey Asya gibi dünyanın çeşitli bölgelerinde de gözlemlenen sürme hastalığının (3) dünyada en yaygın olan türü ise *T. caries*' dir (7).

Sürme hastalığı, sağlıklı tanelere hasat zamanında hastalıklı tanelerin parçalanması ile ortaya çıkan mantar sporlarının hava yoluyla taşınması sonucu bulaşmaktadır. Kontamine tohumların ekilmesiyle de hastalık yayılmaktadır (8). Hastalıklı tohumların ekiminden sonra hastalığa yakalanmış bitkilerin başakları, süt olum dönemine gelinceye kadar sağlıklı bitkilerden ayırt edilemezler. Sürmeli bir buğday başağında yaklaşık 150 milyon mantar sporu bulunmakta ve bu sporlar ortalama yaklaşık 3 milyon tohumu kontamine etmektedir (9).

Buğdaylarda oldukça ciddi verim kaybına ve kalite düşüklüğüne neden olan sürmenin kontrol edilebilmesi için buğday tohumlarının ilaçlanması gerekmektedir. Ancak ilaçlama yöntemi, hem organik tarım açısından hem de çevreye zarar vermesi ve ekonomik olmaması nedeniyle uygun bir yöntem değildir (10). Hastalığın kontrol edilmesinde bir diğer yöntem ise hastalığa karşı dayanıklı buğday hatlarının geliştirilmesidir. Ancak hastalık etmeninin fizyolojik ırklarındaki hastalık yapma yeteneğinin (virülens) zamanla değişiklikler gösterdiği ve dolayısıyla hastalığa karşı uzun yıllar dayanıklı kalmasının mümkün olmadığı görülmüştür (11). Bu nedenden dolayı, sürme sporları ile kontamine olmuş tohumların önceden tespit edilmesi büyük önem taşımaktadır.

Son yıllarda, hastalıkla mücadelede genişleyen çevre bilinci ve organik tarıma karşı artan ilgi, kimyasal tarım ilaçlarının kullanımının azalmasına ve alternatif mücadele yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır (12). Alternatif mücadele yöntemleri içinde, kontamine tohumların erken tespitine yönelik moleküler markörlerin kullanımı ön plana çıkmıştır (13, 14, 12, 15, 9). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), bitki hastalıklarını teşhis ve tespit edilmesinde kullanılan önemli bir araçtır (9). Sürme sporları ile kontamine olmuş tohumları gözle ayırt edilmesi ya da tohumların tek tek mikroskopta incelenmesi mümkün olmayıp, etkin

yöntemler değildir. Bu çalışmada, *Tilletia foetida* tarafından kontamine olmuş buğday tohumlarının ekim öncesinde erken tespit edilebilmesi için PCR tabanlı yöntemine uygun bir ISSR moleküler markörünün geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Mantar Örnekleri

Çalışmada, 13 farklı *T. foetida* izolatu ile 1 *T. caries* izolatu (Tablo.1) ve sürmeye karşı dayanıklı ve hassas olan 18 farklı ekmeçlik buğday türü (Tablo.2) kullanılmıştır. Çalışma materyalleri Eskişehir Geçitkuşuğu Tarımsal Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir (Eskişehir, Türkiye).

2.2. DNA İzolasyonu

Hem buğday hem de sürme örneklerinin izolasyonu için küçük değişikliklerin yapıldığı CTAB yöntemi kullanılmıştır (16). Yaklaşık 100 gr'lık örnekler 2 mL lik ependorf tüplerine konularak üzerlerine 1mL CTAB (Hekzadesil Trimetil Amonyum Bromür) tamponu eklenmiş ve 45 dakika inkübe edilmiştir. Karışım tüpüne eşit hacimde kloroform:isoamil (24:1, v/v) alkol eklenmiş ve 10 dakika boyunca alt üst edilerek 7500 rpm' de 10 dk santrifüjlenmiştir. Tüplerdeki üst faz yeni bir ependorf tüpüne aktarılmış ve 2/3'ü kadar isopropanol (-20°C) karışıma eklenmiş ve örnekler 2 saat -20°C'de tutulmuştur. İnkübasyon sonunda örnekler 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve pelet 300 µL % 70'lik C₂H₅OH ile yıkanmıştır. Kuruyan peletler 50 µL DNase RNase-free ile çözdürülerek NanoDrop Spektrofotometre cihazında miktar ve kalite ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

2.3. ISSR-PCR

Buğday ve sürme örneklerinin ISSR-PCR analizi için, dizi bilgileri British Colombia Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarından (Kanada) temin edilen 25 farklı ISSR primeri taranmıştır (Tablo.3). PCR reaksiyonları 25 µL hacimde 1X Taq Buffer, 2 µM MgCl₂, 2.5 µM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), 2.5 µM primer, 6 ng kalıp DNA ve 1U Taq polimeraz enzimi (Fermentas, Amerika) kullanılarak hazırlanmıştır. Her bir primer için hazırlanan negatif kontrol reaksiyonlara eklenmiştir.

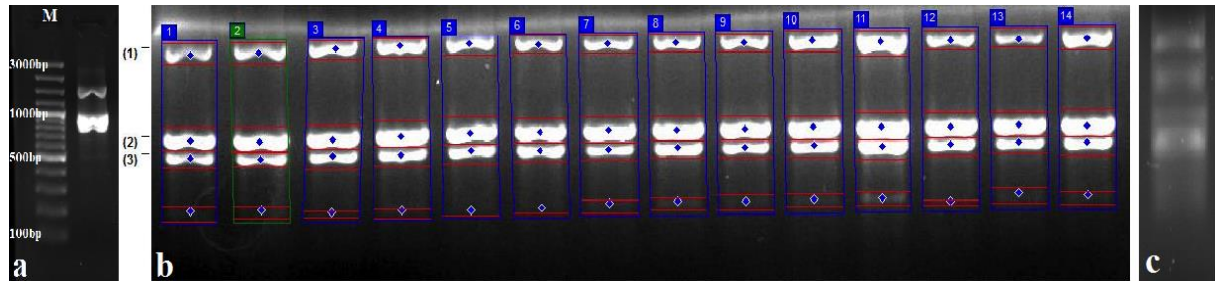
PCR reaksiyonu; 95 °C 4 dakika ön denatürasyon, 94 °C 45 saniye denatürasyon, 40-65 °C arası farklı primerler için 45 saniye oturma ısı, 72 °C 90 saniye uzama ve 72 °C 7 dakika final uzaması şeklinde 45 döngü olarak Techne TC Plus thermal cycler (Techne Inc., Amerika) cihazında gerçekleştirilmiştir. Tüm reaksiyonlar 3 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri, Etidyum Bromür (0.5 µg/mL) içeren %1.2'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra oluşan bant profilleri U.V. transillüminatör altında gözlemlenmiş ve Gel Logic 212Pro (Carestream, Amerika) jel dökümantasyon sistemi kullanılarak fotoğraflanmıştır. PCR sonrasında oluşan bantların büyüklükleri 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) kullanılarak kıyaslanmıştır.

2.4. Kontaminasyon Tespiti

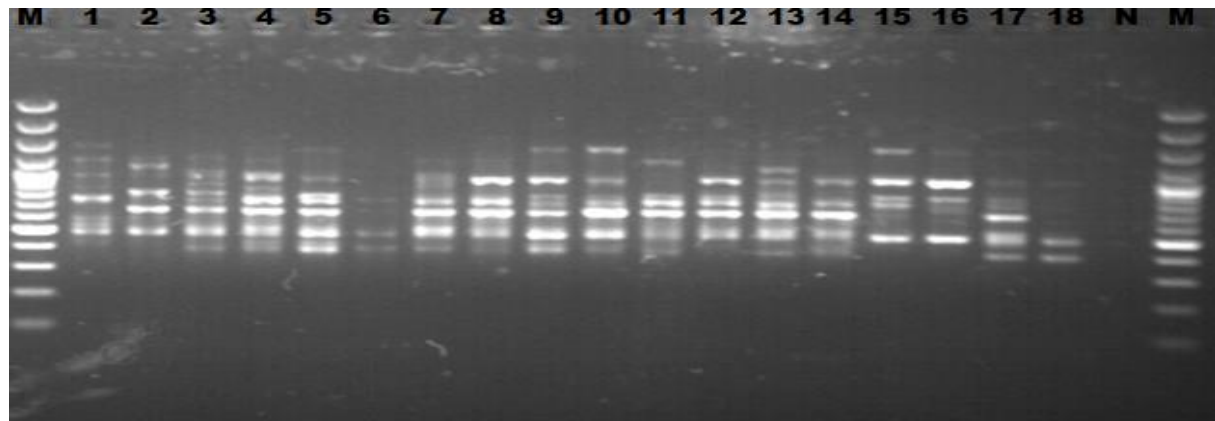
Kontamine olduğu bilinen buğday örnekleri, 2 mL lik ependorf tüplerinde 750 µL steril distile su ile yıkanmış, distile su mikropipetle ortamdandan alınıp 7500 rpm de 5 dakika santrifüjlenerek tüpün dip kısmından 2 µL alınarak PCR işleminde kullanılmıştır.

3. Bulgular

Sürme etmeni *T. foetida* ve *T. caries*'in ekim öncesi teşhis edilebilmesi için 25 farklı ISSR primeri taranmış ve bu primelerden sadece ISSR-847 nolu 5' CAC ACA CAC ACA CAC ARC 3' dizilimine sahip ISSR primerinin, belirgin olarak özgül yaklaşık 800 bp, 1000 bp ve 1500 bp büyüklüklerine sahip 3 bant verdiği görülmüştür (Şekil.1a). ISSR-847 primerinin toplam 14 izolat için yapılan PCR sonuçlarında her iki *Tilletia* türüne de özgül 3 bantın var olduğu görülmüştür (Şekil.1b). Taranan 25 markör'den 19 tanesinin tüm izolatlarda polimorfik ürünler verdiği, 5 primerin ise 3 tekrar yapılan reaksiyonlarda tüm izolatları temsil etmeyen yetersiz sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Monomorfik band veren ISSR-847 markörü ile konakçı DNA kontaminasyonunun olmadığını göstermek amacıyla 18 farklı buğday çeşidi ile gerçekleştirilen PCR işlemi sonucunda her iki *Tilletia* türünden farklı olarak bantların ürün olarak oluştuğu gözlenmiştir (Şekil.2). Kontamine örneklerden yapılan direk PCR işleminde de aynı 3 bantın oluşumu gözlenmiştir (Şekil.1c).



Şekil 1. a- ISSR-847 primeri ile elde edilen özgül 3 bant (yaklaşık 800, 1000, 1500bp) M: 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas), b- 1, 3-14. örnekler : *T. foetida*, 2. örnek: *T. caries*, c-Kontaminasyon test sonucu.



Şekil 2. ISSR-847 no.lu primerin buğdaylardaki ISSR-PCR sonuçları. M: 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas), 1-18: Test edilen buğday çeşitleri, N: Negatif kontrol.

4. Tartışma ve Sonuç

Geleneksel tarımda morfoloji temelli teknikleri kullanarak bitki patojenlerini tam anlamıyla tespit etmek ve tanımlamak yeterli olmamaktadır (15). *Tilletia* türlerinin ise teliospor morfolojileri, genomik yapıları ve ITS bölgelerinin birbirlerine son derece benzer olmasından dolayı, bu türleri birbirinden ayırt etmek de oldukça güçtür (17). ISSR markör'ler, RFLP (restriction fragment length polymorphism), AFLP (amplified fragment length polymorphism), RAPD (random amplification of polymorphic DNA), CAPS (cleavage amplified polymorphic sequence), SSR (simple sequence repeat) ve SCAR (sequence characterized amplified region) gibi çeşitli DNA markör'leri ile kıyaslandığında bazı avantajlara sahip yeni yöntemlerdir (18). Özellikle uygulanması kolay ve ekonomik

olmalarından dolayı ISSR markör'leri daha fazla tercih edilmektedir (13, 19, 20, 21).

Koprivica ve arkadaşları 2004 yılında *Tilletia*'nın NCBI'da (National Center for Biotechnology Information) bilinen ITS 1 DNA bölgesine tasarladıkları TILF ve TILr primerleri ile *T. caries* ve çüce sürme etmeni olan *Tilletia controversa*'yı tanımlaya yardımcı olacak 361 bp büyüklüğünde bant elde etmişlerdir. 2010 yılında da Gao ve arkadaşları, *T. controversa*'da ISSR818 nolu primer ile yaptıkları çalışmalar sonucunda elde ettikleri polimorfik bantlardan, *T. controversa*'yı teşhis edecek TCKSF3 ve TCKSR3 SCAR primerlerini geliştirmişlerdir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *Tilletia* izolatları, coğrafi orijinleri ve izole edildikleri konakçılar.

İzolat No	Tür	Coğrafi Orijin	Konakçı Buğday Çeşidi
İzolat 1	<i>T. foetida</i>	Tozman Yaylası Düden Mevkii	Kırkambar Awnless
İzolat 2	<i>T. caries</i>	Tozman Yaylası Düden Mevkii	Kırkambar Awnless
İzolat 3	<i>T. foetida</i>	Tozman Yaylası Düden Mevkii	Kırkambar Awnless
İzolat 4	<i>T. foetida</i>	Tozman Yaylası Düden Mevkii	Kırgız
İzolat 5	<i>T. foetida</i>	Tozman Yaylası Düden Mevkii	Kırgız
İzolat 6	<i>T. foetida</i>	Tozman Yaylası Düden Mevkii	Kırgız
İzolat 7	<i>T. foetida</i>	Kavacık Köyü	Gerek-kırgız-A
İzolat 8	<i>T. foetida</i>	Kavacık Köyü	Gerek-kırgız-A
İzolat 9	<i>T. foetida</i>	Kavacık Köyü	Gerek-kırgız-A
İzolat 10	<i>T. foetida</i>	Kavacık Köyü	Gerek-kırgız-B
İzolat 11	<i>T. foetida</i>	Kavacık Köyü	Gerek-kırgız-B
İzolat 12	<i>T. foetida</i>	Kavacık Köyü	Gerek-kırgız-B
İzolat 13	<i>T. foetida</i>	Tozman Yaylası Düden Mevkii	Katea
İzolat 14	<i>T. foetida</i>	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü	Gerek

Tablo 2. Konakçı DNA ayırımında kullanılan farklı buğday çeşitleri.

Örnek No	Buğday Çeşidi
1	Heines VI
2	SEL 2092
3	SEL1102
4	Ridit
5	Turkey 1558
6	Hohenheimer
7	Rio
8	SEL 50077
9	M82-2161
10	M82-2098
11	R63-6968
12	M82-2102
13	M82-2123
14	P.I.178383
15	M73-2154
16	P.I.173438
17	P.I.119333 (M82-2141), BW
18	ThuleIII; P.I. 181463, BW

Tablo 3. Taranan ISSR primerleri ve tarama sonuçları.

Primer Adı	Primer dizisi (5'-3')	PCR Sonucu
ISSR-01	AGAGAGAGAGAGAGAGG	Polimorfik
ISSR-02	GAGAGAGAGAGAGAGAT	Polimorfik
ISSR-10	GGGTGGGTTGGGGTG	Polimorfik
ISSR-25	TGTGTGTGTGTGTGTGA	Polimorfik
ISSR-27	GTGCGTGCCTGCCTGC	Polimorfik
ISSR-28	CGATGGATGGATGGAT	Polimorfik
ISSR-29	GAGAGAGAGAGAGAGAC	Polimorfik
ISSR-815	CTCTCTCTCTCTCTG	Polimorfik
ISSR-829	TCTCTCTCTCTCTCG	Polimorfik
ISSR-847	CACACACACACACARC	Monomorfik
ISSR-861	ACCACCACCACCACCACC	Polimorfik
ISSR-862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC	Polimorfik
ISSR-866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	Polimorfik
ISSR-301	GAGCAACAACAACAACAA	Polimorfik
ISSR-309	GAGAGAGAGAGAGAGAA	Polimorfik
ISSR-310	AGAGAGAGAGAGAGAGT	Polimorfik
ISSR-312	ACACACACACACACAC	Polimorfik
ISSR-324	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	Polimorfik
ISSR-03	GTG TGT GTG TGT GTG TC	Sonuç Çıkmadı
ISSR-04	ACA CAC ACA CAC ACA CC	Sonuç Çıkmadı
ISSR-09	GGA TGG ATG GAT GGA T	Sonuç Çıkmadı
ISSR-814	CTC TCT CTC TCT CTC TA	Sonuç Çıkmadı
ISSR-818	GTG TGT GTG TGT GTG TA	Sonuç Çıkmadı
ISSR-819	CAC ACA CAC ACA CAC AG	Sonuç Çıkmadı
ISSR-824	TGT GTG TGT GTG TGT GC	Sonuç Çıkmadı

Bu çalışmada, buğdayı enfekte eden sürme etmenlerinin, buğday toprağa ekilmeden önce tespit edilerek hastalığın kontrol edilmesini amaçlamış, bu sayede buğday tarımında kimyasal ilaç kullanımının azalması gibi gerek organik tarım açısından, gerekse ekonomik açıdan önemli kazançların elde edileceği öngörülmüştür. ISSR-847 primeri ile buğday ve sürme izolatları üzerinde yapılan PCR işlemi sonucu; bu primerin ilginç bir şekilde her iki *Tilletia* (*T. foetida* ve *T. caries*) türünde de spesifik 3 bant (Şekil 1a, 1b.) oluştuğu gözlenmiştir. Bu spesifik bantların konakçı DNA'sına ait olmadığı aynı primer ile yapılan PCR ile görülen farklı bantlar sonucunda teyit edilmiştir. Kontamine örneklerin kullanıldığı PCR örneklerinde de aynı bantların varlığı gözlenmiştir. Reaksiyon sonucu oluşan bantların farklı PCR koşullarından dolayı normalden daha silik bantlar verdiği gözlenmiştir (Şekil 1c.). Sonuç olarak ISSR-847 primerinin *T. foetida*'nın neden olduğu sürme hastalığının erken tespitinde bir markör olarak kullanılabilceği görülmüştür.

Teşekkür

Bu çalışmada sürme izolatlarının temin edilmesindeki katkılarından dolayı Eskişehir Geçit Kuşağı Araştırma Enstitüsünden Aysel YORGANCILAR'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Erarslan, A., Konya İlinde Buğday Tohumlarıyla Taşınan Sürme (*Tilletia* Spp.) Ve Açık Rastık (*Ustilago nuda* Var. *tritici* Schaffn.) Hastalıklarının Bulaşıklığı Üzerine Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi.2007.
2. Tuncel, M., Konya Yöresinde Hasat Edilen Buğday Ürünündeki Sürme Hastalığı (*Tilletia* spp.) Ve Hastalığın Patojenitesini Etkileyen Bazı Faktörler Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi. 10-12, 2006.
3. Matanguihan, J. B. and Jones, S. S., A New Pathogenic Race of *Tilletia caries* possessing the broadest virulence spectrum of known races. Online Plant Health Progress. doi:10.1094/PHP-2010-0520-01-RS. 2011.
4. Koprivica, M., Jevtic, R., Markovic, I.D., The Influence of *Tilletia* spp. Inoculum Source and Environmental Conditions on the Frequency of Infected Wheat Spikes. Pestic. Phytomed. 24, 185-196, 2009.
5. Finci, S., Parlak, Y., Bilgin, O., Gümüştekin, h., Aktuna, İ., Tunçdemir, M., Buğday Sürme Etmenleri (*Tilletia foetida* V/Allr.Liro Ve *T. Caries* (D.C)Tul.)nin Türkiye'de Yayılmış

Olan Irklarının Saptanması Üzerinde Araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni. 23, 124-147, 1983.

6. Özkan, M., Damgacı, E., Türkiye'de Buğdayın Sürme Türleri(*Tilletia Foetida* (Wallr.) Liro Ve *Tilletia Caries* (D.C) Tulj'nin 1949-1964 Ve 1983 Yıllarında Coğrafik Yayılışı Üzerine Araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni. 25, 1-17,1985.
7. Ingold, C.T., The Basidium Of *Tilletia* And Its Evolution. Mycologist. 12, 98-100, 1997.
8. Nagy, E., Moldovan, V., The Effect Of Fungicide Treatments On Wheat Common Bunt (*Tilletia* Spp.) In Transylvania. Agricultural Research and Development Station Turda. 401100, 33-38, 2007.
9. Koprivica, M., Zouhar, M., Prokinova, E., Rysanek, P., Detection of *Tilletia controversa* and *Tilletia caries* in wheat by PCR method. Plant Soil Environ. 50, 75-77, 2004.
10. Waldow, f., Jahn, M., Investigations in the regulation of common bunt (*Tilletia tritici*) of winter wheat with regard to threshold values, cultivar susceptibility and non-chemical protection measures. Journal of Plant Diseases and Protection. 114(6), 269-275, 2007.
11. Aktaş, H., Katırcıoğlu, Y. Z., Bazı Buğday ve Arpa Çeşit ve Hatlarının Önemli Bazı Fungal Patojenlere Karşı Reaksiyonları. Tarım Bilimleri Dergisi. 14 (4), 381-385, 2008.
12. Josefsen, L., Christiansen, K.S., PCR as a tool for the early detection and diagnosis of common bunt in wheat, caused by *Tilletia tritici*. Mycol. Res. 106, 1287-1292, 2002.
13. Gao, L., Yu, H., Han, W., Gao, F., Liu, T., Liu, B., Kang, X., Gao, J., Chen, W., Development of a SCAR marker for molecular detection and diagnosis of *Tilletia controversa* Kuhn, the causal fungus of wheat dwarf bunt. World J Microbiol Biotechnol. 30, 3185-3195, 2014.
14. Liu, J.H., Gao, L., Liu, T.G., Chen, W. Q., Development of a sequence-characterized amplified region marker for diagnosis of dwarf bunt of wheat and detection of *Tilletia controversa* Kuhn. The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology. 49, 235-240, 2009.
15. Majumder, D., Rajesh, T., Suting, E. G., Debbarma, A., Detection of seed borne pathogens in wheat: recent trends. Australian journal of Crop Science. 7(4), 500-507, 2003.
16. Doyle, J. J. and Doyle, J. L.. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19:11-15, 1987.

17. Yuan, Q., Nian, S., Yin, Y., Li, M., Cai, J., Wang, Z., Development of a PCR-based diagnostic tool specific to wheat dwarf bunt, caused by *Tilletia controversa*. *Eur J Plant Pathol.* 124, 585–594, 2009.
18. Gao, L., Chen, W. Q., Liu, T. G., Development of a SCAR Marker by Inter-Simple Sequence Repeat for Diagnosis of Dwarf Bunt of Wheat and Detection of *Tilletia controversa* KÜHN. *Folia Microbiol.* 55 (3), 258–264, 2010.
19. Perera, D., Barnes, D. J., Baldwin B, S., Reichert, N, A., Mutagenesis of in vitro cultures of *Miscanthus giganteus* cultivar Freedom and detecting polymorphisms of regenerated plants using ISSR markers. *Industrial Crops and Products.* 65, 110–116, 2014.
20. Nanda, S., Kar, B., Nayak, S., Jha, S., Joshi, K. R., Development of an ISSR based STS marker for sex identification in pointed gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.). *Scientia Horticulturae.* 150, 11–15, 2013.
21. He, L., Wang, S., Miao X., Wu, H., Huang Y., Identification of necrophagous fly species using ISSR and SCAR markers. *Forensic Science International* 168, 148–153, 2007.