

Cryphonectria parasitica' nin Hipovirüent Strainlerinin Fenol ve Kloroform İçermeyen dsRNA Analiz Yöntemi ile Belirlenmesi ve *Cryphonectria hypovirus 1*' in RT-PCR ile Tanınması

Eda MERSİN¹ , Serap Açıkgöz^{*2} , Ömer Erincik² 

¹ Kale Tarım İlçe Md. Kale/Denizli

² Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü AYDIN

Öz: Kestane Kanseri (*Cryphonectria parasitica*), *Castanea* spp., nin önemli bir hastalığı olup dal ve gövdelerde kanserlere yol açmakta ve ağaçların zamanla ölmesine sebep olmaktadır. 1964 yılında İtalya'da iyileşmekte olan kestane ağaçlarında ilk olarak hipovirulent kanserlerin fark edilmesini takiben biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılan dsRNA virüsü içeren hipovirulent strainler belirlenmiştir. Ülkemizde de Karadeniz ve Marmara Bölgeleri kestane alanlarından elde edilen *C. parasitica*'nın hipovirulent izolatlarının dsRNA içermiş oldukları belirlenmiştir. Hipovirulent izolatlardaki dsRNA'nın varlığını belirlemede genellikle Morris ve Dodds (1979)'un dsRNA izolasyon ve analiz yöntemi kullanılmaktadır. Bu çalışmada ise hipovirulent olabileceği belirlenen *C. parasitica* izolatlarında dsRNA varlığı belirlemek için Balijja ve ark. (2008) tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır. Diğer izolasyon yöntemlerine kıyasla daha kısa süre gerektirmesi, kullanılan miselyum ve kimyasal madde miktarının daha az olması ve fenol- kloroform içermemesi gibi avantajları nedeniyle gelecekte ülkemiz ve bölgemizde bu konuda yapılacak olan araştırmalara kolaylık sağlaması amacıyla bu çalışma planlanmıştır. Bu amaçla Ege, Karadeniz ve Marmara Bölgeleri kestane alanlarından kestane kanseri hastalığı ile bulaşık ağaçların iyileşme belirtisi gösteren kanser yaralarının kabuk dokularından elde edilen ve açık renk-beyaz misel oluşumu gözlenen izolatlar kullanılmıştır. Çalışma kapsamında 68 izolattan 30 tanesi dsRNA ekstraksiyonuna olanak sağlayan Balijja ve ark. (2008)' nin yöntemi ile analiz edilmiş ve 25 izolatın dsRNA profili içerdiği belirlenmiştir. dsRNA profili içeren altı izolat Morris ve Dodds (1979) yöntemi ile dsRNA varlığı yönünden doğrulanmıştır. Ardından, RT-PCR yöntemi ile 15 izolattan elde edilen dsRNA'ların hipovirüs *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: kestane kanseri, chestnut blight, dsRNA analizi, *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1)

Determination of Hypovirulence Strains of *Cryphonectria parasitica* by Using Non-Phenol-Chloroform dsRNA Analysis Method and Detection of *Cryphonectria hypovirus 1* by RT-PCR

Abstract: Chestnut blight, *Cryphonectria parasitica*, is a serious disease of *Castanea* spp. and causes bark cankers that progressively kill branches and trunks. Hypovirulent cancers were first identified with the awareness of chestnut trees recovering in Italy in 1964, and followed by hypovirulent strains containing the dsRNA virus used as a biological control agent. It has been determined that the hypovirulent isolates of *C. parasitica* have dsRNA which obtained from chestnut areas of the Black Sea and Marmara regions of Turkey. The dsRNA isolation and analysis method of Morris ve Dodds (1979) is usually used to determine the presence of dsRNA in hypovirulent isolates. In this study, to determine the presence of dsRNA in *C. parasitica* isolates, which may be hypovirulent, the method of Balijja and collaborators has been used (Balijja et al., 2008). This study was planned in order to investigate whether this method is applicable for conducting research in the future due to its advantages such as shorter time requirements, less amount of mycelium and chemicals used, and not involving phenol-chloroform compared to other isolation methods. For this purpose, the isolates collected from healing cankers of chestnut areas in the Aegean, Black Sea and Marmara regions of Turkey, where light-white mycelium formation was observed, were used. In this study, 30 isolates out of 68 were analyzed by Balijja et al.'s method and only 25 isolates were identified to contain dsRNA profile. dsRNA-containing six isolates were also analyzed by the method of Morris and Dodds, and the existence of dsRNA was confirmed. It was found that 15 of 25 dsRNAs belonged to the hypovirus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) by RT-PCR.

Keywords: *Cryphonectria parasitica*, Chestnut blight, dsRNA analysis, *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1)

GİRİŞ

Dünya kestane üretiminin %3'ü karşılayan ülkemizde, üretimin yaklaşık %33'ünü Aydın ili karşılamaktadır (Anonim, 2014). Bu da Dünya kestane üretiminin yaklaşık %1'dir. Amerikan kestane ağaçlarında (*Castanea dentata*) büyük bir yıkıma neden olan kestane kanseri salgını Kuzey Amerika' da 1904 yılında başlarken, Avrupa'da ise bu hastalık ilk olarak 1930'larda ortaya çıkmıştır. Kestane kanseri (*Cryphonectria parasitica* Murr. Bar.) Türkiye de dahil olmak üzere dünyanın birçok bölgesinde kestane varlığı için büyük bir tehdit

oluşturmaktadır. Kestane Kanseri Türkiye'de ilk olarak 1967'de Marmara Bölgesi'nde saptanmış (Akdoğan ve Erkam; 1968, Delen,1979; Baykal ve ark., 2000) ve bu bölgeden Ege (Çeliker, 2000; Çeliker ve Onoğur, 2001;

Sorumlu Yazar: serapackgz@gmail.com Bu çalışma yüksek lisans tezi ürünüdür ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimince ZRF- 16008 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

Geliş Tarihi: 13 Nisan 2018

Kabul Tarihi: 13 Aralık 2018

Erincik ve ark., 2003) ve Karadeniz Bölgelerindeki (Coşkun ve Kural., 1994; Coşkun ve ark., 1999) kestaneliklere yayılarak pek çok kestane ağacının ölümüne neden olmuştur (Delen, 1979; Coşkun ve ark., 1999). Aydın yöresindeki kestane alanlarındaki kurumlara *C. Parasitica*'nın neden olduğu ilk kez 2003 yılında saptanmıştır (Erincik ve ark., 2003). Kestane kanseri hastalığı enfeksiyonu genellikle gövdelerde ve dallarda kabuk nekrozu şeklinde olup özellikle hastalığın uzun süredir var olduğu bölgelerde birçok kestane ağacının ölümüne neden olmaktadır.

Kestane kanserinde (*C. parasitica*) hipovirüent ırklar olarak 1965 yılında bildirilmiştir (Grente, 1965). Kestane kanseri hastalık etmeniyle mücadelede etkili yöntemin, hipovirüent ırkların kullanıldığı biyolojik mücadele olduğu bildirilmiştir (Robin ve Heiniger, 2001; Milgroom ve Cortesi, 2004). *C. parasitica*'nın hipovirüent ırkları, zayıf patojen olmaları nedeniyle genellikle hastalık yapma yetenekleri düşüktür. Hastalığın kontrolü, doğal olarak veya yapay yollarla *C. parasitica*'nın hipovirüent ırklarının hastalıklı kestaneliklere girişi ve yayılması ile gerçekleşmektedir. Hipovirüente dönüşen *C. parasitica*'nın saldırganlığının azalması ile kabuk dokusunda çok derin tahripkar kanserler üzerinde oluşan yüzeysel kanserler, ağacın oluşturduğu kallus tabakası ile iyileşebilmektedir. Böylece ağacın gövdesinde hastalık bulunmasına rağmen ağaç yaşamını sürdürmektedir. Kestane alanlarına sahip bir çok ülkede, hipovirüent ırklar kullanılarak biyolojik yolla kestane kanseri ile başarılı bir şekilde mücadele edilebilmektedir (Heiniger ve Rigling, 1994; Bissegger ve ark., 1997; Robin ve Heiniger, 2001; Kristin ve ark., 2008).

Ülkemizde de hipovirüent ırklar kullanılarak (Çeliker ve Onoğur, 2001; Çeliker ve ark., 2006; Akıllı ve ark., 2009; Akıllı ve ark., 2012) yapılan uygulamalar sonucunda başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar ile hipovirüent ırklar ve kestane kanseri fungal etmeni (*C. parasitica*) arasındaki etkileşim iyi çalışılmış ve biyolojik mücadeledeki potansiyeli değerlendirilmiştir (Anagnostakis ve ark., 1998; Nuss, 1992; Suzuki ve Nuss, 2002). Hipovirüsler *C. parasitica*'yı enfekte edebilen sitoplazmik çift sarmallı RNA (dsRNA) mikovirüslerdir. Fungus virüs tarafından enfekte edilmekte ve böylelikle fungusun enfeksiyon gücünde azalma olmaktadır. Hipovirüensizliği oluşturan biyolojik kontrol ajanı dsRNA virüsünün en yaygın olarak kullanılanı *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1)'dir. Hipovirüs, hifsel anastomoz yoluyla hipovirüent bireyden vejetatif olarak uyumlu virulent bireye taşınarak onun hipovirüent fenotipe dönüştürülmesine neden olabilir.

Biyolojik mücadele çalışmalarında hipovirüent ırkların belirlenmesi için kullanılan dsRNA izolasyonunda Morris ve Dodds (1979); Valverde ve ark. (1990); Allemann ve ark. (1999) nın uyguladığı fenol kloroform ile ekstraksiyon

ve ardından CF-II kolon kromatografisi kullanılmıştır (Heiniger ve Rigling, 1994; Steenkamp ve ark., 1998; Güner ve ark., 2001; Çeliker ve Onoğur, 2001; Çeliker ve ark., 2006; Açıkgöz ve ark., 2009; Akıllı ve ark., 2009; Akıllı ve ark., 2011, 2012). Bu yöntemde fungal miselyum (6-10 gr) ve kullanılan kimyasal madde ihtiyacı fazla olup uygulama süresi dört ile beş gün arasında değişmektedir. Ayrıca izolasyon sırasında kullanılan fenol ve kloroform gibi insan sağlığı açısından risk oluşturan kimyasal maddeler bu yöntemlerin diğer bir dezavantajıdır.

2008 yılında Balija ve ark. (2008), fungal dokulardan dsRNA izolasyonunda kolaylık sağlayacak farklı bir yöntem geliştirmişlerdir. Morris ve Dodds (1979) ve diğer modifiye yöntemlerde dsRNA izolasyonu için 10 g fungal miselyum kullanılırken, Balija ve ark. (2008)'e göre kullanılan fungal miselyum miktarı 1/50 oranında azaltılabilmektedir. Fenol ve kloroform içermemesi, kullanılan kimyasal madde miktarının da önemli oranda azalması ve CF II (whatman®) selüloz kolon kullanılmaması ile bu yöntem maliyeti de düşürmektedir. Ayrıca dsRNA izolasyonunu bir gün gibi kısa bir sürede mümkün kılması, zamandan da tasarruf edilmesini sağlamaktadır. Morris ve Dodds (1979) yönteminin mikovirüslerin dsRNA izolasyonunda sıklıkla kullanılmasına rağmen, Balija ve ark. (2008)'nin fungus mikovirüsleri için geliştirdiği ekstraksiyon yöntemini uygulayan araştırmalara yaptığımız literatür taramalarında rastlanmamıştır. Balija ve ark. (2008), dsRNA izolasyonu için geliştirdiği yöntemi *Aspergillus niger*, *Cryphonectria parasitica*, *Gremmeniella abietina*, *Sphaeropsis sapinea* mikovirüsleri için uygulamış ve başarılı sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışma, *C. parasitica* gibi fungal dokulardan mikoviral dsRNA izolasyonunda Balija ve ark. (2008)'a ait yöntemin rutin testlerde elverişli olarak kullanılma durumunu araştırmak ve gelecekte ülkemiz ve bölgemizde bu konuda yapılacak olan araştırmalarda emek, zaman ve maliyet açısından kolaylık sağlanması amacıyla planlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

***Cryphonectria parasitica*'nın İzolasyonu ve Kültürel Özelliklerinin Belirlenmesi**

Çalışmada Karadeniz Marmara ve Ege Bölgelerinin farklı yerlerinden, hipovirüent belirtileri taşıyan kestane ağaçlarının gövdelerinden alınan 102 kabuk dokusu örnekleri kullanılmıştır. Örneklemeler kanserli bölgenin kenarı ile bir kısım sağlıklı dokunun da yer aldığı yaklaşık 3x4 cm boyutlarında bir kabuk parçasının kesici bir alet ile alınması ile yapılmıştır. Her bir örnek alma işleminden sonra kullanılan kesici alet, sodium hipoklorit ile silinerek yüzeysel dezenfeksiyon sağlanmıştır. Alınan örnekler kese kağıtlarına yerleştirilip numaralandırıldıktan sonra gün içerisinde buz kutusunda saklanmış ve izolasyon işlemine kadar +4°C' de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Kanserli kabuk dokularından 4 mm çapında mantar delici ile alınan disk

şeklindeki parçalar, %2' lik sodyum hipoklorit içinde 2 dakika bekletilerek yüzeysel olarak dezenfekte edilmiştir. Steril damıtık suda durulanan ve steril filtre kağıtları arasında kurutulan örnekler, petri kaplarında bulunan PDA besi ortamı üzerine yerleştirilerek 24°C' de 3-4 gün *C. parasitica*'nın gelişmesi için beklenmiştir (Anagnostakis, 2001). Gelişen koloniler mikolog Prof. Dr. Ömer Erincik tarafından incelenmiş ve *C. parasitica* olduğu düşünülen kolonilerden Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyeri ortamına aktarılarak izolatların saflaştırılma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kabuk dokularından elde edilen 68 adet *C. parasitica* izolatı, kültürel özelliklerinin belirlenmesi için PDA ortamına alınmışlardır. PDA üzerinde aktif olarak gelişen her bir izolata ait kolonilerin kenar kısımlarından alınan 4 mm çapındaki diskler, yine PDA içeren 9 cm'lik petrilerin orta kısmına yerleştirilerek inkübatörde 7 gün 25°C' de karanlıkta, daha sonra ışık altında 7 gün inkübe edilmiştir (Bissegger ve ark., 1997). İzolatların koloni renkleri beyaz, krem, açık turuncu ve turuncu olarak 7. ve 14. günlerde gözlemlenmiştir. Milgroom ve Cortesi (2004)'nin belirttiği üzere kültürlerde krem-beyaz gelişen izolatlar düşük virülensli (hipovirüent) (Anagnostakis ve Day, 1979; Bissegger ve ark., 1997; Milgroom ve Cortesi, 2004) kırmızı-turuncu renkte gelişen izolatlar ise virüent kabul edilmiştir. *C. parasitica* izolatları kültürel özelliklerine göre gruplandırılmış ve beyaz-krem renkte gelişen, düşük sporulasyon gösterdikleri belirlenen ve hipovirüent olma ihtimali olan 30 adet izolat dsRNA analizi için seçilmiştir. İzolatlar PDA ortamı üzerine serilen selefondisklere yerleştirildikten sonra 6-10 gün boyunca 24°C' de inkübatör içerisinde karanlıkta geliştirilmiş ve ardından selefondiskler üzerinde gelişen kolonilerden 100-200'er mg miselyum alüminyum folyo içerisinde yerleştirilerek dsRNA analizinde kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır. *C. parasitica* izolatlarından dsRNA izolasyonu için Baliija ve ark. (2008)'nin yöntemi uygulanmıştır. Daha sonra dsRNA içerdiği belirlenen bazı izolatların dsRNA varlığı Morris ve Dodds (1979)'un kullandığı izolasyon yöntemi ile doğrulanmıştır.

dsRNA izolasyon yöntemi (Baliija ve ark., 2008)

Derin dondurucuda (-20°C) bekletilen fungal miselyum (100-200 mg) havan içerisinde likit nitrojen ilave edilerek havaneli ile ezilmiş ve fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması için içerisinde 600 µL EBA (50mM Tris-HCl pH 8.5, 50mM EDTA %3 SDS, %1 β-mercaptoethanol, %1 PVPP-40) bulunan 2 mL' lik tüplere aktarılmıştır. +4 °C' de, 15 dakika, 16,110 xg' de santrifüj işleminden sonra oluşan süpernatant 1.5 mL' lik tüplere aktarılıp, üzerine etanol eklenmiştir. Karışım daha sonra mikro-kolonlara (ultrafree-MC sterile 0.65 µm, Millipore) aktarılarak ve 100 xg' de santrifüj edilmiştir. İki kez uygulanan 450 µL 1XSTE (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8.0) +EtOH (%20) ile yıkama işlemi sonucunda dsRNA dışındaki diğer nükleik asitler uzaklaştırılmıştır. dsRNA'ların iki kez 400 µL 1XSTE tampon solüsyon ile 2 mL lik toplama tüpleri içerisinde birikmesi sağlanmış ve üzerine eşit miktarda isopropanol eklenmiştir. +4°C'de, 30 dakika, 16,110xg' de santrifüj işleminden sonra tüp içerisindeki sıvı dökülerek pelet kurumaya bırakılmıştır. Pelet 20 µL RNase free su ile çözdürüldükten sonra, dsRNA' lar %0.8 agaroz jelde 80 V'

da 50 dakika 1X TBE 0.089M Tris-borate (0.089M Boric Acid, 0.002 EDTA) tampon solüsyonda elektroforeze tabi tutulmuş ve sonrasında jeldeki bantların pozisyonlarına göre değerlendirilmiştir (Shapira ve ark., 1991). Moleküler boyut standardı olarak Hind III ile kesilmiş λ DNA ve pozitif kontrol olarak USA-2 CHV-1 kullanılmıştır.

Baliija ve ark., (2008) yöntemine göre belirlenen bu izolatlardan altı adetinin dsRNA varlığı aşağıda verilen Morris ve Dodds (1979) yöntemi kullanılarak doğrulanmıştır.

dsRNA İzolasyon Yöntemi (Morris ve Dodds, 1979)

Derin dondurucuda (-80 °C) bir gece bekletilen 10 g fungal miselyum, likit nitrojen ilave edilen porselen havan içerisinde toz haline gelene kadar ezilmiştir. Toz halindeki örnek, içerisinde 10 mL 2 x STE + 0.5 mL %10'luk SDS + 11mL fenol-8 hidroksiquinolin + 5 mL kloroform:isoamilalkol (24:1) bulunan 50 mL lik tüplere ilave edilmiştir. Tüpler çalkalayıcıda 160 devirde 30 dakika buz içerisinde bekletilmiştir. Örnekler 8,000 xg' de 30 dakika +4°C de santrifüj edildikten sonra üst faz yeni steril tüplere aktarılmıştır. Daha sonra bu örnekler 20 mL olacık şekilde 1xSTE ile tamamlanarak ve 4 mL etanol ilave edildikten sonra bir gece +4°C de bekletilmiştir. dsRNA' nın total DNA dan ayrılmasını sağlayan CF-11 selüloz kolon kromatografisi yöntemine göre örnekler, 1 gr CF-11 (whatman®) selüloz içeren kolonlara aktarılmıştır. Örnekler kolonlara aktarıldıktan sonra kolonlar %16 etanol içeren 60 mL 1X STE tampon solüsyon ile yıkanarak son damlaya kadar akması beklenmiştir. İkinci yıkamada ise 6 mL 1XSTE ilave edilerek altta biriken süspansiyon tüplere toplanmış ve tüpler içerisinde 18 mL etanol ilave edilerek -37°C de bir gece bekletilmiştir. Bir sonraki gün örnekler -37°C den çıkarıldıktan sonra +4°C de 8,000 xg devirde 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra sıvı kısım boşaltılarak peletin kuruması için bir süre beklenmiştir. Pelet kuruduktan sonra 1X TBE ilave edilip resüspanse edilmiştir. Bu işlemin ardından tüplere kısa bir santrifüj işlemi uygulanmıştır. Tüpteki sıvı, mikropipet yardımıyla alınarak steril ependorf tüplere aktarılmış ve üzerlerine 900 µL % 95 lik etanol ve 30 µL 3M sodyum asetat eklenerek, - 20°C' de en az iki saat bekletilmiştir. Ertesi gün dondurucudan çıkarılan örnekler -4°C' de 5,000 xg' de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından tüpteki sıvı boşaltılarak pelet kurutulmuştur. Tüpler kuruduktan sonra 20 µL steril su ile resüspanse edilmiştir. Saflaştırılan dsRNA'lar %0.8 lik agaroz jelde 80 V' da 1 saat 1XTBE tampon solüsyonunda elektroforetik analize tabi tutulmuştur. Hind III ile kesilmiş λ DNA marker olarak, USA-2 CHV1 pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

dsRNA Mikovirüsünün Tanınması

dsRNA pozitif izolatlardaki mikovirüs türünün tanısı, Thermo Scientific Verso 1 tek basamaklı RT-PCR Hot-Start Kiti ile gerçekleştirilmiştir. CHV-1 ile enfekteli izolatların belirlenmesinde ORF A gen bölgesine spesifik hvep1 ve EP-721-4 primerleri (Gobbin ve ark., 2003; Bryner ve ark., 2012) kullanılmıştır (Çizelge 1). RT-PCR ürünlerinin elektroforezi %1'lik agaroz jelde 1XTBE tampon solüsyonunda yapılmıştır.

Çizelge 1. CHV-1 enfekteli izolatların tek basamaklı RT-PCR ile belirlenmesinde ORF A gen bölgesi çoğaltımı için kullanılan primerler

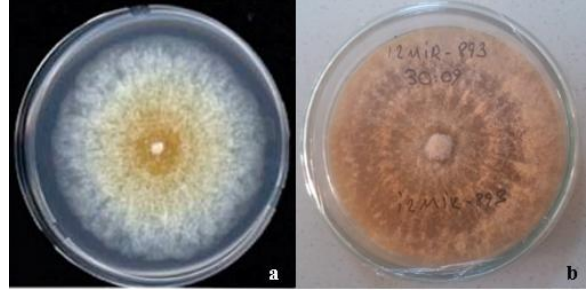
CHV-1 Primer	Bölge	Primer Sekansları (5-3)	Kaynaklar
hvep1 (Forward)	ORFA	TGACACGGAAGCTGAGTGTC	Gobbin ve ark., (2003)
EP721-4 Reverse)	ORFA	GGAAGTCGGACATGCCCTG	Gobbin ve ark., (2003); Bryner ve ark., (2012)

RT-PCR işlemi için, 1 µL verso enzim mix, 25 µL 2X 1-Step RT-PCR Hot-Start Master Mix, 2,5 µL RT Enhancer, 1 µL forward primer (10 pmol/µL), 1 µL reverse primer (10 pmol/µL) ile master mix hazırlanmıştır. Daha sonra 16,5 µL nükleaz-free su ile 47 µL ye tamamlanmıştır. Master mix her PCR tüpüne 47 µL olarak dağıtıldıktan sonra üzerine 3'er µL dsRNA ilave edilmiştir. Litaratürde belirtilen primerlere ait koşullar doğrultusunda RT-PCR yapılmıştır (Bryner ve ark., 2012). RT-PCR sonrası elde edilen ürünler %1' lik agoroz jelde 1 X TBE tampon solüsyonda yapılan elektroforez sonrası UV ışık altında görüntülenmiştir. Elde edilmesi beklenen bant büyüklüğü 693 bp (base pairs)'dir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

İzolatların Kültürel Özelliklerinin Belirlenmesi

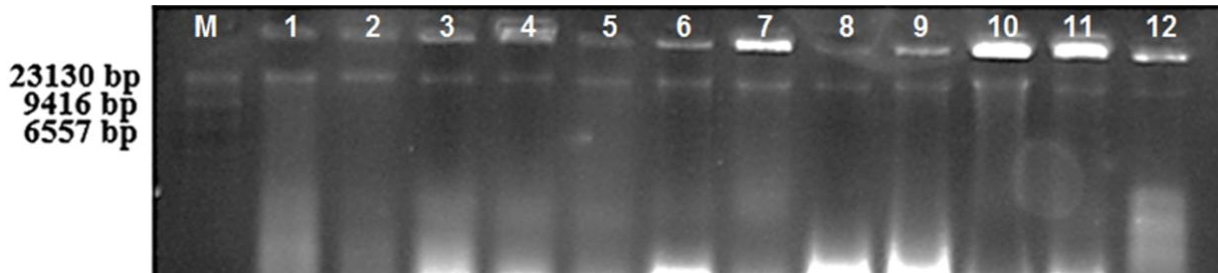
Kültürel özellikleri belirlenen ve koloni renklerine göre gruplandırılan (Şekil 1) 68 izolat arasında hipovirüent olduğu düşünülen seçilen beyaz ve açık turuncu renkte olan 30 izolat dsRNA varlığı yönünden incelenmiştir.



Şekil 1. PDA ortamında beyaz (a), turuncu (b) misel gelişimi gösteren *Cryphonectria parasitica* izolatları

İzolatların dsRNA İçeriklerinin Belirlenmesi

Hipovirüent olma potansiyeli olan ve seçilen 30 *C. parasitica* izolatından 25'inin dsRNA profili içerdiği Balija ve ark. (2008) yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 2). Pozitif kontrol olan USA-2 (CHV1, 12.700 bp) izolatının moleküler ağırlığı ile Balija ve ark. (2008)'nin yöntemine



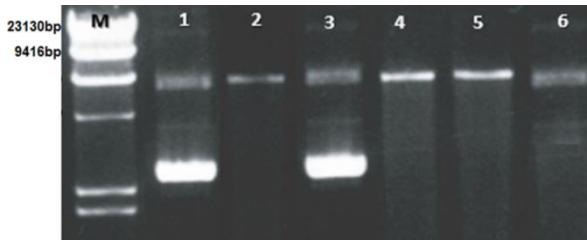
Şekil 2. Balija ve ark. (2008) yöntemi ile *Cryphonectria parasitica* izolatlarından elde edilen dsRNA'ların agar jel elektroforez görüntüsü Marker (M), Pozitif kontrol *Cryphonectria parasitica* USA-2 (1), Kcl-425 (2), Brs-786 (3), Zgl-724 (4), Dzc-580 (5), Rz-155 (6), Brs-789 (7), Grs-257 (8), Zgl-705 (9), Brs-786 (10), Arv-28-B (11), Zgl-709 (12)

göre dsRNA profili belirlenen 25 izolatın moleküler ağırlığının birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. *C. parasitica*'nın tanımlanan en eski izolatı EP713'ün en büyük dsRNA bileşeninin uzunluğu 12.700 bp'dir (Shapira ve ark., 1991). Radocz (2001)'in bildirdiğine göre Macaristan'dan elde edilen 600 izolattan 36 tanesinde L-dsRNA tespit edilmiş ve bunların boyutlarının yaklaşık 12.700 bp olduğu belirlenmiştir. Hogan (2006) 35 izolatın dsRNA molekül boyutunu EP713 (12.700 bp) izolatı ile karşılaştırmış ve bu izolatların molekül boyutlarının yaklaşık olarak aynı olduğunu tespit etmiştir. Slovenya'da Krstin ve ark., (2011) 49 *C. parasitica* izolatında moleküler boyutları 12.000-13.000 bp arasında değişen dsRNA ları belirlemişlerdir. Akıllı ve ark., (2012) ise boyutu yaklaşık 13.000 bp olan 55 *C. parasitica* izolatında dsRNA tespit etmişlerdir. Aydın

bölgesindeki hipovirüent *C. parasitica* izolatlarını belirlemek için Morris ve Dodds (1979) yöntemi kullanılarak tek bir izolatta moleküler boyutu 12.000-13.000 bp arasında olan dsRNA profili belirlenmiş, ancak fungusun tek spor izolatından dsRNA profili elde edilememiştir (Açıkgöz ve ark., 2009). Çizelge 2' de görüldüğü gibi, dsRNA pozitif olan izolatlar Marmara ve Karadeniz Bölgelerinden elde edilmiştir. Bu iller Artvin, Düzce, Giresun, Kastamonu, Rize, Sinop, Trabzon, Zonguldak, Bursa ve Kocaeli'dir. Balija ve ark., (2008) yöntemine göre dsRNA profili içerdiği belirlenen 6 izolatın dsRNA varlığı Morris ve Dodds (1979) yöntemi ile de teyit edilmiş ve aynı profiller elde edilmiştir (Şekil 3). Bu bulgu, Balija ve ark., (2008)'e göre dsRNA izolasyon yöntemi sonuçlarımızı doğrulamıştır.

Çizelge 2. Bölge ve illere göre dsRNA analizi yapılan, dsRNA bulunan ve CHV-I olduğu tespit edilen *Cryphonectria parasitica* izolat kodları ve sayıları

Bölgeler	İller	Kabuk örneği	İzolat sayısı	İzolat kodları	dsRNA+	CHV-I+
Karadeniz	Artvin	5	2	Arv-28-B, Arv-34	2	1
	Bartın	7	4		-	-
	Düzce	8	5	Dzc-580, Dzc-581, Dzc-587, Dzc-602, Dzc-631-B	4	2
	Giresun	8	4	Grs-257, Grs-308	2	1
	Kastamonu	3	1	Ksm-B-158	1	1
	Rize	8	5	Rz-116,Rz-123,Rz-145, Rz-155	2	1
	Sinop	4	2	Snp-892, Snp-915, Snp-928	2	1
	Trabzon	6	4	Tbz-209	1	-
	Zonguldak	11	6	Zgl-646,Zgl-695,Zgl-705, Zgl-709, Zgl-724	4	3
Marmara	Bursa	5	4	Brs-786, Brs-789, Brs-792, Brs-859	4	3
	Kocaeli	8	5	Kcl-425,Kcl-431,Kcl-423, Kcl-444	3	2
Ege	Aydın	19	16		-	-
	İzmir	10	10		-	-
Toplam		102	68	25	25	15

**Şekil 3.** Morris ve Dodds (1979) yöntemi ile *Cryphonectria parasitica* izolatlarından elde edilen dsRNA' ların agar jel elektroforez görüntüsü. Marker (M), Brs-786 (1), Grs-257 (2), Rz-123 (3), Dzc-602 (4), Zgl-705 (5), Kcl-425 (6)

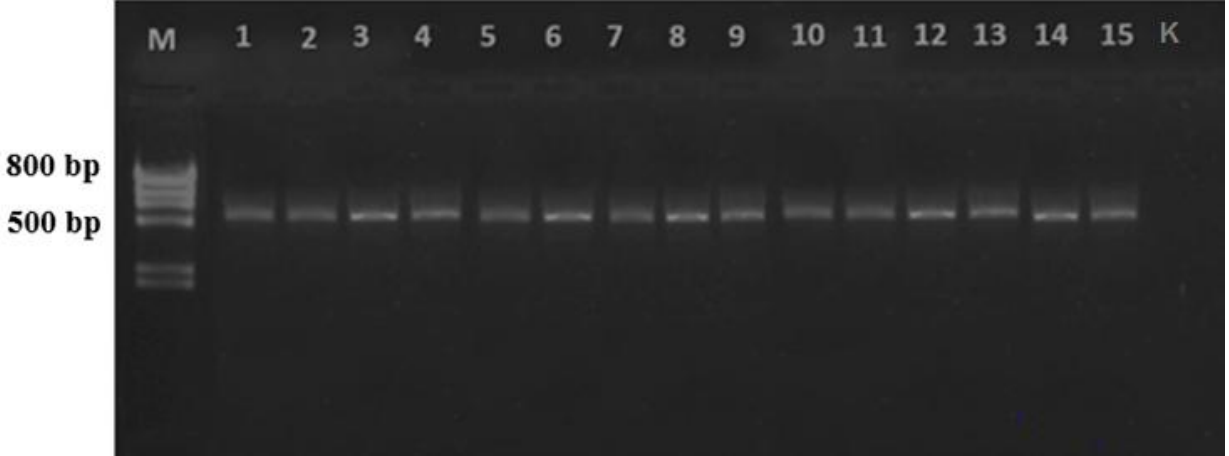
C.parasitica'nın hipovirulent ırklarının belirlenmesinde bazı küçük değişiklikler yaparak, Morris ve Dodds (1979), Valverde ve ark. (1990) ve Allemann ve ark. (1999)' nın dsRNA izolasyon yöntemlerini bir çok araştırıcı uygulamıştır (Heiniger ve Rigling, 1994; Steenkamp ve ark., 1998; Güner ve ark., 2001; Çeliker ve Onoğur, 2001; Çeliker ve ark., 2006; Akıllı ve ark., 2009; Akıllı ve ark., 2012). Kullanılan bu yöntemlerde 6-10 gr fungal miselyum gerekmekte olup, uygulama süresi 4 - 5 gün arasında değişmektedir. Bunlara ilave olarak izolasyon sırasında kullanılan fenol ve kloroform insan sağlığı açısından risk oluşturan kimyasal maddeler grubu içerisinde yer almaktadır.

Balija ve ark., (2008) dsRNA izolasyonu yönteminin, Morris ve Dodds (1979) yöntemine kıyasla ihtiyaç duyulan fungal miselyum miktarını 10 g' dan 100-200 mg' a kadar düşürdüğü, kullanılan kimyasal madde oranını büyük oranda azalttığı, fenol-kloroform içermediği ve 5-6 gün süren analiz sürecini tek bir güne düşürdüğü bu çalışma ile kendi labratuar koşullarımızda belirlenmiştir. Bu yöntem, analiz sürecinde kullanılan kimyasal maddelerin miktarını azaltarak hem maliyeti düşürmekte hem de izolatlardan elde edilen dsRNA bandlarının agar jel elektroforezinde aynı gün içerisinde gözlemlenmesine olanak sağlamaktadır. Morris ve Dodds (1979) yöntemi ile 5-6 günde elde edilen sonuçlar, bu analiz yöntemi ile bir günde elde edilmekte ve aynı süre zarfında daha fazla izolatın dsRNA içerip içermediğinin de araştırılabilmesine imkan sağlamaktadır.

dsRNA Mikovirüsünün Tanınması

RT-PCR sonucunda dsRNA profili içeren 25 izolatın 15'nde CHV-I hipovirüsüne ait 693 Kbp moleküler boyutta bantlar görüntülenmiştir (Şekil 4).

Karadeniz ve Marmara Bölgelerinden elde edilen ve dsRNA içeren izolatların *Cryphonectria hypovirus 1*' a ait olduğu belirlenmiştir. Çizelge 2' de görüldüğü gibi Karadeniz Bölgesinde 8 farklı ilden (Artvin, Düzce, Giresun, Kastamonu, Rize, Sinop, Zonguldak) elde edilen izolatlardan 10' nun CHV-I olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. dsRNA içeren *Cryphonectria parasitica* izolatlarının RT-PCR test sonuçları; DNA ladder mix (MBI Fermentas) (M), Kcl-423 (1), Kcl-425 (2), Ksm-B-158 (3), Dzc-580 (4), (5), Brs-792 (6), Grs-257 (7), Brs-789 (8), Rz-123 (9), Zgl-705 (10), Brs-786 (11), Art-28-B (12), Zgl-709 (13), Zgl-724 (14), Dzc-602 8 (15), su kontrol (K)

Marmara Bölgesi Bursa ve Kocaeli illerinden elde edilen ve dsRNA içeren 5 izolatın da *Cryphonectria hypovirus 1* grubuna ait olduğu saptanmıştır. 2012 yılında yapılan bir çalışma ile de Marmara ve Karadeniz Bölgelerinden elde edilen 72 adet *C. parasitica* izolatından 55'inin CHV-1 hipovirüsü ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir (Akıllı ve ark., 2012). CHV-1'in, Almanya, Fransa ve İspanya da yaygın olarak görüldüğü bildirilmiştir (Hillman ve ark., 1994; Allemann ve ark., 1999; Gobbin ve ark., 2003; Milgroom ve Cortesi, 2004; Montenegro ve ark., 2008). Hırvatistan'dan elde edilen 338 *C. parasitica* izolatının dsRNA içeren 36'sininin (Krstin ve ark., 2008), İspanya'nın Katalonya bölgesinden elde edilen 312 izolattan 35 tanesinin (Castano ve ark., 2014); Slovenya'da 21 izolatın, (Krstin ve ark., 2011), Batı İspanya da 14 dsRNA içeren izolatın (Zamora ve ark., 2012) CHV-1 ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir.

SONUÇ

Biyolojik mücadele amaçlı çalışmalar kapsamında Marmara ve Karadeniz Bölgesi kestaneliklerinden elde edilen *C. parasitica*'nın hipovirulent izolatlardaki dsRNA'nın varlığının belirlenmesinde avantajları nedeni ile Balija ve ark., (2008) tarafından geliştirilen yöntemin başarıyla kullanılabilmesi belirlenmiştir. Aydın Yöresi izolatlarından bir tanesinde dsRNA profili belirlenmiş, ancak fungusun tek spor izolatından yapılan izolasyonda dsRNA profili elde edilememiştir (Açıkgöz ve ark., 2009). Buna bağlı olarak *Cryphonectria hypovirus 1*' varlığı da söz konusu olmamaktadır. Hipovirulensliğin Ege Bölgesinde saptanmamış olduğu daha önce de bildirilmiştir (Çeliker, 2000). Karadeniz ve Marmara Bölgelerinden elde edilen ve vejetatif uyum grupları ve mating tipleri belirlenen hipovirulent izolatların Aydın izolatları ile uyumlu

olanlarının, kestane kanserinin Ege Bölgesinde biyolojik mücadele çalışmalarında kullanılabilme potansiyeli bulunmaktadır. Biyolojik mücadelede ilk basamakta hipovirulent olma ihtimali olan çok sayıda izolatın dsRNA varlığı yönünden test edilmesi gerekmektedir. DsRNA izolasyonu için Balija ve ark., (2008) yönteminin diğer izolasyon yöntemlerine göre kullanılan fungal miselyum ve kimyasal madde miktarının az olması, yöntemin fenol-kloroform içermemesi ve dsRNA izolasyon süresinin bir gün gibi kısa bir sürede gerçekleştirilebiliyor olması gibi avantajları olduğu kendi laboratuvarımızda yapılan bu çalışma sonucunda tespit edilmiştir. Bu nedenle zaman, emek, maliyet ve insan sağlığı yönünden avantajları olan Balija ve ark., (2008) yönteminin gelecekte ülkemiz ve bölgemizde yapılacak olan mikovirüs çalışmalarında kolaylık sağlaması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Açıkgöz S, Döken T, Erincik Ö, Değirmenci F (2009) Determination of hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* by dsRNA analysis in Aydın Province, Turkey. Acta Horticulture (866): 379–385.
- Akdoğan S., Erkan E (1968) Dikkat! Kestane kanseri hastalığı görüldü. Tomurcuk (1):4–5.
- Akıllı S, Katircioğlu Y Z, Maden S (2009) Vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica*, causal agent of chestnut blight, in the Black Sea region of Turkey. Forest Pathology (39):390–396.
- Akıllı S, Katircioğlu Y K, Maden S (2011) Biological control of chestnut canker, caused by *Cryphonectria parasitica*, by antagonistic organisms and hypovirulent isolates. Turkish Journal Agriculture and Forestry (35): 515–523.

- Akıllı S, Ulubaş S Ç, Katırcıoğlu Y Z, Maden S, Rigling, D (2012) Characterization of hypovirulent isolates of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* from the Marmara and Black Sea regions of Turkey. *European Journal of Plant Pathology* 135 (2): 323–334.
- Allemann C, Hoegger P, Heiniger U, Rigling D (1999) Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV1) in Europe, assessed using RFLP markers. *Molecular Ecology* (8): 843–854.
- Anagnostakis S L, Day P R (1979) Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. *Phytopathology*, (69): 1226–1229.
- Anagnostakis S L, Chen B, Geletka L M, Nuss D L (1998) Hypovirus transmission to ascospore progeny by field-released transgenic hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology* (88): 598–604.
- Anonim (2014) Türkiye İstatistik Kurumu Konularına Göre İstatistikler Veri Tabanı <http://www.tuik.gov.tr> Erişim Tarihi: 22.10.2016
- Balijja A, Kvarnheden A, Turchetti T (2008) A non-phenolchloroform extraction of double-Stranded RNA from plant and fungal tissues. *Journal of Virological Methods* (152): 32–37.
- Bissegger M, Rigling D, Heiniger U (1997) Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European chestnut forests in the presence of natural hypovirulence. *Phytopathology* (87): 50–59.
- Bryner S F, Rigling D, Brunner P C (2012) Invasion history and demographic pattern of *Cryphonectria hypovirus 1* across European populations of the chestnut blight fungus. *Ecology and Evolution* (2):3227–3241.
- Castano C, Bassie L, Oliach D, Gomez M, Medina V, Liu B, Colinas C (2014) *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) survey reveals low occurrence and diversity of subtypes in NE Spain. *Forest Pathology* (45):51–59.
- Coşkun H, Kural I (1994) Kestane kanseri *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. Hastalığının mücadelesi üzerinde araştırmalar. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü BKA/01/F-094 Nolu Proje.
- Coşkun H, Turchetti T, Maresi G, Santagada A (1999) Preliminary investigations into *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr isolates from Turkey. *Phytopathologia Mediterranea* 38(2):101–110.
- Çeliker N M (2000) Kestane Kanseri (*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr.)'nın Hipovirulent Irklarla Savaşımı Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, p.116.
- Çeliker N M, Onoğur E (2001) Evaluation of hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* for the biological control of chestnut blight in Turkey. *Forest Snow and Landscape Research* (76): 378–382.
- Çeliker N M, Onoğur E, Uygun H (2006) Ege Bölgesinde Kestane Kanseri (*Cryphonectria parasitica*) Hastalığının Hipovirulent Irklarla Doğal Koşullarda Biyolojik Kontrolü TC Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü BS-03/05-04-115 Nolu Proje Sonuç Raporu.
- Delen N (1979) Studies on the control possibilities of Chesnut Blight (*Endothia parasitica* (Murr.) A and A) in Turkey. *The Journal Turkish Phytopathology* 8 (2-3): 51–76.
- Erincik Ö, Döken T M, Açıkğöz S, Ertan E (2003) First report for Aydın, Turkey: *Cryphonectria parasitica* (Murrill.) Barr. Threatens the chestnut orchards. *The Journal Turkish Phytopathology* (32): 41–44.
- Gobbin D, Hoegger P J, Heiniger U, Rigling D (2003) Sequence variation and evolution of *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) in Europe. *Virus Research* (97): 39–46.
- Gürer M, Ottaviani M P, Cortesi P (2001) Genetic diversity of subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in two chestnut-growing regions in Turkey. *Forest Snow and Landscape Research* (76): 383–386.
- Heiniger U, Rigling D (1994) Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology* (32):581–99.
- Hillman B I, Halper B T, Brown M P (1994) A Viral dsRNA element of the chestnut blight fungus with a distinct genetic organization. *Virology* (201):241–250.
- Hogan E P (2006) Population biology of *Cryphonectria parasitica* infected with *Cryphonectria hypovirus 1* on American chestnut trees. The Faculty of the Virginia Polytechnic Institute Doktora Tezi (Basılmamış) Virginia.
- Krstin L, Novak-Agbaba S, Rigling D, Krajacic M, Curkovic Perica M (2008) Chestnut blight fungus in Croatia: diversity of vegetative compatibility types, mating types and genetic variability of associated *Cryphonectria hypovirus 1*. *Plant Pathology* (57):1086–1092.
- Krstin L, Novak-Agbaba S, Rigling D, Curkovic Perica M (2011) Diversity of vegetative compatibility types, mating types of *Cryphonectria parasitica* in Slovenia and occurrence of associated *Cryphonectria hypovirus 1*. *Plant Pathology* (60):752–761.
- Milgroom M G, Cortesi P (2004) Biological control of chestnut blight with the hypovirulence: A critical analysis. *Annual Review of Phytopathology* (42):311–318.
- Montenegro D, Aguin O, Sainz M J, Hermida M, Mansilla J P (2008) Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence of hypovirulence of *Cryphonectria parasitica* in chestnut stands in NW Spain. *Forest Ecology and Management* (256):973–980.
- Morris T J, Dodds J A (1979) Isolation and Analysis of Double-Stranded RNA from Virus-Infected Plant and Fungal Tissue. *Phytopathology* (69): 854–857.
- Radocz L (2001) Study of subpopulations of the chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*) fungus in the Carpathian basin. *Forest Snow and Landscape Research* 76, 3: 368–372.
- Robin C and Heiniger U (2001) Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and

- biocontrol. Forest Snow and Landscape Research (76): 361–367.
- Shapira R, Choi G, Nuss D L (1991) Virus-like genetic organization and expression strategy for a double-stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight. EMBO Journal (10): 731–739
- Suzuki N, Nuss D L (2002) Contribution of protein p49 to hypovirus-mediated modulation of fungal host phenotype and viral RNA accumulation. Journal of Virology (76): 7747–7759.
- Steenkamp ET Wingfield BD Swart WJ and Wingfield MJ (1998) Double-stranded RNA and associated virulence in South African isolates of *Sphaeropsis sapinea*. Canadian Journal of Botany 76(8):1412–1417.
- Valverde R A, Nameth S T, Jordan R L (1990) Analysis of double stranded RNA for plant virus diagnosis. Plant Disease (74) 255–258.
- Zamora P, Martin A B, Rigling D, Diez J J (2012) Diversity of *Cryphonectria parasitica* in western Spain and identification of hypovirus-infected isolates. Forest Pathology (42): 412–419.