



HetRV6 ve HetPV13 mikovirüslerinin *Heterobasidion abietinum* ve *Heterobasidion annosum* izolatlarına aktarımı

Ayşe Gülden Aday Kaya^{a,*} , H. Tuğba Doğmuş Lehtijärvi^b 

Özet: *Heterobasidion annosum* Fr. Bref. sensu lato, Kuzey Yarım kürenin ılıman kuşakta yer alan ülkelerinde, özellikle ibrelî ağaç türlerinde kök ve kök boğazı çürüklüğüne neden olan oldukça tahripkâr bir hastalık etmenidir. *Heterobasidion* türlerinin mücadelesinde, fungusun konukçusu olmayan ağaç türlerinin seçimi, kimyasal maddeler ve biyolojik kontrol etmenleri kullanılmaktadır. Ancak, bu kontrol yöntemlerinin hiçbirisi patojene karşı tam koruma sağlamamaktadır. Bu bağlamda, hastalık etmeni ile mücadele yöntemlerinin geliştirilmesinde sürdürülebilir alternatif metotların araştırılması, önem arz etmektedir. *Heterobasidion* türleri de dahil olmak üzere birçok fungal türün, çok sayıda farklı mikovirüs topluluğunu barındırdığı bilinmektedir. Bu mikovirüsler, patojen fungusların neden olduğu kayıpları en aza indirerek hastalığı kontrol altına alabilmek üzere biyokontrol ajanı olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, mikovirüs aktarımı ile, annosum kök ve alt gövde çürüklüğüne karşı mücadele olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır. Denemelerde HetPV3-an1 ve HetRV6-ab6 virüsü ile enfekte iki donör izolat ile virüs içermeyen 5 adet *H. annosum* sensu str., 20 adet *H. abietinum* izolatı kullanılmıştır. Her iki grupta yer alan izolatlar %2 malt extract agar bulunan Petri kaplarına karşılıklı olarak ekilmiş ve 20°C'de 3 ay süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, gelişmekte olan hiflerin uç kısmından ve koloniler arasındaki birleşim noktasından alınan hifler, Malt- Orange Serum Agar ortamına aktarılmıştır. Alıcı izolatlar potansiyel dsRNA aktarımının gerçekleşip gerçekleşmediği, spesifik primerler ile RT-PCR metodu kullanılarak belirlenmiştir. Denemeler sonunda, test edilen *H. abietinum* izolatlarının % 15' si, *H. annosum* izolatlarının ise % 20'si dsRNA partikülü başarılı bir şekilde aktarılmış ve RT-PCR ile tek segmentli virüs varlığı kesinleştirilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak, mikrovirüs aktarımı yüzdesinin düşük de olsa başarılı olduğu ve gelecekte in vivo çalışmalarla biyokontrol ajanı olarak kullanılabilceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: dsRNA, Donör izolat, Annosum kök çürüklüğü

Transmission of HetRV6 ve HetPV13 Mycoviruses to *Heterobasidion abietinum* and *Heterobasidion annosum* isolates

Abstract: *Heterobasidion annosum* Fr. Bref. sensu lato is a highly destructive disease factor that causes root and root collar rot in the temperate zone of the Northern Hemisphere, especially in coniferous tree species. In the control of *Heterobasidion* species, the selection of tree species that are not host to the fungus, chemical substances and biological control agents are used. However, none of these control methods provide complete protection against the pathogen. In this context, it is important to search for sustainable alternative methods of combating the disease agent. Many fungal species, including *Heterobasidion* species, are known to host a large number of different mycoviruses. These mycoviruses are used as biocontrol agents to minimize the losses caused by pathogenic fungi and control the disease. In this study, it was aimed to investigate the possibilities of fighting against annosum root and butt rot by mycovirus transmission. In the experiments, two donor isolates infected with HetPV3-an1 and HetRV6-ab6 viruses and 5 *H. annosum* sensu str. and 20 *H. abietinum* isolates without virus were used. Isolates in both groups were tested in a dual culture in Petri dishes with 2% malt extract agar and incubated at 20 ° C for 3 months. At the end of the incubation period, the hyphae taken from the tip of the developing hyphae and the junction between the colonies were transferred to Malt-Orange Serum Agar medium. Potential dsRNA transfer to the recipient isolates occurred was determined using the RT-PCR method with specific primers. At the end of the trials, the dsRNA particle of 15% of the tested *H. abietinum* isolates and 20% of the *H. annosum* isolates were successfully transferred and the presence of single segment virus was confirmed by RT-PCR. Based on these results, even it is thought that the percentage of mycovirus transmission is low, and it can be used as biocontrol agent in future in vivo studies.

Keywords: dsRNA, Donor isolates, Annosum root rot

1. Giriş

Mikovirüsler, fungusları konukçu organizma olarak kullanan obligat parazitlerdir (Lemke ve Nash, 1974). Mikovirüslerin, çoğunlukla konukçu oldukları funguslarda fenotipik değişimlere bazen ise fungusların toksin salgılamasına ve hücre içinde bozulmalara yol açtığı

bilinmektedir (Newhouse vd., 1983; Magliani vd., 1997; McCabe vd., 1999). Mikovirüslerin bir fungustan diğerine taşınması, sporlar ve anastomosis yolu ile gerçekleşmektedir (Buck, 1986; Ghabrial, 1994; 1998). Virüslerin genomları, RNA'dan oluşan tek sarmallı (ss-single-stranded) ya da çift-sarmallı (ds-double-stranded) nükleik asitlerden meydana gelmektedir (Nuss ve Koltin, 1990). Funguslarda bulunan

✉ ^a Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Yenişarbademli Meslek Yüksekokulu, Isparta, Türkiye

^b Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Orman Fakültesi Orman Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

@ ^{*} **Corresponding author** (İletişim yazarı): guldenaday@isparta.edu.tr

✓ **Received** (Geliş tarihi): 03.08.2020, **Accepted** (Kabul tarihi): 31.10.2020



Citation (Atıf): Aday Kaya, A.G., Doğmuş Lehtijärvi, H.T., 2020. HetRV6 ve HetPV13 mikovirüslerinin *Heterobasidion abietinum* ve *Heterobasidion annosum* izolatlarına aktarımı. Turkish Journal of Forestry, 21(4): 383-387. DOI: [10.18182/tjf.776718](https://doi.org/10.18182/tjf.776718)

virüslerin büyük bir kısmı Partitiviridae ve Totiviridae familyasında bulunmaktadır (Ghabrial, 1994; 1998; Van Regenmortel, 2000). Funguslarda meydana gelen viral enfeksiyonlarının tanısında birçok yöntem kullanılmakla birlikte, elde edilen başarı virüs ve konukçuya bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Buck, 1986).

Günümüze kadar yapılan çalışmalar, mikovirüslerin orman ağaçlarında hastalık yaptığı bilinen basidiomiset ve askomisetlerde yaygın olarak bulduklarını, bunun yanında, *Mucor* ve *Rhizopus* gibi türlerde de rastlanıldıklarını göstermektedir. Orman ağacı patojeni funguslardan, *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr, *Ceratocystis ulmi* (Buisman) C. Moreau, *Ophiostoma novoulmi* Brasier, *Heterobasidion annosum* Niemelä & Korhonen, *Gremmeniella abietina* (Lagerb.) M. Morelet, ve *Diplodia sapinea* (Fr.) Dyko & B. Sutton dahil olmak üzere pek çok fungusla dsRNA içeren viral partiküllere rastlanılmıştır (Hollings, 1982; Varga vd., 1994; Coenen vd., 1997; Steenkamp vd., 1998; Van Diepeningen vd., 1998; Cole vd., 2000; Vainio vd., 2010; Tuomivirta, 2003a, b).

Fungal virüsler (mikovirüsler) konukçuları üzerinde büyük bir etkiye sahiptirler. Bunun en güzel örneğini, kestane kanserine neden olan *C. parasitica*'da bulunan hipovirüsler oluşturmaktadır (Milgroom ve Cortesi, 2004). Bu hastalık günümüzde, Avrupa'da virüs ile bulaşık hipovirulent ırkların hastalıklı ağaçlarda bulunan kanserlere inokule edilmesi ile kontrol edilmektedir. Başlangıçta insanların yardımıyla yayılan virüsler, izleyen yıllarda kendileri bulaştırdıkları ortamda yayılışlarını devam ettirmektedirler. Buna ek olarak, kullanılan bu virokontrol, *C. parasitica* haricinde başka bir patojende etkili değildir. Bu nedenle, hastalık kontrolü için başarılı, türe özgü, güvenli ve çevre dostu yöntem olarak görülmektedir (Elliston, 1982; Heiniger ve Rigling, 1994). Ülkemizde de kestane kanserine karşı biyolojik mücadele çalışmaları son yıllarda hız kazanmış ve ümitvar sonuçlar alınmaya başlanmıştır (Akıllı vd., 2012). Avrupa'da kestane kanserine haricinde, diğer fungal hastalıkların kontrolünde virüslerin potansiyelinin araştırıldığı fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bunun en büyük nedeni, en bilinen virüslerin bile konukçularında gözle görülür etkisinin olmaması ve izolasyonlarının çok zor olmasıdır.

Bu çalışmanın ana materyalini, özellikle ibreli ağaç türlerinde neden olduğu kök ve alt gövde çürüklüğü ile dikkat çeken *Heterobasidion annosum* Fr. Bref. sensu lato oluşturmaktadır. Fungal etmen, Kuzey Yarımküre'de 200 bitki türünde rapor edilmiştir (Hodges, 1969; Laine, 1976). *Heterobasidion* kompleksi içinde, konukçu isteklerine ve coğrafik yayılışlarına göre farklılık gösteren önemli türler bulunmaktadır (Korhonen ve Stenlid, 1998). Avrupa ve Batı Asya'da *H. annosum* s.str ve *H. parviporum* türlerinin, %15 sıklıkla fungal virüslere konukçuluk ettiği tespit edilmiştir (Ihrmark, 2001; Vainio vd., 2015b; Vainio ve Hantula, 2016). *Heterobasidion* RNA virüsü 6 (HetRV6) olarak bilinen bir viral türün, Avrupa *Heterobasidion* izolatlarında tüm virüs enfeksiyonlarının %70'ini oluşturduğu tespit edilmiştir.

Vainio ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan çalışmada, *Heterobasidion* türlerinde *Curvularia protuberata* adında bir mikrovirüsün var olduğunu bildirmişlerdir. Bu virüs ile enfekteli izolatların fungal gelişiminde, %28 oranda azalmanın olduğunu tespit etmişlerdir. Annosum kök ve alt gövde çürüklüğüne neden

olan *Heterobasidion* türleri, yeni kesilmiş kütük yüzeylerine basidiosporlar aracılığıyla girmekte, ardından kök sistemine geçerek buradan çevredeki sağlıklı ağaçlara kök kaynaşması yolu ile bulaşmaktadır. Patojen, günümüzde silvikültürel müdahalelerin ardından kesik kütük yüzeyine, türe, boraks ya da biyolojik mücadele ajanı olan *P. gigantea* uygulanması ile kontrol altına alınabilmektedir (Lehtijarvi vd., 2011). Bu uygulamaların temelinde, köklerde hali hazırda bulunan *H. annosum* tarafından meydana gelecek yeni enfeksiyonların önlenmesi yatmaktadır (Woodward vd., 1998). Bununla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalar, *H. annosum* ile enfekte olan bir meşcerede, mikovirüs kullanımının bir biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılabilmesine işaret etmektedir. Bu amaçla, Vainio vd., (2012) dört *Heterobasidion* türünde HetRV6 adlı yeni bir virüs türü rapor etmişlerdir. Bu virüsün *Heterobasidion* türleri için daha önceki çalışmalarda belirtilen virüslerden farklı ve *Curvularia* termal tolerans virüsüne ve *Fusarium graminearum* 4 virüsü ile genetik benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, küresel ölçekte popülasyon analizleri yapılarak, viral partiküllerin konukçuları arasında yayılıp yayılmadığını incelemişlerdir.

Şimdiye kadar *Heterobasidion* türlerinden izole edilen mikovirüslerin, Partitiviridae ve *Narnaviridae* familyasına ait olduğu ve bu virüslerin, farklı *Heterobasidion* türleri arasında yayılma yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Ihrmark, 2001; Vainio ve Hantula, 2016; Vainio ve Hantula, 2018). Partitivirüs, varsayılan RNA'ya bağımlı RNA polimerazı (RdRp) ve bir kapsid proteinini kodlayan iki bağımsız segmentten oluşan bir dsRNA bipartit genomuna sahiptir (Ihrmark, 2001; Nibert vd., 2014; Vainio vd., 2015a; Vainio ve Hantula, 2016). Bu virüslerin yatay geçişi yapay büyüme ortamında *Heterobasidion* türleri içinde ve arasında meydana gelmektedir (Ihrmark vd., 2002; Vainio vd., 2010; Vainio vd., 2011a; Hyder vd., 2013; Vainio vd., 2013). Bu çalışmada, Vainio vd. (2012) tarafından Türkiye orijinli *Heterobasidion abietinum* izolatlarından tespit edilen HetPV3-an1 ve HetRV6-ab6 virüslerinin, diğer *H. annosum* s.s ve *H. abietinum* izolatlarına aktarılması ve bu mikovirüslerin orijinal konukçusunun fenotipik özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

2. Materyal ve yöntem

2.1. Materyal

2.1.1. Fungal Materyal

In vitro denemelerde, *Abies cilicica* (Antoine et Kotschy) Carrière, *Abies nordmanniana* subsp. *bornmülleriana* (Matt.) Coode & Cullen *Abies equitrojani* (Aschcrs et Sinten) üreme organlarından önceki çalışmalarda elde edilmiş (Çizelge 1) 20 adet *H. abietinum* ve 5 adet *H. annosum* sensu s. str. olmak üzere 25 adet *Heterobasidion* izolatı (ISUBU, Dendroklirik laboratuvarı izolat koleksiyonu, Doğmuş-Lehtijarvi vd., 2006, 2007) ve donör olarak ise CF11 kromatografisi analizine göre dsRNA partikülü içerdiği bilinen 2 adet izolat kullanılmıştır (Çizelge 2). Donör izolatlar LUKE Finlandiya Araştırma Enstitüsü kültür koleksiyonundan, temin edilmiştir.

Çizelge 1. Denemelerde kullanılan alıcı izolatlar

No	İzolat no	Toplandığı alan	Türü
1	Tr050723-9	Gümüştüğ	<i>H. annosum</i> s.s
2	Tr050731-53	Mesudiye	<i>H. annosum</i> s.s
3	Tr050731-56b	Mesudiye	<i>H. annosum</i> s.s
4	Tr050731-58	Mesudiye	<i>H. annosum</i> s.s
5	Tr050731-65	Mesudiye	<i>H. annosum</i> s.s
6	Tr050717-1	Karaduğa	<i>H. abietinum</i>
7	Tr050725-25	Tokçam	<i>H. abietinum</i>
8	Tr050726-34d	Yurtköy	<i>H. abietinum</i>
9	Tr050727-40b	Ardanuç	<i>H. abietinum</i>
10	Tr050731-54	Mesudiye	<i>H. abietinum</i>
11	Tr04112d	Akseki-Antalya	<i>H. abietinum</i>
12	Tr04113a	Akseki-Antalya	<i>H. abietinum</i>
13	Tr04115a	Akseki-Antalya	<i>H. abietinum</i>
14	Tr04116b	Akseki-Antalya	<i>H. abietinum</i>
15	Tr04125a	Akseki-Antalya	<i>H. abietinum</i>
16	Tr04151	Bolu-Aladağ	<i>H. abietinum</i>
17	Tr04152	Bolu-Aladağ	<i>H. abietinum</i>
18	Tr04210	Bolu-Aladağ	<i>H. abietinum</i>
19	Tr04410	Bolu-Aladağ	<i>H. abietinum</i>
20	Tr04512	Bolu-Aladağ	<i>H. abietinum</i>
21	Tr04009a	Balıkesir- Edremit	<i>H. abietinum</i>
22	Tr04012b	Balıkesir- Edremit	<i>H. abietinum</i>
23	Tr04030b	Balıkesir- Edremit	<i>H. abietinum</i>
24	Tr04070b	Balıkesir- Edremit	<i>H. abietinum</i>
25	Tr04076c	Balıkesir- Edremit	<i>H. abietinum</i>

Çizelge 2. Denemelerde kullanılan donör izolatlar

Donör izolat	Orijin	Tür	İçerdiği mikovirüs
04065aI	Akseki-Antalya	<i>H. abietinum</i>	HetPV3-an1
04188	Akseki-Antalya	<i>H. abietinum</i>	HetRV6-ab6

2.2. Yöntem

2.2.1. In Vitro'da donör izolatın virus aktarımı

Virüs enfeksiyonu Ihrmark vd. (2002) tarafından hazırlanan, Vainio vd. (2011b) tarafından modifiye edilen protokolüne göre yapılmıştır.

Donör izolat ile virüs içermeyen *Heterobasidion* izolatları, %2 Malt extract agar içeren petri kaplarına aralarında 1 cm mesafe olacak şekilde karşılıklı asılanıp, 3 ay 20°C'de inkube edilmiştir. Tüm eşleştirmeler 5 tekerrürlü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. İnkubasyon süresi sonunda, gelişmekte olan hiflerden uç kısmından ve koloniler arasındaki birleşim noktasından hifler alınarak MOS ortamına aktarılmıştır.

Alıcı izolatlara potansiyel dsRNA aktarımı, spesifik primerler (HetPV3-an1 ve HetRV6-ab6) ile RT-PCR yapılarak belirlenmiştir.

2.2.2. Virüs aktarımının başarısını RT-PCR ile belirleme

Olası bir kültür karışıklığını önlemek için virüslü izolatlar hif uçlarından izole edilmiştir. İzolatlar (1g miktarı) parçalandıktan sonra CF11 kromatografisi ile dsRNA izolasyonu yapılmıştır.

Reverse Transkripsiyon Vainio vd. (2012) protokolüne göre toplam nükleik asit örnekleri kullanılarak hazırlanmıştır. Fungal hücreler 500µl lysis buffer eklenerek homojenizatör ile parçalanmış ve ardından her bir örnek iki kez fenol/kloroform/isoamylalcohol (25:24:1) ve 1 kez kloroform/isoamylalcohol (24:1) ile ekstrakte edilmiştir. Nükleik asitler %20 PEG 6000 ve 25 mL NaCl ile çöktülerek, elde edilen pellet %70'lik etanol ile yıkanmış ve sonrasında 30µl steril su ile seyreltilmiştir. Her bir RT

reaksiyonunda, 5-12 µl nükleik asit örneği (5 dakika boyunca kaynayan su banyosunda denatüre edilir ve -80 °C'de soğutulur), 0,2 µg Rastgele Hexamer primer (Fermentas GmbH), 200 U of RevertAid MuLV reverse transcriptaz (Fermentas GmbH) ve dNTPs içermektedir.

PCR reaksiyonları 50 µl hacimde, 1-2 µl cDNA, her bir primerden 25 pmol, 1U DyNAzyme™ 451 DNA polimeraz (Finnzymes, Finlandiya) ve 10nmol dNTPs içermektedir. Amplifikasyon koşulları 95 °C'de 10 dakika, 95°C' de 30sn, 57°C' de 45sn ve 72°C' de 2dk olmak üzere toplam 35 döngüden oluşmaktadır.

2.2.3. Alıcı izolatlar ile virüs aktarımı sonunda elde edilen izolatların genotiplerinin karşılaştırılması

DNA izolasyonu için, *H. annosum* izolatları, üzerinde selofan membran bulunan malt-extract agar besi ortamında 24 °C' de 10 gün boyunca inkube edilmiştir. Bu sürenin sonunda besi ortamında gelişen miseller, selofan membran üzerinden kazınarak, eppendorf tüpleri içerisinde aktarılmış ve DNA izolasyonunu yapıncaya kadar -20 °C' de muhafaza edilmiştir. Dondurularak kurutulan miseller, porselen havan içerisinde, sıvı azot ile ezilerek toz haline getirildikten sonra, Qiagen DNeasy Plant Mini kit kullanılarak, DNA'ları ekstrakte edilmiştir.

Mitokondriyal PCR amplifikasyonu için ML1 ve ML2 primerleri kullanılmıştır. Reaksiyonlar, 10 mM Tris (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 200 pM dNTP, 1-25 ng of genomic DNA ve 0.5 U Taq polimerazı içeren 25µl hacimde gerçekleştirilmiş olup, amplifikasyonlar, 94°C' de 1,5dk, 95°C' de 1 dk, 55°C' de 1 dk ve 72°C' de 2dk olmak üzere 35 döngüden oluşmaktadır.

Çoğaltılmış DNA fragmentleri, %1 lik Synerjelde 1xTAE tamponu içinde yürütülerek, ana izolatlar ile karşılaştırılmıştır.

3. Bulgular ve tartışma

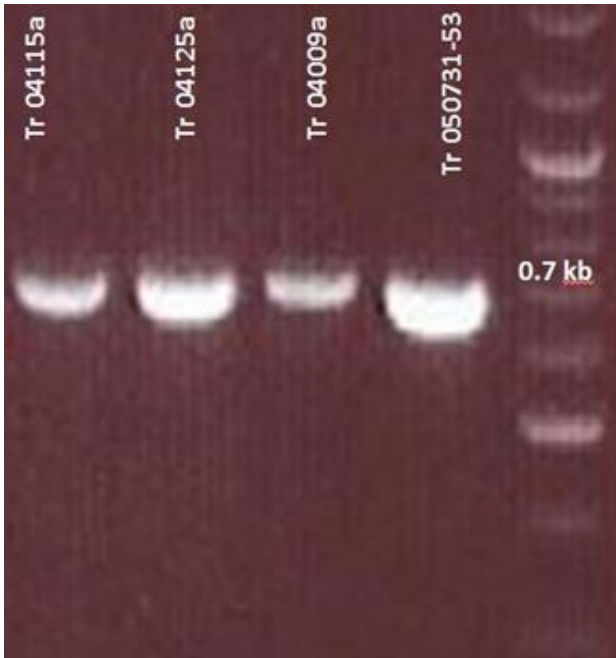
Denemeler sonunda, test edilen *H. abietinum* izolatlarının %15' si, *H. annosum* izolatlarının ise %20'si dsRNA partikülü başarılı bir şekilde aktarılmış ve RT-PCR ile tek segmentli virüs varlığı kesinleştirilmiştir. *Heterobasidion* suşlarının yaklaşık %15-17'si dsRNA virüsleri tarafından enfekte edilmektedir (Ihrmark, 2001; Vainio vd., 2011b). HetRV6 virüsü, *H. annosum* kompleksindeki türlerde bulunan en yaygın dsRNA virüsü olduğu tespit edilmiş olup, Avrupa *Heterobasidion* suşlarında dsRNA enfeksiyonlarının yaklaşık %70'inden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Vainio vd., 2012).

H. abietinum 04188, virus aktarımı denememizde donör olarak kullanılan izolatlardan biridir ve içerisinde HetRV6-ab6 virüsü içermektedir. Çalışmamızda, HetRV6-ab6 virüsü, hem *H. annosum* hem de *H. abietinum* izolatlarına başarılı bir şekilde aktarılmıştır, ancak tüm izolatlarda fenotipik bir değişime yol açmadığından dolayı, alıcı izolatın alınan kültürlerinin, aktarılan virüs partikülünü içerdiği mitokondriyal ve nükleer markerlerle tespit edilmiştir (Şekil 1). Daha önce, *H. annosum* virüsü (HaV), *Heterobasidion* RNA virüsü 2 (HetRV2) ve *Heterobasidion* RNA virüsü 3'ün (HetRV3) farklı *Heterobasidion* türlerine ait heterokaryotik ve birbirleri ile eşleşmeyen izolatlar arasında bulunduğu bildirilmiştir (Ihrmark vd., 2002; Vainio vd., 2010, 2011a, 2011b). Birçok fungus türünde, türler arası vejetatif uyumsuzluk nedeniyle virüs transferi

gerçekleşmemektedir (Ghabrial ve Suzuki, 2009). Genel olarak, HetRV6 kriptik (gizli) ya da duruma göre etkin davranabilmektedirler. Bu nedenle fungusun gelişmesi üzerindeki etkileri inkübasyon sıcaklığına ve ayrıca konukçu fungal izolata morfolojik yapısına bağlı olarak değişim göstermektedir. Bizim çalışmamızda, HetRV6 virüs partikülünün başarılı bir şekilde aktarıldığı Tr04115a ve Tr04009a izolata herhangi bir gelişimsel değişiklik gözlenmemiştir.

Çalışmamızda HetPV3-an1 virüsünün aktarıldığı 1 numaralı Gümüştüğ orijinli izolata fungal gelişimde dejenerasyon gözlenmiştir. HetPV3-an1 virüsü, *H. parviporum* ve *H. annosum*'a ait hem homokaryotik hem de heterokaryotik izolatlarda fenotipik değişikliklere neden olduğu Vainio vd. (2015b) tarafından rapor edilmiştir. Özellikle, tek bir virüs suşu, çevresel ve ekolojik koşullara bağlı olarak, tek bir konukçu izolat üzerinde olumlu ya da olumsuz etkilere sahip olabilir (Hyder vd., 2013).

HetRV6'nın popülasyon yapısı, konukçu fungusla ilginç bir korelasyon göstermektedir. Dolayısıyla, HetRV6'nın gen diziliminde görülen varyasyonlar kabul edilebilir düzeydedir (Van Regenmortel, 2000) ki bu farklı suşların monofitik taksonu temsil ettiğini göstermektedir. Bununla birlikte, filogenetik kümeleme ve popülasyon farklılaşma analizine dayanarak, *H. occidentale*'nin Kuzey Amerika virüs suşlarının, Avrasya virüs suşlarından farklı olduğu tespit edilmiştir (Vainio vd., 2013). Bu durum, söz konusu virüs türlerinin farklı suşlarının coğrafi olarak ayrılmış konukçu popülasyonları ile birlikte geliştiği ve diğer fungal türlerden bulaşmanın olmadığı varsayımına uygundur. Avrasya'da, HetRV6 popülasyonları arasında düşük bir farklılaşma gözlenmiştir. Bu farklılaşmanın çoğunu konukçu ve coğrafya ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.



Şekil 1. RT-PCR sonucu dsRNA partikülünün pozitif bulunduğu izolatlara

Hipovirulens ile ilişkili mikovirüsler bitki fungal hastalıklarına karşı potansiyel biyolojik kontrol ajanları olarak çekici olsa da, virokontrolün etkinliği her zaman tatmin edici değildir. Mikovirüslerin konukçular arasında geçişi, bazı fungal popülasyonların vejetatif uyumsuzlukları olmasından dolayı sınırlı olabildiği gibi arazi koşullarındaki gelişiminde de sınırlama olabilmektedir. Özellikle biyolojik kontrol uygulamalarında, homokaryotik *Heterobasidion* izolatlarının virüs donörleri olarak kullanılması avantajlı olabilir. Çünkü homokaryotik *Heterobasidion*lar canlı ağaçlar arasında nadiren yayıldıkları için yalnızca zayıf patojenik olarak kabul edilmektedir.

4. Sonuç ve öneriler

Mikovirüsler, viroloji ve bitki patolojisi bilimlerinde nispeten bilinmeyen bir gruba temsil eder. Bununla birlikte, genetik dizilere ve biyolojik özelliklere (konakçıların antiviral yanıtı dahil) dayalı mikovirüslerin taksonomisi büyük ölçüde geliştirilmektedir. Odunsu türlerin sağlığını korumak, kimyasal tedavileri tamamlamak veya tamamen değiştirmek için önemli bir araç olabilir.

Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak, *Heterobasidion* zararı, ormancılık uygulamalarında hali hazırda kullanılmakta olan karışık meşcere oluşturulması, profolaktik kimyasal ve biyolojik kütük uygulamaları ile kontrol altına alınabilmekte ancak tamamen hastalığa karşı tam bir koruma sağlanamamaktadır. Bu bağlamda, başarı yüzdesi yüksek, sürdürülebilir ve ekonomik yeni alternatiflerin bulunması gerekmektedir. Sonuç olarak, farklı ve çok sayıda mikovirüs türünü barındırdığı tespit edilen *Heterobasidion* türlerinin neden olduğu zararı, en aza indireyecek alternatif biyokontrol ajanı mikovirüslerin, hastalığı engellemedeki başarısı in vivo testlerle de desteklenerek, ormanlarımızın sağlığını koruma altına alma adına ilerlemeler kaydedilecektir.

Açıklama

Finlandiya LUKE Ormancılık Araştırma Enstitüsünde çalışan Dr. Eeva Vainio'ya donör izolatlara gönderdiği için çok teşekkür ederiz. Ayrıca bu projede kullanılan *Heterobasidion* izolatlara TÜBİTAK TOVAG 1040560 no'lu proje kapsamında elde edilmiştir.

Kaynaklar

- Akıllı, S., Ulubaş-Serçe, Ç., Katircioğlu, 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.
- Buck, K.W., 1986. Fungal Virology – An Overview. In: *Fungal Virology* (Ed: Buck, K.W.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-84.
- Coenen, A., Kevei, F., Hoekstra, R.F., 1997. Factors affecting the spread of doublestranded RNA viruses in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, 69: 1-10.
- Cole, T.E., Hong, Y., Brasier, C.M., Buck, K.W., 2000. Detection of an RNA-dependent RNA polymerase in mitochondria from a mitovirus-infected isolate of the Dutch elm disease fungus, *Ophiostoma novo-ulmi*. *Virology*, 268: 239-243.
- Doğmuş Lehtijärvi, H.T., Lehtijärvi, A., Korhonen, K., 2006. *Heterobasidion abietinum* on *Abies* species in western Turkey. *Forest Pathology*, 36: 280-286.

- Doğmuş Lehtijärvi, H.T., Lehtijärvi, A., Korhonen, K., 2007. *Heterobasidion* on *Abies nordmanniana* in northeastern Turkey. *Forest Pathology*, 37: 387-390.
- Elliston, J.E., 1982. Hypovirulence. *Advanced Plant Pathology*, 1: 1-33.
- Ghabrial, S.A., 1994. New developments in fungal virology. *Advanced Virus Research*, 43: 303-388.
- Ghabrial, S.A., 1998. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes*, 16: 119-131.
- Ghabrial, S.A., Suzuki, N., 2009. Viruses of plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 353-384.
- Heiniger, U., Rigling, D., 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology*, 32: 581-599.
- Hodges, C.S., 1969. Modes of infection and spread of *Fomes annosus*. *Annual Review of Phytopathology*, 7: 247-266.
- Hollings, M., 1982. Mycoviruses and plant pathology. *Plant Disease*, 66: 1106-1112.
- Hyder, R., Pennanen, T., Hamberg, L., Vainio, E.J., Piri, T., Hantula, J., 2013. Two viruses of *Heterobasidion* confer beneficial, cryptic or detrimental effects to their hosts in different situations. *Fungal Ecology*, 6: 387-396.
- Ihrmark, K., 2001. Double-stranded RNA elements in the root rot fungus *Heterobasidion annosum*. PhD Dissertation, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Ihrmark, K., Johannesson, H., Stenström, E., Stenlid, J., 2002. Transmission of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*. *Fungal Genetics and Biology*, 36: 147-154.
- Korhonen, K., Stenlid, J., 1998. Biology of *H. annosum*. In: *Heterobasidion annosum*: Biology, Ecology, Impact and Control (Ed: Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., Hüttermann, A.), CAB International, Wallingford, UK, pp. 43-70.
- Laine, L., 1976. The occurrence of *Heterobasidion annosum* (Fr.) in woody plants in Finland. *Communications Instituti Forestalis Fenniae*, 90(3): 1-52.
- Lehtijärvi, A., Doğmuş, L.T., Aday, A.G., Oskay, F., 2011. The efficacy of selected biological and chemical control agents against *Heterobasidion abietinum* on *Abies cilicica*. *Forest Pathology*, 41: 470-476.
- Lemke, P.A., Nash, C.H., 1974. Fungal viruses. *Bacteriology Review*, 38: 29-56.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L., 1997. Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews*, 10: 369-400.
- McCabe, P.M., Pfeiffer, P., Van Alfen, N.K., 1999. The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. *Trends Microbiology*, 7(9): 377-381.
- Milgroom, M.G., Cortesi, P., 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: A critical analysis. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 311-318.
- Newhouse, J.R., Hoch, H.C., MacDonald, W.L., 1983. The ultrastructure of *Endothia parasitica*. Comparison of a virulent with a hypovirulent isolate. *Canadian Journal of Botany*, 61: 389-399.
- Nibert, M.L., Ghabrial, S.A., Maiss, E., Lesker, T., Vainio, E.J., Jiang, D., Suzuki, N., 2014. Taxonomic reorganization of family partitiviridae and other recent progress in partitivirus research. *Virus research*, 188: 128-141.
- Nuss, D.L., Koltin, Y., 1990. Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 28: 37-58.
- Steenkamp, E.T., Wingfield, B.D., Swart, W.J., Wingfield, M.J., 1998. Double-stranded RNA and associated virulence in South African isolates of *Sphaeropsis sapinea*. *Canadian Journal of Botany*, 76: 1412-1417.
- Tuomivirta, T.T., Hantula, J., 2003a. Two unrelated double-stranded RNA molecule patterns in *Gremmeniella abietina* type A code for putative viruses of the families Totiviridae and Partitiviridae. *Archives of Virology*, 148: 2293-2305.
- Tuomivirta, T.T., Hantula, J., 2003b. *Gremmeniella abietina* mitochondrial RNA virus S1 is phylogenically related to the members of the genus Mitovirus. *Archives of Virology*, 148: 2429-2436.
- Vainio, E.J., Korhonen, K., Tuomivirta, T.T., Hantula, J., 2010. A novel putative partitivirus of the saprotrophic fungus *Heterobasidion ecrustosum* infects pathogenic species of the *Heterobasidion annosum* complex. *Fungal Biology*, 114: 955-965.
- Vainio, E.J., Keriö, S., Hantula, J., 2011a. Description of a new putative virus infecting the conifer pathogenic fungus *Heterobasidion parviporum* with resemblance to *Heterobasidion annosum* P-type partitivirus. *Archives of Virology*, 156: 79-86.
- Vainio, E.J., Hakanpää, J., Dai, Y.C., Hansen, E., Korhonen, K., Hantula, J., 2011b. Species of *Heterobasidion* host a diverse pool of partitiviruses with global distribution and interspecies transmission. *Fungal Biology*, 115: 1234-1243.
- Vainio, E.J., Hyder, R., Aday, A.G., Hansen, E., Piri, T., Doğmuş-Lehtijärvi, T., 2012. Population structure of a novel putative mycovirus infecting the conifer root-rot fungus *Heterobasidion annosum* sensu lato. *Virology*, 422: 366-376.
- Vainio, E.J., Piri, T., Hantula, J., 2013. Virus community dynamics in the conifer pathogenic fungus *Heterobasidion parviporum* following an artificial introduction of a partitivirus. *Microbial Ecology*, 65: 28-38.
- Vainio, E.J., Müller, M.M., Korhonen, K., Piri, T., Hantula, J., 2015a. Viruses accumulate in aging infection centers of a fungal forest pathogen. *The ISME Journal*, 9(2): 497-507.
- Vainio, E.J., Jurvansuu, J., Streng, J., Rajamaki, M.L., Hantula, J., Valkonen, J.P.T., 2015b. Diagnosis and discovery of fungal viruses using deep sequencing of small RNAs. *Journal of General Virology*, 96(3): 714-725.
- Vainio, E.J., Hantula, J., 2016. Taxonomy, biogeography and importance of *Heterobasidion* viruses. *Virus Research*, 219: 2-10.
- Vainio, E.J., Hantula, J., 2018. Fungal Viruses. In: *Viruses of Microorganisms*, (Ed: Hyman, P., Stephen, T.), Caister Academic Press, Abingdon, UK, pp. 193-209.
- Van Diepeningen, A.D., Debets, A.J.M., Hoekstra, R.F., 1998. Intra- and interspecies virus transfer in *Aspergilli* via protoplast fusion. *Fungal Genetics and Biology*, 25: 171-180.
- Van Regenmortel, M.H.V., 2000. Introduction to the Species Concept in Virus Taxonomy. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. (Ed: Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wicker, R.B.), Academic Press, New York, USA, pp. 3-16.
- Varga, J., Kevei, F., Vagvolgyi, C., Vriesema, A., Croft, J.H., 1994. Double-stranded RNA mycoviruses in section Nigri of the *Aspergillus* genus. *Canadian Journal of Microbiology*, 40: 325-329.
- Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., Hüttermann, A., 1998. *Heterobasidion annosum*: Biology, ecology, impact and control. CAB International, Wallingford, UK.