

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>

Original article

PCR-RFLP analysis of Botryosphaeriaceae species isolated from the Aegean and Mediterranean vineyards

Ege ve Akdeniz Bölgesi bağlarından izole edilen Botryosphaeriaceae türlerinin PCR-RFLP analizi

Davut Soner AKGÜL^{a*}, Qamar Nawaz AWAN^a, Ali ERKILIÇ^a

^a Çukurova University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 01330, Balcalı, Adana, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.454980](https://doi.org/10.16955/bitkorb.454980)

Received : 23.08.2018

Accepted : 05.11.2018

Keywords:

asma, *Botryosphaeria* geriye ölümü, kesim enzimleri, *Bsa*HI, *Taq*I

* Corresponding author:

Davut Soner AKGÜL

✉ sakgul@cu.edu.tr

ABSTRACT

The classical identification of Botryosphaeriaceae fungi, causing dieback and local dead arms in many plant species, is very difficult and time-consuming. Some of the molecular tools, such as PCR using species-specific primers, RFLP (Restricted Fragment Length Polymorphism) or gene sequencing are necessary for the fast identification of species. This study aims to contribute for the fast identification of some fungal species belonging Botryosphaeriaceae family reported up to now in Turkey vineyards. DNA was extracted from the 25 isolates obtained from the Aegean and Mediterranean Regions, and 4 different species (*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae*, and *Neofusicoccum parvum*) and β -tubulin (TUB2) and ITS region (specific for Botryosphaeriaceae genus) on genomic DNA was amplified by polymerase chain reactions. This region was digested by five different restriction endonuclease enzymes (*Alu*I, *Bsa*HI, *Mbo*I, *Rsa*I, *Taq*I) and band profiles were analyzed on an agarose gel (2%). According to the results of the analysis, the region, amplified with genus-specific primers, was not suitable for RFLP analysis. On the other hand, to discriminate these species, it was revealed that the β -tubulin gene region should be digested at least two different restriction enzymes. The enzyme *Bsa*HI generated two different band sizes for *B. dothidea* and *D. seriata* (250 and 700 bp for the first; 400 and 600 bp for the second one) digesting β -tubulin gene of these species but this enzyme could not generate any discriminative bands for *L. theobromae* and *N. parvum*. However the enzyme *Taq*I could not discriminate *B. dothidea* and *D. seriata* but digest β -tubulin gene of *L. theobromae* and *N. parvum* at two points and it generated three different bands (for *L. theobromae*: 200-400-800 bp and for *N. parvum*: 200-400-650 bp).

GİRİŞ

Botryosphaeriaceae familyası içerisinde bulunan bazı fungus türleri, asmalarda kol kurumalarına ve ilerleyen süreçte omcaların ölümüne neden olan önemli patojenlerdir. Bu türler, çeşitli meyve ağaçları, orman ve süs bitkilerini içine alan çok yıllık odunsu bitkilerde geriye

ölüm, kangren, meyve çürüklüğü ve yaprak lekelerine yol açarlar (Farr and Rossman 2011). Buldukları ekolojinin durumuna göre bitki içerisinde endofitik, patojenik veya saprofitik halde bulunabilen Botryosphaeriaceae türleri, çoğu zaman latent patojenler olarak nitelendirilmekte

olup, bu özellikleriyle potansiyel bir tehlike olarak görülmektedir (Slippers and Wingfield 2007). Dünyadaki bağ alanlarında, *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Spencermartinsia* ve *Sphaeropsis* cinslerine dahil olan 23 farklı türün, söz konusu hastalığa neden oldukları rapor edilmiştir (Urbez-Torres et al. 2015). Bu türlerden bazılarının anamorf-telemorf ilişkileri belirlenmiş olup birçok türde ise halen belirsiz durumdadır. Bundan başka, türlerin klasik taksonomisinde telemorfik özelliklerin az sayıda olması nedeniyle anamorfik karakterler üzerinden gruplandırmalar ağırlıktadır (Liu et al. 2012). Klasik taksonomide şimdiye kadar anamorfik karakterler ile yapılan tür tanımlamalarında, bazı türlerin, daha önceden teşhis edilen kimi türlerle sinonim oldukları anlaşılmış ve bu türlerin taksonomik pozisyonlarında değişiklikler meydana gelmiştir. Anamorfik karakterlerin esas alındığı tür tanımlamalarında aynı cinsde ait türlerde, morfolojik özelliklerin neredeyse birbiriyle aynı olmaları nedeniyle morfolojik karakterlerin sınırı tam olarak çizilememiştir (Pavlic et al. 2009). Bu nedenle klasik tanıda zaman zaman hatalar meydana gelebilmektedir. Fungus türlerinin teşhisinde morfolojik, mikroskopik ve fruktifikasyon yapılarının incelendiği klasik tanıdan vazgeçilmesi mümkün değildir. Ancak belirtilen nedenlerle oluşabilecek teşhis hatalarını azaltmak için moleküler biyoloji yöntemlerinden de yararlanılmaktadır. Son 25 yılda DNA'daki gen bölgelerini esas alan tanı tekniklerinin geliştirilmesiyle tür komplekslerinin altında yer alan kriptik türlerin, diğer türlerle olan akrabalıkları daha net bir biçimde açığa kavuşturulmuştur (Crous et al. 2006, Taylor et al. 2005). Botryosphaeriaceae familyasında ilk zamanlar ribozomal DNA (rDNA) üzerindeki ITS (Internal Transcribed Spacer) gen bölgelerinin sekanslanması ile yapılan filogenetik analizlerle türlerin ayrımı yapılmaya başlanmış olup, daha sonra ise genomik DNA'daki farklı gen bölgelerinden elde edilen sekanslarla kombine edilerek akrabalık ilişkileri daha doğru bir şekilde ortaya konmuştur (Inderbitzin et al. 2010). Türlerin ayrımında yaygın olarak kullanılan bir diğer yöntem ise RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analizidir. Bu yöntemde DNA üzerindeki bazı gen bölgeleri PCR ile çoğaltılmakta ve ardından restriksiyon enzimleriyle kesilmektedir. Türler arasındaki nükleotid farklılıklarından dolayı enzimler, farklı türlerde farklı büyüklükteki DNA bölgelerini kesmekte, dolayısıyla türlere ve kullanılan enzime göre değişmekle birlikte farklı büyüklüklerde DNA parçacıkları elde edilmektedir. Bu parçacıklar agaroz ya da poliakrilamid jelde farklı büyüklüklerde görüntülenmekte ve oluşan bant profiline göre türlerin ayrımı yapılmaktadır. Chen et al. (2011), okaliptüsten

izole ettikleri Botryosphaeriaceae familyasından beş farklı türün, PCR-RFLP yöntemiyle ayrımını yapmışlardır. ITS gen bölgesi *CfoI* enzimiyle kesilmiş ve *Lasiodiplodia pseudotheobromae* / *L. theobromae* (1), *Neofusicoccum parvum* / *N. ribis* (2) ve *Botryosphaeria dothidea* (3) olmak üzere 3 ayrı tür kompleksini yansıtan bantlar elde edilmiştir. Ancak *Neofusicoccum parvum* / *N. ribis* kompleksini birbirinden ayırt etmek için ise ayrı bir gen bölgesinin (BotF15) amplifikasyonuna ve *CfoI* enzimiyle kesimine ihtiyaç duyulmuştur. Pavlic et al. (2007), Güney Afrika'da yaygın bir ağaç türü olan *Syzygium cordatum*'dan (Myrtaceae) rapor ettikleri Botryosphaeriaceae türlerinin (*N. parvum*, *N. ribis*, *N. luteum*, *N. australe*, *N. mangiferae*, *B. dothidea*, *Lasiodiplodia gonubiensis* ve *L. theobromae*) ayrımını hem ITS gen bölgesini sekanslayarak hem de PCR-RFLP yöntemleriyle yapmışlardır. Ancak ITS gen bölgelerinden elde edilen nükleotid dizilimleri gen bankasındakilerle karşılaştırıldığında, bazı türlerin net ayrımı mümkün olmadığından, cinsde özelleşmiş primer çifti (BOT15-BOT16) ile çoğaltılan bu bölgeyi *CfoI* enzimiyle kesmişlerdir. Çalışmada kullanılan 148 izolattan 8 ayrı grup oluşmuştur (5 *Neofusicoccum*, 1 *Fusicoccum* ve 2 *Lasiodiplodia* anamorfı). PCR-RFLP yöntemi *N. parvum* ve *N. ribis* kompleksini başarıyla ayırt ederken, *N. luteum* ve *N. australe* türlerini ayırt edememiştir. Venezuela'da yapılan başka bir çalışmada, akasya ve çam ağaçlarında kurumalara neden olan *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L. venezuelensis* ve *Diplodia guayanensis* türleri gen sekanslama ve RFLP teknikleriyle ayırt edilebilmiştir. Elongation Factor EF1- α gen bölgesi EF1-688F ve EF1-1251R primerleriyle çoğaltılarak *CfoI* enzimiyle kesilmiş ve bant büyüklükleri incelenmiştir. Bu enzim dört farklı türde farklı bant profilleri (*D. guayanensis*: 50-150-300 bp, *L. pseudotheobromae*: 50-50-500 bp, *L. theobromae*: 50-100-250-300-380 bp, *L. venezuelensis*: 50-100-220 bp) meydana getirmiş ve türlerin ayrımı mümkün olmuştur (Urbez-Torres et al. 2016). Alves et al. (2005) universal primer çiftleri kullanarak ITS bölgesindeki gen kodlayan ve kodlamayan bölgeleri hedef alarak bu bölgelerin PCR ile amplifikasyonunu yapmışlar (ITS1-NL4 primer çiftiyle) ve bu bölgeleri 8 farklı enzim ile keserek DNA profilleri elde etmişlerdir. Bu sayede bazı Botryosphaeriaceae türlerinin markörünü geliştirmişlerdir.

Botryosphaeriaceae türlerinin tanısı için daha önce yapılan RFLP çalışmalarının daha çok ITS bölgelerinin ve bir çalışmada da elongation factor (EF) geninin kesimiyle ilgili olduğu görülmektedir. Bu genlerin amplifikasyonu ile elde edilen nükleotid büyüklüğü yaklaşık 600-1200 baz çiftidir. RFLP enzimleriyle yapılan kesimlerde çoğaltılan bölgenin nükleotid sayısı uzun olduğunda, enzimlerin kesim şansı daha yüksek ve jel üzerinde gözlenen bant büyüklükleri

Çizelge 1. PCR-RFLP çalışmalarında kullanılan Botryosphaeriaceae izolatları

Türler	İzolat No	İzole Edildiği Yer	NCBI GenBank Numarası veya BLAST Benzerlik Oranı (%)		
			ITS	β -tubulin	EF1- α
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CUZF25T	Tarsus, Mersin	99	-	-
	MBAE25	Horozköy, Manisa	KF182329	KP721688	KP721650
	MBAE48-1	Muradiye, Manisa	KJ596525	KP721689	KP721651
	CUZF48-3	Tarsus, Mersin	99	-	-
	MBAE126-1	Turgutlu, Manisa	KJ921848	KP721691	KP721653
MBAE126-2	Çobanisa, Manisa	KJ596531	KP721692	KP721654	
<i>Diplodia seriata</i>	CUZF21T	Tarsus, Mersin	99	-	-
	CUZF27T	Tarsus, Mersin	99	-	-
	MBAE30	Ahmetli, Manisa	KJ921851	KP721693	KP721655
	MBAE104	Turgutlu, Manisa	KJ921847	-	-
	MBAE127	Turgutlu, Manisa	KJ921849	-	-
	MBAE130	Ahmetli, Manisa	KJ921851	KP721693	KP721655
<i>Lasioidiplodia theobromae</i>	MBAE163	Salihli, Manisa	KJ921853	-	-
	MBAE28	Horozköy, Manisa	KF182331	KP721698	KP721660
	MBAE39	Saruhanlı, Manisa	KJ596523	KP721699	KP721661
	MBAE128	Turgutlu, Manisa	KJ921850	KP721700	KP721662
	MBAE184	Alaşehir, Manisa	KJ596529	KP721701	KP721663
	CUZF31T	Tarsus, Mersin	99	-	-
	AkhsL1	Akhisar, Manisa	99	-	-
<i>Neofusicoccum parvum</i>	AkhsL4	Akhisar, Manisa	99	-	-
	MBAE51	Salihli, Manisa	KJ921840	KP721702	KP721666
	MBAE53	Saruhanlı, Manisa	KJ921842	KP721703	KP721665
	MBAE54	Muradiye, Manisa	KJ921843	KP721704	KP721666
	MBAE84	Saruhanlı, Manisa	KP083233	KP721705	KP721667
CUZF69T	Tarsus, Mersin	99	-	-	

daha net olmaktadır. Bu nedenle uzun nükleotid dizilimlerinin çoğaltılacağı gen bölgeleri tercih edilmelidir. Fungal hücrelerdeki β -tubulin genleri, bazı universal primerlerle çoğaltılan ve tanı çalışmalarında kullanılan bir diğer gen grubudur (Glass and Donaldson 1995). Bu genler özellikle Botryosphaeriaceae türlerinin tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. Konuyla ilgili olarak yapılan diğer çalışmalar göz önüne alındığında, β -tubulin gen bölgelerinin restriksiyon enzimleriyle kesilerek RFLP analizinin yapıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ülkemizdeki bağ alanlarında son zamanlarda artış gösteren Botryosphaeriaceae kangrenine neden olan türlerden şimdiye kadar dört tanesi (*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Lasioidiplodia theobromae* ve *Neofusicoccum parvum*) rapor edilmiş (Akgül et al. 2014) ve bu türlere aynı zamanda Türkiye'nin diğer bölgelerindeki bağ alanlarında da rastlanmıştır. Konuyla ilgili olarak yapılan diğer çalışmalar göz önüne alındığında, β -tubulin gen bölgelerinin restriksiyon enzimleriyle kesilerek RFLP analizinin yapıldığı bir çalışma henüz bulunamamıştır.

Bu çalışmanın amacı, Botryosphaeriaceae tanı çalışmalarında daha önce yapılan RFLP çalışmalarına (farklı bir gen bölgesi kullanarak) alternatif sunmak, yurdumuzdaki yaygın türlerin hızlı tanısına katkı sağlamak ve ülkemiz koşullarında bu türlerin RFLP ve gen sekanslama yöntemiyle tanısını, zaman ve maliyet

açısından kıyaslamaktır.

MATERYAL VE METOT

Fungal materyal

Çalışmada, Ege ve Akdeniz Bölgeleri bağ alanlarından izole edilmiş dört farklı türden toplam 25 izolat kullanılmıştır. Bu izolatların tanısı daha önceden PCR ve farklı gen bölgelerinin sekanslanması sonucu elde edilen nükleotid dizilerinin analizleri ve klasik yöntemlere göre yapılmıştır

PCR çalışmaları

RFLP analizlerine temel oluşturmak üzere genomik DNA üzerindeki β -tubulin gen bölgesi ve ITS bölgesinden elde edilmiş, Botryosphaeriaceae cinslerine özgü bölgeler, polimeraz zincir reaksiyonları ile çoğaltılmıştır. PCR çalışmalarında birçok fungal türde β -tubulin gen bölgesini çoğaltan universal primer çifti (T1: 5' AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT 3', Bt2b: 5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3') (Mahmodi et al. 2014) ile Botryosphaeriaceae cinslerine özgü primer çifti (BOT100F: 5' AAA CTC CAG TCA GTR AAC 3', BOT472R: TCC GAG GTC AMC CTT GAG 3') kullanılmıştır (Ridgway et al. 2011). Bunun için toplam 25 μ l hacimde PCR karışımı [Genomik DNA: 1 μ l, buffer (Thermo EP0702, 10X green buffer): 2.5 μ l, dNTPs: 1 μ l, primer T1 (forward, 10 pmol): 0.5 μ l, primer Bt-2b (reverse, 10 pmol): 0.5 μ l, Taq polimerase enzimi

(Thermo EP0702, 5 U/µl): 0.125 µl, nuclease enzimlerinden ari su: 19.375 µl] hazırlanmıştır. Karışımın bulunduğu tüpler thermocycler cihazına koyularak, döngü programı düzenlenmiş (ilk döngü: 95 °C'de 3 dk, sonraki 35 döngü: 95 °C'de 45 sn, 56 °C'de (T1+Bt2b için) ve 52 °C'de (BOT100F+BOT472R için) 55 sn ve 72 °C'de 55 sn, son döngü: 72 °C'de 10 dk) ve bu programa göre DNA'lar çoğaltılmışlardır. Elde edilen PCR ürünleri, hizmet alımı yolu ile diziletilerek ilgili bölgelere ait nükleotid sekans bilgileri elde edilmiştir. Dizi analizi ile elde edilen nükleotid dizileri, web tabanlı bir yazılım olan Web Cutter (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) kullanılarak, hedef bölgede kesim yapabilen en az 5 farklı restriksiyon endonükleaz enzimleri (*AluI*, *BsaHI*, *TaqI*, *RsaI* ve *MboI*) belirlenmiş ve bu enzimler ilgili firmalardan sipariş edilmiştir.

RFLP testleri

Çalışmanın bu bölümünde Çizelge 2'de bazı bilgileri verilen, iki ayrı şirketin (Thermo Scientific ve New England Biolabs) restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. PCR reaksiyonları sonucu tüplerdeki DNA'ların yoğunlukları nanodrop cihazı (Maestro Nano, ABD) ile ölçüldükten sonra, nükleaz enzimlerinden ari su ile 100 ng/µl'ye ayarlanmıştır. Botryosphaeriaceae familyasına ait dört farklı türün, T1-Bt2b ve BOT100F-BOT472R primer çiftiyle çoğaltılmış ve yoğunlukları 100 ng/µl'ye ayarlanmış PCR ürünlerinden, her bir tüpe 10 µl koyulmuştur. Sonra *AluI*, *RsaI* ve *TaqI* enzimleri için, bu tüplerin her birine 17 µl su, 2 µl buffer ve 1 µl enzim koyularak karıştırılmıştır. *MboI* ve *BsaHI* enzimleri için ise, enzim setiyle birlikte bulunan 10X konsantrasyondaki NE Buffer önce 1X'e seyreltilmiştir. Daha sonra bir tüpe kesimi yapılacak PCR ürününden 10 µl, 34 µl nükleaz enzimlerinden ari su, 5 µl buffer (1X) ve 1 µl enzim koyularak karıştırılmıştır. Bu karışımlar PCR thermocycler'a yerleştirilip, PCR ürünleri Çizelge 2'deki kesim protokollerine göre enzimatik olarak kesilmişlerdir. Kesimi ve inaktivasyonu tamamlanan PCR ürünleri bir sonraki aşama başlayıncaya kadar firmanın önerileri doğrultusunda -20 °C'de tutulmuşlardır.

Daha sonra agaroz jel elektroforez aşamasına geçilmiştir. Bu işlemde 1X konsantrasyondaki TAE (Tris-Asetat-EDTA) buffer içerisine, %2 oranında agaroz (Ultrapure, Invitrogen) eklenerek mikrodalga fırında eritilmiş ve 65 °C'ye soğutulduktan sonra, içinde taraklar bulunan kasetlere dökülmüştür. Jelin katılmasını müteakiben kaset ve jel, içerisinde 1X TAE buffer bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Parafilm şeritlerine her bir izolatin PCR ürünü için 2 µl SYBR Green I (Lonza) boyası damlatılmış ve 7.5 µl PCR ürünü bu boya ile karıştırıldıktan sonra jele yüklenmişlerdir. Ardından DNA'lar 55 V DC

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan kesim enzimleri ve protokolleri

Enzim Adı	Kod No	Kesim Protokolü	Üretici Firma
<i>AluI</i>	FD0014	37 °C- 10 dk (kesim) 65 °C-5 dk (inaktivasyon)	Thermo Scientific Fast Digest
<i>BsaHI</i>	R0556S	37 °C-10 dk (kesim) 80 °C-20 dk (inaktivasyon)	New England Biolabs Inc. CutSmart
<i>MboI</i>	R0147S	37 °C-10 dk (kesim) 65 °C-20 dk (inaktivasyon)	New England Biolabs Inc. CutSmart
<i>RsaI</i>	ER1121	37 °C-15 dk (kesim) 65 °C-5 dk (inaktivasyon)	Thermo Scientific Fast Digest
<i>TaqI</i>	FD0674	37 °C-10 dk (kesim) 65 °C-5 dk (inaktivasyon)	Thermo Scientific Fast Digest

(Direct Current) gerilim ve 250 mA akım şiddeti üreten güç kaynağı (Atto AE-8750, Çin) yardımıyla 150 dk yürütülmüş ve bant profilleri 310 nm dalga boyundaki UV (ultraviyole) ışık altında fotoğraflanmıştır.

RFLP testleri ve DNA gen sekanslama hizmetinin maliyetiyle ilgili veriler, ülkemizde bu hizmetleri veren veya bu testlere gerekli enzim ve kimyasalları sağlayan 5 farklı şirketin fiyat ortalamalarıyla elde edilmiştir.

SONUÇLAR

Denemeye alınan izolatlardaki genomik DNA'ların BOT100F-BOT472R primer çiftiyle çoğaltılması sonucu, agaroz jelde yaklaşık 550 bp büyüklüğünde bantlar elde edilirken, β-tubulin gen bölgesinin (TUB 2) T1-Bt2b primer çiftiyle çoğaltımıyla ise yaklaşık 1400 baz çifti büyüklüğünde DNA bantları görülmüştür. BOT100F-BOT472R kodlu primer çifti sadece Botryosphaeriaceae cinslerinin genomik DNA'larını çoğaltırken, T1-Bt2b kodlu primer çifti ise universaldır ve çoğu fungusun genomik DNA'sını çoğaltabilir. Bu nedenle ilk olarak cinse özgü primer çiftiyle elde edilen PCR ürünlerinin enzimatik kesimleri üzerine yoğunlaşmıştır. Cinse özgü primerlerden çoğaltılmış ürünlerin beş farklı enzimle kesimiyle, türlere göre farklı bant profilleri oluşsa da bir tek enzimle dört farklı türün ayrımı başarılammıştır. *MboI* ve *RsaI* enzimleri PCR ürününde seçici bir kesim yapamamış ve 450 bp büyüklüğünde tek tip DNA bantları görülmüştür. *AluI* enzimi dört farklı türde de seçici olmayan 215 ve 320 bp'lik bant çiftleri oluşturmuşlardır. *TaqI* enzimiyle yapılan kesimlerle, 95 ve 240 bp büyüklüğünde seçici olmayan bant çiftleri görülmüştür. Ancak *BsaHI* enzimi, *B. dothidea* için 450 bp, *D. seriata* için 300 bp, *L. theobromae* ve *N. parvum* türleri için ise 350 bp'lik bant oluşturmuştur (Çizelge 3). Tek başına bu enzim, dört farklı türün birbirinden ayrımı için yeterli olamamış, son iki tür için seçici bantlar verememiştir.

Çizelge 3. Farklı primerlerle çoğaltılmış PCR ürünlerinin, restriksiyon enzimleri kullanarak kesilmesiyle gözlenen DNA baz çifti büyüklükleri (bp)

Botryosphaeriaceae Türleri	BOT100F-BOT472R				
	<i>AluI</i>	<i>BsaHI</i>	<i>MboI</i>	<i>RsaI</i>	<i>TaqI</i>
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	215	450	450	450	95
	320				240
<i>Diplodia seriata</i>	215	300	450	450	95
	320				240
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	215	350	450	450	95
	320				240
<i>Neofusicoccum parvum</i>	215	350	450	450	95
	320				240
	T1+Bt2b				
	<i>AluI</i>	<i>BsaHI</i>	<i>MboI</i>	<i>RsaI</i>	<i>TaqI</i>
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Y*	220	Y	Y	220
		800			500
<i>Diplodia seriata</i>	Y	400	Y	Y	220
		600			500
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Y	300	Y	Y	200
		650			450
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Y	300	Y	Y	200
		650			400
					650

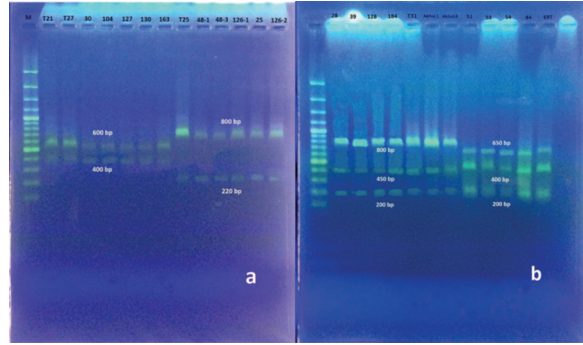
*Y: Yapılamadı

ITS bölgesinden tasarlanan cinse özgü primer çifti ile (BOT100F-BOT472R) nihai sonuç alınmadığından, çalışmanın bundan sonraki bölümü universal karakterde T1-Bt2b primer çiftinden çoğaltılan PCR ürünleri ile devam etmiştir. *BsaHI* enzimi ile kesilen *B. dothidea*'nın PCR ürünü, agaroz jel üzerinde 220 ve 800 bp'lik, *D. seriata*'nın ki ise 400 ve 600 bp'lik iki bant halinde görüntülenmişler ve bu türler bir tek enzimle ayırt edilebilmişlerdir (Çizelge 3). Ancak *BsaHI*, *L. theobromae* ve *N. parvum*'u birbirinden ayırt edememiş, bu türlere ait PCR ürününün kesimiyle 300 ve 650 bp'lik bantlar görülmüştür. Buna karşın *TaqI* enzimi de *B. dothidea* ve *D. seriata*'yı birbirinden ayırt edememiş ve agaroz jel üzerinde 220 ve 500 bp'lik bantlar meydana getirmiştir. Fakat bu enzim ile yapılan kesimlerle *L. theobromae* için 200, 450 ve 800 bp'lik üç, *N. parvum* için ise 200, 400, 650 bp büyüklüğünde üç adet seçici bant oluşmuştur (Şekil 1).

RFLP testinin araştırmacılara ya da çeşitli kuruluşlara olan maliyeti ele alındığında, bu testin gen sekanslama maliyetine göre oldukça ucuz olduğu anlaşılmıştır. Bunun yanı sıra RFLP testi 1 günde sonuçlanabilirken, gen sekanslama sonucunun alınması ortalama 5-7 gün olarak belirlenmiştir.

TARTIŞMA VE KANI

Botryosphaeriaceae familyası türlerinin yalnızca geleneksel tanı yöntemleri (koloni morfolojisi, büyüme hızı, spor şekli ve büyüklükleri, konidiofor yapıları vs.) ile tanınması çoğu zaman yanlış sonuçların ortaya çıkmasına neden



Şekil 1. Agaroz Jel (%2) üzerinde Botryosphaeriaceae PCR ürünlerinin *BsaHI* (a) ve *TaqI* (b) enzimleriyle kesimi sonucu oluşan DNA bant profilleri. a) M: Marker (Thermo Scientific, 100 bp), T21, T27, 30, 104, 127, 130, 163: *Diplodia seriata*, T25, 48-1, 48-3, 126-1, 25, 126-2: *Botryosphaeria dothidea*, b) M: Marker (Thermo Scientific, 100 bp), 28, 39, 128, 184, T31, AkhsL1, AkhsL4: *Lasiodiplodia theobromae*, 51, 53, 54, 84, 69T: *Neofusicoccum parvum*

olabilmektedir. Üstelik bu özelliklerin ortaya çıkması için uzun zaman (en az 3 hafta) gerekmekte olup, ilk izolasyon ve saf kültür elde edildikten hemen sonra tanı yapmak neredeyse imkansızdır. Çünkü farklı besi yeri ve inkübasyon koşulları altında, morfolojik karakterler de değişiklik gösterir (Amponsah et al. 2008). 1980'li yılların başında kullanılmaya başlanan PCR yöntemi, hem mikoloji hem de diğer alanlarda yaygın bir şekilde kabul görmüş ve klasik tanıyı doğrulayıcı bir yöntem olarak kullanılmaya devam etmiştir (Mullis and Faloona 1987, Saiki et al. 1985). Funguslarda genomik DNA ekstraksiyonunun ardından, tüm genomun bir defada çoğaltılması imkansızdır. Genomik DNA üzerindeki bazı genleri veya genler arasındaki intronların çoğaltılması için türlere özgü ya da universal karakterde oligo nükleotid dizilerine ihtiyaç vardır (Hills and Dixon 1991). Universal primerlerle yapılan PCR'in ardından (farklı cinslerdeki fungus türlerinde bile) agaroz jel üzerinde, genellikle aynı büyüklükte DNA bantları görüleceğinden, PCR ürünlerinden gen sekanslama yoluyla (ardından NCBI-BLAST analizi) tanıya gidilebilir. Bazı bilgisayar yazılımları kullanarak tasarlanan türlere (hatta izolatlara) özgü primerler kullanarak da kesin tanı yapmak mümkündür. Xu et al. (2016) Çin'in bazı bölgelerinde yetiştirilen yaban mersinlerinden (Blueberry) elde ettikleri Botryosphaeriaceae türlerini tanılamak için seçici primerler tasarlamışlardır. Bu primerler *B. dothidea*, *L. theobromae* ve *N. parvum*'u birbirinden ayırt edebilmiş, ancak *D. seriata* için seçici primer tasarlanmamıştır. Martin et al. (2014) İspanya'nın Castilla-Leon bölgesindeki bağlarda geriye ölümlere neden olan türlerden *D. seriata*'yı diğer türlerden ayırt edebilmek için

SCAR primerleri tasarlamışlardır. OPA-20 RAPD primer çifti ile çoğaltılan bölge primer tasarımı için kullanılmış ve sonuçta *D. seriata*'yı diğerlerinden ayırt etmede 2 farklı primer elde edilmiştir. Ancak bu araştırmada diğer Botryosphaeriaceae türleri için seçici primer elde edilmemiştir. Bu tarzda yapılan PCR denemeleri, türlerin moleküler tanısı için oldukça uygundur. Ancak, aynı zamanda çok sayıda örneğin test edilmesi gerektiğinde, çok sayıda PCR reaksiyonları hazırlamak gerekebilir. Çünkü seçici primerlerin bağlanma sıcaklıkları birbirinden uzak olduğu zaman, thermocycler içerisinde geniş sıcaklık aralıkları tertip etmek her zaman mümkün olmayabilir, ya da bazı örnekler için ayrı PCR protokolleri gerekebilir. Yaptığımız bu çalışmanın, yukarıda sonuçları açıklanan iki farklı araştırmaya farklı bir alternatif olabileceği, en azından sadece tanı amacıyla hedef gen bölgesinin sekanslanmasına ihtiyaç duyulmadan tür düzeyinde ayırımına olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

Universal primerlerle yapılan PCR, hemen ardından nükleotid baz dizilimlerinin ortaya konması ve bu dizilerin gen bankasındaki dizilerle karşılaştırılması, fungal tanı için neredeyse kesine yakın sonuçlar vermektedir. Ancak bazı durumlarda (özellikle ITS gen bölgelerindeki dizilimlerin karşılaştırılmasında) birden fazla fungus türüyle %99'luk benzerlikler ortaya çıkabilmekte ve bu durumda kesin ayırım yapılamamaktadır. Böyle durumlarda ilave gen bölgelerine ait nükleotid bilgilerine de ihtiyaç duyulmakta ve bu diziler kombine edilerek filogenetik ağaç oluşturup teşhise gidilebilmektedir. Bazı durumlarda PCR reaksiyonlarının optimum şekilde gerçekleşmemesi veya sekanslama sırasında meydana gelen tahmin edilemez bozukluklar nedeniyle, dizi analizlerinden herhangi bir sonuç alınamamakta, bu nedenlerle hem PCR hem de sekans analizinin yeniden yapılması gerekmektedir. Tüm bu analizlerin yeniden yapılmasının ise ilave bir maliyeti olmaktadır. Gen bölgelerine spesifik sekans analizleri ile fungal tanı, son yıllarda ülkemizde de yaygın kullanılmaya başlanmıştır. Ancak çalışılması planlanan fungal türlerin, RFLP analizleri gibi daha sade analizlerden geçirilmesi ya da bazı seçici primerlerin kullanıldığı PCR testlerinin yapılmasının, araştırmaların maliyetini düşürmek açısından yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada ortaya konulan PCR-RFLP analizleri, Botryosphaeriaceae türlerinin kültüre alınıp klasik metotlarla tanılanması yöntemine göre daha basit, hızlı ve güvenilir sonuçlar vermiştir. Bu test Türkiye bağlarında şimdiki kadar rapor edilmiş farklı cinslere mensup türlerin teşhisini hızlı ve doğru bir şekilde yapabilecek sonuçlar ortaya koymuştur. RFLP bant profilleri, asmadan izole edilmiş ve miseliyal olarak birbirine çok

benzeyen dört farklı türün hızlı bir şekilde ayırt edilmesi için kullanışlıdır. Üstelik gen sekanslama analizleri ile kıyaslandığında oldukça düşük maliyettedir. Ancak temsilci bir türün (kriptik tür) altında gruplanan ve bu türle morfolojik olarak neredeyse hiç ayırt edilemeyen kriptik türlerin RFLP analizleriyle ayırt edilmesi mümkün değildir. Böyle durumlarda detaylı filogenetik analizlere ihtiyaç vardır. Yine birçok fungusun tanısında kullanılan β -tubulin gen bölgesinin, bahsedilen universal primer çiftiyle çoğaltılmasıyla uzun bir nükleotid dizisi elde edildiğinden, bu bölgenin başka RFLP deneyleri için de kullanılabilmesi ve alternatif restriksiyon enzimleriyle de denenebileceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma FBA-2015-3658 numaralı bireysel proje kapsamında desteklenmiştir. Çalışmayı finanse eden Çukurova Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederiz. Bu makale daha önce özet halinde, Türkiye 6. Bitki Koruma Kongresinde (5-8 Eylül 2016, Konya) poster bildiri şeklinde sunulmuştur.

ÖZET

Birçok bitki türünde lokal kuruma ve geriye ölümlere neden olan Botryosphaeriaceae funguslarının klasik tanısı oldukça zor ve zaman alıcıdır. Türlerin hızlı tanısı için türe özgü primerlerle PCR testi, RFLP (Restricted Fragment Length Polymorphism) ya da gen sekanslama gibi bazı moleküler yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Bu çalışma, Türkiye bağlarında şimdiki kadar tespit edilmiş bazı Botryosphaeriaceae familyası fungus türlerinin, PCR-RFLP yöntemi ile hızlı tanısına katkı sağlamayı amaçlamaktadır. Ege ve Akdeniz Bölgesi bağlarından izole edilmiş 4 farklı türe ait (*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Lasiodyplodia theobromae* ve *Neofusicoccum parvum*) 25 izolattan DNA ekstraksiyonları yapılmış, genomik DNA üzerindeki β -tubulin (TUB2) ve ITS bölgesinden tasarlanmış Botryosphaeriaceae cinslerine özgü bölgeler, polimeraz zincir reaksiyonlarıyla çoğaltılmıştır. Bu bölgeler beş farklı restriksiyon endonükleaz enzimiyle (*AluI*, *BsaHI*, *MboI*, *RsaI*, *TaqI*) kesilmiş, agaroz jeldeki (%2) bant profilleri incelenmiştir. Analizlerin sonuçlarına göre; cinse özgü primerlerle çoğaltılan bölge RFLP analizi için uygun olmamıştır. Ancak, β -tubulin bölgesinin bu türlerin ayırımı için en az iki farklı restriksiyon enzimiyle kesilmesi gerektiği ortaya çıkmıştır. *BsaHI* enzimi *B. dothidea* ve *D. seriata*'nın β -tubulin genini keserek, iki ayrı büyüklükte bant profili (*B. dothidea*: 250 ve 700 bp ve *D. seriata*: 400 ve 600 bp) oluşturmuştur. Ancak bu enzim *L. theobromae* ve *N. parvum* için ayırt edici bant verememiştir. Buna karşın

TaqI enzimi de *B. dothidea* ve *D. seriata*'yı ayırt edememiş ancak *L. theobromae* ve *N. parvum*'un β -tubulin genini 2 yerden keserek her bir tür için üç ayrı bant (*L. theobromae*: 200-400-800 bp ve *N. parvum*: 200-400-650 bp) meydana getirmiştir.

Anahtar kelimeler: asma, *Botryosphaeria* geriye ölümü, kesim enzimleri, BsaHI, TaqI

KAYNAKLAR

Akgül D.S., Savaş N.G., Eskalen A., 2014. First report of wood canker caused by *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, and *Lasiodiplodia theobromae* on grapevine in Turkey. Plant Disease, 98 (4), 568.

Alves A., Phillips A.J.L., Henriques I., Correia A., 2005. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species. FEMS Microbiology Letters, 245, 221-229.

Amponsah N.T., Jones E.E., Ridgway H.J., Jaspers M.V., 2008. Production of Botryosphaeriaceae species conidia using grapevine green shoots. New Zealand Plant Protection, 61, 301-305.

Chen S.F., Pavlic D., Roux J., Slippers B., Xie Y.J., Wingfield M.J., Zhou X.D., 2011. Characterization of Botryosphaeriaceae from plantation-grown *Eucalyptus* species in South China. Plant Pathology, 60, 739-751.

Crous P.W., Slippers B., Wingfield M.J., Rheeder J., Marasas W.F.O., Phillips A.J.L., Alves A., Burguess T., Barber P., Groenewald J.Z., 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. Studies in Mycology, 55, 235-253.

Farr D.F., Rossman A.Y., 2011. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungush-ost.cfm> (Erişim tarihi: 23.08.2018).

Glass N.L., Donaldson G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from the filamentous ascomycetes. Applied Environmental Microbiology, 61, 1323-1330.

Hills D.M., Dixon M.T., 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Quarterly Reviews in Biology, 66, 411-453.

Inderbitzin P., Bostock R.M., Trouillas F.P., Michailides T.J., 2010. A six locus phylogeny reveals high species diversity in Botryosphaeriaceae from California almond. Mycologia, 102, 1350-1368.

Liu J.K., Phookamsak R., Doilom M., Wikee S., Li Y.M., 2012. Towards a natural classification of Botryosphaerales.

Fungal Diversity, 57, 149-210.

Mahmodi F., Kadir J.B., Puteh A., Pourdad S.S., Nasehi A., Soleimani N., 2014. Genetic diversity and differentiation of *Colletotrichum* spp. isolates associated with leguminosae using multigene loci, RAPD and ISSR. Plant Pathology Journal, 30 (1), 10-24.

Martin M.T., Cuesta M.J., Martin L., 2014. Development of SCAR primers for PCR assay to detect *Diplodia seriata*. International Scholarly Research Notices, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/824106> 1-9.

Mullis K.B., Faloona F.A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. Methods in Enzymology, 155, 335-350.

Pavlic D., Slippers B., Coutinho T.A., Wingfield M.J., 2007. Botryosphaeriaceae occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to *Eucalyptus*. Plant Pathology, 56, 624-636.

Pavlic D., Slippers B., Coutinho T.A., Wingfield M.J., 2009. Multiple gene genealogies and phenotypic data reveal cryptic species of the Botryosphaeriaceae: A case study on the *Neofusicoccum parvum* / *N. ribis* complex. Molecular Phylogenetics and Evolution, 51, 259-268.

Ridgway H.J., Amponsah N.T., Brown D.S., Baskarathevan J., Jones E.E., Jaspers M.V., 2011. Detection of Botryosphaeriaceous species in environmental samples using a multi-species primer pair. Plant Pathology, 60, 1118-1127.

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N., 1985. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 239, 487-491.

Slippers B., Wingfield M.J., 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. Fungal Biology Reviews, 21, 90-106.

Taylor A., Hardy G.E.J., Wood P., Burguess T., 2005. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. Australasian Plant Pathology, 34, 187-195.

Urbez-Torres J.R., Phillips A.J.L., Gubler W.D., 2015. *Botryosphaeria* dieback. In: Compendium of Grape Diseases, Second Edition. Wilcox W.F., Gubler W.D., Uyemoto J. K., (Eds.), APS Press. St. Paul Minnesota, USA, 33-39.

Urbez-Torres J.R., Castro-Medina F., Mohali S.R., Gubler W.D., 2016. Botryosphaeriaceae species associated with cankers and dieback symptoms of *Acacia mangium* and

Pinus caribaea var. *hondurensis* in Venezuela. Plant Disease, 100, 2455-2464.

Xu C., Zhang H., Chi F., Ji Z., Dong Q., Cao K., Zhou Z., 2016. Species-specific PCR-based assays for identification and detection of Botryosphaeriaceae species causing stem blight on blueberry in China. Journal of Integrative Agriculture, 15 (3), 573-579.