

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
2017-YL-049

***Cryphonectria parasitica*' NİN HİPOVİRÜLENT
STRAINLERİNİN FENOL VE KLOROFORM
KULLANMAKSIZIN dsRNA ANALİZİ İLE
BELİRLENMESİ VE RT-PCR İLE TANILANMASI**

Eda MERSİN

**Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ**

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Eda MERSİN tarafından hazırlanan “*Cryphonectria parasitica*’ nın Hipovirülent Strainlerinin Fenol ve Kloroform Kullanmaksızın dsRNA Analizi ile Belirlenmesi ve RT-PCR ile Tanılanması” başlıklı tez, 01/12/2017 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ	ADÜ	
Üye : Prof. Dr. Semih ERKAN	EÜ	
Üye : Doç. Dr. Ömer ERİNCİK	ADÜ	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY

Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

....../...../2017

Eda MERSİN

ÖZET

***Cryphonectria parasitica*' NİN HİPOVİRÜLENT STRAİNLERİNİN FENOL VE KLOROFORM KULLANMAKSIZIN dsRNA ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ VE RT-PCR İLE TANILANMASI**

Eda MERSİN

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ

2017, 41 sayfa

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 varlığının belirlenmesinde genellikle Morris ve Dodds'un dsRNA izolasyon ve analiz yöntemi kullanılmaktadır. Bu çalışmada ise hipovirulent olabileceği belirlenen *C. parasitica* izolatlarında dsRNA varlığı belirlemek için Baliija ve arkadaşları 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 Bölgelerindeki 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 izolatın 30 tanesi dsRNA ekstraksiyonuna olanak sağlayan Baliija'nın önerdiği yöntemi ile analiz edilmiş ve 25 izolatın dsRNA profili içerdiği belirlenmiştir. dsRNA profili içeren 6 izolat Morris ve Dodds'un yöntemi ile dsRNA varlığı yönünden doğrulanmıştır. Ardından RT-PCR ile 15 izolatın elde edilen dsRNA'ların hipovirüs *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kestane kanseri, *Cryphonectria parasitica*, dsRNA, CHV-1

ABSTRACT

DETERMINATION OF HYPOVIRULENCE STRAINS OF *Cryphonectria parasitica* WITH dsRNA ANALYSIS BY USING NON-PHENOL-CHLOFORM AND THEIR DETECTION BY RT-PCR

Eda MERSİN

M.Sc. Thesis, Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ

2017, 41 pages

Chestnut blight, *Cryphonectria parasitica*, is a serious disease of *Castanea* spp. and causes bark cankers that progressively kill branches and trunks. Hypovirulent cankers were first identified with the awareness of chestnut trees recovering in Italy in 1964. 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 in our country. The dsRNA isolation and analysis method of Morris and Dodds is usually used to determine the presence of dsDNA in hypovirulent isolates. In this study, to determine the presence of dsRNA in *C. parasitica* isolates, which may be hypovirulent, method of Balijja and collaborators has been used. Balijja's method has advantages such as low amount of mycelium and chemicals used according to other isolation method, the phenol-chloroform inclusion and the isolation period of dsRNA can be realized in one day, the study was planned in order to facilitate the future research of our country and region. For this purpose, isolates, were collected from healing cankers of chestnut areas of the Aegean, Black Sea and Marmara, in which light-white micelle formation was observed were used. In this study 30 out of 68 isolates analyzed by Balijja's and only identified dsRNA profile in 25 isolates. dsRNA-containing 6 isolates were analyzed by method of Morris and Dodds and confirmed the existence of dsRNA. RT-PCR revealed that 25 out of 15 dsRNAs belonged to the hypovirus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1).

Key Words: Chestnut blight, *Cryphonectria parasitica*, Chestnut, dsRNA, CHV-1

ÖNSÖZ

Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından (ZRF-16008 numaralı proje) desteklenen bu araştırma, *Cryphonectria parasitica* izolatlarında dsRNA olup olmadığını tespiti için daha önce kullanılan yöntemlere göre pek çok avantajı olan Balijja vd. (2008) metodunun mevcut laboratuvar koşullarına uyarlanarak gelecekte ülkemiz ve bölgemizde yapılacak çalışmalara kolaylık sağlaması amacıyla yapılmıştır.

Kestane kanserine neden olan *Cryphonectria parasitica* fungal etmeni kestane ağaçlarında dal, sürgün ve gövdede farklı boyutlarda gelişen kanserler şeklinde belirtiler göstermekte ve bu kanserli bölgelerde kambiyumun ölmesine neden olmaktadır. Kanser oluşumu gözlenen dokularda iletim demetleri zarar gördüğü için yaprak ve sürgünlere su ve besin maddesi iletimi yapılamadığı için bu organlar, zamanla canlılıklarını kaybetmektedir. Hastalık etmeni, Kuzey Amerika’da ilk olarak 1904 yılında, Avrupa’da 1930’lu yıllarda, Türkiye’de ise 1967’de Marmara Bölgesinde saptanmıştır. Aydın yöresindeki kestane alanlarındaki kurumlara *Cryphonectria parasitica*’nın neden olduğu ilk kez 2003 yılında saptanmıştır. Bu hastalığın en etkili kontrolü doğal veya yapay yollarla *C. parasitica* ‘nın hipovirulent ırklarının hastalıklı kestaneliklere girişi ve yayılması ile gerçekleşmektedir. Hipovirulent *C. parastica* ile enfekteli kestane ağaçlarında yeni kallus dokusu geliştiği için kanserlerin etkinliği azaltmakta ve iyileşmektedirler.

Balijja vd. (2008)’nin yöntemi, maliyeti azaltması, fungal izolatların dsRNA varlıklarını daha kısa sürede saptaması ve insan sağlığına zararlı olan fenol-kloroform gibi maddeleri içermemesi gibi avantajları nedeni ile yapılan bu çalışmayla ülkemizde gelecekte fungal etmenlerin kontrolünde mikovirüslerin kullanılarak biyolojik mücadele olanaklarının değerlendirilmesi amacı ile yapılacak olan çalışmalarda kolaylık sağlaması planlanarak yapılmıştır.

Çalışmamda bana yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ’ e, tezimin *Cryphonectria parasitica* ile ilgili tüm aşamalarında benden yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Ömer ERİNCİK’ e, bana tezim boyunca maddi ve manevi destek olan başta ailem olmak üzere, Zir. Müh. Derman PARMAK’ a ve Zir. Yük. Müh. Sahra Hosseinalizadeh’ e teşekkür ederim.

Eda MERSİN

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM	14
3.1. Materyal	14
3.1.1. Örnek Toplama.....	14
3.1.1.1. Patojenin izolasyonu	15
3.1.1.2. İzolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesi	16
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. İzolatların dsRNA İçeriklerinin Belirlenmesi	17
3.2.1.1. Balijja vd. (2008) yöntemi	17
3.2.1.2. Morris ve Dodds (1979) yöntemi	18
3.2.2. dsRNA Mikovirüsünün Tanılanması.....	20
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	22
4.1. İzolatların Kültürel Özelliklerinin Belirlenmesi.....	22
4.2. İzolatların dsRNA İçeriklerinin Belirlenmesi	22
4.3. dsRNA Mikovirüsünün Tanılanması	26
5. SONUÇ	30

KAYNAKLAR.....	33
ÖZGEÇMİŞ.....	41



SİMGELER DİZİNİ

FAO	Food Agriculture Organization
gr	Gram
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
μ L	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Toplanan kabuk doku örneklerinden <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının elde edilmiş aşamaları	16
Şekil 3.2. PDA üzerinde gelişen a) 3 günlük, b) 7 günlük ve c) 14 günlük <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatı (E-246)	17
Şekil. 3.3. <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının Balijja vd. (2008) yöntemine göre dsRNA izolasyonu aşamaları a) fungal miselyumların ezilmesi işlemi b) 450 µl 1XSTE+EtOH (%20) ile yıkama işlemi.....	18
Şekil 3.4. <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının Morris ve Dodds (1979) yöntemine göre dsRNA izolasyonu aşamaları a) %16 etanol içeren 60 ml 1X STE tampon solüsyon ile yıkama işlemi b) çalkalayıcıda 160 devirde 30 dakika buz içerisinde bekletilen tüpler c) santrifüj sonrası boşaltılarak kurutulan tüpler.....	20
Şekil 4.1. a) Beyaz misel kolonisi oluşturan <i>Cryphonectria parasitica</i> (Ksm-B-158) izolatı, b) turuncu misel gelişimi gösteren <i>Cryphonectria parasitica</i> (İzmir-893) izolatı	22
Şekil 4.2. Balijja vd., (2008) yöntemi ile <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarından elde edilen dsRNA' ların agar jel elektroforez görüntüsü; Marker (M), 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).....	24
Şekil 4.3. Morris ve Dodds (1979) yöntemi ile <i>Cryphonectria parasitica</i> 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).....	24
Şekil 4.4. dsRNA <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının CHV-1' e özel ORF A gen bölgesi için hvep1 ve EP-721-4 primerleri kullanılarak RT-PCR testlerinin sonuçları: M DNA ladder mix (MBI Fermentas), 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-602 815) K su kontrol	27

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünyada kestane üreticisi ülkelerin kestane üretim alanları ve üretim miktarları (Anonim, 2016b)	2
Çizelge 1.2. 2006-2016 yılları arasında Türkiye’de kestane ağacı sayısı ve üretim miktarı (Anonim, 2016c)	2
Çizelge 1.3. Türkiye’de Bölgelere göre kestane üretim alanları ve miktarı (Anonim, 2016d)	3
Çizelge 1.4. Ege Bölgesi illerinde kestane üretim alanı, ağaç sayıları, üretim ve verim miktarları (Anonim, 2016e)	3
Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan izolatların bölgelere ve illere göre dağılımı.....	15
Çizelge 3.2. CHV-1 enfekteli izolatların belirlenmesinde ORF A gen bölgesi çoğaltımı için kullanılan primerler	21
Çizelge 3.3. RT-PCR yapılan <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının alındıkları iller, izolat adı ve sayısı.....	21
Çizelge 4.1. dsRNA varlığı yönünden pozitif <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının alındıkları iller ve sayıları	23
Çizelge 4.2. Bölge ve illere göre dsRNA analizi yapılan, dsRNA bulunan ve CHV-1 olduğu tespit edilen izolatlar.....	27

1. GİRİŞ

Kestane (*Castanea sativa* Miller) meşe ve kayınla birlikte kayıngiller (*Fagaceae*) familyasına girmektedir. Kestane, kerestesi ve meyvesi nedeniyle önemli bir orman ağacıdır. Asya, Avrupa ve Amerika’ da olmak üzere dünyanın pek çok kıtasında kültürü yapılan orman ağaçlarındandır. Kestanenin 13 türü bilinmekte, bunlar Kuzey Amerika, Avrupa ve Doğu Asya’da yetişmektedir (Burnham vd., 1986). Türkiye’ de Ege, Marmara ve Karadeniz Bölgelerinde kestane alanları bulunmakta ve ürünü toplanmaktadır. Ülkemiz kestane üretiminde dünyada 2016 verilerine göre ikinci sırada yer almaktadır (Anonim, 2016). Ege, Karadeniz ve Marmara Bölgelerinde toplam kestane ağacı sayısı/varlığımız 2.2350.000 üzerindedir.

Kestane, doyurucu olma özelliğinden ziyade beslenmeye katkı sağlayan pek çok besin ögesine sahiptir. Vitamin açısından oldukça zengin bir besindir. Diğer kabuklu yemişlere göre, vitamin ve mineral maddeler bakımından üstündür. B1, B2 ve C vitaminleri bakımından zengin bir kaynak olan kestanenin sağlık bakımından faydaları çok fazladır. Düşük kalorili olmasına karşın, vitamin mineral ve diğer besleyici değerler açısından zengindir. Kırmızı kan hücreleri ve DNA sentezine yardımcı olacak folik asidi üretmektedir. Kestane demir, kalsiyum, magnezyum, manganez ve fosfor gibi mineraller bakımından zengin bir besindir. Aynı zamanda 100 gram kadar kestane 518 mg potasyum ihtiva etmektedir (Anonim, 2016a).

FAO’ nun 2016 yılı istatistik verilerine göre, kestanenin dünyada toplam üretim alanı 562.114 ha ve toplam meyve üretimi ise 1.925.255 ton olarak bildirilmiştir. Türkiye sahip olduğu 115.704 ha kestane üretim alanı ve 63.762 ton üretim miktarı ile dünyada ikinci sırada yer almaktadır. (Çizelge 1.1.) (Anonim, 2016b).

Çizelge 1.1. Dünyada kestane üreticisi ülkelerin kestane üretim alanları ve üretim miktarları (Anonim, 2016b)

Ülkeler	Üretim Alanı (ha)	Üretim Miktarı (ton)
Çin	297.000	1.683.815
Türkiye	115.704	63.762
Portekiz	35.352	18.456
Kore	33.000	56.551
İspanya	31.158	16.136
İtalya	21.500	51.959
Japonya	20.200	16.136
Yunanistan	8.200	28.440
Toplam	562.114	1.935.255

Türkiye’ de kestane üretim miktarı 1991 yılından sonra azalış göstermiştir. 2013 yılından itibaren ise tekrar 60.000 ton seviyelerine ulaşmıştır. Ülkemizdeki toplam kestane ağacı sayımız 2006-2016 yılları arasında büyük oranda değişim göstermemiş olup 2010 yılından itibaren meyve vermeyen ağaç sayısında azalma görülmektedir. 2013-2016 yıllarındaki üretim miktarına bakıldığında ise yıllara göre az da olsa bir artışın olduğu gözlemlenmektedir (Çizelge 1.2.) (Anonim, 2016c).

Çizelge 1.2. 2006-2016 yılları arasında Türkiye’de kestane ağacı sayısı ve üretim miktarı (Anonim, 2016c)

Yıllar	Meyve Veren Ağaç Sayısı (bin)	Meyve Vermeyen Ağaç Sayısı (bin)	Üretim Miktarı (ton)
2006	1.863	447	53.814
2007	1.948	444	55.100
2008	1.949	529	55.395
2009	1.952	442	61.697
2010	1.920	394	59.171
2011	1.922	366	60.270
2012	1.939	306	57.881
2013	1.959	362	60.019
2014	1.991	362	63.762
2015	2.008	366	63.750
2016	1.950	371	64.705

Ülkemizde pekçok bölgede kestane yetiştiriciliği yapılmaktadır (Çizelge 1.3.). TÜİK 2016 yılı verilerine göre Ege Bölgesi 98.724 da kestane üretim alanı ve % 85’ lik payı ile birinci sırada yer almaktadır. Ege Bölgesi’ni sırasıyla Marmara, Karadeniz ve Akdeniz Bölgeleri takip etmektedir. Bölgelere göre kestane üretim

miktarlarına bakıldığında ise, 2016 yılında 44.203 tonluk kestane üretim miktarı ve % 68' lik Türkiye payı ile Ege Bölgesi birinci sırada bulunmaktadır. Karadeniz Bölgesi % 21' lik üretim payı ile ikinci, Akdeniz Bölgesi ise % 10' luk üretim payı ile üçüncü sırada yer almaktadır (Çizelge 1.3) (Anonim, 2016d).

Çizelge 1.3. Türkiye’de Bölgelere göre kestane üretim alanları ve miktarı (Anonim, 2016d)

Bölgeler	Üretim Alanı (da)	Meyve Veren Ağaç Sayısı	Meyve Vermeyen Ağaç Sayısı	Toplam Ağaç Sayısı	Üretim Miktarı (ton)
Ege	98.724	1.263.101	242.901	1.506.002	44.203
Doğu Marmara	11.558	110.439	16.411	126.850	3.896
Batı Karadeniz	4.129	409.499	76.155	485.654	12.382
Batı Marmara	1.082	63.080	14.302	77.382	2.368
Doğu Karadeniz	126	97.232	19.630	116.862	1.764
Akdeniz	80	1.040	565	1.605	79
Orta Doğu Anadolu	5	600	100	700	13
Toplam	115.704	1.944.991	370.064	2.315.055	64.705

Ege Bölgesinde Aydın 68.477 da üretim alanı ve 25.423 tonluk üretim miktarı ile birinci sırada yer almakta olup onu 25.460 da alan ve 11.603 ton üretimi ile İzmir takip etmektedir (Çizelge 1.4.) (Anonim, 2016e). Dünya kestane üretiminin %3’ü karşılayan ülkemizde üretimin yaklaşık %33’ünü Aydın ili karşılamaktadır (FAO, 2016; TÜİK, 2016). Bu da Dünya kestane üretiminin yaklaşık %1’dir. Ege Bölgesinde Manisa, Denizli, Muğla, Kütahya ve Afyon illerinde de kestane yetiştiriciliği yapılmaktadır (Çizelge 1.4.).

Çizelge 1.4. Ege Bölgesi illerinde kestane üretim alanı, ağaç sayıları, üretim ve verim miktarları (Anonim, 2016e)

İller	Alan (da)	Meyve Veren Ağaç Sayısı (bin)	Meyve Vermeyen Ağaç Sayısı (bin)	Toplam Ağaç Sayısı (bin)	Üretim (ton)	Verim (kg/ağaç)
Aydın	68.477	665.209	119.080	784.289	25.423	38
İzmir	25.460	365.150	51.644	416.794	11.603	32
Manisa	3.852	56.425	11.625	68.050	2.502	44
Denizli	817	66.955	7.297	74.252	2.120	32
Muğla	67	1.785	112	1.897	105	59
Kütahya	51	107.527	53.723	161.250	2.448	23
Afyon	0	50	420	470	2	40

Ülkemizde 1991 yılında 81.000 ton olan kestane üretimi 2016 yılında 64.705 tona düşmüştür (Anonim, 2016c). Bu azalışın en önemli nedenlerinden birisinin kestane kanseri hastalığı olduğu ifade edilmektedir. Kestane kanseri (*Cryphonectria parasitica* Murr. Bar.) Türkiye’de dahil olmak üzere dünyanın birçok bölgesinde kestane varlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Enfeksiyon genellikle gövdelerde ve dallarda kabuk nekrozu şeklindedir. Hastalık, özellikle hastalığın uzun süredir var olduğu bölgelerde birçok kestane ağacının ölümüne neden olmaktadır (Katırcıoğlu vd., 2010).

Bu hastalığın en etkili kontrolü doğal olarak veya yapay yollarla *C. parasitica* ‘nın hipovirulent ırklarının hastalıklı kestaneliklere girişi ve yayılması ile gerçekleşmektedir. Kestane alanlarına sahip bir çok ülkede kestane kanseri ile hipovirulent ırklar kullanılarak başarılı bir şekilde, biyolojik yolla mücadele edilebilmektedir (Anagnostakis ve Jaynes, 1973; MacDonald ve Fulbright, 1991; Heiniger ve Rigling, 1994; Bissegger vd., 1997; Robin ve Heiniger, 2001; Trestic vd., 2001; Sotirovski vd., 2001; Krstin vd., 2008). Ülkemizde de hipovirulent ırklar kullanılarak (Çeliker ve Onoğur, 2001; Çeliker vd., 2006; Akıllı vd., 2009; Akıllı vd., 2012) yapılan uygulamalar sonucunda hastalığın kontrolü açısından başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Hipovirulensliği oluşturan biyolojik kontrol ajanı bir dsRNA virüsü olup en yaygın olarak kullanılan *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1)’ dir. Mikovirüs, hifsel anastomoz yoluyla hipovirulent bireyden vejetatif olarak uyumlu virulent bireye taşınarak onun hipovirulent fenotipe dönüştürülmesine neden olabilir. Biyolojik mücadele çalışmalarında hipovirulent ırkların belirlenmesi için kullanılan dsRNA izolasyonunda (Heiniger ve Rigling, 1994; Steenkamp vd., 1998; Gürer vd., 2001; Çeliker ve Onoğur, 2001; Çeliker vd., 2006; Akıllı vd., 2009; Akıllı vd., 2012) Morris ve Dodds 1979, Valverde vd., 1990; Allemann vd., 1999) fenol kloroform ile ekstraksiyonu ve ardından CF-11 kolon kromatografisi kullanılmıştır. Bu yöntemlerde fungal miselyum (6-10 gr) ve kullanılan kimyasal madde ihtiyacı fazla olup uygulama süresi 4 ile 5 gün arasında değişmektedir. Ayrıca, izolasyon sırasında kullanılan fenol ve kloroform gibi insan sağlığı açısından risk oluşturan kimyasal maddeler bu yöntemlerin diğer bir dezavantajıdır. dsRNA izolasyonu için gerekli diğer kimyasal madde ve çözeltilerin fazla miktarlarda kullanımı da araştırmacılara iş yükü ve maliyet getirmektedir. Bu nedenle ülkemizde yapılacak olan mikovirüs tespiti ve hipovirulenslik ile ilgili çalışmalara emek, zaman ve maliyet açısından kolaylık sağlaması amacıyla Baliija vd. (2008)’nin *Aspergillus niger*, *Cryphonectria*

parasitica, *Gremmeniella abietina*, *Sphaeropsis sapinea* fungus mikovirüsleri için geliştirdiği ekstraksiyon yönteminin uygulanması bu çalışmanın başlıca amacını oluşturmaktadır. Bu yöntemle *C. parasitica*'daki mikovirüslerin fenol ve kloroform kullanılmaksızın dsRNA ekstraksiyonu için başarılı sonuçlar alındığı Balijja vd. (2008) tarafından ifade edilmiştir. Diğer izolasyon yöntemine göre kullanılan miselyum ve kimyasal madde miktarının az olması, fenol- kloroform içermemesi ve dsRNA izolasyon süresinin bir gün gibi kısa bir sürede gerçekleştirilebiliyor olması gibi avantajları olan bu yöntemin (Balijja vd.,2008), yurt dışında yeterince yaygınlaşmamış ve ülkemizde bu güne kadar uygulanmamış olduğu görülmektedir. Bu çalışma ile yöntem kendi laboratuvar koşullarımıza uyarlanmış ve bu durumun gelecekte ülkemiz ve bölgemizde bu konuda yapılacak olan araştırmalara kolaylık sağlayacağı düşünülmüştür.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

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’lu yıllarda ortaya çıkmıştır. Türkiye’de ise Kestane Kanseri ilk olarak 1967’de Marmara Bölgesinde saptanmış (Akdoğan ve Erkan, 1968) ve bu bölgeden Karadeniz Bölgesindeki kestaneliklere yayılarak pek çok kestane ağacının ölümüne neden olmuştur (Delen, 1979; Coşkun vd., 1999). Aydın yöresindeki kestane alanlarındaki kurumlara *Cryphonectria parasitica*’ nın neden olduğu ilk kez 2003 yılında saptanmıştır (Erincik vd., 2003).

Kestane kanserinin fungal etmeni yara yolu ile giriş yapmakta, kabuk altında gelişmekte ve sürgün, dal ve gövdede kambiyumun ölmesine neden olmaktadır. Hastalık ilk olarak gövdede farklı boyutlarda gelişen kanserler şeklinde kendini göstermekte ve kanserler yana doğru gelişmektedir. Yaprakların ve sürgünlerin öz kısmına su iletimi yapılamadığı için bu organlar, zamanla canlılıklarını kaybetmektedir. Bu belirtilere ek olarak kanserli dokular üzerinden dışarıya çıkan turuncu konidyum kitleleri böcekler, hayvanlar ve insanlar aracılığı ile diğer ağaçlara ulaşabilmektedir. Enfekteli dokulardaki peritesyumlarda oluşan askosporlar ise daha uzun mesafelere hava akımı ile yayılmaktadır (Anagnostakis, 1987, Guerin vd., 2001).

Kuzey Amerika’da geçmişte ciddi epidemilere neden olan hastalık, Avrupa kestane ormanlarını da tehdit etmekte, ancak fungustaki hypovirüs sayesinde fungal etmenin zararı birçok ülkede önlenabilmektedir (Choi ve Nuss, 1992). Kestane Kanseri hastalığı *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de kestane üretiminde önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. Kestane kanseri ilk defa ülkemizde Marmara Bölgesinde 1967 yılında tespit edilmiştir (Akdoğan ve Erkan, 1968). Hastalık Marmara (Delen, 1979; Coşkun ve Kural, 1994), Karadeniz (Delen, 1979; Coşkun ve Kural, 1994) ve Ege Bölgesi’nde (Demir ve Çeliker, 1996; Erincik vd., 2003) yapılan araştırmalar sonucunda saptanmıştır. Hastalık ile mücadelede en etkili yöntemin biyolojik kontrol ajanı olarak hipovirulent ırkların kullanımının olduğu yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur (Robin ve Heiniger, 2001; Milgroom ve Cortesi, 2004). Hipovirulent kanserler ilk olarak 1964 yılında İtalya’ da iyileşmekte olan kestane ağaçlarının fark edilmesi ile tespit edilmiştir (Anagnostakis, 1987).

Ülkemizde Ege, Karadeniz ve Marmara Bölgelerinden çok sayıda izolat toplanmış ve izolatların eşleşme tipleri, vejetatif uyum grupları, fenotipleri ve fungusun hastalık yapma şiddetine olan etkileri yapılan pek çok çalışma sonucunda tespit edilmiştir (Coşkun vd., 1999; Gürer vd., 2001; Çeliker ve Onoğur, 2001; Açıkgöz vd., 2009; Akıllı vd., 2009). Bugüne kadar Arnavutluk, Bosna-Hersek, Hırvatistan, Fransa, Almanya, Yunanistan, Macaristan, İtalya, Portekiz, Makedonya, Romanya, Slovakya, Slovenya, İspanya, İsviçre, Türkiye ve Amerika' da hipovirüsent ırkların tespiti yapılmıştır (Robin ve Heiniger, 2001).

C. parasitica 'nın hipovirüsent ırklarının, zayıf patojen olmaları nedeniyle genellikle hastalık yapma yetenekleri düşüktür. Bu nedenle, kabuk enfeksiyonları daha az belirgin, yüzeysel kabuk gelişimi sınırlı ve enfeksiyon odun dokusuna kadar ilerlememekte ve kallus dokusu oluşmaktadır. Bu nedenle ağacın gövdesinde hastalık bulunmasına rağmen ağaç yaşamını sürdürmektedir. Meydana gelen enfeksiyonlar iyileşen kanserler ve iyileşmiş kanserler olmak üzere iki farklı şekilde oluşmaktadır. İyileşen kanserlerde, hastalıklı kırmızı kabuk dokusu şişkinleşmiş, miselyum gelişimi kabuk dokusunda yüzeysel ve kallus oluşumu belirgindir (Milgroom ve Cortesi, 2004). Hipovirüsent ırklar ve konukçu kestane kanseri fungal etmeni (*Cryphonectria parasitica*) arasındaki etkileşim iyi çalışılmış ve biyolojik mücadeledeki potansiyeli değerlendirilmiştir (Anagnostakis vd., 1998; Nuss, 1992, 1996; Suzuki ve Nuss, 2002).

Bu fungus virüs tarafından enfekte edilmekte ve böylelikle fungusun enfeksiyon gücünde azalma olmaktadır. Hipovirüsler *C. parasitica* 'yı enfekte edebilen sitoplazmik çift sarmallı RNA (dsRNA) mikovirüslerdir. Mikovirüsler kapsid oluşturmamaları ve hücre dışı yayılım göstermemeleri ile pek çok virüsten farklıdır (Smith, 20013). Mikovirüslerin ilk kez rapor edilmesinden bu yana iki yüzden fazla mikovirüs on familya içerisinde sınıflandırılmıştır (Ghabrial ve Suzuki, 2009). Bunlar *Hypoviridae*, *Partitiviridae*, *Totiviridae*, *Barnaviridae*, *Narnaviridae*, *Megabirnaviridae*, *Pseudoviridae*, *Chrysoviridae*, *Metaviridae*, *Endornaviridae* 'dir. Mikovirüslerin çoğunun dsRNA (çift sarmallı RNA) genoma sahip olduğu, daha az oranda +ssRNA genoma ve az sayıda mikovirüsün ise ssDNA ya da dsDNA genomu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Yu vd., 2010). Hipovirüslerin *C. parasitica* 'nın virülensliğini nasıl azalttığı tam olarak bilinmese de bunu konukçusu olduğu hastalık etmeninin enzim mekanizmasını baskılayarak ya da bazı enzimlerin aktivitesini arttırarak yaptığı düşünülmektedir (Chen vd.,

1996; Powell ve Van Alfen, 1987). Bitki kütikulasını parçalaması ve fungal penetrasyona yardımcı olması nedeni ile bitki patojeni funguslar için önemli olduğu kabul edilen kitinaz enziminin hipovirüs enfeksiyonu ile azaldığı belirlenmiştir. Nitekim, bazı bitki patojeni funguslar ile kitinaz üretimi arasında pozitif ilişki olduğu bildirilmiştir (Schafer, 1993; Rogers vd., 1994; Li vd.,2003). Varley vd. (1992)' ne göre *C. parasitica*'nın virü lent ve hipovirü lent ırklarının her ikisinde de kitinaz geni bulunmakta ancak hipovirü lent ırklarında dsRNA varlığının kitinaz gen ifadesini baskıladığı ve bu yüzden kitinaz üretiminde büyük ölçüde azalma olduğunu bildirmiştir.

Hipovirus ya aseksüel sporlar (konidia) aracılığıyla dikey ya da hifal anastomoz yoluyla yatay olarak iki şekilde aktarılmaktadır. Hipovirüsler anastomoz yolu ile aynı vejetatif uyum grupları arasında yayılmaktadır. Hiflerin birleşmesinin ardından sitoplazma karışımı ile virü lent *C. parasitica* izolatları hipovirü lent strainlere dönüştürülebilmektedir (Choi ve Nuss, 1992). *C. parasitica*'da hipovirü lensliğe neden olan mikovirüsler Hypoviridae familyasında yer almaktadır. Bugüne kadar bu familyada dört *Cryphonectria* hipovirüs türü belirlenmiş ve bunlar CHV-1, CHV-2, CHV-3 ve CHV-4 olarak adlandırılmıştır (Hillman ve Suzuki, 2004).

CHV-1 ilk olarak Avrupa'da tespit edilmiş olup pigment ve sporulasyonun azalması ile ilişkilidir. CHV-1' in dört alt tipi belirlenmiş ve bunlardan CHV-1 alt tip I (İtalyan tipi) Avrupa'da dominant ve yaygın olarak görü lürken, diğerleri ise Almanya, Fransa ve İspanya' da daha düşük sıklıkta görü lmektedir (Hillman vd., 1994; Allemann vd.,1999; Milgroom ve Cortesi, 2004). F1 ve F2 (Fransız tipi) alt tipleri Fransa ve Kuzey İspanya' da , D/E alt tipi ise İspanya ve Almanya' da tespit edilmiştir (Gobbin vd. ,2003; Montenegro vd., 2008). Akıllı vd. (2012)' nin bildirdiğine göre F2 alt tipi ağırlıklı olarak Doğu Karadeniz Bölgesinde (Ordu, Trabzon, Rize ve Artvin) görü lürken, F1 alt tipi Marmara ve Batı Karadeniz Bölgesinde tespit edilmiştir. Bu dört alt tipin *C. parasitica* 'nın virü lensliği üzerine olan etkisi farklılık göstermektedir. Alt tip I en düşük virü lensliğe, D orta derecede, F1 ve F2 ise yüksek virü lensliğe sahiptir (Bryner vd., 2012). Alt tip F1 ve F2, I' ya göre fungusun gelişmesini ve sporulasyonu önemli ölçüde azaltır (Robin et al.,2010 1999). Alt tip I fungusun büyüme ve sporulasyonuna izin verir ve daha az engelleyicidir (Bryner vd., 2012). Fungal popü lasyonlarda nispeten hızlı yayılımı nedeniyle, alt tip I'nın, Avrupa'da kestane kanserinin biyolojik

kontrolünde önemli rol oynadığı öne sürülmektedir (Bryner vd., 2012). CHV-2 ilk olarak 1989'da New Jersey ve daha sonra 1995 yılında Çin' de tespit edilmiştir. Şimdiye kadar bulunan virülensliği en zayıflatıcı hipovirüs olarak bilinmektedir. Ancak, pigment üretimi ve sporulasyonu ise düşük miktarda azaltabilmektedir (Hillman vd., 1994). CHV-3'e doğal olarak Michigan ve Ontario da rastlanmış fakat Asya'da rastlanmamıştır. CHV-4 Kuzey Amerika' da en yaygın görülen *C. parasitica* virüsü olup 1994 yılında Batı Virginia' da tespit edilmiştir. Genom yapısından dolayı taksonomik olarak diğerlerine benzemektedir. Ancak virülensliği diğerlerine göre az ya da hiç görülmemektedir (Heiniger ve Rigling 1994; Hillman vd., 1994; Milgroom ve Cortesi, 2004). *Cryphonectria* hipovirüs türlerinin *C. parasitica*' nın fenotipine etkileri farklılık göstermektedir. CHV-1 izolatları ile enfeksiyon sonucunda fungusda beyaz ya da beyaza yakın, CHV-2 ile enfeksiyonda ise turuncu- kahverengi fenotip ortaya çıkmaktadır. CHV-3 ve CHV-4' ün fungal pigment üzerine etkisi çok azdır (King vd., 2012).

C. parasitica izolatlarının kültürel özelliklerinin incelenmesi hipovirülensliğin belirlenmesinde en çok kullanılan yöntemlerdendir. Hipovirü lent izolatlarda pigmentasyon ve sporulasyon virü lent izolatlardan daha azdır. Bu izolatların PDA besisi ortamında beyaz renkli gelişim göstermesi ve az sayıda konidi meydana getirmesi nedeniyle bu izolatların hipovirü lent olabileceği pek çok kaynakta belirtilmektedir (Anagnostakis ve Day, 1979; Bissegger, 1997; Milgroom ve Cortesi, 2004). Akıllı vd., (2012) tarafından kültürel morfolojinin izolatın hipovirülensliği hakkında genel bir bilgi verdiği ve beyaz kültürlerin, krem renkli kültürlerle göre daha iyi bir gösterge olduğu bildirilmiştir.

Radócz (2001) Harpat havzasından elde ettiği izolatları 7 gün 25°C' de karanlıkta, daha sonra ışık altında 7 gün inkübe ettiğinde hipovirüs içeren izolatların beyaz kalırken, hipovirüs içermeyenlerin gözle görülür şekilde turuncu pigmentasyon oluşturduğunu bildirmiştir. Gürer vd., (2001) tarafından Türkiye'de kestane yetiştiriciliği yapılan iki bölgedeki *C. parasitica*' nın alt tiplerinin genetik çeşitliliğini belirlemek için yapılan çalışmada izolatlar 7 gün 25 °C' de karanlıkta, daha sonra 7 gün ışık altında inkübe edilerek *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) enfeksiyonunun bir göstergesi olarak, beyaz fenotipli miselyumu gelişimi gösteren izolatlar seçilmiştir.

Akıllı (2008) tarafından Karadeniz Bölgesinden elde edilen 294 izolatın fenotipik özelliklerine bakılarak 269 adedi virü lent, 25'i ise hipovirü lent olarak belirlenmiştir. Hogan (2006)'nın bildirdiğine göre, 7 tanesi turuncu, 11 tanesi beyaz ve 18 tanesi krem renkli miselyal gelişim gösteren 51 izolattan turuncu olanlar dsRNA negatif, beyaz olanlar dsRNA pozitif krem renkli gelişim gösterenlerde ise daha az pigmentasyonlu olanların dsRNA pozitif olduğu tespit edilmiştir.

Curkovic-Perica vd., (2011)'in bildirdiğine göre, Slovenya'da *C. parasitica*'nın vejetatif uyum çeşitliliği, mating tiplerinin belirlenmesi ve *Cryphonectria hypovirus 1*'in ortaya çıkışı ile ilişkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada toplanan 254 izolattan 74 tanesi (41 beyaz, 10 krem ve 23 turuncu miselyal gelişim) Alleman vd., (1999) yöntemine göre analiz edilmiş ve 49 izolatta (41 beyaz, 8 krem renkli miselyal gelişim) dsRNA olduğu tespit edilmiştir. Turuncu kültür morfolojisi gösteren izolatlarda ise dsRNA varlığı belirlenmemiştir.

Ülkemizde Marmara ve Karadeniz Bölgerinden elde edilen 134 izolat Morris ve Dodds (1979) dsRNA analiz yöntemine göre analiz edilmiş ve dsRNA profili içeren 19 izolat tespit edilmiştir (Gürer vd., 2001). Marmara Bölgesinin 15 farklı lokasyonundan elde edilen 198 *C. parasitica* izolatından 34 tanesinde beyaz renkli miselyal gelişim belirlenmiş ve bu izolatların hipovirü lent olabileceği düşünülerek dsRNA varlıklarının tespit edilmesi için Allemann vd., (1999)'nin CF-11 kolon kromatografi yöntemi kullanılarak 30 izolatta dsRNA varlığı kaydedilmiştir (Akıllı, 2012).

Kuzey Amerika'da, Avrupa'da (Anagnostakis ve Jaynes, 1973; McDonald ve Fulbright, 1991; Heiniger ve Rigling, 1994; Bissegger vd., 1997; Robin ve Heiniger, 2001; Trestic vd., 2001; Sotirovski vd., 2001; Krstin vd., 2008) ve Türkiye'de (Çeliker ve Onoğur, 2001; Çeliker vd., 2006; Akıllı vd., 2009; Akıllı vd., 2012) kestane kanseri ile hipovirulent ırklar kullanılarak başarılı bir şekilde mücadele edilebilmektedir. Heiniger ve Rigling (1994)'in bildirişine göre, Grenthe ve Berthelay- Sauret 1967-1972 yılları arasında Güney Fransa'da 12 kestane bahçesinde yaptıkları çalışmada 20 hektarlık bir alan içersindeki iki yüz kanserli kestane ağacı vejetatif olarak uyumlu hipovirü lent izolat ile aşılanmıştır. Hipovirü lent ırk aşılanmamış kanserler ile karşılaştırıldığında, aşılama yapılan kanserlerde genişleme gerçekleşmemiş ve hiç biri ölümcül kanserlere

dönüşmemiştir. İşlem görmemiş kanserlerinde çalışmadan dört yıl sonra iyileşme belirtileri gösterdiği saptanmıştır. Fransa'nın pek çok bölgesinde hipovirulent ırklar ile yapılan alan çalışmaları başarıya ulaşmıştır.

İtalya'da yapılan benzer bir çalışmada da 233 aktif kansere uygulanan hipovirulent izolatlar başarılı sonuçlar vermiştir (Heiniger ve Rigling, 1994). İsviçre'de Bissegger vd. (1997), deneme alanlarında hipovirulent ırklar ile yaptıkları uygulamalarda olumlu sonuçlar elde ettiklerini bildirmiştir.

Kestane kanserine karşı biyolojik mücadele çalışmaları Türkiye'de de son yıllarda hız kazanmıştır. Çeliker (2000)' nin çalışmasında Ege, Marmara ve Karadeniz Bölgelerinden toplanan 324 izolatattan 7 tanesi hipovirulent olarak saptanmıştır. Hipovirulent 7 ırkın kullanıldığı virülenslik çalışmalarında, sadece virulent ırk inokule edilen fidanların kuruduğu, sadece hipovirulent ırkla inokule edilen fidanlarda ise belirgin bir kallus dokusunun oluştuğu ve lezyonların küçüldüğü belirlenmiştir. Hipovirulent ve virulent izolatların beraber inokule edildiği fidanlarda kanser gelişiminin durduğu ve kallus dokusunun oluşmaya başladığı gözlemlenmiştir.

Çeliker vd. (2006) tarafından hipovirulent ırkların bulunmadığı, virulent ırkla doğal olarak enfekteli olan Manisa'nın Hacısalar köyündeki bir kestanelikte, hipovirulent izolat kullanılarak hastalığın doğal koşullarda biyolojik mücadelesine yönelik bir çalışma yürütülmüştür. Deneme alanında sadece EU-1 uyum grubu ve *Mat1-1* eşleşme tipine ait virulent ırkların bulunduğu saptanmış, Marmara Bölgesinden elde edilen ve çalışmada kullanılan hipovirulent ırkın da EU-1 uyum grubu, *Mat1-1* eşleşme tipine ait olduğu belirlenmiştir. Deneme alanındaki 18 adet hastalık taşıyan kestane ağacı üzerindeki 29 aktif kanserin çevresine hipovirulent ırkla inokulasyon yapılmış ve hastalık gelişimi izlenmiştir. Sonuçta, hipovirulent strain dsRNA'sını virulent straine aktarabilmiş ve bu kanserlerin çoğunun 1 yıl sonra iyileşmeye başladığı gözlemlenmiştir. Kırmızı renkli olan aktif kanserlerin rengi kırmızıdan siyahımsı kahverengiye dönüşmüş, kabukta yüzeysel çatlamlar ortaya çıkmış, kanserin dokuda derinlemesine yayılması durmuştur. İnokulasyondan sonra iki yıl boyunca, iyileşen kanserlerden hipovirulent izolatlar geri elde edilmiştir.

Karadeniz Bölgesinden Akıllı vd. (2012) tarafından 2008-2009 yıllarında toplanan örneklerden elde edilen *Cryphonectria parasitica*'nın iki virulent, üç hipovirulent izolatı, beş *Trichoderma*, dört *Penicillium* ve dört *Bacillus* izolatı kullanılarak kestane kanserinin biyolojik mücadelesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Hipovirulent izolatlar ve antagonistik mikroorganizmaların etkinliği üç yaşında kestane fidanlarda 6 mm'lik kabuk diskleri çıkartılmış ve açılan deliklere ilk olarak virulent *C. parasitica* izolatı diski sonra hipovirulent izolat veya antagonist fungusların diski yerleştirilmiştir. *Bacillus*'ların ise 1010 hücre mL⁻¹ bakteri süspansiyonu önce deliklere uygulanmış sonra virulent *C. parasitica* diski uygulanmıştır. Hipovirulent izolatların etkinliği virulent izolata bağlı olarak değişmiş, hipovirulent izolat Z - 1 en virulent izolat K - 19' a karşı %59 engelleme sağlamış diğer yandan, aynı izolat daha az saldırgan olan izolat K - 44' e karşı %32 engelleme oluşturmuştur. Diğer hipovirulent izolat Ba - 6 virulent izolat K - 19' deki kanser gelişimini %42 oranında engellemiştir. *C. parasitica* izolatlarında hipovirüs varlığı ve bu hipovirüslerin biyolojik mücadelede kullanım olanakları üzerine yapılan bir çalışmada izolatlardan çoğunlukla CHV-1 alt tip I ve F2 hipovirüsleri izole edilmiştir. Elde edilen 23 hipovirulent izolat, 2-3 yaşındaki kütük sürgünlerine bulaştırılan bir virulent ırka karşı denenmiştir. Deneme sonuçlarına göre, 10 hipovirulent strainin kanser gelişimini %80 durdurduğu belirlenmiş ve virüs ile enfekteli bu hipovirulent strainin biyolojik mücadelede kullanılabileceği kanısına varılmıştır (Akıllı vd., 2012).

Yukarıda ifade edilen *C. parasitica* izolatları ile yapılan çalışmaların pek çoğunda (Gürer vd., 2001; Açıkgöz vd., 2009; Akıllı vd., 2012) kestane kanseri etmeninden dsRNA izolasyonu ve analizinde Morris ve Dodds (1979) 'un yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem virüs enfekteli fungal dokular ve bitkilerden dsRNA'nın izolasyonu ve görüntülenmesini sağlayan ilk kolay ve hızlı izolasyon yöntemidir. Bu yöntem bugüne kadar başarılı bir şekilde kullanılmış olmasına rağmen, zaman içerisinde araştırmacılar tarafından prosedürde çeşitli değişiklikler yapılması önerilmiştir (Allemann vd., 1999; Hillman vd., 1994; Peever vd., 1997; Rigling vd., 1989). 2008 yılında Balijja vd. (2008) fungal dokulardan dsRNA izolasyonunda kolaylık sağlayacak farklı bir yöntem geliştirmiştir. Morris ve Dodds (1979) ve diğer modifiye yöntemlerinde dsRNA izolasyonu için 10 g fungal miselyum kullanılırken, Balijja (2008) yönteminde kullanılan fungal miselyum miktarı 1/50 oranında azaltılabilmektedir. Fenol ve kloroform içermemesi, kullanılan kimyasal madde miktarının da önemli oranda azalması 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 Baliija vd. (2008)'nin *Aspergillus niger*, *Cryphonectria parasitica*, *Gremmeniella abietina*, *Sphaeropsis sapinea* fungus mikovirüsleri için geliştirdiği ekstraksiyon yöntemini uygulayan araştırmalara yapılan literatür taramalarında rastlanmamıştır. Ancak, diğer mikovirüsler ile ilgili yaptığımız labratuvar çalışmalarında Baliija vd. (2008)'nin yöntemi uygulanmıştır. Ayrıca, Morris ve Dodds (1979) yöntemine göre daha kısa sürede *C. parasitica* izolatlarından dsRNA analizine olanak sağlayan ancak fenol ve kloroform içeren modifiye diğer bir yöntem Libantova vd., (2007) tarafından uygulanmıştır. Bu çalışma Baliija vd., (2008) yönteminin fenol kloroform içermemesi, izolasyon süresini azaltması ve maliyeti düşürmesi gibi avantajları nedeniyle gelecekte mikovirüs alanında yapılacak olan çalışmalara kolaylık sağlayabilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada Fakültemiz Bitki Koruma Bölümü laboratuvarında kestane kanseri üzerine yapılan çalışmalar sırasında Karadeniz ve Marmara Bölgelerinin farklı yerlerinden, hipovirüent belirtileri taşıyan kestane ağaçlarının gövdelerinden alınan kabuk dokusu örnekleri ile çalışılmıştır. Buna ilave olarak, Ege Bölgesi'nden (Aydın yöresi) toplanan kabuk dokuları da bu çalışmada kullanılmıştır. Toplam 92 kabuk dokusu çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Toplanan kabuk dokularından 68 adet *C. parasitica* izolatu elde edilmiştir. Bu izolatlar *Cryphonectria parasitica*'nın kültürel özelliklerine göre gruplandırılmış ve beyaz-krem renkte gelişen, az sayıda piknit oluşturduğu gözlemlenen hipovirüent olma ihtimali olan 30 adet *C. parasitica* izolatu dsRNA analizi için kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

3.1.1. Örnek Toplama

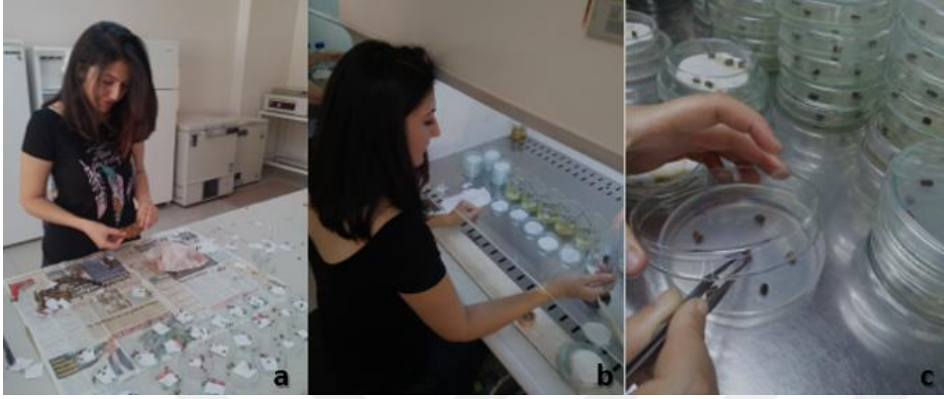
Örneklemeler kanserli bölgenin kenarı ile bir kısım sağlıklı dokunun da yer aldığı yaklaşık 3x4 cm boyutlarında bir kabuk parçasının kesici bir alet ile alınması ile yapılmıştır. Her bir örnek alma işleminden sonra kullanılan kesici alet sodium hipoklorit ile silinerek yüzeysel dezenfeksiyon sağlanmıştır. Alınan örnekler kese kağıtlarına yerleştirilip numaralandırıldıktan sonra gün içerisinde buz kutusunda saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan izolatların bölgelere ve illere göre dağılımı

Bölgeler	İller	Kabuk Örneği	İzolat Kodları	İzolat Sayısı
Karadeniz	Artvin	5	Arv-28-B,Arv-34	2
	Bartın	7	Br-646,Br-680,Br-691,Br-69	4
	Düzce	8	Dzc-580, Dzc-581, Dzc-587, Dzc-602, Dzc-631-B	5
	Giresun	8	Grs-257,Grs-298,Grs-308, Grs-328	4
	Kastamonu	3	Ksm-B-158	1
	Rize	8	Rz-83,Rz-90,Rz-116,Rz-123, Rz- 145,Rz-155	5
	Sinop	4	Sn-892, Sn-915	2
	Trabzon	6	Tbz-191,Tbz-209 Tbz-237,Tbz-245	4
	Zonguldak	11	Zgl-646,Zgl-655,Zgl-695, Zgl-705, Zgl-709,Zgl-724	6
Marmara	Bursa	5	Brs-786,Brs-789,Brs-792, Brs-859	4
	Kocaeli	8	Kcl-425,Kcl-431,Kcl-423, Kcl-444	4
Ege	Aydın	19	Ayd-378, Ayd-379, Ayd-381, Ayd- 384, Ayd-385, Ayd-386, Ayd-388, Ayd-390, Ayd-391, Ayd-393, Ayd- 394, Ayd-395, Ayd-398, Ayd-399, Ayd-403, Ayd-404	16
	İzmir	0	İzm-893,İzm-903,İzm-918, İzm-920, İzm-923,Tire-837, Tire-852, Tire- 855,Tire-874, Tire-8545	10
Toplam		92		68

3.1.1.1. Patojenin izolasyonu

Toplanan örnekler izolasyon işlemine kadar +4°C’ de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Kanserli kabuk dokularından 4 mm çapında mantar delici ile alınan diskler %2 lik sodium hipoklorit içinde 2 dakika bekletilerek yüzeysel dezenfeksiyon yapılmıştır. 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 gelişmesi beklenmiştir (Şekil 3.1) (Anagnostakis, 2001). Gelişen koloniler incelenerek ve *C. parasitica* olduğu düşünülen kolonilerden PDA ortamına aktarılarak izolatların saflaştırılma işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Toplanan kabuk doku örneklerinden *Cryphonectria parasitica* izolatlarının elde ediliş aşamaları a) kanserli kabuk dokularından mantar delici ile disklerin alınması b) %2 lik sodyum hipoklorit ile yüzeysel dezenfeksiyon c) steril filtre kağıtları arasında kurutulan örneklerin PDA besi ortamı üzerine yerleştirilmesi

3.1.1.2. İzolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesi

Elde edilen *C. parasitica* izolatları kültürel karakterlerini belirlemek için tüm izolatlar PDA ortamında incelenmiştir. PDA üzerinde aktif olarak gelişen her bir izolata ait kolonilerinin kenar kısımlarından alınan 4 mm çapındaki diskler içinde PDA bulunan 9 cm'lik petrilerin orta kısmına yerleştirilerek ve petriler inkübatörde 7 gün 25°C' de karanlıkta, daha sonra ışık altında 7 gün inkübe edilmiştir (Bisseger vd., 1997; Melzer vd., 1997). Milgroom ve Cortesi (2004)'nin belirttiği üzere kültürlerde krem-beyaz renkte gelişen izolatlar düşük virülensli (hipovirulent), kırmızı-turuncu renkte gelişen izolatlar ise virulent kabul edilmiştir (Şekil 3.2.). Hipovirulent izolatların kültürel özelliklerinin bu şekilde olduğu pekçok kaynakta belirtilmektedir (Anagnostakis ve Day, 1979; Bisseger, 1997; Milgroom ve Cortesi, 2004). İzolatların koloni renkleri beyaz, krem veya açık turuncu olarak 7. ve 14. günlerde gözlemlenmiştir.



Şekil 3.2. PDA üzerinde gelişen a) 3 günlük, b) 7 günlük ve c) 14 günlük *Cryphonectria parasitica* izolatu (E-246)

3.2. Yöntem

3.2.1. İzolatların dsRNA İçeriklerinin Belirlenmesi

İzolatlar PDA ortamı üzerine serilen selefondisklere yerleştirildikten sonra 6-10 gün boyunca 24°C’ de inkubator içerisinde karanlıkta geliştirilmiş, selefondisk üzerinde gelişen koloniden 200’er mg miselyum alüminyum folyo içerisinde dsRNA analizinde kullanılmak üzere -20 °C’de saklanmıştır.

dsRNA izolasyonu Balijja vd. (2008)’ nin yöntemine göre yapılmıştır. Bu yöntemde göre dsRNA içeren bazı izolatların dsRNA varlığı Morris ve Dodds (1979)’ un kullandığı yöntem ile doğrulanmıştır.

3.2.1.1. Balijja vd. (2008) yöntemi

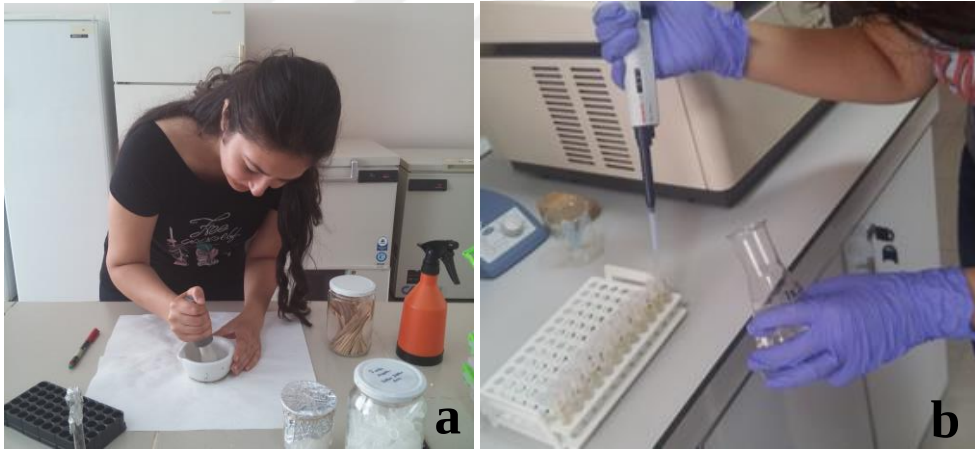
1. -80 °C de bir gece bekletilen fungal miselyum (100-200 mg) havan içerisinde havaneli ile ezilmiştir.
2. Ezilen miselyum total nükleik asidin izolasyonu ve fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması için içerisinde 600 µl EBA bulunan 2ml lik tüplere aktarılmıştır.
3. +4 °C, 15 dakika, 16110 g de santrifüj işleminden sonra oluşan süpernatant 1.5 ml lik tüplere aktarılıp, üzerine etanol eklenmiştir. Karışım daha sonra kolonlara (ultrafree-MC sterile 0.65µm, Millipore) aktararak ve 100 g de santrifüj edilmiştir.

4. 2 kez uygulanan 450 µl 1XSTE+EtOH (%20) ile yıkama işlemi sonucunda dsRNA dışındaki diğer nükleik asitler uzaklaştırılmıştır.

5. İki kez 400 µl 1XSTE tampon solüsyon ile dsRNA 2 ml lik toplama tüpleri içerisinde birikmesi sağlanmıştır. Toplama tüplerinde biriken sıvının üzerine eşit miktarda isopropanol eklenmiştir.

6.+4 °C, 30 dakika, 16110 g de santrifüj işleminden sonra tüp içerisindeki sıvı dökülerek ve pelet kurumaya bırakılmıştır.

7. Etil alkol presipitasyonundan sonra pelet 20 µl RNase free su ile çözündürülerek %0.8 agaroz jelde 80 V da 50 dakika 1X TBE buffer ile elektroforez yapılmıştır (Şekil 3.3). dsRNAlar jelde göç etme pozisyonlarına göre değerlendirilmiştir (Shapira vd., 1991). Moleküler ağırlık standardı olarak Hind III ile kesilmiş λ DNA ve pozitif kontrol olarak USA-2 CHV-1 kullanılmıştır.

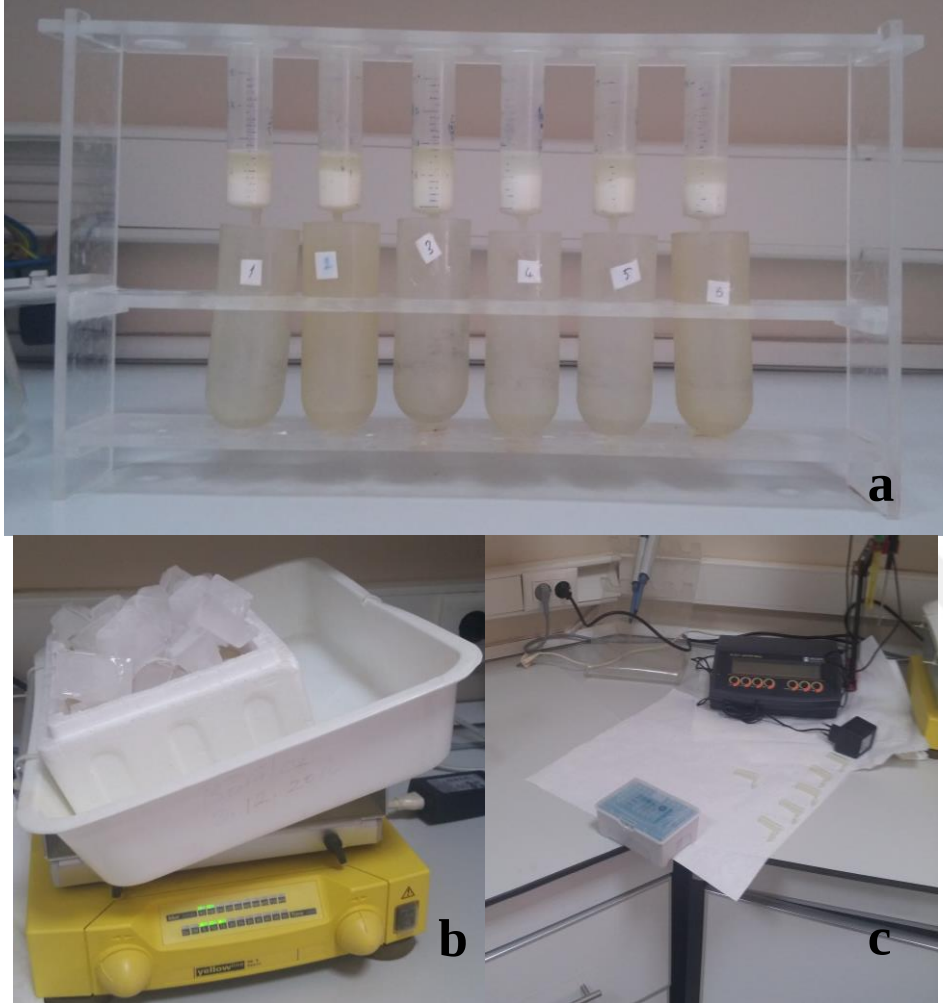


Şekil. 3.3. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının Balijja vd. (2008) yöntemine göre dsRNA izolasyonu aşamaları a) fungal miselyumların ezilmesi işlemi b) 450 µl 1XSTE+EtOH (%20) ile yıkama işlemi

3.2.1.2. Morris ve Dodds (1979) yöntemi

Bir gece -80 °C de bekletilen 10 g fungal miselyum porselen havan içerisinde toz haline gelene kadar ezilmiştir. Toz halindeki örnek içerisinde 10 ml 2 x STE (200 mMNaCl, 100 mMTris, 1 mM EDTA) + 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 8000 g de 30 dakika +4 °C de santrifüjde tutulduktan sonra ve üst faz yeni steril tüplere aktarılmıştır. Daha sonra bu örnekler 20 ml olacak şekilde 1x STE ile tamamlanarak ve 4 ml etanol ilave edilerek bir gece +4 °C de bekletilmiştir. dsRNA nın total DNA dan ayrılacağı CF-11 selüloz kolon kromatografisi yöntemine göre örnekler 1 gr CF II 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. 2. yıkamada ise 6 ml 1XSTE ilave edilerek altta biriken süspansiyon tüplere toplanmış ve tüpler içerisine 18 ml etanol ilave edilerek -37 °C de bir gece bekletilmiştir. Bir sonraki gün örnekler -37 °C den çıkarılarak +4 °C de 8000 g devirde 30 dk santrifüjde tutulmuştur. 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 spin yaptırılmıştır. Tüpteki sıvı mikropipet yardımıyla alınarak steril ependorf tüplere aktarılmış ve ependorflara 900 µl % 95 lik etanol ve 30 µl sodyum asit eklenerek, - 20 °C’ de en az iki saat bekletilmiştir. Ertesi gün dondurucudan çıkarılan örnekler -4 °C de 5000 g de 20 dk santrifüjde tutulmuştur. Santrifüj işleminin ardından tüpteki sıvı boşaltılarak pelet kurutulmuştur. Tüpler kuruduktan sonra 20 µl steril su ile resüspanse edilmiştir. Saflaştırılan dsRNAlar %0.8 lik agarozda 80V da 1 saat 1X TBE tampon solüsyonda elektroforezde analiz edilmiştir. HindIII ile kesilmiş λ DNA marker olarak USA-2 CHV1 pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.4. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının Morris ve Dodds (1979) yöntemine göre dsRNA izolasyonu aşamaları a) %16 etanol içeren 60 ml 1X STE tampon solüsyon ile yıkama işlemi b) çalkalayıcıda 160 devirde 30 dakika buz içerisinde bekletilen tüpler c) santrifüj sonrası boşaltılarak kurutulan tüpler

3.2.2. dsRNA Mikovirüsünün Tanılanması

dsRNA pozitif izolatların CHV-1 tanısı RT-PCR ile yapılmıştır. RT-PCR analizi, Thermo Scientific Verso 1 tek basamaklı RT-PCR Hot-Start Kit ile gerçekleştirilmiştir. RT-PCR sonrasında % 1 agaroz jelinde 1XTBE tamponu ile elektroforez yapılmıştır. CHV-1 enfekteli izolatların belirlenmesinde kullanılan

güncel primerler ORF A gen bölgesi için hvep1 ve EP-721-4 primerleri RT-PCR da kullanılmıştır (Çizelge 3.2) (Gobbin vd., 2003, Bryner vd., 2012).

RT-PCR işlemi için 1 µl verso enzim mix, 25µl 2X 1-Step PCR Hot-Start Master Mix, 2,5 µl RT Enchanter, 1µl Forward primer (10 pmol/µl), 1µl Reverse primer (10 pmol/µl) ile master mix hazırlanmıştır. Daha sonra 16,5µl 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. Hazırlanan reaksiyonlar litaratürde belirtilen primerlere ait koşullar doğrultusunda RT-PCR yapılmıştır (Bryner vd., 2012). RT-PCR sonrası elde edilen ürünler %1' lik agoroz jelde 1X TBE buffer ile elektroforez sonrası UV ışık altında görüntülenmiştir. Elde edilmesi beklenen band büyüklüğü 693 bp'dir.

Çizelge 3.2. CHV-1 enfekteli izolatların belirlenmesinde ORF A gen bölgesi çoğaltımı için kullanılan primerler

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

Çizelge 3.3. RT-PCR yapılan *Cryphonectria parasitica* izolatlarının alındıkları iller, izolat adı ve sayısı

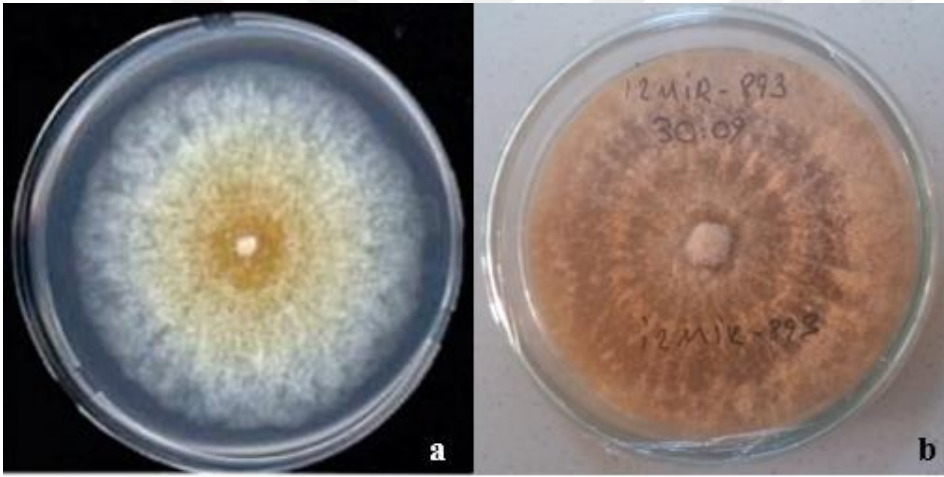
Bölgeler	İller	İzolat Kodları	RT-PCR Yapılan*	CHV-1 Bulunan**
Karadeniz	Artvin	Arv-28-B, Arv-34	2	1
	Düzce	Dzc-580, Dzc-581, Dzc-602, Dzc-631-B	4	2
	Giresun	Grs-257, Grs-308	2	1
	Kastamonu	Ksm-B-158	1	1
	Rize	Rz-116, Rz-123	2	1
	Sinop	Snv-892, Snp-915	2	1
	Trabzon	Tbz-209	1	0
	Zonguldak	Zgl-695, Zgl-705, Zgl-709, Zgl-724	4	3
Marmara	Bursa	Brs-786, Brs-789, Brs-792, Brs-859	4	3
	Kocaeli	Kcl-425, Kcl-431, Kcl-423	3	2
Toplam			25	15

*RT-PCR yapılan izolat sayısı **CHV-1 bulunan izolat sayısı

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. İzolatların Kültürel Özelliklerinin Belirlenmesi

Kültürel özelliklerinin belirlenmesi için 7 gün 25°C’ de karanlıkta, daha sonra ışık altında 7 gün inkübe edilen (Bissegger vd., 1997; Melzer vd., 1997) 68 izolattan koloni rengi beyaz veya krem olarak kaydedilen izolatların, hipovirü lent olduğu düşünülerek dsRNA içerip içermedikleri yönünden incelemek amacıyla 30 izolat seçilmiştir.



Şekil 4.1. a) Beyaz misel kolonisi oluşturan *Cryphonectria parasitica* (Ksm-B-158) izolatu, b) turuncu misel gelişimi gösteren *Cryphonectria parasitica* (İzmir-893) izolatu

4.2. İzolatların dsRNA İçeriklerinin Belirlenmesi

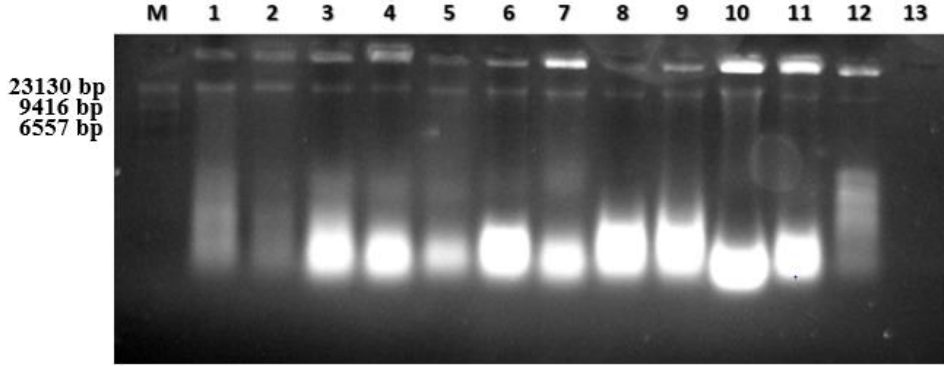
Kültürel özelliklerine göre (beyaz-krem renkte gelişen, düşük sporulasyon gösteren vb.) belirlenen hipovirü lent olma ihtimali olan izolatlardan 30 tanesinin dsRNA analizi Balijja vd., (2008) yöntemine göre yapılmış ve 25 izolatta dsRNA profili belirlenmiştir. dsRNA pozitif olan izolatlar Marmara ve Karadeniz Bölgelerinden elde edilmiştir (Şekil.4.1.).

Çizelge 4.1. dsRNA varlığı yönünden pozitif *Cryphonectria parasitica* izolatlarının alındıkları iller ve sayıları

Bölgeler	İller	İzolat Kodları	dsRNA Yapılan*	dsRNA Pozitif**
Karadeniz	Artvin	Arv-28-B, Arv-34	2	2
	Düzce	Dzc-580, Dzc-581, Dzc-602, Dzc-631-B	4	4
	Giresun	Grs-257, Grs-308	2	2
	Kastamonu	Ksm-B-158	1	1
	Rize	Rz-116, Rz-123, Rz-145, Rz-155	4	2
	Sinop	Snp-892, Snp-915, Snp-928	3	2
	Trabzon	Tbz-209	1	1
	Zonguldak	Zgl-646, Zgl-695, Zgl-705, Zgl-709, Zgl-724	5	4
Marmara	Bursa	Brs-786, Brs-789, Brs-792, Brs-859	4	4
	Kocaeli	Kcl-425, Kcl-431, Kcl-423, Kcl-444	4	3
Toplam			30	25

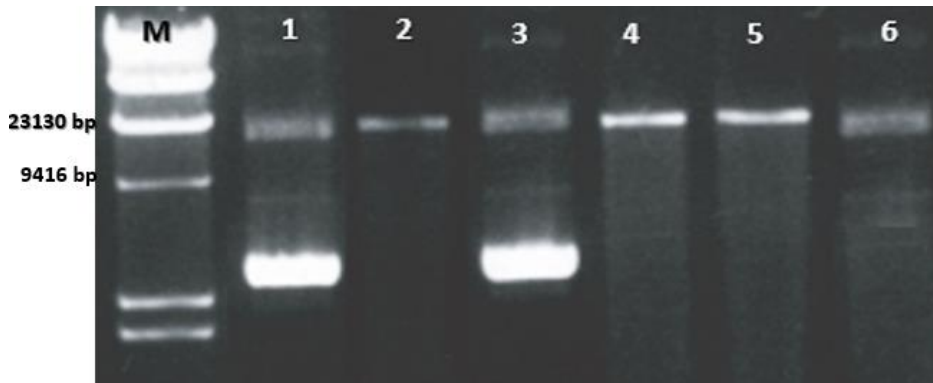
* dsRNA yapılan izolat sayısı **dsRNA pozitif izolat sayısı

Pozitif kontrol olan USA-2 (CHV1, 12.700 bp) izolatının moleküler ağırlığı ile Balijja vd. (2008) yöntemine göre dsRNA profili belirlenen 25 izolatın moleküler ağırlığının birbirine yakın olduğu gözlemlenmiştir. Çizelge 4.1.' de görüldüğü gibi dsRNA profili belirlenen 25 *C. parasitica* izolatlarının Artvin (Arv-28-B, Arv-34), Düzce (Dzc-580, Dzc-581, Dzc-602, Dzc-631-B), Giresun (Grs-257, Grs-308), Kastamonu (Ksm-B-158), Rize (Rz-116, Rz-123, Rz-145, Rz-155), Sinop (Snp-892, Snp-915, Snp-928), Trabzon (Tbz-209), Zonguldak (Zgl-646, Zgl-705, Zgl-709, Zgl-724), Bursa (Brs-786, Brs-789, Brs-792, Brs-859) ve Kocaeli (Kcl-423, Kcl-425, Kcl-431) illerinden elde edilen izolatlar olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Balijja vd., (2008) yöntemi ile *Cryphonectria parasitica* izolatlarından elde edilen dsRNA' ların agar jel elektroforez görüntüsü; Marker (M), 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)

dsRNA profilleri Balijja vd., (2008) yöntemine göre belirlenen bu izolatlardan 6 adetinin dsRNA varlığı Morris ve Dodds (1979) yöntemi kullanılarak yapılan analiz sonucunda aynı profiller elde edilmiştir (Şekil 4.3.). Böylece Balijja vd., (2008)' nin yöntemi ile elde edilen sonuçlar da doğrulanmıştır.



Şekil 4.3. 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)

Cryphonectria parasitica'nın tanımlanan en eski izolatu olan EP713'ün en büyük dsRNA bileşeninin uzunluğu 12.700 bp'dir (Shapira vd., 1991). Hillman vd. (1994) tarafından Amerika Birleşik Devletleri kökenli NB58 izolatının dsRNA'sı ise 12.500 bp molekül ağırlığında olduğu tespit edilmiştir. Peever vd. (1997)'nin bildirdiğine göre Kuzey Amerika'dan elde edilen 595 *C. parasitica* izolatından 166 tanesinde dsRNA profili belirlenmiş ve bunların molekül ağırlıkları 9.0- 13.0 bp arasında olduğu tespit edilmiştir. Akıllı vd., (2012) tarafından 55 adet *C. parasitica* izolatında dsRNA tespit edilmiş ve dsRNA'ların boyutu yaklaşık 13.000 bp olarak belirlenmiştir. Radocz (2001)'in bildirdiğine göre Macaristan'dan elde edilen 600 izolattan 36 tanesinde L-dsRNA tespit edilmiş ve bunların boyutunun yaklaşık 12.700 bp olduğu belirlenmiştir. Aydın yöresindeki hipovirülent *C. parasitica* izolatlarını dsRNA analizi ile belirlemek amacıyla yapılan çalışmada Morris ve Dodds (1979) yöntemi kullanılarak tek bir izolatta dsRNA profilinin moleküler ağırlığı 12.000-13.000 bp arasında olduğu belirlenmiş ancak bu izolatın tek spor izolatlarından yapılan izolasyonlarda dsRNA profili elde edilememiştir (Açıkgöz vd., 2009). Hogan (2006) 35 izolatın dsRNA molekül ağırlığını EP713 (12.700 bp) izolatu ile karşılaştırmış ve bu izolatların molekül ağırlıklarının yaklaşık olarak aynı olduğunu tespit etmiştir. Slovenya'da Krstin vd., (2011) tarafından yapılan çalışmada 49 *C. parasitica* izolatında (41 beyaz, 8 krem miselyal gelişim) dsRNA tespit edilmiş ve moleküler ağırlıklarının 12.000-13.000 bp arasında olduğu bildirilmiştir.

Çalışma kapsamında Karadeniz, Marmara ve Ege Bölgelerinden elde edilen 92 adet *Cryphonectria parasitica* ile bulaşık olduğu düşünülen kabuk örneği kullanılmış ve koloni özellikleri incelenen izolatlardan 30 tanesinin açık renkli miselyal gelişim göstermesi nedeniyle hipovirülent olabileceği düşünülmüştür. Açık renkli gelişim gösteren 30 izolattan 25 tanesinin Balijja vd., (2008) yöntemi kullanılarak dsRNA içerdiği tespit edilmiştir.

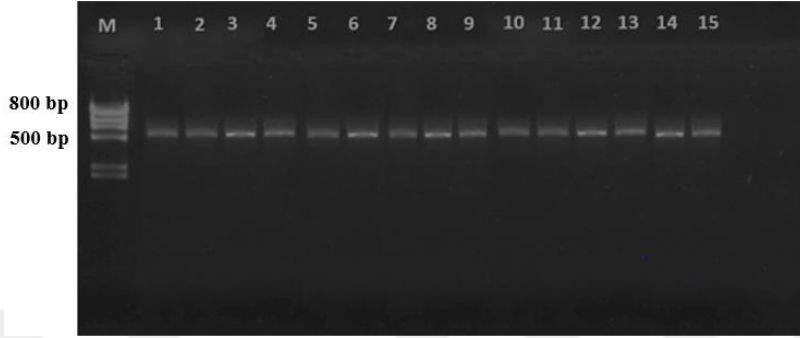
Balijja vd., (2008) dsRNA izolasyonu yönteminin, Morris ve Dodds (1979) yöntemine kıyasla ihtiyaç duyulan fungal miselyum miktarını 10 g' dan 200 mg' a kadar düşürdüğü, kullanılan kimyasal madde oranını büyük oranda azalttığı, fenol-kloroform içermediği ve 5-6 gün süren analiz sürecini tek bir güne düşürdüğü bu çalışma ile kendi laboratuvar 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 içersinde gözlemlenmesine olanak sağlamaktadır. Morris ve Dodds (1979) yöntemi ile 5-6 günde elde edileceğimiz sonuçları bu analiz yöntemi ile bir günde elde etmemiz aynı süre zarfında daha fazla izolatin dsRNA içerip içermediğinin araştırmamıza imkan sağlamıştır. Bu da yapılan çalışmalarda araştırmacılara zamandan tasarruf ettirmektedir. Bu nedenle gelecekte ülkemiz ve bölgemizde yürütülecek olan mikovirüs çalışmalarında araştırmalara yöntemin kolaylık sağlayacağı düşünülmektedir.

4.3. dsRNA Mikovirüsünün Tanılanması

Çalışma kapsamındaki dsRNA profili içeren 25 izolatta CHV-1 enfekteli izolatların belirlenmesinde güncel primerler ORF A gen bölgesi için hvep1 ve EP-721-4 primerleri RT-PCR da kullanılmıştır (Gobbin vd., 2003, Bryner vd., 2012). RT-PCR sonrası elde edilen ürünler %1' lik agoroz jelde 1X TBE buffer ile elektroforez sonrası UV ışık altında görüntülenmiştir. UV ışık altında görüntülenen bandların büyüklüğü 693 bp'dir. Bu sonuçlar doğrultusunda bu 15 izolatın CHV-1 hipovürüsüne ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4.).

Şekil 4.4 de görüldüğü gibi Karadeniz Bölgesinde 8 farklı ilden elde edilen izolatlardan 10 tanesinde dsRNA tespit edilmiş ve bunlar yapılan RT-PCR sonucunda CHV-1 olarak belirlenmiştir. Bu 10 *Cryphonectria parasitica* izolatları Artvin (Art-28-B), Düzce (Dzc-580, Dzc-602), Giresun (Grs-257), Kastamonu (Ksm-B-158), Rize (Rz-123), Sinop (Snp-915), Zonguldak (Zgl-705, Zgl-709, Zgl-724) illerinden elde edilen izolatlar olduğu belirlenmiştir. Marmara Bölgesi Bursa ve Kocaeli illerinden elde edilen izolatlardan 5 tanesinde dsRNA varlığı belirlenmiş ve bunların *Cryphonectria hypovirus* 1 grubuna ait olduğu belirlenmiştir. Bu izolatlar Bursa (Brs-786, Brs-789, Brs-792) ve Kocaeli (Kcl-423, Kcl-425) illerinden elde edilmiştir.



Şekil 4.4. dsRNA *Cryphonectria parasitica* izolatlarının CHV-1' e özel ORF A gen bölgesi için hvep1 ve EP-721-4 primerleri kullanılarak RT-PCR testlerinin sonuçları: M DNA ladder mix (MBI Fermentas), 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-602 815) K su kontrol

Çizelge 4.2. Bölge ve illere göre dsRNA analizi yapılan, dsRNA bulunan ve CHV-1 olduğu tespit edilen izolatlar

Bölgeler	İller	Kabuk Örneği	İzolat Sayısı	İzolat Kodları	dsRNA Analizi	dsRNA Pozitif	CHV-1 Pozitif
Karadeniz	Artvin	5	2	Arv-28-B, Arv-34	2	1	1
	Bartın	7	4	Br-646, Br-680, Br-691, Br-69	2	1	1
	Düzce	8	5	Dzc-580, Dzc-581, Dzc-587, Dzc-602, Dzc-631-B	2	1	1
	Giresun	8	4	Grs-257, Grs-298, Grs-308, Grs-328	1	1	1
	Kastamonu	3	1	Ksm-B-158	1	1	1
	Rize	8	5	Rz-83,Rz-90, Rz-116,Rz-123, Rz-145, Rz-155	3	2	2
	Sinop	4	2	Sn-892, Sn-915	1	1	1

Çizelge 4.2. Bölge ve illere göre dsRNA analizi yapılan, dsRNA bulunan ve CHV-1 olduğu tespit edilen izolatlar (devamı)

Bölgeler	İller	Kabuk Örneği	İzolat Sayısı	İzolat Kodları	dsRNA Analizi	dsRNA Pozitif	CHV-1 Pozitif
Karadeniz	Trabzon	6	4	Tbz-191, Tbz-209 Tbz-237, Tbz-245	1	1	0
	Zonguldak	11	6	Zgl-646, Zgl-655, Zgl-695, Zgl-705, Zgl-709, Zgl-724	2	2	2
Marmara	Bursa	5	4	Brs-786, Brs-789, Brs-792, Brs-859	6	4	4
	Kocaeli	8	4	Kcl-425, Kcl-431, Kcl-423, Kcl-444	4	1	1
Ege	Aydın	19	16	Ayd-378, Ayd-379, Ayd-381, Ayd-384, Ayd-385, Ayd-386, Ayd-388, Ayd-390, Ayd-391, Ayd-393, Ayd-394, Ayd-395, Ayd-398, Ayd-399, Ayd-403, Ayd-404	0	0	0
	İzmir	0	10	İzm-893, İzm-903, İzm-918, İzm-920, İzm-923, Tire-837, Tire-852, Tire-855, Tire-874, Tire-8545	0	0	0
Toplam		92	68		30	25	15

CHV-1 Avrupa’ da (Almanya, Fransa ve İspanya) yaygın olarak görülmekte (Hillman vd., 1994; Allemann vd.,1999; Gobbin vd. ,2003; Milgroom vd., 2004; Montenegro vd., 2008). Krstin vd., (2008)’ in bildirdiğine göre, Hırvatistan’ ın kestane yetiştiriciliği yapılan 10 bölgesinden elde edilen 338 *C. parasitica* izolatından 36 tanesinde dsRNA belirlenmiş ve bu izolatların yapılan RT-PCR sonucunda *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1)’ e ait olduğu belirlenmiştir. İspanya’ nın Katalonya bölgesinden elde edilen 312 izolattan 35 tanesinin CHV-1 hipovirüsü ile enfekte olduğu tespit edilmiştir (Castano vd., 2014). Krstin vd., (2011) tarafından Slovenya’ da yürütülen çalışmada, hipovirüs olduğu tespit edilen 21 izolatın yapılan RT-PCR sonrasında *Cryphonectria hypovirus 1*’ e ait olduğu bildirilmiştir. Batı İspanya’daki *Cryphonectria parasitica* çeşitliliğinin ve hipovirüs enfekteli izolatların belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada 14 izolatın dsRNA içerdiği saptanmış ve bu izolatların CHV-1 hipovirüsü ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir (Zamora vd., 2012).

Ülkemizde ise Gürer vd., (2001) ve Akıllı (2008)’in bildirdiğine göre, Karadeniz Bölgesi’nde *Cryphonectria hypovirus 1*’e rastlanılmaktadır. Ancak, yapılan bu çalışmalarda izolatların dsRNA içeriğinin hangi hipovirüs grubuna ait olduğunun tanısı yapılmamıştır. Marmara ve Karadeniz Bölgelerinden elde edilen 72 adet *C. parasitica* izolatından 55 tanesinin yapılan RT-PCR sonucunda CHV-1 hipovirüsü ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir (Akıllı vd., 2012). Yaptığımız çalışma ile elde ettiğimiz bulgular sonucunda da dsRNA varlığı gözlemlenen ve *Cryphonectria hypovirus 1*’ a ait olan izolatların Karadeniz ve Marmara Bölgelerinden elde edilen izolatlar olduğu saptanmıştır. *Cryphonectria hypovirus 1*’ a ait olan izolatların daha çok Karadeniz bölgesinden elde edildiği belirlenmiştir. Açıkgöz vd., (2009)’ nin bildirdiğine göre Ege Bölgesi izolatlarından bir tanesinde dsRNA profili belirlenmiş ancak fungusun tek spor izolatından yapılan izolasyonda dsRNA profili elde edilememiştir. DsRNA içeren ve CHV-1 olduğu tespit edilen izolatların vejetatif uyum grupları ve mating tipleri Aydın izolatları ile uyumlu olanlar kestane kanseri ile biyolojik mücadelede kullanılabilir. Ancak, biyolojik mücadelede çevre şartlarının da önemli bir faktör olduğu unutulmamalıdır. Bu çalışma ile özellikle çok sayıda örnek ile çalışılıyorsa zaman, emek, maliyetten tasarruf etmek ve insan sağlığının önemi nedeniyle Balijja vd., (2008) yönteminin önerilebileceği belirlenmiştir.

5. SONUÇ

Türkiye'nin Karadeniz, Marmara ve Ege Bölgesi (Aydın yöresi) kestane alanlarından, kestane kanseri hastalığı nedeniyle ağaçlarda oluşan kanserli kabuk dokularından elde edilen izolatlar ile çalışılmıştır.

Bu izolatlar arasından fungusun kültürel özelliklerine göre (beyaz-krem renkte gelişen, düşük sporulasyon gösteren vb.) hipovirü lent olma ihtimali olan izolatlardan 30 tanesi seçilmiş ve izolatların yapısında dsRNA içerip içermediği Baliija vd. (2008) yöntemi ile belirlenmiştir. Bu izolatlardan sadece 25 tanesinde dsRNA profili tespit edilmiştir. Daha sonra, bu 25 izolat arasından rastgele seçilen ve dsRNA içerdiği bilinen 6 izolat Morris ve Dodds (1979) yöntemi kullanılarak yöntem doğrulanmıştır. Yapılan RT-PCR ile de dsRNA profili içeren 25 izolattan 15 tanesinin CHV-1 hipovürüsüne ait oldukları belirlenmiştir. Baliija vd. (2008) yönteminin uygulanan diğer yöntemle göre kullanılan fungal miselyum ve kimyasal madde miktarının az olması, fenol- kloroform içermemesi ve dsRNA izolasyon süresinin bir gün gibi kısa bir sürede gerçekleştirilebiliyor olması gibi avantajları olduğu kendi laboratuvarımızda yapılan çalışma sonucunda tespit edilmiştir. Gelecekte ülkemiz ve bölgemizde mikovirüs çalışmalarında yapılacak olan araştırmalara yöntemin kolaylık sağlaması beklenmektedir.

Baliija vd. (2008) geliştirdikleri bu izolasyon yöntemini *Aspergillus niger*, *Cryphonectria parasitica*, *Gremmeniella abietina*, *Sphaeropsis sapinea* gibi 4 farklı fungus için denemişler ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Ülkemizde gelecekte mikovirüs alanında yapılacak olan çalışmalarda bu yöntem sadece *Cryphonectria parasitica*'nın hipovirü lent izolatlarının belirlenmesinde değil farklı funguslarda mikovirüslerin varlığının saptanmasında da kullanılması önerilmektedir.

Mikovirüsler ile ilgili yapılan çalışmalar üniversitelerde sınırlı kalmamakta ve Araştırma Enstitülerinde de biyolojik mücadele amacıyla yürütölmektedir. Bu araştırma merkezlerinde yapılacak olan çalışmalarda çok sayıda fungal izolatin dsRNA varlığının belirlenmesinde kullanılacak olan kimyasal madde miktarının azalması ve sonuçların eldesi için harcanan sürenin kısılması ile maliyetin azalacağı ve zamandan tasarruf edileceği öngörülmektedir. Hipovirü lent izolatlar ile biyolojik mücadele olanaklarının farklı fungal etmenlerde araştırılması için

yapılacak olan çalışmalarda bu yöntemin daha önce kullanılan yöntemlere göre, dsRNA varlığının belirlenmesi için harcanan süreyi azaltarak çalışmalara hız kazandıracağı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra insan sağlığına zararlı olan fenol ve kloroform gibi kimyasal maddeleri içermemesi büyük önem taşımakta olup, çok sayıda izolat ile yapılan çalışmalarda tekrar tekrar insan sağlığını tehlikeye atan kimyasal maddelere maruz kalmanın önüne geçilmektedir.

Fungal etmenler ile mücadelede hipovirulent izolatların kullanımında bölge ile uyumlu olan izolatların tercih edilmesi gerektiği ve fungal etmenin biyolojik kontrolünde çevre şartlarının önemli bir faktör olduğu unutulmamalıdır.

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. 2008. Karadeniz Bölgesinde Kestane Kanseri (*C. parasitica*)' nin Biyolojik Mücadelesi Üzerine Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmamış), Ankara.
- Akıllı, S. 2012. Feasibility of biological control of chestnut blight caused by *Cryphonectria parasitica*, in Marmara region of Turkey. **African Journal of Agricultural Research**, 7(45): 6068-6072
- Akıllı, S., Katircioğlu, Y.K., Maden, S. 2011. Biological control of chestnut canker, caused by *Cryphonectria parasitica*, by antagonistic organisms and hypovirulent isolates. **Turk J Agric For**, 35: 515-523
- 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.
- Akıllı, S., Katircioğlu, Y.Z. and Maden, S. 2009. Chestnut Cankers in Black Sea Region of Turkey. Proceedings of International Workshop on Chestnut Management in Mediterranean Countries, **Acta Hort**, 815: 247-252.
- Allemann, C., Hoegger, P., Heiniger, U., Rigling, D. 1999. Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV1) in Europe, assessed using RFLP markers. **Mol. Ecol.**, 8: 843-854.
- Anagnostakis, S. L. 1987. Chestnut Blight: The Classical problem of an Introduced Pathogen. **Mycologia**, 79:23-37.

- 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.
- Anagnostakis, S. L., Day, P.R. 1979. Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, 69: 1226-1229.
- Anagnostakis, S. L., Jaynes, R. A. 1973. Chestnut blight control: use of hypovirulent cultures. **Plant Dis. Rep.** 57:225-226.
- Anonim, 2016c. Türkiye İstatistik Kurumu Konularına göre İstatistikler veri tabanı <http://www.tuik.gov.tr>. Erişim Tarihi: 22.10.2016
- Anonim, 2016d. Türkiye İstatistik Kurumu Konularına göre İstatistikler veri tabanı <http://www.tuik.gov.tr>. Erişim Tarihi: 22.10.2016
- Anonim, 2016e. Türkiye İstatistik Kurumu Konularına göre İstatistikler veri tabanı <http://www.tuik.gov.tr>. Erişim Tarihi: 22.10.2017
- Anonim, 2016a. www.kestane.gen.tr. Erişim Tarihi: 13.10.2016
- Anonim, 2016b. www.fao.org. Erişim Tarihi: 13.10.2016
- Balijja, A., Kvarnheden, A., Turchetti, T. 2008. A non-phenol-choloroform 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., D. Rigling, and P. C. Brunner 2012. Invasion history and demographic pattern of *Cryphonectria hypovirus 1* across European populations of the chestnut blight fungus. **Ecology and Evolution**, 2:3227–3241.

- Burnham, C.R., Rutter, P.A., French, D.W. 1986. Breeding blight-resistant chestnuts. **Plant Breeding Reviews**, 4: 347-397.
- 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.
- Chen B., Gao S., Choi G.H., Nuss D.L. 1996. Extensive alteration of fungal gene transcript accumulation and elevation of G-protein-regulated cAMP levels by a virulence-attenuating hypovirus. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 93: 7996–8000
- Choi, G.H., Nuss, D.L. 1992. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. **Science**, 257:800-803.
- Coşkun, H., Kural, I. 1994. Kestane kanseri *Cryphonectria parasitica* (murr.) barr. Hastalığının mücadelesi üzerinde araştırmalar. Tarım ve Köyisleri 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.
- Curkovic-Perica, M., Novak-Agbaba, S., Rigling, D., Krstin, L. 2011. Chestnut blight in Croatia and Slovenia. 4TH Congress of European Microbiologists.
- Çeliker, N. M., Onoğur, E. 2001. Evaluation of hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* for the biological control of chestnut blight in Turkey. **For. Snow Landsc. Res.**, 76: 378–382.
- Çeliker, N. M., Onoğur, E., Uygun, H. 2006. Ege Bölgesinde Kestane Kanseri (*Cryphonectria parasitica*) Hastalığının Hipovirulent Irklarla Doğal Koşullarda Biyolojik Kontrolü. T.C. Tarım Ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü BS-03/05-04-115 nolu proje (Sonuç raporu).

- Çeliker, N.M. 2000. Kestane kanseri (*Cryphonectria parasitica* (murr.) barr.)'nın hipovirulent ırklarla savaşımı üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova-İzmir, 116s.
- Delen, N. 1979. Studies on the control possibilities of Chesnut Blight (*Endothia parasitica* (Murr.) A. And A.) in Turkey. **J. Turkish Phytopath**, 8 (2-3): 51-76.
- Demir, S.T., Çeliker, N.M. 1996. Ege Bölgesinde Meyve Fidanlarında Fungal Hastalıkların ve Çözüm Yollarının Belirlenmesi Üzerinde Araştırmalar Zirai Mücadele Araştırma Yıllığı No:28-28.
- Erincik, Ö., Döken, T.M., Açıkgöz, S., Ertan, E. 2003. First report for Aydın, Turkey : *Cryphonectria parasitica* (Murrill.) Barr. Threatens the chestnut orchards. **J. Turk. Phytopath.**, 32: 41-44.
- Ghabrial S. A., Suzuki N. (2009). Viruses of plant pathogenic fungi. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 47:353–384
- 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.
- Guerin, L., Froidefond, G., Xu, M. 2001. Seasonal patterns of dispersal of ascospores of *Cryphonectria parasitica* (Chestnut blight). **Plant Pathology**, 50: 717-724.
- Gürer, M., Ottaviani, M.P., Cortesi, P. 2001. Genetic diversity of subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in two chestnut-growing regions in Turkey. **For. Snow Landsc. Res**, 76: 383–386.
- Heiniger, U., Rigling, D. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. **Annu. Rev. Phytopathol**, 32:581-99.
- Hillman, B., Tian, Y., Bedker P.J. and Brown M.P. 1992. A North American hypovirulent isolate of the chestnut blight fungus with European isolate-related dsRNA. **Journal of General Virology**, 73:681-68.

- Hillman, B.I., Halpern, B.T., Brown, M.P. 1994. A Viral dsRNA element of the chestnut blight fungus with a distinct genetic organization. **Virology**, 201:241-250.
- Hillman, B.I., Suzuki, N. 2004. Viruses of chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Advances of Virus Research**, 63: 423-472.
- 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.
- Ihrmark, K. 2001. Double-stranded RNA Elements in the Root Rot Fungus *Heterobasidion annosum*. Swedish University of Agricultural Sciences, Doctoral Thesis, Uppsala.
- King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E. B., Lefkowitz E. J. 2012. Virus Taxonomy Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, CA: Elsevier Academic Press. pp.193-210, USA.
- 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.
- 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.
- Li, D., Ashby, A. M., Johnstone, K. 2003. Molecular evidence that the extracellular cutinase Pbcl is required for pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on oilseed rape. **Mol. Plant Microbe Interact**, 16: 545-52
- Libantova, J., Moravcikova, J., Adamcikova, J., Marek, K., Juhasova, G. 2007. Modified small-scale batch for isolation of dsRNA *Cryphonectria parasitica*, **Phytoprotection**, 88:27-29

- Macdonald, W.L., Fulbright, D.W. 1991. The biological control of chestnut blight: use and limitations of transmissible hypovirulence. **Plant Dis.**, 75: 656-661.
- Melzer, M. S., Dunn, M., Zhou, T., and Boland, G. J. 1997. Assessment of hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* for potential in biological control of chestnut blight. *Can. J. Plant Pathol.* 19:69-77.
- 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.
- Nuss, D. L. 1992. Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. **Microbiol Rev**, 56: 561–576.
- Nuss, D. L. 1996. Using hypoviruses to probe and perturb signal transduction processes underlying fungal pathogenesis. **Plant Cell**, 8: 1845-1853.
- Peever, T.L., Liu, Y-C., Milgroom, M.G. 1997. Diversity of hypoviruses and other double-stranded RNAs in *Cryphonectria parasitica* in North America. **Phytopathology**, 87:1026-1033.
- Powell, W.A., Van Alfen, N.K. 1987. Differential accumulation of poly (A) ⁺ RNA between virulent and double-stranded RNA induced hypovirulent strains of *Cryphonectria* (*Endothia*) *parasitica*. **Molecular and Cellular Biology**, 7:3688–93.

- Radocz, L. 2001. Study of subpopulations of the chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*) fungus in the Carpathian basin. **Snow Landsc. Res.** 76, 3: 368-372.
- Rigling, D., Heiniger, U. and Hohl, H.R. 1989. Reduction of laccase activity in ds-RNA containing hypovirulent strains of *Cryphonectria* (*Endothia*) *parasitica*. **Phytopathology**, 79: 219–223.
- Robin, C., Lanz, S., Soutrenon, A., & Rigling, D. (2010). Dominance of natural over released biological control agents of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in southeastern France is associated with fitness-related traits. **Biological Control**, 53, 55-61.
- Robin, C. Heiniger, U., 2001. Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. **Forest Snow and Landscape Research**, 76: 361–367.
- Rogers, H.J., Buck, K.W., Brasier, C.M . 1994. Transmission of double-stranded RNA and a disease factor in *Ophiostoma ulmi*. **Plant Pathology**, 135.
- Schafer, W. 1993. The role of cutinase in fungal pathogenicity. **Trends Microbiol**, 1 :69-71.
- Shapira, R. G.H. Choi and D.L. Nuss, 1991. Virus-like genetic organization expression strategy for a double stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight. **EMBO Journal**, 10: 731-739.
- Smith, 2013. Biological control of *Cryphonectria parasitica* with *Streptomyces* and an analysis of vegetative compatibility diversity of *Cryphonectria parasitica* in Wisconsin, USA. MS thesis in Biology, 52 pp.
- Sotirovski, K. 2000. Hypovirulence, Vegetative-Compatibility Groups and Mating Types of *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. in the Republic of Macedonia. PhD thesis. Skopje: University Ss. Kiril i Metodij.
- 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(8):1412-1417.

- 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.
- Trestic T, Uscuplic M, Colinas C, Rolland G, Giraud A, Robin C, 2001. Vegetative compatibility type diversity of *Cryphonectria parasitica* in Bosnia-Herzegovina, Spain and France. *Forest Snow and Landscape Research*, 76: 391–396.
- Yu X., Li B., Fu Y., Jiang D., Ghabrial S.A., Li G., Peng Y., Xie J., Cheng J., Huang J., and X. Yi. 2010. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 107:8387-8392.
- 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.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Eda MERSİN
Doğum Yeri ve Tarihi : Muğla / 01.09.1990

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Kale İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü-2017

İLETİŞİM

E-posta Adresi : edamersin@hotmail.com
Tarih :