

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HUMİK VE FULVİK ASİTİN *CRYPHONECTRIA PARASITICA*
ÜZERİNDE HIPOVİRÜLENS OLUŞUMUNA ETKİSİNİN LAKKAZ
ENZİMİ KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI

İrem ARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN

Eylül, 2022

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HUMİK VE FULVİK ASİTİN CRYPHONECTRIA PARASITICA
ÜZERİNDE HİPOVİRÜLENS OLUŞUMUNA ETKİSİNİN LAKKAZ
ENZİMİ KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI

İrem ARSLAN tarafından hazırlanan tez çalışması 08.09.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Emel ORDU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr.Öğr. Üyesi Esmâ ULUSOY
Üsküdar Üniversitesi



Bu tez çalışması Orman Genel Müdürlüğü, Marmara Ormancılık Araştırma Enstitüsü tarafından desteklenmiştir. Proje numarası : 10.4803

Danışmanım Prof. Dr. Semiha ERİŞEN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Humik Ve Fulvik Asitin *Cryphonectia Parasitica* Üzerinde Hipovirülans Oluşumuna Etkisinin Lakkaz Enzimi Kullanılarak Araştırılması” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

İrem ARSLAN

Sevgili Aileme

ve

arkadaşıma



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmam süresince bana destek olan, yol gösteren, beni hiçbir zaman geri çevirmeyen, her zaman hoşgörü ile karşılayan ve yol gösteren değerli hocam, sayın tez danışmanım Prof.Dr. Semiha ERİŞEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu çalışma sürecinde deneylerin yürütülmesini takip eden, laboratuvar çalışmalarına yardımcı olan, bilgi ve desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Emel ORDU ve Dr. Günseli Gür KURT'a teşekkürlerimi sunarım. 10.4803 numaralı "Humik Maddelerin Kestane Dal Kanseri Üzerine Etkilerinin İn-vitro Koşullarda Araştırılması" isimli proje ile tezimi destekleyen Orman Genel Müdürlüğü, Marmara Ormancılık Araştırma Enstitüsü çalışanları Dr. Mehmet ÖZDEMİR ve Ali GÜREL'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı ve destek olan arkadaşım Büşra BALA ve Yunus Emre ARVAS'a teşekkür ederim. Bana hayata ve işe dair çok şey öğretip kendimi geliştirmeme yardımcı olan, deneylerime ışık tutan Pınar Hüner Omay Selin AKPINAR, Mine AVCU'ya teşekkür ederim. Bizi güzel günlerin beklediğine inandıran, moral ve motivasyon sağlayan sevgili arkadaşım Ümmügülsüm GÜZELSOY'a, liseden beri yanımda olan, her türlü derdimi dinleyen, desteğini asla esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Bengisu ERÇEVİK, Özge DOĞAN, Armina POURHASSANI, Seda ÖZKAN, Nazgül GÜLER'e; Japonca ve akademik bilgisiyle beni aydınlatan Kübra Hatice BİLDİK'e; üniversite hayatımın bana kazandırdığı ve beni kök hücre ile tanıştıran Melike GEÇİLİ'ye teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her daim yanımda olan, ellerinden gelen yardımı hiçbir zaman benden esirgemeyen, her kararımın arkasında duran, bana olan inançlarını hiçbir zaman kaybetmeyen, hayallerimin peşinden koşmam için beni cesaretlendiren ve destek olan biricik annem Ayşe ARSLAN, babam Erol ARSLAN, kardeşlerim Muhammed Emin ve Buğra Alp ARSLAN, teyzem Nurten ARSLAN'a; beni dualarından eksik etmeyen anneannem ve dedeme teşekkürü borç bilirim.

İrem ARSLAN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1 GİRİŞ	16
1.1 Literatür Özeti.....	16
1.2 Tezin Amacı	18
1.3 Hipotez	19
2 GENEL BİLGİLER	20
2.1 Kestane	20
2.2 Kestane Dal Kanseri	22
2.3 Mikovirüsler	26
2.4 Hipovirülanslık.....	27
2.5 Humik ve Fulvik Asit	28
2.6 Lakkaz Enzimi.....	29
3 MATERYAL ve METOD	31
3.1 Materyaller.....	31
3.1.1 <i>Cryphonectria parasitica</i> İzolatları.....	31
3.1.2 Kullanılan Kitler	32
3.1.3 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	32
3.1.4 Kullanılan Besiyerleri	32
3.2 Metodlar	33
3.2.1 <i>Cryphonectria parasitica</i> İzolatlarının Büyütülmesi	33
3.2.2 Bavendamm Testi.....	33
3.2.3 Vejetatif Uyum Testi	34
3.2.4 Fulvik Asit ve Humik Asit Konsantrasyonlarının Hipovirülans Dönüşümüne Etkisi	35
3.2.5 Total RNA İzolasyonu.....	36
3.2.6 Jel Elektroforezi	36
3.2.7 Real-time qPCR	37

3.2.8 Total Protein Ekstraksiyonu.....	39
3.2.9 Bradford Yöntemi ile Protein Tayini	39
3.2.10 Lakkaz Enzim Aktivitesi.....	40
4 SONUÇ VE ÖNERİLER	41
4.1 Sonuçlar.....	41
4.1.1 Sonuçların Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi.....	41
4.1.2 Hipovirülans Dönüşümün Lac1 Gen Transkripsiyon Seviyesi ile Değerlendirilmesi	42
4.1.3 Hipovirülans Dönüşümün Lakkaz Enzim Aktivitesi ile Değerlendirilmesi	48
4.2 Öneriler.....	54
KAYNAKÇA	55
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	62

SİMGE LİSTESİ

%	yüzde
°C	santigrat derece
bp	base pair
cm	santimetre
gr	gram
ha	hektar
kg	kilogram
L	litre
M	molar
mg	miligram
ml	mililitre
mm	milimetre
rpm	rotatory per minute
vb	ve bunun gibi
vd	ve diğerleri
µl	mikrolitre

KISALTMA LİSTESİ

TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
FAO	Food Agriculture Organization
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection
Eu	European Union
PCR	Polymerase Chain Reaction
CHV	Cryphonectria hypovirus
PDA	Potato Dextrose Agar
PDAMB	Potato Dextrose Agar methionin biotin
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
dsRNA	double stranded Ribo Nucleic Acid
dNTP	deoxy Nucleotide Tri Phosphate
vc	vegetative compatibility
vic	vegetative incompatibility
ABTS	2-2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-Polyacrylamide gel electrophoresis
HA	Humik asit
FA	Fulvik asit
GAPDH	Glisealdehit-3- fosfat dehidrojenaz

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1 <i>Cryphonectria parasitica</i> 'da vejetatif uyumsuzluk.....	24
Şekil 2. 2 Humik madde türleri.....	28
Şekil 3. 1 Çalışmada kullanılan <i>C. parasitica</i> izolatları.....	31
Şekil 3. 2 Bavendamm besiyerinde gelişen <i>C. parasitica</i> izolatları	33
Şekil 3. 3 Virülent ve hipovirülent izolatların vejetatif uyum testi.....	34
Şekil 4.1 Farklı içeriğe sahip besiyerlerinde gerçekleştirilmiş hipovirülans dönüşümün 14 günlük inkübasyonu	41
Şekil 4. 2 Bavendamm testi sonuçları	42
Şekil 4. 3 Örneklerden elde edilen total RNA'nın jel elektroforez görüntüsü.....	43
Şekil 4. 4 lac1 geninin Real-time qPCR amplifikasyon eğrileri	45
Şekil 4.5 Farklı fulvik asit ve fulvik asit+ humik asit konsantrasyonlarında hipovirülans dönüşüme uğramış örneklerin lac1 gen ekspresyon seviyelerinin virülens örnek ile karşılaştırılması	46
Şekil 4. 6 Farklı fulvik asit konsantrasyonlarında dönüşüme uğramış örneklerin lac1 gen ekspresyon seviyeleri.....	47
Şekil 4. 7 Farklı fulvik asit ve humik asit konsantrasyonlarında dönüşüme uğramış örneklerin lac1 gen ekspresyon seviyeleri	48
Şekil 4. 8 Bradford standart eğrisi	49
Şekil 4. 9 Farklı fulvik asit konsantrasyonlarında dönüştürülen örneklerin lakkaz enziminin bağıl aktivitesi (%)	50
Şekil 4. 10 Farklı fulvik asit ve humik asit konsantrasyonlarında dönüştürülen örneklerin lakkaz enziminin bağıl aktivitesi (%)	51
Şekil 4. 11 Farklı humik asit ve fulvik asit konsantrasyonlarında dönüştürülen örneklerin lakkaz enziminin bağıl aktivitesi (%)	52

TABLO LİSTESİ

Tablo 3. 1 Çalışmada kullanılan besiyerlerinin içeriği.....	35
Tablo 3. 2 Real-time qPCR için kullanılan primerler	38
Tablo 3. 3 Real time qPCR reaksiyonunun termal koşulları	38
Tablo 4. 1 Humik ve fulvik asit içeren besiyerinde gelişen dönüşümü gerçekleştiren <i>C. parasitica</i> 'ya ait total protein miktarları (mg/ml)	49

Humik Ve Fulvik Asitin *Cryphonectria Parasitica* Üzerinde Hipovirülans Oluşumuna Etkisinin Lakkaz Enzimi Kullanılarak Araştırılması

İrem ARSLAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Semiha ERİŞEN

Cryphonectria parasitica, Latincesi *Castanea* olan kestane ağaçlarında kestane dal kanserine neden olan bir mantardır. Pozitif çift sarmallı RNA (dsRNA) virüsü ile enfekte olan hipovirülent *C. parasitica* suşu, hastalığın biyolojik kontrolü olarak Avrupa ülkelerinde sıklıkla kullanılmaktadır. dsRNA'nın varlığı mantar sporülasyonunu azaltmakta ve aseksüel üremeyi engellemekte; böylece hastalığın yayılmasını önlemektedir. Kestane dal kanseri etkeni olan virülent izolat, hipovirülent izolatla birlikte kültürlendiğinde hipovirülans geliştirdiği bilinmektedir. Lakkaz, mantarlarda lignin yıkımı, pigment sentezi ve morfogenez gibi birçok süreçte görev yapan bir enzimdir. *C. parasitica*'nın patojenitesi lakkaz ile bağlantılıdır. *C. parasitica*'da hipovirülans gelişmesi lakkaz aktivitesinde azalmaya neden olur.

Bu çalışmada, topraktaki fulvik ve humik asit konsantrasyonlarının *C. parasitica*'da hipovirülans gelişimine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla virülent ve

hipovirulent *C. parasitica* suşları PDA ortamına inoküle edildi ve karanlıkta 7 gün $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi. Suşlar Bavendamm testi yapılarak değerlendirildi. Suşlar, hipovirulent suşun virulent suşun transformasyonu üzerindeki etkisi ile fulvik ve humik asidin bu transformasyon üzerindeki etkisini incelemek için farklı konsantrasyonlarda fulvik asit ile fulvik + humik içeren selofanlı PDA ortamında ekildi. 14 günlük inkübasyondan sonra toplanan örneklerden RNA ve protein izolasyonları yapılmıştır. İzole edilen total RNA, lakkaz spesifik oligonükleotidler kullanılarak kurulan real time PCR ile transkripsiyon düzeyindeki farklılıkları nicel olarak analiz edildi. Enzim aktivitesi ise total ham özütteki lakkaz enzimin aktivitesi ölçülerek değerlendirildi.

Sonuçlar, fulvik ve humik asit içeren PDA besiyerlerinde hipovirulent izolat ile birlikte kültüre edilen virulent izolatların hipovirülans özellik kazandığı ve *C. parasitica*'nın virulent suşlarının her zaman hem hipovirulent izolattan hem de hipovirulente dönüşümü sağlanmış izolatlardan daha fazla lakkaz ürettiğini göstermektedir. Ayrıca 75 ppm'lik fulvik asit varlığında lac1 gen transkripsiyonunun düşmesi aynı zamanda lakkaz enzim aktivitesindeki azalmanında gözlenmiş olması ve bunun morfolojik bulgularla desteklemesi ile hipovirülans özelliğın kazanılmasında 75 ppm'lik fulvik asit varlığının önemli olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kestane dal kanseri, *Cryphonectria parasitica*, Hipovirülanslık, Humik asit, Fulvik asit, Lakkaz

Investigation of The Effect of Humic And Fulvic Acid on Hypovirulence Formation *on Cryphonectria Parasitica* by Using Laccase Enzyme

İrem ARSLAN

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Semiha ERİŞEN

Cryphonectria parasitica is a fungus that cause chestnut blight in chestnut trees (Castanea). The hypovirulent strain of *C. parasitica*, infected with positive double-stranded RNA (dsRNA) virus, is frequently used in European countries as a biological control of the disease. The presence of dsRNA reduces fungal sporulation, prevents asexual reproduction, thus prevents the spread of the disease. The virulent *C. parasitica*, the agent of chestnut blight, can develop hypovirulence when co-cultured with hypovirulent *C. parasitica*. Laccase is an enzyme involved in many processes such as lignin degradation, pigment synthesis, and morphogenesis in fungi. The pathogenicity of *C. parasitica* is linked to laccase. The development of hypovirulence in *C. parasitica* causes a decrease in laccase enzyme activity.

In this study, aimed to investigate the effect of fulvic and humic acid concentrations in the soil on the development of hypovirulence in *C. parasitica*,

For this purpose, virulent and hypovirulent *C. parasitica* strains were inoculated into PDA medium and incubated at $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 7 days in the dark. The strains were evaluated by the Bavendamm test. The strains were inoculated on cellophane PDA media containing different concentrations of fulvic acid and fulvic+humic acid to examine the effect of the hypovirulent strain on transformation the virulent strain and the effect of fulvic and humic acid on this transformation. After 14 days of incubation, RNA isolation and protein extraction were made from collected samples. The isolated total RNA was quantitatively analyzed for differences in transcription level by real time PCR using laccase specific oligonucleotides. Enzyme activity was evaluated by measuring the laccase enzyme in the total crude extract.

The results showed that virulent isolates co-cultured with hypovirulent isolate on PDA media containing fulvic and humic acid acquired hypovirulence and that virulent strains of *C. parasitica* always produced more laccase than both hypovirulent isolates and transformed isolates. In addition, the decrease in lac1 gene transcription in the presence of 75 ppm fulvic acid and the decrease in laccase enzyme activity in the presence of 75 ppm fulvic acid, supported by morphological findings. Those results suggest that the presence of 75 ppm fulvic acid may be important in the acquisition of hypovirulence.

Keywords: Chestnut blight, *Cryphonectria parasitica*, Hypovirulence, Humic acid, Fulvic acid, Laccase

1.1 Literatür Özeti

Mantarlar diğer bir ismiyle funguslar, bitkilerde hastalık oluşumuna neden olabilen iplikli yapıdaki canlılardır. İnsanlar, hayvanlar ve bitkiler üzerinde parazitik yaşam sürdürebilen mantarlar, konakçısına ciddi zararlar verebilir. Bitkilerde hastalığa neden olabilen 10.000'e yakın mantar türü bulunmaktadır. Sorunu ve çözümü üretenin doğanın kendisi olduğundan bitki hastalıklarının yönetiminde biyolojik kontrolü ön plana çıkarmıştır [1].

Biyolojik kontrol, bir organizma ile başka bir organizmanın büyümesini, enfeksiyonunu ya da üremesini engellemesini ifade eder. Çevre açısından güvenli bir yöntem olan biyolojik kontrol, fiziksel ve kimyasal olarak mücadelenin yetersiz kaldığı ve kullanılamadığı bazı durumlarda bitkileri patojenlerden korumak için tek seçenektir. Zararlıları ve patojenleri yok etmek veya kontrol altına almak için bu zararlıların doğal düşmanlarının yani antagonistlerinin kullanılması, patojenik olmayan veya birbiriyle uyumsuz mikroorganizmalar kullanarak bitki direncinin uyarılması biyolojik kontrol yöntemlerindendir.

Başarılı biyolojik mücadele için patojen ve antagonist arasındaki etkileşimin bilinmesi gerekmektedir. Antagonistler; antibiyotik üretimi, patojen ile yer veya besin rekabeti, patojeni konakçı olarak kullanarak gelişimini baskılayabilir ya da engelleyebilir. Virülans özelliğe sahip bir patojen ile az virülanslık gösteren organizma arasındaki etkileşim sonucu patojenin virülanslığının azalmasına hipovirülans denir. Kestane dal kanseri etkeni olan *C. parasitica* mantarına karşı yaygın olarak kullanılan biyolojik mücadele uygulaması hipovirülanslıktır. Mantarları enfekte eden virüsler diğer adıyla mikovirüsler bu uygulamalarda kullanılan etkin araçlardır [2][3].

Kestane, Fagaceae familyasına, *Castanea* türüne ait ağaçlara ve bu ağaçların yenilebilen meyvelerine verilen isimdir. Kestane kış mevsiminde yaprak döken,

uzun kenarları tırtıklı yeşil yapraklı, dikenlerle kaplı bir örtü altında bulunan nişasta bakımından zengin meyveye sahip, odunu dayanıklı ve değerli olan uzun boylu orman ağacıdır. Doğal yayılış alanı Güney Avrupa, Türkiye ve Kafkasya'dır. Ülkemizin Ege ve Akdeniz Bölgelerinde doğal olarak bulunan kestane ağaçları, Marmara ve Kuzey Anadolu'da meşe, gürgen gibi yapraklı ağaçlarla karışık meşcereler kurulmaktadır. Odunu, meyvesi ve bal üretimi için yaprağı ve çiçeği kullanılan; ülkemiz ve dünya için önemli ekonomik değere sahip kestane ağaçları, kestane dal kanseri hastalığı ve kestane gal arısı gibi patojenler nedeniyle git gide azalmaktadır [4].

Kestane dal kanseri, *C. parasitica*'nın neden olduğu Amerika ve Avrupa kestane ağaçlarını etkileyen yıkıcı bir hastalıktır. Patojen, Doğu Asya'ya özgü olmasına rağmen enfekte kestane bitkileri yoluyla diğer kıtalara yayılmıştır. *C. parasitica*, duyarlı konakçı ağaçların gövde ve dallarının kabuğunda çok yıllık nekrotik lezyonlara ve zamanla enfeksiyonlu bölgenin kuruyup ölmesine neden olur. Duyarlı konakçı ağaçlarda öldürücü olmayan, yüzeysel kanserler mikovirüs kaynaklı hipovirülans ile ilişkilidir. Bu mikovirüs pozitif çift zincirli (ds) RNA genetik materyaline sahip kapsidi bulunmayan bir virüstür [5]. Konakçısı olduğu *C. parasitica*'nın sporülasyonunu azaltmakta ve aseksüel üremesini baskılamakta ve böylece hipovirülans özellik göstermesini sağlamaktadır [6].

C. parasitica'nın yeni bir bölgeye girmesinden sonra, hastalıklı bitki/ağaçların kesilip yakılarak yok edilmesi çabaları çoğunlukla başarısız olmuştur. *Cryphonectria hypovirus 1* adı verilen mikovirüs (CHV-1), hipovirülansa neden olan kestane dal kanserine karşı uygulanabilir başarılı bir biyolojik kontrol ajanıdır [5]. CHV-1'in *C. parasitica*'yı enfekte etmesi sonucu parazitin büyümesini engeller ve sporlaşma kapasitesini azaltır. Enfekte ağaçlardaki tekil kanserler, hipovirüs ile enfekte *C. parasitica* suşları ile terapötik olarak tedavi edilebilir. Sonrasında hipovirüs tedavi edilmemiş kanserlere yayılabilir ve *C. parasitica* popülasyonunda yerleşik hale gelerek hastalığın ölümcül seyrini değiştirebilir [7]. Hipovirülans yöntemi Avrupa'nın birçok bölgesinde hastalığın tedavisine yönelik olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem dışında Kuzey Amerika'da kestane dal kanseri ajanı *C. parasitica*'ya doğal direnci olan Çin kestanesi ile Amerikan kestanesi

genomlarının geri çaprazlama yoluyla hastalığa dirençli kestane ağaçları oluşturmaktır [8].

Humik maddeler doğada bulunan çeşitli organik maddelerden en yaygın olanıdır. Dünyada bulunan toplam organik karbonun yaklaşık %25'ini oluştururlar ve ayrıca göller, nehirler, deniz tortulları, toprak ve kömür kompozitleri gibi çeşitli ekosistemlerde bulunabilirler. Humik maddeler, karasal ve sucul ortamlarda kimyasal elementlerin kimyasını, döngüsünü ve biyoyararlanımını ve ayrıca doğal kaynaklı ksenobiyotik ve organik kimyasalların dağılımını ve bozunmasını etkiler. Toprakta meydana gelen kimyasal ve biyolojik reaksiyonlar farklı yapılarda, farklı özelliklerde ve değişken moleküler kütlelere sahip humik madde türlerinin oluşmasına neden olur. Humik maddeler, humin, humik asit ve fulvik asit olmak üzere üç kategoride sınıflandırılır. Fulvik ve humik asit gibi humatlar, tarım ve bitki yaşamı için büyük önem taşıyan maddelerdir. Bu karmaşık asitler laboratuvarlarda sentezlenemez [9]. Fulvik ve humik asit birçok yönden toprak sağlığına katkıda bulunur. Topraktaki kilin gevşemesini sağlarken suyun toprağa nüfuz etmesini kolaylaştırırlar. Toprak pH'nın alkali veya asidik yöne kaymasını önleyerek toprak pH'nı tamponlar. Topraktaki iyon değişim kapasitesini artırırlar. Karbon ve fosfat kaynağı oldukları için bitkilerin azot, fosfor ve potasyum alma yeteneğini artırırlar. Tohumun çimlenme kapasitesini artırır, bitki köklerinin uzamasını, filizlerin büyüme noktalarının aktifleştirilmesini sağlarlar. Aynı zamanda bitkinin biyotik ve abiyotik strese karşı direnmesine yardımcı olur. Bitki patojenleri tarafından salgılanan bazı toprak enzimlerini stabilize eder veya inaktive eder, bu da onları bitkilere daha az zararlı hale getirir [10].

1.2 Tezin Amacı

Kestane dal kanserinin biyolojik kontrolünde hipovirü lent *C. parasitica* suşu olan CHV1 yaygın şekilde kullanılmaktadır. Aynı zamanda hastalıktan daha az etkilenmiş bölgelerdeki toprakta daha fazla miktarda humik maddelerin varlığına rastlanmıştır [11]. Bu bilgiler göz önüne alındığında, hipovirü lent suş ile enfekte edilmiş virü lent *C. parasitica*'nın hipovirü lente dönüşümü humik madde türlerinden olan fulvik ve humik asit ile desteklenmesi hastalığın biyolojik kontrolünde yeni bir bakış açısı kazandıracaktır.

Bu çalışmada in vitro olarak, kestane dal kanseri ajanı olan virulent *C. parasitica* mantarının hipovirulent *C. parasitica* suşu ile enfekte edilip hipovirulans özellik geliştirmesi ve bu gelişimde toprakta bulunan fulvik ve humik asitlerin farklı konsantrasyonlarının etkisi lakkaz enzimi ile protein ekspresyonu ve transkripsiyon düzeyinde araştırılması amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Hipovirulent suş ile enfekte edilen ve farklı fulvik ve humik asit konsantrasyonlarında büyütülen virulent izolatın hipovirulans gelişim göstermesi ve buna bağlı olarak dsRNA transferinin gerçekleştirmesi; lakkaz enzim aktivitesine azalma ve lac1 gen ekspresyonunda downregülasyon görülmesi beklenmektedir.

2.1 Kestane

Kestane, kayıngiller (Fagaceae) familyasından *Castanea* cinsini oluşturan, ortalama 20-25 m'ye kadar boylanabilen, 1,5-2 m çaplarına ulaşabilen, gövdesi dik, kırmızı-kahverengi kabuklu ve sert yapraklı ağaçlara verilen isimdir. Kışın yaprağını döken, üzeri dikenlerle kaplanmış nişasta bakımından zengin besleyici meyvelere sahip, odunu dayanıklı ve değerli olan uzun boylu orman ağacıdır. Gövdede simpodial yani yanlara doğru büyüyen dallanma görülür. Kuvvetli yan kökler ile desteklenen kazık kök tipine sahiptir. Yaprakları ise geniş, uzun ve kenarları tırtıklı olup üst yüzeyi parlak alt yüzeyi tüylüdür. Meyveleri sarı-yeşil renkte dikenli kabuk ile sarılmış tek veya ikili şekilde bulunur. Kestane ağacının tomurcukları hem sürgünleri hem de sürgünler üzerindeki çiçek püsküllerini oluşturur. Üzerlerinde yalnızca erkek çiçek bulunduran çiçek püskülleri yaprak koltuklarında bulunurken; hem dişi hem de erkek çiçek bulunduran karışık eşeyli püsküller sürgünlerin uç bölümlerinde bulunurlar. 500 ila 1000 yıl arası değişebilen yaşam süresine sahiplerdir. Haziran ayında çiçeklenen Ekim-Kasım aylarında meyve verirler [12].

Kestane ağacının sınıflandırılması aşağıdaki gibidir:

Alem: Plantae

Bölüm: Tracheophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Takım: Fagales

Familya: Fagaceae

Cins: *Castanea*

Başlıca türleri Amerikan (*C. dentata*), Çin(*C. mollissima*), Japon (*C. crenata*) ve Avrupa (*C. sativa*) olmak üzere birçok alt türe sahiptir. Dünyada kestane ağacının

doğal yayılım alanları, Çin, Japonya ve Kore gibi Doğu Asya ülkeleri, Türkiye, Güney Avrupa ve Kuzey Amerika'dır. Çin, Kore, Japonya ve Akdeniz ülkeleri kestane ağaçlarının orman şeklinde yetiştiği başlıca ülkelerdir. Akdeniz ülkelerine dahil olan ülkemizde ise Avrupa kestanesi yani *C. sativa* Mill türü doğal olarak yetişmektedir. Aynı zamanda kestane ağaçları meşe, gürgen, kayın gibi yapraklı türlerle beraber kültüre alınarak da yetiştirilmektedir.

Türkiye coğrafi konumu, toprak yapısı ve iklimi ile biyolojik çeşitlilik bakımından önemli bir potansiyeli elinde tutar. Kestane ağacı Anadolu'da pek çok bölgede doğal yayılım göstermektedir. Yaygın olarak Ege, Karadeniz ve Marmara Bölgelerinde ekonomik değeri için yetiştirilmektedir. Kestane ağacı çok amaçlı olması nedeniyle hedeflenen ürün veya hizmetlere göre yetiştirilir. Kestane ağacı, çürümeye karşı koruma görevi olan yüksek tanen içeriği sayesinde harici kullanıma uygundur. Kestane kerestesi yakacak odun, odun kömürü, mobilya, tekne ve benzeri ürünlerin üretimi için kullanılırken aynı zamanda tanen ekstrasyonu için de kullanılabilir. Meyvesi için yetiştirilen kestane ağaçları genellikle aşılınmış ağaçlardan oluşan açık meşcereler üzerine kurulmuştur. Kestane meyvesi protein ve karbonhidrat kaynağı olmakla birlikte vücut için gerekli yağ asitleri bakımından zengin, tok tutucu ve enerji verici bir besindir. Yenilebilir meyveler kavrulmuş, şekerlenmiş, haşlanmış, kurutulmuş veya un haline getirilmiş şekilde kullanılabilir. Çiçeğinden elde edilecek polen ile üretilen kestane balı da severek tüketilen önemli bir besindir [11] [12].

Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organisation;FAO) 2018 verilerine göre, dünyada 612.877 hektarlık alanda kestane üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu kestane üretim alanlarının yaklaşık %56'sı Çin'de bulunmaktadır. 2018 yılında tüm dünyadaki kestane üretimi 2.353.825 ton olmuştur. Üretimin yaklaşık %83,5'i Çin'de gerçekleştirilmekte ve bu miktar 2 milyon tonu aşkın kestaneye denk gelmektedir. Türkiye ise dünya kestane üretiminde Bolivya'yı takiben üçüncü sıradadır [15].

2.2 Kestane Dal Kanseri

Bitkilerde hastalığa neden olabilen yaklaşık 10.000 fungus türü vardır. Bu funguslar bitkilere sadece yetiştirme döneminde değil, hasat ve depolama dönemlerinde de kayıplara neden olabilmektedir. Bu kayıplar doğrudan beslenme sonucu oluşan nitelik ve niceliğini değiştirip bozulması yoluyla ortaya çıkan zararlar olduğu gibi, *Penicillium spp.*, *Apergillus spp.*, *Fusarium spp.* ve *Alternaria spp.* başta olmak üzere bazı fungusların oluşturdukları mikotoksin denen sekonder metabolitleri ile de zarar verirler. Fungal bitki hastalıkları, tarımda her yıl ciddi kayıplara neden olan en önemli mikrobiyal ajanlar olarak kabul edilmektedir [3], [16]–[18].

Bir bitki patojeni olan *C. parasitica*, 1904 yılında New York Zooloji Parkı'ndaki Amerikan kestanesinde rapor edilmiştir ve neden olduğu hastalığa kestane dal kanseri adı verilmiştir. İlk olarak *Diaporthe parasitica* Murrill olarak tanımlansa da 1912 yılında *Endothia* cinsine aktarılmış ve nihayet 1978 yılında da şu anki ismi olan *C. parasitica* Murr Barr'ı almıştır. *C. parasitica*, Kuzey Amerika'da baskın bir ağaç türü olan Amerikan kestanesinin büyük ölçüde ortadan kalkmasına ve Avrupa'da Avrupa kestanesinin azalmasına neden olmuştur [19], [20]

2.2.1 Hastalık Belirtileri

C. parasitica, gövde ve dal gibi ağacın yer üstü kısımlarını enfekte eden bir kabuk patojenidir. Konakçılarda ortaya çıkan semptomlar hem *C. parasitica* suşunun virülansına hem de enfekte olmuş ağaç parçasının yaşına bağlı olarak değişir. *C. parasitica*'nın virulan suşları tipik olarak küçük ve ince dalları öldürebilen nekrotik lezyonlar üretir. Çok yıllık kanserlerde ise daha kalın dallarda ve gövdede yıllar içinde gelişerek ölüme neden olur. Pürüzsüz kabuklu genç gövde ve dallar üzerindeki kabuk kanserleri, turuncu veya kırmızımsı-kahverengi renkteyken daha yaşlı gövde ve dallarda daha az belirgindir [21], [22].

Kuraklık, yangın veya ağaçların kesilmesinden kaynaklanan kabuk yaraları nekrotrofik bir patojen olan *C. parasitica* için bir giriş noktası işlevi görür. *C. parasitica*'nın hem seksüel hem de aseksüel sporları hastalığa neden olabilir [6].

Kabuk ve kambiyumda, kestane dal kanseri enfeksiyonunun bir işareti olan tipik soluk kahverengi miselyumlar gelişir, kambiyumun ölmesi nedeniyle kabuk içe çöker. Kabukta gelişen kanser hızla büyür ve etkilenen ağaç kısmını çevreleyerek gövde ve dalların ölümüne neden olur. Ölen dallardaki yapraklar solgunlaşır, sararır ve kahverengiye döner. Yaşlı ağaçlardaki *C. parasitica* enfeksiyonunun en erken belirtisi ölü dallarda asılı kalan bu yapraklardır [23].

Hipovirülent *C. parasitica* suşu ile indüklenen kanserler, başlangıçta virülent suşların neden olduğu özelliklerle benzer özellikler gösterir. Zamanla kanserin genişlemesi yavaşlayabilir ve durabilir. Enfekte olmuş bölgenin altında yeni kabuk katmanları oluşur, dış kabuk çatlar ve dış kabuk şişmiş bir görünüm alır. Kambiyum mantar tarafından öldürülmediği için, gövde ve dallarda kuruma görülmez. Virülent *C. parasitica*'nın neden olduğu kanserler aktif kanser olarak adlandırılırken; hipovirülent *C. parasitica*'nın neden olduğu kanserlere iyileşmiş veya pasif kanserler denir [23]–[25].

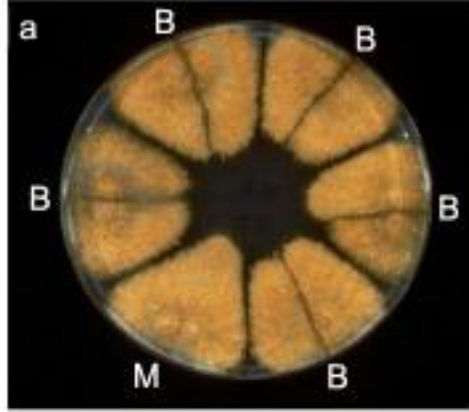
2.2.2 Konakçı Aralığı

C. parasitica'nın ana konakçısı Fagaceae (kayıngiller) familyasından *Castanea* cinsidir. Amerikan kestanesi, Avrupa kestanesi, Çin kestanesi (*C. mollissima* Blume) ve Japon kestanesi (*C. crenata* Siebold & Zucc.) başlıca kestane türleridir. Kestane dal kanseri ajanı *C. parasitica*'ya en duyarlı tür *C. dentata* olmakla birlikte, onu *C. sativa* izlemektedir. Asya'da görülen diğer iki kestane türü, patojenle birlikte evrim geçirmeleri sayesinde *C. parasitica*'ya karşı dirençlidir. Bu patojenin bir diğer konakçısı ise Fagaceae familyasından *Quercus* cinsi yani meşedir [26][27].

2.2.3 Vejetatif Uyumsuzluk

Vejetatif uyumsuzluk, mantarlarda yaygın görülür. Hifyal füzyon oluşumunu ve sitoplazmik değişimi önleyerek sitoplazmik olarak bulaşan hastalıklara karşı bir savunma mekanizması olarak iş görür. *C. parasitica*'daki vejetatif uyumsuzluk sistemi, virülans azaltıcı etki gösteren mikovirüslerin yatay geçişini kısıtlamaktadır. Her biri iki allel içeren altı farklı vejetatif uyumsuzluk (*vic*) lokusu tanımlanmıştır. Bu altı *vic* lokusu, 64 farklı *vc* tipine karşılık gelen $2^6 = 64$ *vic* genotipini tanımlamaktadır. *C. parasitica* izolatları *vic* lokuslarında aynı allellere

sahipse aynı vc tipine aitlerdir ve vejetatif olarak uyumlulardır. Agar üzerinde birlikte kültür yapılırken uyumlu izolatlar tek bir kültürde birleşirken; uyumsuz izolatların temas bölgesinde bir baraj hattı oluşur. Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Baraj hattının oluşmasının nedeni uyumsuz hücrelerin temasıyla tetiklenen programlanmış hücre ölümü yani apoptozdur [28], [29].



Şekil 2.1 *Cryphonectria parasitica*'da vejetatif uyumsuzluk

(a) Vejetatif uyum testleri, uyumlu suşlar (M) tek bir kültürde birleşirken, uyumsuz suşlar arasında bir baraj bölgesi (B) oluşur. (*Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: Invasion history, population biology and disease control - Şekil 3'ten uyarlanmıştır.)

Genetik olarak tanımlanmış altı *vic* lokusu moleküler düzeyde karakterize edilmiştir. Moleküler karakterizasyon sayesinde bilinen 64 *vic* genotipinin tanımlanması için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı yöntemler geliştirilmiştir. *C. parasitica* popülasyonlarının genetik yapısını değerlendirmek için vc tiplerine yönelik araştırmalar yapılmıştır. 64 Avrupa vc tipi test suşundan (EU-1'den EU-64'e) oluşan tanımlanması, farklı çalışmalar arasında karşılaştırmaları büyük ölçüde kolaylaştırmıştır. Uzun süredir yerleşik merkezi popülasyonlar, yeni kurulan popülasyonlara göre daha yüksek vc tipi çeşitlilik göstermektedir. En yüksek vc tipi çeşitliliği Asya'daki *C. parasitica*'da tespit edilmiş ve bu izolatların çoğu test suşları ile uyumsuzluk göstermiştir. Bunun yanında ABD ve Avrupa'da test suşlarıyla uyumsuz izolatlar tespit edilmiştir. Bilinen altı *vic* lokusunun hepsinde aynı allel paternine sahip fakat vejetatif olarak uyumsuz izolatlar bulunmuştur. Bu da *C. parasitica*'daki vejetatif uyumsuzluğun bilinen altı

vic lokusu dışında farklı etmenlercede kontrol edildiğini göstermektedir [30]–[33].

2.2.4 Hastalık Yönetimi

C. parasitica'nın yayılmasını önlemek için, dünya çapında kestane ve duyarlı meşe odunları, tohumları ve canlı bitkilerin taşınımı ve ticaretini etkileyen karantina düzenlemeleri kabul edilmiştir. Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü (EPPO) için bu patojen A2 seviyesinde bir zararlı olarak değerlendirilmektedir. *C. parasitica*'dan arındırılmış veya üretim yerinde ve çevresinde *C. parasitica*'ya ilişkin gözlem yapılmamış alanlarda üretilmiş kestane veya meşe ağaçlarının ülkeler arasında taşınımına ve dikimine izin verilmektedir [34]. Göz ile muayene ile tespit edilemeyen asemptomatik enfekteli bitkiler nedeniyle patojenin yayılmasının önüne geçilememiştir. *C. parasitica*'nın yeni bir alanda görülmesi sonrasında enfekte olmuş bitkilerin veya ağaçların kesilmesi ve yakılması olmak üzere eradikasyon çalışmaları sıklıkla gerçekleştirilmiştir. Budama ve aşılama sonrası oluşan yaralar ve kesikler bu patojen için potansiyel giriş kapısıdır. Bu yaraların ve kesiklerin tespiti zor olduğundan ormanlarda eradikasyon çalışmaları yetersiz kalmıştır. Patojenin spor üretim dönemlerinde yaralanmalardan kaçınılmalı, dezenfekte edilmiş alet kullanılmalı ve daha az invaziv aşılama teknikleri kullanılmalıdır. Ormanlarda kimyasal kullanımının kısıtlı veya yasak olması; fungusitlerin fitotoksik olması ve mantarlarda direnç gelişimine neden olabilmesi kimyasalların tedavi olarak kullanımını mümkün kılmamaktadır [35], [36].

Bitki fungal hastalıkları geniş sayıda hastalık etmenini barındırmaktadır. Bu hastalık etmenlerinden *Fusarium* ve *Verticillium* gibi kimyasal mücadelesi bulunmayan ve bitkilerde solgunluk yapan hastalıkların kontrol altına alınmasında biyolojik mücadele çalışmalarının ayrı bir önemi vardır. Bitkinin rizosfer bölgesinde yaşayan, saprofitik karakterdeki bazı bakteriler ve fungusların yarışmacı özellikte oldukları ve bazı metabolik maddeler üreterek bu patojenik etmenlere baskılayıcı etki gösterdikleri bilinmektedir. Bunlar arasında fluorescent *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Talaromyces* ve avirülent *Fusarium* gibi organizmalar sayılabilir. Bu mikroorganizmalar, bulundukları

ekosisteme gösterdikleri uyum ve bitki gelişimi üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle ticari olarak da üretilmeye başlanmıştır. Bunlar arasında; *Mycostop*, *Actinovate* gibi bakteriyel ve *Trichodex* gibi fungal antagonistler ticari preparat haline getirilmişlerdir. Bitki kök ve kök boğazında değişik hastalıklara yol açan *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Phytophthora*, *Fusarium* gibi hastalık etmenleri ile biyolojik savaşında çeşitli bakteriyel antagonistlerin ve *Trichoderma* türlerinin başı çektiği, pek çok çalışmada yer aldığı görülmektedir. Bitkinin toprak üstü kısımlarında görülen fungal hastalıklara yönelik çalışmaların, iklim koşullarının kontrol altına alınabildiği örtü altında üretilen bitki türlerinde daha başarılı olduğu görülmüş ve çalışmalar bu yönlü de yoğunlaşmıştır. *Trichoderma harzianum*'un ve floresan *Pseudomonas*'ların etkili oldukları en yüksek etkiyi ise bu patojene karşı birden fazla yöntem ve tekniğin birlikte uygulandığı entegre mücadelede sağlandığı görülmektedir. Yine biyolojik savaşında önemli kazanımlar elde edilen bir diğer fungal patojen de kestane dal kanseri etmeni *C. parasitica*'dır. Bu fungusu karşı hipovirulent ırklar ile ağaçlara aşılama yapılmakta ve hastalık geriletilebilmektedir [2].

2.3 Mikovirüsler

Bitki patojenlerinden mikovirüsler, konakçı mantarlarında hipovirülans yani azaltılmış virülans indükleyebilir ve potansiyel olarak biyolojik kontrol araçları olarak büyük ilgi görmektedir. Çok çeşitli taksonomik gruplardan fungal hipovirülansı indükleyen çok sayıda mikovirüs rapor edilmiştir. Bu virüslerin hastalık yönetiminde başarılı bir şekilde uygulanması, patojenin doğal popülasyonlarında yayılma yeteneklerine bağlıdır [37].

Mikovirüsler genellikle hücre dışı bulaşma yollarından yoksundur. Hifsel birleşme, mikovirüsün diğer izolatlara bulaşmasının yatay yolu ve konidialardaki sporlar ile döllere geçiş dikey yoldur. İletim etkinlikleri, hem mantar konakçısından hem de enfekte eden virüsten etkilenir. Yapay transfeksiyon yöntemleri, potansiyel biyokontrol ajanı mikovirüslerinin çoğu zaman çeşitli mantarları enfekte etme kabiliyetine sahip olduğunu göstermiştir. Bu, onların olası kullanımlarını, tanımlandıkları patojenlerden başka patojenlerin kontrolüne doğru genişletir. Mikovirüs araştırmaları ayrıca onların karmaşık moleküler biyolojileri ve fungus-

virüs etkileşimlerinin moleküler temelleri hakkında bilgi edinmeye odaklanmıştır. Bu bilgi, mikovirüsü manipüle etmek için kullanılabilir. Tarla koşullarında mikovirüslerin kullanımını araştırırken, patojen yaşam tarzı, ile hastalığın ve etkilenen mahsulün özellikleri, üstesinden gelinmesi gereken belirli zorlukları, biyokontrol formülasyonların içerikleri ve uygulama yöntemlerinin geliştirilmesini etkilemektedir.

Mikovirüslerin karakteristik bir özelliği, bulaşmaları için yalnızca hücre içi mekanizmalara bağlı olarak, yaşam döngülerinde genellikle hücre dışı bir fazdan yoksun olmalarıdır [38], [39]. Bu nedenle, onları barındıran mantar izolatlarının içsel genetik unsurları olarak kabul edilirler ve esas olarak kriptik enfeksiyonlara neden olacak şekilde evrimleştikleri düşünülmüştür. Bu görüş, *C. parasitica hypovirus* 1'in (CHV1), *C. parasitica*'nın Avrupa popülasyonlarına girmiş ve kendiliğinden yayılarak kestane yanıklığı salgınına yavaşlatan bir mikovirüs olarak tanımlanmasıyla değişmiştir [21]. Mikovirüslerin konakçılarında hipovirülans indükleyebildiğinin kabul edilmesi, biyokontrol araçları olarak potansiyelleri nedeniyle fitopatojenik mantarlardan virüslerin karakterizasyonuna büyük ilgi uyandırmıştır. Virüslerin çoğu, ya çift sarmallı RNA (dsRNA) ya da tek sarmallı RNA (ssRNA) genomlarına sahiptir ve kapsidli ya da kapsidsiz olabilirler. CHV1, dsRNA mikovirüs ailesi *Hypoviridae*'nin üyesidir ve bu grubunun üyeleri kapsidden yoksundur [40]. *C. parasitica*'da CHV2, CHV3 ve CHV4 olarak adlandırılan üç başka hipovirüs daha tanımlanmıştır [41].

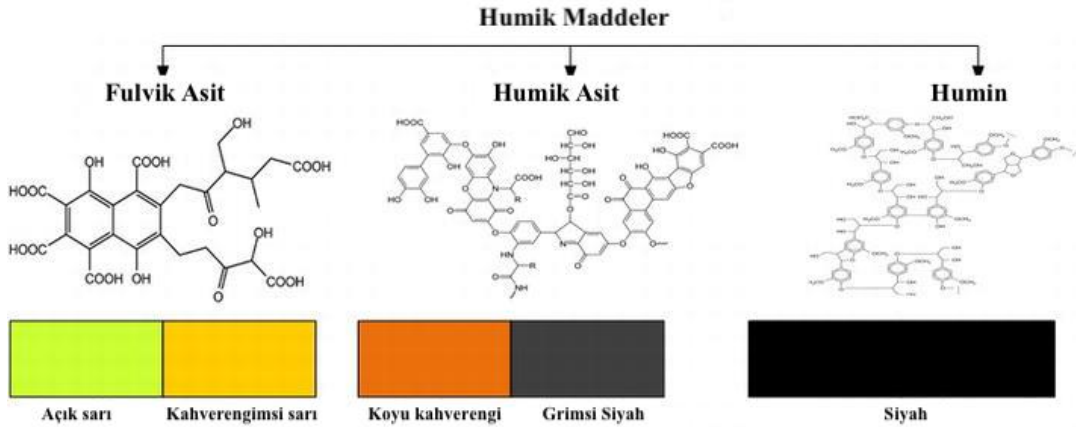
2.4 Hipovirülanslık

Virülent bir patojen ile az virülent olan birey arasındaki hibridizasyon sonucu patojenin virülensliğinin azalması durumudur. Hipovirülans, *Hypoviridae* ailesindeki mikovirüslerin enfekte ettiği *C. parasitica*'daki viral bir hastalığı ifade eder. [7], [42], [43]. Avrupa'da kestane dal kanseri ile biyolojik mücadele kontrol ajanı olarak CHV-1 çalışılmaktadır. Dal kanseri patojeninin sporülasyonunu azaltması ve aseksüel üremesini engellemesi ile *C. parasitica*'da hipovirülent bir fenotip oluşturur [44], [45]. Bu hipovirüs, 1950'li yıllarda İtalya'da ağır enfeksiyon görülen kestane meşcerelerinde iyileşme belirtileri görülmesiyle bulunmuştur [21]. Hipovirüs, enfekte olmuş mantardan diğer mantara konidya

adı verilen aseksüel sporlar ile bulaşır. Büyüyen sporların hiflerinin birleşmesi ile hipovirüs diğer mantarlara iletilir. Böylece hipovirülansın yayılmasını sağlayabilir [46], [47].

2.5 Humik ve Fulvik Asit

Humik ve fulvik asitler yaygın olarak toprak organik maddesinin bir kısmından (%65-70) oluşan humik maddeler olarak adlandırılırlar (Şekil 2.2). Bu organik kompleksler toprakta doğal olarak bulunur. Bu humik maddeleri, karboksil (COOH-) ve fenolik (OH-) grupları nedeniyle toprak özelliklerini ve bitkilerin fizyolojik özelliklerini etkiler. Fulvik (FA) ve humik asidin çoklu rolleri nedeniyle bitki büyümesi üzerinde doğrudan ve dolaylı etkileri vardır. Humik asit (HA) toprak yapısını, agregasyonunu, su geçirgenliğini, iklimlendirmeyi, ve nem tutma kapasitesini iyileştirir ve katyon değişim kapasitesini ve mikrobiyal popülasyonun mikrobiyal aktivitesini artırır. Ayrıca yaprak gelişimi, gövde ve kök uzaması, çiçeklenme vb. gibi bitkilerin büyüme modellerinden sorumludur. Bitki büyümesini etkileyen maddelerin üretimi gibi bazı biyolojik süreçlerde yer alırlar. Bunların yanı sıra humin malzemeleri, çevre dostu tedaviler olarak kaynakların korunmasına yardımcı olur [48], [49].



Şekil 2. 2 Humik madde türleri (Humic Substances: Its Toxicology, Chemistry and Biology Associated with Soil, Plants and Environment- Şekil 1'den uyarlanmıştır.)

Toprak HA'ları ve FA'lerinin tümü, birçok fitopatojenik mantarı inhibe etme yeteneğine sahiptir. Bu, toprağın bazı toprak kaynaklı hastalıklara direnecek bir

yapıya sahip olduğu anlamına gelmektedir. HA'daki daha karmaşık bileşiklerin FA'deki basit bileşiklerden daha yüksek inhibisyon oranları sergilediğini gösterilmiştir. HA'ların aktif alifatik bileşenleri ve FA'lerin aktif grupları (OH ve COOH), mantar öldürücü aktivitelerinden sorumludur [50].

HA'nın bitki büyümesi üzerindeki etkisi, bu bileşiğin kök hücre duvarları ile etkileşiminden kaynaklanan stresin gelişimi ile ilişkilendirilebilir. Stresin yoğunluğu, uygulanan HA konsantrasyonuna ve bunun bitki üzerindeki etkisine bağlı olacaktır. Düşük konsantrasyonlar hafif streslere neden olur ve bitki büyümesini teşvik eder, yüksek konsantrasyonlar ise yoğun strese neden olur ve bitki büyümesini engeller [51].

ROS üretimi aynı zamanda patojen saldırısına karşı her tür tepki için önemli bir bitki savunma sinyalidir. Birkaç çalışma, biyotik ve abiyotik streslere karşı bitki direncinin uyarılması üzerinde humik maddelerin hazırlama etkisine değinmiştir [52], [53].

Humik maddeler, *Trichoderma* gibi biyolojik mücadele aracı olan mikroorganizmaların oluşumunu iyileştirerek ve konsantrasyonunu artırarak dolaylı yoldan zararlılarla mücadele etmekte kullanılabilir. Bu etki, humik maddelerin ikincil bitki metabolizmasını etkileme, daha yüksek fenolik bileşik verimini teşvik etme ve sonuç olarak biyolojik kontrol için büyük ilgi çeken bir özellik olan uçucu yağların daha büyük bir antimikrobiyal aktivitesini teşvik etme kabiliyetine bağlanabilir [54]–[56].

2.6 Lakkaz Enzimi

Lakkazlar mantarlarda yaygın olarak bulunur. Ascomycetes ve Deuteromycetes mantarları lakkaz üretebilse de Basidiomycetes sınıfından beyaz çürüklük mantarları en verimli lakkaz üretici gruptur ve bu lakkazlar çoklu bakır oksidaz ailesinin en önemli temsilcileridir. Daha düşük mantarlar olan Zygomycetes ve Chytridiomycetes'te lakkaz aktivitesi gösterilmemiştir. Lakkazlar için çeşitli fizyolojik işlevler önerilmiştir. Mantarlarda, lakkazlar sadece lignin bozulmasına değil, aynı zamanda pigmentasyon meyve gelişimine ve patogeneze de katılır. Lakkaz ayrıca bitkilerde lignin biyosentezinde, pigment oluşumunda ve bakteriyel

sporları UV ışığına karşı korumada ve böceklerin kütikülünün sklerotizasyonunda rol almaktadır [57], [58].

Hipovirü lent *C. parasitica* izolatlarının azaltılmış lakkaz aktivitesi, doğrudan CHV1 enfeksiyonlarına atfedilen ilk biyokimyasal özelliklerden biridir. İlk kez İsviçre'de üç virü lent ve üç hipovirü lent *C. parasitica* izolatu üzerinde yapılan lakkaz incelemesinde virü lent izolatların tümünde güçlü lakkaz aktivitesi görü lürken; hipovirü lent izolatlarda lakkaz aktivitesi yarı yarıya azalmış veya hiç görü lmemiştir [59].

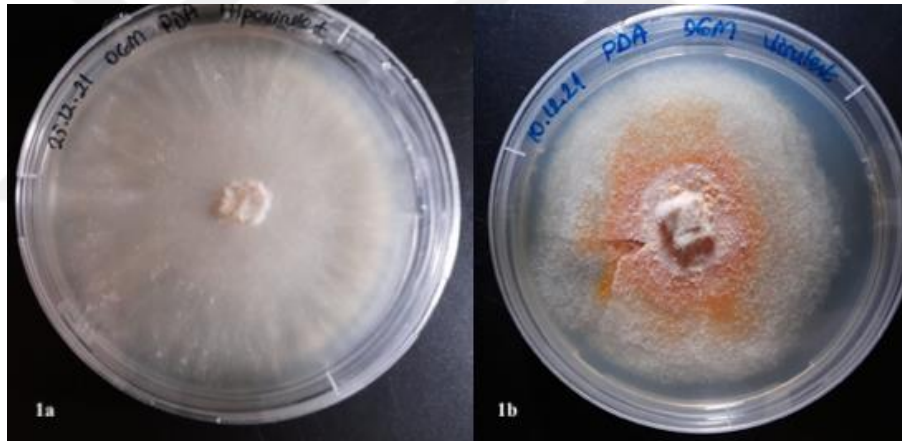
Büyü me ortamı lakkaz aktivitesi üzerinde önemli etkiye sahiptir. Katı veya sıvı ortamda yetiştirilen mantarlar morfolojik ve fizyolojik farklılıklar gösterebilir. Daha gelişmiş mantarlar öncelikle karasal organizmalar olarak evrimleştiğ inden, katı substratlar üzerinde büyü meye iyi adapte olmuşlardır, bu nedenle sıvı kültürde yetiştirme metabolik tepkilerini değ iştirebilmektedir [35], [60]. Katı veya sıvı ortamda kültürlenen mantarların fizyolojik farklılıkları, lakkazların biyosentezini ve gözlemlenen enzimatik aktivitelerinde değ işimleri etkileyebilmektedir [61]. Hipovirü lent *C. parasitica* izolatlarının sekretom analizi sonrasında PDA üzerinde büyü tülen kültürlerde lac-1 geninin ekspresyonunun arttığ ını, ancak tam sıvı ortamında büyü tülen CHV1 ile enfekte olmuş kültürlerde LAC enziminin salgılanmasının azaldığ ını göstermiştir [62]. Selofan ile kaplanmış PDA üzerinde büyü tülen CHV1 ile enfekte *C. parasitica* için lac-1 transkripsiyonunda hiçbir değ işiklik görü lmemiştir. Bu nedenle katı veya sıvı ortamda *C. parasitica* lakkaz fizyolojisine ilişkin herhangi bir sağlam sonuca varılamamıştır [63].

Farklı mantarların lakkazları, çeşitli mikoviral enfeksiyonlara farklı tepki verir. Bununla birlikte, aynı mantar türlerinin izolatlarının, lakkaz aktivitesinde kendi aralarında farklılık göstermeleri dışında, CHV1 enfeksiyonuna karşı farklı tepkilere sahip olduklarını gösterilmiştir. [64].

3.1 Materyaller

3.1.1 *Cryphonectria parasitica* İzolatları

Bu çalışmada kullanılan *C. parasitica* izolatları Tarım Orman Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü, Marmara Ormancılık Araştırma Enstitüsü tarafından 10.4803 nolu proje kapsamında sağlanmıştır. Virü lent *C. parasitica* izolatı İzmir; hipovirü lent izolat ise Bolu'daki farklı bölgelerden elde edilmiştir. Hipovirü lent izolatlar, PDA (Patates Dekstroz Agar) kültür ortamında beyaz bir morfolojiye sahip olmaları ile karakterize edilir. Virü lent izolatlar ise karakteristik turuncu bir morfolojiye sahiptir. Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 1 Çalışmada kullanılan *C. parasitica* izolatları.

(1a) PDAMB besiyerine ekilmiş hipovirü lent *C.parasitica* (1b)PDA mb besiyerine ekilmiş virü lent *C.parasitica* (Orman Genel Müdürlüğü, Marmara Ormancılık Araştırma Enstitüsü tarafınca yürütö len 10.4803 numaralı projeden alınmıştır.)

3.1.2 Kullanılan Kitler

Bu çalışmada total RNA izolasyonu için NORGEN BIOTEK CORP. Plant/Fungi Total RNA Purification Kit kullanılmıştır.

3.1.3 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Patates Dekstroz Agar "PDA" (Merck); L-metionin (Sigma-Aldrich); D-biotin (Vitamin H, Biomatik); Agaroz (Sigma-Aldrich); Etilendiamin tetraasetik asit "EDTA"(Sigma-Aldrich); TRIS (Sigma-Aldrich); Tannik asit (Sigma-Aldrich); Malt ekstrat agar (Sigma-Aldrich); Bakto-agar (Sigma-Aldrich); Potasyum fosfat monobazik (Sigma-Aldrich); Potasyum fosfat dibazik (Sigma-Aldrich); Bradford protein assay (Bio-Rad)

Güvenlik kabini (Hedlab X-bio Class II); Otoklav (Hirayama HVE-50); Hassas terazi (Shimadzu ATX224); Yatay jel elektroforez cihazı (Thermo Fisher EC250-90); Mikropipet (Eppendorf); Nanodrop (Thermo Scientific One/OneC); pH-metre (Hanna Instrument); Santrifüj (Hettich Universal 32R); UV-Spektrofotometre (Shimadzu UV-1800); Vorteks (Heidolph)

3.1.4 Kullanılan Besiyerleri

PDAMB besiyeri için 40 g PDA, 100 mg L-metionin, 1 mg biotin tartılıp cam şişe içerisine eklenmiş, distile su 1 L'ye tamamlanmıştır. 1,5 mL %20'lik laktik asit eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı ile karıştırılıp homojen bir hale dönüşünce pH'ı 4,5 olacak şekilde sabitlenmiştir. pH'sı düşürürken asetik asit kullanılmıştır. Hazırlanan besiyeri 121°C sıcaklıkta 1,5 atm basınçta 20 dk otoklavlanmıştır

Bavendamm besiyeri için 5 g tannik asit, 25 g malt ekstrat agar, 12,5 g bacto-agar tartılıp cam şişeye eklenmiştir, distile su 1 L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 121°C sıcaklıkta 1,5 atm basınçta 20 dk otoklavlanmıştır.

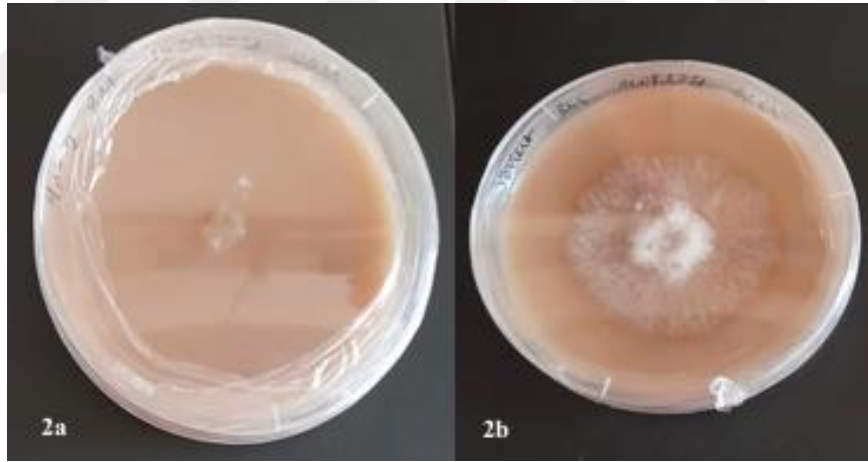
3.2 Metodlar

3.2.1 *Cryphonectria parasitica* İzolatlarının Büyütülmesi

Bu çalışmada kullanılan farklı bölgelerden gelen *C. parasitica* izolatları ayrı ayrı PDAMB besiyeri içeren 90 mm'lik petriler içerisine ekilmiştir. Inoküle edilen izolatlar bir hafta boyunca karanlıkta 22±2 °C'de büyütülmüştür. Morfolojileri gözlemlenmiştir.

3.2.2 Bavendamm Testi

Bavendamm besiyeri yüksek lakkaz aktivitesi gösteren virulent izolat ile lakkaz aktivitesinin düşük olduğu hipovirulent izolatın ayırt edilmesi için kullanılmıştır. Bavendamm testi sonuçları, Virulent ve hipovirulent izolatlar Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 2 Bavendamm besiyerinde gelişen *C. parasitica* izolatları

(2a) Bavendamm besiyerine ekilmiş hipovirulent *C.parasitica* (2b) Bavendamm besiyerine ekilmiş virulent *C.parasitica* (Orman Genel Müdürlüğü, Marmara Ormancılık Araştırma Enstitüsü tarafınca yürütülen 10.4803 numaralı projeden alınmıştır.)

3.2.3 Vejetatif Uyum Testi

Test, iki farklı bölgeden getirilen hipovirü lent ve virü lent *C. parasitica* izolatının vejetatif uyumlu olup olmadığını belirlemek için gereklidir. Bu amaçla, izolatların PDAMB ortamında saf olarak gelişen kültürlerinden bir miktar spor alınmış, yine PDAMB ortamında 1 mm aralıklarla ekilmiştir. 7 gün karanlıkta 7 gün gün ışığında inkübe edilmiştir. Eşleştirilen izolatlar arasında kuvvetli baraj zonu oluşmuşsa uyumsuz; baraj zonu oluşmayıp tek bir kültür halinde büyümüşse uyumlu izolatlar olarak değerlendirilirler. Vejetatif uyum testi sonucunda hipovirü lent ve virü lent *C. parasitica* izolatları arasında baraj zonu gözlenmemiş ve tek bir kültür halinde büyüdükleri tespit edilmiştir. İzolatların vejetatif uyumlu olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3 Virü lent ve hipovirü lent izolatların vejetatif uyum testi

(Orman Genel Müdürlüğü, Marmara Ormancılık Araştırma Enstitüsü tarafınca yürütö len 10.4803 numaralı projeden alınmıştır.)

3.2.4 Fulvik Asit ve Humik Asit Konsantrasyonlarının Hipovirülans Dönüşümüne Etkisi

CHV1'in bulaşmasını sağlamak için virüs donörü olan hipovirulent izolat ve virüs alıcısı olan virulent izolat üzerine selofan koyulmuş PDAMB besiyerinde, farklı konsantrasyonlarda (Tablo 3.1.) sadece fulvik asit veya fulvik ve humik asiti birlikte içeren PDAMB besiyeri içeren petrilerde birlikte kültüre edilmiştir. 90 mm'lik petri kaplarında, dönüştürme kabiliyetini değerlendirmek için her kombinasyon beş tekerrür halinde yapılmıştır. Hipovirülans dönüşümü gerçekleştirmek için 7 gün boyunca karanlıkta $22\pm2^{\circ}\text{C}$ 'ye, ardından 7 gün aydınlıkta inkübe edilmiştir.

Tablo 3. 1 Çalışmada kullanılan besiyerlerinin içeriği

Besiyerinin İçeriği	
Kontrol	PDAMB
50 FA	50 ppm FA+ PDAMB
75 FA	75 ppm FA+ PDAMB
150 FA	150 ppm FA+ PDAMB
300 FA	300 ppm FA+ PDAMB
50 HAFA	50 ppm HA+50 ppm FA+ PDAMB
75 HAFA	75 ppm HA+75 ppm FA+ PDAMB
150 HAFA	150 ppm HA+150 ppm FA+ PDAMB
300 HAFA	300 ppm HA+ 300 ppm FA+ PDAMB

3.2.5 Total RNA İzolasyonu

Çalışmada total RNA izolasyonu kitte belirtilen protokole göre yapılmıştır. Her bir denemeye ait petrilerden toplanmış yaklaşık 50 mg mantar örneği steril bir havan içerisinde sıvı azot ile ezerek toz haline getirilmiştir. Elde edilen tozlar 2 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmış ve üzerlerine Lysis Buffer C eklenmiştir. Vortekslendikten sonra 55°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında filtre kolonları içeren toplama tüplerine lizat eklenmiş ve 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Supernatant temiz bir tüpe alınmış ve eşit miktarda %100'lük etanol eklenmiştir. Yeni toplama tüplerine spin kolonu takılmış, elde edilen lizattan 600 µL eklenip 6000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü atılıp spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. 400 µL Wash Solution A eklenerek 1 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Bu işlem 3 kez uygulanmıştır. Sonrasında spin kolonu yeni tüplere alarak üzerine 100 µL Elution Solution A eklenmiştir. 2000 rpm'de 2 dk ve ardından 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Tüpte toplanan sıvı saflaştırılmış RNA örneği -20°C'de saklanmıştır.

3.2.6 Jel Elektroforezi

Elde edilen total RNA'ları görüntülemek için %1'lik agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Agaroz jel için, 0,4 g agaroz üzerine 40 ml 1x TBE'nin eklenmiş ardından mikrodalga fırında 2,5 dakika kaynatılması ile çözünmesi sağlanmıştır. Jel yaklaşık 60 °C sıcaklığa düştükten sonra karışıma 3 µl etidyum bromür eklenmiştir. Elektroforez jel kalıbına uygun tarak yerleştirilip dökülen jel donmaya bırakılmıştır. Jel donduktan sonra tarak çıkarılıp 1x TBE içeren tankın içine bırakılan jelin kuyucuklarına 3 µl RNA marker, 5 µl RNA yükleme boyası ile karıştırılan PCR ürünleri yüklenmiş 90 voltta 20 dakika boyunca yürütülmüştür. Bu süre sonunda jel UV ışık altında jel görüntüleme cihazında görüntülenmiş ve elde edilen görüntü üzerinden bandların büyüklükleri üzerinden değerlendirmeler yapılmıştır.

3.2.7 Real-time qPCR

RT-qPCR ile lac1 geninin ekspresyon analizi Ardi Medical tarafından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

RT-qPCR tekniğinde RNA üzerinden “Reverse Transkriptaz” enzimi ile cDNA sentezlenir ve bu gene özgül primerler ile PCR gerçekleştirilir. Bir genin eksprese olup olmaması veya farklı örneklerin ekspresyonları karşılaştırılabilir. İlgilenilen genin ekspresyon düzeyinin incelenmesi için fizyolojik ve patolojik koşullarda ekspresyonu değişmeyen bir genin ürünü mRNA ile normalize edilmesi gerekir. Bu amaçla kullanılan genlere Housekeeping gen denir [65].

RT-qPCR için kullanılan SensiFAST™ SYBR® No-ROX One-Step Kit ile RNA’dan cDNA eldesi ve amplifikasyonu aynı tüp içerisinde gerçekleştirilmiştir. İlgilenilen yani hedef gen lakkaz genleri arasından lac1; referans gen 18S rRNA’dır. Lakkaz varlığının tespiti için kurulan reaksiyonda RNA’ların hepsi 100ng/μl olacak şekilde normalize edilip total hacim 2 μl olacak şekilde kit ile hazırlanan PCR tüplerinde real time PCR cihazına yüklenmiştir. 11 farklı örnek 3 tekerrür olarak çalışılmıştır. İki farklı grup; fulvik veya humik asit içermeyen besiyerinde büyütülen hipovirülans dönüşüme uğrayan örnekler ile sadece virülans *C. parasitica* örnekleri kontrol olarak seçilmiştir. Göreceli gen ekspresyonu analizi için aşağıda basamakları verilen ve yaygın olarak kullanılan Livak metodu uygulanmıştır [66]. Denklemler kullanılarak elde edilen lac1 ekspresyon oranlarındaki değişimler karşılaştırılmıştır.

1. Hem test örneği hem de kalibratör örneği için hedef genin Cq’si referans gene göre normalize edilir.

$$\Delta Cq_{(test)} = Cq_{(hedef, test)} - Cq_{(ref, test)}$$

$$\Delta Cq_{(kalibratör)} = Cq_{(hedef, kalibratör)} - Cq_{(ref, kalibratör)}$$

2. Test örneğinin ΔCq değerini kalibratörün ΔCq değerine normalize edilir.

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{(test)} - \Delta Cq_{(kalibratör)}$$

3. Ekspresyon oranı hesaplanır.

$$2^{-\Delta\Delta Cq} = \text{Ekspresyon oranı}$$

Lakkaz ve 18S rRNA için kullanılan primerler aşağıdaki Tablo 3.2’de verilmiştir. Reaksiyonun termal koşulları Tablo 3.3’te verildiği gibidir.

Tablo 3. 2 Real-time qPCR için kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Sekansı	
18S rRNA- fwd	5'-ATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGA-3'	Forward
18S rRNA- rev	5'-CTCGCTGGCTCTGTCAGTGTAG-3'	Reverse
CpLac-RT-fwd	5'ATCCAGATTGACGGTCCTGC-3'	Forward
CpLac-RT-rev	5'-TCTCAGGCGATGTCTCTTGC-3'	Reverse

Tablo 3. 3 Real time qPCR reaksiyonunun termal koşulları

	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Hazırlık	1	45°	10 dk
Ön Denatürasyon	1	95°	2 dk
Denatürasyon	40	95°	5 sn
Primerlerin bağlanması		55°	10 sn
Uzama		72°	5 sn

3.2.8 Total Protein Ekstraksiyonu

Aktivite deneylerinde kullanılacak protein ekstraktlarını hazırlamak için petrilerden toplanmış mantar örnekleri RNAaz'dan arındırılmış steril havanlarda sıvı azot ile toz haline getirilmiş ve 2 mL'lik tüpler içerisine alınmıştır. 100mM potasyum fosfat tamponu, 0,1 mM EDTA içeren soğuk ekstraksiyon tamponu (pH:7) hazırlanmıştır.[67] Her bir tüpe 1500 μ l soğuk ekstraksiyon tamponu eklenmiştir. 18000 g 4°C'de 22 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant farklı bir tüpe alınmıştır. Protein stabilizasyonunun sağlanması için 4°C'de saklanmıştır.

3.2.9 Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Bradford yöntemi, Coomassie Brilliant Blue adı verilen G-250 boyasının proteinlerde bulunan arjinin, triptofan, tirozin, histidin ve fenilalanin gibi amino asit rezidülerine bağlanması sonucu mavi renkli kompleks oluşturması esasına dayanan spektrofotometrik bir yöntemdir. Renklendirilmiş çözeltinin absorbanansı 595 nm'de ölçülür [68].

Bovine serum albumin (BSA) standartları sırasıyla 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,5 ; 2 ve total protein ekstraktlarından 5 μ L alınarak, üzerine 250 μ L Bradford boyası eklenmiş ve pipet ucu ile karıştırılarak 5 dk karanlıkta oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonasında örnekler mikrolatelere alınarak 595 nm'de mikrolaka okuyucuda absorbanları okunarak kaydedilmiştir. Kör olarak örnekle aynı miktarda soğuk ekstraksiyon tamponu kullanılmıştır.

3.2.10 Lakkaz Enzim Aktivitesi

250 mL distile su içeren cam şişe içerisine 0,41 g sodium asetat ve 1,98 g asetik asit eklenmiş çözeltinin pH'ı 3,5 olan Sodyum asetat tamponu hazırlanmıştır. 13,72 mg ABTS tartılıp 500 µL sodium asetat tampon hazırlanmıştır. Kristal küvet içerisine sırasıyla 100 µL protein çözeltisi, 50 µL ABTS çözeltisi, 850 µL sodyum asetat tampon eklenmiştir. Spektrofotometrede 418 nm'de sıfıncı ve üçüncü dakikada absorbans alınmıştır.

Absorbans değişim değerleri ile aşağıda verilen denklem (1) kullanılarak enzim aktivitesi (U/mL) hesaplanmıştır [69]. Her bir örnek için enzim aktivitesi aynı örneğin protein miktarı (mg/mL) değerine bölünerek 1mg proteinin spesifik aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\text{Enzim Aktivitesi} \left(\frac{U}{mL} \right) = (\Delta Abs_{418} \cdot V_t \cdot 10^3) / (\epsilon \cdot d \cdot V_e \cdot t) \quad (1)$$

ΔAbs = Absorbansdaki artış,

V_t = Toplam hacim (mL)

ϵ = ABTS substratının molar ekstinksiyon katsayısı ($36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

V_e = Enzim hacmi (mL)

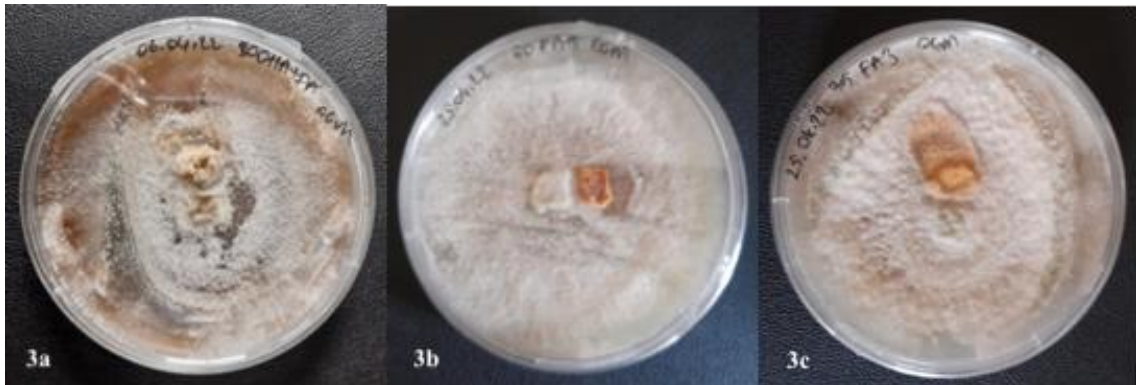
t = Süre

4.1 Sonuçlar

Çalışma Orman Genel Müdürlüğü, Marmara Ormancılık Araştırma Enstitüsü tarafınca yürütülen 10.4803 numaralı projesi kapsamında Bolu ilinden gelen hipovirulent ve İzmir ilinden gelen virulent *C. parasitica* izolatları ile yapılmıştır. Fulvik asit ve humik asitin hipovirülans dönüşümüne etkisi; morfolojik, lac1 gen transkripsiyonu ve lakkaz enzim aktivitesindeki değişimler ile değerlendirilmiştir.

4.1.1 Sonuçların Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

Beyaz kültür morfolojisinin hipovirülans dönüşümün kriteri olarak alındığında farklı konsantrasyonlarda fulvik asit ile fulvik + humik asit içeren besiyerlerinde birlikte kültüre edilen virulent ve hipovirulent izolatların inkübasyonu sonrası beyaz hiflenmeler görülmüştür. Şekil 4.1'de 50 ppm ve 75 ppm fulvik asit içeren; 300 ppm fulvik asit ve humik asit içeren besiyerlerinde dönüşümü sağlanmış örneklerin inkübasyon sonucu gösterilmiştir. Bavendamm testi ile dönüştürülmüş örneklerin hipovirülanslığı doğrulanmıştır . Şekil 4.2'de 75 ppm fulvik asit ve 75 ppm fulvik asit+humik asit içeren besiyerinde dönüştürülmüş örnekler ile fulvik ve humik asit içermeyen besiyerinde büyütülen virulent izolatların Bavendamm test sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 4. 1 Farklı içeriğe sahip besiyerlerinde gerçekleştirilmiş hipovirülans dönüşümün 14 günlük inkübasyonu

(3a) 300 ppm fulvik ve humik asit içeren PDAMB (3b) 50 ppm fulvik ve humik asit içeren PDAMB (3c) 75 ppm fulvik asit içeren PDAMB



Şekil 4. 2 Bavendamm testi sonuçları

(4a) 0 ppm besiyerinde büyütülen virulent izolat (4b) 75 ppm fulvik asit içeren besiyerinde dönüştürülmüş virulent ve hipovirulent izolatlar (4c) 75 ppm fulvik asit ve humik asit içeren besiyerinde dönüştürülmüş virulent ve hipovirulent izolatlar

4.1.2 Hipovirülans Dönüşümün Lac1 Gen Transkripsiyon Seviyesi ile Değerlendirilmesi

4.1.2.1 Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu sonrası yapılan jel elektroforezinde hipovirulent izolat ve farklı konsantrasyonlarda sadece fulvik asit ile fulvik + humik asit içeren PDAMB besiyerlerinde büyütülmüş örneklerde aynı seviyelerde bant oluşumu saptanmıştır. Hipovirulent ve dönüştürülmüş örneklerdeki RNA'nın degrade olmadığı görülmüştür. Jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.3'te verilmiştir.



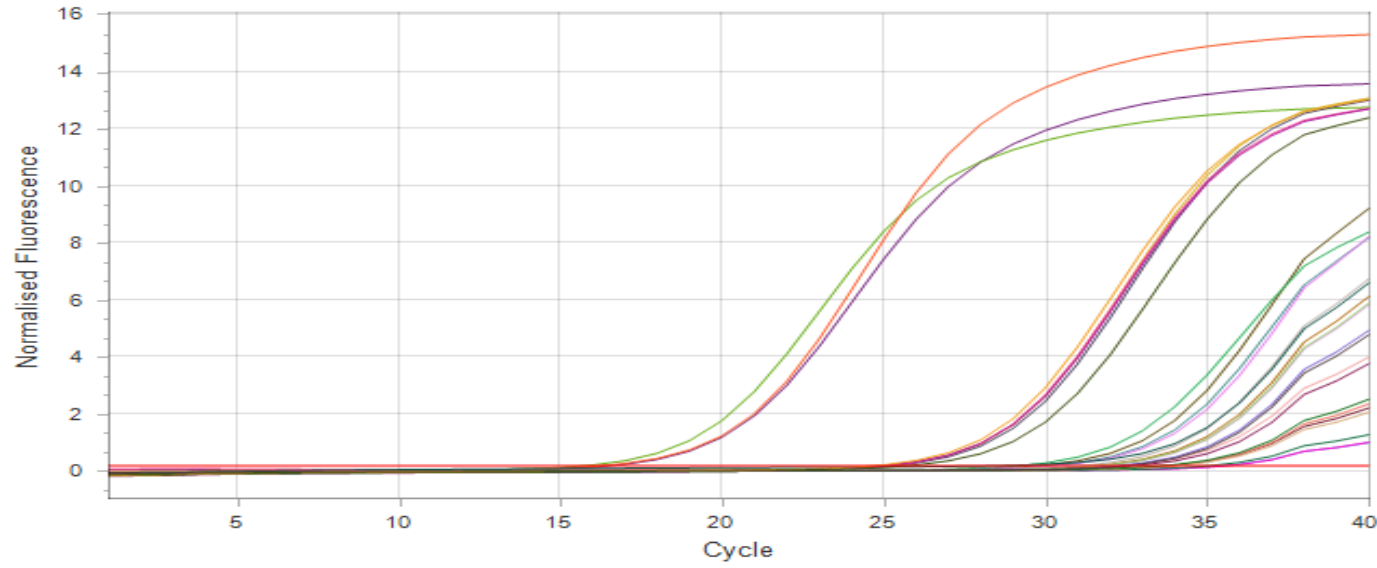
Şekil 4. 3 Örneklerden elde edilen total RNA'nın jel elektroforez görüntüsü

(1) Virü lent,(2) Hipovirü lent, (3) Kontrol-0 ppm, (4) 50 ppm HAFA, (5) 75 ppm HAFA, (6)150 ppm HAFA, (7) 300 ppm HAFA; (8) 50 ppm FA, (9) 75 ppm FA, (10) 150 ppm FA, (11) 300 ppm FA

4.1.2.2 Real Time qPCR ile lac1 Gen Transkripsiyon Seviyelerinin Belirlenmesi

RT-qPCR tekniği kullanılarak elde edilen Cq değerleri Livak metoduna göre hesaplanıp lakkaz geninin ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. lac1 geninin amplifikasyon eğrisi Şekil 4.4'te verilmiştir.

Sonuçların değerlendirilmesi iki farklı kontrol grubu kullanılarak yapılmıştır. Bunlar; fulvik asit ve humik asit içermeyen besiyerinde büyütülen virü lent *C. parasitica* izolat ile aynı besiyeri ortamında hipovirü lant dönüşümü gerçekleşmiş *C. parasitica* izolatına ait sonuçlardır.

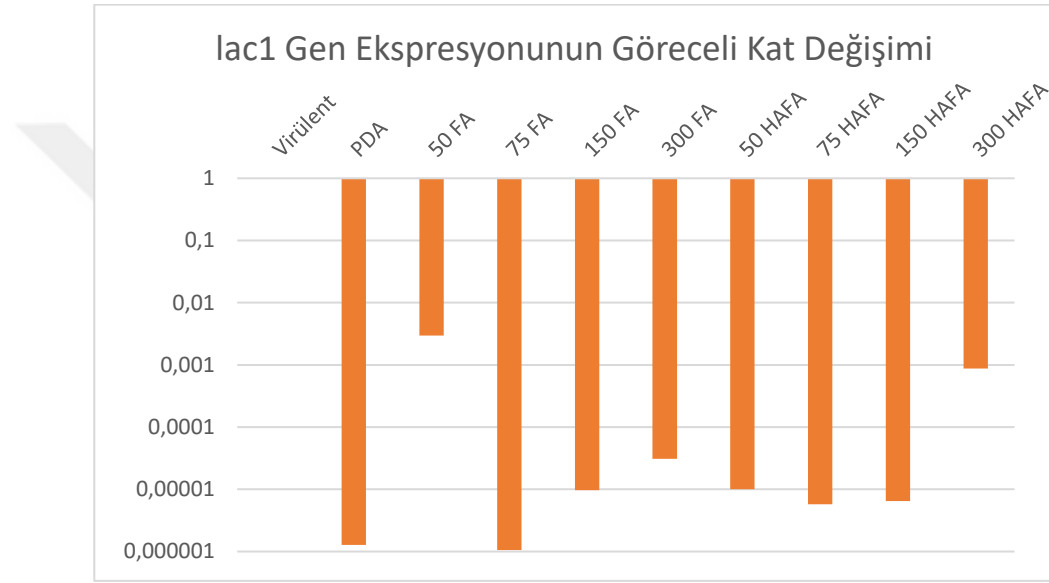


Şekil 4. 4 lac1 geninin Real-time qPCR amplifikasyon eğrileri

Virü lent 1	Hipovirü lent 1	PDA 1	50 FA 1	75 FA 1	150 FA 1	300 FA 1
Virü lent 2	Hipovirü lent 2	PDA 2	50 FA 2	75 FA 2	150 FA 2	300 FA 2
Virü lent 3	Hipovirü lent 3	PDA 3	50 FA 3	75 FA 3	150 FA 3	300 FA 3
			50 HAFA 1	75 HAFA 1	150 HAFA 1	300 HAFA 1
			50 HAFA 2	75 HAFA 2	150 HAFA 2	300 HAFA 2
			50 HAFA 3	75 HAFA 3	150 HAFA 3	300 HAFA 3

Kontrol grubu olarak fulvik asit ve humik asit içermeyen besiyerinde büyütülen virulent izolatın ekspresyon seviyesi 1 olarak kabul edildiğinde; dönüşümü gerçekleşmiş tüm örneklerde lac1 geninin downregüle olduğu görülmüştür. Şekil 4.5'te lac1 gen ekspresyon seviyeleri grafik olarak verilmiştir.

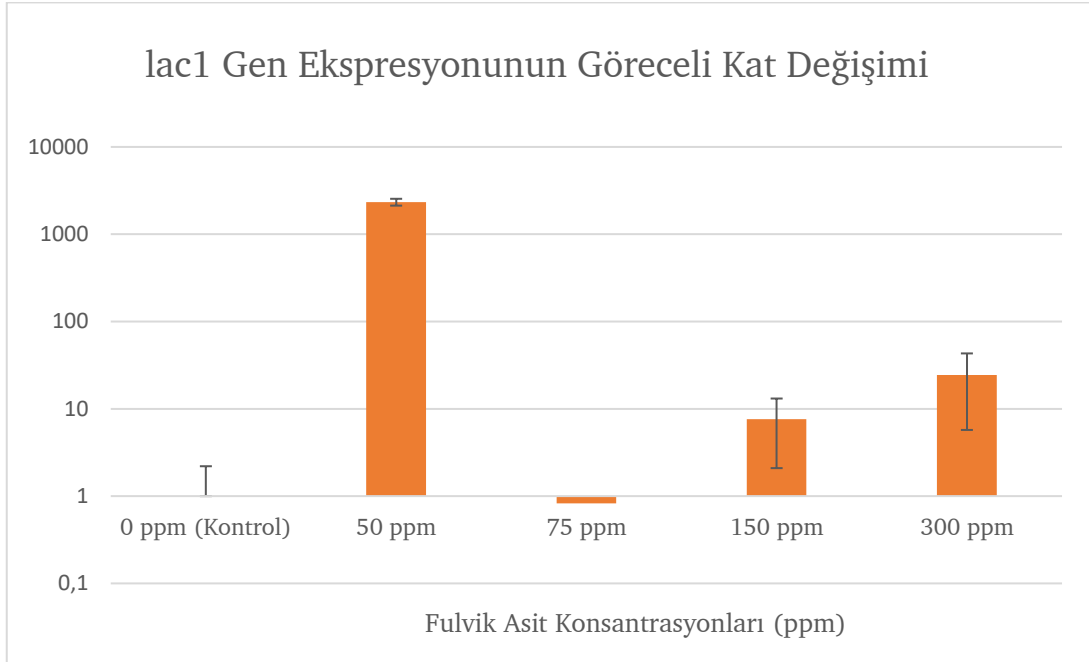
Ekspresyon seviyelerindeki azalma değerlendirildiğinde; en fazla azalmanın sırasıyla 75 ppm ve 0 ppm fulvik asit içeren besiyerinde, en az düşüşün ise 50 ppm fulvik asit ile 300 ppm fulvik + humik asit içeren besiyerlerinde olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4. 5 Farklı fulvik asit ve fulvik asit+ humik asit konsantrasyonlarında hipovirülans dönüşüme uğramış örneklerin lac1 gen ekspresyon seviyelerinin virülens örnek ile karşılaştırılması (Grafik, logaritmik ölçekte çizilmiştir.)

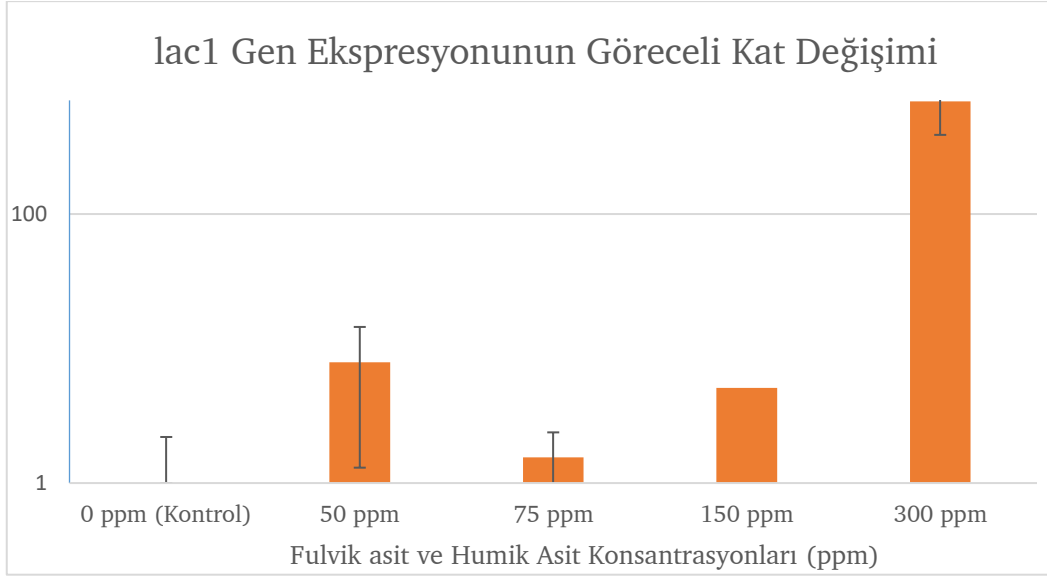
Hipovirülans dönüşümde besiyerine ilave edilen fulvik ve humik asidin etkilerini değerlendirmek için, sonuçlar fulvik asit ve humik asit içermeyen (0 ppm) besiyerindeki dönüşüme uğramış örneklerle ait sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. 0 ppm besiyeri örneklerindeki lac1 ekspresyon kat sayısı “1” olarak alınmıştır. lac1 gen ekspresyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında 50 ppm fulvik asit, 150 ppm fulvik asit ve 300 ppm asit fulvik + humik asit içeren besiyerinde büyütülen hipovirülans dönüşüm geçiren örneklerin gen ekspresyonlarının upregüle; 75 ppm fulvik asit içeren besiyerinde büyütülen örneğin gen ekspresyonunun ise downregüle olduğu görülmüştür. Kontrol grubunun ekspresyonu ile oranlandığında lakkaz gen ekspresyonları yaklaşık olarak 50 FA grubunda 2336

kat, 150 FA grubunda 7 kat, 300 FA grubunda ise 24 kat artmışken; 75 FA grubunda 0,80 kat azalmıştır. Şekil 4.6'da farklı fulvik asit konsantrasyonlarında lac1 gen ekspresyonunun göreceli kat değişimi gösterilmiştir.



Şekil 4. 6 Farklı fulvik asit konsantrasyonlarında dönüşüme uğramış örneklerin lac1 gen ekspresyon seviyeleri (Grafik, logaritmik ölçekte çizilmiştir.)

Fulvik asit ve humik asit konsantrasyonları eklenmiş PDAMB besiyerlerinde dönüşümün gerçekleştiği tüm örneklerin lac1 gen ekspresyonları kontrol grubuna oranla upregüle olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslandığında lac1 ekspresyonları yaklaşık olarak 50 HAFA'da 8 kat; 75 HAFA'da 1,5 kat; 150 HAFA'da 5 kat; 300 HAFA'da ise 687 kat artış göstermiştir. 300 ppm'lik asit fulvik ve humik asit varlığında gen ekspresyonunda büyük bir artış gözlenirken; 75 ppm'lik fulvik asit ve humik varlığında ekspresyon artışı çok az olmuştur. Şekil 4.7'de farklı asit fulvik ve humik asit konsantrasyonlarında lac1 gen ekspresyonunun göreceli kat değişimi gösterilmiştir.

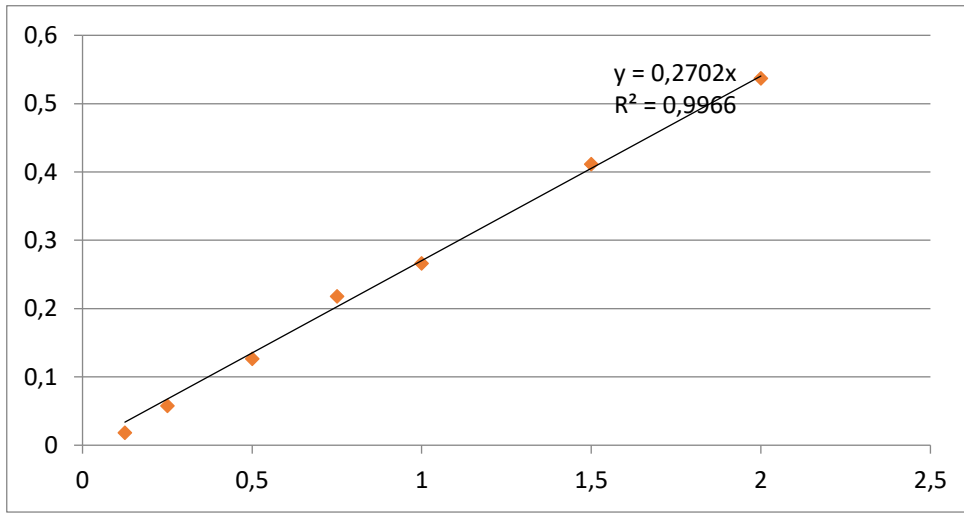


Şekil 4. 7 Farklı fulvik asit ve humik asit konsantrasyonlarında dönüşüme uğramış örneklerin lac1 gen ekspresyon seviyeleri (Grafik, logaritmik ölçekte çizilmiştir.)

4.1.3 Hipovirülans Dönüşümün Lakkaz Enzim Aktivitesi ile Değerlendirilmesi

4.1.3.1 Total Protein Miktarları

Besiyerine farklı konsantrasyonlarda fulvik asit ya da fulvik + humik asit ilavesinin hipovirülans dönüşüme etkisini lakkaz enzim miktarı ve aktivitesindeki değişimler ile belirlemek için öncelikle total protein tayini yapılmıştır. Bovine serum albümin standartları kullanılarak çizilen Bradford standart eğrisinden (Şekil 4.8) elde edilen denklem kullanılarak total protein ekstraksiyonu ile elde edilen ekstratların protein miktarları hesaplanmıştır. Tablo 4.1’de her bir örnek grubunun protein miktarı yer almaktadır. Protein miktarları lakkaz enzim aktivitesinin hesaplanması için kullanılmıştır.



Şekil 4. 8 Bradford standart eğrisi

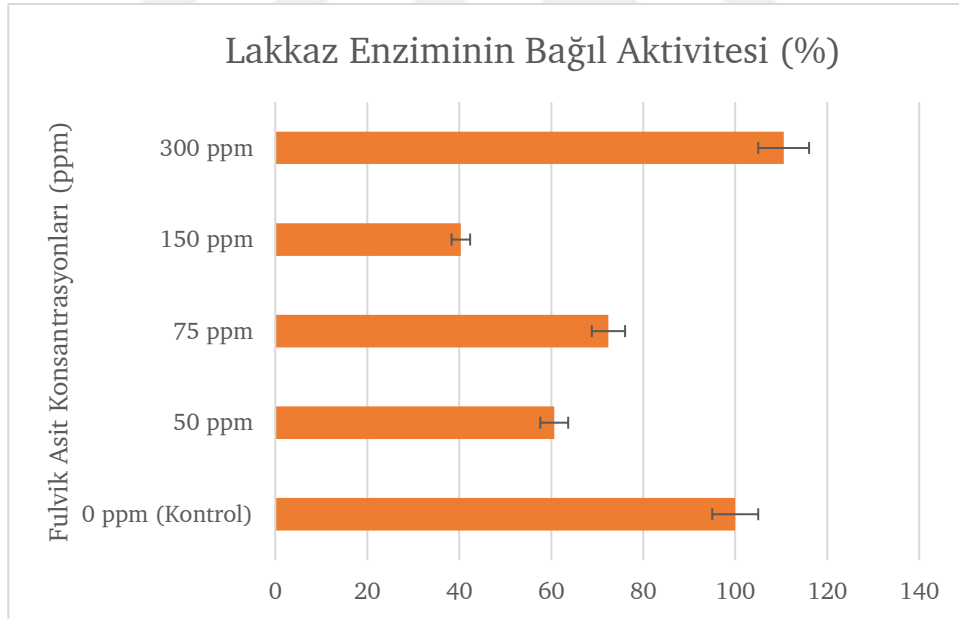
Tablo 4. 1 Humik ve fulvik asit içeren besiyerinde gelişen dönüşümü gerçekleştiren *C. parasitica*'ya ait total protein miktarları (mg/ml)

Örnek Grubu	Protein Miktarı (mg/ml)
Kontrol (0 ppm)	0,379965
50 FA	0,204787
75 FA	0,191216
150 FA	0,34789
300 FA	0,262768
50 HAFA	0,521836
75 HAFA	0,924007
150 HAFA	0,303479
300 HAFA	0,699482

4.1.3.2 Lakkaz Enziminin Bağlı Aktivitesi

Her bir örnek için enzim aktivitesi (U/mL) hesaplandıktan sonra aynı örneğin Bradford metodu ile elde edilen protein miktarına (mg/mL) bölünmesi sonucu elde edilen değer enzimin spesifik aktivitesidir. Kontrol yani fulvik ve humik asit içermeyen PDAMB besiyerinde hipovirülans dönüşümü gerçekleşen *C. parasitica*'ya ait örneğin spesifik aktivitesi %100 aktivite gösterdiği kabul edilerek farklı konsantrasyonlarda sadece fulvik asit ya da fulvik asit + humik asit içeren besiyerinde büyütülmüş örneklerin % bağlı aktivitesi hesaplanmıştır.

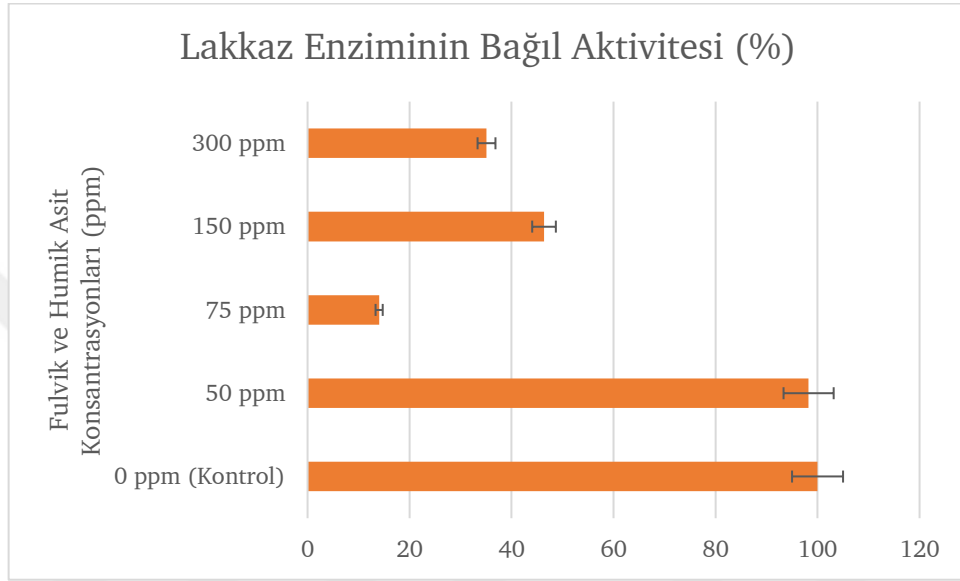
Farklı fulvik asit konsantrasyonları içeren besiyerlerinde dönüşümün gerçekleştiği örneklerin lakkaz enziminin bağlı aktivitesi Şekil 4.9'da grafik olarak verilmiştir. 300 ppm'lik fulvik asit varlığında lakkaz enziminin aktivitesinin kontrole göre arttığı (%110); diğer konsantrasyonlarda lakkaz enzim aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. En düşük lakkaz enzim aktivitesi (%40) 150 ppm fulvik asit varlığında görülmüştür.



Şekil 4. 9 Farklı fulvik asit konsantrasyonlarında dönüştürülen örneklerin lakkaz enziminin bağlı aktivitesi (%)

Farklı fulvik asit ve humik asit konsantrasyonları içeren besiyerlerinde dönüşüme uğramış örneklerin lakkaz enziminin bağlı aktivitesi Şekil 4.10'da grafik olarak verilmiştir. 50 ppm fulvik asit ve humik asit içeren besiyerinde büyütülen örneğin bağlı aktivitesi %98; 75 ppm fulvik asit ve humik asit içeren besiyerinde büyütülen

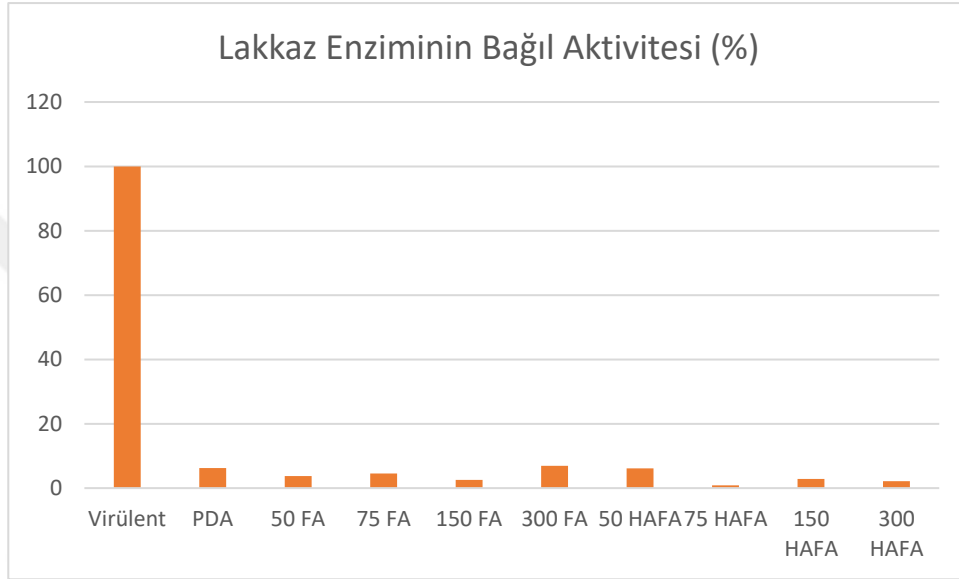
örneğin bağıl aktivitesi %14; 150 ppm humik asit ve fulvik asit içeren besiyerinde büyütülen örneğin bağıl aktivitesi %46; 300 ppm humik asit ve fulvik asit içeren besiyerinde büyütülen örneğin bağıl aktivitesi %35 olarak hesaplanmıştır. 50 ppm'lik fulvik ve humik asit varlığında enzim aktivitesi kontrole çok yakın olduğu görülmüştür. Aktivitedeki en fazla düşüş 75 ppm'lik fulvik ve humik asit varlığında görülmüştür.



Şekil 4. 10 Farklı fulvik asit ve humik asit konsantrasyonlarında dönüştürülen örneklerin lakkaz enziminin bağıl aktivitesi (%)

Virüレント *C. parasitica*'nın lakkaz aktivitesinin her zaman hipovirüレント *C.parasitica*'dan fazla olması gerektiğinden sonuçların kontrolünü sağlamak için besiyerinde fulvik ve humik asit bulunmayan virüレント izolatın da enzim aktivitesi hesaplanarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu olan virüレント izolatın lakkaz enzim aktivitesi %100 olarak alındığında; 0 ppm'lik fulvik asit içeren besiyerinde dönüşümü sağlanmış örneğın bağıl aktivitesi %6, 50 ppm'lik fulvik asit içeren besiyerinde dönüşümü sağlanmış örneğın bağıl aktivitesi %4, 75 ppm'lik fulvik asit içeren besiyerinde dönüşümü sağlanmış örneğın bağıl aktivitesi %5, 150 ppm'lik fulvik asit içeren besiyerinde dönüşümü sağlanmış örneğın bağıl aktivitesi %3, 300 ppm'lik fulvik asit içeren besiyerinde dönüşümü sağlanmış örneğın bağıl aktivitesi %7 olarak hesaplanmıştır. Aktivitedeki en fazla düşüş 150 ppm fulvik asit varlığında görülmüştür.

50 ppm'lik fulvik ve humik asit içeren besiyerinde dönüşümü sağlanmış örneğin bağıl aktivitesi % 6; 75 ppm'lik humik asit+fulvik asit içeren besiyerinde dönüşümü sağlanmış örneğin bağıl aktivitesi % 1; 150 ppm'lik fulvik ve humik asit içeren besiyerinde dönüşümü sağlanmış örneğin bağıl aktivitesi % 3; 300 ppm'lik fulvik ve humik asit içeren besiyerinde dönüşümü sağlanmış örneğin bağıl aktivitesi % 2 olarak hesaplanmıştır. Aktivitedeki en fazla düşüş 75 ppm fulvik ve humik asit varlığında görülmüştür. Şekil 4.11'de grafik olarak verilmiştir.



Şekil 4. 11 Farklı humik asit ve fulvik asit konsantrasyonlarında dönüştürülen örneklerin lakkaz enziminin bağıl aktivitesi (%)

Fulvik veya humik asit gibi humik maddelerin bitki büyümesini ve gelişmesini desteklediğine dair birçok çalışma olmasına rağmen bitki patojenleri özellikle mantarlar üzerindeki etkisini araştıran çalışmaların sayısı oldukça azdır. Literatürde fulvik asit veya humik asitin *C.parasitica*'yı nasıl etkilediği hakkında sadece bir çalışmaya ulaşılabilmektedir. Riva Orman İşletme Şefliğinde kestane dal kanserinin yoğun olarak görüldüğü meşcerelerde, mantarla mücadele ve hipovirulent gelişimin tespit edildiği alanlardaki toprakta humik madde içeriği ve miktarı üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda mantar ile mücadele edilen ve hipovirulent gelişimin tespit edildiği alanlarda humik madde miktarının kanserin yoğun olduğu bölgelere göre daha fazla olduğu bildirilmiştir[11]. Bu veriden yola çıkılarak yapılan bu çalışmada farklı fulvik asit ile fulvik ve humik asit konsantrasyonlarının hipovirülans dönüşüm üzerindeki etkisi in vitro olarak lac1

gen transkripsiyon seviyeleri ve lakkaz enzim aktivitesi ile değerlendirilmiştir. Literatürde virulent *C. parasitica*'nın lakkaz ekspresyonu ve aktivitesinin hipovirulent *C. parasitica*'dan fazla olduğu gösterilmiştir. Bunun aksine fulvik veya humik asitlerin lakkaz üretimi veya aktivitesine dair herhangi bir bilgiye rastlanılmamıştır. 0 ppm fulvik asit içeren besiyerinde hipovirülans dönüşümü gerçekleşmiş *C. parasitica* kontrol grubu olarak seçildiğinde lac1 gen ekspresyonu sadece 75 ppm fulvik asit içeren besiyerinde hipovirülans dönüşümü sağlanmış *C. parasitica* izolatında downregüle olmuşken; diğer farklı konsantrasyonlarda fulvik ile fulvik+humik asit içeren besiyerlerinde dönüşümü gerçekleşen örneklerin tümünde upregülasyon tespit edilmiştir. Kontrol grubu 0 ppm olarak alındığında lakkaz enzim aktivitesi, 300 ppm fulvik asit haricinde tüm fulvik ile fulvik+humik asit konsantrasyonlarında azalmıştır. En az enzim aktivitesi 75 ppm fulvik+humik asit içeren besiyerinde hipovirülans dönüşümü sağlanmış *C. parasitica*'da görülmüştür. lac1 gen transkripsiyonu ve lakkaz enzim aktivitesi arasındaki sonuçların farklılığı lakkaz enziminin lac1, lac2 ve lac3 gibi farklı genler ile kontrol ediliyor olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Literatürde humik madde ile muamele edilmiş topraklarda *Phythium ultimum* ile enfekte edilmiş bezelye bitkilerinin kök ağırlığı ve verimliliğinin arttığı, enfeksiyonun neden olduğu artan kök lezyonları; azalan kök uzunluğu ve yan kök sayısının humik maddelerin varlığında iyileşme gösterdiği rapor edilmiştir. [70].

Loffredo ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmada da, farklı konsantrasyonlarda fulvik ve humik asitlerin bitki patojeni olan *S. sclerotiorum*'u inhibe ederek, büyüme hızını geriletmediği farklı olarak antagonist *Trichoderma viride* ve *Trichoderma harzianum*'un büyümesini desteklediği gösterilmiştir. *S. sclerotiorum*'un inhibisyonunda komposttan elde edilen humik maddelerin toprakta bulunan humik maddelerden daha etkili olduğu görülmüştür. Çalışma da humik maddelerin kökeninin, yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin ve COOH grup içeriğinin mantarlar üzerindeki humik madde aktivitesini kontrol ettiği belirtilmiştir. [71].

Diğer çalışmalarda da benzer şekilde humik madde uygulamalarının bitki patojeni *Verticillium dahliae* ile enfekte olmuş domates, biber ve patlıcan [72] ve *Fusarium*

oxysporum f.sp. *lycopersici* ile enfekte olmuş domates bitkilerinde [73] patojenlerin neden olduğu solgunluk hastalığı şiddetini önemli oranda azalttığı, humik asitin çimlenme sürecindeki tohumların enzim aktivitelerini arttırarak çimlenmeyi teşvik ettiği ve arttırdığı belirtilmiştir. Sonuçlar rizosferde organik olarak bulunan humik maddelerin, ekonomik değeri yüksek olan bitkileri koruma çalışmalarına yardımcı olabileceğini göstermiştir[72].

Bu çalışmada da 75 ppm'lik fulvik asit varlığında lac1 gen transkripsiyonunun düşmesi aynı zamanda lakkaz enzim aktivitesindeki azalmanında gözlenmiş olması ve bunun morfolojik bulgularla desteklemesi ile hipovirülans özelliğin kazanılmasında 75 ppm'lik fulvik asit varlığının önemli olabileceğini düşündürmüştür.

4.2 Öneriler

Fulvik asit ve humik asitin hipovirülans dönüşüme olan etkisinin lakkaz enzimi üzerinden araştırıldığı bu çalışmada hipovirülans dönüşümü gösteren lakkaz enzimi üzerinden yapılan değerlendirmede 75 ppm'lik fulvik asit içeren besiyerinin dönüşüme katkı sağladığına ait veriler elde edilmiştir. Bununla birlikte diğer uygulamalarda lac1 gen transkripsiyonu ile lakkaz enzim aktivite sonuçları arasındaki benzer sonuçlar olmadığı belirlenmiştir. Bunun nedeni intraselüler ve ekstraselüler lakkazların varlığından kaynaklanabilir. Bu nedenle lac1, lac2 ve lac3 genlerinin de transkripsiyon seviyesi araştırılmalıdır. Elde edilen sonuçlarında doğruluğu ve güvenilirliği için yeni araştırmaların yapılması gereklidir.

- [1] R. James Cook, "Making Greater Use of Introduced Microorganisms for Biological Control of Plant Pathogens," *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 31, pp. 53–80, 1993.
- [2] H. Özaktan, Y. Aysan, F. Yıldız, and P. Kınay, "Fitopatolojide Biyolojik Mücadele," *Türk. biyo. müc. derg.*, vol. 1, no. 1, pp. 61–78, 2010.
- [3] A. Heydari and I. J. Misaghi, "The role of rhizosphere bacteria in herbicide-mediated increase in *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling damping-off," *Plant Soil*, vol. 257, no. 2, pp. 391–396, 2003, doi: 10.1023/A:1027330215553.
- [4] K. Ok and Y. Z. Tengiz, "Türkiye ' de Odun Dışı Orman Ürünlerinin Yönetimi," 2017, no. April 2021.
- [5] N. K. Van Alfen and P. Kazmierczak, "Hypovirulence," *Encycl. Virol.*, pp. 574–580, Jan. 2008, doi: 10.1016/B978-012374410-4.00564-1.
- [6] S. Prospero, M. Conedera, U. Heiniger, and D. Rigling, "Saprophytic Activity and Sporulation of *Cryphonectria parasitica* on Dead Chestnut Wood in Forests with Naturally Established Hypovirulence," *Phytopathology*, vol. 96, no. 12, pp. 1337–1344, Dec. 2006, doi: 10.1094/PHYTO-96-1337.
- [7] G. H. Choi and D. L. Nuss, "Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA," *Science*, vol. 257, no. 5071, pp. 800–803, 1992, doi: 10.1126/SCIENCE.1496400.
- [8] J. A. Glaeser, "Mycological Society of America," *IMA Fungus*, vol. 2, no. 2, pp. 49–50, 2011, doi: 10.1080/00275514.1942.12020904.
- [9] F. H. Frimmel and R. . Christman, "Humic substances and their role in the environment," 1993. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB9114298> (accessed Jun. 15, 2022).
- [10] A. Kłeczek and A. Anielak, "Humic substances and significance of their application – a review," *Tech. Trans.*, pp. 1–14, 2021, doi: 10.37705/techtrans/e2021012.
- [11] M. Özdemir, M. Tandoğan, A. Gürel, V. Aslan, and A. Tutar, "Riva Orman İşletme Şefliği Şefliği (İstanbul) Kestane Meşcerelerinde Görülen Hipovirulent Kestane Dal Kanseri (*Cryphonectria parasitica* (Murill) Barr) Gelişiminin Bazı Meşcere Özellikleri ve Humik Madde Açısından Değerlendirilmesi," 2014. Accessed: Aug. 15, 2022. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/322715464_Riva_Orman_Isletme_Sefligi_Sefligi_Istanbul_Kestane_Mescerelerinde_Gorulen_Hipovirulent_Kestane_Dal_Kanseri_Cryphonectria_parasitica_Murill_Barr_Gelisiminin_Bazi_Mescere_Ozellikleri_ve_Humik_Madde_Ac
- [12] Okan Taner, Köse Coşkun, Aksoy Elif Başak, Köse Nesibe, And Wall Jeffrey R., "Türkiye'de Kestane (*Castanea Sativa* Mill.) Ve Kullanımı Üzerine Geleneksel Terimler," *Avrasya Terim Derg.*, 2017, Accessed: Jun. 15, 2022. [Online]. Available: <https://Dergipark.Org.Tr/En/Download/Article->

- [13] Bellini Elvio and Vannacci Giovanni, "Chestnut (*Castanea sativa*): a Multipurpose European Tree. Workshop Proceedings, Bruxelles, September 30, 2010," 2010, Accessed: Jun. 16, 2022. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/280644365_Chestnut_Castanea_sativa_a_Multipurpose_European_Tree_Workshop_Proceedings_Bruxelles_September_30_2010
- [14] M. Conedera, W. Tinner, P. Krebs, D. de Rigo, and G. Caudullo, "Castanea sativa in Europe: distribution, habitat, usage and threats," *Eur. Atlas For. Tree Species*, p. e0125e0+, 2016.
- [15] "FAOSTAT." <https://www.fao.org/faostat/en/#data> (accessed Jun. 16, 2022).
- [16] K. F. Baker, "Evolving Concepts of Biological Control of Plant Pathogens," *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 25, no. 1, pp. 67–85, Sep. 1987, doi: 10.1146/ANNUREV.PY.25.090187.000435.
- [17] R. J. Cook, "Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens," *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 31, pp. 53–80, 1993, doi: 10.1146/ANNUREV.PY.31.090193.000413.
- [18] A. Heydari and M. Pessarakli, "A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists," *J. Biol. Sci.*, vol. 10, no. 4, pp. 273–290, 2010, doi: 10.3923/JBS.2010.273.290.
- [19] P. J. Anderson and H. W. Anderson, "Chestnut Blight Fungus and A Related Saprophyte," 1913, doi: 10.3/JQUERY-UI.JS.
- [20] M. BARR, "The Diaporthales in North America with Leuphasis on Gnomonia and Its Segregates," *Diaporthales North Am. With Leuphasis Gnomonia Its Segreg.*, 1978.
- [21] U. Heiniger and D. Rigling, "Biological Control of Chestnut Blight in Europe," *undefined*, vol. 32, pp. 581–599, 1994, doi: 10.1146/ANNUREV.PY.32.090194.003053.
- [22] S. Prospero and D. Rigling, "Infectious Forest Diseases," in 2013, Accessed: Aug. 19, 2022. [Online]. Available: https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=_YtcBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&ots=9IZwEN9tOY&sig=3tEluBoyHsS4LRqAgV7_F0lQqcs&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- [23] J. D. Diller, "Chestnut Blight," 1965. https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=286tBAG0WB8C&oi=fnd&pg=PA3&dq=related:xw70qTF6CacJ:scholar.google.com/&ots=pomc hwd5Vh&sig=tUb7zoewmhajtYzHihZROAEmLz8&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false (accessed Aug. 16, 2022).
- [24] U. Heiniger and D. Rigling, "Application of the cryphonectria hypovirus (Chv-1) to control the chestnut blight, experience from Switzerland," *Acta Hortic.*, vol. 815, pp. 233–246, Mar. 2009, doi: 10.17660/ACTAHORTIC.2009.815.31.

- [25] S. F. Bryner, S. Prospero, and D. Rigling, "Dynamics of cryphonectria hypovirus infection in chestnut blight cankers," *Phytopathology*, vol. 104, no. 9, pp. 918–925, 2014, doi: 10.1094/PHYTO-03-13-0069-R.
- [26] S. L. Anagnostakis, "Biological control of chestnut blight," *Science (80-.)*, vol. 215, no. 4532, pp. 466–471, 1982, doi: 10.1126/science.215.4532.466.
- [27] M. K. Roane, "Chestnut blight, other Endothia diseases, and the genus Endothia.", Accessed: Aug. 16, 2022. [Online]. Available: <https://www.cabi.org/isc/abstract/19870615566>
- [28] P. Cortesi and M. G. Milgroom, "Genetics of vegetative incompatibility in cryphonectria parasitica," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, no. 8, pp. 2988–2994, 1998, doi: 10.1128/AEM.64.8.2988-2994.1998.
- [29] S. Biella, M. L. Smith, J. R. Aist, P. Cortesi, and M. G. Milgroom, "Programmed cell death correlates with virus transmission in a filamentous fungus," *Proceedings. Biol. Sci.*, vol. 269, no. 1506, pp. 2269–2276, Nov. 2002, doi: 10.1098/RSPB.2002.2148.
- [30] Y. C. Liu and M. G. Milgroom, "High diversity of vegetative compatibility types in Cryphonectria parasitica in Japan and China," *Mycologia*, vol. 99, no. 2, pp. 279–284, Mar. 2007, doi: 10.3852/MYCOLOGIA.99.2.279.
- [31] G. H. Choi, A. L. Dawe, A. Churbanov, M. L. Smith, M. G. Milgroom, and D. L. Nuss, "Molecular characterization of vegetative incompatibility genes that restrict hypovirus transmission in the chestnut blight fungus Cryphonectria parasitica," *Genetics*, vol. 190, no. 1, pp. 113–127, 2012, doi: 10.1534/GENETICS.111.133983.
- [32] D. X. Zhang, M. J. Spiering, A. L. Dawe, and D. L. Nuss, "Vegetative incompatibility loci with dedicated roles in allorecognition restrict mycovirus transmission in chestnut blight fungus," *Genetics*, vol. 197, no. 2, pp. 701–714, 2014, doi: 10.1534/GENETICS.114.164574/-/DC1/GENETICS.114.164574-4.PDF.
- [33] D. P. G. Short, M. Double, D. L. Nuss, C. M. Stauder, W. MacDonald, and M. T. Kasson, "Multilocus PCR Assays Elucidate Vegetative Incompatibility Gene Profiles of Cryphonectria parasitica in the United States," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 81, no. 17, pp. 5736–5742, 2015, doi: 10.1128/AEM.00926-15.
- [34] "Cryphonectria parasitica," *EPPO Bull.*, vol. 35, no. 2, pp. 295–298, Aug. 2005, doi: 10.1111/J.1365-2338.2005.00836.X.
- [35] E. Trapiello, G. González-Varela, and A. J. González, "Chestnut Blight Control by Agrochemicals in Castanea sativa under Managed Conditions," *J. Plant Dis. Prot. 2015 1223*, vol. 122, no. 3, pp. 120–124, Mar. 2016, doi: 10.1007/BF03356540.
- [36] S. Prospero, A. Lutz, B. Tavadze, A. Supatashvili, and D. Rigling, "Discovery of a new gene pool and a high genetic diversity of the chestnut blight fungus Cryphonectria parasitica in Caucasian Georgia," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 20, pp. 131–139, 2013, doi: 10.1016/J.MEEGID.2013.08.009.

- [37] J. C. Springer, A. L. D. Baines, D. W. Fulbright, M. T. Chansler, and A. M. Jarosz, "Hyperparasites influence population structure of the chestnut blight pathogen, *Cryphonectria parasitica*," *Phytopathology*, vol. 103, no. 12, pp. 1280–1286, 2013, doi: 10.1094/PHYTO-10-12-0273-R.
- [38] M. N. Pearson, R. E. Beever, B. Boine, and K. Arthur, "Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology," *Mol. Plant Pathol.*, vol. 10, no. 1, pp. 115–128, Jan. 2009, doi: 10.1111/J.1364-3703.2008.00503.X.
- [39] J. Xie and D. Jiang, "New Insights into Mycoviruses and Exploration for the Biological Control of Crop Fungal Diseases," <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-050222>, vol. 52, pp. 45–68, Aug. 2014, doi: 10.1146/ANNUREV-PHYTO-102313-050222.
- [40] A. L. Dawe and D. L. Nuss, "Hypovirus Molecular Biology: From Koch's Postulates to Host Self-Recognition Genes that Restrict Virus Transmission," *Adv. Virus Res.*, vol. 86, pp. 109–147, Jan. 2013, doi: 10.1016/B978-0-12-394315-6.00005-2.
- [41] B. I. Hillman and N. Suzuki, "Viruses of the Chestnut Blight Fungus, *Cryphonectria parasitica*," *Adv. Virus Res.*, vol. 63, pp. 423–472, 2004, doi: 10.1016/S0065-3527(04)63007-7.
- [42] D. R. Hansen, W. A. Powell, N. K. Van Alfen, and K. Gillies, "Naked dsRNA Associated with Hypovirulence of *Endothia parasitica* Is Packaged in Fungal Vesicles," *Artic. J. Gen. Virol.*, vol. 66, pp. 2605–2614, 1985, doi: 10.1099/0022-1317-66-12-2605.
- [43] T. Fahima, P. Kazmierczak, D. R. Hansen, P. Pfeiffer, and N. K. Van Alfen, "Membrane-associated replication of an unencapsidated double-strand RNA of the fungus, *Cryphonectria parasitica*," *Virology*, vol. 195, no. 1, pp. 81–89, 1993, doi: 10.1006/VIRO.1993.1348.
- [44] B. I. Hillman and N. Suzuki, "Viruses of the Chestnut Blight Fungus, *Cryphonectria parasitica*," *Adv. Virus Res.*, vol. 63, pp. 423–472, 2004, doi: 10.1016/S0065-3527(04)63007-7.
- [45] M. Turina and L. Rostagno, "VIRUS-INDUCED HYPOVIRULENCE IN *CRYPHONECTRIA PARASITICA*: STILL AN UNRESOLVED CONUNDRUM," *J. Plant Pathol.*, vol. 89, no. 2, pp. 165–178, Jul. 2007, doi: 10.4454/JPP.V89I2.740.
- [46] P. J. Hoegger, U. Heiniger, O. Holdenrieder, and D. Rigling, "Differential Transfer and Dissemination of Hypovirus and Nuclear and Mitochondrial Genomes of a Hypovirus-Infected *Cryphonectria parasitica* Strain after Introduction into a Natural Population," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 7, p. 3767, Jul. 2003, doi: 10.1128/AEM.69.7.3767-3771.2003.
- [47] M. G. Milgroom and P. Cortesi, "BIOLOGICAL CONTROL OF CHESTNUT BLIGHT WITH HYPOVIRULENCE: A Critical Analysis," <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto.42.040803.140325>, vol. 42, pp. 311–338, Jul. 2004, doi: 10.1146/ANNUREV-PHYTO.42.040803.140325.
- [48] P. Calvo, L. Nelson, and J. W. Kloepper, "Agricultural uses of plant

- biostimulants,” *Plant Soil*, vol. 383, no. 1–2, pp. 3–41, 2014, doi: 10.1007/s11104-014-2131-8.
- [49] M. S. R. de A. da Silva *et al.*, “Humic acids enrich the plant microbiota with bacterial candidates for the suppression of pathogens,” *Appl. Soil Ecol.*, vol. 168, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.APSOIL.2021.104146.
- [50] Kumar Gautam Rajneesh, Navaratna Dimuth, Muthukumaran Shobha, and Singh Amarendra, “Humic Substances: Its Toxicology, Chemistry and Biology Associated with Soil, Plants and Environment | IntechOpen,” 2021, Accessed: Jun. 15, 2022. [Online]. Available: <https://www.intechopen.com/chapters/77091>
- [51] G. Onaga and K. Wydra, “Advances in Plant Tolerance to Abiotic Stresses,” *Plant Genomics*, Jul. 2016, doi: 10.5772/64350.
- [52] A. C. García *et al.*, “Involvement of Hormone-and ROS-Signaling Pathways in the Beneficial Action of Humic Substances on Plants Growing under Normal and Stressing Conditions,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/3747501.
- [53] N. Galambos *et al.*, “Humic Acid Enhances the Growth of Tomato Promoted by Endophytic Bacterial Strains Through the Activation of Hormone-, Growth-, and Transcription-Related Processes,” *Front. Plant Sci.*, vol. 11, Sep. 2020, doi: 10.3389/FPLS.2020.582267.
- [54] K. Jindo, F. L. Olivares, D. J. da P. Malcher, M. A. Sánchez-Monedero, C. Kempenaar, and L. P. Canellas, “From Lab to Field: Role of Humic Substances Under Open-Field and Greenhouse Conditions as Biostimulant and Biocontrol Agent,” *Front. Plant Sci.*, vol. 11, May 2020, doi: 10.3389/FPLS.2020.00426.
- [55] H. H. Kesba and H. S. El-Beltagi, “Biochemical changes in grape rootstocks resulted from humic acid treatments in relation to nematode infection,” *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 2, no. 4, pp. 287–293, 2012, doi: 10.1016/S2221-1691(12)60024-0.
- [56] M. Verrillo, V. Cozzolino, R. Spaccini, and A. Piccolo, “Humic substances from green compost increase bioactivity and antibacterial properties of essential oils in Basil leaves,” *Chem. Biol. Technol. Agric.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, Dec. 2021, doi: 10.1186/S40538-021-00226-7/FIGURES/3.
- [57] D. Singh Arora and R. Kumar Sharma, “Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications,” *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009 1606, vol. 160, no. 6, pp. 1760–1788, Jun. 2009, doi: 10.1007/S12010-009-8676-Y.
- [58] P. Giardina, V. Faraco, C. Pezzella, A. Piscitelli, S. Vanhulle, and G. Sannia, “Laccases: A never-ending story,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 67, no. 3, pp. 369–385, Feb. 2010, doi: 10.1007/S00018-009-0169-1.
- [59] D. Rigling, “Reduction of Laccase Activity in dsRNA-Containing Hypovirulent Strains of *Cryphonectria (Endothia) parasitica*,” *Phytopathology*, vol. 79, no. 2, p. 219, 1989, doi: 10.1094/PHYTO-79-219.

- [60] M. Raimbault and D. Alazard, "Culture method to study fungal growth in solid fermentation," *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1980 93, vol. 9, no. 3, pp. 199–209, Sep. 1980, doi: 10.1007/BF00504486.
- [61] H. Ishida, Y. Hata, E. Ichikawa, A. Kawato, K. Suginami, and S. Imayasu, "Regulation of the glucoamylase-encoding gene (glaB), expressed in solid-state culture (koji) of *Aspergillus oryzae*," *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 86, no. 3, pp. 301–307, Jan. 1998, doi: 10.1016/S0922-338X(98)80134-7.
- [62] J. Wang, L. Shi, X. He, L. Lu, X. Li, and B. Chen, "Comparative Secretome Analysis Reveals Perturbation of Host Secretion Pathways by a Hypovirus," *Sci. Reports* 2016 61, vol. 6, no. 1, pp. 1–12, Oct. 2016, doi: 10.1038/srep34308.
- [63] T. D. Allen, A. L. Dawe, and D. L. Nuss, "Use of cDNA Microarrays to Monitor Transcriptional Responses of the Chestnut Blight Fungus *Cryphonectria parasitica* to Infection by Virulence-Attenuating Hypoviruses," *Eukaryot. Cell*, vol. 2, no. 6, pp. 1253–1265, Dec. 2003, doi: 10.1128/EC.2.6.1253-1265.2003/ASSET/268D752E-DF8A-4103-B60A-4AB4B413F66C/ASSETS/GRAPHIC/EK0630119002.JPEG.
- [64] L. Nuskern, M. Tkalec, B. Srezović, M. Ježić, M. Gačar, and M. Ćurković-Perica, "Laccase Activity in Fungus *Cryphonectria parasitica* Is Affected by Growth Conditions and Fungal–Viral Genotypic Interactions," *J. Fungi*, vol. 7, no. 11, Nov. 2021, doi: 10.3390/JOF7110958.
- [65] J. Bachman, "Reverse-transcription PCR (RT-PCR)," *Methods Enzymol.*, vol. 530, pp. 67–74, 2013, doi: 10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6.
- [66] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [67] L. Nuskern, M. Tkalec, B. Srezović, M. Ježić, M. Gačar, and M. Ćurković-Perica, "Laccase activity in fungus *cryphonectria parasitica* is affected by growth conditions and fungal–viral genotypic interactions," *J. Fungi*, vol. 7, no. 11, 2021, doi: 10.3390/jof7110958.
- [68] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, May 1976, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [69] L. I. Trubitsina, S. V. Tishchenko, and A. G. Gabdulkhakov, "Structural and functional characterization of two-domain laccase from *Streptomyces viridochromogenes*," 2015, Accessed: Aug. 28, 2022. [Online]. Available: <https://sci-hub.se/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0300908415000644>
- [70] J. A. Pascual, C. Garcia, T. Hernandez, S. Lerma, and J. M. Lynch, "Effectiveness of municipal waste compost and its humic fraction in suppressing *Pythium ultimum*," *Microb. Ecol.*, vol. 44, no. 1, pp. 59–68, 2002, doi: 10.1007/S00248-001-0040-X.

- [71] E. Loffredo and N. Senesi, "In vitro and in vivo assessment of the potential of compost and its humic acid fraction to protect ornamental plants from soil-borne pathogenic fungi," *Sci. Hortic. (Amsterdam)*., vol. 122, no. 3, pp. 432–439, Oct. 2009, doi: 10.1016/J.SCIENTA.2009.05.030.
- [72] S. Demir *et al.*, "Effects of arbuscular mycorrhizal fungus, humic acid, and whey on wilt disease caused by *Verticillium dahliae* Kleb. in three solanaceous crops," *Turkish J. Agric. For.*, 2015, doi: 10.3906/tar-1403-39.
- [73] E. Gülser, Ş. Tüfenkçi, and S. Demir, "Domateste Potasyum , Salisilik Asit ve Humik Asit Uygulamalarının Fide Çıkışı ve *Fusarium Solgunluğu*na (*Fusarium oxysporum* f . sp . *lycopersici*) Etkileri," vol. 24, no. 1, pp. 16–22, 2014.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Uluslararası Konferans Bildirileri

1. Investigation Of The Effect Of Humic And Fulvic Acid On Hypovirulence Formation By Using Laccase Enzyme - UBM- 9A - 2022. 109U- 03

