

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI
2021-DR-003

**BAĞ ALANLARINDA ÖLÜKOL HASTALIĞI ETMENİ
PHOMOPSIS VITICOLA (SACC.) SACC.
İZOLATLARINDAKİ DSRNA'NIN TANILANMASI,
MOLEKÜLER VE BİYOLOJİK KARAKTERİZASYONU İLE
HIPOVİRÜLENT ETKİSİ**

Sahra HOSSEINALIZADEH
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ

Bu tez TÜBİTAK-TOVAG tarafından 217O293 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2021

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalıŐmamda ilgi, yardım ve hoŐgörösünü esirgemeyen değerli danıŐman hocam Sayın Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ baŐta olmak üzere Sayın Prof. Dr. Ömer ERİNCİK ve Tez İzleme Komitesi üyesi Sayın Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŐ hocalarıma çok teŐekkür ederim. Ayrıca Zanjań Üniversitesi (Zanjań-İran) Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Davoud KOOLIVAND'den doktora çalıŐma süresinde hem teknik hem de manevi desteklerinden dolayı teŐekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her döneminde yanımda olan ve sonsuz desteklerini her zaman hissettiğim, canımdan çok sevdiğim annem Masumeh HOSSEINALIZADEH ve babam İsmail HOSSEINALIZADEH'e sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Bana tez boyunca manevi ve bilgi yönünden destek olan, ArŐ. Gör. Sevdie YORGANCI, Zir. Müh. Fatma Selin TÜREMEN arkadaşlarıma ve Msc. Sezgin KARAMAN'a teşekkür ederim. Biyoinformatik çalışmalarda bilgilerini benimle paylaŐan Can HOLYKAVİN'e teŐekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
ÖZET	xviii
ABSTRACT	xx
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	8
2.1. <i>Phomopsis viticola</i> Etmeninin İsimlendirilmesi ve Dünyada Yapılan Çalışmalar	8
2.2. Türkiye Bağ Alanlarında Ölükol Hastalığı (<i>Phomopsis viticola</i>)	11
2.3. Ölükol Hastalığı ile Mücadele	12
2.4. <i>Phomopsis</i> Türlerinde Mikovirüs Çalışmaları	14
2.5. Türkiye’de Mikovirüsler Üzerinde Çalışmalar:	19
2.6. Yeni Nesil Gen Dizileme Teknolojilerinin Virüs ve Mikovirüslerin Tanılanmasında Kullanımı	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	24
3.1. Materyal	24
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Ölükol Hastalığı Belirtileri Sergileyen Omcalardan Fungal Örneklerin Elde Edilmesi	24
3.2.2. Fungal Örneklerin İzolasyonu, Saflaştırması ve Miselyal Koloni Değerlendirmeleri ...	27
3.2.3. Fungal İzolatların Kültürel Özelliklerinin Değerlendirilmesi	28

3.2.3.1. Miselyal Gelişimleri ve Koloni Gelişme Hızları	28
3.2.3.2. Piknit Oluşumu	29
3.2.3.3. Koloni Renkleri ve Spor Oluşumları	30
3.2.4. Fungal İzolatların Moleküler Tanısı	31
3.2.4.1. <i>Phomopsis viticola</i> 'nın DNA İzolasyonu	31
3.2.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	32
3.2.5. Fungal İzolatlarda dsRNA Varlığının Belirlenmesi	33
3.2.6. dsRNA Pozitif izolatların Biyolojik Yönden Karakterizasyonu	35
3.2.6.1. dsRNA İçeren ve İçermeyen <i>Phomopsis viticola</i> İzolatlarının Kültürel Özelliklerinin Karşılaştırılması	35
3.2.7. dsRNA Pozitif İzolatların Dikey Taşınma Kapasitesinin Ölçülmesi	35
3.2.8. dsRNA Pozitif <i>Phomopsis viticola</i> İzolatların Virülenslik Durumunun Belirlenmesi... 37	
3.2.8.1. Asma Bitkilerinin Yetiştirilmesi.....	37
3.2.8.2. dsRNA Pozitif <i>Phomopsis viticola</i> İzolatlarından İnokulum Hazırlanması.....	38
3.2.9. dsRNA Pozitif <i>Phomopsis viticola</i> İzolatlarında dsRNA'nın Yatay Taşınımı.....	40
3.2.9.1. İzolatların Vejetatif Uyum (vc) Tiplerinin Belirlenmesi.....	40
3.2.9.2. dsRNA Pozitif <i>Phomopsis viticola</i> İzolatlarının Yatay Taşınım Çalışmaları	41
3.2.10. dsRNA Virüslerinin Hipovirulenslik Üzerine Etkisi (2. Aşama Virülenslik Testleri)	42
3.2.11. Moleküler Karakterizasyon	43
3.2.11.1. dsRNA'nın Ekstraksiyon.....	44
3.2.11.2. dsRNA'nın Genom Dizi Analizi.....	47
3.2.11.2.1. dsRNA Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi	47
3.2.11.2.2. dsRNA Örneklerinin Saflaştırılması.....	47
3.2.11.2.3. dsRNA Dizileme Çalışmaları	48
3.2.11.3. dsRNA'nın Biyoinformatik Analizi	48
3.2.11.3.1. <i>De novo</i> assembly Çalışmaları	49

3.2.11.3.2. Birleştirme (Assembly) Doğrulaması.....	50
3.2.11.3.3. Genom tahmini (Gene Prediction) ve anotasyonu.....	51
3.2.11.3.4. BLAST Analizleri ve Filogenetik Ağaç Çizimi	51
4. BULGULAR	53
4.1. Ölükol Hastalığı Belirtileri Gösteren Örneklerin Toplanması	53
4.2. Fungal Örneklerin İzolasyonu ve Saflaştırılması	54
4.3. <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarının Morfolojik Tanılanması ve Kültürel Özelliklerinin Belirlenmesi	55
4.3.1. Koloni Gelişme Hızları ve Piknit Oluşumu.....	55
4.3.2. Koloni renkleri.....	61
4.3.3. Spor Oluşumları.....	65
4.4. Fungal İzolatların Moleküler Tanısı.....	65
4.5. Fungal İzolatlarda dsRNA Varlığının Belirlenmesi	67
4.6. dsRNA İçeren ve İçermeyen <i>Phomopsis viticola</i> İzolatlarının Biyolojik Yönden Karakterizasyonu	69
4.6.1. Koloni Renkleri	69
4.6.2. Miselyal Gelişme Hızı	71
4.6.3. Piknit Oluşumu	75
4.7. dsRNA Pozitif İzolatların Dikey Taşınma Kapasitesinin Ölçülmesi	78
4.8. dsRNA içeren <i>Phomopsis viticola</i> İzolatlarının Virülenslik Belirleme Çalışmaları	79
4.9. dsRNA Pozitif İzolatlarda dsRNA'nın Yatay Taşınma Kapasitesinin Ölçülmesi	83
4.9.1. İzolatların Vejetatif Uyum (vc) Tiplerinin Belirlenmesi.....	83
4.9.2. dsRNA Yatay Taşınım Çalışmaları	85
4.10. dsRNA Virüslerinin Hipovirulenslik Üzerine Etkisi (2. Aşama Virülenslik Testleri)....	88
4.11. Moleküler Karakterizasyon ve DNA Dizi Okumaları.....	93
4.12. İllimuna Sonuçlarına göre dsRNA'nın Biyoinformatik Analizleri	98
4.12.1. İllimuna Okumalarından Kontig Oluşumu ve Self-mapping analizleri.....	99

4.12.2. Genom anotasyonu	103
4.12.3. BLAST Analizleri ve Filogenetik Ağaç	105
5. TARTIŞMA.....	113
5.1. Ege Bölgesi Bağ Alanlarından İzole Edilen <i>Phomopsis</i> spp İzolatlarının Kültürel Özelliklerinin Değerlendirilmesi ile Morfolojik ve Moleküler Yöntemler ile Tanılanması.....	113
5.2. dsRNA İçeren <i>P. viticola</i> İzolatlarından dsRNA'ların İzole Edilmesi ve Biyolojik Karakterizasyonu	117
5.3. <i>Phomopsis viticola</i> 'dan İzole Edilen dsRNA'ların Genom Dizilenmesi ve Biyoinformatik Analizleri	129
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	139
KAYNAKLAR.....	143
EKLER	163
Ek 1. <i>Phomopsis</i> spp. izolatların α sporları ölçümünün sayısal verileri	163
Ek 2. Fungal izolatların β sporları ölçümünün sayısal verileri	164
Ek 3. dsRNA pozitif 12 <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarının biyolojik ve kültürel özellikleri ...	165
Ek 4. 961M den virüs genomun dışında saptanan fungal kontingler	166
Ek 5. 962M den virüs genomun dışında saptanan fungal kontingler	167
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	169
ÖZ GEÇMİŞ.....	170

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- µm** : Mikrometre
- A** : Adenin
- bp** : Basepair
- C** : Cytosine
- dk** : Dakika
- dsRNA**: double-stranded RNA viruses
- g** : gram
- G** : Guanin
- GPS** : Global Positioning System
- Kb** : Kilobasepair
- M** : Molar
- mg** : Miligram
- mL** : Mililitre
- mm** : Milimetre
- mM** : Milimolar
- ng/µl** : Mikrolitre başına Nanogram
- nt** : Nükleotit
- PCR** : Polymerase Chain Reaction
- PDA** : Patates Dekstroz Agar
- RdRp** : RNA-dependent RNA polymerase
- SDS** : Sodyum Dodesil Sülfate
- sn** : Saniye
- T** : Timin

ug : Mikrogram

UV : Ultra Violet

V : Voltaj

μL : Mikrolitre



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Ege Bölgesinden elde edilen <i>Phomopsis</i> spp. izolatlarının besi ortamında inkübasyon 3., 7. ve 14. günlerindeki miselyal koloni gelişimlerinin yüzde oranları	56
Şekil 4.2. Besi ortamında inkübasyonun dördüncü haftasında Ege Bölgesinden elde edilen <i>Phomopsis</i> spp. izolatlarının piknit sayısının yüzde oranları	61
Şekil 4.3. Ege Bölgesinden elde edilen dsRNA pozitif ve negatif <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarının besi ortamında inkübasyon 3., 7. ve 14. günlerindeki miselyal koloni gelişimlerin yüzde oranı.....	74
Şekil 4.4. Enzim uygulanmış ve seyreltilmiş dsRNA örneklerinin kalite kontrol ve nükleik asit miktar ölçüm sonuçları; kırmızıyla işaretlenmiş miktarlar 500 (ug)'ın altındaki miktarlardır.....	95
Şekil 4.5. Enzim uygulanmamış ve seyreltilme yapılmamış dsRNA örneklerinin kalite kontrol ve nükleik asit miktar ölçümü sonuçları; kırmızıyla işaretlenmiş miktarlar 500 (ug)'ın üstünde ölçülen dsRNA miktarıdır	96
Şekil 4.6. TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero H/M/R kiti ile 962M ve 961M örneklerinden hazırlanan cDNA kütüphane sonucu	96
Şekil 4.7. 962M ve 961M dsRNA örneklerinden kalite kontrol sonucunda gözlemlenen multi peaklerin görünümü.....	97
Şekil 4.8. Filtrelemeden sonra her döngüde a) 961M ve B) 962M'nin temel kalite şeması: sarı çizgi: her döngüde çeyrekler arası phred skoru (%25-75), kırmızı çizgi: her döngüde phred puanının orta değeri, mavi çizgi: her döngüdeki phred puanının ortalaması, yeşil arka plan: iyi kalite, turuncu arka plan: kabul edilebilir kalite ve kırmızı arka plan: kötü kalite.	99
Şekil 4.9. Kontiglerin uzunluğu a) 961M, b) 962M.....	100
Şekil 4.10. Kontiglerin uzunluk dağılımı a) 961M, b) 962M.....	101
Şekil 4.11. a) 961M ve b) 962M'nin kontiglerinin GC oranının histogramı	102
Şekil 4.12. a) 961M ve b) 962M örneklerinin insert uzunluk dağılımları.....	102

RESİMLER DİZİNİ

- Resim 3.1.** Asmalarda ölükol hastalık belirtileri a) yapraklarda sarı klorotik lekeler b) sürgünlerde siyah lezyonlar 25
- Resim 3.2.** Hastalık belirtisi sergileyen omcalardan örnekleme çalışmalarının görüntüleri.... 25
- Resim 3.3.** Ege Bölgesi bağ alanlarında ölükol hastalığı simptomları gösteren sürgün örneklerinin alındığı lokasyonların GPS harita konumları 26
- Resim 3.4.** Asma sürgün örneklerinden fungus izolasyonunun aşamaları; a) siyah çatlamış lekelerin görünümü b) siyah ve çatlanmış dokulardan parça alınması c) doku parçalarının yüzeysel dezenfeksiyonu..... 27
- Resim 3.5.** a) *Phomopsis* spp. izolatlarını muhafaza amaçlı eğik agarda kısa süreli b) besi ortamındaki filtre kâğıtlarının üzerinde uzun süreli saklamak amacıyla geliştirilmesi..... 28
- Resim 3.6.** *Phomopsis* spp. izolatlarının piknit analizi a) Piknit yoğunluğu belirlemede sayım yapılan alanlar, b), stereomikroskop altında piknit görünümü c) ve sayımı. 30
- Resim 3.7.** *Phomopsis viticola* izolatlarının Balijja vd. (2008) yöntemine göre dsRNA izolasyonu aşamaları; a) fungal miselyumun likit nitrojen yardımı ile ezilmesi b) ezilmiş olan miselyumlar (c ve d) 1×STE+EtOH (%20) ile yıkama işlemi..... 34
- Resim 3.8.** Dikey taşınma için seçilen *Phomopsis viticola* izolatlarının dsRNA elektroforetik jel görünümü 1) Marker, 2) USA-2 (pozitif kontrol), 3) dsRNA negatif, 4-9) iyi dsRNA profili görünümlü izolatlar (861Ç, 870Ç, 910M, 919M, 961M, 843Ku), 10-13) net görülmeyen dsRNA profili görünümlü izolatlar (763Ko, 1230Na, 1112Sa, 1135Sa)..... 36
- Resim 3.9.** *Phomopsis viticola* tek spor izolatlarının elde edilmesi: a) sporulasyon için izolatların PDA ortamında geliştirilmesi, b) su agar ortamında çimlenen ve mikroskop altında görülen tek spor, c) tek spordan gelişen koloniler 37
- Resim 3.10.** Uygun koşullar altında bakımı yapılarak yetiştirilen asma bitkileri..... 38
- Resim 3.11.** *Phomopsis viticola* spor süspansiyonun; a) steril kıl fırça sürtülerek suya karışmasının sağlanması, b) steril tülbentten süzülmesi 39

Resim 3.12. a, b, c) Asma fidanlarında; <i>Phomopsis viticola</i> spor süspansiyonu ile inokulasyon işlemleri, d) iklim odasında nemlendirilmiş şeffaf plastik torba ile örtülerek inkübasyona bırakılması	40
Resim 3.13. Asma fidanlarında ikinci aşama virülenslik testi; a) <i>Phomopsis viticola</i> spor inokulasyon işlemleri, b) iklim odasında nemlendirilmiş şeffaf plastik torba ile örtülerek inkübasyona bırakılması	43
Resim 3.14. <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarının Morris ve Dodds (1979) ve Valverde vd. (1990) yöntemine göre dsRNA izolasyon aşamaları a) örneklerin buz içerisinde çalkalanması b) santrifüj sonrası oluşan üst sıvı fazın alınması c) örneklerin CF-II selüloz kolonda 1×STE tampon solüsyon (%16 Etanol içeren) ile yıkanması d) örneklerin 1×TBE tamponu ile resüspanse edilmesi.....	46
Resim 3.15. Genom dizileme çalışmalarının iş akışı	49
Resim 3.16. De novo Assembly'nin şematik iş akışı.....	50
Resim 3.17. De novo Assembly'nin algoritmaları.....	50
Resim 3.18. Self-mapping analizin şematiği	51
Resim 4.1. İzmir ili Selçuk ilçesinin asma yapraklarında gözlenen sarı klorotik lekeler	53
Resim 4.2. Manisa ili Saruhanlı ilçesinin asma sürgünlerinde gözlenen siyah lezyonlar ve çatlaklar	54
Resim 4.3. <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarının kültürde geliştirilmesi a) miselyal koloni b) piknitleri	54
Resim 4.4. Ege Bölgesinden elde edilen <i>Phomopsis</i> spp. izolatlarının besi ortamında inkübasyonun 3. gününde oluşan beyaz renkli koloniler	61
Resim 4.5. Ege Bölgesinden elde edilen <i>Phomopsis</i> spp. izolatlarının besi ortamında inkübasyonun 7. gününde oluşan a) beyaz, b) gri ve c) krem renkte koloniler	62
Resim 4.6. <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarının α ve β sporlarından görünüm	65
Resim 4.7. <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarının PCR ürünlerine ait elektroforetik görünüm	66
Resim 4.8. <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarından elde edilen dsRNA ların elektroforetik analiz sonuçları 1) Marker λ DNA/HindIII (23 kb), 2) USA-2 pozitif kontrol (12,7 kb <i>Cryphonectria parasitica</i>), 3-11) dsRNA pozitif (~ 9,4 kb) ve 12-14) dsRNA negatif izolatlar	68

- Resim 4.9.** Besi ortamında inkübasyonun 14. gününde dsRNA pozitif izolatlarda gözlenen; a) yavaş, b) orta ve c) hızlı miselyal koloni gelişimleri 74
- Resim 4.10.** *Phomopsis viticola* izolatları arasında piknit oluşumu yönünden ortaya çıkan farklı görünüşler; a) piknit oluşumu gözlemlenmeyen (1109Sa), b) 26-50 arasında piknit oluşumu gözlemlenen (887Ç), c) 50-100 arasında piknit oluşumu gözlemlenen (770Sö) ve d) 100 üzerinde sayıda piknit oluşumu gözlemlenen (812Ku) dsRNA pozitif izolatları, e) 100'den fazla sayıda piknit oluşumu gözlemlenen dsRNA negatif (1143Sa) izolatı 76
- Resim 4.11.** 1091B *Phomopsis viticola* izolatının dsRNA elektroforetik analiz sonucunda %100 dikey geçiş performans görünümü 1) Marker λ DNA/HindIII (23 kb), 2) pozitif Kontrol (12,7 kb *Cryphonectria parasitica*), 3) 1091B dsRNA pozitif izolat (ebeveyn ~ 9,4 kb), 4-13) dikey taşınmada dsRNA pozitif izolatlar (~ 9,4 kb) 78
- Resim 4.12.** Asma fidanlarında *Phomopsis viticola* ile inokulasyonun 15. gününde yapraklarda gözlenen klorotik lekeler 80
- Resim 4.13.** Asma fidanlarında *Phomopsis viticola* ile inokulasyonun 30. gününde dsRNA negatif (1056B) ve dsRNA pozitif (889G, 1091B) sürgünlerde gözlenen lezyonlar 81
- Resim 4.14.** *Phomopsis viticola* izolatlarının vejetatif uyum (vc) tiplerinin belirlenmesi: a) eşleşebilen kolonilerin birleştiği vejetatif uyumlu reaksiyonlar b) koloniler arasında barajın olduğu vejetatif uyumsuzluk reaksiyonları 84
- Resim 4.15.** 962M *Phomopsis viticola* izolatından elde edilen teksporların dsRNA analizi sonuçları 1) Marker λ DNA/HindIII (23 kb), 2) pozitif Kontrol (12,7 kb *Cryphonectria parasitica*), 3) 962M dsRNA pozitif izolat (ebeveyn ~9,4 kb), 4-15) ~9,4 kb büyüklüğünde dsRNA pozitif tekspor izolatlar 86
- Resim 4.16.** 962M ve 961M *Phomopsis viticola* izolatlarının 884Ç izolatı ile yatay taşınma testinden görünüşler 86
- Resim 4.17.** 962M *Phomopsis viticola* izolatın yatay taşınım testinde dsRNA analizi sonuçları; 1) Marker λ DNA/HindIII (23 kb), 2) dsRNA negatif izolat, 3-7) dsRNA pozitif izolat (~ 9,4 kb), 8) 962M dsRNA pozitif izolat (ebeveyn ~ 9,4 kb), 9) pozitif kontrol (12,7 kb *Cryphonectria parasitica*) 87

- Resim 4.18.** 961M *Phomopsis viticola* izolatın yatay taşınım testinde dsRNA analizi sonuçları; 1) Marker λ DNA/HindIII (23 kb), 2) pozitif kontrol (12,7 kb *Cryphonectria parasitica*), 3) 961M dsRNA pozitif izolat (ebeveyn ~ 9,4 kb), 5 ve 9) net görülmeyen dsRNA bantları, 4, 6, 7 ve 8) dsRNA negatif izolatlardan 87
- Resim 4.19.** Asma fidanlarında *Phomopsis viticola* ile inokulasyonun 15. gününde yapraklarda gözlenen klorotik lekeler; a) virüent izolat 884Ç, b) dsRNA pozitif dönüştürülmüş 884Ç/962M, c) 884Ç/961M, d) 884Ç/889G, e) 884Ç/861Ç ve f) 884Ç/780Se izolat 89
- Resim 4.20.** Asma fidanlarında *Phomopsis viticola* ile inokulasyonun 30. gününde sürgünlerde gözlenen lezyonlar; a) virüent izolat 884Ç, b) dsRNA pozitif dönüştürülmüş 884Ç/962M, c) 884Ç/961M, d) 884Ç/889G, e) 884Ç/861Ç ve f) 884Ç/780Se izolat 90
- Resim 4.21.** *Phomopsis viticola* izolatlarından Morris ve Dodds (1979) ve Valverde vd. (1990) yöntemleri ile elde edilen dsRNA profillerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü; 1) Marker λ DNA/HindIII (23 kb), dsRNA içeren; 2) 961M, 3) 780Se ve 4) 962M izolatları 94
- Resim 4.22.** GelAnalyzer programında dsRNA bantlarının ölçüm sonucu 1) marker λ DNA/HindIII (23 kb), 2) 961M, 3) 962M 94
- Resim 4.23.** 961M-L, 961M-S, 962M-L 962M-S1 ve 962M-S2 kontiglerin genom organizasyonu şemaları 105
- Resim 4.24.** Mega7 programının Maximum likelihood, Neighbour Joining 1000 replicate bootstrap metodu ile 961M ve 962M dsRNA-L kontiglerinin RdRp proteinlerinden çizilen filogenetik ağaç (Virüslere ait numaralar GenBank erişim numaraları olup bootstrap değerleri dalların üzerinde gösterilmiştir). 109
- Resim 4.25.** Mega7 programının Maximum likelihood, Neighbour Joining 1000 replicate bootstrap metodu ile 961M ve 962M dsRNA-L kontiglerinin hypothetical proteinlerine göre çizilen filogenetik ağacı (Virüslere ait numaralar GenBank erişim numaraları olup bootstrap değerleri dalların üzerinde gösterilmiştir). 110

Resim 4.26. ClustalW yaparak, 961M ve 962M dsRNA-L kontiglerinin RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) alanlarının ve Fusagraviridae familiyanın bazı üyeler ile korunmuş motiflerin amino asit sekanslarının çoklu hizalamaları. Motif I – VIII (koyu yıldız işaretleri), dsRNA virüslerinin RdRp karakteristiğine sahip sekiz korunmuş motifleri, koyu ve normal yıldız işaretleri; korunmuş amino asitlerdir. 111



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. 2015-2018 yıllarına ülkelere göre bağ alanları (Bin Ha) (FAO, 2018).....	1
Çizelge 1.2. 2015-2018 yıllarında ülkelere göre üzüm üretim miktarları (Milyon Ton)	2
Çizelge 1.3. 2018 yılı Ege Bölgesi illerine göre bağ alanları ve üzüm üretim miktarları.....	3
Çizelge 3.1. Hastalık belirtisi gösteren bitkilerden alınan örnek sayılarının Ege Bölgesi il ve ilçelerine göre dağılımları	26
Çizelge 3.2. Fungal izolatlarının DNA ekstraksiyonunda kullanılan lysis buffer içeriği	32
Çizelge 3.3. Dikey taşınma testinde kullanılan dsRNA pozitif izolatların illere göre dağılımları	36
Çizelge 3.4. Moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılacak dsRNA <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarının seçiminde kullanılan testlere göre puan tablosu	44
Çizelge 4.1. <i>Phomopsis</i> spp. izolat sayılarının Ege Bölgesi il ve ilçelerine göre dağılımı	55
Çizelge 4.2. Ege Bölgesinden elde edilen <i>Phomopsis</i> spp. izolatlarının besi ortamında inkübasyonun 3. gününde miselyal koloni gelişim hızlarına göre gruplandırılması	57
Çizelge 4.3. Ege Bölgesinden elde edilen <i>Phomopsis</i> spp. izolatlarının besi ortamında inkübasyonun 7. gününde miselyal koloni gelişimlerine göre gruplandırılması	58
Çizelge 4.4. Ege Bölgesinden elde edilen <i>Phomopsis</i> spp. izolatlarının besi ortamında inkübasyonun 14. gününde miselyal koloni gelişimlerine göre gruplandırılması	59
Çizelge 4.5. Besi ortamında inkübasyonun dördüncü haftasında Ege Bölgesinden elde edilen <i>Phomopsis</i> spp. izolatlarının oluşturdukları piknit sayıları	60
Çizelge 4.6. Ege Bölgesinden elde edilen <i>Phomopsis</i> spp. izolatlarının besi ortamında inkübasyonun 7. gününde koloni renklerine göre dağılımı.....	63
Çizelge 4.7. Ege Bölgesinden elde edilen <i>Phomopsis</i> spp. izolatlarının besi ortamında inkübasyonun 14. gününde koloni renklerine göre dağılımı.....	64
Çizelge 4.8. PCR testi sonucunda tanılanan <i>Phomopsis viticola</i> izolat sayılarının Ege Bölgesi il ve ilçelerine göre dağılımı	67

Çizelge 4.9. Aydın, Denizli, Manisa ve İzmir illerinde dsRNA pozitif (içeren) ve negatif (içermeyen) <i>Phomopsis viticola</i> izolat sayılarının dağılımları	68
Çizelge 4.10. Ege Bölgesinden elde edilen dsRNA pozitif ve negatif <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarının inkübasyonun 7. gününde koloni renkleri.....	70
Çizelge 4.11. Ege Bölgesinden elde edilen dsRNA pozitif ve negatif <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarının besi ortamında inkübasyonunun 14. gününde koloni renkleri.....	71
Çizelge 4.12. Ege Bölgesinden elde edilen dsRNA pozitif ve negatif <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarının besi ortamında inkübasyon üçüncü gününde miselyal koloni gelişimleri.....	72
Çizelge 4.13. Ege Bölgesinden elde edilen dsRNA pozitif ve negatif <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarının besi ortamında inkübasyonunun 7. gününde miselyal koloni gelişimleri...	73
Çizelge 4.14. Ege Bölgesinden elde edilen dsRNA pozitif ve negatif <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarının besi ortamında inkübasyonunun 14. gününde miselyal koloni gelişimleri.....	73
Çizelge 4.15. Ege Bölgesinden elde edilen dsRNA pozitif ve negatif <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarının inkübasyonun dördüncü haftasına ait piknit sayıları	77
Çizelge 4.16. dsRNA pozitif <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarında dsRNA virüslerinin dikey geçiş performansı (%)	78
Çizelge 4.17. dsRNA içeren <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarının asma fidanlarında sürgün ve yapraklarda oluşturduğu hastalık şiddeti.....	82
Çizelge 4.18. İllere göre dsRNA içeren <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarının vejetatif uyum (vc) yönünden gruplandırılması	84
Çizelge 4.19. <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarının dsRNA yatay taşınım eşleştirmeleri sonrası alıcı izolatlarda dsRNA analiz sonuçları	85
Çizelge 4.20. 962M ve 961M izolatlarının dsRNA yatay taşınım testi sonuçları.....	87
Çizelge 4.21. 884Ç dsRNA negatif <i>Phomopsis viticola</i> izolatının dönüştürülmüş dsRNA pozitif formlarının asma sürgün ve yapraklarda oluşturduğu hastalık şiddeti	91
Çizelge 4.22. 1056B dsRNA negatif <i>Phomopsis viticola</i> izolatının dönüştürülmüş dsRNA pozitif formlarının asma sürgün ve yapraklarda oluşturduğu hastalık şiddeti ...	92

Çizelge 4.23. 1215Na dsRNA negatif <i>Phomopsis viticola</i> izolatının dönüştürülmüş dsRNA pozitif formlarının asma sürgün ve yapraklarda oluşturduğu hastalık şiddeti ...	92
Çizelge 4.24. Moleküler karakterizasyon için seçilen dsRNA pozitif <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarının biyolojik özelliklerinin puan tablosu	93
Çizelge 4.25. <i>Phomopsis viticola</i> izolatlarından elde edilen dsRNA örneklerinin DNase ve RNase enzimleri uygulamadan önce ve sonra Nanodrop cihazında ölçüm sonuçları	95
Çizelge 4.26. 961M ve 962M dsRNA örneklerinden eş-çift kütüphane kurularak elde edilen nükleotid dizi değerleri.....	97
Çizelge 4.27. Illimuna sisteminde 962M ve 961M dsRNA örneklerinden yapılan okumaların kalite kontrol değerleri.....	98
Çizelge 4.28. 961M ve 962M dsRNA örneklerinden elde edilen kontiglerin sayı ve uzunlukları	100
Çizelge 4.29. 961M dsRNA örneğinden elde edilen kontiglerin N10-N100 arasında uzunluk dağılımları	101
Çizelge 4.30. 962M dsRNA örneğinden elde edilen kontiglerin N10-N100 arasında uzunluk dağılımları	102
Çizelge 4.31. 961M ve 962M dsRNA örneklerinin kontiglerinin nükleotid içerikleri ve GC oranları.....	102
Çizelge 4.32. 961M ve 962M dsRNA örneklerinin self-mapping analizi istatistik sonuçları.....	103
Çizelge 4.33. 961M ve 962M dsRNA örneklerinin genom anotasyon sonuçları.....	104
Çizelge 4.34. 961M ve 962M dsRNA örnekleri kontiglerinin genom anotasyonu.....	104
Çizelge 4.35. 961M ve 962M dsRNA örnekleri kontiglerinin BLASTn sonucunda tahmin edilen fonksiyon değerleri.....	106
Çizelge 4.36. 961M ve 962M dsRNA-L kontiglerinin RdRp proteinlerinin amino asit dizileri ile yapılan BLASTp sonuçları	108
Çizelge 4.37. 961M ve 962M dsRNA-L kontiglerinin hypothetical proteinin amino asit dizileri ile yapılan BLASTp sonuçları	109

ÖZET

BAĞ ALANLARINDA ÖLÜKOL HASTALIĞI ETMENİ *PHOMOPSIS VITICOLA* (SACC.) Sacc. İZOLATLARINDAKİ DSRNA'NIN TANILANMASI, MOLEKÜLER VE BİYOLOJİK KARAKTERİZASYONU İLE HIPOVİRÜLENT ETKİSİ

Hosseinalizadeh S. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2021.

Amaç: Ege Bölgesinin bağ alanlarında *Phomopsis sürgün ve yaprak lekesi* (ölükol) hastalığı etmeni *Phomopsis viticola* izolatlarında dsRNA'nın tanılanması, moleküler ve biyolojik karakterizasyonu ile hipovirulent etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem: 2018 yılında Ege Bölgesinin en fazla asma yetiştiriciliği yapılan il ve ilçelerden ölükol hastalığı belirtisi sergileyen asmaların sürgün örneklerinden elde edilen fungal izolatların morfolojik ve kültürel özellikleri değerlendirilerek *P. viticola* etmeni moleküler yöntemlerle tanılanmıştır. *P. viticola* izolatlarından Balijja vd. (2008) yöntemi ile dsRNA analizi yapıp, dsRNA içeren izolatlar dsRNA içermeyen 3 izolat ile biyolojik özellikleri yönünden karşılaştırılmıştır. Seçilen dsRNA içeren 50 izolatın dikey taşınma kapasitesi en iyi performans gösteren izolatlar ile asma fidanların üzerinde virülenslik testleri yapılmıştır. dsRNA içeren izolatların vegetatif uyum grupları belirlenmiş ve yatay taşınım kapasiteleri değerlendirilmiştir. Yatay taşınım ile dsRNA pozitive dönüştürülen virulent *P. viticola* izolatlarında dsRNA virüslerin hipovirulenslik etkisi asma fidanları üzerinde belirlenmiştir. Tüm uygulanan biyolojik testlerde en iyi performans göstermesi nedeniyle biyolojik mücadelede kullanılabilme özelliği taşıyan 6 adet izolat arasından seçilen 2 izolata ait dsRNA'ları tüm genom dizi analizi yeni nesil dizileme teknolojisi (YND) Illumnia sekanslayıcıda yapılmıştır. Çift yönlü okumaların birleştirilmesiyle *de novo* tüm genom dizisi belirlenmiş ve filogenetik analizleri yapılmıştır.

Bulgular: Asma sürgün örneklerinden elde edilen toplam 214 *P. viticola* izolatın 125'inde tek segmentli veya iki segmentli ~2,5-9,4 kb uzunluğunda dsRNA'lar belirlenmiştir. dsRNA içeren ve içermeyen izolatların koloni renk farklılığı olmadığı ve dsRNA içermeyen

izolatların içerenlere göre daha hızlı koloni gelişimi ile petrinin tamamını kaplayarak çok sayıda piknit oluşturduğu belirlenmiştir. Dikey taşınım performansı en iyi olan dsRNA içeren 12 izolatın asma fidanlarının sürgün ve yapraklarında virülenslik yönünden farklılıklar saptanmıştır. dsRNA içeren izolatlarda 5 farklı vejetatif uyum grubu saptanmış ve yatay taşınım testinde 12 izolatın 10'unda dsRNA'nın alıcı izolata taşınabildiği saptanmıştır. Virülenslik testinin ikinci aşamasında 884Ç/962M, 884Ç/961M, 884Ç/780Se, 884Ç/889G ve 884Ç/861Ç izolatları asma fidanlarının hem yapraklarında (%26,32-49,37) hem sürgünlerinde (%14,11-16,33) düşük virülenslik göstermiştir. Yapılan tüm biyolojik testler sonucu en iyi performansı gösteren 6 izolatın miktar ve kalite yönünden en uygun olan 961M ve 962M numaralı izolatlarının dsRNA'ları genom dizi analizinde sırasıyla toplam 24 ve 33 milyon okuma elde edilmiştir. Ardından 961M den 9,7 ve 2,5 kb büyüklüğünde 2 konting, 962M den ise, 9,5, 2,5 ve 2,5 kb uzunluğunda 3 konting elde edilmiş ve 3 (961M) ile 6 (962M) CDS saptanmıştır. Hypothetical ile RdRp proteinlerini kodlayan 2 (961M) ve 5 (962M) ORF bölgeleri tesbit edilmiştir. Hypothetical ve RdRp protein amino asit dizilerinin BLASTp sonucunda en yüksek özdeşlik oranı (%41-44) *Fusagraviridae* familyasından *Fusarium poae dsRNA virus 2* ile olmuştur. Filogenetik analizde aynı yerde kümelenen 961M ve 962M sadece *Fusarium poae dsRNA virus 2* ile en yakın kümelenme oluşturmuştur. Bu nedenle bu iki dsRNA'nın yeni bir mikovirüs familyasının üyesi olabileceği düşünülmüştür. 961M ve 962M dsRNA genom dizileri NCBI da kayıt altına alınmıştır.

Sonuç: Ege Bölgesi bağ alanlarında izole edilen *P. viticola* izolatlarında belirlenen mikoviral dsRNA'lar arasında yapılan tüm biyolojik testlerde en iyi performans gösteren ve dsRNA kalite/miktarı en iyi olan 961M ve 962M nolu izolatların fungal konukçusunun virülenslik etkisini kayda değer oranda azalttığı belirlenmiştir. Biyoformatik analizler sonucu yeni bir mikoviral dsRNA familyasının üyesi olabileceği düşünülen 961M ve 962M dsRNA'nın genom organizasyonu konusunda daha derinlikli çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: dsRNA, Mikovirüs, *Phomopsis viticola*, Yeni nesil dizileme

ABSTRACT

IDENTIFICATION, MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF DSRNA IN THE ISOLATES OF *PHOMOPSIS VITICOLA* (SACC.) SACC, THE CAUSAL AGENT OF PHOMOPSIS CANE AND LEAF SPOT DISEASE, AND HYPOVIRULENT EFFECT

Hoseinalizadeh S. Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Plant Protection Program, Doctorate Thesis, Aydın, 2021.

Objective: This study was aimed to identify dsRNA in the isolates of *Phomopsis viticola*, which is the causal agent of Phomopsis cane and leaf spot disease, in the vineyard areas of the Aegean Region, and to determine its hypovirulent effect by molecular and biological characterization.

Material and Methods: In 2018, the fungal isolates were obtained from the shoot samples of the grapevines that had the signs of Phomopsis cane and leaf spot disease. Sampling was done in the districts of the grapevine-growing provinces of the Aegean Region, where the majority of grapevines are cultivated. The samples were evaluated and the *P. viticola* was identified by molecular methods. dsRNA analysis of *P. viticola* isolates was performed according to Balijja's method and the dsRNA containing isolates were compared with three dsRNA-free isolates in terms of their biological properties. The virulence assay was carried out on the two-years old grapevine seedlings using 50 selected dsRNAs containing isolates that had the best performance in vertical transmission assay. The vegetative compatibility groups of the isolates containing dsRNA were determined and their horizontal transmission capacities were evaluated. The hypovirulent effect of dsRNA viruses was determined by comparing the virulence of a virulent *P. viticola* isolates with its converted form that is generated by horizontal transmission. The six isolates showing the best performances in all applied biological tests were selected for whole genome sequence analysis. whole genome sequences were determined by next generation sequencing (NGS) in the Illumina sequencer. Bidirectional sequence reading were assabed *de nova* to obtain whole genome sequence and phylogenetic analyses were performed.

Results: Single-segmented and two-segmented dsRNAs of ~ 2.5-9.4 kb were determined in 125 of a 214 *P. viticola* isolates obtained from grapevine shoot samples. It was determined that dsRNA-containing and dsRNA-free isolates did not have any difference in colony color. dsRNA-free isolates covered the entire petri with faster colony growth than the ones containing dsRNA and formed a large number of pycnidia. The 12 dsRNA isolates, which had the best vertical transmission rate, exhibited varying degree virulence in the virulence test. Among the isolates containing dsRNA, 5 different vegetative compatibility groups were determined. In the horizontal transmission test, dsRNA's in 10 of 12 isolates were successfully transferred to the recipient virus free *P. viticola* isolate. The results of the second virulence assay showed that converted isolates, 884Ç/962M, 884Ç/961M, 884Ç/780Se, 884Ç/889G ve 884Ç/861Ç, had low virulence in both the leaf (26.32-49.37%) and shoot (14.11-16.33%) inoculation of grapevine samplings. Among 6 dsRNA containing isolates with the best performance according to results of all biological tests, the dsRNAs of 961M and 962M isolates, which are the most suitable in terms of the quantity and quality and produced a total of 24 and 33 million readings, respectively, in the genome sequence analysis. Then, two contigs of 9.7 and 2.5 kb from 961M and 3 contigs of 9.5 and 2.5 kb were obtained from 962M and 3 (961M) and 6 (962M) CDS were determined. There were two ORF regions in 961M and 5 in 962M encoding an RdRp and hypothetical proteins. As a result of BLASTp, hypothetical and RdRp amino acid sequences showed the highest identity (41-44%) with *Fusarium poae dsRNA virus 2* from the *Fusagraviridae* family. In the phylogenetic analysis, 961M and 962M clustered in the same place and formed the closest cluster with *Fusarium poae dsRNA virus 2*. Therefore, it is thought that these two dsRNA may be members of a new mycovirus family. 961M and 962M dsRNA genome sequences were recorded in the NCBI databases.

Conclusion: It was determined that among the isolates with mycoviral dsRNAs, which were detected in the *P. viticola* isolates collected from the Aegean region vineyards, 961M and 962M showed the best performance in all biological tests applied, and had the best dsRNA quality/ quantity, significantly reduced the virulence of the fungal host. It is necessary to carry out more studies on the genome organization of 961M and 962M dsRNAs, which are thought to be a member of a new mycoviral dsRNA family as a result of bioinformatics analysis.

Key Words: dsRNA, Mycovirus, Next Generation Sequencing, *Phomopsis viticola*

1. GİRİŞ

Dünyanın en eski bitkilerinden biri olan asma; Asmagiller (Vitaceae) familyasına ait olup üzüm veren, çok yıllık odunsu bir bitkidir. Genellikle yeşilimsi renkli çiçek kümeleri döllendikten sonra salkım hâlinde tatlı ve bol sulu meyveler verir (Çelik, 2013). Milyonlarca yıl öncesine dayanan asmanın anavatanı konusunda birbirinden çok farklı görüşler bulunmaktadır. Tarihi kaynaklara ve arkeolojik bulgulara göre; yabani asmanın (*Vitis vinifera sylvestris*) ilk kez Kuzeydoğu Anadolu ile Kafkas dağları arasında yer alan Transkafkasya coğrafyasında kültüre alındığı ve şaraba işlendiği, daha sonra Anadolu üzerinden Aşağı Mezopotamya ve Mısır'a (M.Ö. 3500-3000), daha sonra ise (M.Ö. 2200) Girit'e götürüldüğü anlaşılmıştır (Çelik, 2013). Günümüzde bağcılık dünyanın birçok ülkesinde en önemli tarım faaliyetleri arasında yer almaktadır. Bunun nedenleri arasında asmanın iklim ve toprak isteklerinin diğer meyve türlerine göre daha az seçici olması ve üzümün çok yönlü değerlendirilme şansına sahip olmasıdır. Üzüm taze olarak sofralık tüketimin yanı sıra gıda sanayisinde hammadde olarak kuru üzüm, şarap, üzüm suyu, pekmez, reçel vb. ürünlere işlenerek değerlendirilebilen önemli bir üründür (Akkurt vd., 2018). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) 2018 yılı verilerine göre dünyada toplam 7,5 milyon ha alanda 78 milyon ton üzüm üretiminin gerçekleşmiş olduğu bildirilmiştir (Çizelge 1.1) (FAO, 2018). Türkiye toplam 448 bin hektar bağ alanı ile İspanya, Çin, Fransa ve İtalya'dan sonra yüzde 6'lık oran ile 5'inci sırada ve toplam 3.933.000 ton üzüm üretimiyle Çin, İtalya, ABD, Fransa, İspanya'dan sonra yüzde 5,2'lik oran ile 6'ncı sırada yer almaktadır (Çizelge 1.2) (FAO, 2018).

Çizelge 1.1. 2015-2018 yıllarına ülkelere göre bağ alanları (Bin Ha) (FAO, 2018)

Ülkeler	2015	2016	2017	2018
İspanya	941	920	968	969
Çin	802	843	865	875
Fransa	752	757	788	793
İtalya	673	668	699	705
Türkiye	462	435	448	448
ABD	413	410	434	439
Arjantin	224	224	222	218
İran	202	207	213	212
Şili	199	203	194	192
Diğer Ülkeler	2.457	2.428	2.594	2.598
Toplam	7.127	7.097	7.425	7.449

Çizelge 1.2. 2015-2018 yıllarında ülkelere göre üzüm üretim miktarları (Milyon Ton)
(FAO, 2018)

Ülkeler	2015	2016	2017	2018
Çin	12.6	13.8	13.1	11.7
İtalya	7.9	7.9	6.9	8.6
ABD	7.0	7.1	6.7	6.9
Fransa	6.3	6.3	5.0	6.2
İspanya	5.8	5.9	5.0	6.9
Türkiye	3.7	4.0	4.2	3.9
Şili	2.4	2.5	2.0	2.5
İran	2.4	2.5	1.9	2.3
Arjantin	2.6	2.4	2.1	2.7
Diğer Ülkeler	25.3	24.4	26.1	26.10
Toplam	76.8	77.4	73.0	77.8

Türkiye’de 2018 yılında üretilen 3.933 milyon ton üzümün, 1,9 milyon tonu sofralık (%49), 1,5 milyon tonu kurutmalık (%39), 464 bin tonu şaraplık-şıralık (%12) olarak değerlendirilmiştir (Türkiye İstatistik Kurumu [TÜİK], 2019). Türkiye bağıcılığına bakıldığında her ilin tarımsal ürün deseni içerisinde en az %1 bağ alanı olduğu görülmektedir. Yıllardan yıla az miktarda değişiklik göstermekle birlikte 448 bin hektar ortalama bağ alanına sahip olan Türkiye’de yer alan dokuz tarım bölgesi içinde hem alan, hem de üretim miktarı yönünden Ege Bölgesi %32,5 lik pay ile birinci sırada yer almaktadır (Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü Müdürlüğü [TEPGEM], 2019). Ülke bağ alanlarının yarısına yakını yine Ege Bölgesinde bulunmaktadır. Ege Bölgesinden sonra ülkemizin önemli üretici bölgeleri sırasıyla Akdeniz Bölgesi ve Güneydoğu Anadolu Bölgesidir. Bağ alanı ve üretim miktarı açısından Karadeniz ve Doğu Anadolu Bölgeleri ise Türkiye üzüm yetiştiriciliğinde son iki sırayı paylaşmışlardır (TEPGEM, 2019).

Ege Bölgesinin üretim alanı en büyük illeri sırasıyla Manisa, Denizli ve İzmir’dir (Çizelge 1.3). Manisa ilinin Turgutlu, Akhisar, Salihli, Alaşehir ve Sarıgöl ilçeleri, Denizli’nin Buldan, Güney ve Çal ilçeleri, İzmir’in Kemalpaşa, Urla ve Çeşme ilçeleri yoğun üretim yapan ve ürünlerini dış pazarlarda değerlendiren yörelerdir (TÜİK, 2018).

Çizelge 1.3. 2018 yılı Ege Bölgesi illerine göre bağ alanları ve üzüm üretim miktarları (TÜİK, 2018)

İller	Ekim alanı (dekar)	Üretim (ton)
Manisa	807.387	1.234577
Denizli	386.060	355.276
İzmir	128.499	194.978
Uşak	32.485	30.167
Aydın	15.495	13.825
Muğla	6.497	6.628
Afyonkarahisar	2.988	1.176
Kütahya	1.829	1.208

Ülkemiz için önemli olan bağcılık günümüzde üretimden pazarlamaya kadar geçen süreç içerisinde birçok sorunla karşı karşıyadır. Bu sorunlar içerisinde bitki hastalıkları, özellikle fungal etmenler yer almaktadır. Külleme (*Erysiphe necator*), Mildiyö (*Plasmopara viticola*), Kurşuni Küf (*Botrytis cinerea*) ve ölükol (*Phomopsis viticola*) gibi fungal hastalıklar bağ yetiştiriciliği yapılan tüm ülkelerde ekonomik boyutlara ulaşan zararları ile üzüm üretimini sınırlandıran önemli fungal hastalıklardır (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü [TAGEM], 2019).

Bağlarda *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc.'nın neden olduğu ülkemizde ölükol olarak bilinen *Phomopsis* sürgün ve yaprak leke hastalığı ilk olarak 1909 yılında New York eyaletinde Reddick (1909) tarafından rapor edilmiştir (Erincik, 2002). Daha sonra hastalık, bağ yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede görülmüş ve görüldüğü bu ülkelerde önemli ürün kayıplarının ortaya çıkmasına neden olmuştur (Erincik, 2002; Scheper, 2001). 1997 yılında ABD'nin Ohio eyaletinde hastalık nedeniyle %30'a varan ürün kayıpları gözlemlenmiştir (Erincik vd., 2001). Ölükol hastalığı etmeni asmanın taze gelişen toprak üstü organlarında yani genç sürgünler, yapraklar, yaprak sapları, salkım sapları ve daneler üzerinde hastalık oluşturmaktadır (Erincik vd., 2001). Hastalık ilk olarak ilkbaharda yapraklarda küçük sarı klorotik lekeler olarak ortaya çıkar. Bu yapraklar zamanla sararır, buruşur, kenarları yırtılır, şekli bozulur ve küçük kalırlar. Bahar aylarının ilerleyen dönemlerinde enfeksiyona uğrayan sürgünlerin dip kısımlarında açık renkli küçük lekeler oluşur ve bu lekeler daha sonra odun dokusuna kadar ulaşan çatlaklara dönüşür ve siyahlaşır. Hastalıklı sürgünlerde gelişme yavaşlar hatta durabilir. Ağır enfeksiyon geçiren sürgünler rüzgara karşı dayanamayarak kırılabilirler. Lezyonlar salkım sapına kadar ilerleyebilir ve tüm salkımı çürütebilir. Salkım ve meyve enfeksiyonları doğrudan ürün kayıplarına neden olabilir. Ölükol hastalığı sonuçta asmaları kuruttuğu için ekonomik anlamda verdiği zarar önemlidir. Hastalık asma

yetiştiriciliği yapılan tüm bölgelerde görülebilmektedir (Hewitt ve Pearson, 1988 ve Urbez-Torres vd., 2013). Ölükol hastalığı enfekteli olan asmalarda genel olarak yaprak, sürgün hatta salkım kurumaları nedeniyle %10 civarında hastalık verim kaybına yol açmakta ve ertesi yıl gözlerin ölmesinin (uyanmaması) ardından daha yüksek oranlarda verim kaybına neden olmaktadır (TAGEM, 2019).

Phomopsis cinsi içerisinde 900'ün üzerinde anamorf tür olduğu ve bunlardan 180 kadarının teleomorf *Diaporthe* cinsi ile ilişkili olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Uecker 1988; Wicks ve Rawnsley, 2002). Anamorf türlerin arasında saptanan genetik uzaklıklar ve morfolojik ve patojenik özelliklerdeki farklılıklardan dolayı geçmişten bugüne kadar bazı araştırmacılar farklı sinonim isimlendirmeler yapmışlardır. Bu isimlendirmeler *Phomopsis* cinsi taksonomisinde karışıklığına neden olmuştur (Wicks ve Rawnsley, 2002). Hastalık üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda etmeni doğada anamorf formu *P. viticola* olarak bildirilmiş ve etmenin teleomorf formu bazı moleküler çalışmaları ve DNA dizilim analizleri sonucunda *Diaporthe ampelina* ile ilişkilendirilmiştir. Ancak teleomorf formu ile ilgili karışık ilişkilendirmelerden dolayı etmen hala anamorf formu ile tanımlanmaktadır.

Ülkemizde Ege ve Marmara Bölgeleri bağ alanlarında *Phomopsis* sürgün ve yaprak leke simptomlarını sergileyen asmalardan sıklıkla *P. viticola*'nın izole edildiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Akgül vd., 2015; Awan, 2017; Çetinkaya ve Onoğur, 2006; Özben, 2011; Güngör Savaş, 2019; Yıldırım, 2014). Dünyada farklı asma yetiştiriciliği yapılan bölgelerden yaklaşık 15 *Phomopsis* (*Diaporthe*) türü araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Awan, 2017). *P. viticola* (*Diaporthe ampelina*), *D. ambigua*, *D. ampelina*, *D. amygdali*, *D. australafricana*, *D. cytospora*, *D. eres*, *D. feoniculina*, *D. helianthi*, *D. hongkongensis*, *D. kyushuensis*, *D. phaseolorum*, *D. rudis*, *D. sojae* ve *P. longiparaphysata* bağ alanlarında en sık görülen türler olarak bildirilmiştir (Awan, 2017).

Ülkemizde hastalık ilk olarak Marmara ve Ege Bölgelerinde görülmüş ve Karaca ve Eroğlu (1967) tarafından 1967 yılında sürgün kuruması (Dead-arm) olarak tanımlanmıştır. Dünyada bağcılık yapılan ülkeler arasında beşinci sırada bulunan ülkemiz için asma ekolojik, sosyal ve ekonomik yönlerden son derece öneme sahip bir bitkidir. Ölükol hastalığı dünyanın birçok yerinde olduğu gibi Ege Bölgesinde de önemli ürün kayıplarına yol açmakta ve hastalıkla mücadelede kültürel önlemler ile kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Birçok araştırmacı ölükol hastalığının mücadelesi üzerinde araştırmalar yapmışlardır (Castillo-Pando vd., 1997; Kaşkaloğlu vd., 1975 ve Nair vd., 1998). Bu yapılan çalışmalar göstermiştir ki ölükol ile bulaşık alanlarda, hastalıklı bitki sürgünlerinin kış

budaması sırasında kesilerek uzaklaştırılması (sanitasyon) ile birlikte dormant dönem ve yeşil aksam fungusit uygulamaları önemli bir yer tutmaktadır. Ancak hastalığın yoğun olarak görüldüğü yerlerde tek başına sanitasyon başarılı olmamakta ve bu nedenle fungusit kullanımı zorunluluk halini almaktadır (Kaşkaloğlu vd., 1975). Ölükol hastalığına karşı etkili olan fungusitlerin sayısı sınırlıdır. Hastalığa karşı ilk ilaçlamanın sürgünlerin 2-3 cm boya ulaştığı zaman yapılması uygundur. Ancak bu dönem üreticiler tarafından kaçırıldığında hastalığın kontrolü zorlaşmaktadır (Awan, 2017; Cucuzza vd., 1982; ve Nita vd., 2006). Nitekim, ölükol hastalığının Michigan ve Ohio'daki üzüm bağlarında fungusit kullanılmasına rağmen bağlarda ciddi ürün kayıplarına neden olduğu belirlenmiştir (Schilder vd., 2005). Ayrıca Ohio'da yapılan bir survey çalışmasında, mevsim başında ölükol için önerilen fungusitlerin kullanılmasına rağmen ölükol hastalığının bulunma oranının yine de %50 dolaylarında olduğu bildirilmiştir (Nita vd., 2008). Külleme hastalığına etkili olduğu bilinen prochloraz, fenarimol, triadimefon gibi fungusitlerin ölükol hastalığına etkisinin az olduğunu saptanmıştır (Latinovic vd., 2008). Bağ alanlarında görülen mildiyö ve kurşuni küf gibi önemli fungal hastalıklara karşı önerilen bazı fungusitlerin ölükol hastalığı üzerinde etkili olmadığını bildirilmiştir (Adaskaveg vd., 2010; Teviotdale vd., 2003). Ayrıca ölükol hastalığına karşı etkili bulunan fungusitlerin aşırı ve düzensiz kullanımından dolayı *B. cinerea* gibi bazı fungal etmenlerin fungusitlere dayanıklılık kazanma riskinin yanısıra ürünler üzerinde fungusitlerin kalıntı bırakma riskini de barındırmakta ve bu kalıntılar insanlar, hayvanlar ve çevre üzerinde olumsuz etkilere sahip olmaktadır (Komarek vd., 2010; Nair vd., 1998 ve Wigtwick ve Allinson 2007). Nitekim Avustralya bağ alanlarında ölükol hastalığın mücadelesinde bazı fungusitlerin çevreye olumsuz etkilerinden dolayı kullanımı yasaklanmıştır (Castillo-Pando vd., 1997). Bu nedenlerle son zamanlarda araştırmacılar fungal patojenlerin kontrolünde çevreye ve insan sağlığına zarar vermeyen alternatif kimyasallar ve biyolojik ajanların kullanımı ile ilgili çalışmalara yoğunlaşmışlardır (Robin ve Hoegger, 2001; Yıldırım, 2014; Zheng vd., 2014). Fungal hastalıkların biyolojik mücadelesinde hipovirulent mikovirüslerin kullanılabilirliği bilinmektedir. Mikovirüsler, hifsel anastomoz yoluyla hipovirulent bireylerden vejetatif olarak uyumlu virulent bireye taşınarak onun hipovirulent fenotipe dönüştürülmesine neden olabilirler. Bunun en iyi örneklerinden *Cryphonectria hipovirüs 1* olup kestane kanseri ile biyolojik mücadelede başarı ile kullanılmaktadır (Açıkgöz vd., 2017; Anagnostakis ve Jaynes, 1973; Bissegger vd., 1997; Heiniger ve Rigling, 1994; Krstin vd., 2008; Macdonald ve Fulbright, 1991; Sotirovski vd., 2000 ve Trestic vd., 2001).

Diğer fungal hastalıkların mücadelesinde olduğu gibi (Ahn ve Lee, 2001; Nuss, 2005; Xie ve Jiang, 2014) *Phomopsis* spp. kaynaklı hastalıkların önlenmesinde de çevreye ve insan sağlığına zarar vermeyen biyolojik mücadele çalışmaları ön plana çıkmıştır. Hatta bu mücadele yöntemlerinden birisi hipovirulent mikovirüslerin kullanılması olup patlıcanda *Phomopsis vexans* ve soya fasulyesinde *Phomopsis longicolla* üzerinde kontrol sağlayabileceği de ifade edilmiştir (Hrabakova vd., 2017; Zhang vd., 2015). *Phomopsis* ile akraba olan elma patojeni *Diaporthe ambigua*'da mikoviral dsRNA'nın yatay taşınması ve fungus üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Preisig vd., 2000; Smit vd., 1996). Ancak *P. viticola* izolatlarında mikoviral dsRNA'nın varlığı konusunda Türkiye'de Ege Bölgesi bağ alanlarında yapılan çalışma (Hosseinalizadeh vd., 2020) dışında dünyada herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. 2016 yılında yapılan çalışmada (ADÜ BAP ZRF-16009 nolu proje) Ege Bölgesinin bağ alanlarından elde edilen 80 *P. viticola* izolatının sekizinde dsRNA'nın varlığı belirlenmiştir (Hosseinalizadeh vd., 2020).

P. viticola izolatlarında belirlenen dsRNA'nın tanılanması ve dsRNA içeren izolatların virülensliklerinin belirlenmesine yönelik araştırma ilk kez gerçekleştirilmiştir. Bu özgün çalışma ile Ege Bölgesi bağ alanlarında *P. viticola* izolatlarındaki dsRNA'nın moleküler karakterizasyonun belirlenmesi ve hipovirulentlik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu ana amaç doğrultusunda;

1. Ege Bölgesinde (Denizli, Manisa, İzmir, Aydın) bağ alanlarında asmalardaki kahverengi nekrotik doku belirtileri gösteren sürgünlerden fungal örnekler toplanmış ve kültüre alınmıştır.

2. Elde edilen fungal izolatların kültürel özelliklerinin değerlendirilmiş ve morfolojik ve moleküler yöntemler ile *P. viticola* tanılanmıştır.

3. *P. viticola* izolatlarından dsRNA'lar Balijja vd., (2008) ve Valverde vd., (1990) yöntemleri ile izole edilmiştir.

4. dsRNA içeren *P. viticola* izolatlarının biyolojik karakterizasyonu (kültürel özellikleri) belirlenmiştir.

5. dsRNA içeren fungal izolatların dikey taşınma kapasitesi ölçülmüş ve virülenslik üzerine etkisi araştırılmıştır.

6. dsRNA içeren fungal izolatların vejetatif uyum (vc) tipleri saptanarak hipovirüsün yatay taşınma kapasitesi belirlenmiş ve dsRNA hipovirüsün virülenslik üzerine etkisi araştırılmıştır.

7. *P. viticola* izolatlarından izole edilen dsRNA'ların cDNA kütüphanesi oluşturularak *de nova* Yeni Nesil Dizileme (YND) ile tüm genom dizi okuması yapılmış ve filogenetik analizler ile elde edilen veriler NCBI GenBank da kayıtları yapılarak Accession Number'ları alınmıştır.

Çalışma sonucunda ulaşılmak istenen en önemli hedef olan asmada ölükol hastalık etmeni olan *P. viticola*'ya ait mikovirüs olduğu tahmin edilen dsRNA'nın tüm genom dizisi belirlenerek moleküler tanısı yapılmış ve hipovirülenslik ilişkisi saptanmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Phomopsis viticola* Etmeninin İsimlendirilmesi ve Dünyada Yapılan Çalışmalar

Günümüzde anamorf *Phomopsis* cinsi içerisinde 900'ün üzerinde tür olduğu bunlardan 180 kadarının teleomorf *Diaporthe* cinsi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Uecker, 1988; Wicks ve Rawnsley, 2002). Ancak geçmişte farklı araştırmacılar tarafından yapılan sinonim isimlendirmeler, bazı anamorf *Phomopsis* türler arasında saptanan genetik uzaklıklar ve morfolojik (koloni şekli, koloni rengi, konidi oluşumu vb.) ve patojenik özelliklerdeki farklılıklar (belirti tipleri ve konukçu tercihleri) bu cinsin taksonomisinde kafa karışıklığına neden olmuştur (Wicks ve Rawnsley, 2002).

İlk olarak 1880 yılında ölükol etmeni Saccardo tarafından *Phoma viticola* Sacc. adıyla tanılanmıştır. Daha sonra, 1885 yılında Britanya'da Cooke tarafından *Phoma viniferae* Cooke olarak adlandırılmıştır. 1905 yılında Saccardo ABD-New York Eyaletinde hastalıklı asma örneklerinden izole edilen *Phoma viticola*'yı ilk kez *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc olarak adlandırmıştır (Mostert vd., 2001). Yıllarca ölükol hastalığına yanlılıkla o yıllarda asmalarda görülen bir başka etmenin (*Eutypa lata*) neden olduğu düşünülmüş ve tek bir hastalık olarak ele alınmıştır. Ancak *Eutypa lata*'nın tanılanmasından sonra ölükol olarak bilinen hastalık iki farklı hastalığa ayrılmıştır (Moller ve Kasimatis, 1978). Yoğun sürgün ölümlerine neden olan *Eutypa lata*'nın oluşturduğu hastalığa *Eutypa* geriye ölümü (*Eutypa die back*), *P. viticola*'nın neden olduğu yaprak ve sürgün lekelerinden oluşan hastalığa ise *Phomopsis* sürgün ve yaprak leke hastalığı (*Phomopsis cane and leaf spot*) adı verilmiştir. Ancak ülkemizde hastalık hala ölükol olarak adlandırılmaktadır.

Anamorf cins *P. viticola*'nın tanısı genel olarak eşeysiz üreme yapılarına bakılarak yapılmaktadır. Tüm *Phomopsis* türlerinde olduğu gibi *P. viticola*'da α ve β olmak üzere iki farklı piknidiospor üretmektedir (Uecker, 1998). 1911 yılında *P. viticola*'nın teleomorf tek hücreli askosporlara sahip *Cryptosporella viticola* olarak bildirilmiş ancak günümüzde birçok *Phomopsis*'in teleomorf formunun iki hücreli askosporları olan *Diaporthe* olduğu moleküler çalışmalarda ortaya konmuştur (Niekerk vd., 2005). Bu iki teleomorf fungus *Diaporthaceae* familyasında yer almaktadır. Günümüzde hastalık etmeni doğada anamorf

formda bulunan fungal patojen *P. viticola* olarak bildirilmiştir (Niekerk vd., 2005). Etmenin teleomorf formu bazı moleküler belirteçlere ilişkin DNA dizilim analizleri sonucunda *Diaporthe ampelina* ile ilişkilendirilmiş olsa da hastalık etmeni hala anamorf formu ile anılmaktadır.

Ölököl hastalığı olarak bilinen Phomopsis Sürgün ve Yaprak Leke Hastalığı dünya çapında birçok bağcılık yapılan bölgelerde önemli bir fungal hastalıktır. Geçmişten bu güne kadar hastalık birçok ülkeden rapor edilmiştir (Erincik, 2002). Güney Afrika'da, hastalık ilk olarak 1935 yılında fark edilmiş ve daha sonra Du Plessis tarafından 1938 yılında rapor edilmiştir (Mostert, 2000). Hastalık 1958 yılında ABD'de bağ alanlarında %50 oranında asmalarda verim kaybına neden olmuş ve 1997 yılında ise Ohio eyaletinde %30 oranında verim kaybına yol açtığı rapor edilmiştir (Erincik, 2002). Merrin vd. (1995) 1995 yılında ilk kez Avustralya bağ alanlarından toplanan 144 sürgün örneğinden izole edilen Phomopsis izolatlarını morfolojik ve coğrafi özellikleri açısından sınıflandırmışlardır. Çalışma sonucunda Phomopsis izolatlarında alfa konidi boyutları, piknidia şekli ve *in vitro* sporülasyon oranı temelinde dört biyotipinin varlığı saptanmıştır. Bu biyotiplerden en yaygın olanının yaprak ve sürgün lekesi belirtilerine neden olan *P. viticola* olduğu bildirilmiştir (Mostert vd., 2000; Scheper vd., 2000). Phillips vd. (1999)'nın Portekiz bağ alanlarında bir *Diaporthe* türünü tespit ettiklerini ve bu türün Avustralya asmalarını enfekte eden *P. viticola*'nın takson 1'in teleomorfı olan *D. perijuncta* olarak tanımladıklarını ifade etmişlerdir. Mostert vd. (2000) Phomopsis türlerini öncelikle alfa-konidi ve konidioforların morfolojisi, kültürel özellikleri ve patojenisitelerine göre tanılamışlardır. Daha sonra moleküler yöntemler ve DNA dizilimi tekniklerini kullanarak asmada Phomopsis türlerinin birbirinden ayrılmasını gerçekleştirmişlerdir (Mostert vd., 2000). Merrin vd. (1995) 1995 yılında Avustralya bağ alanlarında *D. perijuncta* (eski adıyla Phomopsis takson 1) ve *P. viticola* (Phomopsis takson 2) etmenlerinin, Phomopsis sürgün ve yaprak lekesi hastalığıyla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Mostert vd., 2000). Ancak 2004 yılında Rawnsley vd. (2004) Avustralya bağ alanlarından topladıkları sürgün örneklerinden elde ettikleri fungal izolatların patojenisite testleri sonucu *D. perijuncta*'nın Phomopsis sürgün ve yaprak lekesi hastalığıyla ilişkili olmadığını ve asmada bir endofitik fungus olduğunu saptamışlardır (Rawnsley vd., 2004). ABD ve Avrupa bağ alanlarından Phomopsis sürgün ve yaprak leke belirtileri sergileyen sürgünlerden toplam izole edilen 80 Phomopsis izolatının DNA sekanslaması sonucu ikisi hariç tüm izolatların *P. viticola* olduğu saptanmıştır (Schilder vd., 2005). Daha sonra 30 izolat seçilerek misel büyüme oranı, konidial boyut, yaprak ve

sürgünlerinde patojenisite açısından *in vitro* koşullarında değerlendirilmiş ve *P. viticola* izolatlarının tümünün asmada hastalığa neden olduğu, ancak virülenslik açısından farklılık gösterdiği ifade edilmiştir (Schilder vd., 2005). 2002-2004 yıllarında ABD'nin Ohio eyaletinin bağ alanlarından Phomopsis sürgün ve yaprak lekesi hastalığına neden olan *P. viticola*'nın bölgede hastalık durumunu belirlemek için Nita vd. (2008) 3 yıl boyunca eyalet çapında yaptıkları sürvey çalışmasında bağ alanlarında *P. viticola* etmeninin asmalar üzerindeki hastalık şiddetini değerlendirmişlerdir. Bu değerlendirmeler sonucunda yapraklar ve sürgünlerde ortalama hastalık oranının sırasıyla %42 ve %50 olduğunu saptamışlardır.

Santos vd. (2010) çeşitli bitkilerden izole edilen *Diaporthe* ve *Phomopsis*'in *MAT1-1-1* ve *MAT1-2-1* genlerinin bir bölümünden tasarladıkları spesifik primerler ile PCR yapmışlar ve ardından filogenetik analizler ile *Diaporthe* ve *Phomopsis* etmenlerinin her iki MAT bölgelerine de sahip olması nedeniyle heterotallik fungus olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda tasarladıkları bu primerlerin uyumlu mating tiplerinin seçilmesinde, homotallik ve heterotallik türlerin moleküler ayrımında ve türlerin güvenilir bir şekilde tanımlanmasında kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. ABD'nin Kaliforniya eyaletinin bağ alanlarında *P. viticola* etmeninin asmalarda sıklıkla rastlanan etmen olduğunu ve ekonomik düzeyde hastalığa yol açtığını Úrbez-Torres vd. (2012) bildirmişlerdir.

Phomopsis sürgün ve yaprak lekesi (*P. viticola*) hastalığının diğer odun hastalıkları ile birlikte görüldüğü Kuzey Amerika'nın bağ alanlarında toplam 23 farklı alandan 190 hastalıklı sürgün toplanmış ve 65 fungal izolat kültüre alınmıştır. Kültüre alınan izolatlar morfolojik yapılarına ve filogenetik analizlerine göre *P. viticola*, *P. fukushii* ve *D. eres* olarak tanılanmıştır (Baumgartner vd., 2013). 2014 yılında ilk kez Tunus bağ alanlarından toplanan sürgün örneklerinden PCR ve DNA sekans analizleri yapılarak *P. viticola* ve *D. seriata* saptanmıştır (Ghnaya-Chakroun vd., 2014). Mundy vd. (2020) 2017 yılında Yeni Zelanda'nın Marlborough bölgesi bağ alanlarında asma kurumalarına neden olan asma gövde hastalığı etmenlerinin dağılımı ve tanımlanmasına yönelik yaptıkları araştırmada elde ettikleri izolatların morfolojik özellikleri ve DNA dizi analizlerine göre *P. viticola* olduğunu belirlemişlerdir.

2.2. Türkiye Bağ Alanlarında Ölükol Hastalığı (*Phomopsis viticola*)

Ülkemizde Ege ve Marmara Bölgeleri bağ alanlarında *Phomopsis* sürgün ve yaprak leke simptomlarını sergileyen asmalardan sıklıkla *P. viticola*'nın izole edildiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Akgül vd., 2015; Awan, 2017; Çetinkaya ve Onoğur 2006; Güngör Savaş 2019 ve Yıldırım 2014). Ancak ülkemizde ölükol hastalığı ile ilgili araştırmaların oldukça az sayıda olduğu dikkat çekicidir. Hastalık ilk olarak Karaca ve Eroğlu (1967) tarafından 1967 yılında Marmara ve Ege Bölgelerinde görülmüş ve hastalık, o dönemde dünyada kabul gören ismi olan ölükol (Dead-Arm) olarak adlandırılmıştır. Daha sonraki yıllarda dünyada hastalığın ismi *Phomopsis* sürgün ve yaprak leke hastalığı olarak değiştirilse de Türkiye'de ölükol isminde bir değişiklik yapılmamıştır. Menemen Bölge Zirai Araştırma Enstitüsü ve Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü bağ alanlarında ve laboratuvar koşullarında *P. viticola*'nın asma sürgünleri gözlerinin uyanmasına ve sürmesine olan negatif etkisi belirlenmiş ve ayrıca kültürel önlemlerin önemi vurgulanmıştır (Karaca ve Eroğlu, 1967). Ünal ve Onoğur, (1991) ölükol hastalığı etmeni *P. viticola*'nın kimyasal mücadelesinde karşılaşılan sorunları ifade etmişler ve dayanıklılığın bazı sentetik bileşikler ve patojen olmayan *Phomopsis* türü ile uyarılması yoluyla *P. viticola*'nın bitkideki gelişiminin önlenebileceğini belirlemişlerdir. Çetinkaya ve Onoğur (2006) Manisa Merkez İlçesinde yer alan organik çekirdeksiz üzüm bağlarında yaptıkları gözlemlere göre ölükol hastalığının bölgede ileri yıllarda büyük bir sorun yaratabileceğini ifade etmişlerdir (Çetinkaya ve Onoğur, 2006). Özben (2011) Ankara ili bağ alanlarında ölükol hastalığı belirtilerini sergileyen asmalardan toplamış olduğu sürgünlerin üzerinde oluşan piknitler ile preparatlar hazırlamış *P. viticola*'yı morfolojik yapılarına göre tanımlamıştır. Manisa-Akhisar İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, 2016 yılında yapmış oldukları arazi kontrolleri neticesinde bağlarda yaz mücadelesi düzgün yapılmadığından ve gerekli önlemler yeteri kadar alınmadığından dolayı bağlarda ölükol hastalığının çok yaygın olduğunu bildirmişlerdir (TOB, 2016). Ege Bölgesi bağ alanlarından toplanan sürgün örneklerden elde edilen 23 adet *Phomopsis* izolatının özellikleri belirlenmiştir (Awan, 2017). Moleküler tanısı ve gen dizimleri belirlenen tüm izolatlar *P. viticola* (*Diaporthe ampelina*) olarak tanımlanmıştır. Buna ilave olarak *Phomopsis* izolatlarının sıcak su uygulamalarına ve bazı fungusitlere karşı duyarlılıkları da incelenmiştir (Awan, 2017). Güngör Savaş (2019) 2013-2018 yıllarında, Ege Bölgesinde Manisa ve Marmara Bölgesinde Bursa ve Tekirdağ illeri bağ alanlarından odun doku hastalığı sergileyen asmalardan aldığı

örnekleri morfolojik yapılarına göre inceleyerek etmenin *P. viticola* olduğunu belirlemiştir. Daha sonra Real Time (RT)-PCR da elde edilen PCR ürünlerinin DNA dizilimlerine göre etmenin *P. viticola* olduğu saptanmıştır (Güngör Savaş, 2019). Ege Bölgesinin İzmir ve Manisa illerinden ölükol hastalığı belirtilerini sergileyen asmaların sürgünlerinden 86 örnek steril bağ makası ile kesilerek alınmış ve sürgün örneklerinden izolasyon yapılmıştır. Ardından kültüre alınan izolatlar morfolojik özelliklerine göre değerlendirilmiş ve 80 izolatin *P. viticola* olduğu saptanmıştır (Hosseinalizadeh vd., 2020).

2.3. Ölükol Hastalığı ile Mücadele

Dünyada bağ üretim alanlarında ölükol hastalığının önemli ürün kayıplarına yol açtığı bildirilmiştir (Nair vd., 1998). Aynı şekilde hastalığın ülkemizde de verim kayıplarına yol açtığı ifade edilmiştir (Kaşkaloğlu vd., 1975). Ölükol hastalığının 1958 yılında ABD bağ alanlarında %50 oranında verim kaybına neden olduğu belirlendikten sonra 1997 yılında, ABD nin Ohio eyaletinde bu oranın % 30 oranında olduğu rapor edilmiştir (Erincik, 2002). Etmen o yıl verimi direkt olarak etkilediği gibi, ertesi yılın ürününü oluşturacak gözleri de tahrip ederek ciddi kayıplara neden olmaktadır. Nemli ve ılıman bölgelerde asma yetiştiriciliği yapılan alanlarda hastalık şiddetinin yüksek olduğu ve bu bölgelerde hastalığın %30 oranında verim kayıplarına neden olduğu saptanmıştır (Úrbez Torres vd., 2013). Ülkemiz Ege Bölgesi Manisa ilinin tüm bağ alanlarında yaygın olarak görülen ölükol hastalığının, dip gözlerin uyanmaması, gelişme ve olgunlaşma döneminde sürgünlerin zayıf gelişmeleri sonucunda sürgün ve salkımların kurumalarına yol açarak o yılın ve ertesi yılın verimini önemli ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir (TOB, 2016). Ölükol hastalığının mücadelesi üzerinde başta Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya ve Fransa olmak üzere birçok ülkede araştırmalar yürütülmüştür (Castillo-Pando vd., 1997; Kaşkaloğlu vd., 1975 ve Nair vd., 1998). Ülkemizde ölükol ile bulaşık alanlarda hastalıklı bitki sürgünlerinin kış budaması sırasında kesilerek uzaklaştırılması ile dormant dönem ve yeşil aksam fungusit uygulamalarının önemli bir yer tuttuğu bildirilmiştir (Kaşkaloğlu vd., 1975). Ancak hastalığın yoğun olarak görüldüğü yerlerde tek başına sanitasyonun başarılı olmadığı ve bu nedenle fungusit kullanımının zorunluluk haline geldiği bildirilmiştir (Kaşkaloğlu vd., 1975). ABD'nin bağ alanlarında *P. viticola* sıklıkla görülmekte olup üzüm üretimini ciddi bir oranda etkilemektedir. Patojen enfekte olmuş asmalarda kışı geçirerek bahar mevsiminde

piknidler oluşturup yağmur sıçramaları ile konidilar yayılarak enfeksiyonu başlattığı için hastalığı kontrol altına almak için belirli mücadele stratejisinin geliştirilemediği bildirilmiştir (Nita vd., 2006). Ardından *P. viticola* için bir mücadele stratejisi oluşturmak için, sera koşullarında *P. viticola*'nın konidial süspansiyonunu yaprak ve sürgünlere püskürmüşler ve 24 saatlik ıslaklık, 4 saatlik kuruma süresinden sonra *P. viticola*'ya karşı kullanılan koruyucu fungusitlerin (Mancozeb, Azoxystrobin) uygulamasının yanı sıra etkili hastalık uyarı sisteminin temel ön şart olduğunu ve adjuvantlar-fungisit (JMS Stylet-Oil ve Regulaid) karışımlarının ise hastalığın kontrolünde etkili olmadığını bildirmişlerdir. Daha sonra yine aynı araştırmacılar, ABD'nin Ohio eyaletin bağ alanlarında Phomopsis sürgün ve yaprak lekeli hastalığı etmeni için önerilen fungusitlerin kullanılmasına rağmen hastalığın bulunma oranının %50 den aşağılara düşmediğini bildirmişlerdir (Nita vd., 2008). Latinovic vd. (2008)'de asmada külleme hastalığına karşı kullanan bazı fungusitlerin (prochloraz, fenarimol, triadimefon) ölükol hastalığında etkisiz olduğunu bildirmişlerdir. Yine ABD'nin bağ alanlarında tüm fungal hastalıklarına karşı ruhsatlı bulunan 46 fungusitten sadece beşinin tatmin edici düzeyde *P. viticola*'da etkili olduğu bildirilmiştir (Adaskaveg vd., 2010). Bu bulgulara ilave olarak birçok araştırmacı bağ alanlarında görülen önemli fungal etmenlere (*Erysiphe necator*, *P. viticola* ve *B. cinerea*) karşı kullanılan bazı fungusitlerin *P. viticola*'nın üzerinde etkili olmadığını bildirmişlerdir (Adaskaveg vd., 2010; Eviotdale vd., 2003). Ayrıca organik üzüm yetiştiriciliği yapılan alanlarda yaz ilaçlamalarında *P. viticola* etmenine karşı kullanılacak etkili bir fungusit olmadığını ve bu nedenle bu alanlarda ölükol hastalığı ile mücadelede sorunlar yaşandığı ifade edilmiştir (Çetinkaya ve Onoğur, 2006). Bunun dışında, *P. viticola*'ya karşı etkili bulunan fungusitlerin aşırı ve düzensiz kullanımı nedeniyle *B. cinerea* gibi fungal etmenlerin fungusitlere karşı dayanıklı olmasına sebep olmakta ve bağ alanlarında fungal hastalıklar ile mücadelede çeşitli riskler taşımaktadır (Nair vd., 1998). Ayrıca hastalık nedeniyle oluşan salkım ve meyve çürümelerinin önüne geçmek amacıyla kullanılacak fungusitler ürün üzerinde kalıntı bırakma riski de barındırmaktadırlar. Bu kalıntılar bilindiği üzere insanlar, hayvanlar ve çevre üzerinde olumsuz etkilere sahiptirler (Komarek vd., 2010; Wigtwick ve Allinson 2007). Nitekim çevreye olumsuz etkileri dolayısıyla Avustralya'daki bağlarda ölükol hastalığı mücadelesinde kullanılan sodium arsenite, dinitrobutylphenol ve dinitro-ocresol gibi fungusitlerin kullanılması yasaklanmıştır (Castillo-Pando vd., 1997).

Birçok araştırmacı yukarıda bahsedilen nedenlerle biyolojik ajanlar ve alternatif kimyasalların fungal patojenlerin kontrolünde kullanılmasını önermişlerdir (Hoegger vd.,

2003; Robin ve Heiniger, 2001; Yıldırım, 2014 ve Zheng vd., 2014). Birçok fungal hastalığın mücadelesinde araştırıcılar çevreye ve insan sağlığına zarar vermeyen biyolojik mücadele çalışmalarına yönelmişlerdir (Ahn ve Lee, 2001; Nuss, 2005 ve Xie ve Jiang, 2014). *Phomopsis* spp. kaynaklı hastalıkların önlenmesinde de biyolojik ajanların kullanılması ön plana çıkmıştır. Bu mücadele yöntemlerinden birisi olan hipovirulent mikovirüslerin kullanılması, patlıcanda *P. vexans* ve soya fasulyesinde *P. longicolla* zerinde kontrol sağlayabileceği araştırıcılar tarafından saptanmıştır (Zhang vd., 2015).

2.4. *Phomopsis* Türlerinde Mikovirüs alışmaları

Mikovirüsler enfekte ettikleri fungal hücrelerde replike olan ve hücreler arasında yayılış gösteren obligat parazitlerdir. Mikovirüslerin genomları, DNA'ya da RNA'dan oluşan tek sarmallı (ss-single-stranded) ya da çift-sarmallı (ds-double-stranded) nükleik asitlerden oluşmaktadır (Nuss, 2011). Bitkide fungusun neden olduğu hastalık belirtisi ile doğrudan ilişkili değil, ancak konukçularında bazı fenotipik değişikliklere yol açtıkları bilinmektedir (Ghabrial vd., 2015). Mikovirüsler fungal konukçularında büyüme ve gelişme, sporülasyon, pigmentasyon ve enzim aktivitelerinde değişikliklere yol açmaktadır. Mikovirüsler ile enfekteli fungal izolatların virlensliğinin arttığına (hipervirlenslik) ya da azaldığına (hipovirülenslik) dair pek çok rapor bulunmaktadır (Dawe ve Nuss, 2001; Nuss, 2000 ve 2005).

İlk mikovirüs 1962 yılında *Agaricus bisporus*'da A.B.D.'nin Pensilvanya (Pennsylvania) eyaletinde La France kardeşlerin mantar iftliğinde ortaya çıkarılmıştır (Ghabrial vd., 2015). 1962 yılından bugüne kadar bazı bitki fungal hastalıklarda çok sayıda mikovirüs araştırıcılar taraflarından saptanmış olup bunların bazıları bitki fungal hastalıklarına karşı biyolojik ajan olarak kullanılmaktadır (Ghabrial vd., 2015). Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi'nin (ICTV) onuncu raporuna göre, bugüne kadar 250'den fazla mikovirüs genomunun tanısı yapılmış ve bunlar 17 familyada yer almıştır (Li vd., 2019). Bu familyalar *Chrysoviridae*, *Endornaviridae*, *Megabirnaviridae*, *Quadriviridae*, *Partitiviridae*, *Reoviridae*, *Totiviridae*, *Alphaflexiviridae*, *Barnaviridae*, *Deltaflexiviridae*, *Gammaflexiviridae*, *Hypoviridae*, *Narnaviridae*, *Myonaviridae*, *Metaviridae*, *Pseudoviridae*, *Genomoviridae*'dir. Mikovirüsler üzerinde yapılan birçok çalışmada mikovirüsün genom yapısının dsRNA (ift sarmallı RNA) olduğu bildirilmiştir (Yu vd.,

2010). *Cryphonectria parasitica*, *Ophiostoma novo ulmi*, *Magnaporthe oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *B. cinerea* ve *Helminthosporium victoriae* gibi bazı önemli bitki fungal patojenlerde dsRNA mikovirüslerinin varlığı belirlenmiş ve hipovirülenslikle ilişkili olduğu saptanmıştır (Ghabrial ve Suzuki, 2009).

Çin’de buğday örneklerinden izole edilen *Fusarium poae* izolatından 9 ve 2,5 kb lık iki segmentli dsRNA (L-dsRNA ve S-dsRNA) Valverde vd. (1996)’nin yöntemini kullanarak Wang vd., (2016) tarafından izole edilmiştir. Elektroforezde elde ettikleri L-dsRNA fraksiyonunu agaroz jelden keserek saflaştırmışlar ve cDNA kütüphanesini klonlamada rastgele primerler kullanarak oluşturmuşlardır. Ardından Sanger sekanslamasını ile DNA dizi analizlerini yapmışlardır. Sekans sonuçlarını Computer-assisted sequence assembly programı kullanılarak analiz edilmiş L-dsRNA’nın, birbirinin üstüne gelen iki dsRNA segmentinin olduğunu tesbit ederek L-dsRNA, L-1 ve L-2 ismini vermişlerdir. Sekans uzunlukları sırasıyla 9,5 ve 9,4 kb olan L-1 ve L-2 dsRNA’ya geçici olarak sırasıyla "*Fusarium poae dsRNA virus 2* (FpV2)" ve "*Fusarium poae dsRNA virus 3* (FpV3)" olarak isimlendirilmiştir. Bu iki yeni mikovirüsün genom dizi analizlerini DNAMAN Yazılım (Lynnon Biosoft, San Ramon, CA, USA) programı kullanılarak NCBI da ORF Finder ile FpV2 ve FpV3’de hypothetical ve RdRp proteinlerini kodlayan iki büyük, açık okuma çerçevesini (ORF1 ve 2) tesbit edilmiştir. Filogenetik ağaç RdRp proteinin amino asit dizilerini kullanarak *Totiviridae* ailesinin 14 üyesi, *Chrysoviridae* ailesinin dört üyesi, Phlegivirus cinsinin iki üyesi, tanımlanmayan dsRNA virüsleri ve *Megabirnaviridae* ve *Partitiviridae* ailelerinden üç dsRNA virüsünü seçerek FpV2 ve FpV3 ile hizalanarak MEGA 6 programında Neighbour Joining 1000 replicate bootstrap metodunu kullanarak filogenetik ağaç oluşturulmuş ve her iki mikovirüs sınıflandırılmamış dsRNA virüsleri ile kümelenirken FpV2 tarafından kodlanan RdRp proteinleri sırasıyla *Macrophomina phaseolina double-stranded RNA virus 2* (% 36) ve *Phlebiopsis gigantea mycovirus dsRNA 2* (% 36) ile en yüksek sekans özdeşliğini gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca FpV3 tarafından kodlanan RdRp, *Fusarium graminearum dsRNA mycovirus 3* (%44), *Sclerotinia sclerotiorum nonsegmented virus L* (44%) ve *Grapevine associated totivirus-2* (44%) en yüksek sekans özdeşliği de tesbit edilmiştir. Sonuç olarak bu iki dsRNA’yı yeni bir mikovirüs ailesinin temsil ettiğini ve atanmamış bir dsRNA virüs grubuna ait olduğunu ifade etmişlerdir. Bu iki yeni mikovirüsün genomundan spesifik primerler tasarlanmış ve sekans analizleri ile mikovirüsün genom organizasyonu ve filogenetik analizleri yapılarak *Fusagraviridae* olarak adlandırılan yeni bir mikovirüs familyası önerilmiş ve FpV2 ile

FpV3 mikovirüslerinin bu aile üyesinde olduğu belirlenerek sırasıyla KU728180 ve KU728181 erişim numaraları ile GenBank veri tabanına kaydı yapılmıştır.

Phomopsis ile ilişkili olan elma patojeni *Diaporthe ambigua*'da mikoviral dsRNA'nın fungus üzerindeki etkileri üzerinde yapılan çalışma sonucunda, mikovirüs dsRNA'nın fungusun laktaz enzimini, spor ve pigment oluşumunu azalttığı belirlenmiştir. Mikovirüs dsRNA'nın fungal hifler arasında anastomosis yoluyla geçiş yaptığı saptanmıştır (Smit vd., 1996). Ayrıca elma fidanlarına yapılan patojeniste testi sonucunda dsRNA içeren izolatların dsRNA içermeyen izolatlara göre daha az hastalık oluşturduğu tespit edilmiştir (Smit vd., 1996).

Preisig vd. (2000) Güney Afrika'da elma ve şeftali ağaçlarının meyvelerinde kuruma ve ağaç ölümüne neden olan *Diaporthe ambigua* izolatlarından 4 kb'lık dsRNA mikovirüsünü Valverde vd. (1990)'nin dsRNA izolasyon yöntemi ile saptamışlardır. Ardından mikoviral dsRNA RT-PCR ile tanılanıp dizi analizi yapılmış ve *Diaporthe ambigua RNA virus* (DaRV) olarak isimlendirilen yeni bir mikovirüs saptanmıştır (Preisig vd., 2000). *Phomopsis* spp.'in telemorfik grubunda yer alan *Diaporthe perijuncta* asmada yaygın ve önemli bir fungal etmendir. Güney Afrika'da Moleleki vd., (2003) *Diaporthe RNA Virus* (DaRV)'ünün, fungusun sporulasyonunu ve pigmentasyonunu azalttığını saptamışlardır. Bu mikovirüs *in vitro* koşullarında dsRNA virüsü içermeyen fungus strainlerine aktarıldığında virüs ilişkili avirüent fenotipik özelliklere sahip strainler elde edilmiştir. *D. perijuncta*'nın virülensliğindeki gerilemeye yol açan bu mikovirüsün biyolojik mücadele ajanı olarak geliştirilebileceği de bildirilmiştir (Moleleki vd., 2003). Daha sonra yine *D. perijuncta* izolatlarından Valverde vd. (1990)'nin dsRNA izolasyon yöntemi kullanarak 4.1 kb'lık *Diaporthe RNA virus 1* (DRV1) izole edilmiştir (Moleleki vd., 2011). Bu mikovirüs dsRNA'sının *D. ambigua* ve *Phomopsis* spp. izolatlarına *in vitro* koşullarda aktarılması ile *D. ambigua* izolatlarında misel gelişimi ve yoğunluğunun azalmasına neden olurken *Phomopsis* spp. izolatlarında herhangi bir etkiye neden olmamıştır (Moleleki vd., 2011).

Diaporthe türleri, dünyada bağcılık yapılan alanlarda asma gövde hastalıklarına neden olmakta ve dünya çapında yaklaşık 1.5 milyar dolar ekonomik zarar vermektedir (Gramaje vd., 2018; Hofstetter vd., 2012). Türler içinde *Diaporthe rudis* etmeni asmada önemli patojenlerden biridir ve dünyadaki tüm önemli bağcılık bölgelerinde kanserler ve diğer ölüm semptomlarına neden olmaktadır (Úrbez-Torres vd., 2013; Van Niekerk vd., 2005). Kocanova vd. (2020) Çek Cumhuriyeti'nin bağ alanlarından toplanan *D. rudis*

izolatlarından small RNA ve total RNA dizileme tekniklerini kullanarak yeni bir mikovirüs saptamışlar ve bu yeni mikovirüsün tam genom analizi için RNA high throughput sequencing (Next Generation Sequencing) yöntemini kullanmışlardır. Bunun için ilk önce fungal izolattan dsRNA (Morris ve Dodds, 1979; Tuomivirta vd., 2002) izole edilmiş ve DNA sekans analizleri ile Small-RNA kütüphanesi oluşturulmuştur. SPLIT RNA Ekstraksiyon Kiti (Lexogen, Viyana, Avusturya) kullanılarak fungal misellerden total RNA izole edilmiş ve DNase I (Thermo Scientific, MA, ABD) ve A Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Human/Mouse/Rat) enzimleri uygulanmış, ardından Illumina TruSeq® kiti ile cDNA kütüphanesi ve NovaSeq6000 (Illumina, San Diego, CA) ile çift taraflı (2 x 101 nt) sekanslama yapılmıştır. Elde edilen DNA sekans verilerine göre mikovirüsün tam genomundan spesifik primerler tasarlanarak PCR ile bulgular doğrulanmıştır. Çalışma sonucunda *Mitovirus* cinsinden saptanan yeni mikovirüs *Diaporthe rudis mitovirus 1* (DrMV1) olarak isimlendirilmiş ve elde edilen veriler Gen Bank'a kaydedilmiştir (Kocanova vd., 2020).

Bazı *Phomopsis* türlerinde mikoviral dsRNA'lar belirlenmiş ve bu mikovirüslerin genom yapıları ve hipovirülenlikle ilişkileri üzerinde çalışılmıştır. *Phomopsis longicolla* soya fasulyesi yetiştiren ülkelerin çoğunda tohum çürümmesine neden olarak tohum kalitesini önemli ölçüde düşüren bir hastalık etmenidir (Sinclair, 1993). Koloniuk vd. (2014) soya fasulyesinden elde edilen *P. longicolla* (ME711) izolatlarından Castillo vd. (2011)'nin yöntemini uygulayarak dsRNA izolasyonu yapmışlar ve SuperScript® II Reverse H⁻ Reverse Transcriptase kitini kullanarak cDNA sentezlemişlerdir. Ardından BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit kullanılarak ABI 3730 DNA Analyzer sisteminde bu dsRNA'nın sekansı gerçekleştirilmiştir. Sekans bilgileri CLC Main Workbench 6.7.1 (CLC bio, Denmark) ile analiz edilmiştir. Mikovirüs (PIHV1)'ün tüm genom sekansı ardaşık RT-PCR ile tanılanıp 5' ve 3' terminal dizileri MINT Universal cDNA Sentez Kiti ile çoğaltılmıştır. Filogenetik analiz maximum-likelihood metodu kullanılarak yapılmıştır. Sonuç olarak *Phomopsis longicolla hypovirus 1* mikovirüsünün *Hypoviridae* familyasının *Betahypovirus* genusunda olduğu saptanmıştır (Koloniuk vd., 2014). Daha sonra Hrabakova vd. (2017) *P. longicolla* dan Morris ve Dodds (1979) yöntemini kullanarak izole ettikleri dsRNA'dan cDNA kütüphanesi hazırlamışlardır. Ardından Illumina platform (Next Generation Sequencing) ile tüm genom dizi analizi ve filogenetik analiz yapılmıştır. Bu genoma spesifik primerler tasarlanarak PCR ile bulgu doğrulanmıştır. Çalışmada elde edilen veriler Gen Bank'da alınan erişim numarası (Accession Number KR997836) ile kayıt

edilmiştir. *P. longicolla* etmeninden elde edilen bu yeni mikovirüs *Phomopsis longicolla RNA virusu 1* (PIRV1) olarak isimlendirilmiştir. Bu yeni mikovirüsün son yıllarda *S. sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Magnaporthe oryzae* ve *Botrytis* sp. (Donaire vd., 2016; Illana vd., 2016; Marzano vd., 2016 ve Marzano ve Domier, 2016) gibi fungal etmenlerden izole edilen *Ourmiaviruses* cinsinde saptanan mikovirüsler ile benzer olduğu ifade edilmiştir (Hrabakova vd., 2017).

Patlıcan *Phomopsis* yanıklığına neden olan *Phomopsis vexans*, dünyada patlıcan yetiştirilen alanlarda tahripkâr bir fungal hastalıktır. Bu hastalığa karşı etkili bir fungisit bulunmaması nedeniyle biyolojik mücadele ajanı olarak mikovirüslerin kullanılması amaçlanmıştır (Zhang vd., 2015). Çin'de yetiştirilen patlıcan bitkilerinden elde edilen *P. vexans* izolatlarından üç segmentli dsRNA (dsRNA-L 12kbp, dsRNA-M 5kbp ve dsRNA-S 3kbp) Morris ve Dodds (1979) yöntemi kullanılarak izole edilmiştir (Zhang vd., 2015). dsRNA-M segmenti rastgele hexadeoxynucleotide primerleri (Takara) ve tasarladıkları spesifik primerler kullanılarak cDNA kütüphaneleri oluşturulmuştur. cDNA ürünlerinin hepsi pMD18-T vektöründe (Takara) klonlanıp DNAMAN ve ClustalX programları ile dizilimi yapılmış ve elde edilen sekanslar GenBank veritabanına kaydedilmiştir. Takiben filogenetik ağaç, MEGA 4'deki neighborjoining metodu kullanılarak 1000 bootstrap örnekleme kullanılarak oluşturulmuştur. Sonuçta *Phomopsis vexans RNA virüsü 1* (PvRV1)'in *Totiviridae* familyasında ve *Victorivirus* cinsinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada, tanılanan bu dsRNA'nın hipovirülenslik ile ilişkili olabileceği düşünülerek gelecekte biyolojik mücadelede kullanılabilmesi ifade edilmiştir (Zhang vd., 2015). Daha sonra Zhang vd. (2020) yılında patlıcandan izole edilen *P. vexans* (PvHZ002) izolatlarında *Partitiviridae* familyasında, 2 segmentli dsRNA1 (1,662 bp) ve dsRNA2 (1,628bp) *Phomopsis vexans partitivirus 1* (PvPV1) olarak isimlendirilen yeni bir mikovirüs saptanmıştır (Zhang vd., 2020). Çalışmada Morris ve Dodds (1979) yöntemi ile dsRNA izole edilmiş ve ardından rastgele heksanükleotid primerlerini ile cDNA kütüphanesi oluşturularak sekans analizleri yapılmıştır. Sekans sonucunda elde edilen veriler erişim numaraları (MT711194 ve MT711195) ile GenBank veri tabanına kaydedilmiştir.

2.5. Türkiye’de Mikovirüsler Üzerinde Çalışmalar:

Ülkemizde yapılan birçok çalışma, mikovirüslerin funguslar üzerindeki etkisini ortaya çıkarmak yönündedir. Bu etkinin virülensi düşüren dsRNA partiküllerinden kaynaklandığı tespit edilmiş ve çalışmalar virüsle enfekteli fungusların biyolojik mücadelede kullanılabilme olanakları üzerinde yoğunlaştırılmıştır. Genellikle mikovirüs konusundaki çalışmalar, kestane kanserine neden olan *Cryphonectria parasitica*’nın hipovirüent ırklarının belirlenmesi ve biyolojik mücadelede kullanılması üzerinde olmuştur. *C. parasitica* da hipovirülensliğe neden olan *Cryphonectria hypovirus I* (CHVI) ülkemizde varlığı Karadeniz ve Marmara Bölgelerinde klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmiştir (Akıllı vd., 2013; Çeliker ve Onoğur 2006 ve Gürer vd., 2001). Bu iki bölgede doğal olarak hipovirülensliğin yayıldığı ve kestane kanserini kontrol ettiği gözlemlenmiştir. Bunun üzerine yapay olarak hipovirulent izolatların kestane alanlarına uygulanması üzerine çalışmalar yürütülmüştür. İlk olarak ülkemizde yerel hypovirüent izolatların bahçe koşullarında uygulama çalışmaları Çeliker ve Onoğur (2006) tarafından 2002 ve 2005 yılları arasında Manisa ilinin Hacısalar köyünde yapılmış ve hypovirüent strain uygulanan bazı kanserlerin iyileştiği görülmüştür.

Aydın Yöresinde yapılan çalışmalarda dsRNA içeren etkin bir *C. parasitica* izolatı bulunmamış (Açıkgöz vd., 2009) ve diğer bölgelerde olduğu gibi doğal bir iyileşme de tesbit edilmemiştir. Yörede hastalık kestane ağaçları üzerindeki tahribatını sürdürmüştür. Bunun üzerine Karadeniz ve Marmara Bölgelerinden elde edilecek hypovirüent strainler kullanılarak Aydın yöresi kestaneliklerinde biyolojik mücadele gerçekleştirmek amacıyla “Hypovirüent Strainleri Kullanılarak Kestane Kanseri Hastalığı ile Biyolojik Mücadele Olanaklarının Araştırılması ve Uygulanması” konulu (TÜBİTAK-1001-1140403 BF-01) proje Prof. Dr. Ömer ERİNCİK yürütücülüğünde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında en etkin hypovirus izolatının elde edilmesi için çok sayıda CHV1 virüs izolatı üzerinde kapsamlı fenotipik ve genetik araştırmalar yapılmıştır.

Fitopatojenik funguslardaki virüslerin varlığının belirlenmesi üzerine devam etmekte olan çalışmalar, yeni mikovirüslerin tanımlanmasına ve literatüre kazandırılmasına olanak sağlamaktadır. Nitekim bugüne kadar hypovirüent strainlerin varlığını ortaya koymak ve bu strainler kullanılarak fungal etmenlerle mücadele olanaklarını belirlemek amacıyla çok sayıda çalışma yürütülmüştür. Fungal virüslerin belirlenmesi, fungus misellerindeki dsRNA

varlığının tespiti ile başlamaktadır. Bu amaç doğrultusunda araştırmacılar pek çok önemli fungal bitki patojenlerinden mikoviral dsRNA'yı Morris ve Dodds (1979), Valverde vd. (1990) ve bu yöntemlere benzer diğer metodlar kullanarak izole etmişlerdir (Domingo vd., 2014; Khalifa vd., 2016; Strauss vd., 2000 ve Zhang vd., 2018).

Fungal virüsler ile ilgili çalışmalarda çok sayıda örnek ile çalışma gereği, daha pratik ve güvenilir dsRNA izolasyonu yöntemi arayışını beraberinde getirmiştir. Hipovirulent olabileceği belirlenen *C. parasitica* izolatlarında dsRNA varlığının belirlenmesi için iki farklı (Balijja vd., 2008; Morris ve Dodds, 1979) yöntem kullanılarak karşılaştırılan çalışmada iki yöntemin de fungal misellerden mikoviral dsRNA'yı izole etmek için uygun olduğu saptanmıştır (Mersin vd., 2018). Balijja vd. (2008) tarafından geliştirilen yöntemin 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 sağlayacağı ifade edilmiştir (Mersin vd., 2018). Özellikle çok sayıda fungal izolat ile yapılacak dsRNA izolasyonlarında araştırmacıya zaman kazandırması önemli bulunmuştur. Elde edilen dsRNA'lar ile RT-PCR yapılarak *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) un tanısı yapılarak çalışma doğrulanmıştır (Mersin vd., 2018).

Aydın yöresinde pamuk üretiminde solgunluk hastalığına neden olan *Verticillium dahliae* izolatlarında belirlenen dsRNA'ların tanılanması amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Aydın pamuk alanlarından elde edilen 72 *V. dahliae* izolatının 12'sinde dsRNA profili saptanmıştır (Balcı ve Açıkgöz, 2019). Pamukta *V. dahliae* mikovirüsüne özgü tasarlanan bir primer olmadığı için zeytin *Verticillium dahliae partitivirus 1*-olive (VdPV1-ol) mikovirüsüne ait primer (Canızares vd., 2015) ve rastgele hegzamer primeri ile bu dsRNA virüsünü tanılamamıştır.

Aydın yöresinde ekonomik anlamda önemli olan pamuk, kiraz, zeytin ve asma ürünlerde hastalıklara neden olan bazı funguslarda dsRNA mikovirüs varlığını belirlemek amacıyla 2016 yılında bir çalışma planlanmıştır. Çalışmada asmada 80 *Phomopsis viticola* izolatının sekizinde, zeytinde 50 *Verticillium dahliae* izolatının birinde, pamukta 50 *V. dahliae* izolatının üçünde, pamukta 50 *Rhizoctonia solani* izolatının altısında ve kirazda 50 *Leucostoma* spp. izolatının üçünde dsRNA profili elde edilmiştir (Hosseinizadeh vd., 2020). dsRNA'ların tahmini moleküler boyutlarının yaklaşık 12 ila 20 kb arasında değişmekte olduğu saptanmıştır. Bir çeşit tarama niteliğinde olan bu araştırma; asmada *P.*

viticola izolatları için orijinal bir bulguya ulaşılmasını sağlamış ve bu doktora çalışması için de temel oluşturmuştur.

2.6. Yeni Nesil Gen Dizileme Teknolojilerinin Virüs ve Mikovirüslerin Tanılanmasında Kullanımı

21. yüzyılın en önemli moleküler biyoloji araçlarından biri olan Yeni Nesil Dizileme YND (Next Generation Sequencing- NGS) yüksek verim ve düşük maliyeti sayesinde geleneksel Sanger dizleme yönteminin yerini almıştır (Hosseinizadeh ve Açıköz, 2021). 2005 yılında ilk kez Yeni Nesil Dizileme teknolojisi-YND, 454 prodizileme teknolojisinin kullanımı ile ticari olarak Solexa firması tarafından erişilebilir duruma getirilmiştir (Hosseinizadeh ve Açıköz, 2021; Mardis, 2011 ve van Dijk vd., 2014). 2007 yılında Solexa GA firması tarafından geliştirilen Illumina'nın genom sentez dizileme (<http://www.illumina.com>) sistemi her çalışmada 50 milyar baza (Bbp) kadar okuma yapılabilen ve en son modeli her çalışmada 85 bp'e ulaşılabilmiştir (Cock vd., 2010; Kulski, 2015). Son yıllarda geliştirilen diğer YND sistemleri arasında yer alan; Helicos sequencer (<http://www.helicosbio.com/>), Life Technologies Ion Torrent PGM sequencer (<http://www.iontorrent.com>), Pacific Biosciences (<http://www.pacificbiosciences.com/>) single molecule real-time (smrt) sequencer ve Oxford Technologies Nanopore (Oxford, UK) single molecule sequencer sistemleri kullanıma sunulmuştur (Ion-Torrent, 2017; Kızmaz vd., 2017; Nanopore, 2017 ve PacBio, 2017).

YND ile bitki tüm viral genom dizilemesi 2009 yılında Adams vd. (2009) tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar *Pepino mosaic potexvirus* (PepMV) enfekteli domates bitkisinden cDNA dizisi üretmek için metagenomik analiz ile YND'i birleştirerek kullanmışlardır. Daha sonra bilinmeyen bir patojenle enfekteli *Gomphrena globosa* bitkisine uygulanmış ve sonuçta bu bitkinin 'Gayfeather mild mottle virüs' olarak adlandırılan yeni bir *Cucumovirus* ile enfekteli olduğu belirlenmiştir (Adams vd., 2009). Bundan sonra YND yöntemi tüm yeni virüslerin tanılanmasında kullanılan viral genom dizileme sürecini hızlandırmıştır. Aynı yıl YND ile virüs enfekteli simptomsuz tatlı patateslerden small RNA'ların deep sequencing'i ile tüm genom dizilemesi yapılmıştır (Kreuze vd., 2009).

Coetzee vd. (2010) ise deep sequencing analiz yöntemini kullanarak virüs enfekteli asmadan Güney Afrika bağlarında bilinen dört viral etmenin genom dizilemesini

yapmışlardır. Aynı araştırmacılar mikovirüs enfekteli fungal izolatlardan elde ettikleri viral dsRNA fraksiyonları ile tüm genom dizilimi gerçekleştirmişlerdir. dsRNA genom dizelemesi Illumina Genome Analyzer II sentezleme yöntemi kullanılarak yapılmış ve 837 megabazlık metagenomik dizi elde edilmiştir. Al Rwahnih vd. (2011) asmada *Chrysoviridae*, *Hypoviridae*, *Narnaviridae*, *Partitiviridae* ve *Totiviridae* familyasında yer alan bazı mikovirüslerin dizilimini yine YND kullanarak tesbit etmişlerdir. Daha sonra *Maize chlorotic mottle virüs* (MCMV) ve *Sugarcane mosaic virüs* (SCMV)'unun genomlarının tanılanması ve karakterizasyonu için YND uygulanmış ve yöntemin viral etmenlerin hızla tanılanması için uygun bir teknik olduğu ifade edilmiştir (Adams vd., 2013). Espach vd. (2013) asma bitkisinde *Chalara elegans* ve *S. sclerotiorum* izolatlarından Valverde vd. (1990)'nin yöntemine göre dsRNA izolasyonu yapıp ScriptSeq™ v2 RNA-Seq cDNA kiti (Epicenter) ile random hexamer primer kullanarak cDNA kütüphanesi sentezlemişlerdir. Bunu takiben YND (Illumina HiScanSQ) yöntemi ile dizi analizi yapmışlar ve bu mikovirüslerin NCBI'da *Endornavirus* cinsinde *Chalara elegans endornavirus* 1-(CeEV-1) ve *Sclerotinia sclerotiorum partitivirus S-like* olduklarını belirlemişlerdir. Ayrıca bu mikovirüslerin ORF (ORF finder) tanısı ve protein alanı belirlemek için NCBI programı kullanılmıştır. Bu yeni *Endornavirus*'ün RdRp aa sekansları, sekans bilgisi diğer bilinen 15 *Endornavirus* ile karşılaştırılarak 1000 bootstrap yinelemeli olarak UPGMA yöntemi ile filogenetik ağacını oluşturmuşlardır.

Adams vd. (2013) *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) ve *Sugarcane mosaic virus* (SCMV)'unun genomlarının tanılanması ve karakterizasyonu için YND uygulamış ve yöntemin viral etmenlerin hızlı tanılanması için uygun bir teknik olduğunu ifade etmişlerdir. Devam eden süreçte YND yöntemi kısa sürede virüslerin genomlarının dizilemesi için popüler bir yöntem haline gelmiştir. Nitekim bağlarda düşük miktarda virüs enfeksiyonları da dahil olmak üzere agronomik önemdeki virüslerin saptanmasında standart biyolojik testlerin yerine yeni nesil dizileme (YND) analizinin kullanılmasının daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir (Al Rwahnih vd., 2015).

Hadidi vd. (2016) 2009 yılından beri bitki virolojisinde uygulanmakta olan NGS'nin küçük RNAs, RNA-DNA bitki virüs ve viroid genomlarını hızlı, güvenli ve düşük maliyetle sekanslama olanağını sunduğunu vurgulamışlardır. Bu yöntem hızlı ve güvenilir olması nedeniyle kısa sürede daha önce bilinmeyen patojenlerin ve viral genomların dizilenmesine olanak vermiş ve genom dizileme sürecinin hızlandırılmasını da sağlamıştır (Hadidi vd., 2016). YND tekniklerinin gelişmesiyle birlikte son yıllarda birçok araştırmacı, bu teknolojiyi

kullanarak farklı bitki fungal hastalık etmenlerinde bulunan bazı mikovirüsleri güvenilir ve hızlı bir şekilde tanımlanmasını ve karakterizasyonunu İllumina dizileme platformlarını kullanarak yapmışlardır (Bartholomaeus vd., 2016; Hrabakova vd., 2017; Li vd., 2020; Marvelli vd., 2014; Wang vd., 2019 ve Wang vd., 2020). Donaire vd. (2016), Pandey vd. (2018) ile Kocanova vd. (2020) asmada fungal hastalıklarına neden olan bazı fungal etmenlerde bu teknikleri kullanarak yeni mikovirüsler saptamışlardır. Ayrıca son yıllarda *Phomopsis* türünden olan ve soya fasulyesinde tohum çürümmesine yolaçan *P. longicolla* ve patlıcanda patlıcan yanıklığına neden olan *P. vexans* etmenlerinden yeni mikoviral dsRNA'lar YND dizileme tekniklerini kullanarak Hrabakova vd. (2017) ve Zhang vd. (2020) tarafından tanımlanmıştır. Böylece bu teknolojiler sayesinde birçok yeni mikovirüsün tanımlanması güvenilir ve hızlı bir şekilde mümkün olmuş ve mikovirüslerin taksonomisine de katkı sağlamıştır. Donaire vd. (2016) asmada kurşuni küf hastalığına neden olan *B. cinerea* izolatından total RNA izole etmişler ve YND dizileme teknikleri (Illumina platformu HiSeq2000) ile cDNA kütüphanesi, DNA sekanslaması ve biyoinformatik analizler sonrası Emaravirus cinsi ve *Bunyaviridae* familyasından olan yeni mikovirüs, *Botrytis cinerea* negative-stranded RNA virus 1 sekans verilerini Gen bankasına kaydetmişlerdir. Hrabakova vd. (2017) *P. longicolla* izolatından izole edilen dsRNA'yı DNA dizi analizi için Illumina platformunu kullanmışlar ve ourmia-like mikovirüsüne benzer yeni bir mikovirüsü (*Phomopsis longicolla* RNA virusu 1) saptamışlardır. ABD bağ alanlarında küllemeye neden olan *Erysiphe necator* izolatlarından elde edilen dsRNA'lar Illumina Hi Seq 2000 platformu kullanarak yüksek verimli sekanslama (high-throughput sequencing) ile dizi analizi yapılarak *Erysiphe necator partitivirus* 1, 2 ve 3 (EnPV 1-3) ve *Erysiphe necator mitovirus* 1, 2, ve 3 (EnMV 1-3) mikovirüsleri saptanmıştır (Pandey vd., 2018). Asmada önemli bir olan patojen *D. rudis* izolatlarından izole edilen mikoviral dsRNA'ların RNA high-throughput sequencing teknikleri kullanılarak sekans analizleri yapılmış ve *Diaporthe rudis mitovirus* 1 (DrMV1) mikovirüsü saptanmıştır (Kocanova vd., 2020). Zhang vd. (2020) *P. vexans* izolatından *Partitiviridae* familyasına ait olan 2 segmentli (dsRNA1 ve dsRNA2) *Phomopsis vexans partitivirus* 1 (PvPV1) yeni mikovirüsünü YND dizileme tekniklerini kullanarak tesbit etmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

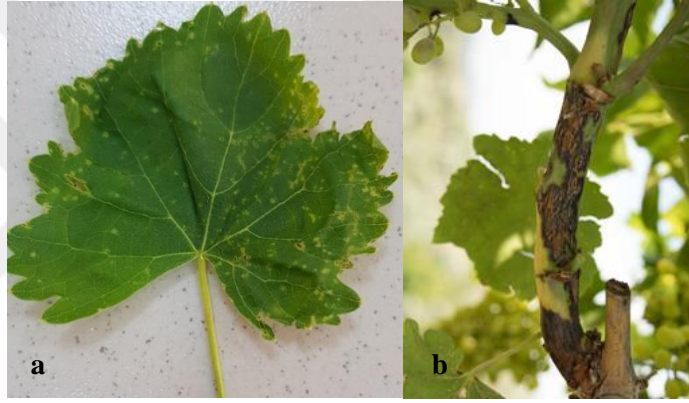
Bu araştırma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü sera, iklim odası ve laboratuvarında yürütülmüştür. Ege Bölgesinde en yoğun asma yetiştiriciliği yapılan Manisa, İzmir, Denizli ve Aydın illeri ve ilçelerinden ölükol hastalığı belirtisi sergileyen asmalardan alınan 416 sürgün örneğinden elde edilen 232 adet fungal izolat ile çalışılmıştır. *P. viticola* olduğu belirlenen 214 izolatın dsRNA içeren 125'i ile çalışma sürdürülmüştür. dsRNA içeren ve içermeyen 3 *P. viticola* izolatı biyolojik özelliklerin karşılaştırılmasında kullanılmışlardır. Agar jelde en iyi dsRNA profil görüntüsü veren 50 izolattan dikey taşınmada en iyi performans gösteren 12 izolat virülenslik ve yatay taşınım testlerinde kullanılmak üzere seçilmişlerdir. Vegetatif uyum grupları dsRNA pozitif 125 izolat ile yapılmıştır. Tüm genom dizi analizi için, uygulanan testlerde en iyi performansı gösteren ve dsRNA jel elektroforez görüntüsü en iyi olan 6 adet dsRNA pozitif izolat kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Ölükol Hastalığı Belirtileri Sergileyen Omcalardan Fungal Örneklerin Elde Edilmesi

Ege Bölgesinin Aydın (Koçarlı, Nazili ve Kuşadası), Denizli (Çal, Buldan ve Güney), Manisa (Alaşehir, Salihli ve Saruhanlı) ve İzmir (Menemen, Kemalpaşa ve Bayındır) illerinden ölükol hastalık etmeni *P. viticola* izolatlarının elde edilmesi için 2018 yılının üretim sezonu içerisinde saha çalışmaları yapılmıştır. Arazi çalışmaları sırasında omcaların sürgünlerinde siyah lekeler, çatlamış kabuk dokuları ve yapraklarda sarı küçük lokal lekeler gibi (Resim 3.1) ölükol hastalığının belirtilerini gösteren bitkilerden sürgün örnekleri toplanmıştır (Resim 3.2). Hastalık belirtilerinin olduğu sürgünler dip kısımlarından 5-10 cm

uzunluğunda olacak şekilde budama makası ile kesilmiş ve her bir bitkiden örnek aldıktan sonra bağ makası %2 lik çamaşır suyu ile dezenfekte edilmiştir. Örneğin alındığı omcanın coğrafik koordinatları GPS ile kayıt edilmiştir (Resim 3.3). Alınan örnekler etiketlenerek kâğıt torbalar içerisine yerleştirilmiş ve gün içerisinde buz kutusunda muhafaza edilmiştir. Gün sonunda, örnekler Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji laboratuvarına getirilmiştir. Örnekler izolasyon işlemlerine kadar +4 °C buzdolabında muhafaza edilmişlerdir. Arazi çalışmalarında illere göre toplam örnek sayıları Çizelge 3.1’de gösterilmiştir. Çizelge 3.1’den anlaşılacağı gibi Aydın’dan 90, Denizli’den 62, Manisa’dan 99 ve İzmir’den 165 adet sürgün örneği toplanmıştır. Arazi çalışmaları sonunda toplam 416 hastalıklı örnek sayısına ulaşılmıştır.



Resim 3.1. Asmalarda ölükol hastalık belirtileri a) yapraklarda sarı klorotik lekeler b) sürgünlerde siyah lezyonlar



Resim 3.2. Hastalık belirtisi sergileyen omcalardan örnekleme çalışmalarının görüntüleri



Resim 3.3. Ege Bölgesi bağ alanlarında ölükol hastalığı simptomları gösteren sürgün örneklerinin alındığı lokasyonların GPS harita konumları

Çizelge 3.1. Hastalık belirtisi gösteren bitkilerden alınan örnek sayılarının Ege Bölgesi il ve ilçelerine göre dağılımları

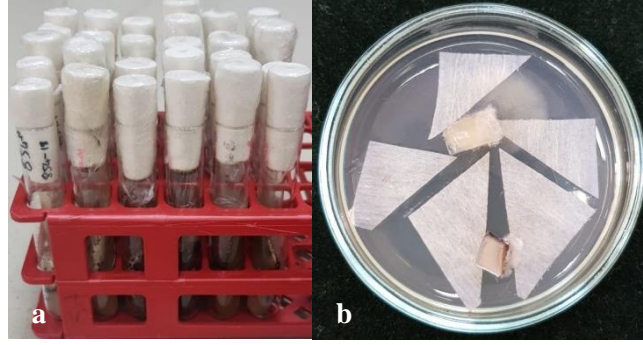
İller	İlçeler	Örnek sayıları
Aydın	Nazilli	32
	Koçarlı	11
	Söke	5
	Kuşadası	42
Ara Toplam		90
Denizli	Çal	20
	Güney	9
	Buldan	33
Ara Toplam		62
Manisa	Salihli	43
	Alaşehir	24
	Saruhanlı	34
Ara Toplam		99
İzmir	Selçuk	30
	Bayındır	53
	Efem Çukuru	4
	Urla	8
	Menemen	49
	Kemal Paşa	21
Ara Toplam		165
Genel Toplam		416

3.2.2. Fungal Örneklerin İzolasyonu, Saflaştırması ve Miselyal Koloni Değerlendirmeleri

Laboratuvara getirilen ölükol hastalık belirtisi gösteren sürgün örneklerinin simptomlu kısımlarından steril bistüri yardımıyla parçalar kesilmiş ve %2'lik sodyum hipoklorit içinde 2 dakika süre ile yüzeysel olarak dezenfekte edilmiştir. Steril damıtık suda 2 kez durulanıp takiben steril filtre kağıtları arasında kurutulan örnekler petri kaplarında bulunan patates dekstroz agar (PDA) üzerine yerleştirilerek karanlık koşullarda 24 °C'de inkübe edilmişlerdir (Resim 3.4). Görsel olarak değerlendirilecek büyüklüğe ulaşan miselyal koloniler makroskobik ve mikroskobik olarak incelenmiştir. Beyaz veya gri renkte gelişen kolonilerin görsel olarak *P. viticola*'ya ait olabileceği düşünülerek yeni PDA ortamlarında saflaştırılmıştır. Saflaştırılan 232 adet izolat PDA ortamında inkübatörde 24 °C'de 7 gün süre ile gelişmeye bırakılmışlardır. Saflaştırmanın ardından; her bir izolat eğik agar tüplerde geliştirilerek kısa süreli saklama amaçlı +4 °C'de buzdolabına kaldırılmışlardır. Her bir izolat PDA üzerine yerleştirilmiş steril filtre kağıtları üzerinde geliştirilerek, kağıtların hiflerle kolonize olmaları sağlanmış ve ardından bu kağıtlar steril koşullarda kurutulularak steril kağıt zarflar içerisinde uzun süreli saklamak amacıyla -20 °C'de saklamaya alınmıştır (Resim 3.5). Tüm izolatlar her iki yöntem ile koruma altına alınmıştır.



Resim 3.4. Asma sürgün örneklerinden fungus izolasyonunun aşamaları; a) siyah çatlaklı lekelerin görünümü b) siyah ve çatlaklı dokulardan parça alınması c) doku parçalarının yüzeysel dezenfeksiyonu



Resim 3.5. a) *Phomopsis spp.* izolatlarını muhafaza amaçlı eğik agarda kısa süreli b) besi ortamındaki filtre kâğıtlarının üzerinde uzun süreli saklamak amacıyla geliştirilmesi

3.2.3. Fungal İzolatların Kültürel Özelliklerinin Değerlendirilmesi

P. viticola olduğu düşünülen toplam 232 fungal izolat besi ortamında kültürel özellikleri yönünden daha detaylı incelenmişlerdir. Bunun için PDA üzerinde aktif olarak gelişen her bir izolata ait kolonilerin kenar kısımlarından alınan 4 mm çapındaki diskler, içinde PDA bulunan 9 cm'lik petrilerin orta kısmına yerleştirilmiş ve sonrasında izolatlar inkübatörde 25 °C'de 7 gün karanlık koşulları takiben 7 gün aydınlık ortamda inkübasyona bırakılmışlardır. Her bir petrinin bir tekerrür olarak değerlendirileceği bu çalışma üç tekerrürlü olarak yapılmıştır. Toplam 696 fungal izolat kültürel özellikleri yönünden inkübasyonun 3., 7. ve 14. günlerinde değerlendirilmiş ve kaydedilmiştir.

3.2.3.1. Miselyal Gelişimleri ve Koloni Gelişme Hızları

Fungal izolatın besi ortamında 24 °C'de miselyal gelişimleri ve koloni gelişme hızları koloni çapları birbirini dik kesen iki noktadan inkübasyonun 3., 7. ve 14. günlerde cetvelle ölçülerek belirlenmiştir. Tüm izolatlar koloni çaplarının ortalamasına göre üç farklı grup altında gruplandırılmıştır. Bu grupların oluşturulmasında koloni çap aralıkları ise şöyle belirlenmiştir; izolat setinde en düşük ortalama çapa sahip izolatın değerinden en yüksek ortalama çapa sahip izolatın değeri çıkarılmış ve bu değer üç farklı çap grubu (Grup I: Yavaş, Grup II: Orta hızlı ve Grup II: Hızlı) oluşturmak için 3'e bölünmüştür. Elde edilen değerler grupların çap aralığını hesaplamada kullanılmıştır.

Örnek: İzolatların en yüksek ortalama çap değeri: 7 cm

İzolatların en düşük ortalama çap değeri: 3,51 cm

$$7-3,51=3,49$$

$$3,49:3=1,16$$

- Birinci grup tavan değeri hesaplama: $3,51+1,16=4,67$ →1. grup çap aralığı: 3,51 cm–4,67 cm (Ortalama apı 3,51 cm ile 4,67 cm arasında olan izolatlar bu grupta yer alacaktır)
- İkinci grup tavan değeri hesaplama: $4,67+1,16=5,83$ →2. grup çap aralığı: 4,68 cm–5,83 cm (Ortalama apı 4,68 cm ile 5,83 cm arasında olan izolatlar bu grupta yer alacaktır)
- Üçüncü grup çap aralığı: $5,84-7=1,16$ →3. grup ap Aralığı: 5,84 cm-7 cm (Ortalama apı 5,84 cm ile 7 cm arasında olan izolatlar bu grupta yer almıştır)

3.2.3.2. Piknit Oluşumu

İzolatların piknit oluşumu inkübasyonun dördüncü haftasında değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmelerde her bir petri kabının tesadüfi olarak seçilen 1cm^2 'lik dört farklı alanında piknit yoğunluğu belirlenmiştir. Ölçüm yapılacak alanın belirlenmesinde agar yaklaşık 1cm^2 lik bir alan oluşturan bir mantar delici kullanılmıştır. Stereomikroskop altında kesili alanda aşağıdaki skala kullanılarak piknit sayısı tahmin edilmiştir (Resim 3.6). Bu yoğunluğun ölçülmesinde geliştirilen 0-4 skalası kullanılmıştır.

0-4 skalası; 0: piknit yok, 1: piknit sayısı 1-25, 2: piknit sayısı 26-50 3: piknit sayısı 50-100 4: piknit sayısı >100



Resim 3.6. *Phomopsis* spp. izolatlarının piknit analizi a) Piknit yoğunluğu belirlemede sayım yapılan alanlar, b), stereomikroskop altında piknit görünümü c) ve sayımı.

3.2.3.3. Koloni Renkleri ve Spor Oluşumları

İzolatların 3, 7. ve 14. günlerinde kolonilerin renk tiplerine (W, beyaz renkli koloni, G, gri renkli koloni ve kahve renkli koloni) yönünden değerlendirilmiş ve elde edilen veriler excell de kayıt altına alınmıştır. İnkübasyonun dördüncü haftasında izolatların α (alfa sporlar, tek hücreli, renksiz) ve β (beta sporlar, renksiz ince ve uzun ve tek hücreli) sporların değerlendirilmesi için her bir izolatın 3 tekrüründen tesadüf olarak bir petri kabı seçilmiş ve 25 adet alfa (α) konidi, bulunması durumunda ise 25 adet beta (β) konidinin boyutları mikroskop (Leica DFC320) altında Labsens bilgisayar programı (www.olympus-sis.com) kullanılarak ölçülmüştür (Kanematsu vd., 2000; Uecker, 1998).

3.2.4 Fungal İzolatların Moleküler Tanısı

İzolatların kültürel özellikleri değerlendirildikten sonra izolatların moleküler tanısı için DNA ekstraksiyonu ve ardından PCR yapılmıştır.

3.2.4.1 *Phomopsis viticola*'nın DNA İzolasyonu

P. viticola izolatlarının DNA izolasyonu için kullanılacak 232 adet izolata ait miseller, PDA ortamı üzerine konulan steril sefon diskler üzerinde yerleştirilmiş ve inkübatörde 24 °C'de karanlık koşullarda 6-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sefon disklerde gelişen kolonilerden, yaklaşık 3×3 cm boyutlarında misel kitlesi steril kürdan ile alınarak 1,5 ml santrifüj tüplere yerleştirilmiş ve ardından DNA ekstraksiyonu Geçioğlu Erincik vd. (2020)'e göre aşağıda açıklandığı gibi yapılmıştır.

1. DNA ekstraksiyon için kullanılacak izolatlara ait miseller, PDA ortamı üzerine konulan steril sefon diskler üzerinde geliştirilerek elde edilmiştir.

2. İnkübatörde 24 °C'de karanlık koşullarda 6-7 gün inkübasyonun ardından sefon disklerde gelişen kolonilerden, yaklaşık 3×3 cm boyutlarında misel kitlesi steril kürdan ile alınarak 1,5ml santrifüj tüplere yerleştirilmiş ve ardından DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere -20 °C'deki derin dondurucuya kaldırılmıştır.

3. İçerisinde misel olan derin dondurucudaki tüpler, buz üzerinde 30 dakika bekletildikten sonra, içerlerine 1ml lysis buffer (Çizelge 3.2) ilave edilip vorteksde 1 dakika boyunca karıştırılmıştır.

4. Tüpler, 65 °C 15 dakika boyunca inkübasyona bırakılmış ve ardından tekrar 1 dakika vorteks ile karıştırılmış ve 5 dakika 12200 rpm'de santrifüj edilmişlerdir.

5. Santrifüjün hemen ardından tüplerden 1 ml supernatant yeni tüplere alınmıştır. Üzerine 200µl 7,5M amonyum acetat (NH₄Oac) ilave edilmiş ve vortekste 10 saniye karıştırılmıştır.

6. Tüpler, buz üzerinde 15 dakika bekletildikten sonra 3 dakika santrifüj edilmişlerdir.

7. Daha sonra her bir tüpteki süpernatanttan 850µl lik kısım pipetle dikkatle alınarak yeni tüplere aktarılmıştır.

8. Ardından tüplere 700µl isopropanol ilave edilmiş ve elde 20 kez çalkalandıktan sonra tüpler 5 dakika santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj sonrası süpernatantın tümü peletin düşmemesine dikkat edilerek dökülmüştür.

9. Ardından tüp içerisinde kalan pelet %70'lik ethanol ile 2 kez yıkanmıştır. Tüpler kısa süreliğine santrifüj edilmiş ve tüpün dibinde biriken ethanol pipetle çekilerek uzaklaştırılmıştır. Tüpler ağzı açık olacak şekilde laminar flow içerisinde yaklaşık 10 dakika süre ile kurumaya bırakılmıştır. En son olarak tüp içerisine 40µl steril ultra saf su ilave edilerek izolasyon tamamlanmıştır.

10. Elde edilen DNA'lar %1,5'lik agaroz jelinde DNA'nın varlığına bakılmış ve DNA'lar PCR da kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.2. Fungal izolatlarının DNA ekstraksiyonunda kullanılan lysis buffer içeriği

	Stok	Final	1 Tüp
Saf su			~600 µl
EDTA pH 8	0,5 M	50 mM	100 µl
Tris pH 8	1 M	100 mM	100 µl
SDS	% 20	% 3,50	175 µl
Proteinase K	20 mg/ml	250 ug/ml	12,5 µl
Sodium Bisulfite		% 1	0,01 g

3.2.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Elde edilen DNA'ların PCR ile tanısı için *Phomopsis viticola* End-Point PCR Kiti (Norgen, Biotek Corporation, www.norgenbiotek.com/ Canada) kullanılmıştır. Kit protokölüne göre; 10 µL MDx 2X PCR Master Mix, 2 µL *P. viticola* Primer Mix, 2,5 µl örnek DNA ve 5,5 µl steril saf ile toplam 20 µl'ye tamamlanmıştır. Thermal cyler içerisinde 40 döngü olarak planlanan PCR'da ilk denatürasyon 94 °C'de 3 dakika olarak başlanmış ve 94 °C'de 15 saniye denatürasyon, 60 °C'de 30 saniye annealing, 72 °C'de 45 saniye extension ve 72 °C'de 5 dakika final extension şeklinde uygulanmıştır. PCR ürünleri 150V, 30 dakika %1,4'lik agaroz jel elektroforezde ayrıştırılarak görüntülenmiştir. Moleküler ağırlık olarak 2000 bp DNA marker kullanılmış ve *P. viticola*'nın tanısı 300 bp moleküler ağırlık esas alınarak yapılmıştır. Ayrıca kitin içerisinde bulunan *P. viticola* negatif ve pozitif örnekler PCR'da kullanılmıştır.

3.2.5. Fungal İzolatlarda dsRNA Varlığının Belirlenmesi

PCR sonucunda *P. viticola* olarak tanısı yapılan 214 adet izolatın dsRNA varlığını belirlemek için Baliija vd. (2008) tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır. İzolasyonda dsRNA'ların bozulmasına mani olmak ve endojen RNazların aktivitesini sınırlı tutmak için eldiven kullanılmış ve izolasyon süresini kısa tutmak, RNase-free bileşikler kullanmak ve buzda çalışmak gibi önemli kurallara azami derecede dikkat edilmiştir. dsRNA izolasyon detayları aşağıda sunulduğu gibi uygulanmıştır;

dsRNA analizinde kullanılan miseller, izolatların patates dekstroz agar (PDA) ortamı üzerine serilmiş selefondisklerde geliştirilerek elde edilmiştir. Her bir izolatın miselyal diski selefondisk üzerine yerleştirildikten sonra 6-10 gün süre ile 24 °C'de inkubator içerisinde karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, selefondisk üzerine gelişen miseller steril kürdan ile alınıp tartıldıktan sonra alüminyum folyoya sarılıp -20 °C'deki derin dondurucuda kullanılmaya kadar saklanmıştır. Gerektiğinde, daha fazla misel elde etmek için izolatlar sıvı PDA ortamında cam tüpler içerisinde 10 gün süreyle 25°C'de karanlıkta gelişmeleri sağlandıktan sonra kağıt havlular arasında kurutulmuştur. Kurutulan miselyumlar dsRNA analizlerinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmışlardır. dsRNA ekstraksiyonundan önce miseller -80 °C'deki derin dondurucuda bir gece bekletilmiştir. Bu çalışmada Amerika'dan (The Connecticut Agricultural Experiment Station) Sandra L. Anagnostakis'den alınan *Cryphonectria parasitica* hipovirus USA-2 izolatı (yöntemin çalışıp çalışmadığını göstermek için) pozitif kontrol, dsRNA içermeyen *P. viticola* izolatı negatif kontrol ve HindIII-Eco R1 ile kesilmiş Lambda DNA marker olarak kullanılmıştır.

Baliija vd. (2008) Yöntemine Göre dsRNA İzolasyonu;

1. Fungal miselyum (100-200 mg) havan ve havan eli ile likit nitrojen yardımı ezilmiştir (Resim 3.7).

2. Ezilmiş olan miselyumlar içerisinde 600 µl EBA tampon solusyonu içeren 2 ml'lik tüplere aktarılmış +4 °C, 15 dakika, 16,110 g de santrifüj yapılmıştır.

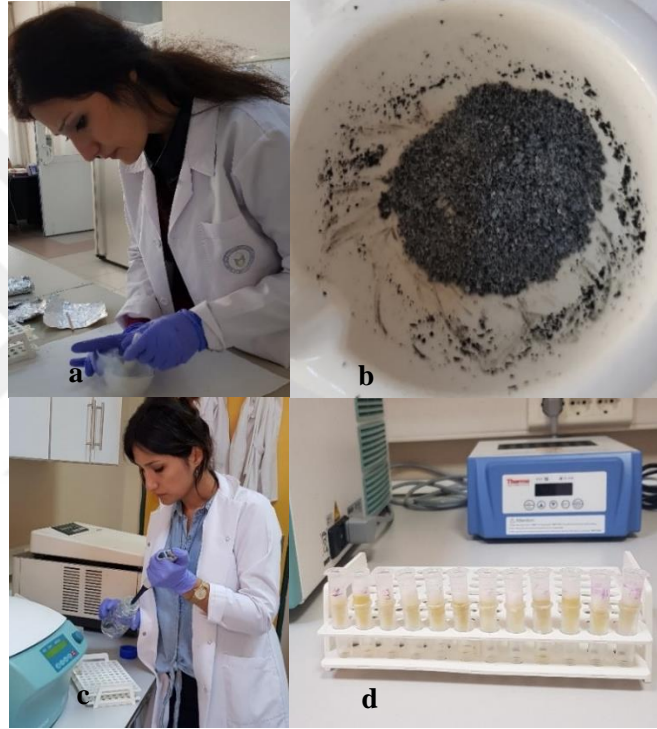
3. Süpernatant 1,5 ml lik tüplere aktarılıp ve üzerine etanol ilave edilerek karıştırılmıştır. Karışım daha sonra kolonlara (ultrafree MC sterille 0.65 Mm. Millipore) aktarılmış ve 100 g de santrifüj edilmiştir.

4. 2 kez 450 µl 1XSTE+EtOH (%20) uygulanarak yıkama işlemi yapılmıştır.

5. İki kez 400 µl 1×STE tampon solüsyon ile yıkanarak elde edilen dsRNA 2 ml lik toplama tüpleri içerisinde aktarılmış ve üzerine eşit miktarda isopropanol eklenmiştir.

6. Bunu takiben +4 °C'de, 30 dakika, 16,110 g'de santrifüj yapılmış ve tüpler kurumaya bırakılmıştır.

7. Daha sonra dsRNA'lar 20 µl RNase free su ile çözdürülmüş ve dsRNA profilleri %0,8 agaroz gelde TBE tampon solüsyon ile ayrıştırılarak analiz edilmiştir. dsRNA'lar jelde göç etme pozisyonlarına göre değerlendirilmiştir.



Resim 3.7. *Phomopsis viticola* izolatlarının Baliija vd. (2008) yöntemine göre dsRNA izolasyonu aşamaları; a) fungal miselyumun likit nitrojen yardımı ile ezilmesi b) ezilmiş olan miselyumlar (c ve d) 1×STE+EtOH (%20) ile yıkama işlemi

3.2.6. dsRNA Pozitif izolatların Biyolojik Yönden Karakterizasyonu

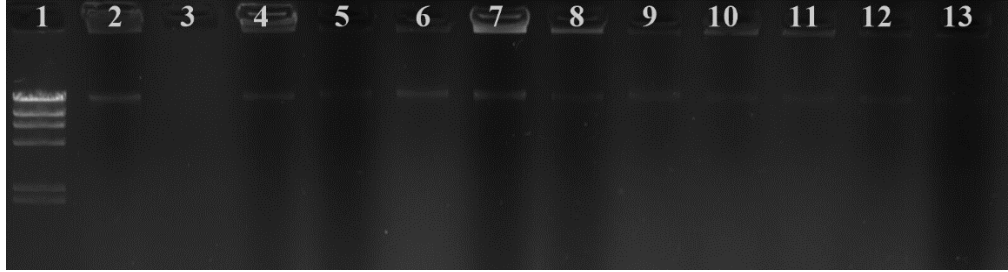
3.2.6.1. dsRNA İçeren ve İçermeyen *Phomopsis viticola* İzolatlarının Kültürel Özelliklerinin Karşılaştırılması

Bölüm 3.2.3 de anlatıldığı gibi kültürel özellikleri belirlenmiş olan izolatlardan seçilen dsRNA negatif üç izolat, dsRNA pozitif 125 izolat ile kültürel özellikleri yönünden karşılaştırılmıştır.

3.2.7. dsRNA Pozitif İzolatların Dikey Taşınma Kapasitesinin Ölçülmesi

Çalışmanın bu bölümünde agar jelde en iyi görüntü veren dsRNA profiline sahip olan izolatlar dsRNA pozitif izolatlar arasından dikey taşınma kapasitesinin ölçümü için seçilmişlerdir (Resim 3.8). Buna göre dsRNA profiline sahip tüm illeri temsil edecek şekilde İzmir'den 26, Aydın'dan 10, Manisa'dan 6 ve Denizli'den 8 izolat seçilmiş ve toplam dsRNA pozitif 50 adet izolat dikey taşınım testine alınmıştır (Çizelge 3.3). Bunun için ilk olarak izolatlar PDA ortamında floresan ışık altında geliştirilerek spor oluşturmaları sağlanmıştır (Resim 3.9 a). Her bir izolatın piknidyumlarından çıkan konidiler steril bir öze yardımıyla alınarak içerisinde steril su bulunan cam tüplere transfer edilmiş ve vortekste karıştırılarak spor süspansiyonları elde edilmiştir. Hemasitometrede spor sayımı yapılarak süspansiyonların spor konsantrasyonları belirlenmiş ve gerektiği miktarda su ile konsantrasyon 500 konidi/ml olacak şekilde seyreltilmiştir. Petri başına yaklaşık 50 konidi olacak şekilde spor süspansiyonu miktarı su agar ortamı üzerine homojen bir şekilde cam baget yardımı ile yayılmıştır. Ardından petriler 24 °C'de 12-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Denemede her bir izolat için üç petri inokule edilmiştir. Bir gün sonra mikroskop altında çimlendiği görülen ancak etraflarında başka çimlenen konidi olmayan konidilerden 12 adet (10 asil + 2 yedek) seçilerek öze yardımı ile yeni PDA ortamına aktarılmıştır (Resim 3.9 b ve c). PDA'da gelişme gösteren tek spor kolonilerden uzun süreli saklamak amacıyla içerisinde PDA bulunan tüplere stok kültürler hazırlanmıştır. Daha sonra her bir dsRNA pozitif izolatın 10'ar adet tek spor izolat ve 1 adet ebeveyn (original) izolat dsRNA analizi yapılmıştır. dsRNA analizi 3.2.5'de detayları verilen Balijja vd. (2008)

yöntemine göre yapılmıştır. dsRNA içeren toplam 50 izolattan elde edilen 500 tek spor ve 50 ebeveyn olmak üzere toplam 550 adet izolatın dsRNA analizi yapılmıştır.

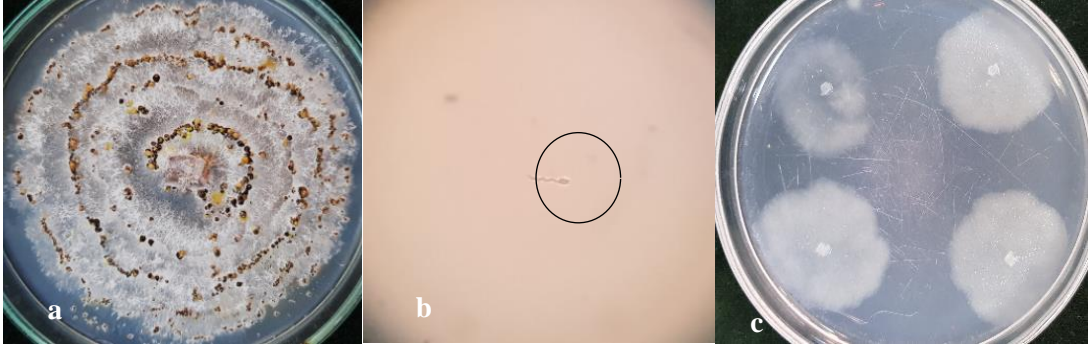


Resim 3.8. Dikey taşınma için seçilen *Phomopsis viticola* izolatlarının dsRNA elektroforetik jel görünümü 1) Marker, 2) USA-2 (pozitif kontrol), 3) dsRNA negatif, 4-9) iyi dsRNA profili görünümlü izolatlar (861Ç, 870Ç, 910M, 919M, 961M, 843Ku), 10-13) net görülmeyen dsRNA profili görünümlü izolatlar (763Ko, 1230Na, 1112Sa, 1135Sa)

Çizelge 3.3. Dikey taşınma testinde kullanılan dsRNA pozitif izolatların illere göre dağılımları

İller	İzolatlar
Aydın	841Ku, 809Ku, 847Ku, 843Ku, 809Ku, 812Ku, 828Ku, 770Sö, 1227Na, 1216Na,
Denizli	889G, 861Ç, 882Ç, 900Bu, 899Bu, 1248Bu, 1252Bu, 878Ç
Manisa	1124Sa, 1137Sa, 1108Sa, 1005Sr, 998Sr, 1207Al
İzmir	903M, 1091B, 1098B, 1027K, 1049B, 799Se, 910M, 1080B, 1032K, 1061B, 780Se, 962M, 961M, 1065B, 781Se, 919M, 784Se, 927M, 1036K, 785Se, 1095B, 947M, 1071B, 783Se, 1024K, 1045K

Not: Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Şöke; Ç Çal, Bu Buldan; Se Selçuk, M Menemen, Ef Efem Cukuru; K Kemalpaşa; B Bayındır; Sr Saruhanlı; Sa Salihli; Al Alaşehir



Resim 3.9. *Phomopsis viticola* tek spor izolatlarının elde edilmesi: a) sporulasyon için izolatların PDA ortamında geliştirilmesi, b) su agar ortamında çimlenen ve mikroskop altında görülen tek spor, c) tek spordan gelişen koloniler

3.2.8. dsRNA Pozitif *Phomopsis viticola* İzolatların Virülenslik Durumunun Belirlenmesi

3.2.8.1. Asma Bitkilerinin Yetiştirilmesi

P. viticola'ya duyarlı olduğu bilinen Sultani çekirdeksiz asma çeşidine ait toplam 200 adet tüplü asma fidanı 21.06.2019 tarihinde Manisa Göker Asma Fidancılığında satın alınmıştır. Fidanlar içeriğinde 1:1:1 oranında toprak, kum ve hayvan gübresi olacak şekilde hazırlanmış saksı toprağının bulunduğu 3 litre'lik saksılara şaşırtılmıştır. Bitkiler örtü altı sera koşullarında gelişmeye bırakılmış ve günlük olarak takipleri yapılmıştır (Resim 3.10). Gerekğinde sulanmış ve haftalık olarak NPK kompoze gübre ile gübrenmiştir. Buna ilave olarak 3 kez, 10 gün aralıkla %1 potasyum nitrat ile gübrenmiştir. Asmalarda *P. viticola*'ya karşı ontogenik bir dayanıklılık olması sebebiyle virülenslik teslerinde bitkilerin sürgün ucu dokularının sukkulent formda ve tüm bitkilerde homojen yapıda olması gerekmektedir. Bunun için yaz dönemi boyunca bitkiler gelişmeye bırakılmış ve sürgünlerin kalınlaşarak bitkilerin kuvvetlenmesi sağlanmıştır. Eylül ayında bitkiler gövdede alttan üç göz bırakılacak şekilde budanmıştır. Bitkiler, ADÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünün cam seralarında 20-28 °C sıcaklıkta ve 16 saatlik aydınlatılmış koşullarda gelişmeye bırakılmıştır. Gözler uygun sıcaklık koşullar altında budamadan 8-12 gün sonra açılmış ve her bitkide en güçlü olan göz gelişmeye bırakılarak diğerleri uzaklaştırılmıştır.

Bitkilerin sürgün uçları istenilen doku formuna geldiğinde bitkiler virülenslik testinde kullanılmıştır.

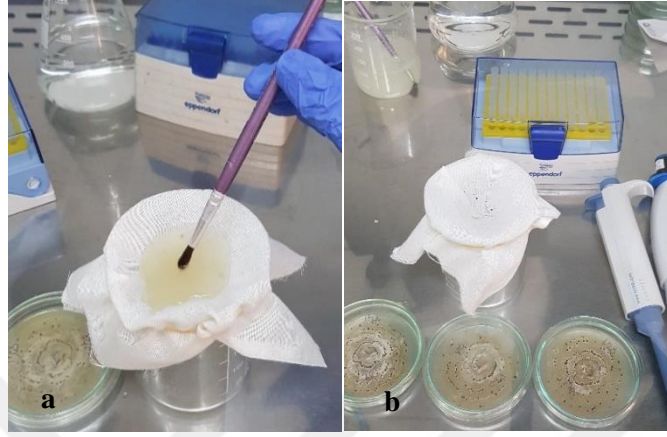


Resim 3.10. Uygun koşullar altında bakımı yapılarak yetiştirilen asma bitkileri

3.2.8.2. dsRNA Pozitif *Phomopsis viticola* İzolatlarından İnokulum Hazırlanması

dsRNA'nın dikey taşınım sonuçlarında en iyi geçiş performans olan izolatlar asma fidanlar üzerinde virülenslik testi için seçilmiştir. Toplam dsRNA pozitif 12 izolat ve negatif kontrol için dsRNA negatif 1 adet izolatı PDA ortamında 20 °C'de 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamda gelişmeye bırakılarak piknit ve konidi oluşumu teşvik edilmiştir (Erincik vd., 2001). Her bir izolat bir tekerrür olarak değerlendirilmiş ve çalışma 3 tekerrür olarak yapılmıştır. Böylece toplam 39 adet *P. viticola* izolatı besi PDA'da gelişmiştir. Gelişmenin 15. gününde kültürler üzerinde oluşan piknitlerden cirrus oluşturarak sıızan konidilerin (alpha spor) hasat edilmesi işlemine geçilmiştir. Bu amaçla kültürlerin üzerine steril saf su ilave edilerek ve yüzeye steril kıl fırça sürtülerek sporların suya karışması sağlanmış ve daha sonra steril tülbentten süzölmüştür (Resim 3.11a ve b). Elde edilen süspansiyon içerisindeki konidi konsantrasyonu hemasitometre yardımıyla mikroskop altında sayılmış ve

konsantrasyon mililitrede 1×10^6 alpha spor olacak şekilde süspansiyon seyreltilmiştir. Daha sonra sporların homojen bir şekilde bitki üzerinde yayılması ve tutunmasını sağlamak amacıyla süspansiyona % 0,05 oranında Tween 80 ilave edilmiştir.



Resim 3.11. *Phomopsis viticola* spor süspansiyonunun; a) steril kıl fırça sürülerek suya karışmasının sağlanması, b) steril tülbentten süzülmesi

Virülenslik testinde kullanılmak amacıyla serada yetiştirilen bitkiler arasında homojen gelişme gösteren ve sürgün uçları sukkulent dokuya sahip olanlar toplam 56 asma fidanı test materyali olarak seçilmiştir (Resim 3.12 a). Her bir izolat için hazırlanan spor süspansiyonu bitki yüzeyini iyice kaplayacak şekilde el spreyi kullanılarak püskürtülmüştür (Resim 3.12 b ve c). Püskürtme sırasında spor süspansiyonunun yıkanmamasına dikkat edilmiştir. Negatif kontrol bitkilerine sadece steril saf su uygulanmıştır. Daha sonra bitkiler iklim odasında üzerileri nemlendirilmiş şeffaf plastik torba ile örtülerek 20 °C'de 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır (Resim 3.12 d). İnkübasyondan sonra bitkiler seraya yerleştirilerek gelişmeleri sağlanmış ve hastalık gelişimi yönünden günlük olarak takip edilmiştir.



Resim 3.12. a, b, c) Asma fidanlarında; *Phomopsis viticola* spor süspansiyonu ile inokulasyon işlemleri, d) iklim odasında nemlendirilmiş şeffaf plastik torba ile örtülerek inkübasyona bırakılması

3.2.9. dsRNA Pozitif *Phomopsis viticola* İzolatlarında dsRNA'nın Yatay Taşınımı

3.2.9.1. İzolatların Vejetatif Uyum (vc) Tiplerinin Belirlenmesi

Toplam 125 adet dsRNA pozitif *P. viticola* izolatının yatay geçiş çalışmalarının yürütülebilmesi için öncelikle izolatların vejetatif uyum gruplarının belirlenmesi gerekmektedir. Ancak *P. viticola*'ya ait vejetatif uyum grupları hakkında literatürde

herhangi bir bilgi bulunmamakta ve diğerk bazı *Phomopsis* türlerinde vejetatif uyum grupları ve kestane kanseri etmeni *Cryphonectria parasitica* için kullanılan eşleştirme yöntemleri örnek alınarak belirlenmiştir (Brayford, 1990; Ploetz ve Shokes, 1986). Bu yöntemegöre; eşleştirmeler 1 litre PDA ya 1 mg biotin ve 100 mg methionine ilave edilerek hazırlanan PDAmb besi ortamı üzerinde yapılmıştır (Anagnostakis, 1977). Eşleştirmelerde iki izolat, aralarında 3-4 mm olacak şekilde besi ortamı üzerine yerleştirilmiş ve daha sonra 7 gün karanlık ve ardından 7 gün 12 saat aydınlık koşullarda gelişmeye bırakılmıştır. Eşleştirmeler PDAmb ortamı içeren 9 cm çapındaki petri kapları içerisinde her petride 6 izolat eşleştirilerek gerçekleştirilmiştir. Deneme üç tekerrürlü ve her tekerrürde bir petri olacak şekilde yürütülmüştür. Denemenin 14. gününde eşleştirilen izolatların kolonileri görsel olarak incelenmiş ve kolonileri birleşmiş olan çiftler uyumlu yani aynı ve grubunda, kolonileri birleşmeyerek aralarında baraj oluşturanlar ise uyumsuz yani farklı ve grup olarak kabul edilmiştir.

3.2.9.2. dsRNA Pozitif *Phomopsis viticola* İzolatlarının Yatay Taşınım Çalışmaları

Dikey taşınım ile geçiş yapan dsRNA pozitif *P. viticola* izolatlarının yatay olarak anastomozis yoluyla dsRNA negatif izolatlara taşınıp taşınmadığına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu test için, dsRNA pozitif izolat (verici) ile dsRNA negatif izolat (alıcı) aynı petride aralarında anastomozis yapabilmeleri için yanyana geliştirilmişlerdir (Anagnostakis ve Day, 1979). Bunun için eşleştirilecek izolat çiftine ait misel diskleri petri kabının kenar kısmından 5 mm iç kısmına gelecek ve aralarında 3-4 mm olacak şekilde PDA besi ortamına yerleştirilmiş ve 24 °C’de 16 saat/gün’lük aydınlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince her gün izolatların gelişmeleri takip edilmiştir. İki koloninin birleştiği nokta cam yazar kalem ile petrinin alt yüzü çizilerek işaretlenmiştir. Deneme üç tekerrürlü ve her tekerrürde bir petri ve her petride iki eşleştirme olacak şekilde yapılmış ve toplam 72 adet *P. viticola* izolatında yatay taşınım denemesi yapılmıştır. İnkübasyonun 14. gününde, dsRNA’nın yatay taşınım ile taşınıp taşınmadığını kontrol etmek için alıcı kolonilerden yeni izolatlar elde edilmiştir. Bunun için her bir alıcı koloniden bir miselyal disk parçası alınıp yeni PDA besi ortamına transferi yapılmıştır. PDA da gelişmelerinin ardından alıcı yeni izolatların koloni morfolojileri incelenmiştir. Kestane Kanseri etmeni *C. parasitica*’da gözlemlenen dsRNA geçişi sonucu oluşan kolonideki renk değişimi *P. viticola* da

gözlemlenmemiştir. Bu nedenle alıcı kolonilerden elde edilen tüm izolatlarda dsRNA analizi yapılmasına karar verilmiştir. Toplam 72 adet alıcı izolatu ve 12 dsRNA pozitif (ebeveyn) izolatu yukarıda (3.2.5.) ifade edilen Balijja vd. (2008)'nin yöntemi kullanılarak dsRNA analizleri yapılmıştır.

3.2.10. dsRNA Virüslerinin Hipovirulenslik Üzerine Etkisi (2. Aşama Virülenslik Testleri)

dsRNA pozitif *P. viticola* izolatlarının yatay taşınım çalışmalarında belirlenmiş olan virülensliği yüksek virulent izolatlar (dsRNA negatif) ile bunların dsRNA pozitive dönüştürülen virulent (dönüşen sektör) izolatların *in vivo* da asma bitkisi üzerinde oluşturacakları hastalık şiddetleri karşılaştırılarak dsRNA'nın virülenslik üzerine olan etkileri belirlenmiştir. Bunun için ilk olarak dsRNA pozitif izolat kendisiyle ve yönden uyumlu bir virulent izolat ile besi ortamında eşleştirilerek hifsel anastomozis ile hypovirüsün virulent izolata geçmesi sağlanmıştır. Böylece bir izolatu virulent (dsRNA negatif) formunun yanında dsRNA pozitif formu da elde edilmiştir. Bu izolatlar yukarıda kısım 3.2.8'de verildiği gibi virülenslik testine tabi tutulmuştur (Resim 3.13). Her bir virulent izolatu virülensliği ve onun dsRNA pozitive dönüştürülmüş formu ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada toplam 3 virulent ve 10 dsRNA pozitive dönüştürülmüş *P. viticola* izolatu kullanılmıştır. Deneme dört tekerrürlü her tekerürde bir bitki (toplam 52 bitki) olacak şekilde kurulmuş, deneme sonucunda elde edinilen veriler SPSS programında analiz edilmiş ve excelde kayıt altına alınmıştır.



Resim 3.13. Asma fidanlarında ikinci aşama virülenslik testi; a) *Phomopsis viticola* spor inokulasyon işlemleri, b) iklim odasında nemlendirilmiş şeffaf plastik torba ile örtülerek inkübasyona bırakılması

3.2.11. Moleküler Karakterizasyon

Moleküler karakterizasyon çalışmasında kullanılacak dsRNA pozitif *P. viticola* izolatların seçiminde bu aşamaya gelinceye kadar yürütülen tüm biyolojik testler üzerinden Çizelge 3.4’de ifade edildiği gibi biyolojik mücadeledeki önem durumuna göre bir puanlama sistemi oluşturulmuş ve bu puanlamaya göre ümitvar hipovirüent özelliğe sahip izotatlardan en yüksek puana sahip olan 6 adet (889G, 861Ç, 780Se, 961M, 962M ve 1091B) dsRNA pozitif *P. viticola* izolatı moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

Çizelge 3.4. Moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılacak dsRNA *Phomopsis viticola* izolatlarının seçiminde kullanılan testlere göre puan tablosu

Puan Türü	Uygulanan Testler	Puan Değeri
P1	Sürgünde virülenslik	4: yüksek, 5: orta, 6: zayıf
P2	Yaprakta virülenslik	4: yüksek, 5: orta, 6: zayıf
P3	Yatay geçiş performansı	Yavaş (++) : 4 puan Orta (++++): 5 puan Hızlı (+++++): 6 puan
P4	Dikey geçiş performansı	Dikey geçiş yüzdesi/10: %40-60/10= 4 puan %70-80/10= 5 puan %90-100/10= 6 puan
P5	Sürgünde virülenslik azalma (%)	Virülenslikte azalma yüzdesi >12: 3 puan Virülenslikte azalma yüzdesi >5: 2 puan Virülenslikte azalma yüzdesi <5: 1 puan
P6	Yaprakta virülenslik azalma (%)	Virülenslikte azalma yüzdesi >40: 3 puan Virülenslikte azalma yüzdesi >20: 2 puan Virülenslikte azalma yüzdesi <20: 1 puan
TP	Toplam Puan	P1+P2+P3+P4+P5+P6

3.2.11.1. dsRNA'nın Ekstraksiyon

Tez önerisinde seçilen izolatların dsRNA analizleri yapıldıktan sonra dsRNA profilindeki bantın jelden kesildikten sonra arındırılarak elde edilmesi önerilmiştir. Ancak YND analizleri yapan firmalar (Macrogen), arındırma esasında dsRNA kalitesinde azalma, agaroz jel kalıntısı olması dolayısıyla saflığın bozulması gibi nedenlerden dolayı dsRNA'yı jelden arındırma yönteminin riskli olabileceğini ifade etmişlerdir. Bu nedenle Çizelge 4.1'de verilen biyolojik özellikler dikkate alınarak yapılan puanlamaya göre seçilen *P. viticola* izolatlarından dsRNA'lar Morris ve Dodds (1979) ve Valverde vd. (1990) tarafından geliştirilen yöntemler modifiye edilerek izole edilmiştir. Ayrıca bu izolatların jel elektroforetik dsRNA bantlarının görüntüleri de dikkate alınarak görüntüsü diğer izolatlardan nisbeten iyi olanlar seçilmiştir. Ardından izole edilen dsRNA'lar tüm genom dizi analizi için gönderilmek üzere hazırlanmış ve – 20 °C'de muhafaza altına alınmıştır.

dsRNA izolasyonu için ön hazırlık;

dsRNA analizinde kullanılacak miseller, PDA ortamında 10 gün 25 °C'de geliştirilmiş olan izolatlardan fungal parçalar alınmış ve erlenler içerisinde bulunan PD broth ortamına aktarılmış ve 180 devirde çalkalayıcı üzerine 25 °C'de 10-14 gün boyunca gelişmeye bırakılmıştır. PD broth ortamında gelişen fungal misellyumlar steril tülbentden süzülüp steril kurutma kağıdına aktararak kurutulmuş ve ardından tartılarak (5 g olacak şekilde)

steril aliminyum folyo içine sarılarak $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. dsRNA ekstraksiyonundan önce miseller $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki derin dondurucuda bir gece bekletilmiştir. Ayrıca içinde ezme işleminin yapılacağı steril havan ve havan elleri de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki derin dondurucuda bir gece bekletilmiştir. Misellerin havan içerisinde havan eli yardımıyla kolayca ezilebilmelerini sağlama için likit nitrojen temin edilip likit nitrojen tankı içerisinde laboratuvarında muhafaza edilmiştir. dsRNA izolasyonu için yapılan bu ön hazırlık tamamlandıktan sonra dsRNA protokolü aşağıda verildiği gibi uygulanmıştır;

1. $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de tutulan fungal miselyum (5 g) dondurucudan çıkarılmış ve likit nitrojen yardımıyla porselen havan içerisinde toz haline getirilmiştir.

2. Ezilen misel, içerisinde 10 mL $2\times\text{STE}$ (200 mM NaCl, 100 mM Tris, 1 mM EDTA) + 0,5 ml %10'luk SDS + 11mL %1'lik 8 hidroksiokinolin içeren fenol + 5 mL kloroform: isoamilalkol (24:1) bulunan 50 ml'lik steril tüplere aktarılmıştır.

3. Homojenizasyon sağlanması için buz içerisinde yerleştirilen tüplerdeki karışım çalkalayıcıda 160 devirde 2 saat bırakılmıştır (Resim 3.14a).

4. Örnekler 8000 g'de 30 dakika $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildikten sonra üst faz yeni steril tüplere aktarılmış (Resim 3.14 b) ve daha sonra bu örnekler 20 mL olacak şekilde $1\times\text{STE}$ ile tamamlanıp üzerine 4 ml Etanol ilave edilerek bir gece $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de beklemeye bırakılmıştır.

5. dsRNA'nın total DNA'dan ayırmak için CF-11 selüloz kolon kromatografisi yöntemine göre ilk önce her bir örnek için 1 gram selüloz tartılmış ve örnekler ilave edilip çalkalanmıştır. Daha sonra örnekler dip kısmına steril miracloth kağıt yerleştirilip üzerine 1g selüloz eklenen 20 ml'lik plastik kolonlara ilave edilmiştir. Kolon toplamda 80 μl olacak şekilde kolonlar %16'lık Etanol içeren $1\times\text{STE}$ tampon solüsyon ile yıkanmış (Resim 3.14 c) ve son damla gelinceye kadar beklenmiştir

6. Yıkınması tamamlanan kolona ilave edilen 6 mL $1\times\text{STE}$ 'nin 50 ml lik steril tüplerde toplanması sağlanmıştır Tüplere 18 mL Etanol ve 0,5 ml 3,0 M sodium acetate (PH 5,5) ilave edilerek $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece bekletilmiştir.

7. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılan tüpler 8000 g devirde 25 dakika santrifüj edilmiş ve tüpteki sıvı dikkatlice boşaltılıp peletin kuruması için beklenmiştir.

8. Pelet kurduktan sonra $1\times\text{TBE}$ tamponu ile resüspanse edilmiş ve tüplere kısa bir spin yapıldıktan sonra tüp içerisindeki süspansiyon steril 1,5 ml'lik ependorf tüplerine

aktarılmış, üzerine 900 µl %95'lik Etanol ve 30 µl 3 M sodyum asetat eklendikten sonra –20 °C'de 1 gün muhafaza edilmiştir.

9. –20 °C'den alınan örnekler + 4 °C'de 5000 g'de 20 dk santrifüj edildikten sonra süspansiyon boşaltılıp pelet kurutulmuştur. Tüplere 50 µl steril su konarak resüspanse edilmiştir. İzole edilen dsRNA'lar, buz üzerinde %0,8'lik agaroz da 80 V'da 1 saat 1×TBE tampon çözeltide yatay elektroforeze tabi tutulmuştur.



Resim 3.14. *Phomopsis viticola* izolatlarının Morris ve Dodds (1979) ve Valverde vd. (1990) yöntemine göre dsRNA izolasyon aşamaları a) örneklerin buz içerisinde çalkalanması b) santrifüj sonrası oluşan üst sıvı fazın alınması c) örneklerin CF-II selüloz kolonda 1×STE tampon solüsyon (%16 Etanol içeren) ile yıkanması d) örneklerin 1×TBE tamponu ile resüspanse edilmesi

3.2.11.2. dsRNA'nın Genom Dizi Analizi

3.2.11.2.1. dsRNA Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi

Genom dizilimi için ilk önce dsRNA analizinden elde edilen dsRNA'ların kalite ve miktarı Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zooteknik Bölümünün laboratuvarında bulunan NanoDrop 8000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) cihazı ile absorbans değerleri ng/ul olarak ölçümlenmiştir. Nanodrop'ta elde edilen veriler $Concentration = (A_{260}/A_{320}) \times 50 \times dilution\ factor$, µg/ml formülüne göre hesaplanmış ve dsRNA'nın konsantrasyonu 100 ng/µl den az olmayacak şekilde seyreltilerek hazırlanmıştır.

3.2.11.2.2. dsRNA Örneklerinin Saflaştırılması

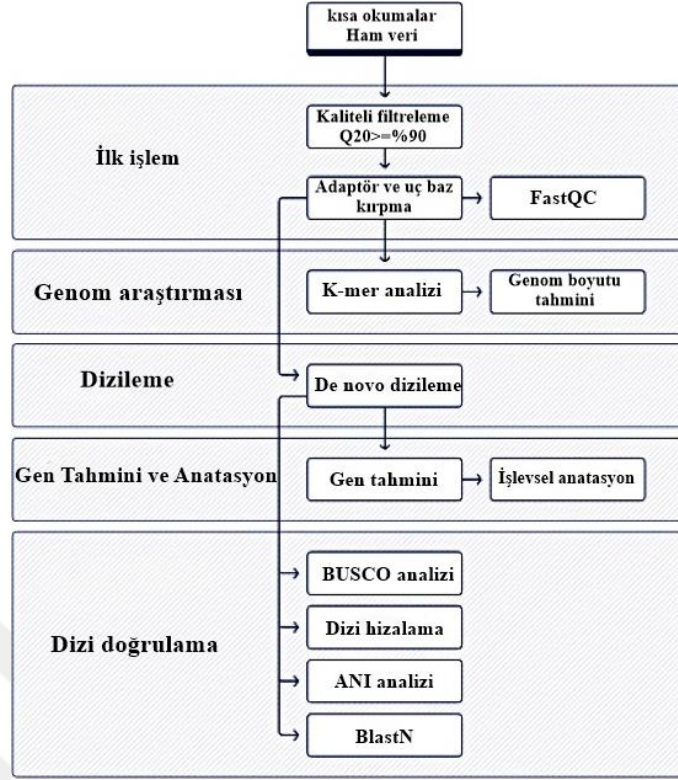
dsRNA konsantrasyon ölçümleri yapılan örneklerden (3.2.11.2.1) yüksek molekül ağırlıklı DNA'ları uzaklaştırmak için DNase I (RQ1-DNase (60 g/ml)) enzimi kullanılmıştır. Enzim kullanımı protokole göre her bir örnek için 1u/µg RNA, 1µl 10x Reaction buffer, 1 µl RQ1 RNase-Free DNase olacak şekilde ayarlanmıştır. Örnekler 37 °C'de 30 dakika ısıtıcıda inkübe edilmiş ardından 1µl DNase Stop Solution ilave edilerek 65 °C'de 10 dakika inkübe edilip enzimin inaktivasyonu sağlanmıştır. dsRNA örnekleri DNA'lardan arındırıldıktan sonra küçük RNA parçalarından da arındırılması için RNase A Stock (DNase-free) enzimi kullanılmıştır. Her bir örnek için RNA miktarı 10 µg/ml olacak şekilde ayarlanmış ve 37 °C'de 30 dakika ısıtıcıda inkübe edilmiştir. DNase ve RNase enzimleri uyguladıktan sonra bir kez daha NanoDrop cihazında dsRNA'ların miktar ve kaliteleri ölçülmüş ve ölçüm miktarına göre örnekler en az 100 ng/µl olacak şekilde seyreltilmiştir. Ardından dsRNA örnekleri 2 set olarak (enzim uygulanan-seyreltilen ve enzim uygulanmayan-seyreltilmeyen) kuru buz üzerinde uygun şekilde etiketlenerek genom dizilimi için Macrogen (Güney Kore) firmasına gönderilmiştir. Çalışmanın sağlıklı yürümesi için dsRNA örneklerinin hazırlanması ve taşınması yeni nesil dizileme (Next generation sequencing) yöntemine uygun şekilde ve gereken özen gösterilerek yapılmıştır.

3.2.11.2.3. dsRNA Dizileme Çalışmaları

Makrogen firmasına gönderilen izolatların filorometrik ölçümüne göre kalite kontrolü yapılmış ve dsRNA konsantrasyonu en az 500 ng/μl olan örneklerle YND genom dizi analizi yapılabileceği için enzim uygulanmayan-seyreltilmeyen örnekler kalite kontrolüne alınmış ve iki örnek YND tüm genom analizi için uygun bulunmuştur. Kalite kontrolünden geçen iki izolata ait dsRNA'ların cDNA kütüphanesi hazırlığı TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero H/M/R kiti kullanarak cDNA kütüphaneleri hazırlanmıştır. Daha sonra tüm genom dizilimi Next generation yöntemiyle Illumina sekanslayıcıda oluşturulmuş (Illumina Sequencing By Synthesis) ve ardından çift yönlü (Illumina paired-end sequencing) *de novo* tüm genom dizisi oluşturulmuştur (SPAdes V: 3.13.0 <http://cab.spbu.ru/software/spades/>). Illumina sekans sonucundan elde edilen ham veriler RTA (Real Time Analysis) ile analiz edilerek kontrol edilmiş ve BCL (base calls)/cBCL ikili, illumina paketi (bcl2fastq) kullanılarak veriler FASTQ (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) formatına dönüştürülmüştür (MacroGen, Güney Kore).

3.2.11.3. dsRNA'nın Biyoinformatik Analizi

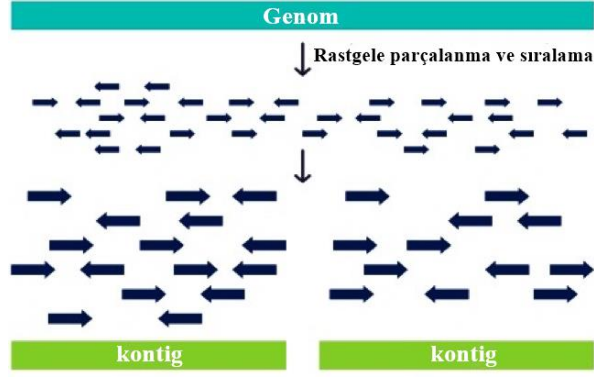
Yeni nesil dizileme analizinde elde edilmiş olan ham okumaların (FASTQ verisi) "veri birleştirme" analizinden önce filtreleme işlemine tabii tutulmuştur. Filtreleme işlemi; düşük kaliteli ve kısa (< 50 baz) dizilerin kaldırılması, adaptörlerin ham okumalardan çıkarılması, GC içeriği ve temel istatistikler hesaplanmasını kapsamaktadır (Resim 3.15).



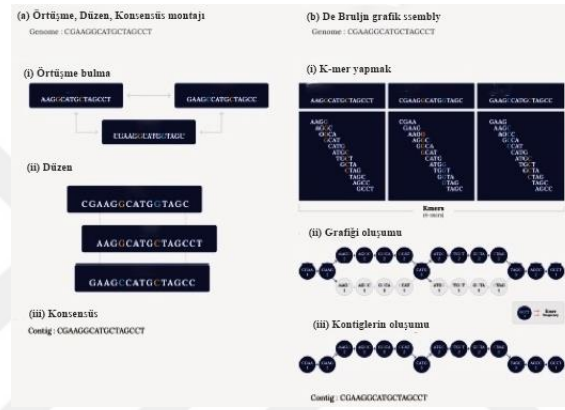
Resim 3.15. Genom dizileme çalışmalarının iş akışı

3.2.11.3.1. *De novo* assembly Çalışmaları

De novo assembly, bir genomun baştan aşağıya başka herhangi bir referans olmaksızın aşağıdan yukarıya inşa edilmesini ifade etmektedir. Elde edilen genom, gen tahmini ve büyük yapısal varyasyonların ortaya çıkarılması dahil olmak üzere DNA dizilerini kullanan tüm araştırmaların temelini oluşturan referans genom olarak ele alınır (Resim 3.16). Bilgisayar ortamında *de novo* assembly SPAdes (<http://cab.spbu.ru/software/spades>, v3.15.0) programı kullanılarak, FASTQ verisinde yer alan okumalar (reads) hizalanmış, okumalar birleştirilerek kontigler (contigs) elde edilmiştir (Resim 3.17). Çalışmada genom birleştirme aşamasında oluşabilecek olası hataları minimum indirmek amacıyla SPAdes programında farklı k-mer analizleri yapılarak filtreli okumalar yapılmış ve birleştirme sonucunda grup sayısı, kontiglerin toplamı, N50 vb. istatistiklerle en iyi k-mer seçilmiş, böylece en iyi birleştirilmiş sekans seti belirlenmiştir.



Resim 3.16. De novo Assembly'nin şematik iş akışı



Resim 3.17. De novo Assembly'nin algoritmaları

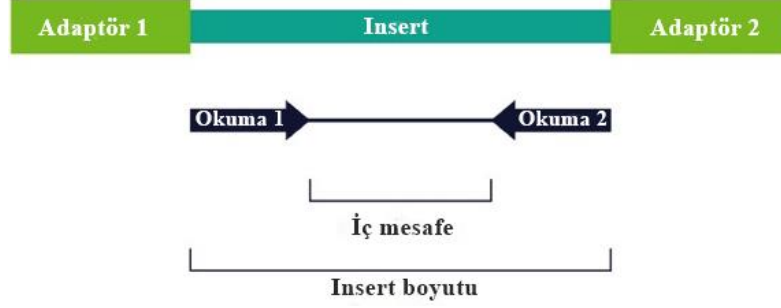
3.2.11.3.2. Birleştirme (Assembly) Doğrulaması

Seçilen en iyi birleştirme sonucu self-mapping analizleri yapılarak, filtrelenmiş okumalar birleştirilmiş genoma göre hizalanmış ve insert boyutları tahmin edilerek birleştirilmiş genom doğrulanmıştır (Resim 3.18). Self-mapping analizlerinde hesaplanan aşağıdaki ögeler kullanılmıştır;

a) Derinlik (Depth of coverage): Bir genomun her lokusunun ortalama sekanslama sayısı olarak tanımlanır.

b) Kapsam genişliği (Breadth of coverage): Okumaların kapsadığı genom yüzdesi (Çalışmada 1X veya daha fazla derinliği gösteren alan hesaplanmıştır.)

c) Insert boyutu: Adaptörlerin cDNA kütüphanesinden çıkarılması, haritalama sonucunda insert boyutları hesaplanması ve ardından kütüphane yapımında kullanılan DNA fragmanı ile karşılaştırılması.



Resim 3.18. Self-mapping analizin şematiği

3.2.11.3.3. Genom tahmini (Gene Prediction) ve anotasyonu

Genom birleştirildikten sonra genomda protein kodlayan gen veya kodlamayan genlerinin konumu tahmin edilmiş ve ardından tahmin edilen genomların ek açıklamaları (anotasyonu) InterProScan ([www.http://InterProScan.com](http://InterProScan.com)) ve EggNOG ([www.http://eggnog.embl.de](http://eggnog.embl.de)) programları kullanılarak yapılmıştır. InterProScan programı ile sekans dizileri familya düzeyinde tanımlanması için kullanılmış ve daha sonra EMBL tarafından sağlanan EggNOG programı kullanarak genom ile ilgili ek açıklamalar (anotasyonu) yapılmıştır. Protein sekanslarının hizalanması, CLUSTAL programı (Versiyon 2.1) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda tahmin edilen protein dizileri psi-BLAST (Position-Specific Iterative-BLAST) yapılarak doğrulanmıştır.

3.2.11.3.4. BLAST Analizleri ve Filogenetik Ağaç Çizimi

Sekanslama sonucunda her iki örnekten elde edilen nükleik asit dizilerinin başka nükleik asit dizileri ile benzerlik yüzdelerinin karşılaştırılması için NCBI (National Center for Biotechnology Information)'ın BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) aracı ile analizler yapılmış ve NCBI veri tabanında yer alan organizmalarla benzerliğin yüzde oranı ile en yakın olanlar belirlenmiştir.

Her iki örnekte de RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)'da korunmuş amino asit bölgelerini ve motiflerinin bulunması için protein BLASTp analizinde benzerliği en yakın olan organizma sekansları seçilmiş ve ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) yaparak çoklu hizalama yapılmış, ardından Boxshade (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html) programıyla motifler tesbit edilmiştir. Her iki örneğe ait amino asit dizileri kullanılarak, NCBI'da BLASTp analizi yapılarak hypothetical proteine en yakın benzerlik gösteren 8 (hypothetical protein) ve RdRP proteinine en çok benzerlik gösteren 15 mikovirüsün sekansı kullanılarak MEGA 7 (http://www.megasoftware.net/m_con_select.html) yazılımında Maximum likelihood, Neighbour Joining 1000 replicate bootstrap metodu ile analiz edilerek filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Daha sonra illumina sekanslama sonucunda elde edilen ham veriler ilk önce NCBI SRA (Sequence Read Archive) da kaydı yapılarak kayıt numarası (Accession Number) alınmıştır. Ardından belirlenen her kontig için biyoinformatik analiz verileri NCBI BankIt seçeneği ile kaydedilmiş ve bu veriler için de kayıt numaraları alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Ölükol Hastalığı Belirtileri Gösteren Örneklerin Toplanması

Ege Bölgesinde bağ alanlarının yoğun olduğu Manisa, İzmir, Denizli ve Aydın illerinin örnekleme yapılan tüm ilçelerinde ölükol hastalığı belirtilerine rastlanmıştır. Hastalıklı bitkilerde dip yapraklarda gelişen sarı klorotik lekelerin (Resim 4.1) yanı sıra sürgün diplerinde nekroz ve derin çatlakların (Resim 4.2) salkım sağlığını olumsuz etkilediği gözlemlenmiştir. Ayrıca salkım saplarında oluşan nekrozların meyve enfeksiyonuna yol açtığı belirlenmiştir. Arazi çalışması sonucunda Çizelge 3.1’de ifade edildiği gibi toplam 416 hastalıklı sürgün örneği elde edilmiştir.



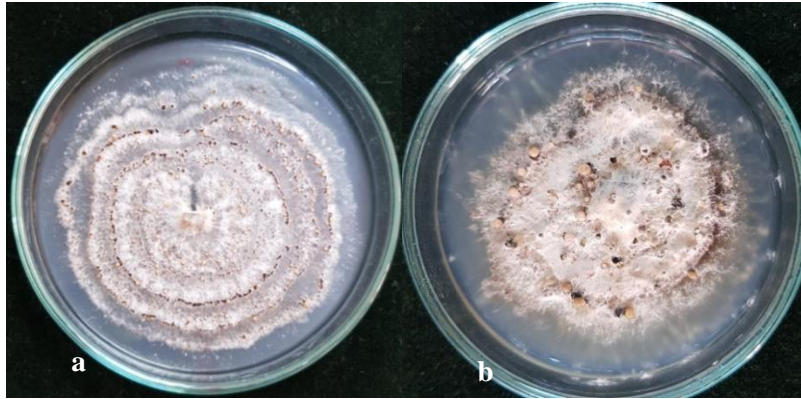
Resim 4.1. İzmir ili Selçuk ilçesinin asma yapraklarında gözlenen sarı klorotik lekeler



Resim 4.2. Manisa ili Saruhanlı ilçesinin asma sürgünlerinde gözlenen siyah lezyonlar ve çatlaklar

4.2. Fungal Örneklerin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Elde edilen fungal izolatlarda gelişen beyaz veya gri renkte kolonilerin görsel olarak *P. viticola*'ya ait olabileceği düşünülerek yeni PDA ortamında saflaştırılmıştır (Resim 4.3). Makroskobik ve mikroskobik incelenme sonucunda Aydın'dan 53, Denizli'den 50, Manisa'dan 59 ve İzmir'den 70 olmak üzere *P. viticola* olduğu düşünülen toplam 232 adet izolat saflaştırılmıştır (Çizelge 4.1). Bu izolatların tamamı PDA besi ortamında kültürel özellikleri yönünden incelenmiştir. İzolatların kültürel özellikleri, inkübasyonun 3., 7. ve 14. günlerinde yapılan ölçüm sonuçlarına (Bölüm 4.2.1 ve 4.2.1) göre değerlendirilmiştir.



Resim 4.3. *Phomopsis viticola* izolatlarının kültürde geliştirilmesi a) miselyal koloni b) piknitleri

Çizelge 4.1. *Phomopsis* spp. izolat sayılarının Ege Bölgesi il ve ilçelerine göre dağılımı

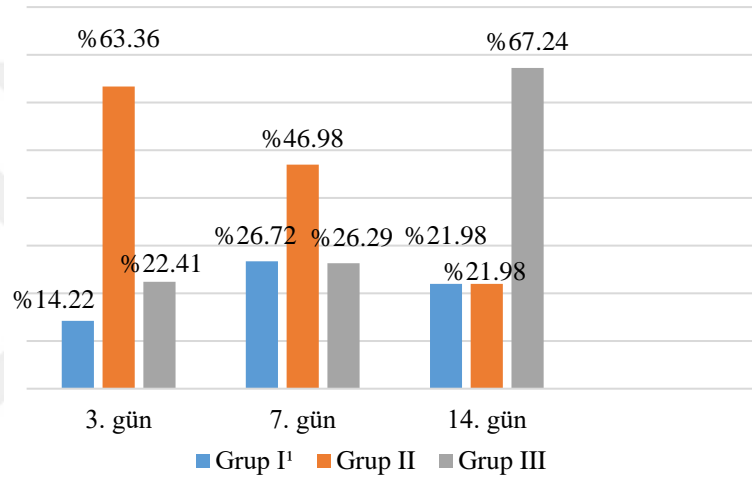
İller	İlçeler	İzolat Sayıları
Aydın	Nazili	18
	Koçarlı	8
	Söke	4
	Kuşadası	23
Ara Toplam		53
Denizli	Çal	17
	Güney	6
	Buldan	27
Ara Toplam		50
Manisa	Salihli	24
	Alaşehir	13
	Saruhanlı	22
Ara Toplam		59
İzmir	Selçuk	15
	Bayındır	25
	Efem çukur	3
	Urla	3
	Menemen	15
	Kemalpaşa	9
Ara Toplam		70
Genel Toplam	232	

4.3. *Phomopsis viticola* izolatlarının Morfolojik Tanılanması ve Kültürel Özelliklerinin Belirlenmesi

4.3.1. Koloni Gelişme Hızları ve Piknit Oluşumu

İzolatların koloni gelişme hızları ve koloni çapları birbirini dik kesen iki noktadan anılan günlerde cetvelle ölçülerek belirlenmiştir. İzolatların gelişim hızları 3.2.3.1’de ifade edildiği gibi 3 farklı gruba (yavaş, orta ve hızlı) ayrılarak değerlendirilmiştir. İzolatlar, PDA ortamında 24 °C’de 3, 7 ve 14 günlük inkübasyon sonrasında farklı miselyal koloni gelişimleri göstermişlerdir. Ölçüm sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4’de gösterilmiştir. Çizelge 4.2’ye göre inkübasyonun 3. gününde toplam 33 izolat 0,5-1,79 cm ortalama miselyal çapı ile yavaş gelişenler olarak Grup 1’de yer almıştır. Ortalama miselyal koloni çapı 1,80-2,43 cm olan 147 izolat orta hızda gelişenler olarak Grup 2’de yer almıştır. Geri kalan 52 izolat ise 2,44-3,23 cm ortalama miselyal koloni çapı ile hızlı gelişenler olarak Grup 3’de yer almıştır. İnkübasyonun 7. gününde yapılan ölçümlerde ortalama miselyal koloni çapı 2-3,44 cm olan 62 izolat 1. Grupta (yavaş), 3,45-4,61 cm olan 109 izolat 2. Grupta (orta hız) ve 4,62-6 cm olan 61 izolat 3. Grupta (hızlı) yer almışlardır

(Çizelge 4.3). İnkübasyonun 14. gününde yapılan ölçümlerde ise 2,28-4,8 cm miselyal çap aralığında yer alan 25 izolat Grup 1 de, miselyal çapı 4,81-5,53 cm olan 51 izolat Grup 2’de 5,54-7 cm olan 156 izolat Grup 3’de yer almıştır. (Çizelge 4.4). Sonuç olarak tüm illerde inkübasyonun 3., 7. ve 14. günlerinde yavaş, orta ve hızlı gelişen izolatlara rastlanmıştır. Ancak izolatların %63,36 ve %46,98’i inkübasyonun üçüncü ve yedinci günlerinde orta hızda ve izolatların %67,24’ü 14. gününde hızlı miselyal koloni gelişimi, izolatların %14,22, %26,29 ve %21,98’i sırasıyla inkübasyonunu 3. 7. ve 14. gelişim günlerinde yavaş miselyal koloni gelişimi göstermişlerdir (Şekil 4.1).



1: izolatlar koloni çaplarının ortalaması yavaş (Grup I), orta (Grup II) ve hızlı (Grup III)

Şekil 4.1. Ege Bölgesinden elde edilen *Phomopsis* spp. izolatlarının besi ortamında inkübasyon 3., 7. ve 14. günlerindeki miselyal koloni gelişimlerinin yüzde oranları

Çizelge 4.2. Ege Bölgesinden elde edilen *Phomopsis* spp. izolatlarının besi ortamında inkübasyonun 3. gününde miselyal koloni gelişim hızlarına göre gruplandırılması

Koloni Çap Aralığı (cm)	
Grup I (0,5-1,79)	763Ko, 822Ku, 842Ku, 1208Na, 1211Na, 1213Na, 1215Na, 955M, 1216Na, 1220Na, 1223Na, 1225Na, 1226Na, 1230Na, 910M, 961M, 888G, 1248Bu, 1108Sa, 1112Sa, 1118Sa, 1119Sa, 1140Sa, 1027K, 1141Sa, 1161Al, 1164Al, 786Se, 791Se, 793Se, 904M, 1100B, 1102B
Toplam	33
Grup II (1,80-2,43)	754Ko, 759Ko, 765Ko, 771Sö, 803Ku, 805Ku, 811Ku, 825Ku, 919M, 823Ku, 813Ku, 815Ku, 818Ku, 820Ku, 981Sr, 965Sr, 837Ku, 927M, 827Ku, 828Ku, 831Ku, 830Ku, 832Ku, 847Ku, 848Ku, 1209Na, 982Sr, 1233Na, 1210Na, 899Bu, 1212Na, 1221Na, 1227Na, 856Ç, 858Ç, 862Ç, 900Bu, 865Ç, 869Ç, 880Ç, 882Ç, 884Ç, 890G, 896Bu, 901Bu, 903Bu, 1243Bu, 1244Bu, 1249Bu, 1250Bu, 1253Bu, 933M, 1254Bu, 1255Bu, 986Sr, 1258Bu, 1259Bu, 1260Bu, 1262Bu, 788Se, 1264Bu, 1266Bu, 1267Bu, 1268Bu, 1269Bu, 995Sr, 966Sr, 906M, 970Sr, 971Sr, 979Sr, 993Sr, 997Sr, 998Sr, 1003Sr, 1014Sr, 913M, 1018Sr, 1106Sa, 780Se, 1109Sa, 1111Sa, 1115Sa, 1127Sa, 1116Sa, 1117Sa, 1120Sa, 1121Sa, 783Se, 1128Sa, 1129Sa, 1135Sa, 926M, 1273Ef, 1137Sa, 1143Sa, 1145Sa, 1149Sa, 1151Sa, 1157Al, 1158Al, 784Se, 1159Al, 1160Al, 1167Al, 1173Al, 785Se, 774Se, 1052B, 922M, 921M, 1185Al, 1194Al, 1197Al, 1205Al, 1207Al, 779Se, 1058B, 1062B, 1286Ba, 1048B, 1049B, 1050B, 1061B, 1060B, 1057B, 1055B, 1056B, 1101B, 1065B, 1066B, 1071B, 936M, 941M, 962M, 1024K, 1028K, 1032K, 1035K, 1045K, 1072B, 1079B, 1084B, 1085B, 1091B, 1092B, 1095B
Toplam	147
Grup III (2,44-3,23)	755Ko, 756Ko, 762Ko, 770Sö, 808Ku, 809Ku, 844Ku, 812Ku, 821Ku, 841Ku, 843Ku, 1222Na, 1229Na, 860Ç, 861Ç, 867Ç, 889G, 891G, 870Ç, 878Ç, 885Ç, 887Ç, 892G, 894G, 898Bu, 1242Bu, 1245Bu, 1251Bu, 1252Bu, 1265Bu, 1270Bu, 898Bu, 964Sr, 996Sr, 1006Sr, 1005Sr, 1012Sr, 1021Sr, 1107Sa, 1124Sa, 778Se, 1043K, 959M, 781Se, 799Se, 947M, 1036K, 1070B, 1080B, 1086B, 1088B, 1098B
Toplam	52

Not: Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Söke, Ç Çal, Bu Buldan, Se Selçuk, M Menemen, Ef Efem Çukuru, K Kemalpaşa, B Bayındır, Sr Saruhanlı, Sa Salihli, Al Alaşehir

Çizelge 4.3. Ege Bölgesinden elde edilen *Phomopsis* spp. izolatlarının besi ortamında inkübasyonun 7. gününde miselyal koloni gelişimlerine göre gruplandırılması

Koloni Çap Aralığı (cm)	
Grup I (2-3,44)	754Ko, 763Ko, 803Ku, 813Ku, 818Ku, 831Ku, 842Ku, 1208Na, 1209Na, 1210Na, 1211Na, 1213Na, 1215Na, 1216Na, 1220Na, 1223Na, 860Ç, 865Ç, 869Ç, 884Ç, 858Ç, 856Ç, 888G, 1225Na, 1226Na, 1230Na, 1243Bu, 1248Bu, 1250Bu, 1253Bu, 1254Bu, 1255Bu, 1258Bu, 1259Bu, 1260Bu, 1262Bu, 1264Bu, 1266Bu, 1269Bu, 986Sr, 996Sr, 998Sr, 1018Sr, 1108Sa, 1109Sa, 1112Sa, 1117Sa, 1118Sa, 1137Sa, 1194Al, 786Se, 791Se, 904M, 910M, 919M, 955M, 1028K, 1091B, 1092B, 1100B, 1102B, 1286Ba
Toplam	62
Grup II (3,45-4,61)	759Ko, 771Sö, 844Ku, 815Ku, 820Ku, 822Ku, 823Ku, 827Ku, 828Ku, 843Ku, 847Ku, 848Ku, 1212Na, 1229Na, 862Ç, 867Ç, 892G, 894G, 896Bu, 1267Bu, 965Sr, 993Sr, 995Sr, 997Sr, 1003Sr, 1005Sr, 1012Sr, 1014Sr, 1106Sa, 1107Sa, 1111Sa, 1115Sa, 1116Sa, 1119Sa, 1120Sa, 1121Sa, 1140Sa, 1143Sa, 1149Sa, 1157Al, 1158Al, 1160Al, 1161Al, 1164Al, 1167Al, 1173Al, 1185Al, 1197Al, 1205Al, 778Se, 783Se, 982Sr, 825Ku, 784Se, 793Se, 927M, 936M, 941M, 961M, 1024K, 1027K, 1035K, 1043K, 1045K, 1070B, 1079B, 1084B, 1085B, 1101B, 809Ku, 821Ku, 830Ku, 832Ku, 837Ku, 901Bu, 899Bu, 900Bu, 903Bu, 979Sr, 1135Sa, 1141Sa, 966Sr, 970Sr, 971Sr, 981Sr, 1129Sa, 906M, 921M, 933M, 1052B, 774Se, 1062B, 1058B, 913M, 922M, 926M, 1048B, 1049B, 1050B, 1055B, 1056B, 1057B, 1060B, 1061B, 1065B, 1066B, 1071B, 808Ku, 811Ku
Toplam	109
Grup III (4,3-6)	979Sr, 1135Sa, 1141Sa, 966Sr, 970Sr, 971Sr, 981Sr, 982Sr, 1129Sa, 906M, 921M, 933M, 1052B, 774Se, 1062B, 1058B, 913M, 922M, 926M, 1048B, 1049B, 1050B, 1055B, 1056B, 1057B, 1060B, 1061B, 1065B, 1066B, 1071B, 808Ku, 811Ku, 825Ku
Toplam	61

Not: Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Söke, Ç Çal, Bu Buldan, Se Selçuk, M Menemen, Ef Efem Çukuru, K Kemalpaşa, B Bayındır, Sr Saruhanlı, Sa Salihli, Al Alaşehir

Çizelge 4.4. Ege Bölgesinden elde edilen *Phomopsis* spp. izolatlarının besi ortamında inkübasyonun 14. gününde miselyal koloni gelişimlerine göre gruplandırılması

Koloni Çap Aralığı (cm)	
Grup I (2,28-4,8)	763Ko, 843Ku, 848Ku, 1230Na, 862Ç, 867Ç, 1248Bu, 986Sr, 996Sr, 1109Sa, 1112Sa, 1117Sa, 1194Al, 786Se, 791Se, 910M, 936M, 955M, 1027K, 1079B, 1085B, 1092B, 1100B, 1286Ba, 1137Sa
Toplam	25
Grup II (4,81-5,53)	756Ko, 759Ko, 803Ku, 823Ku, 827Ku, 828Ku, 841Ku, 847Ku, 1216Na, 1229Na, 1233Na, 880Ç, 887Ç, 888G, 889G, 890G, 892G, 894G, 1242Bu, 1244Bu, 1255Bu, 1258Bu, 1259Bu, 965Sr, 998Sr, 1012Sr, 1018Sr, 1106Sa, 1107Sa, 1108Sa, 1118Sa, 1124Sa, 1145Sa, 83Se, 785Se, 793Se, 919M, 927M, 941M, 1024K, 1028K, 1035K, 1045K, 1072B, 1080B, 1084B, 1088B, 1091B, 1273Ef, 809Ku, 1128Sa
Toplam	51
Grup III (5,44-7)	754ko, 755ko, 762ko, 765ko, 770Sö, 771Sö, 805ku, 844ku, 812ku, 813ku, 815ku, 818ku, 820ku, 822ku, 831ku, 842ku, 1208Na, 1209Na, 1210Na, 1211Na, 1212Na, 1213Na, 1215Na, 1220Na, 1221Na, 1222Na, 1223Na, 1225Na, 1226Na, 1227Na, 856Ç, 858Ç, 860Ç, 861Ç, 865Ç, 869Ç, 870Ç, 878Ç, 882Ç, 884Ç, 885Ç, 891G, 896Bu, 898Bu, 1243Bu, 1245Bu, 1249Bu, 1250Bu, 1251Bu, 1252Bu, 1253Bu, 1254Bu, 1260Bu, 1262Bu, 1264Bu, 1265Bu, 1266Bu, 1267Bu, 1268Bu, 1269Bu, 1270Bu, 964Sr, 993Sr, 995Sr, 997Sr, 1003Sr, 1005Sr, 1006Sr, 1014Sr, 1021Sr, 1111Sa, 111Sa, 1116Sa, 1119Sa, 1120Sa, 1121Sa, 1127Sa, 1140Sa, 1143Sa, 1149Sa, 1151Sa, 1157Al, 1158Al, 1159Al, 1160Al, 1161Al, 1164Al, 1167Al, 1173Al, 1185Al, 1197Al, 1205Al, 1207Al, 778Se, 779Se, 780Se, 781Se, 784Se, 788Se, 799Se, 947M, 959M, 961M, 962M, 1032K, 1036K, 1043K, 1070B, 1086B, 1095B, 1098B, 1101B, 1102B, 821Ku, 830Ku, 832Ku, 837Ku, 901Bu, 899Bu, 900Bu, 903Bu, 979Sr, 1135Sa, 1141Sa, 966Sr, 970Sr, 971Sr, 981Sr, 982Sr, 1129Sa, 906M, 921M, 933M, 1052B, 774Se, 1062B, 1058B, 772Se, 904M, 913M, 922M, 926M, 1048B, 1049B, 1050B, 1055B, 1056B, 1057B, 1060B, 1061B, 1065B, 1066B, 1071B, 808Ku, 811Ku, 825Ku
Toplam	156

Not: Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Söke, Ç Çal, Bu Buldan, Se Selçuk, M Menemen, Ef Efem Çukuru, K Kemalpaşa, B Bayındır, Sr Saruhanlı, Sa Salihli, Al Alaşehir

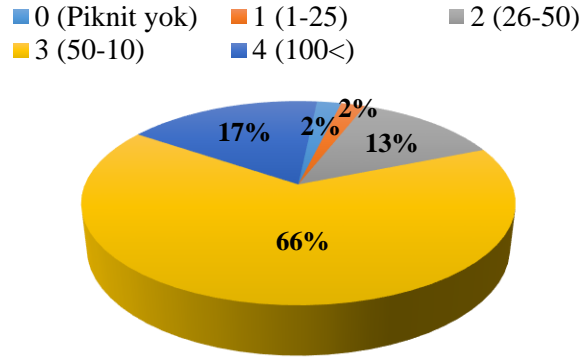
İnkübasyonun 4. haftasında toplam 232 adet izolata ait 1 cm² lik alanda ortalama piknit sayısı skala değerlerine göre Çizelge 4.5'te verilmiştir. Beş izolatta piknit oluşumu gözlenmemiştir. İzolatların 5'inde 1 cm² alanda 1 ile 25 arasında piknit oluşmuştur. Otuz izolatta 26-50 arasında piknit "2" skala değerinde yer almıştır. Diğer izolatlardan, 152'si 50 ile 100 arasında ve 40'ı 100'ün üzerinde piknit oluşturmuştur (Çizelge 4.5). İzolatların piknit oluşum değerlendirmesine bakıldığında, izolatların %98'inde piknit oluşumu gözlemlenirken piknit yoğunluğunda farklılıklar saptanmıştır (Şekil 4.2).

Çizelge 4.5. Besi ortamında inkübasyonun dördüncü haftasında Ege Bölgesinden elde edilen *Phomopsis* spp. izolatlarının oluşturdukları piknit sayıları

Piknit sayısı	İller			
	Aydın	Denizli	Manisa	İzmir
0: (Piknit yok)	-	-	1109sa, 1137sa, 1145sa	959M, 1092B
Toplam	0	0	3	2
1: (1-25)	1216Na	899Bu	986Sr	919M, 1091B
Toplam	1	1	1	2
2: (26-50)	763Ko, 803Ku, 823Ku, 1233Na	882Ç, 887Ç, 888Ç, 1269Bu, 889G, 892G, 894G	1124Sa, 1128Sa, 1141Sa, 1194Al,	793Se, 904M, 913M, 1027K, 926M, 961M, 1032K, 1036K, 1050B, 1072B, 1066B, 1070B, 1080B, 1084B, 1286Ba
Toplam	4	7	4	15
3: (50-100)	755Ko, 756Ko, 759Ko, 770Sö, 771Sö, 809Ku, 813Ku, 820Ku, 821Ku, 822Ku, 825Ku, 827Ku, 828Ku, 830Ku, 832Ku, 1230Na, 837Ku, 841Ku, 842Ku, 843Ku, 844Ku, 84Ku, 848Ku, 1211Na, 1212Na, 1221Na, 1222Na, 1225Na, 1227Na, 1229Na	858Ç, 860Ç, 861Ç, 862Ç, 867Ç, 870Ç, 884Ç, 891G, 878Ç, 880Ç, 885Ç, 890G, 896Bu, 900Bu, 1242Bu, 1244Bu, 1245Bu, 1248Bu, 1250Bu, 1252Bu, 1253Bu, 1255Bu, 1260Bu, 1264Bu, 1265Bu, 1266Bu, 1267Bu, 1268Bu, 1270Bu	964Sr, 965Sr, 966Sr, 971Sr, 979Sr, 982Sr, 993Sr, 995Sr, 996Sr, 997Sr, 1003Sr, 100Sr, 1006Sr, 1012Sr, 1014Sr, 1018Sr, 1021Sr, 1106Sa, 1107Sa, 1108Sa, 1111Sa, 1112Sa, 1115Sa, 1116Sa, 1117Sa, 1118Sa, 1119Sa, 1121Sa, 1129Sa, 1135Sa, 1140Sa, 1143Sa, 1149Sa, 1151Sa, 1157Al, 1158Al, 1159Al, 1160Al, 1161Al, 1164Al, 1167Al, 1185Al, 1197Al, 1207Al, 998Sr	772Se, 774Se, 778Se, 779Se, 780Se, 785Se, 781Se, 784Se, 786Se, 788Se, 906M, 910M, 921M, 922M, 933M, 936M, 941M, 947M, 955M, 962M, 1024K, 1028K, 1035K, 1043K, 791Se, 1045K, 1052B, 1058B, 1048B, 1049B, 1055B, 1056B, 1057B, 1060B, 1061B, 1071B, 1062B, 1065B, 1079B, 1085B, 1086B, 1100B, 1088B, 1098B, 1101B, 1102B, 1273Ef
Toplam	31	29	45	47
4: (100<)	754Ko, 762Ko, 805Ku, 808Ku, 811Ku, 812Ku, 815Ku, 831Ku, 852Ku, 1208Na, 1209Na, 1210Na, 1213Na, 1215Na, 1220Na, 1223Na, 1226Na	856Ç, 865Ç, 869Ç, 898Bu, 901Bu, 903Bu, 1249Bu, 1251Bu, 1254Bu, 1258Bu, 1259Bu, 1262Bu, 1243Bu	970Sr, 981Sr, 1120Sa, 1127Sa, 1173Al, 1205Al	783Se, 799Se, 927M, 1095B
Toplam	17	13	6	4

Not: İzolat isimlendirmelerinde; Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Şöke; Ç Çal, Bu Buldan; Se Selçuk, M

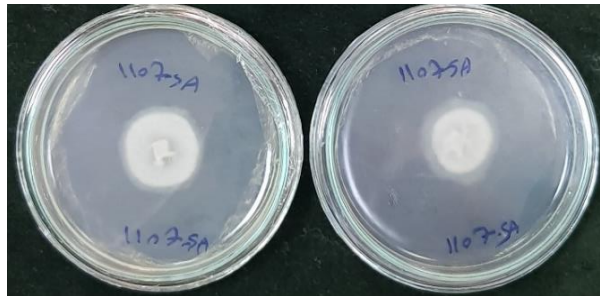
Menemen, Ef Efem Cukuru; K Kemalpaşa; B Bayındır; Sr Saruhanlı Sa Salihli; Al Alaşehir, 0-4 skalası (1 cm² lik alanda piknit sayısı): 0: piknit yok; 1: 1-25 piknit; 2: 26-50 piknit; 3:50-100 piknit; 4: >100 piknit



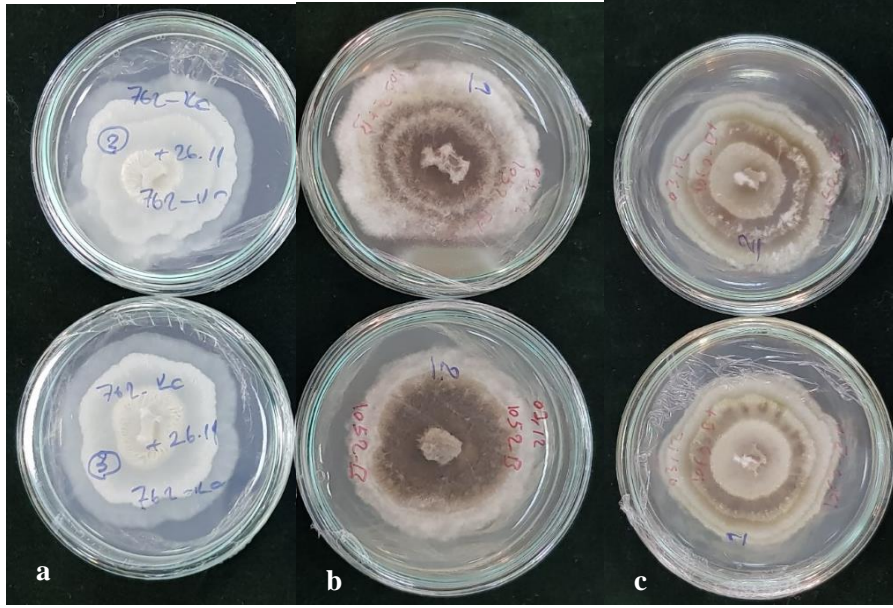
Şekil 4.2. Besi ortamında inkübasyonun dördüncü haftasında Ege Bölgesinden elde edilen *Phomopsis* spp. izolatlarının piknit sayısının yüzde oranları

4.3.2. Koloni renkleri

Çalışmanın bu bölümünde PDA ortamında 24 °C üçüncü, yedinci ve 14. günlük inkübasyonun ardından, izolatlar koloni renkleri yönünden beyaz, gri ve krem olmak üzere 3 farklı gruba ayrılmışlardır. İnkübasyonun üçüncü gününde tüm izolatlarda (%100) beyaz renkte koloniler görülmüştür (Resim 4.4). İnkübasyonun yedinci gününde ise 45 izolat (%19,39) gri, 173 izolat (%74,56) beyaz ve 14 izolat (%6,03) krem renkte koloniler oluşturmuşlardır (Resim 4.5). Tüm illerde beyaz, gri ve krem renkli izolatlara rastlanmıştır (Çizelge 4.6). Değerlendirmenin 14. gününde 137 izolatta (%59,05) gri, 83 izolatta (%35,77) beyaz ve 12 izolatta (%5,17) krem renkte koloniler görülmüştür. Beyaz ve gri renkli izolatlara tüm illerde rastlanırken Manisa'da krem renkli izolata rastlanmamıştır (Çizelge 4.7).



Resim 4.4. Ege Bölgesinden elde edilen *Phomopsis* spp. izolatlarının besiy ortamında inkübasyonun 3. gününde oluşan beyaz renkli koloniler



Resim 4.5. Ege Bölgesinden elde edilen *Phomopsis* spp. izolatlarının besi ortamında inkübasyonun 7. gününde oluşan a) beyaz, b) gri ve c) krem renkte koloniler

Çizelge 4.6. Ege Bölgesinden elde edilen *Phomopsis* spp. izolatlarının besi ortamında inkübasyonun 7. gününde koloni renklerine göre dağılımı

Koloni Renkleri	İller			
	Aydın	Denizli	Manisa	İzmir
Beyaz	754Ko, 756Ko, 765ko, 770Sö, 812Ku, 815Ku, 821Ku, 822Ku, 830Ku, 832Ku, 842Ku, 847Ku, 852Ku, 1216Na, 1221Na, 1222Na, 1227Na, 1229Na, 1230Na, 1233Na, 762Ko, 803Ku, 811Ku, 820Ku, 825Ku, 837Ku, 844Ku, 1208Na, 1209Na, 1210Na, 1211Na, 1212Na, 1213Na, 1225Na, 1226Na	860Ç, 862Ç, 867Ç, 870Ç, 878Ç, 880Ç, 882Ç, 885Ç, 887Ç, 888Ç, 889G, 890G, 891G, 892G, 894G, 899Bu, 900Bu, 856Ç, 1248Bu, 1244Bu, 858Ç, 896Bu, 1252Bu, 1267Bu, 898Bu, 901Bu, 1242Bu, 1265Bu, 1266Bu, 1268Bu, 1269Bu, 1245Bu	964Sr, 965Sr, 966Sr, 970Sr, 971Sr, 979Sr, 981Sr, 997Sr, 982Sr, 993Sr, 998Sr, 1005Sr, 1003Sr, 1006Sr, 1012Sr, 1014Sr, 1018Sr, 1111Sa, 1106Sa, 1108Sa, 1109Sa, 1112Sa, 1124Sa, 1127Sa, 1128Sa, 1135Sa, 1137Sa, 1140Sa, 1141Sa, 1149Sa, 1115Sa, 1116Sa, 1118Sa, 1119Sa, 1129Sa, 1143Sa, 1151Sa, 1157Al, 1158Al, 1159Al, 1160Al, 1164Al, 1167Al, 1205Al, 1194Al, 1207Al, 1021Sr	779Se, 781Se, 784Se, 785Se, 786Se, 788Se, 919M, 922M, 793Se, 799Se, 904M, 910M, 927M, 936M, 941M, 947M, 961M, 962M, 791Se, 906M, 913M, 921M, 926M, 933M, 903M, 1028K, 774se, 1024K, 1027K, 1032K, 1036K, 1048B, 1049B, 1050B, 1057B, 1061B, 1065B, 1066B, 1070B, 1071B, 1072B, 1079B, 1086B, 1088B, 1091B, 1092B, 1095B, 1098B, 1101B, 1102B, 1286Ba, 955M, 1055B, 1060B, 1062B, 1084B, 1085B, 1100B
Toplam	35	33	47	58
Gri	755Ko, 763Ko, 771Sö, 809Ku, 823Ku, 828Ku, 848Ku, 805Ku, 808Ku, 813Ku, 831Ku, 1215Na, 1220Na, 1223Na	865Ç, 869Ç, 884Ç, 1249Bu, 1250Bu, 1251Bu, 1253Bu, 1254Bu, 1255Bu, 1258Bu, 1259Bu, 1262Bu, 1264Bu	1145Sa, 995Sr, 1121Sa, 1161Al, 1173Al, 1185Al, 996Sr	772Se, 780Se, 783Se, 1043K, 1045K, 1080B, 1273Ef, 959M, 1035K, 1052B, 1058B
Toplam	14	13	7	11
Krem	759Ko, 827Ku, 841Ku, 843Ku	861Ç, 1242Bu, 1260Bu	986Sr, 1107Sa, 1117Sa, 1120Sa, 1197Al	1056B, 778Se
Toplam	4	3	5	2

Not: İzolat isimlendirmelerinde; Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Şöke; Ç Çal, Bu Buldan; Se Selçuk, M Menemen, Ef Efem Cukuru; K Kemalpaşa; B Bayındır; Sr Saruhanlı Sa Salihli; Al Alaşehir

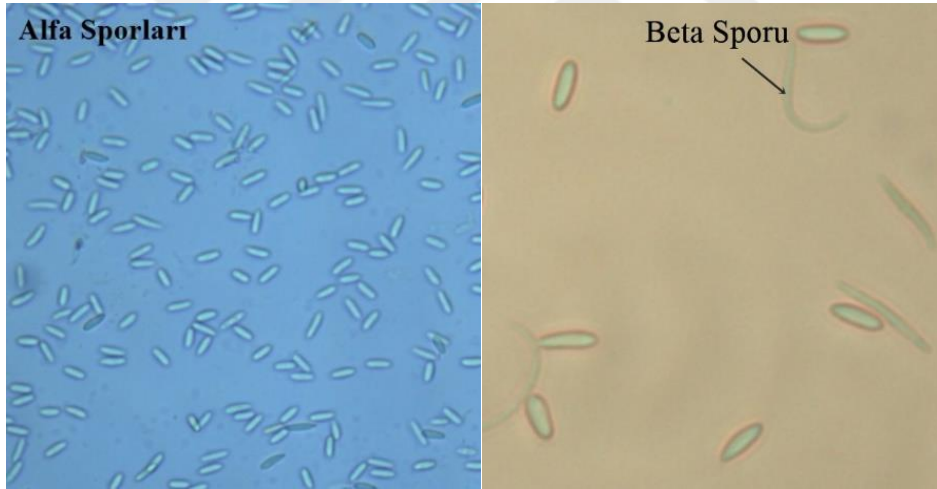
Çizelge 4.7. Ege Bölgesinden elde edilen *Phomopsis* spp. izolatlarının besi ortamında inkübasyonun 14. gününde koloni renklerine göre dağılımı

İller				
Koloni Renkleri	Aydın	Denizli	Manisa	İzmir
Beyaz	754Ko, 755Ko, 762Ko, 842Ku, 803Ku, 812Ku, 815Ku, 822Ku, 831Ku, 808Ku, 852Ku, 837Ku, 1211Na, 1212Na, 1216Na, 1221Na, 1222Na, 1227Na, 1229Na, 1230Na, 1233Na, 811Ku, 825Ku	856Ç, 870Ç, 878Ç, 891G, 882Ç, 888G, 894G, 901Bu, 1248Bu, 1266Bu, 1252Bu, 1262Bu	1108Sa,1109Sa, 1111Sa,979Sr, 1112Sa,1115Sa, 1124Sa,1143Sa, 1127Sa,1141Sa, 1149Sa,1128Sa, 1140Sa,966Sr, 970Sr,971Sr	779Se,781Se, 784Se,788Se, 785Se,786Se, 793Se,799Se, 903M,936M, 910M,919M, 947M,955M, 961M,926M, 933M,1062B, 1027K,1028K, 1072B,1091B, 1079B,1085B, 1092B,1095B, 1101B,1102B, 904M,1048B, 1049B,1061B
Toplam	23	12	16	32
Gri	756Ko, 759Ko, 771Sö, 770Sö, 763Ko, 765Ko, 805Ku, 844Ku, 813Ku, 827Ku, 820Ku, 823Ku, 828Ku, 841Ku, 843Ku, 809Ku, 847Ku, 848Ku, 1208Na, 1209Na, 1226Na, 830Ku, 1210Na, 1213Na, 1215Na, 1220Na, 1223Na, 1225Na	858Ç, 860Ç, 861Ç, 867Ç, 862Ç, 865Ç, 869Ç, 884Ç, 885Ç, 887Ç, 889G, 890G, 892G, 896Bu, 898Bu, 899Bu, 1244Bu, 1245Bu, 1249Bu, 1250Bu, 1251Bu, 1253Bu, 1254Bu, 1255Bu, 1258Bu, 1259Bu, 1260Bu, 1264Bu, 1265Bu, 1268Bu, 1269Bu, 1270Bu, 1243Bu	965Sr, 964Sr, 986Sr, 996Sr, 993Sr, 995Sr, 997Sr, 998Sr, 981Sr, 982Sr, 1005Sr, 1006Sr, 1012Sr, 1014Sr, 1018Sr, 1021Sr, 1106Sa, 1107Sa, 1116Sa, 1117Sa, 1118Sa, 1119Sa, 1120Sa, 1121Sa, 1145Sa, 1151Sa, 1157Al, 1158Al, 1159Al, 1160Al, 1161Al, 1164Al, 1167Al, 1173Al, 1185Al, 1194Al, 1197Al, 1205Al, 1207Al, 1129Sa, 1135Sa, 1137Sa, 1003Sr	780Se, 783Se, 791Se, 959M, 927M, 941M, 962M, 1032K, 1035K, 1045K, 1036K, 1043K, 1070B, 1080B, 1088B, 1100B, 1086B, 1098B, 1273Ef, 772Se, 1286Ba, 74Se, 922M, 1050B, 7906M, 913M, 921M, 1056B, 1052B, 1055B, 1058B, 1057B, 1060B
Toplam	28	33	43	33
Krem	821Ku, 832Ku	880Ç, 1242Bu, 1267Bu, 900Bu	-	778Se, 1024K, 1084B, 1066B, 1071B, 1065B
Toplam	2	4	0	6

Not: İzolat isimlendirmelerinde; Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Şöke; Ç Çal, Bu Buldan; Se Selçuk, M Menemen, Ef Efem Cukuru; K Kemalpaşa; B Bayındır; Sr Saruhanlı Sa Salihli; Al Alaşehir

4.3.3. Spor Oluşumları

Besi ortamında inkübasyonun 14. gününde izolatların spor değerlendirilmesinde; izolatların hepsi PDA üzerinde α sporları üretmiştir. Sadece 13 izolatta α ve β sporları birlikte görülmüş ve bu izolatlarda α sporların yoğunluğunun β sporlarına göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. α sporların boyutları ortalama $8-11,04 \mu\text{m} \times 1,7-2,8 \mu\text{m}$ büyüklük arasında değişmiştir. β sporlar ise $20,5-25,14 \mu\text{m} \times 0,83-1,06 \mu\text{m}$ boyutlarında olup kıvrımlı uçlar oluşturmuşlardır (Resim 4.6). Her bir izolata ait ortalama spor boyutları Ek 1 ve 2’de gösterilmiştir. Sonuç olarak Aydın’da 4, Denizli’de 1, Manisa’da 3 ve İzmir’de 5 izolatta her iki spor (α ve β) tipi görünürken ve 219 izolatta (%94,39) sadece α sporların varlığı belirlenmiştir. α ve β sporları görülen beyaz ve açık krem renkli olan izolatlarda gelişme hızı ve büyüme çapı, gri renkli kolonileri olan izolatlara göre daha az ve dar büyüme halkaları ile gelişme göstermiştir.

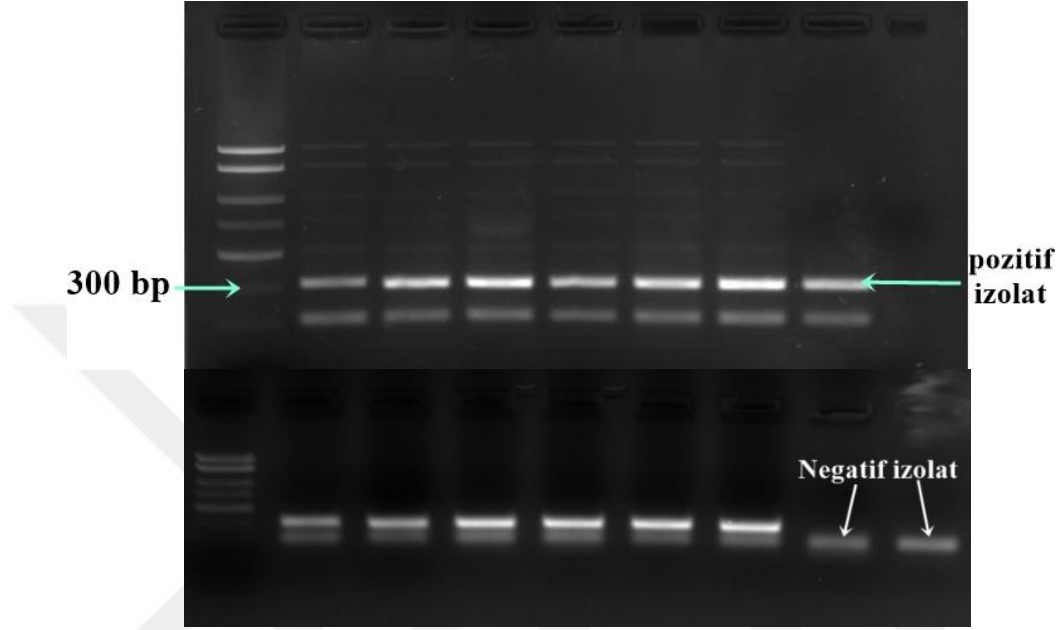


Resim 4.6. *Phomopsis viticola* izolatlarının α ve β sporlarından görüntümler

4.4. Fungal İzolatların Moleküler Tanısı

İzolatların kültürel özellikleri değerlendirildikten sonra toplam 232 *Phomopsis* spp. izolatın moleküler tanısı için ilk önce DNA ekstraksiyonu Geçioğlu Erincik vd. (2020) göre yapılmış ve ardından PCR ile çoğaltılarak *P. viticola*'nın tanımı yapılmıştır. PCR testi sonucunda 232 izolattan 214’ünde beklenen 300 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiş ve

böylece bu izolatların *P. viticola* olarak kesin tanısı gerçekleştirilmiştir (Resim 4.7 ve Çizelge 4.8). Örnekleme yapılan tüm illerde *P. viticola* izolatları elde edilmiştir. Çizelge 4.8'e göre Aydın ilinden 50, Denizli ilinden 50, Manisa ilinden 52 ve İzmir ilinden 62 izolat *P. viticola* olarak tanılanmıştır.



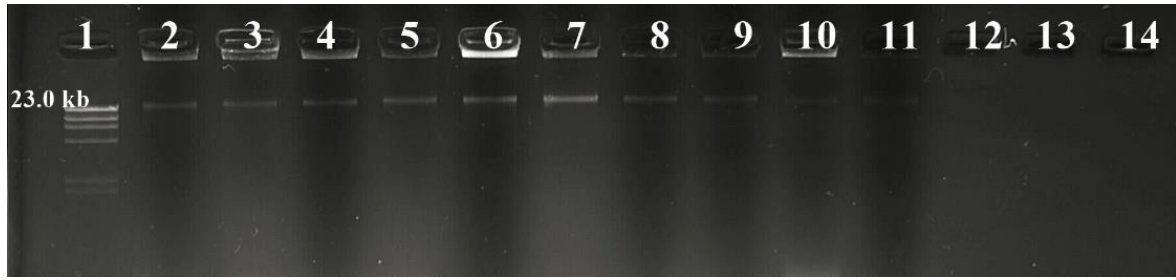
Resim 4.7. *Phomopsis viticola* izolatlarının PCR ürünlerine ait elektroforetik görünüm

Çizelge 4.8. PCR testi sonucunda tanımlanan *Phomopsis viticola* izolat sayılarının Ege Bölgesi il ve ilçelerine göre dağılımı

İller	İlçeler	İzolat sayıları
Aydın	Nazilli	18
	Koçarlı	6
	Söke	2
	Kuşadası	24
Ara Toplam		50
Denizli	Çal	15
	Günay	6
	Buldan	29
Ara Toplam		50
Manisa	Salihli	24
	Alaşehir	12
	Saruhanlı	16
Ara Toplam		52
İzmir	Selçuk	13
	Bayındır	26
	Efem çukur	1
	Urla	1
	Menemen	14
	Kemal paşa	7
Ara Toplam		62
Genel Toplam	214	

4.5. Fungal İzolatlarda dsRNA Varlığının Belirlenmesi

Moleküler yöntemler ile tanımlanması yapılan 214 *P. viticola* izolatı dsRNA varlığı yönünden Balijja vd. (2008) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak incelenmiştir. Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi örnekleme yapılan tüm il ve ilçelerde farklı sayılarda dsRNA içeren *P. viticola* izolatlarına rastlanmıştır. dsRNA analizleri sonucunda 214 *P. viticola* izolatından toplam 125 izolatta jel elektroforez de λ DNA/HindIII marker göre dsRNA bantları değerlendirilmiş ve GelAnalyzer 19.1 (www.gelanalyzer.com) programını kullanarak yaklaşık 9,4 kb moleküler ağırlığında dsRNAlar saptanmıştır (Resim 4.8 ve Çizelge 4.9). Ayrıca bazı izolatlarda yaklaşık 2,5 kb büyüklüğünde çok ne görülmeyen dsRNA bantları da tesbit edilmiştir.



Resim 4.8. *Phomopsis viticola* izolatlarından elede edilen dsRNA ların elektroforetik analiz sonuçları 1) Marker λ DNA/HindIII (23 kb), 2) USA-2 pozitif kontrol (12,7 kb *Cryphonectri parasitica*), 3-11) dsRNA pozitif (~ 9,4 kb) ve 12-14) dsRNA negatif izolatlar

Çizelge 4.9. Aydın, Denizli, Manisa ve İzmir illerinde dsRNA pozitif (içeren) ve negatif (içermeyen) *Phomopsis viticola* izolat sayılarının dağılımları

İller							
Aydın		Denizli		Manisa		İzmir	
dsRNA (+) ¹	dsRNA (-)	dsRNA (+)	dsRNA (-)	dsRNA (+)	dsRNA (-)	dsRNA (+)	dsRNA (-)
755Ko	754Ko	860Ç	856Ç	986Sr	964Sr	772Se	778Se
756Ko	762kKo	861Ç	858Ç	998Sr	966Sr	779Se	791Se
759Ko	803Ku	862Ç	865Ç	1005Sr	970Sr	780Se	913M
763Ko	805Ku	867Ç	869Ç	1021Sr	971Sr	781Se	926M
765Ko	813Ku	870Ç	884Ç	1106Sa	981Sr	783Se	955M
770Sö	818Ku	878Ç	898Bu	1107Sa	982Sr	784Se	959M
771Sö	820Ku	880Ç	896Bu	1108Sa	993Sr	785Se	1055B
812Ku	831Ku	882Ç	901Bu	1109Sa	995Sr	786Se	1056B
815Ku	844Ku	885Ç	1243Bu	1112Sa	997Sr	788Se	1060B
822Ku	1208Na	887Ç	1245Bu	1117Sa	1003Sr	793Se	1084B
823Ku	1209Na	888Ç	1249Bu	1124Sa	1012Sr	799Se	1085B
827Ku	1210Na	889G	1250Bu	1127Sa	1014Sr	904M	1100B
828Ku	1211Na	890G	1251Bu	1128Sa	1111Sa	910M	
841Ku	1212Na	891G	1253Bu	1135Sa	1115Sa	919M	
842Ku	1213Na	892G	1254Bu	1137Sa	1116Sa	922M	
843Ku	1215Na	894G	1255Bu	1140Sa	1119Sa	927M	
847Ku	1220Na	899Bu	1258Bu	1141Sa	1120Sa	936M	
848Ku	1223Na	900Bu	1259Bu	1145Sa	1121Sa	941M	
1216Na	1225Na	903Bu	1260Bu	1149Sa	1129Sa	947M	
1221Na	1226Na	1242Bu	1262Bu	1194Al	1143Sa	961M	
1222Na		1244Bu	1264Bu	1207Al	1151Sa	962M	
1227Na		1248Bu	1265Bu		1157Al	1024K	
1229Na		1252Bu	1266Bu		1158Al	1027K	
1230Na		1267Bu	1268Bu		1160Al	1028K	
1233Na			1269Bu		1161Al	1032K	
809Ku			1270Bu		1164Al	1036K	
821Ku					1167Al	1043K	
830Ku					1173Al	1045K	
832Ku					1185Al	1048B	

Çizelge 4.9. Aydın, Denizli, Manisa ve İzmir illerinde dsRNA pozitif (içeren) ve negatif (içermeyen) *Phomopsis viticola* izolat sayılarının dağılımları (Devamı)

İller							
Aydın		Denizli		Manisa		İzmir	
dsRNA (+) ¹	dsRNA (-)	dsRNA (+)	dsRNA (-)	dsRNA (+)	dsRNA (-)	dsRNA (+)	DsRNA (-)
852Ku					1197A1 1205A1	1049B 1050B 1057B 1061B 1065B 1066B 1070B 1071B 1072B 1079B 1080B 1086B 1088B 1091B 1092B 1095B 1098B 1101B 1102B 1273Ef 1286Ba	
Toplam 30	20	24	26	21	31	50	12
Toplam; 125 dsRNA(+), 89 dsRNA (-)							

Not: İzolat isimlendirmelerinde; Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Şöke, Ç Çal, Bu Buldan, Se Selçuk, M Menemen, Ef Efem Cukuru, K Kemalpaşa; B Bayındır; Sr Saruhanlı Sa Salihli; A1 Alaşehir, 1: dsRNA pozitif (+), dsRNA negatif (-)

4.6. dsRNA İçeren ve İçermeyen *Phomopsis viticola* İzolatlarının Biyolojik Yönden Karakterizasyonu

4.6.1. Koloni Renkleri

Toplam 125 adet dsRNA pozitif ve temsili olarak seçilen üç adet dsRNA negatif (toplam 128) *P. viticola* izolatları kültürel özellikleri yönünden incelenmiş ve karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

PDA'da oluşan kolonilerin renk değerlendirme test sonucunda; inkübasyonun 3. gününde dsRNA pozitif ve negatif izolatların hepsinde beyaz renkte koloniler oluşturduğu

belirlenmiştir. İnkübasyonun 7. günde 101 dsRNA pozitif ve 3 dsRNA negatif (104 izolat) izolatta beyaz, 14 izolatta gri, 10 izolatta ise krem renkte konidilerin oluştuğu gözlenmiştir (Çizelge 4.10). İnkübasyonun 14. gününde dsRNA negatif izolatların hepsi ve 62 dsRNA pozitif izolatta gri renkte koloniler oluşturduğu gözlenmiş ve diğer izolatlarda ise 47 beyaz, 16 krem renkte koloniler meydana gelmiştir (Çizelge 4.11).

İzolatların üç farklı inkübasyon günlerinin değerlendirilmesinde genel olarak beyaz renk koloniler daha fazla meydana gelmiştir. Ancak *P. viticola* dsRNA pozitif ve dsRNA negatif izolatlar arasında belirgin bir koloni rengi farklılığı gözlenmemiştir.

Çizelge 4.10. Ege Bölgesinden elde edilen dsRNA pozitif ve negatif *Phomopsis viticola* izolatlarının inkübasyonun 7. gününde koloni renkleri

Koloni Renkleri	İnkübasyonun 7. günü
Beyaz	862Ç, 867Ç, 870Ç, 878Ç, 880Ç, 882Ç, 885Ç, 887Ç, 888Ç, 889G, 890G, 891G, 892G, 894G, 779Se, 781Se, 784Se, 785Se, 786Se, 788Se, 793Se, 799Se, 904M, 910M, 919M, 922M, 927M, 936M, 941M, 947M, 961M, 962M, 1233Na, 860Ç, 903Bu, 1244Bu, 756Ko, 765Ko, 770Sö, 852Ku, 812Ku, 815Ku, 821Ku, 822Ku, 830Ku, 832Ku, 842Ku, 847Ku, 899Bu, 900Bu, 1267Bu, 998Sr, 1216Na, 1221Na, 1222Na, 1227Na, 1229Na, 1230Na, 1248Bu, 1252Bu, 1005Sr, 1021Sr, 1106Sa, 1108Sa, 1109Sa, 1112Sa, 1124Sa, 1127Sa, 1128Sa, 1135Sa, 1137Sa, 1140Sa, 1141Sa, 1149Sa, 1194Al, 1207Al, 1024K, 1027K, 1028K, 1032K, 1036K, 1048B, 1049B, 1050B, 1057B, 1061B, 1065B, 1066B, 1070B, 1071B, 1072B, 1079B, 1086B, 1088B, 1091B, 1092B, 1095B, 1098B, 1101B, 1102B, 1286Ba, 805Ku(-)¹, 1143Sa(-), 1055B(-)
Toplam	104
Gri	755Ko, 763Ko, 771Sö, 809Ku, 823Ku, 828Ku, 1145Sa, 772Se, 780Se, 783Se, 1043K, 1045K, 1080B, 1273Ef
Toplam	14
Krem	759Ko, 827Ku, 841Ku, 843Ku, 848Ku, 861Ç, 1242Bu, 986Sr, 1107Sa, 1117Sa
Toplam	10

Not: İzolat isimlendirmelerinde; Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Şöke; Ç Çal, Bu Buldan; Se Selçuk, M Menemen, Ef Efem Cukuru; K Kemalpaşa; B Bayındır; Sr Saruhanlı Sa Salihli; Al Alaşehir, 1: dsRNA negatif (-)

Çizelge 4.11. Ege Bölgesinden elde edilen dsRNA pozitif ve negatif *Phomopsis viticola* izolatlarının besi ortamında inkübasyonunun 14. gününde koloni renkleri

Koloni Renkleri	İnkübasyonun 14. günü
Beyaz	867Ç, 882Ç, 888Ç, 779Se, 781Se, 784Se, 793Se, 799Se, 904M, 910M, 919M, 936M, 947M, 961M, 1027K, 892G, 903M, 1108Sa, 770Sö, 812Ku, 815Ku, 822Ku, 842Ku, 852Ku, 1216Na, 1221Na, 1222Na, 1229Na, 1230Na, 1233Na, 1112Sa, 1124Sa, 1127Sa, 1128Sa, 1140Sa, 1149Sa, 1028K, 1048B, 1049B, 1061B, 1072B, 1079B, 1091B, 1092B, 1095B, 1101B, 1102B
Toplam	47
Gri	848Ku, 860Ç, 861Ç, 862Ç, 870Ç, 880Ç, 885Ç, 878Ç, 889G, 890G, 894G, 899Bu, 772Se, 780Se, 783Se, 785Se, 786Se, 788Se, 922M, 927M, 941M, 962M, 1032K, 1036K, 755Ko, 756Ko, 763Ko, 765Ko, 771Sö, 809Ku, 823Ku, 828Ku, 830Ku, 841Ku, 843Ku, 847Ku, 1244Bu, 986Sr, 998Sr, 1043K, 1045K, 1050B, 1057B, 1070B, 1080B, 1086B, 1088B, 1098B, 1005Sr, 1021Sr, 1106Sa, 1107Sa, 1109Sa, 1117Sa, 1135Sa, 1137Sa, 1141Sa, 1145Sa, 1194Al, 1207Al, 1273Ef, 1286Ba, 805Ku(-)¹, 1143Sa(-), 1055B(-)
Toplam	65
Krem	759Ko, 821Ku, 827Ku, 832Ku, 1227Na, 887Ç, 891G, 900Bu, 1242Bu, 1248Bu, 1252Bu, 1267Bu, 1024K, 1065B, 1066B, 1071B
Toplam	16

Not: İzolat isimlendirmelerinde; Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Şöke; Ç Çal, Bu Buldan; Se Selçuk, M Menemen, Ef Efem Cukuru; K Kemalpaşa; B Bayındır; Sr Saruhanlı Sa Salihli; Al Alaşehir, * dsRNA negatif (-)

4.6.2 Miselyal Gelişme Hızı

Toplam 125 adet dsRNA pozitif ve üç adet dsRNA negatif *P. viticola* izolatların miselyal gelişme hızlarının değerlendirilme sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 4.12, 4.13 ve 4.14'de gösterilmiştir. Çizelge 4.12'e göre; dsRNA pozitif izolatları inkübasyonun 3. gününde toplam altı izolat 0,5-1,36 cm ortalama miselyal çapı ile yavaş gelişen grup 1'de yer almıştır. 56 izolat ortalama miselyal koloni çapı 1,37-2,23 cm ile orta hızda gelişen grup 2'de yer almıştır. Geri kalan 63 izolat 2,24-3,1 cm ortalama miselyal koloni çapı ile hızlı gelişen grup 3'de yer almıştır. dsRNA negatif izolatlar ise; bir izolat (1055B) grup 2 ve diğer iki izolat (805Ku, 1143Sa) grup 3'de yer almıştır.

İnkübasyonun 7. gününde; 38 dsRNA pozitif izolatı 0,8-2,56 cm ortalama miselyal koloni çapı ile 1. grupta (yavaş), 52 izolat 2,57-4,33 cm ile 2. grup (orta hız) ve 35 izolat 4,34-6,1 cm ile 3. grupta (hızlı) yer almıştır (Çizelge 4.13). İnkübasyonun bu döneminde dsRNA negatif izolatların hepsi 4,34-6,1 cm ortalama miselyal koloni çapı ile hızlı gelişen yani grup 3'de yer almıştır (Çizelge 4.13). İnkübasyonun 14. gününde ise toplam 11 (1,9-3,6

cm), 47 (3,61-5,3 cm) ve 67 (5,31-7 cm) dsRNA pozitif izolatu sırasıyla yavaş, orta ve hızlı miselyal koloni gelişimleri göstermiştir (Çizelge 21 ve Resim 4.9). dsRNA negatif izolatları ise inkübasyonun yedinci gün gibi hepsi hızlı miselyal koloni gelişimleri ile 3. grupta yer almıştır.

Çizelge 4.12. Ege Bölgesinden elde edilen dsRNA pozitif ve negatif *Phomopsis viticola* izolatlarının besi ortamında inkübasyon üçüncü gününde miselyal koloni gelişimleri

Koloni Çap Aralığı (cm)	
Grup I (0,5-1,36)	842Ku, 1230Na, 888Ç, 1248Bu, 1108Sa, 904M
	6
Grup II (1,37-2,23)	862Ç, 786Se, 880Ç, 882Ç, 890G, 892G, 910M, 919M, 927M, 936M, 1024K, 1072B, 763Ko, 815Ku, 822Ku, 827Ku, 828Ku, 832Ku, 986Sr, 998Sr, 1106Sa, 841Ku, 847Ku, 852Ku, 1216Na, 1221Na, 861Ç, 894G, 1244Bu, 1267Bu, 1109Sa, 1112Sa, 1137Sa, 1140Sa, 784Se, 941M, 1141Sa, 1149Sa, 785Se, 793Se, 961M, 1194Al, 1207Al, 779Se, 783Se, 1027K, 1028K, 1045K, 1048B, 1079B, 1091B, 1092B, 1095B, 1101B, 1102B, 1286Ba, 1055B(-)¹
Toplam	57
Grup III (2,24-3,1)	870Ç, 878Ç, 885Ç, 887Ç, 891G, 900Bu, 755Ko, 756Ko, 759Ko, 765Ko, 770Sö, 771Sö, 809Ku, 812Ku, 821Ku, 843Ku, 823Ku, 830Ku, 848Ku, 899Bu, 889G, 1233Na, 860Ç, 867Ç, 1005Sr, 780Se, 947M, 962M, 922M, 772Se, 781Se, 1021Sr, 1128Sa, 788Se, 1145Sa, 1032K, 1036K, 1043K, 1049B, 1050B, 1070B, 1057B, 1061B, 1065B, 1066B, 1071B, 1080B, 1086B, 1135Sa, 799Se, 1107Sa, 1117Sa, 1124Sa, 1127Sa, 1222Na, 1227Na, 1229Na, 903Bu, 1242Bu, 1252Bu, 1088B, 1098B, 1273Ef, 805Ku(-), 1143Sa(-)
Toplam	65

Not: Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Şöke; Ç Çal, Bu Buldan; Se Selçuk, M Menemen, Ef Efem Cukuru; K Kemalpaşa; B Bayındır; Sr Saruhanlı; Sa Salihli; Al Alaşehir, 1: dsRNA negatif (-)

Çizelge 4.13. Ege Bölgesinden elde edilen dsRNA pozitif ve negatif *Phomopsis viticola* izolatlarının besi ortamında inkübasyonunun 7. gününde miselyal koloni gelişimleri

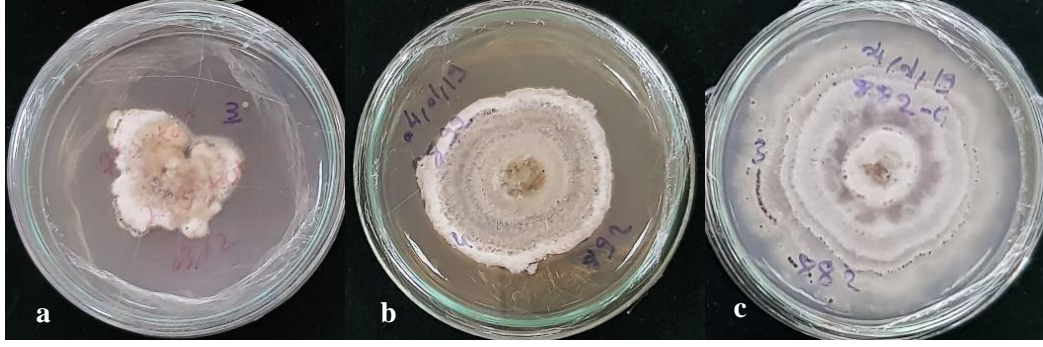
Koloni Çap Aralığı (cm)	
Grup I (0,8-2,56)	842Ku, 1216Na, 1248Bu, 986Sr, 1109Sa, 779Se, 783Se, 784Se, 785Se, 786Se, 788Se, 793Se, 904M, 910M, 919M, 927M, 936M, 941M, 947M, 961M, 962M, 1024K, 1027K, 1028K, 1032K, 1045K, 1048B, 1066B, 1072B, 1079B, 1091B, 1092B, 1095B, 1098B, 1101B, 1102B, 1273Ef, 1286Ba
Toplam	38
Grup II (2,57-4,33)	880Ç, 882Ç, 888Ç, 772Se, 781Se, 799Se, 1230Na, 862Ç, 867Ç, 892G, 894G, 1244Bu, 763Ko, 809Ku, 822Ku, 827Ku, 828Ku, 832Ku, 843Ku, 847Ku, 848Ku, 860Ç, 1221Na, 1229Na, 1267Bu, 998Sr, 1005Sr, 1106Sa, 1107Sa, 1108Sa, 1112Sa, 780Se, 1117Sa, 1137Sa, 1140Sa, 1141Sa, 1149Sa, 1194A, 1207Al, 922M, 1036K, 1043K, 1049B, 1050B, 1057B, 1061B, 1065B, 1070B, 1071B, 1080B, 1086B, 1088B
Toplam	52
Grup III (4,34-6,1)	870Ç, 878Ç, 885Ç, 887Ç, 889G, 890G, 891G, 900Bu, 903Bu, 755Ko, 756Ko, 759Ko, 765Ko, 770Sö, 771Sö, 812Ku, 815Ku, 821Ku, 823Ku, 830Ku, 841Ku, 852Ku, 899Bu, 1222Na, 1227Na, 1233Na, 861Ç, 1242Bu, 1252Bu, 1021Sr, 1124Sa, 1127Sa, 1128Sa, 1135Sa, 1145Sa, 1143Sa(-)¹, 1055B(-), 805Ku(-)
Toplam	38

Not: Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Şöke; Ç Çal, Bu Buldan; Se Selçuk, M Menemen, Ef Efem Cukuru; K Kemalpaşa; B Bayındır; Sr Saruhanlı; Sa Salihli; Al Alaşehir, 1: dsRNA negatif (-)

Çizelge 4.14. Ege Bölgesinden elde edilen dsRNA pozitif ve negatif *Phomopsis viticola* izolatlarının besi ortamında inkübasyonunun 14. gününde miselyal koloni gelişimleri

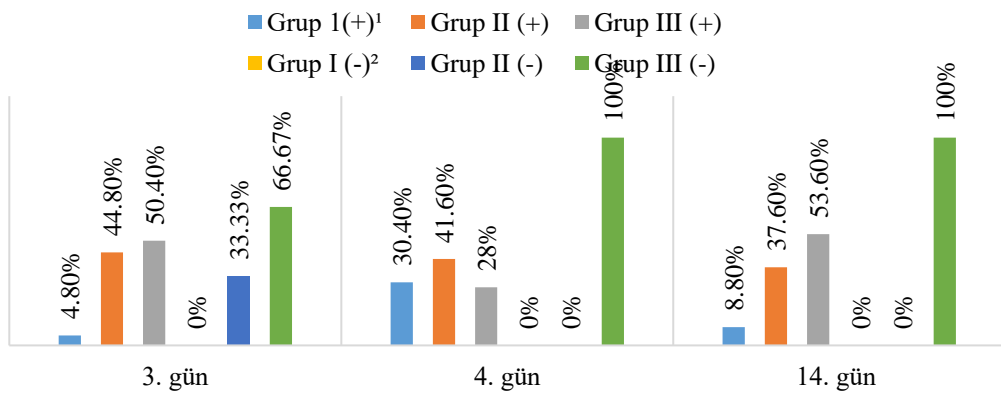
Koloni Çap Aralığı (cm)	
Grup I (1,9-3,6)	763Ko, 986Sr, 1109Sa, 1112Sa, 1117Sa, 1137Sa, 1194Al, 786Se, 910M, 1092B, 1286Ba
Toplam	11
Grup II (3,61-5,3)	809Ku, 823Ku, 841Ku, 843Ku, 848Ku, 1216Na, 1229Na, 1230Na, 1233Na, 862Ç, 867Ç, 888Ç, 889G, 903M, 892G, 894G, 899Bu, 1244Bu, 1248Bu, 998Sr, 1005Sr, 784Se, 1106Sa, 1107Sa, 1108Sa, 1124Sa, 1140Sa, 1145Sa, 1149Sa, 1207Al, 785Se, 919M, 922M, 936M, 941M, 1024K, 1027K, 1028K, 1045K, 1048B, 1070B, 1072B, 1079B, 1080B, 1088B, 1102B, 1273Ef
Toplam	47
Grup III (5,31-7)	755Ko, 756Ko, 759Ko, 765Ko, 770Sö, 771Sö, 812Ku, 815Ku, 821Ku, 822Ku, 827Ku, 828Ku, 830Ku, 832Ku, 842Ku, 847Ku, 852Ku, 1221Na, 1222Na, 1227Na, 860Ç, 861Ç, 870Ç, 878Ç, 880Ç, 882Ç, 885Ç, 887Ç, 890G, 891G, 900Bu, 1242Bu, 1252Bu, 1267Bu, 1021Sr, 788Se, 1127Sa, 1128Sa, 1135Sa, 1141Sa, 772Se, 779Se, 780Se, 781Se, 783Se, 962M, 799Se, 904M, 927M, 947M, 961M, 1032K, 1036K, 1043K, 793Se, 1049B, 1050B, 1057B, 1061B, 1065B, 1066B, 1071B, 1086B, 1091B, 1095B, 1098B, 1101B, 805Ku(-)¹, 1143Sa(-), 1055B(-)
Toplam	70

Not: Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Şöke; Ç Çal, Bu Buldan; Se Selçuk, M Menemen, Ef Efem Cukuru; K Kemalpaşa; B Bayındır; Sr Saruhanlı; Sa Salihli; Al Alaşehir, 1: dsRNA negatif (-)



Resim 4.9. Besi ortamında inkübasyonun 14. gününde dsRNA pozitif izolatlarda gözlenen; a) yavaş, b) orta ve c) hızlı miselyal koloni gelişimleri

İzolatların koloni gelişim değerlendirmesinde; inkübasyonun 3. gününde izolatların %100'ü (dsRNA pozitif ve dsRNA negatif) 1,37 ile 3,1 cm arasında çaplar oluşarak orta ve hızlı hız gelişimi gözlenmiştir. İnkübasyonun yedinci gününde pozitif izolatlarda %41,60'ı orta hızlı koloni çap ile sınırlı miselyal gelişim gözlenmiştir. dsRNA negatif izolatlarda ise, %100'ü petrinin tamamını kapatarak grup III de yer almıştır. İnkübasyonun 14. gününde dsRNA pozitif izolatların %37,60'ı orta hızlı ve %53,60'ı hızlı koloni gelişimi meydana getirmiştir. Bunun aksine dsRNA negatif izolatların %100'ü 4,34-7 arasında değişen çapıyla hızlı koloni gelişimi göstererek petrinin tamamını kaplamışlardır (Şekil 4.3).



Not: izolatların koloni çaplarının ortalaması; yavaş (Grup I), orta (Grup II) ve hızlı (Grup III) 1: dsRNA pozitif (+), 2: dsRNA negatif (-)

Şekil 4.3. Ege Bölgesinden elde edilen dsRNA pozitif ve negatif *Phomopsis viticola* izolatlarının besiyerinde inkübasyon 3., 7. ve 14. günlerindeki miselyal koloni gelişimlerinin yüzde oranı

4.6.3. Piknit Oluşumu

Toplam 125 dsRNA pozitif ve üç dsRNA negatif *P. viticola* izolatları oluşturdukları piknit sayısı ortalama skala değerine göre değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. dsRNA pozitif izolatların dördünde (1109Sa, 1137Sa, 1145Sa ve 1092B) piknit oluşumu gözlenmemiştir. (Çizelge 4.15 ve Resim 4.10 a). İzolatların beşi 1 cm² alanda ortalama 1 ile 25 arasında değişen miktarlarda piknit oluşturmuştur. 27 izolat ise 1 cm²'de 26-50 arasında piknit oluşturarak 2 skala değerinde grup oluşturmuştur (Resim 4.10 b). 82 izolat 50 ile 100 arasında ve yedi izolat 100'ün üzerinde 1 cm²'lik alanda değişen sayılarda piknit oluşturmuştur (Resim 4.10 c ve d). dsRNA negatif izolatların hepsinde 1 cm²'lik alanda 50 ile 100 arasında piknit oluşumu meydana gelmiştir (Çizelge 4.15 ve Resim 4.10 e).



Resim 4.10. *Phomopsis viticola* izolatları arasında piknit oluşumu yönünden ortaya çıkan farklı görünümler; a) piknit oluşumu gözlemlenmeyen (1109Sa), b) 26-50 arasında piknit oluşumu gözlemlenen (887Ç), c) 50-100 arasında piknit oluşumu gözlemlenen (770Sö) ve d) 100 üzerinde sayıda piknit oluşumu gözlemlenen (812Ku) dsRNA pozitif izolatları, e) 100'den fazla sayıda piknit oluşumu gözlemlenen dsRNA negatif (1143Sa) izolatı

Çizelge 4.15. Ege Bölgesinden elde edilen dsRNA pozitif ve negatif *Phomopsis viticola* izolatlarının inkübasyonun dördüncü haftasına ait piknit sayıları

Piknit oluşumu index değeri	İzolatlar
0: (Piknit yok)	1109Sa, 1137Sa, 1145Sa, 1092B
Toplam	4
1: (1-25)	1216Na, 986Sr, 1117Sa, 919M, 1091B
Toplam	5
2: (26-50)	763Ko, 823Ku, 1233Na, 882Ç, 887Ç, 888Ç, 889G, 892G, 894G, 899Bu, 903Bu, 1124Sa, 1128Sa, 1141Sa, 1194Al, 793Se, 904M, 961M, 1027K, 1032K, 1036K, 1050B, 1066B, 1070B, 1072B, 1080B, 1286Ba
Toplam	27
3: (50-100)	755Ko, 756Ko, 759Ko, 765Ko, 770Sö, 771Sö, 809Ku, 821Ku, 822Ku, 827Ku, 828Ku, 830Ku, 832Ku, 841Ku, 842Ku, 843Ku, 847Ku, 848Ku, 852Ku, 1221Na, 1222Na, 1227Na, 1229Na, 1230Na, 860Ç, 861Ç, 862Ç, 867Ç, 870Ç, 878Ç, 880Ç, 885Ç, 890G, 891G, 900Bu, 1242Bu, 1244Bu, 1248Bu, 1252Bu, 1267Bu, 998Sr, 1005Sr, 1021Sr, 1106Sa, 1107Sa, 1108Sa, 1112Sa, 1135Sa, 1140Sa, 1149Sa, 1207Al, 772Se, 779Se, 780Se, 781Se, 784Se, 785Se, 786Se, 788Se, 910M, 922M, 936M, 941M, 947M, 962M, 1024K, 1028K, 1043K, 1045K, 1048B, 1049B, 1057B, 1061B, 1065B, 1071B, 1079B, 1086B, 1088B, 1098B, 1101B, 1102B, 1273Ef, 805Ku (-)¹, 1143Sa(-), 1055B(-)
Toplam	85
4: (100<)	812Ku, 815Ku, 1127Sa, 783Se, 927M, 799Se, 1095B
Toplam	7

Not: Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Şöke; Ç Çal, Bu Buldan; Se Selçuk, M Menemen, Ef Efem Cukuru; K Kemalpaşa; B Bayındır; Sr Saruhanlı; Sa Salihli; Al Alaşehir, 1: dsRNA negatif izolat, 0-4 skalası (1 cm² lik alanda piknit sayısı): 0: piknit yok; 1: 1-25 piknit; 2: 26-50 piknit; 3:50-100 piknit; 4: >100 piknit

Yukarıda elde edilen bulgulara göre dsRNA pozitif izolatların %65,6'sında 50 ile 100 arasında değişen sayıda piknit oluşurken, izolatların sadece %3,2'sinde piknit oluşumu gözlenmemiştir. dsRNA negatif izolatların ise %100'ünde 50-100 arasında değişen sayıda piknit oluşumu meydana gelmiştir.

Ayrıca piknit oluşturmayan dört dsRNA pozitif izolatı inkübasyonun 14. gününde oluşturdukları koloni renkleri ve miselyal koloni gelişimi ise şöyledir; 1109Sa, 1137Sa izolatları gri ve 1092B izolatı beyaz renkte kolonilerle sınırlı miselyal gelişim gösterirken, 1145Sa nolu izolat gri renkte koloniler ve orta hız miselyal koloni gelişimi göstermişlerdir. Bu izolatların aksine 4 skala değerini alan ve 100 üzerinde piknit oluşturan izolatlarda inkübasyonun 14. gününde 5 (812Ku, 815Ku, 1127Sa, 799Se, 1095B) izolatta beyaz ve 2 (783Se, 927M) izolatta gri renkte koloniler görülmüş ve izolatların hepsi hızlı miselyal kloni gelişim hızıyla petri kabının tamamını kapatarak gelişmiştir. dsRNA negatif izolatlar ise, 3

skala değeri ile gri renkte koloniler oluşturarak ve hızlı miselyal gelişim göstererek petriyi hızla doldurmuş olduğu gözlenmiştir.

4.7. dsRNA Pozitif İzolatların Dikey Taşınma Kapasitesinin Ölçülmesi

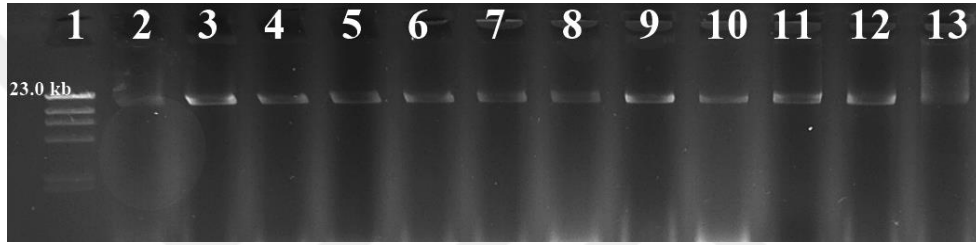
Çalışmanın bu aşamasında, agar jel görüntüsü en iyi dsRNA profiline sahip olan 50 (İzmir'den 26, Aydın'dan 10, Manisa'dan 6 ve Denizli'den 8 izolat) dsRNA pozitif izolat seçilmiş ve bu izolatlar virüsün eşeysiz üreme sırasında konidiye geçişini gösteren dikey taşınım kapasiteleri yönünden değerlendirilmiştir. Her izolattan en az 10 olmak üzere toplam 500 adet tek spor izolatu elde edilmiş ve 50 ebeveyn olmak üzere toplam 550 izolatu dsRNA analizi yapılmıştır. Çalışma bulguları Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.16. dsRNA pozitif *Phomopsis viticola* izolatlarında dsRNA virüslerinin dikey geçiş performansı (%)

İzolat	dsRNA Dikey Taşınan İzolat Oranı (%)	İzolat	dsRNA Dikey Taşınan İzolat Oranı (%)
841Ku	%100	1032K	%0
809Ku	%0	1061B	%60
847Ku	%0	780Se	%100
843Ku	%0	962M	%100
830Ku	%0	961M	%100
812Ku	%0	1065B	%0
828Ku	%0	919M	%0
770Sö	%0	784Se	%0
1227Na	%0	927M	%0
1216Na	%80	1036K	%0
889G	%100	1095B	%0
861Ç	%70	947M	%0
882Ç	%0	1071B	%0
900Bu	%0	1024K	%0
899Bu	%0	1045K	%0
1248Bu	%0	783Se	%0
1252Bu	%0	785Se	%0
878Ç	%0	781Se	%0
903M	%60	1049B	%0
1091B	%100	1124Sa	%0
1098B	%100	1137Sa	%0
1027K	%40	1108Sa	%0
799Se	%0	1005Sr	%0
910M	%0	1207Al	%0
1080B	%0	998Sr	%0

Not: Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Şöke; Ç Çal, Bu Buldan; Se Selçuk, M Menemen, Ef Efem Cukuru; K Kemalpaşa; B Bayındır; Sr Saruhanlı; Sa Salihli; Al Alaşehir

Çizelge 4.16'daki veriler değerlendirildiğinde izolatların dsRNA içeren tek spor oranlarının %0 ve %100 arasında değiştiği görülmektedir. Yedi izolatta dikey taşınım %100 olarak saptanmıştır. Bunların orijinal (ebeveyn) izolatlarının dsRNA band'ları incelendiğinde çok güçlü belirgin dsRNA band'larına sahip olduğu dikkat çekmiştir (Resim 4.11). Bunun dışında 33 izolatta dikey taşınım gözlemlenmemiştir. dsRNA bantları çok net görülmeyen ebeveynlerin tek spor izolatlarında dsRNA geçişi ya olmamış ya da çok az sayıda ne görülmeyen bantlar elde edilmiştir. Yapılan değerlendirmelere göre dikey performansı en iyi izolatlar, 841Ku, 1216Na, 889G, 861Ç, 780Se, 1091B, 1098B, 1061B, 903M, 962M, 961M ve 1027K olarak saptanmıştır.

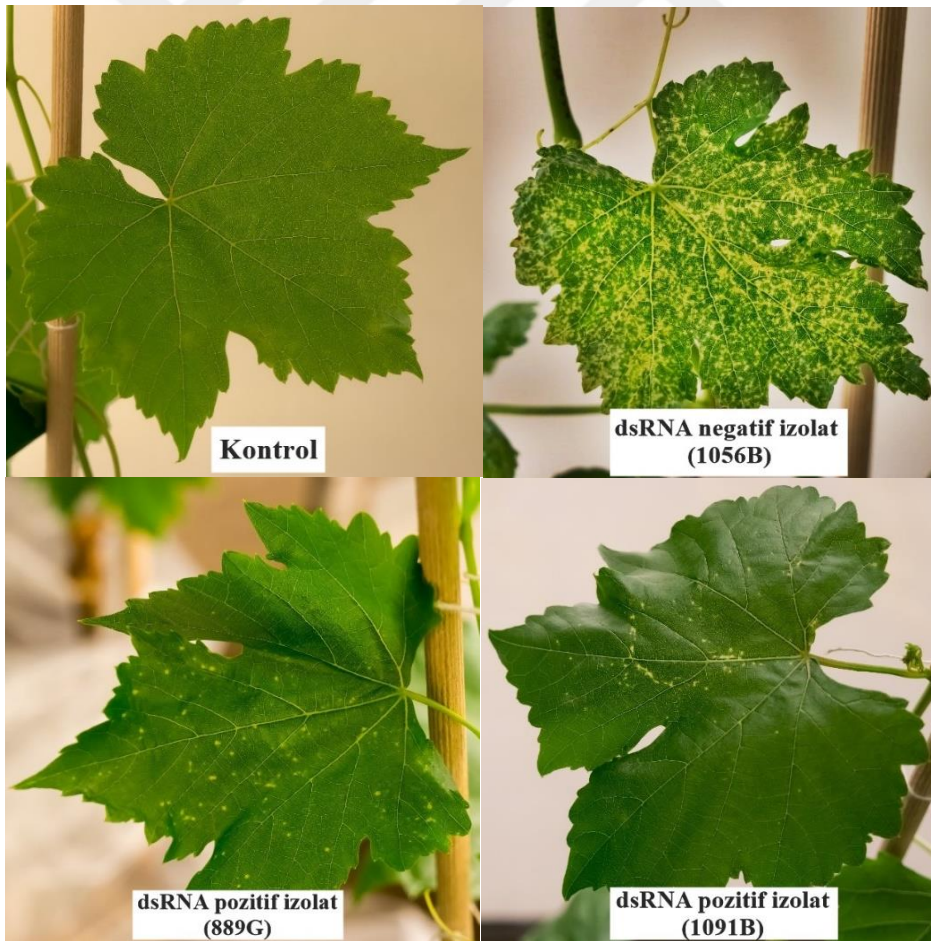


Resim 4.11. 1091B *Phomopsis viticola* izolatının dsRNA elektroforetik analiz sonucunda %100 dikey geçiş performans görünümü 1) Marker Λ DNA/HindIII (23 kb), 2) pozitif Kontrol (12,7 kb *Cryphonectria parasitica*), 3) 1091B dsRNA pozitif izolat (ebeveyn ~ 9,4 kb), 4-13) dikey taşınmada dsRNA pozitif izolatlar (~ 9,4 kb)

4.8. dsRNA içeren *Phomopsis viticola* İzolatlarının Virülenslik Belirleme Çalışmaları

Serada yetiştirilen asma fidanların sürgün uçları istenilen doku formuna ulaştığında homojen yapıda olan bitkiler test materyali olarak seçilmiştir. Virülenslik testi için dikey taşınma test sonucunda belirlenen toplam 12 adet dsRNA pozitif *P. viticola* izolatlarından (841Ku, 1216Na, 889G, 861Ç, 780Se, 1091B, 1098B, 1061B, 903M, 962M, 961M ve 1027K) Materyal ve Metod (3.2.8.2) bölümünde ifade edildiği gibi inokulum hazırlanmış ve asma fidanları üzerine el spreyi kullanılarak püskürtülmüştür. Bitkiler kontrollü bitki yetiştirme kabini hastalık gelişimi yönünden günlük olarak takip edilmiş ve bakımları yapılmıştır. Denemenin ikinci haftasından sonra yapraklarda sarı klorotik lekeler ve sürgünlerde 3. haftadan sonra siyah lezyonlar görülmeye başlamıştır. Yapraklarda hastalık şiddeti ölçümü inkübasyonun 15. gününde, sürgünlerde ise 30. gününde yapılmıştır.

Yapraklarda hastalık ölçümünde lezyon sayısına dayalı hastalık diagramı (Erincik vd., 2001), sürgünlerde ise Horsfall-Barratt skalası kullanılmıştır (Horsfall ve Barratt, 1945). İnokülasyon yapılan asma fidanlarının yapraklarında önce hafif açık renkte lekeler görülmüş ardından küçük açık sarı renkte benek şeklinde lekeler belirmiştir (Resim 4.12). Genel olarak dsRNA negatif izolat ile inoküle edilen bitkilerin yapraklarında bu küçük sarı lekeler çok daha sık ve yoğun olarak, dsRNA pozitif izolatlarda ise lekeler daha az yoğun olarak gözlenmiştir. İnokülasyondan sonra asma sürgünlerinde küçük siyah lezyonlar belirlenmiştir (Resim 4.13). Bu siyah lezyonlar dsRNA negatif izolat ile inoküle edilen bitkilerin sürgünlerinde çok daha yoğun ve sıkken, dsRNA pozitif izolatlarda daha az sayıda lezyonun olduğu gözlenmiştir. Tesadüfi deneme desenine göre, dört tekerrürlü ve her tekerrürde 2 bitki olacak şekilde yapılmış olan denemede ölçüm sonrası verilerin istatistiksel analizi tek yönlü varyans analizi ile SPSS programında izolatlar arasındaki virülenslik farklılıkları ortaya konulmuş ve elde edilen bulgular Çizelge 4.17’de gösterilmiştir.



Resim 4.12. Asma fidanlarında *Phomopsis viticola* ile inokülasyonun 15. gününde yapraklarda gözlenen klorotik lekeler



Resim 4.13. Asma fidanlarında *Phomopsis viticola* ile inokulasyonun 30. gününde dsRNA negatif (1056B) ve dsRNA pozitif (889G, 1091B) sürgünlerde gözlenen lezyonlar

Çizelge 4.17. dsRNA içeren *Phomopsis viticola* izolatlarının asma fidanlarında sürgün ve yapraklarda oluşturduğu hastalık şiddeti

İzolatlar	Sürgünde Ortalama Hastalık Şiddeti(%) ¹	Yaprakta Ortalama Hastalık Şiddeti ²
Negatif kontrol	0,0	0,0
780Se	0,5 d ³	16,6 cd
1091B	0,6 d	17,5 cd
1061B	0,7 d	17,2 cd
861Ç	0,8 cd	27,5 bc
1027K	1,2 cd	24,7 bcde
889G	1,5 cd	7,6 d
961M	1,5 cd	10,6 cd
962M	1,9 cd	17,2 cd
1098B	2,3 cd	14,8 cd
841Ku	2,5 cd	13,2 cd
903M	4,7 bc	25,6 bcd
1216Na	6,6 b	36,7 bc
1056B (dsRNA negatif)	10,8 a	65,9 a

1: Sürgünde hastalık şiddeti lezyonların sürgün yüzeyinde kapladığı alanı ifade etmektedir, 2: Yaprakta hastalık şiddeti, yaprak üzerindeki leke sayısını ifade etmektedir, 3: Ortalama değerler arasında istatistiki fark Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre yapılmıştır. Sütun boyunca aynı harfi alan değerler arasında fark istatistiki olarak önemli değildir.

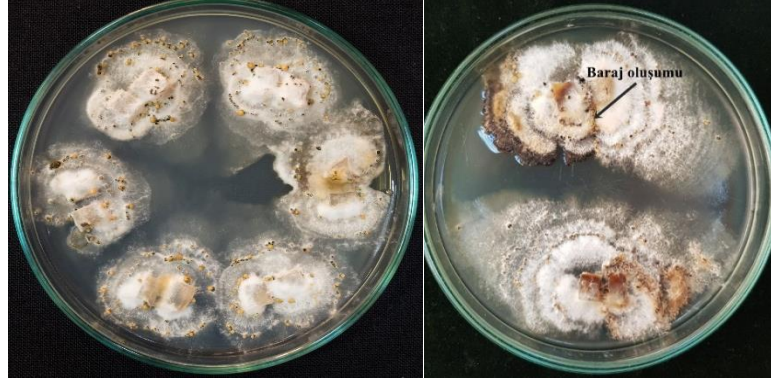
Çizelge 4.18'de görüldüğü gibi dsRNA negatif izolat (1056B) hem sürgün hem de yaprakta diğer dsRNA pozitif izolatlarla göre istatistiksel olarak daha fazla hastalık şiddeti meydana getirmiştir. dsRNA pozitif izolatlar ile inokule edilen bitkiler arasında sürgün ve yaprakta hastalık şiddeti yönünden farklılıklar bulunmuştur. 1216Na izolatı sürgünde diğerlerine göre istatistiki açıdan da önemli olarak daha yüksek hastalık şiddetine sebep olmuştur. On izolattın, (780Se, 1091B, 1061B, 861Ç, 1027K, 889G, 961M, 962M, 1098B ve 841Ku) sürgündeki hastalık şiddeti %2,5 ile 0,5 arasında değişmiş olup bunlar arasında istatistiki fark görülmemiştir. Yapraklarda en yüksek hastalık şiddeti gösteren izolattın dsRNA negatif 1056B olduğu belirlenmiştir. 1216Na izolatı sürgünde olduğu gibi yaprakta da dsRNA pozitif izolatlar arasında virülensliği en yüksek olarak bulunmuştur. İstatistiki olarak aynı gruba giren dsRNA pozitif 10 izolatta hastalık şiddeti 25,6-7,6 arasında değişmiştir. Bu sonuçlardan dsRNA pozitif fungal izolatların dsRNA negatif izolata göre virülensliklerinin düşük olduğu ve hipovirulent özellikte olma ihtimallerinin olduğu söylenebilir. Hatta bunlardan bazıları (780Se, 1098B, 1091B, 961M, 962M, 889G ve 841Ku) virülensliklerinin düşük olmasının yanında dikey taşınım performanslarının %100 olarak bulunması sebebiyle biyolojik mücadele için ümitvar izolatlar olarak kabul edilebilir. Bunun dışında 1061B izolatı virülensliği düşük olsa da dikey taşınım performansı düşük

(%60) olduğundan, 1216Na izolatu %80 dikey geçiş performansı olsa da virülenliğinin yüksek olması sebebiyle biyolojik mücadele için uygun izolatlar olmayabilirler. Bu sonuçlar ile her dsRNA pozitif olan izolatu hipovirulent olarak değerlendirilmeyeceği ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada ele alınan eleme testlerinin gerekliliği de böylece anlaşılmaktadır.

4.9. dsRNA Pozitif İzolatlarda dsRNA'nın Yatay Taşınma Kapasitesinin Ölçülmesi

4.9.1 İzolatların Vejetatif Uyum (vc) Tiplerinin Belirlenmesi

Elde edilen toplam 125 adet dsRNA pozitif *P. viticola* izolatu yatay geçiş çalışmalarının yürütülebilmesi için öncelikli olarak izolatların vejetatif uyum gruplarının belirlenmesi testi 3.2.9.1'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Test sonucunda dsRNA pozitif eşleşebilen iki *P. viticola* izolatu kolonisinin birleşmesi ile vejetatif uyumluluk ve eşleştirilen iki koloni arasında baraj oluşmasına ise vejetatif uyumsuzluk reaksiyonları gözlenmiş (Resim 4.14) ve aralarında vc uyum reaksiyonu olan izolatlar aynı grupta yer almıştır. İzolatların vc tip yönünden gruplandırılması ile ilgili bulgular çizelge 4.18'de gösterilmiştir. Buna göre izolatlar vejetatif uyum yönünden toplam 5 farklı vc gruba ayrılmıştır. Bu gruplandırma sonucunda, 2. grup'da her 4 ilin (Aydın, Denizli, İzmir ve Manisa) farklı ilçelerinden izolatlar yer almıştır. Böylece 2. grup en fazla izolat içeren grup olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.18). Çalışmada dikkat çeken diğer bir bulgu ise İzmir ili Menemen ilçesinin izolatlarının birçoğu grup 2'de yer alan izolatlarla vejetatif uyumlu reaksiyonlar gösterirken (Resim 4.14 a) 961M ve 962M adlı izolatlar herhangi bir izolatla vejetatif uyum reaksiyonu göstermemişlerdir (Resim 4.14 b). Bu nedenle 961M ve 962M izolatlarının her biri farklı vc grubunda yer almıştır (Çizelge 4.18).



Resim 4.14. *Phomopsis viticola* izolatlarının vejetatif uyum (vc) tiplerinin belirlenmesi: a) eşleşebilen kolonilerin birleştiği vejetatif uyumlu reaksiyonlar b) koloniler arasında barajın olduğu vejetatif uyumsuzluk reaksiyonları

Çizelge 4.18. İllere göre dsRNA içeren *Phomopsis viticola* izolatlarının vejetatif uyum (vc) yönünden gruplandırılması

Vc Grup							
Grup 1	Grup 2				Grup 3	Grup 4	Grup 5
İller	İller				İller	İller	İller
Aydın	Aydın	Denizli	İzmir	Manisa	İzmir	İzmir	İzmir
1216Na	770Sö	860Ç	772Se	986Sr	1048B	961M	962M
1221Na	771Sö	861Ç	779Se	998Sr	1049B		
1222Na	755Ko	862Ç	780Se	1005Sr	1050B		
1227Na	756Ko	867Ç	781Se	1021Sr	1057B		
1229Na	759Ko	870Ç	783Se	1106Sa	1061B		
1230Na	763Ko	878Ç	784Se	1107Sa	1065B		
1233Na	765Ko	880Ç	785Se	1108Sa	1066B		
809Ku		882Ç	786Se	1109Sa	1070B		
812Ku		885Ç	788Se	1112Sa	1071B		
815Ku		887Ç	793Se	1117Sa	1072B		
821Ku		888Ç	799Se	1124Sa	1079B		
822Ku		889G	904M	1127Sa	1080B		
823Ku		890G	903M	1128Sa	1086B		
827Ku		891G	910M	1135Sa	1088B		
828Ku		892G	919M	1137Sa	1091B		
830Ku		894G	922M	1140Sa	1092B		
832Ku		899Bu	927M	1141Sa	1095B		
841Ku		900Bu	936M	1145Sa	1098B		
842Ku		1242Bu	941M	1149Sa	1101B		
843Ku		1244Bu	947M	1194Al	1102B		
847Ku		1248Bu	1273Ef	1207Al			
848Ku		1252Bu	1024K				
852Ku		1267Bu	1027K				
			1028K				
			1032K				
			1036K				
			1043K				
			1045K				
			1286B				

Not: Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Şöke; Ç Çal, Bu Buldan; Se Selçuk, M Menemen, Ef Efem Cukuru; K Kemalpaşa; B Bayındır; Sr Saruhanlı; Sa Salihli; Al Alaşehir

4.9.2. dsRNA Yatay Taşınım Çalışmaları

Yatay taşınım testlerinde elde edinilen bulgulara göre; denemede kullanılan dsRNA pozitif izolatların çoğunda, dsRNA'nın yatay olarak alıcı izolata taşınabildiği saptanmıştır (Çizelge 4.19). Ancak izolatların yatay taşınım kapasitelerinde farklılıklar bulunmuştur. 1061B izolatının tüm eşleştirmelerinde alıcı izolata dsRNA'nın yatay taşınım gerçekleşmiştir. 1091B, 1216Na ve 861Ç izolatlarında 6 eşleştirmeden 4'ünde, 841Ku izolatından 6 eşleştirmeden 3'ünde, 1098B, 889G ve 780Se izolatlarından 6 eşleştirmeden 2'sinde yatay taşınım saptanmıştır. 903M ve 1027K izolatlarının hiçbir eşleştirmesinde yatay taşınım belirlenmemiştir.

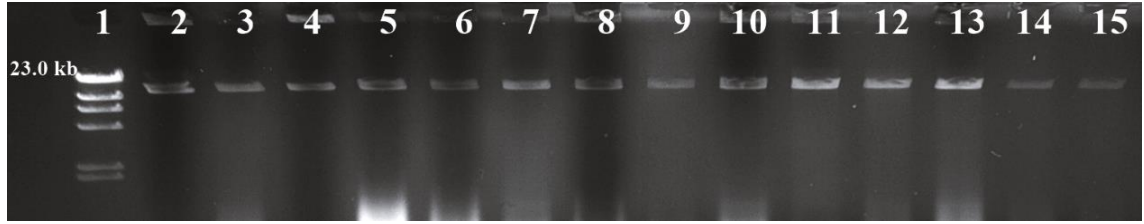
Çizelge 4.19. *Phomopsis viticola* izolatlarının dsRNA yatay taşınım eşleştirmeleri sonrası alıcı izolatlarda dsRNA analiz sonuçları

İzolatlar (Alıcı dsRNA (-) ¹ /Donör dsRNA(+) ²	dsRNA analizi					
	Tekerrür Petri 1	Tekerrür Petri 2	Tekerrür Petri 3	Tekerrür Petri 4	Tekerrür Petri 5	Tekerrür Petri 6
1056B/1091B	+	+	+	+	-	-
1056B/1098B	-	+	-	-	-	+
1056B/1061B	+	+	+	+	+	+
1215Na/841Ku	-	-	+	+	-	+
1215Na/1216Na	-	+	+	-	+	+
884Ç/861Ç	-	+	+	-	+	+
884Ç/780Se	+	-	-	-	-	+
884Ç/889G	+	-	+	-	-	-
884Ç/903M	-	-	-	-	-	-
884Ç/1027K	-	-	-	-	-	-

1: -; dsRNA negatif, 2: +; dsRNA pozitif

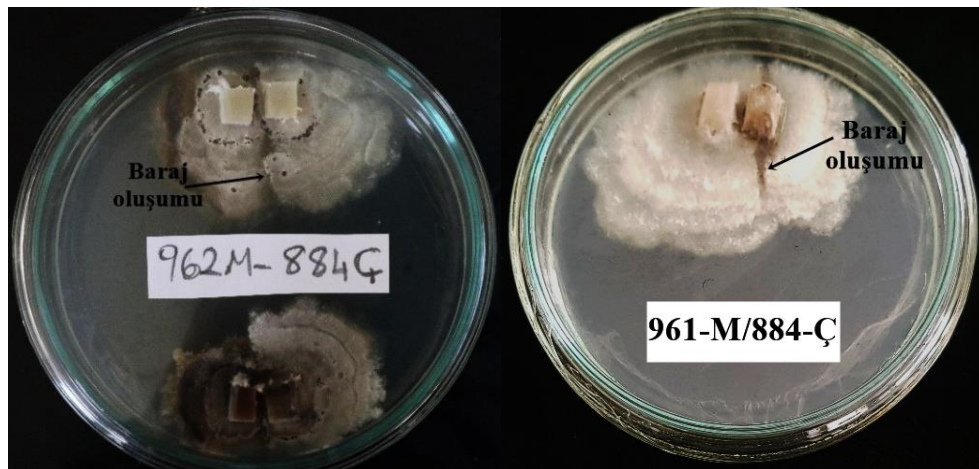
Yukarıda (4.8.1) vejetatif uyum grubu çalışmalarında da belirtildiği gibi; 691M ve 962M izolatları tek başlarına vc grup oluşturan izolatlar olması nedeniyle bu izolatlara vejetatif uyum sağlayacak dsRNA negatif alıcı izolat doğal olarak izolat koleksiyonunda yer almamıştır. Ancak buna rağmen çalışmada bu izolatların tek spor izolatlarından dsRNA negatif izolatlar elde edilme yoluna gidilmiştir. Her bir izolat için toplam 20 adet olmak üzere 2 izolat için toplamda 40 adet tek spor izolat elde edilmiştir. Ancak bunlar üzerinde yapılan dsRNA analizleri sonucunda hepsinin dsRNA pozitif oldukları belirlenmiştir (Resim 4.15). Sonuç olarak bu uygulamanın sonucunda dahi bu iki izolat için

yatay taşınım testlerinde kullanabileceğimiz kendileri ile vejetatif olarak uyumlu dsRNA negatif izolat elde edilememiştir.

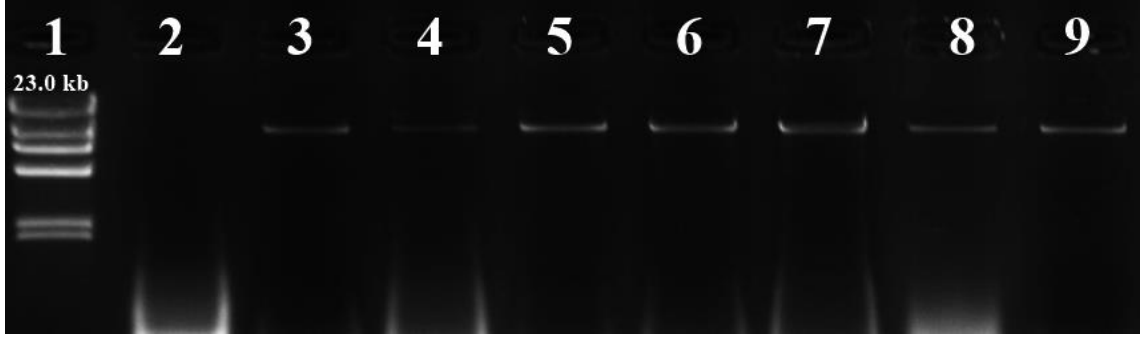


Resim 4.15. 962M *Phomopsis viticola* izolatından elde edilen teksporların dsRNA analizi sonuçları 1) Marker λ DNA/HindIII (23 kb), 2) pozitif Kontrol (12,7 kb *Cryphonectria parasitica*), 3) 692M dsRNA pozitif izolat (ebeveyn ~9,4 kb), 4-15) ~9,4 kb büyüklüğünde dsRNA pozitif tekspor izolatlar

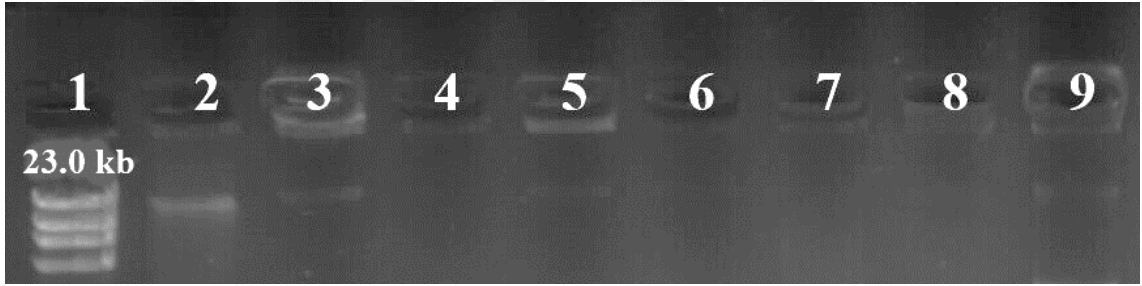
961M ve 962M izolatlarında vejetatif olarak uyumlu dsRNA negatif izolat bulunmadığı için *P. viticola* izolatların arasında en yaygın olarak bulunan ve gruptan dsRNA negatif bir izolat (884Ç) seçilmiş ve dsRNA pozitif 691M ve 962M izolatlarıyla yatay taşınım testlerinde alıcı izolat olarak kullanılmış ve bu iki izolatın yatay taşınım denemesi gerçekleştirilmiştir (Resim 4.16). Eşleştirme sonrası alıcı kolonilerden elde edilmiş yeni izolatlar dsRNA analizine alınmıştır. Yapılan dsRNA analiz sonucunda 692M izolatında 6 eşleştirmeden 5'inde yatay taşınım gerçekleşirken (Resim 4.17), 961M izolatında 6 eşleştirmeden sadece ikisinde net görülmeyen dsRNA bandları elde edilmiştir (Çizelge 4.20 ve Resim 4.18).



Resim 4.16. 962M ve 961M *Phomopsis viticola* izolatlarının 884Ç izolatı ile yatay taşınım testinden görünüm



Resim 4.17. 962M *Phomopsis viticola* izolatın yatay taşınım testinde dsRNA analizi sonuçları; 1) Marker λ DNA/HindIII (23 kb), 2) dsRNA negatif izolat, 3-7) dsRNA pozitif izolat (~ 9,4 kb), 8) 692M dsRNA pozitif izolat (ebeveyn ~ 9,4 kb), 9) pozitif kontrol (12,7 kb *Cryphonectria parasitica*)



Resim 4.18. 961M *Phomopsis viticola* izolatın yatay taşınım testinde dsRNA analizi sonuçları; 1) Marker λ DNA/HindIII (23 kb), 2) pozitif kontrol (12,7 kb *Cryphonectria parasitica*), 3) 961M dsRNA pozitif izolat (ebeveyn ~ 9,4 kb), 5 ve 9) net görülmeyen dsRNA bantları, 4, 6, 7 ve 8) dsRNA negatif izolatlar

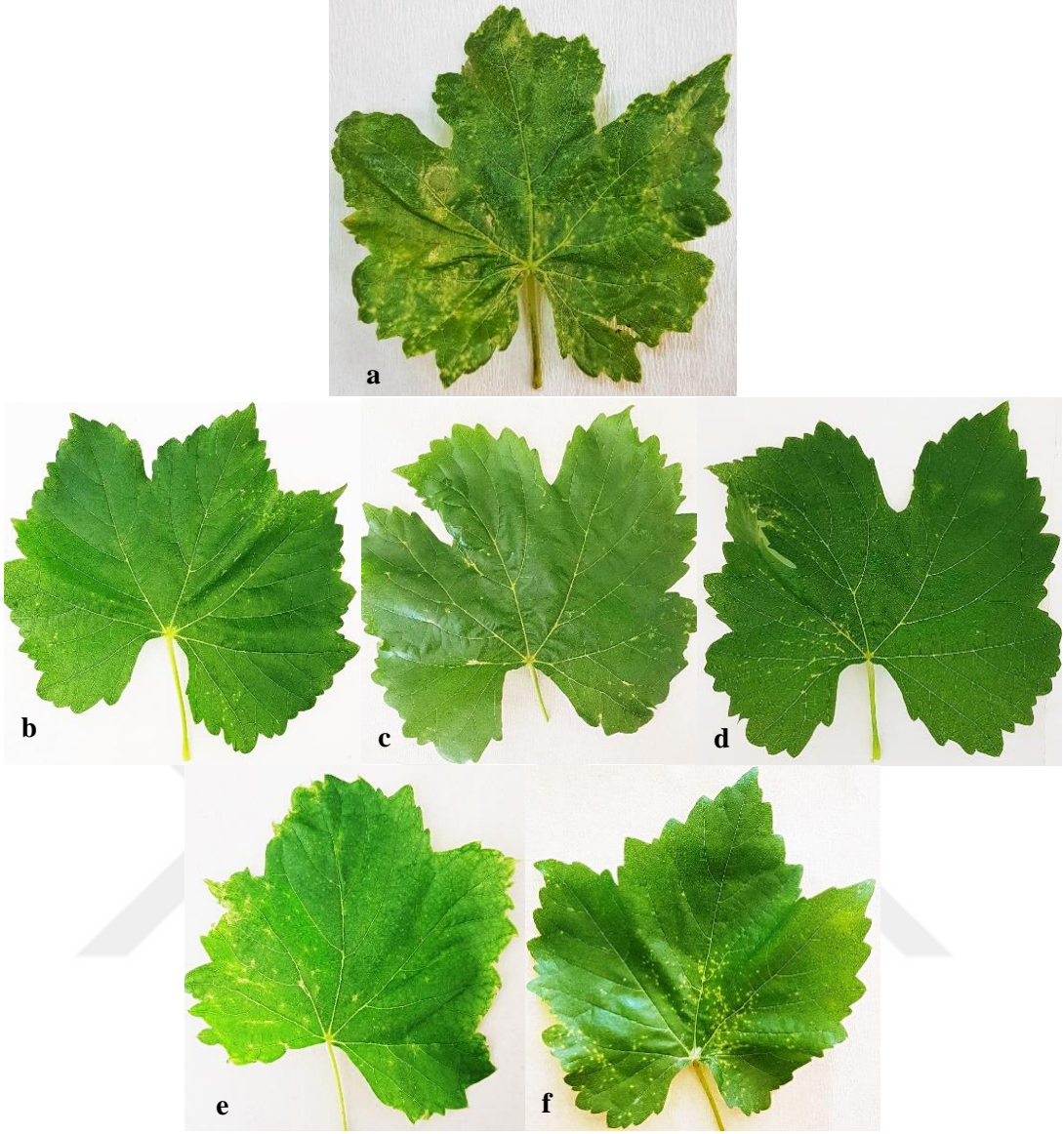
Çizelge 4.20. 962M ve 961M izolatlarının dsRNA yatay taşınım testi sonuçları

İzolatlar (Alıcı dsRNA(-) ¹ / Donör dsRNA(+) ²)	dsRNA analiz sonucu					
	Tekerrür Petri 1	Tekerrür Petri 2	Tekerrür Petri 3	Tekerrür Petri 4	Tekerrür Petri 5	Tekerrür Petri 6
884Ç/962M	-	+	+	+	+	+
884Ç/961M	-	-	-	+	+	-

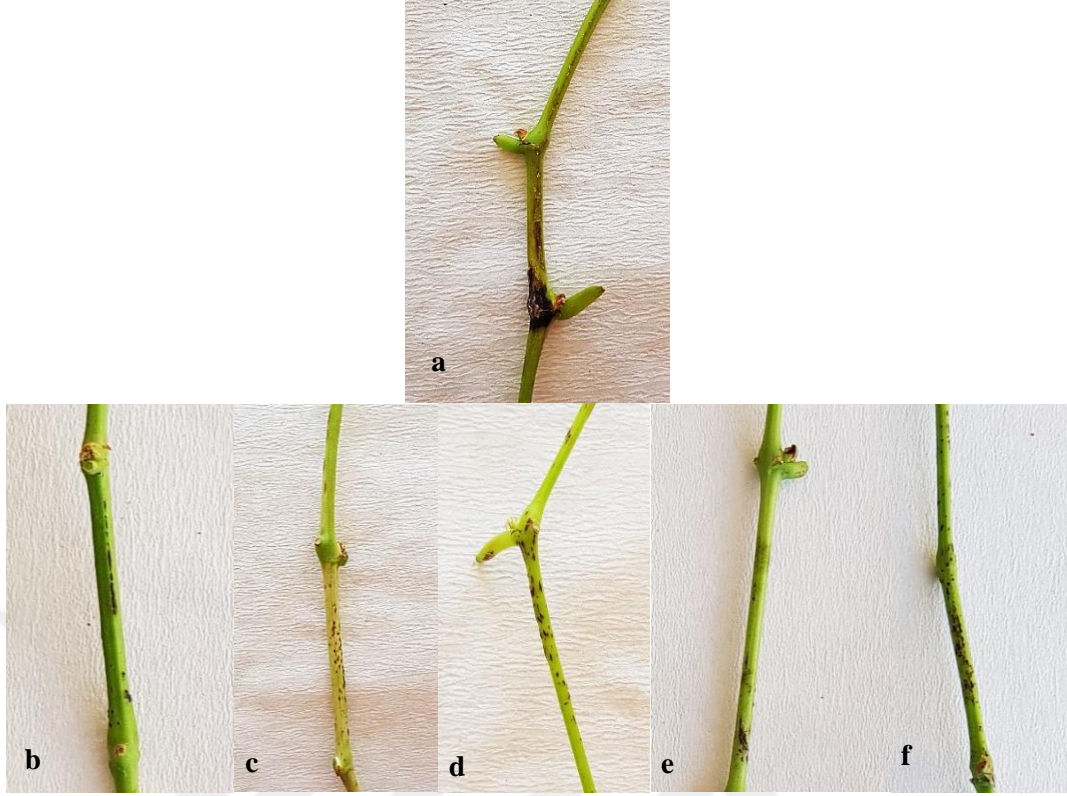
1: -; dsRNA negatif, 2: +; dsRNA pozitif

4.10. dsRNA Virüslerinin Hipovirulenslik Üzerine Etkisi (2. Aşama Virülenslik Testleri)

Çalışmanın 4.8 bölümünde orijinal dsRNA pozitif *P. viticola* izolatları ile virülenslik testi yapılmış ve izolatların değişen oranlarda dsRNA negatif izolata göre düşük virülensliklere sahip oldukları görülmüştür. Ancak sözü edilen testte virülenslikte gözlemlenen bu farklılıkların fungal izolataın genetik yapısından da kaynaklanma olasılığı vardır. Çünkü her dsRNA'nın içinde olduğu izolat farklı bir fungus izolataı olup, genetik yapıları ve patojenik özellikleri farklı olabilir. Bu da virülensliği etkilemiş olabilir. Bu durumu ortadan kaldırmak adına çalışmanın bu kısmında yapılan 2. virülenslik testlerinde her bir dsRNA pozitif izolattaki dsRNA yatay taşınım ile vejetatif yönden uyumlu olduğu dsRNA negatif bir izolata aktarılmıştır. Böylece tek bir fungal izolataın hem dsRNA pozitif ve hem de dsRNA negatif izolataına sahip olunmuştur. Bu aşamada asma fidanları üzerinde yapılan 2. virülenslik testinde bu iki negatif ve pozitif izolatlar birbiri ile karşılaştırılarak dsRNA'nın virülensliğe etkisi belirlenmiştir.



Resim 4.19. Asma fidanlarında *Phomopsis viticola* ile inokulasyonun 15. gününde yapraklarda gözlenen klorotik lekeler; a) virüent izolat 884Ç, b) dsRNA pozitif dönüştürülmüş 884Ç/962M, c) 884Ç/961M, d) 884Ç/889G, e) 884Ç/861Ç ve f) 884Ç/780Se izolat



Resim 4.20. Asma fidanlarında *Phomopsis viticola* ile inokulasyonun 30. gününde sürgünlerde gözlenen lezyonlar; a) virüent izolat 884Ç, b) dsRNA pozitif dönüştürülmüş 884Ç/962M, c) 884Ç/961M, d) 884Ç/889G, e) 884Ç/861Ç ve f) 884Ç/780Se izolat

dsRNA pozitif dönüştürülmüş 884Ç izolatları (884Ç/962M, 884Ç/961M, 884Ç/889G, 884Ç/861Ç ve 884Ç/780Se) hepsi dsRNA negatif 884Ç izolatına göre hem yaprakta hem de sürgünde daha az hastalık oluşturmuşlardır. dsRNA pozitif 884Ç izolatlarında yapraklarda hastalık şiddeti 4,1 ile 18,9 arasında değişirken dsRNA negatif 884Ç izolatında 35,8 olmuştur. Sürgünde hastalık şiddeti ise dsRNA pozitif 884Ç izolatlarında 0,3 ile 2,2 arasında değişirken dsRNA negatif 884Ç izolatında 14,3 olarak meydana gelmiştir. Bu değerlere göre dsRNA izolatları yaprakta %26,32-49,37 ve sürgünde %14,11-16,33 arasında değişen oranlarda virülenslik şiddetinin azaldığı görülmektedir (Çizelge 4.21).

884Ç/962M nolu izolatu yapraklarda %4,1 ve sürgünlerde %0,3 hastalık oluşumuyla %49,37 yaprakta %16,33 sürgünde hastalık şiddetinde azalma olmuş ve kendi grubunda yer alan diğer izolatlara göre virülenslik şiddeti en düşük izolat olmuştur. Ayrıca yaprakta

hastalığın gelişiminde en az azalma %26,32 oranında 884Ç/889G ve sürgünde ise, %14,11 oranında 844Ç/780Se izolatlarında saptanmıştır (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.21. 884Ç dsRNA negatif *Phomopsis viticola* izolatının dönüştürülmüş dsRNA pozitif formlarının asma sürgün ve yapraklarda oluşturduğu hastalık şiddeti

İzolat	Yaprakta Hastalık şiddeti ¹	Yaprakta V.A. (%) ²	Sürgünde Hastalık şiddeti (%) ³	Sürgünde V.A. (%) ⁴
Virülent Kontrol (884Ç)	35,8 a ⁵	-	14,3 a	-
884Ç/889G	18,9 cde	26,32	0,9 c	15,63
884Ç/861Ç	8,3 de	42,83	0,3 c	16,33
884Ç/961M	7,5 de	44,08	1,0 c	15,51
844Ç/780Se	5,9 de	46,57	2,2 c	14,11
884Ç/962M	4,1 e	49,37	0,3 c	16,33

1: Yaprakta hastalık şiddeti, yaprak üzerindeki leke sayısını ifade etmektedir, 2: Yaprakta Virülenslik azalma (%), 3: Sürgünde hastalık şiddeti lezyonların sürgün yüzeyinde kapladığı alanı ifade etmektedir, 4: Sürgünlerde Virülenslik azalma (%), 5: Ortalama değerler arasında istatistiki fark Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre yapılmıştır. Sütun boyunca aynı harfi alan değerler arasında istatistiki fark yoktur.

1056B dsRNA negatif izolat ile bunun 1098B, 1061B ve 1091B dsRNA pozitif izolat ile dönüştürülmüş formlarının virülenslikleri asma fidanlar üzerinde yapılan 2. aşama virülenslik testinde karşılaştırılmıştır; dsRNA negatif 1056B formu yapraklarda 26,6 ve sürgünlerde ise, %10,4 hastalık şiddeti oluşturmuştur. Bu izolatın dönüştürülmüş dsRNA pozitif formlarının tümünde daha az hastalık şiddeti saptanmıştır. (Çizelge 4.22).

1056B/1098B nolu izolatıyla inokulum yapılan asma yapraklarında hastalık şiddeti 10,9 ve sürgünlerde %1,6 olarak gözlenmiş ve dolayısıyla yaprakta %12,21 sürgünde %9,86 oranında hastalığın gelişiminde azalma meydana gelmiş ve kendi grubundaki diğer izolatlarla göre virülenslik şiddeti en yüksek izolat olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.22). Ayrıca bu grupta yer alan 1056B/1091B ve 1056B/1061B izolatları yaprak %19,39-17,63 ve sürgünde %11,04-11,27 oranlarında virülensliğin şiddetinde azalmalar saptanmıştır (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.22. 1056B dsRNA negatif *Phomopsis viticola* izolatının dönüştürülmüş dsRNA pozitif formlarının asma sürgün ve yapraklarda oluşturduğu hastalık şiddeti

İzolat	Yaprakta Hastalık Şiddeti (%) ¹	Yaprakta V.A. (%) ²	Sürgünde Hastalık Şiddeti ³	Sürgünde V.A. (%) ⁴
Virüent kontrol (1056B)	20,6 bcd ⁵	-	10,4 b	-
1056B/1098B	10,9 cde	12,21	1,6 c	9,82
1056B/1061B	6,6 de	17,63	0,3 c	11,27
1056B/1091B	5,2 de	19,39	0,5 c	11,04

1: Yaprakta hastalık şiddeti, yaprak üzerindeki leke sayısını ifade etmektedir, 2: Yaprakta Virülenslik azalma (%), 3: Sürgünde hastalık şiddeti lezyonların sürgün yüzeyinde kapladığı alanı ifade etmektedir, 4: Sürgünlerde Virülenslik azalma (%), 5: Ortalama değerler arasında istatistiki fark Ducan Çoklu Karşılaştırma Testine göre yapılmıştır. Sütun boyunca aynı harfi alan değerler arasında istatistiki fark yoktur.

dsRNA negatif 1215Na izolatu ile bunun 1216Na ve 841Ku dsRNA pozitif izolat ile dönüştürülmüş formlarının asma yaprak ve sürgünlerinde oluşturduğu hastalık şiddeti değerleri Çizelge 4.24’de verilmiştir. DsRNA negatif 1215Na izolatın yapraklarında ve sürgünlerinde hastalık şiddeti sırasıyla 24,2 ve %13 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.23). 1215Na’nın 1216Na ile dönüştürülmüş dsRNA pozitif formu yaprakta 33,5 hastalık şiddeti oluşturmuş olup dsRNA negatif 1215Na’ya göre %12,31 oranında daha az hastalık şiddetine sebep olmuştur. Sürgünde ise %9,3 hastalık şiddeti ile %4,12 oranında hastalıkta azalma meydana gelmiştir. 1215Na/841Ku izolatu diğer izolatın aksine yaprakta %25,03 ve sürgünde %13,44 oranında hastalığın şiddetinde azalma saptanmıştır (Çizelge 4.23).

Çizelge 4.23. 1215Na dsRNA negatif *Phomopsis viticola* izolatının dönüştürülmüş dsRNA pozitif formlarının asma sürgün ve yapraklarda oluşturduğu hastalık şiddeti

İzolat	Yaprakta Hastalık şiddeti ¹	Yaprakta V.A. (%) ²	Sürgünde Hastalık şiddeti ³	Sürgünde V.A. (%) ⁴
Virüent kontrol (1215Na)	24,2abc ⁵	-	13,0 a	-
1215Na/1216Na	33,5 ab	12,31	9,3 b	4,12
1215Na/841Ku	5,3 de	25,03	1,3 c	13,44

1: Yaprakta hastalık şiddeti, yaprak üzerindeki leke sayısını ifade etmektedir, 2: Yaprakta Virülenslik azalma (%), 3: Sürgünde hastalık şiddeti lezyonların sürgün yüzeyinde kapladığı alanı ifade etmektedir, 4: Sürgünlerde Virülenslik azalma (%), 5: Ortalama değerler arasında istatistiki fark Ducan Çoklu Karşılaştırma Testine göre yapılmıştır. Sütun boyunca aynı harfi alan değerler arasında istatistiki fark yoktur.

4.11. Moleküler Karakterizasyon ve DNA Dizi Okumaları

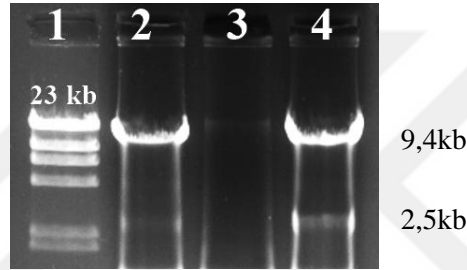
Moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılacak dsRNA pozitif izolatların seçiminde bu aşamaya gelinceye kadar yapılan tüm biyolojik testleri kapsayan bir puanlama tablosu Materyal ve Yöntem bölümünde (Çizelge 4.24) verilmiştir. Bu puanlama tablosundaki biyolojik özelliklerine göre ümitvar özelliklere sahip, hipovirulent olabilecek ve en yüksek puana sahip 6 adet dsRNA pozitif *P. viticola* izolatu moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. 889G, 861Ç, 780Se, 961M, 962M ve 1091B nolu izolatlar biyolojik testlerde en yüksek puanları alarak moleküler karakterizasyonda kullanılacak izolat setinde yer almışlardır (Çizelge 4.241). Ayrıca dikey geçiş ve yatay taşınım performansı iyi olan dsRNA içeren 12 *P. viticola* izolatının biyolojik ve kültürel özellikleri Ek 3'de verilmiştir.

Çizelge 4.24. Moleküler karakterizasyon için seçilen dsRNA pozitif *Phomopsis viticola* izolatlarının biyolojik özelliklerinin puan tablosu

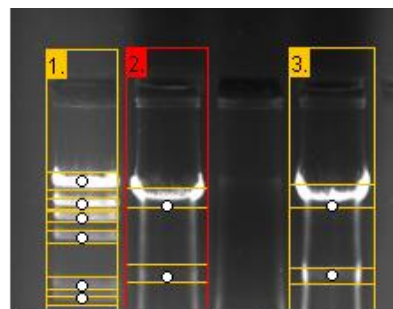
İzolat	S.V ¹	P1 ²	Y.V ³	P2 ⁴	Yatay Geçiş	P3 ⁵	Dikey Geçiş	P4 ⁶	S.V.A (%) ⁷	P5 ⁸	Y.V.A (%) ⁹	P6 ¹⁰	TP ¹¹
780Se	0,5dd	6	16,6cd	6	++	4	%100	6	14,11	3	46,57	3	28
1091B	0,6d	6	17,5cd	5	++++	5	%100	6	11,04	2	19,39	1	25
1061B	0,7d	6	17,2cd	6	++++ ++	6	%60	4	11,27	2	17,63	1	25
861Ç	0,8cd	6	27,5bc	4	++++	5	%70	5	16,33	3	42,83	3	28
1027K	1,2cd	6	24,7bcdf	5	0	0	%40	4	-	-	-	-	
889G	1,5cd	6	7,6d	6	++	4	%100	6	15,63	3	26,32	2	27
961M	1,5cd	6	10,6cd	6	++	4	%100	6	15,51	3	44,08	3	28
962M	1,9cd	6	17,2cd	6	++++ ++	6	%100	6	16,33	3	49,37	3	30
1098B	2,3cd	6	14,8cd	6	++	4	%100	6	9,82	2	12,21	1	25
841Ku	2,5cd	6	13,2cd	6	+++	4	%100	6	1,3	1	25,03	2	25
903M	4,7bc	4	25,6bcd	5	0	0	%60	4	-	-	-	-	13
1216Na	6,6b	4	36,7bc	4	++++	5	%80	5	4,12	1	12,31	1	20

Not: Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Şöke; Ç Çal, Bu Buldan; Se Selçuk, M Menemen, Ef Efem Cukuru; K Kemalpaşa; B Bayındır; Sr Saruhanlı; Sa Salihli; Al Alaşehir, 1: S.V; Sürgünde virülenslik, 2: P1; Virülenslik; 4: yüksek, 5: orta, 6: zayıf, 3: Y.V; Yaprakta virülenslik, 4: P2; Virülenslik. 4: yüksek, 5: orta, 6: zayıf, 5: P3; Yatay geçiş performansı. ++ (yavaş): 4puan, ++++(orta):5 puan, ++++++(hızlı):6 puan, 6: P4; Dikey geçiş performansı (%).%40-60: 4puan, %70-80: 5puan, %90-100: 6puan, 7: S.V.A= Sürgünde virülenslik azalma (%). 8: P5; >12: 3 puan, >5: 2, <5:1, 9: Y.V.A= Yaprakta virülenslik azalma (%). 10: P6; >40: 3 puan, >20: 2, <20: 1, 11: TP; Toplam puan, P1+P2+P3+P4+P5+P6

Seçilen bu altı adet dsRNA içeren *P. viticola* izolatının moleküler karakterizasyon çalışmaları için dsRNAlar Morris ve Dodds, (1979) ve Valverde vd. (1990) tarafından geliştirilen yöntemler modifiye edilerek izole edilmiş ve jel elektroforezde elde edilen dsRNA profilleri görüntülenmiştir (Resim 4.21). Elektroforetik analiz sonucu dsRNA profillerinde elde edilen iki banttın birisinin yaklaşık 9,4 kb, diğerinin ise yaklaşık 2,5 kb boyutlarında olduğu GelAnalyzer programı ile belirlenmiştir (Resim 4.22). Daha sonra izole edilen bu dsRNAların konsantrasyonu nanodropta ölçülmüştür (Çizelge 4.25). Ardından DNase, RNase enzimleri protokollerine göre seyreltilip, saflaştırılmış ve dsRNA'ların kalite ve miktarları NanoDrop ile tekrar ölçülmüştür (Çizelge 4.25).



Resim 4.21. *Phomopsis viticola* izolatlarından Morris ve Dodds (1979) ve Valverde vd. (1990) yöntemleri ile elde edilen dsRNA profillerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü; 1) Marker λ DNA/HindIII (23 kb), dsRNA içeren; 2) 961M, 3) 780Se ve 4) 962M izolatları



Lane #	Band #	Rf	Raw volume	Cal. volume	MW
2.	1.	0,323	4704	-	9487
2.	2.	0,472	3173	-	2519
Lane #	Band #	Rf	Raw volume	Cal. volume	MW
3.	1.	0,323	5144	-	9487
3.	2.	0,468	3272	-	2548

Resim 4.22. GelAnalyzer programında dsRNA bandlarının ölçüm sonucu 1) marker λ DNA/HindIII (23 kb), 2) 961M, 3) 962M

Çizelge 4.25. *Phomopsis viticola* izolatlarından elde edilen dsRNA örneklerinin DNase ve RNase enzimleri uygulamadan önce ve sonra Nanodrop cihazında ölçüm sonuçları

İzolat Kodları ¹	Enzim Uygulama Öncesi (ng/ul)	Enzim Uygulama Sonrası (ng/ul)
1-962M	740	450
2-961M	510	200
3-889G	480	200
4-1091B	610	360
5-780Se	200	100
6-861Ç	580	200

1: Menemen (M), G (Güney), B (Bayındır), Se (Selçuk) ve Ç (Çal)

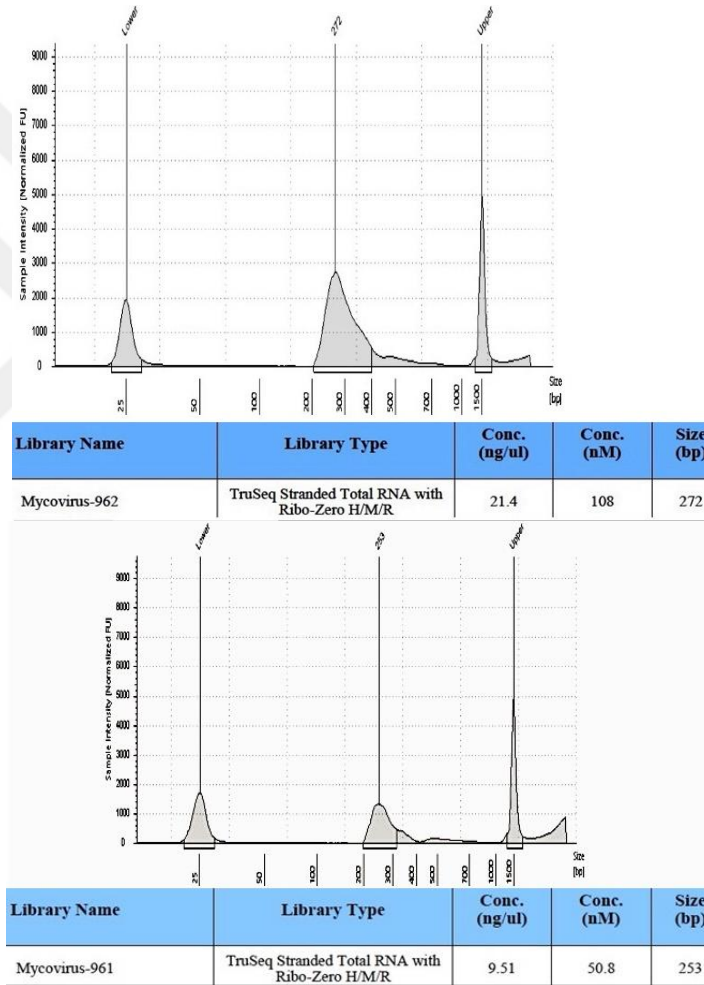
Makrogen firmasına gönderilen örneklerin ilk önce kalite kontrolü ve nükleik asit miktarları ölçülmüştür. Enzim uygulanmış örneklerin dsRNA miktarları 500 (ug)'ın altında olduğu bildirilmiştir (Şekil 4.4). dsRNA örneklerinden sağlıklı cDNA kütüphane hazırlanması için dsRNA miktarının en az 500 (ug) olması gerektiği Makrogen tarafından bildirilmiştir. Bu bilgi doğrultusunda cDNA kütüphane hazırlığı için enzim uygulanmayan örneklerin kalite kontrolü ve nükleik asit miktar ölçümleri yapılmıştır (Şekil 4.5). Sonuçta iki dsRNA örneği 962M (3.572 ug) ve 961M (1.991ug) miktar ve kalite kontrolünde uygun bulunmuştur. Böylece 962M ve 962M dsRNA örneklerinin TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero H/M/R kiti kullanarak cDNA kütüphanesi hazırlanmıştır (Şekil 4.6).

#	Sample Name	Conc. (ng/ul)	Final Volume (ul)	Total Amount (ug)	Result*	
1	Mycovirus-962	3.122	24	0.075	Fail	Quantity, Need to confirm
2	Mycovirus-961	3.107	24	0.075	Fail	Quantity, Need to confirm
3	Mycovirus-889	0.653	24	0.016	Fail	Quantity, Need to confirm
4	Mycovirus-1091	0.811	24	0.019	Fail	Quantity, Need to confirm
5	Mycovirus-780	1.652	24	0.04	Fail	Quantity, Need to confirm
6	Mycovirus-861	0.519	24	0.012	Fail	Quantity, Need to confirm

Şekil 4.4. Enzim uygulanmış ve seyreltilmiş dsRNA örneklerinin kalite kontrol ve nükleik asit miktar ölçüm sonuçları; kırmızıyla işaretlenmiş miktarlar 500 (ug)'ın altındaki miktarlardır

#	Sample Name	Conc. (ng/ul)	Final Volume (ul)	Total Amount (ug)	Result*	
1	Mycovirus-962	127.589	28	3.572	Hold	Need to confirm
2	Mycovirus-961	90.478	22	1.991	Hold	Need to confirm
3	Mycovirus-1091	32.737	15	0.491	Fail	Quantity, Need to confirm

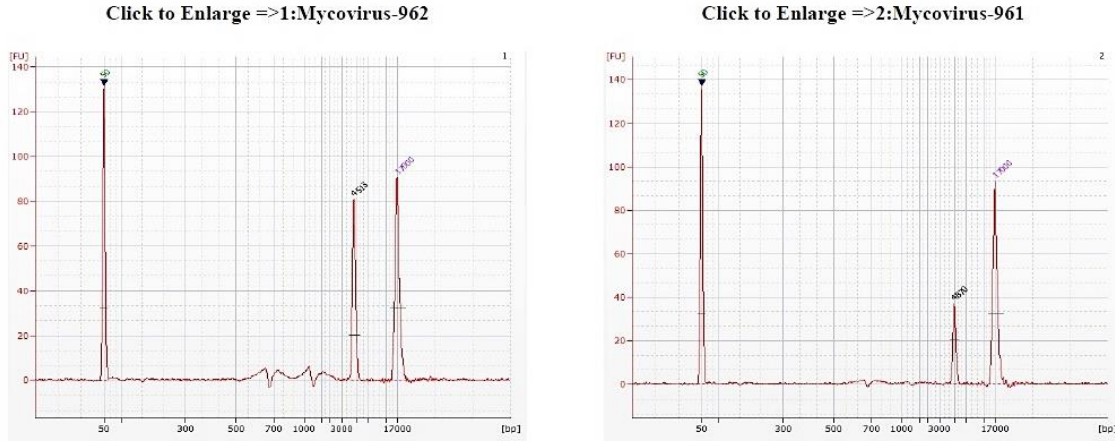
Şekil 4.5. Enzim uygulanmamış ve seyreltilme yapılmamış dsRNA örneklerinin kalite kontrol ve nükleik asit miktar ölçümü sonuçları; kırmızıyla işaretlenmiş miktarlar 500 (ug)'ın üstünde ölçülen dsRNA miktarıdır



Şekil 4.6. TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero H/M/R kiti ile 962M ve 961M örneklerinden hazırlanan cDNA kütüphane sonucu

dsRNA örneklerinin kalite kontrol ve nükleik asit miktar ölçüm sonuçlarında 2 standart Bioanalyzer piklerinin yanı sıra örneklerde fazla sayıda piklerin (multi peak) oluştuğu Makrogen den gelen rapor ile bildirilmiştir (şekil 4.7). dsRNA virüslerinde kalite

ve nükleik asit miktar ölçümlerinde multi peak oluştuğu Wilcox vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada da rastlanmıştır. Makrogen ile yapılan görüşmeler de daha öncede mikoviral dsRNA üzerinde yaptıkları çalışmalarda da böyle bir duruma rastlandığını ifade etmişlerdir.



Şekil 4.7. 962M ve 961M dsRNA örneklerinden kalite kontrol sonucunda gözlemlenen multi peaklerin görünümü

Yeni Nesil Dizileme çalışmasında 962M ve 961M örneklerinden Illumina çift-uç (Pair-End) kütüphane hazırlanmış ve dizilenmiştir. Dizileme sonucu ve istatistiki değerler Çizelge 4.26'da verilmiştir. 961M ve 962M örnekleri çift-uç kütüphanesinden 25.221.504 ve 34.337.890 okuma elde edilmiş ve toplam okuma 2,5G ve 3,4G olmuştur. Kütüphanenin Q20 değerleri her iki örnek için %98,84 (961M) ve %98,73 (962M) ve Q30 değerleri de %96,31 (961M) ve %96,21 (962) olarak belirlenmiştir. Bu elde edilen değerler, dizileme kalitesi için başarı seviyesinde olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.26. 961M ve 962M dsRNA örneklerinden eş-çift kütüphane kurularak elde edilen nükleotid dizi değerleri

Örnek	Toplam Okuma (bp çift)	Toplam Okuma ¹	GC (%)	AT (%)	Q20 (%) ²	Q30 (%) ³
961M	2.547.371.904	25.221.504	49,38	50,62	98,84	96,31
962M	3.468.126.890	34.337.890	48,87	51,13	98,73	96,21

1: Toplam okuma sayısı: Illumina çift-uç sekanslam da bu değer okuma 1 ve okuma 2'nin toplamını ifade eder.

2: Phred kalite puanı: 20' nin üzerinde olan bazların oranı. 3: Phred kalite puanı: 30'nin üzerinde olan bazların oranı.

4.12. İllimuna Sonuçlarına göre dsRNA'nın Biyoinformatik Analizleri

İllimuna sisteminde 962M ve 961M örneklerin kütüphanelerinden üretilen okumaların kalitesi GC yüzdesi, Q20 ve Q30 yüzde değerleri çizelge 4.27'de verilmiştir. Çizelge 4.27'de görüldüğü gibi filtreleme işleminden sonra tüm okumaların Q20 değeri %100 yakın çıkmıştır.

Çizelge 4.27. Illimuna sisteminde 962M ve 961M dsRNA örneklerinden yapılan okumaların kalite kontrol değerleri

Örnek	Toplam Okuma Baz Sayısı	Toplam Okuma ¹	GC (%) ²	Q20 (%) ³	Q30 (%) ⁴
961M	2.133.767.741	24.604.780	49.17	99.39	97.31
962M	3.104.036.629	33.256.712	48.48	99.33	97.15

1: Toplam okuma sayısı: Illumina çift-uç sekanslam da bu değer okuma 1 ve okuma 2'nin toplamını ifade eder, 2: GC içeriği. Yüzde, $(G + C) / (A + T + G + C) * \% 100$ olarak hesaplanır, 3: Phred kalite puanı: 20'nin üzerinde olan bazların oranı, 4: Phred kalite puanı: 30'nin üzerinde olan bazların oranı.

Ayrıca FastQC ile oluşturulan verilerin kalitesini kontrol etmek için temel kalite grafiği döngü sayısı ve phred kalite puanına göre çizilmiştir (Şekil 4.8). Phred kalite puanı 20 olduğunda %99 doğruluk anlamına gelir ve kalite puanı 20'nin üzerinde olan okumalar genellikle kaliteli okumalar olarak kabul edilir. Grafikte mavi çizgi kalitenin skorunu göstermekte ve bu çalışmada Şekil 4.8'de görüldüğü gibi mavi çizgi 30'ün üzerinde olmuş bu da kaliteli ve temiz bir okuma elde edildiğini göstermiştir.



Şekil 4.8. Filtrelemeden sonra her döngüde a) 961M ve B) 962M'nin temel kalite şeması: sarı çizgi: her döngüde çeyrekler arası phred skoru (%25-75), kırmızı çizgi: her döngüde phred puanının orta değeri, mavi çizgi: her döngüdeki phred puanının ortalaması, yeşil arka plan: iyi kalite, turuncu arka plan: kabul edilebilir kalite ve kırmızı arka plan: kötü kalite.

4.12.1. İlimuna Okumalarından Kontig Oluşumu ve Self-mapping analizleri

Yukarıda ifade edildiği gibi dsRNA örneklerin içerisinde enzim uygulanmayan örneklerden DNA dizi sekans analizleri yapılmış ve dolayısıyla sekans sonucunda viral genomu dışında fungusu ait genomlar da dizilenmiş ve toplam 36 (961M), 87 (962M) kontig elde edilmiştir. Bu kontigler ile ilgili veriler Ek 4 ve 5'de verilmiştir. *De novo* assembly analiz sırasında oluşan kontigler arasında virüse ait kontigleri diğer kontiglerden ayırması için bilgisayar ortamında SPAdes programını kullanarak elde edilen tüm okumalardan sadece virüs genomuna ait olan diziler seçilmiştir. Her iki dsRNA örneği için üretilen tüm yüksek kalitedeki DNA okumalarının birleştirilmesi sonucunda 961M 12,141 ve 962M ise 14,452 nt uzunluğunda kontingler oluşmuştur. 961M de oluşan 9,7 ve 2,5 kb büyüklüklerinde kontiglere dsRNA-L ve dsRNA-S olarak isimlendirilmiştir. 962M

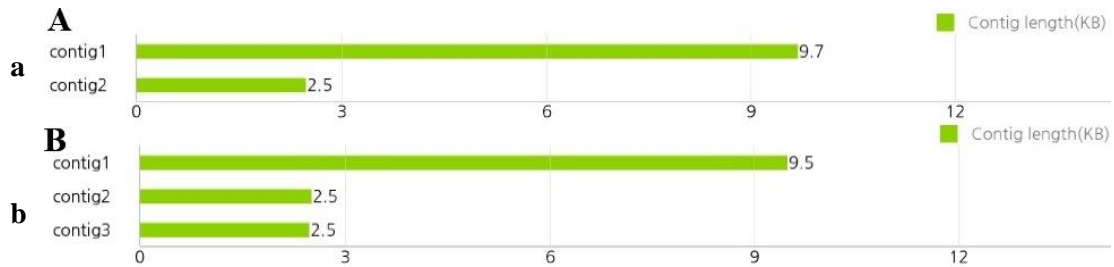
örneğinde ise, oluşan 9,5 ve 2 adet 2,5 kb lık kontinglere dsRNA-L, dsRNA-S1 ve S2 olarak isimlendirilmiştir (Çizelge 4.28, Şekil 4.9 ve 4.10). Kontiglerin ortalama uzunluğu 6,070 (961M) ve 4,817 (962M) nt olmuştur.

P. viticola'dan izole edilen 962M ve 961M dsRNA örneklerinin elektroforezi sonucunda her iki örnekte yaklaşık 9,4 ve 2,5 kb büyüklüğünde belirlenen dsRNA'ların, biyoinformatik analiz sonucu elde edilen kontiglerin uzunluğuna yakın bir uzunlukta (yaklaşık 9,7-9,5 ile 2,5 kb) olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9). Ayrıca 962M de 2 adet tesbit edilen dsRNA-S1 ve dsRNA-S2 2,5 kb uzunlukta olup, daha önce jel elektroforezde bu iki kontig üstüste gelmiş ve jelde sadece tek bant olarak görülmüş olabilir. Bu sonuçlara göre, dsRNA 962M ve 961M her iki örneğinin de iki segmentli olduğu belirlenmiştir.

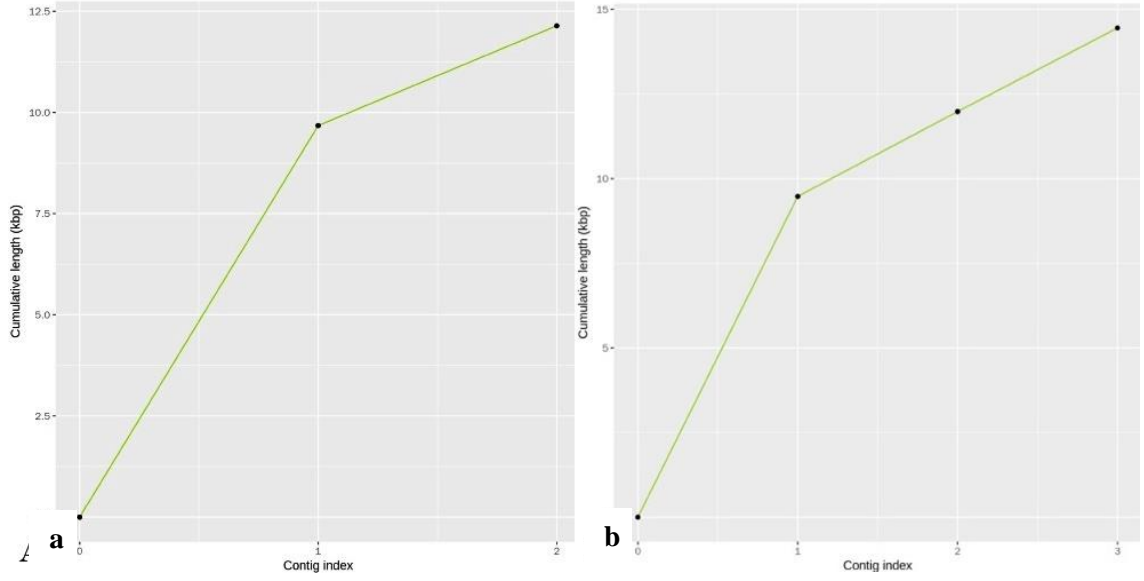
Çizelge 4.28. 961M ve 962M dsRNA örneklerinden elde edilen kontiglerin sayı ve uzunlukları

Örnek	Kontig Sayısı	Kontig Toplamı	N50 ¹	En uzun Kontig (kb)	En kısa Kontig (kb)	Ortalama Uzunluk
961M	2	12,141	9,675	9,675	2,466	6,070
962M	3	14,452	9,477	9,477	2,470	4,817

1: Tüm bazların yarısının bu boyutta veya daha uzun bir bitişikte bulunduğu anlamına gelir.



Şekil 4.9. Kontiglerin uzunluğu a) 961M, b) 962M



Şekil 4.10. Kontiglerin uzunluk dağılımı a) 961M, b) 962M

Çizelge 4.29 ve 4.30’da örneklerden elde edilen kontiglerin istatistiki değerleri verilmiştir. Toplam uzunluğun %10’una denk gelen N10 ortalama uzunluğu 961M’de 9,675 ve 962M de 9,477 baz oluşmuştur. N50’de her iki örnek için kontiglerin ortalama uzunluğu N10 daki değer ile aynı olmuştur. Kontigler arasında ortalama baz uzunluğunda farklılıklar meydana gelmemiştir. Her iki örnek için elde edilen kontiglerin toplam nükleotid dağılımları, GC oranları ve CG’nini oran grafiği Çizelge 4.31 ve Şekil 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.29. 961M dsRNA örneğinden elde edilen kontiglerin N10-N100 arasında uzunluk dağılımları

	Konting sayısı	Uzunluğu	Ortalama Uzunluk	Toplam Uzunluk
N10	1	9,675	9,675	9,675
N20	1	9,675	9,675	9,675
N30	1	9,675	9,675	9,675
N40	1	9,675	9,675	9,675
N50	1	9,675	9,675	9,675
N60	1	9,675	9,675	9,675
N70	1	9,675	9,675	9,675
N80	2	2,466	6,070	12,141
N90	2	2,466	6,070	12,141
N100	2	2,466	6,070	12,141

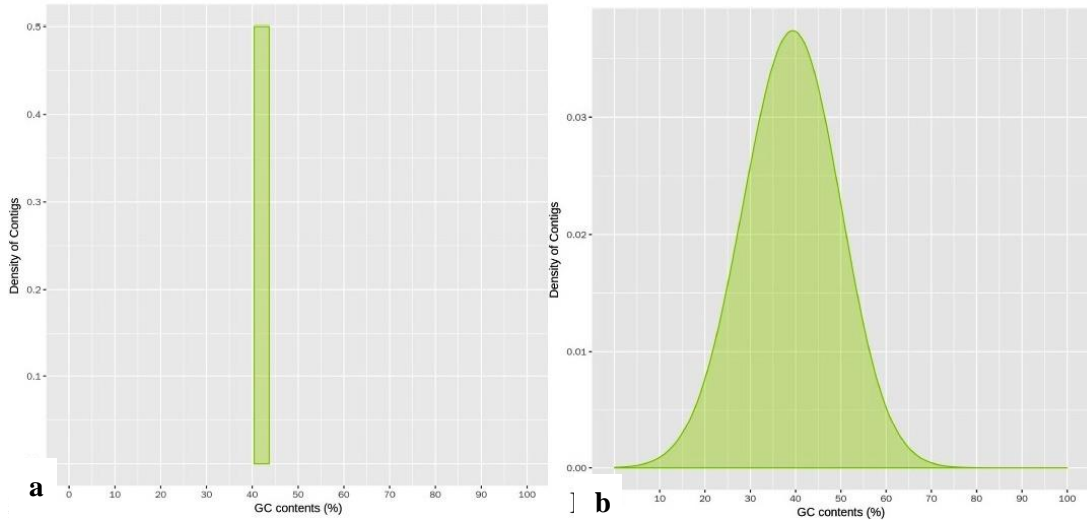
Çizelge 4.30. 962M dsRNA örneğinden elde edilen kontiglerin N10-N100 arasında uzunluk dağılımları

	Konting Sayısı	Uzunluğu	Ortalama Uzunluk	Toplam Uzunluk
N10	1	9,477	9,477	9,477
N20	1	9,477	9,477	9,477
N30	1	9,477	9,477	9,477
N40	1	9,477	9,477	9,477
N50	1	9,477	9,477	9,477
N60	1	9,477	9,477	9,477
N70	2	2,505	5,991	11,982
N80	2	2,505	5,991	11,982
N90	3	2,470	4,817	14,452
N100	3	2,470	4,817	14,452

Çizelge 4.31. 961M ve 962M dsRNA örneklerinin kontiglerinin nükleotid içerikleri ve GC oranları

Örnek	A sayısı	T sayısı	G sayısı	C sayısı	N sayısı ¹	GC oranı
961M	3,280	3,542	2,598	2,626	95	43.3%
962M	4,379	4,079	2,963	3,031	-	41.4%

1: Toplam belirsiz baz sayısı



Şekil 4.11. a) 961M ve b) 962M'nin kontiglerinin GC oranının histogramı

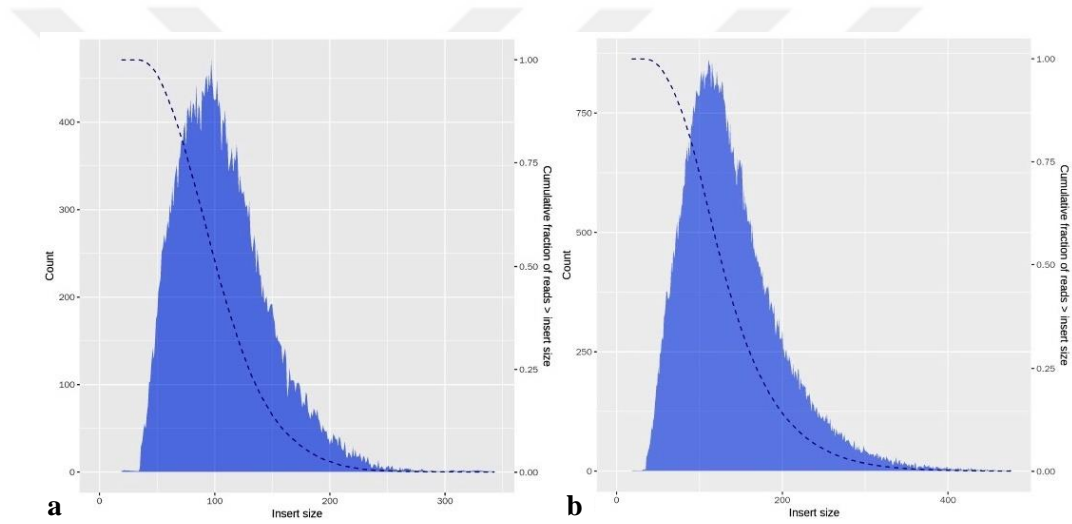
Her iki örnekten elde edilen konting okumaları self-mapping istatistikleri ve insert uzunluk dağılımları Çizelge 4.32 ve Şekil 4.12'de verilmiştir. Analiz sonucunda 961M'den 206,704 ve 962M'den 606,833 adet okuma elde edilmiştir (Çizelge 4.32). Bu miktar okumada toplam yapılan okumaların %0,85'ini 961M ve %1,82'si 962M örneklerinin genomlarını içermekte geriye kalan okumalar ise virüs genomunun dışında oluşan fungal

kontinglerine ait genomların okumaları yapılmış ve toplam okuma miktarları 961M için 24.178.746 ve 962M için 33.256.712 nükleotid olmuştur (Çizelge 4.32). 961M ve 962M nin sırasıyla insert boyutları 107.39 ve 139.13 olmuştur.

Çizelge 4.32. 961M ve 962M dsRNA örneklerinin self-mapping analizi istatistik sonuçları

Örnek	Toplam Okuma	Eşlenmiş Okumalar ¹	Coverage (%) ²	Derinlik ³	Insert Boyutu (Std.) ⁴
961M	24.178.746	206,704 (0.85%)	100.00	597.29	107.39 (39.80)
962M	33.256.712	606,833 (1.82%)	100.00	1322.91	139.13 (59.67)

1: Eşlenmiş okumaların toplam sayısı, 2: Yerleştirilmiş eşlenenlerin yüzdesi ($\geq 1x$), 3: Ortalama haritalama derinliği, 4: Adaptörler arasındaki uzunluk ve tahmin edilen uzunluğun standart ayrılması.



Şekil 4.12. a) 961M ve b) 962M örneklerinin insert uzunluk dağılımları

4.12.2. Genom anotasyonu

961M ve 962M örneklerinin genomlarının içerdiği protein kodlayan gen bölgeleri EggNog programını kullanılarak belirlenmiş ve veriler Çizelge 4.33'de verilmiştir.

Çizelge 4.33. 961M ve 962M dsRNA örneklerinin genom anotasyon sonuçları

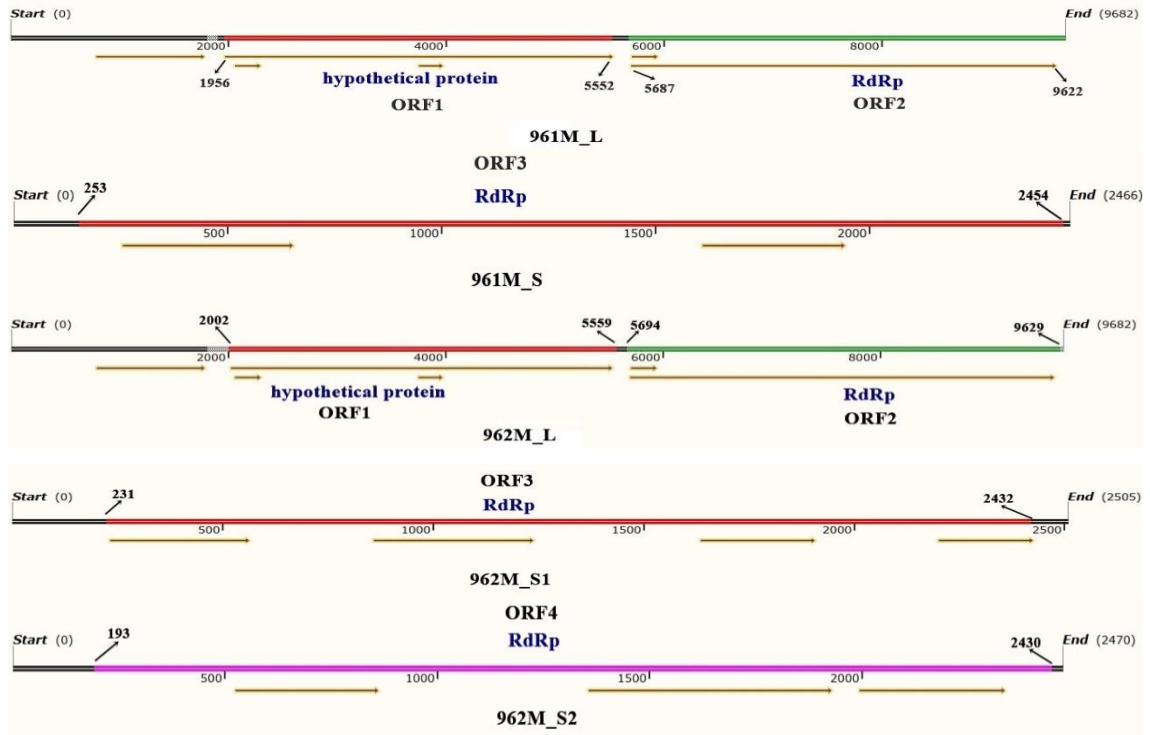
Örnek	Kontig ¹	Baz ²	Gen ³	CDS ⁴	tRNA ⁵	rRNA ⁶	tmRNA ⁷
961M	2	12,141	3	3	0	0	0
962M	3	14,452	6	6	0	0	0

1: Birleştirilmiş sekans sonucunda dizilerin birleşme sayısı, 2: Birleştirme sekansında baz sayısı, 3: Birleştirilmiş dizideki gen sayısı, 4: Birleştirilmiş sıradaki CDS sayısı, 5: Birleştirilmiş sıradaki tRNA sayısı, 6: Birleştirilmiş sıradaki rRNA sayısı, 7: Birleştirilmiş dizilerdeki tmRNA sayısı.

Çizelge 4.33’de görüldüğü gibi 961M ve 962M örneklerin nükleotid dizilerinin kodonlarının oluşturan bölge ya da kodlayan dizi (CDS: Coding Sequences) sayıları sırasıyla 3 ve 6 olduğu saptanmıştır. 961M’nin dsRNA-L ve dsRNA-S kontiglerinde hypothetical protein ve RdRp proteinlerini kodlayan pozitif yönlü sarmalı 3 açık okuma çerçevesi (ORF1, ORF2 ve ORF3) saptanmış, (Çizelge 4.34 ve Resim 4.23) 962M’de ise, dsRNA-L ve dsRNA-S1, S2 kontiglerinde hypothetical protein ve RdRp proteinlerin kodlayan pozitif yönlü sarmalı 4 ORF (ORF1, 2, 3 ve 4) tesbit edilmiştir (Çizelge 4.34 ve Resim 4.23). Çizelge 4.34’de görüldüğü gibi, her iki örneğin dsRNA-L kontiglerinde bulunan ORF’lar her iki proteini (hypothetical ve RdRp) kodlanmaktadır. Diğer kontiglerin ORF’larının ise, sadece RdRp proteinlerini kodlandığı gözlenmektedir. Her iki örneğin (962M ve 961M) protein dizileri NCBI de BLASTp yapıldığında, RdRp %41 ve hypothetical protein %44 oranında *Fusarium poae dsRNA virus 2* ile en yüksek özdeşlik verdiği tesbit edilmiştir.

Çizelge 4.34. 961M ve 962M dsRNA örnekleri kontiglerinin genom anotasyonu

Kontigler	ORF	Protein	Sarma Yönü	Başlangıç	Bitiş
961M: dsRNA-L (9,7 kb)	ORF 1	hypothetical	+	1956	5552
961M: dsRNA-L (9,7 kb)	ORF2	RdRp	+	5687	9622
961M: dsRNA-S (2,5 kb)	ORF3	RdRp	+	253	2454
962M: dsRNA-L (9,5 kb)	ORF 1	hypothetical	+	2002	5559
962M: dsRNA-L (9,5 kb)	ORF 2	RdRp	+	5694	9629
962M: dsRNA-S1 (2,5 kb)	ORF3	RdRp	+	231	2432
962M: dsRNA-S2 (2,5 kb)	ORF 4	RdRp	+	193	2430



Resim 4.23. 961M-L, 961M-S, 962M-L 962M-S1 ve 962M-S2 kontinglerin genom organizasyonu şemaları

4.12.3. BLAST Analizleri ve Filogenetik Ağaç

Tüm genom birleştirildikten sonra, kontinglerin fonksiyonu diğer viral dsRNA'larla benzerlik oranlarının belirlenmesi için BLAST algoritması kullanılarak analizler yapılmıştır. Bu amaç için NCBI'de BLASTn analizi ile her iki örnekten elde edilen kontingler taranmış ve toplam 5 adet fonksiyonu tahmin edilmiştir (Çizelge 4.35). Ayrıca *P. viticola*'dan izole edilen ve mikovirüs olduğu tahmin edilen 961M ve 962M dsRNA örneklerinin tüm genomunun nükleik asit dizileri (kontig) NCBI veri tabanında BLASTn analizinin sonucunda 961M: dsRNA-L ile 962M: dsRNA-L kontiglerinin 9,675 ve 9,477 bp'lık bölümleri mikovirüslerle benzerlik gösterirken dizinin diğer küçük kontigleri 961M: dsRNA-S, 962M: dsRNA-S1 ve S2 sırasıyla 2,466, 2,505 ve 2,505 bp'lık uzunlukları mitovirüslerle benzerlik göstermiştir (Çizelge 4.35). Bu nedenle 961M dsRNA-L ve 962M dsRNA-L kontiglerinin mikovirüsler içinde yer alırken, 961M: dsRNA-S, 962M: dsRNA-S1 ve S2 kontiglerinin mitovirüslere dahil farklı virüslere ait olduğu düşünülebilir.

Çizelge 4.35. 961M ve 962M dsRNA örnekleri kontiglerinin BLASTn sonucunda tahmin edilen fonksiyon değerleri

Kontig	Kontig Uzunluğu (bp)	Benzer fonksiyonlar	Accession Number	Fonksiyon Uzunluğu (bp)	Query Cover (%) ¹	Percent Identity (%) ²	E-value ³
961M: dsRNA-L (kontig1)	9,675	<i>Macrophomina phaseolina double-stranded RNA virus 2</i>	KP900891.1	9,188	2	86.32	7e-15
961M: dsRNA-S (kontig2)	2,466	<i>Colletotrichum falcatum mitovirus 1</i>	MK279482.1	2,283	12	75.08	1e-22
962M: dsRNA-L (kontig1)	9,477	<i>Macrophomina phaseolina double-stranded RNA virus 2</i>	KP900891.1	9,188	2	86.32	4e-15
962M: dsRNA-S1 (kontig2)	2,505	<i>Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 13</i>	KF913888.1	1,329	1	93.48	1e-06
962M: dsRNA-S2 (kontig3)	2,505	<i>Mitovirus sp.</i>	MN034672.1	2,723	5	79.02	3e-13

1: Sorgulama Kapsamı; NCBI isabetiyle eşleşen bitiş uzunluğunun yüzdesi, 2: Yüzde özdeşlik; Referans genom ile aynı olan bazların yüzdesi (yüksek uyumlu %99 benzeri çıkan dizilerin aynı gen dizileri olduğunu göstergesidir), 3: Şans eseri görülmesi beklenen isabet sayısı (0'a ne kadar yakınsa o kadar iyidir).

BLAST analizinde sorgulama kapsamı (Query Cover), taranan genomun NCBI veri tabanında diğer genomlarla biraraya gelmesiyle eşleşen bitişik uzunluğun yüzdesidir. Küçük bir sorgu kapsamı yüzdesi, kontig'in yalnızca küçük bir kısmının hizalandığı anlamına gelir yani %100 özdeşliğe (Perce identity) ve %5 sorgu kapsamına sahip bir hizalama varsa, iki genom aynı taksondan olmadığını göstermektedir. Kısacası iki genomun aynı taksonda olması için her iki değerinin de (Perce identity ve Query Cover) yüksek olması gerekmektedir (Newell vd., 2013), Ancak bu çalışmada Çizelge 4.35'de görüldüğü gibi her iki örneğin nükleik asit dizileri için yapılan BLASTn sonucunda 961M: dsRNA-L ve 962M: dsRNA-L kontinglerin nükleik asit dizileri NCBI veri tabanında kayıtlı olan mikoviral dsRNAların nükleik asit dizileri ile özdeşlik oranı her iki konting için %86,32 oranı saptanmış, fakat sorgu kapsam oranları çok düşük çıkmıştır. Aynı durum 961M: dsRNA-S ve 962M: dsRNA-S1, S2 kontiglerinde de meydana gelmiş ve sırasıyla %75.08, %93.48 ve %79.02 oranlarında mitovirüslerin nükleik asit dizileri ile özdeşlik oranları tesbit edilmiş, ancak sorgu kapsam değerleri çok düşük çıkmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada BLASTn sonuçlarında saptanan düşük dizi benzerlik oranları bu iki mikoviral dsRNA örneklerinin NCBI da kayıtlı olan mikoviral dsRNA dizilerinden farklı olduğu ve yeni bir mikoviral dsRNA türü olabileceği düşünülebilir. Bu da gelecekte yapılacak çalışmalarla netlik kazanabilecektir.

Filogenetik ağacı her iki örnekte tahmin edilen hypothetical ve RdRP proteinlerini amino asit dizilerini NCBI da BLASTp yaparak benzerliği yüksek olan toplam 15 (RdRP) ve 8 (hypothetical) farklı mikoviral dsRNAların protein dizileri ile MEGA7 programını kullanılarak oluşturulmuştur (Çizelge 4.36, Çizelge 4.37, Resim 4.24 ve 4.25). Çizelge 4.36 ve 4.37'de bakıldığında her iki örneğin BLASTp sonuçları aynı çizelgelerde verilmiştir bunun nedeni, 961M ve 962M örneklerinin amino asit dizilerininin BLASTp sonucunda aynı mikovirüs dsRNAlar ile hizalanmış ve benzerlik oranları da birbirine çok yakın olduğu için her iki örneğinin BLASTp sonuçları aynı çizelgede verilmiştir. BLASTp sonuçlarına bakıldığında her iki örneğin proteinlerinin en çok benzerlik *Fusagraviridae* ailesinin üyeleriyle olmuş ve en yüksek özdeşlik %41-44 oranlarıyla *Fusarium poae dsRNA virus 2* ile olduğu saptanmıştır. Bu oranda iki mikoviral dsRNAnın *Fusarium poae dsRNA virus 2* ile aynı aileden olduğunu söylemek için çok düşük özdeşlik oranıdır. Çünkü mikoviral çalışmalarında BLAST analizlerine bakıldığında genellikle mikovirüsler arasında %50 üzerinde özdeşlik oranları olan genomlar aynı aileden farklı üyeleri olduğunu ifade etmektedir. Yapılan filogenetik analizlerine göre, 961M ve 962M in ikisi de aynı yerde

kümelenmiş olması, her iki örneğin de aynı mikovirüs dsRNA familyasında olduğu belirtmektedir. Ayrıca örneklerin her ikisi de sadece *Fusagraviridae* familyasının üyesi olan *Fusarium poae dsRNA virus 2* ile kümelenirken, mitovirüslerle aralarında çok uzak kümelenme bağı meydana gelmiş olduğu için iki dsRNA'nın mitovirüs olma ihtimalini düşürmektedir (Resim 4.24 ve 4.25). Resim 4.26'de 961M ve 962M'nin RdRp proteinlerinin amino asit dizilerin *Fusagraviridae* familyasına benzerliği en yakın olan *Fusarium poae dsRNA virus 2* (FpV2), *Macrophomina phaseolina fusagravirus 1,2,3,4,5* (MpfV1, 2, 3, 4 ve 5), *Macrophomina phaseolina double-stranded RNA virus 2* (MpDSRV2) ve *Rosellinia necatrix fusagravirus 1* (RnFGV1) mikovirüsler ile ClustalW yaparak çoklu hizalması yapılmış ve görüldüğü gibi dsRNA virüslerinin RdRp proteininde bulunan sekiz korunmuş motif (I-VIII) (Bruenn, 1993) bölgelerine benzer bölgeler iki örnekte saptanmıştır. Bu da iki örneğin bir dsRNA virüsü olduğunu ifade etmektedir (Resim 4.26). Filogenetik ağaç sonuçlarına göre bu iki dsRNA'nın tanımlanmamış yeni bir mikoviral dsRNA familyasının yeni üyelerinden biri olabileceği ifade edilebilir. Ayrıca *Fusagraviridae* familyasının yeni bir üyesi olma ihtimali de söz konusudur. Ancak yukarıda ifade edildiği gibi gelecekte yapılacak olan çalışmalar ile bu durum açığa kavuşabilecektir.

Çizelge 4.36. 961M ve 962M dsRNA-L kontiglerinin RdRp proteinlerinin amino asit dizileri ile yapılan BLASTp sonuçları

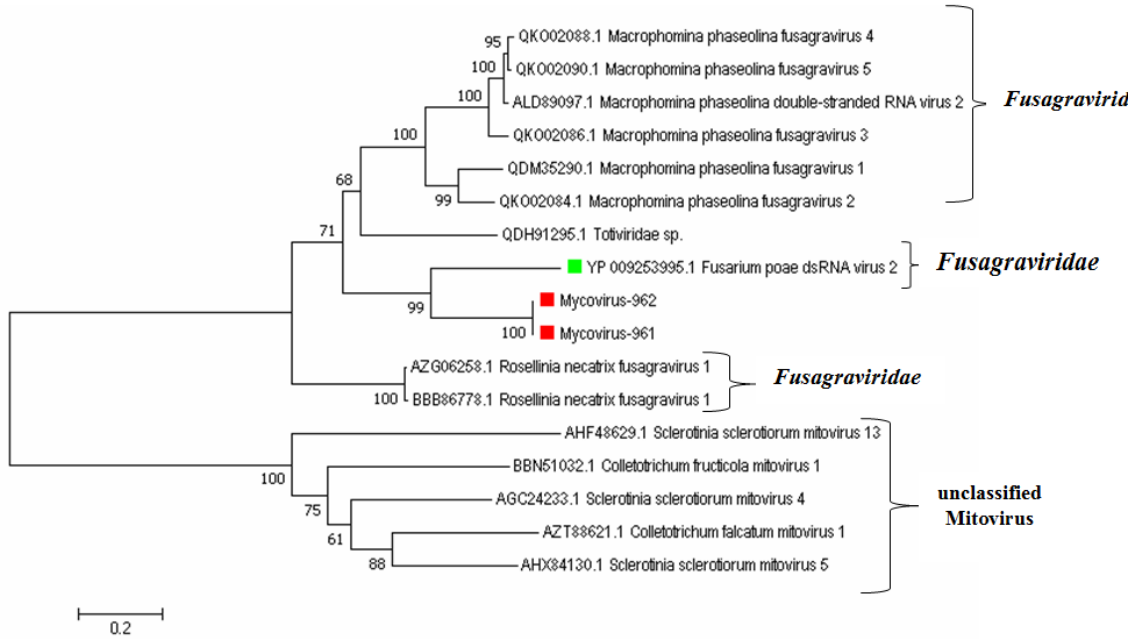
Benzer Fonksiyonlar	Accession Number	Query Cover (%) ¹	Percent Identity (%) ²	E-value ³
<i>Fusarium poae dsRNA virus 2</i>	YP009253995.1	99	41	0-0
<i>Macrophomina phaseolina fusagravirus 1</i>	QDM35290.1	95	33	0-0
<i>Macrophomina phaseolina fusagravirus 2</i>	QKO02084.1	94	33	0-0
<i>Macrophomina phaseolina fusagravirus 3</i>	QKO02086.1	95	33	0-0
<i>Macrophomina phaseolina fusagravirus 4</i>	QKO02088.1	88	33	0-0
<i>Macrophomina phaseolina fusagravirus 5</i>	QKO02090.1	79	35	0-0
<i>Macrophomina phaseolina ds RNA virus 2</i>	ALD89097.1	78	36	0-0
<i>Totiviridae sp</i>	QDH91295.1	88	35	0-0
<i>Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 4</i>	AGC24233.1	59	35	1e-67
<i>Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 5</i>	AHX84130.1	73	36	2e-69
<i>Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 13</i>	AHF48629.1	50	41	4e-68
<i>Rosellinia necatrix fusagravirus 1</i>	AZG06258.1	98	30	2e-167
<i>Rosellinia necatrix fusagravirus 1</i>	BBB86778.1	98	30	2e-164
<i>Colletotrichum falcatum mitovirus 1</i>	AZT88621.1	64	38	2e-62
<i>Colletotrichum fructicola mitovirus 1</i>	BBN51032.1	91	36	4e-13

1: Sorgulama Kapsamı; NCBI isabetiyle eşleşen bitiş uzunluğunun yüzdesi, 2: Yüzde özdeşlik; Referans genom ile aynı olan bazların yüzdesi (yüksek uyumlu %99 benzeri çıkan dizilerin aynı gen dizileri olduğunun göstergesidir), 3: Şans eseri görülmesi beklenen isabet sayısı (0'a ne kadar yakınsa o kadar iyidir).

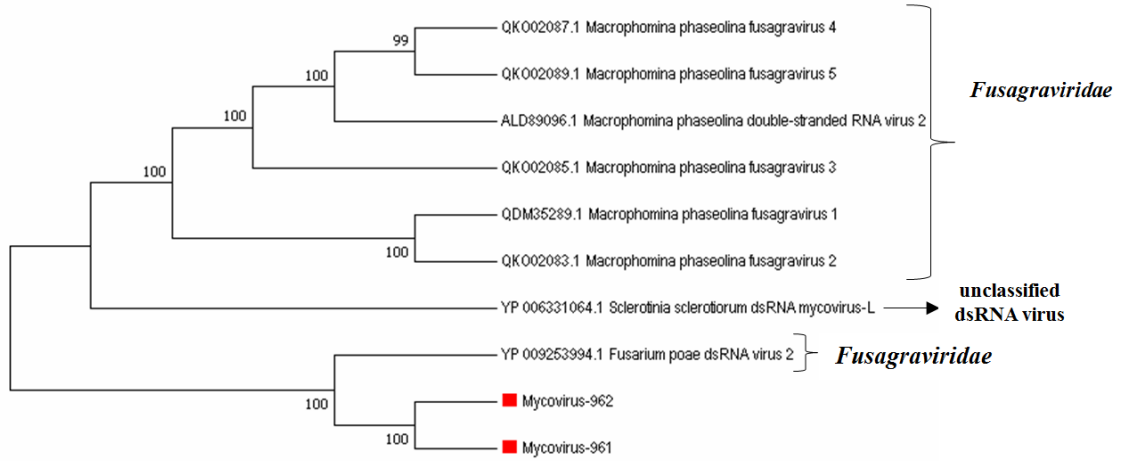
Çizelge 4.37. 961M ve 962M dsRNA-L kontiglerinin hypothetical proteininin amino asit dizileri ile yapılan BLASTp sonuçları

Benzer fonksiyonlar	Accession Number	Query Cover (%) ¹	Percen Identity (%) ²	E-value ³
<i>Fusarium poae dsRNA virus 2</i>	YP_009253994.1	99	44	0-0
<i>Macrophomina phaseolina fusagravirus 1</i>	QDM35289.1	84	34	8e-153
<i>Macrophomina phaseolina fusagravirus 2</i>	QKO02083.1	80	30	6e-155
<i>Macrophomina phaseolina fusagravirus 3</i>	QKO02085.1	84	33	5e-149
<i>Macrophomina phaseolina fusagravirus 4</i>	QKO02087.1	85	33	3e-151
<i>Macrophomina phaseolina fusagravirus 5</i>	QKO02089.1	85	33	9e-151
<i>Macrophomina phaseolina double-stranded RNA virus 2</i>	ALD89096.1	85	33	9e-152
<i>Sclerotinia sclerotiorum dsRNA mycovirus-L</i>	YP_006331064.1	66	34	5e-113

1: Sorgulama Kapsamı; NCBI isabetiyle eşleşen bitiş uzunluğunun yüzdesi, 2: Yüzde özdeşlik; Referans genom ile aynı olan bazların yüzdesi (yüksek uyumlu %99 benzeri çıkan dizilerin aynı gen dizileri olduğunu göregesidir), 3: Şans eseri görülmesi beklenen isabet sayısı (0'a ne kadar yakınsa o kadar iyidir).



Resim 4.24. Mega7 programın Maximum likelihood, Neighbour Joining 1000 replicate bootstrap metodu ile 961M ve 962M dsRNA-L kontiglerinin RdRp proteinlerinden çizilen filogenetik ağaç (Virüslere ait numaralar GenBank erişim numaraları olup bootstrap değerleri dalların üzerinde gösterilmiştir).



Resim 4.25. Mega7 programının Maximum likelihood, Neighbour Joining 1000 replicate bootstrap metodu ile 961M ve 962M dsRNA-L kontiglerinin hypothetical proteinlerine göre çizilen filogenetik ağacı (Virüslere ait numaralar GenBank erişim numaraları olup bootstrap değerleri dalların üzerinde gösterilmiştir).

		Motif I	
Mycovirus-962	308	ISRWLYC-NSRH-----AQTGQSNCLFNQDFTLVVVKLFKDVHTRGRMMSYLSGMLYRILPMVEARAFGDAIYGFMTLCCGRSEKYYKAS	
Mycovirus-961	308	ISRWLYC-NSRH-----AQTGQSNCLFNQDFTLVVVKLFKDVHTRGRMMSYLSGMLYRILPMVEARAFGDALYGFMTLCCGRSEKYYKAS	
FpV2	335	IVLWLLHCNIISSDALNALVFPKSLRVTFALFNABFTTVAKAFKVEVHTQGRLLFSLHLLGFGRIIRPIHLARGYGDVYVGFPTLAGRSEKYYKAS	
RnFGV1	288	IAIFLLN-N-----T-SIFNLKFSYVKTCKEIHANVRLTQQLPGYHKKWPEAHKGRAWNANNIYIGDIIIGGRSELLKFD	
MpFV3	306	IGLEFLQ-N-----YRIFKQGFDDYIKICKAIQQYTRMNGALFNYLRTDPQTECDRAWANQLYGLDVIIGGRSELMHLD	
MpFDSRV2	72	IGLEFLQ-N-----SDYLFNGQFVDYIKTCKAIQQYTRMNGALFNYFRTPDQACDRAWANQLYGLDVIIGGRSELMHLD	
MpFV4	198	IGLEFLQ-N-----SGYLFNGQFVDYIKSCKAIQQYTRMNGALFNYFRTPDQACDRAWANQLYGLDVIIGGRSELMHLD	
MpFV5	72	IGLEFLQ-N-----SGYLFNGQFVDYIKSCKAIQQYTRMNGALFNYFRTPDQACDRAWANQLYGLDVIIGGRSELMHLD	
MpFV1	260	LSLFLQ-N-----FKWISRLDFVDYIKVCKEVHHVVRMVGALPKYLRSVIDVQDDRAWANANNIYIGDIIIGGRSELMHLD	
MpFV2	260	LSLFLQ-N-----YKYLKLNKFTTEYITICKELHHYVRMVGALPLFLRISIDVQDDRAWANANNIYIGDIIIGGRSELMHLD	
consensus	361	* * * * *	
		Motif II	
Mycovirus-962	389	FLDEVIMRMDPEVIRGVFNIDIRT--GKVTFNKKEYDEVIKRLLCSDTVNEVL---KNQVSLTGFDKQYQNRLEFWGASGGSPGTTAEWADG	
Mycovirus-961	389	FLDEVIMRMDPEVIRGVFNIDIRT--GKVTFNKKEYDEVIKRLLCSDTVNEVL---KNQVSLTGFDKQYQNRLEFWGASGGSPGTTAEWADG	
FpV2	425	FVDECLMRSVDPHIRGIFKFDSTT--KQYIFDEDAWTFMIKEVSRVSEVSELL---ERKVALTPFHKWYDRRMFWGASGGSPGYANWSTG	
RnFGV1	360	TEGEFVMRTIDPAIRGILTITESHKPNQLRYITGGPYDSYLLSVIFRVTR---KLIRPMVKLEMERWFNRMFWAPSGGGAGAKLDDWLT	
MpFV3	379	FTEETVMRLIDPALRAVPTYDIGE--RRLYMSHSLYEKYEDEATEEAAREVVIKADAGDGVTLFAFDNSWFDPRMYWASGGGAPGATITWRKN	
MpFDSRV2	145	FTEETVMRLIDPALRAVPTYDIGE--RRLYMSHSLYEKYEDEATEEAAREVVIKADAGDGVTLFAFDNSWFDPRMYWASGGGAPGATITWRKN	
MpFV4	271	FTEETVMRLIDPALRAVPTYDIGE--RRLYMSHSLYEKYEDEATEEAAREVVIKADAGDGVTLFAFDNSWFDPRMYWASGGGAPGATITWRKN	
MpFV5	145	FTEETVMRLIDPALRAVPTYDIGE--RRLYMSHSLYEKYEDEATEEAAREVVIKADAGDGVTLFAFDNSWFDPRMYWASGGGAPGATITWRKN	
MpFV1	333	FTKETVMRLMDPALRAVPTYSTTE--RRLYMSSDLYERYEDEATHEAVREVVKFAEDGVTLFGDSDWFDPRMFWGASGGGAPGATIQWKEN	
MpFV2	333	FTKETVMRLIDPALRAVPTYSTTE--RRLYMSSDLYERYEDEATHEAVREVVIKADAGDGVTLFGDSDWFDPRMFWGASGGGAPGATIQWKEN	
consensus	451	* * * * *	
		Motif III	
Mycovirus-962	474	-----DKLRLNKRKALLSFSKDIRC-LWKQADEVVQWVSVGLTKFESGKLRHILTTGLYNYVTQAYLLDNFESNLRDRTW	
Mycovirus-961	474	-----DKLRLNKRKALLSFSKDIRC-LWKQADEVVQWVSVGLTKFESGKLRHILTTGLYNYVTQAYLLDNFESNLRDRTW	
FpV2	510	-----ERLRLNKRKALLVTPKDIRC-MWDQANAVQWVSVGLTKFESGKLRHILTTGLYNYISQAYLLDNFESNLRDRTW	
RnFGV1	447	GDTERASLQQRNTPDESRYLNKRKALLSLSLNDLKNLNLRRRAVQWVSVGLTKFESGKLRHILTTGLYNYISQAYLLDNFESNLRDRTW	
MpFV3	467	-----NEKLRVNRKALLSIPKDYIRK--VMGKLENVAVQWVSVGLTKFESGKLRHILTTGLYNYISQAYLLDNFESNLRDRTW	
MpFDSRV2	233	-----DEKLRVNRKALLSIPRDIYIRK--VMNRWEKAVQWVSVGLTKFESGKLRHILTTGLYNYISQAYLLDNFESNLRDRTW	
MpFV4	359	-----DEKLRVNRKALLSIPRDIYIRK--VMNRWEKAVQWVSVGLTKFESGKLRHILTTGLYNYISQAYLLDNFESNLRDRTW	
MpFV5	233	-----DEKLRVNRKALLSIPRDIYIRK--VMNRWEKAVQWVSVGLTKFESGKLRHILTTGLYNYISQAYLLDNFESNLRDRTW	
MpFV1	421	-----NEKLRVNRKALLSIPVEYIRK--IIISKAEKAVQWVSVGLTKFESGKLRHILTTGLYNYISQAYLLDNFESNLRDRTW	
MpFV2	421	-----NEKLRVNRKALLSIPIDYIRK--IMDKTEKAVQWVSVGLTKFESGKLRHILTTGLYNYISQAYLLDNFESNLRDRTW	
consensus	541	* * * * *	
		Motif IV	
Mycovirus-962	548	YSANHSVGVARLSNHLRRLKDLRSAAVMDFSDYLNLEHTFVSMSTLYATVASTLISRGKATAPSVYTHASNDLEAAANYISQARHRTFL	
Mycovirus-961	548	YSANHSVGVARLSNHLRRLKDLRSAAVMDFSDYLNLEHTFVSMSTLYATVASTLISRGKATAPSVYTHASNDLEAAANYISQARHRTFL	
FpV2	584	YSARKHSAARVANHIRRLEDLQSGVAMDFSDYLNLEHTFYQMLAIMKSALEEMVARGDDTMTDVAADVGLDLAAGDYVMTARARTFL	
RnFGV1	537	YSTAHGNTTRLANSLRRLSDLTR--TALMWDYADFNINHTIKQMQQLLYASVSVLLERSETLTSQGLVKQIWNMDLALKFMSMDKAGAAFL	
MpFV3	542	YSSAHDMTARIANAYRRIIGELERHNGMLMDFADFNINHTFRGMIKLFNVTVKVLQERGEHATPPHYIYVSAKEDLESALKWVRVARDNTYV	
MpFDSRV2	308	YSSAHDMTARIANAYRRIIGELERHNGMLMDFADFNINHTFRGMIKLFNVTVKVLQERGEHATPPHYIYVSAKEDLESALKWVRVARDNTYV	
MpFV4	434	YSSAHDMTARIANAYRRIIGELERHNGMLMDFADFNINHTFRGMIKLFNVTVKVLQERGEHATPPHYIYVSAKEDLESALKWVRVARDNTYV	
MpFV5	308	YSSAHDMTARIANAYRRIIGELERHNGMLMDFADFNINHTFRGMIKLFNVTVKVLQERGEHATPPHYIYVSAKEDLESALKWVRVARDNTYV	
MpFV1	496	YSTAHGLTARVANMLRTEELKTAHALMDFSDYLNLEHTFRGMIKLFNVTVKVLQERGEHATPPHYIYVSAKEDLESALKWVRVARDNTYV	
MpFV2	496	YSTAHGLTARIANMLRSEELRNQHALMDFSDYLNLEHTFRGMIKLFNVTVKVLQERGEHATPPHYIYVSAKEDLESALKWVRVARDNTYV	
consensus	631	* * * * *	
		Motif V	
Mycovirus-962	638	QDKQTGLIAAISRGLQSGERSTFCNVNMCNKIDSAYVDYALKLLGRKLIHQGDRVGDVDFVTKTDHMKDAILLCALFNLSGASGQLYKI	
Mycovirus-961	638	QDKQTGLIAAISRGLQSGERSTFCNVNMCNKIDSAYVDYALKLLGRKLIHQGDRVGDVDFVTKTDHMKDAILLCALFNLSGASGQLYKI	
FpV2	674	NDKLSGLVVRIVRGLQSGERSTSFNTLCKNVDSVMVDRVAEQFGRRLITHQGDRVGDVDFVTKTDHMKDAILLCALFNLSGASGQLYKI	
RnFGV1	626	HSALAKLTVLAARSLQSGERATSYVNSMSNEVDYIYKDTARRVLMGMEVFTGANDKLGDDLFQTCSTWAEVLAALYNITGSAAGQLSKI	
MpFV3	632	KDNDTGFVSKLVRSLQSGERATSFVNAMRNHIDYLVIRKTAHNLFSRPFQKKGDKQDDVFLPFVNAVEATLACALYNITGSAAGQLSKI	
MpFDSRV2	398	KDNDTGFVSKLVRSLQSGERATSFVNAMRNHIDYLVIRKTAHNLFSRPFQKKGDKQDDVFLPFVNAVEATLACALYNITGSAAGQLSKI	
MpFV4	524	KDNDTGFVSKLVRSLQSGERATSFVNAMRNHIDYLVIRKTAHNLFSRPFQKKGDKQDDVFLPFVNAVEATLACALYNITGSAAGQLSKI	
MpFV5	398	KDNDTGFVSKLVRSLQSGERATSFVNAMRNHIDYLVIRKTAHNLFSRPFQKKGDKQDDVFLPFVNAVEATLACALYNITGSAAGQLSKI	
MpFV1	586	QDNDTGFVSKLVRSLQSGERATSFVNAMRNHIDYLVIRKTAHNLFSRPFQKKGDKQDDVFLPFVNAVEATLACALYNITGSAAGQLSKI	
MpFV2	586	QDNDTGFVSKLVRSLQSGERATSFVNAMRNHIDYLVIRKTAHNLFSRPFQKKGDKQDDVFLPFVNAVEATLACALYNITGSAAGQLSKI	
consensus	721	* * * * *	
		Motif VI	
Mycovirus-962	728	NVEYCSSETTPGRGEFLRYSYDGNASTVKGYPIRALVGFTHGEYFSEAVPAIFERAGTIEQVSKLQRRGLTLPPFLVERSIYRNCISITYT	
Mycovirus-961	728	NVEYCSSETTPGRGEFLRYSYDGNASTVKGYPIRALVGFTHGEYFSEAVPAIFERAGTIEQVSKLQRRGLTLPPFLVERSIYRNCISITYT	
FpV2	764	TSEYCSKPNPGRGEFLRHSYDGNASTVKGYPIRALVGFTHGEYFSEAVPAIFERAGTIEQVSKLQRRGLTLPPFLVERSIYRNCISITYT	
RnFGV1	716	TMEYGGDI-SSYGEYLRYSYDGNASTVKGYPIRALVGFTHGEYFSEAVPAIFERAGTIEQVSKLQRRGLTLPPFLVERSIYRNCISITYT	
MpFV3	722	TNDYHKPE-AARGEYLRYAYDGRNRIVSGYPIRAMMGVIHGEFFDEFIPKPLERAATFMEQFARLQRRGWIIPKTLLEIRIKRNCNLVYT	
MpFDSRV2	498	TNDYHKPE-AARGEYLRYAYDGRNRIVSGYPIRAMMGVIHGEFFDEFIPKPLERAATFMEQFARLQRRGWIIPKTLLEIRIKRNCNLVYT	
MpFV4	614	TNDYHKPE-AARGEYLRYAYDGRNRIVSGYPIRAMMGVIHGEFFDEFIPKPLERAATFMEQFARLQRRGWIIPKTLLEIRIKRNCNLVYT	
MpFV5	498	TNDYHKPE-AARGEYLRYAYDGRNRIVSGYPIRAMMGVIHGEFFDEFIPKPLERAATFMEQFARLQRRGWIIPKTLLEIRIKRNCNLVYT	
MpFV1	676	TNDYSKPK-GARGEYLRYAYDANANTVSGYPIRAMMGVIHGEFFDEFIPKPLERAATFVEQFEKLRRRGWTPPDTLLERAIKRNCHLVYT	
MpFV2	676	TNDYSKPK-GARGEYLRYAYDSHARTVSGYPIRAMMGVIHGEFFDEFIPKPLERAATFVEQFEKLRRRGWTPPDTLLERAIKRNCHLVYT	
consensus	811	* * * * *	
		Motif VII	
Mycovirus-962	728	NVEYCSSETTPGRGEFLRYSYDGNASTVKGYPIRALVGFTHGEYFSEAVPAIFERAGTIEQVSKLQRRGLTLPPFLVERSIYRNCISITYT	
Mycovirus-961	728	NVEYCSSETTPGRGEFLRYSYDGNASTVKGYPIRALVGFTHGEYFSEAVPAIFERAGTIEQVSKLQRRGLTLPPFLVERSIYRNCISITYT	
FpV2	764	TSEYCSKPNPGRGEFLRHSYDGNASTVKGYPIRALVGFTHGEYFSEAVPAIFERAGTIEQVSKLQRRGLTLPPFLVERSIYRNCISITYT	
RnFGV1	716	TMEYGGDI-SSYGEYLRYSYDGNASTVKGYPIRALVGFTHGEYFSEAVPAIFERAGTIEQVSKLQRRGLTLPPFLVERSIYRNCISITYT	
MpFV3	722	TNDYHKPE-AARGEYLRYAYDGRNRIVSGYPIRAMMGVIHGEFFDEFIPKPLERAATFMEQFARLQRRGWIIPKTLLEIRIKRNCNLVYT	
MpFDSRV2	498	TNDYHKPE-AARGEYLRYAYDGRNRIVSGYPIRAMMGVIHGEFFDEFIPKPLERAATFMEQFARLQRRGWIIPKTLLEIRIKRNCNLVYT	
MpFV4	614	TNDYHKPE-AARGEYLRYAYDGRNRIVSGYPIRAMMGVIHGEFFDEFIPKPLERAATFMEQFARLQRRGWIIPKTLLEIRIKRNCNLVYT	
MpFV5	498	TNDYHKPE-AARGEYLRYAYDGRNRIVSGYPIRAMMGVIHGEFFDEFIPKPLERAATFMEQFARLQRRGWIIPKTLLEIRIKRNCNLVYT	
MpFV1	676	TNDYSKPK-GARGEYLRYAYDANANTVSGYPIRAMMGVIHGEFFDEFIPKPLERAATFVEQFEKLRRRGWTPPDTLLERAIKRNCHLVYT	
MpFV2	676	TNDYSKPK-GARGEYLRYAYDSHARTVSGYPIRAMMGVIHGEFFDEFIPKPLERAATFVEQFEKLRRRGWTPPDTLLERAIKRNCHLVYT	
consensus	811	* * * * *	
		Motif VIII	
Mycovirus-962	728	NVEYCSSETTPGRGEFLRYSYDGNASTVKGYPIRALVGFTHGEYFSEAVPAIFERAGTIEQVSKLQRRGLTLPPFLVERSIYRNCISITYT	
Mycovirus-961	728	NVEYCSSETTPGRGEFLRYSYDGNASTVKGYPIRALVGFTHGEYFSEAVPAIFERAGTIEQVSKLQRRGLTLPPFLVERSIYRNCISITYT	
FpV2	764	TSEYCSKPNPGRGEFLRHSYDGNASTVKGYPIRALVGFTHGEYFSEAVPAIFERAGTIEQVSKLQRRGLTLPPFLVERSIYRNCISITYT	
RnFGV1	716	TMEYGGDI-SSYGEYLRYSYDGNASTVKGYPIRALVGFTHGEYFSEAVPAIFERAGTIEQVSKLQRRGLTLPPFLVERSIYRNCISITYT	
MpFV3	722	TNDYHKPE-AARGEYLRYAYDGRNRIVSGYPIRAMMGVIHGEFFDEFIPKPLERAATFMEQFARLQRRGWIIPKTLLEIRIKRNCNLVYT	
MpFDSRV2	498	TNDYHKPE-AARGEYLRYAYDGRNRIVSGYPIRAMMGVIHGEFFDEFIPKPLERAATFMEQFARLQRRGWIIPKTLLEIRIKRNCNLVYT	
MpFV4	614	TNDYHKPE-AARGEYLRYAYDGRNRIVSGYPIRAMMGVIHGEFFDEFIPKPLERAATFMEQFARLQRRGWIIPKTLLEIRIKRNCNLVYT	
MpFV5	498	TNDYHKPE-AARGEYLRYAYDGRNRIVSGYPIRAMMGVIHGEFFDEFIPKPLERAATFMEQFARLQRRGWIIPKTLLEIRIKRNCNLVYT	
MpFV1	676	TNDYSKPK-GARGEYLRYAYDANANTVSGYPIRAMMGVIHGEFFDEFIPKPLERAATFVEQFEKLRRRGWTPPDTLLERAIKRNCHLVYT	
MpFV2	676	TNDYSKPK-GARGEYLRYAYDSHARTVSGYPIRAMMGVIHGEFFDEFIPKPLERAATFVEQFEKLRRRGWTPPDTLLERAIKRNCHLVYT	
consensus	811	* * * * *	

Resim 4.26. ClustalW yaparak, 961M ve 962M dsRNA-L kontiglerinin RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) alanlarının ve *Fusagaviridae* familiyanın bazı üyeleri ile korunmuş motiflerin amino asit sekanslarının çoklu hizalamaları. Motif I – VIII (koyu yıldız işaretleri), dsRNA virüslerinin RdRp karakteristiğine sahip sekiz korunmuş motifleri, koyu ve normal yıldız işaretleri; korunmuş amino asitlerdir.

Genom dizilemeden sonra yapılan biyoinformatik analizler sonucunda 961M ve 962M örneklerinden sırasıyla 12141 ve 14452 (nt) tüm genom uzunluğunda negatif ve pozitif yönelimli (double stranded) dsRNAlar saptanmıştır. 961M ve 962M dsRNA genom dizi analizlerinden elde edilen ham veriler ilk önce NCBI SRA (Sequence Read Archive) da kayıt edilerek 961M için PRJNA722503 ve 962M için PRJNA723482 Accession Number'ı alınmıştır. Ardında biyoinformatik analiz verileri NCBI Banklt de kaydedilmiş ve 961M'in 2 kontigi için 961M-L'e MZ050804 ve 961M-S'e MZ074321 ve 962M'in 3 kontigi için 962M-L'e MZ050805, 962M-S1'e MZ050806 ve 962M-S2'e MZ050807 Accession Number'leri alınmıştır.



5. TARTIŞMA

5.1. Ege Bölgesi Bağ Alanlarından İzole Edilen *Phomopsis* spp İzolatlarının Kültürel Özelliklerinin Değerlendirilmesi ile Morfolojik ve Moleküler Yöntemler ile Tanılanması

Ege Bölgesi bağ alanlarında ölükol hastalığı etmeni *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc. izolatlarında dsRNA'nın tanılanması, moleküler ve biyolojik karakterizasyonu ile hipovirüent etkilerinin araştırılması amacıyla bu çalışmada yapılmıştır. Ege ve Marmara bölgelerinde ölükol hastalığının varlığı bazı araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir (Akgül vd., 2015; Arı, 2000; Awan, 2017; Çetinkaya ve Onoğur 2006; Erkan ve Larignon, 1998; Güngör Savaş 2019; Karaca ve Eroğlu, 1967; Özhendekçi, 1978; ve Yıldırım, 2014). Marmara Bölgesinin Kocaeli, Sakarya, Bursa ve İstanbul illerinin bağ alanlarında ölükol hastalığına sebep olan *P. viticola*'nın yaygınlığı ile ilgili yapılan bir survey çalışmasında; Geyve'de %61, Gebze ve Mudanya'da %44 ve İznik'de %30 civarında olduğu Özhendekçi, (1978) tarafından bildirilmiştir. Güngör Savaş, (2019) Ege Bölgesinde Manisa ve Marmara Bölgesinde Bursa ve Tekirdağ illeri bağ alanlarından *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *P. viticola* ve *Diplodia* spp. etmenlerinin ortalama %4,7 oranında var olduğunu rapor etmiştir. Hosseinalizadeh vd. (2020) Ege Bölgesinin İzmir ve Manisa illerinden elde edilen 86 asma sürgün örneğinden 80 adet *P. viticola* izole etmişlerdir. Oldukça geniş sörvey alanında yapılan bu çalışma ile ölükol hastalığının günümüzde Ege Bölgesinde bağ yetiştiriciliğinde öneminin halen devam ettirdiği ortaya konulmuştur. Nitekim Tarım ve Orman Bakanlığının yayınladığı teknik talimatlarda Türkiye'de ölükol hastalığı, asmanın en önemli dört hastalığından biri olarak kabul edilmektedir (TAGEM, 2011).

Ölükol hastalığı etmeninin ilk olarak ilkbaharda yapraklarda küçük sarı klorotik lekeler oluşturduğunu ve asmanın genç sürgün, yaprak, yaprak ve salkım sapsarı ile meyveler üzerinde hastalık oluşturduğu bildirilmiştir (Erincik vd., 2001). Ayrıca bahar aylarında hastalığın ilerleyip enfeksiyona uğrayan sürgünlerin dip kısımlarında açık renkli küçük lekelerin oluştuğu ve bu lekelerin daha sonra odun dokusuna kadar ulaşan çatlaklara dönüşüp siyahlaştığını Erincik vd., (2001) gözlemiştir. Erincik vd., (2001)'nin ölükol

hastalığı için belirttiği belirtiler ile bu çalışma kapsamında Ege Bölgesi illerindeki sürveyelerde gözlenen ölükol hastalığı belirtileri benzerlik içerisindedir.

P. viticola etmeni diğer *Phomopsis* cinsleri gibi besi ortamında W (beyaz renkli koloni) ve G (gri renkli koloni) olmak üzere iki farklı renkte koloniler oluşturmaktadır (Kanematsu vd, 1999; Kanematsu vd., 2000; Urbez-Torres vd., 2013 ve Awan, 2017). Bu çalışmada da, izole edilen *Phomopsis* spp. izolatlarının besi ortamında beyaz ve gri renkte koloniler oluştuğu gözlenmiştir. Urbez-Torres vd. (2013) ABD'nin Kaliforniya eyaleti bağ alanlarından toplanan *P. viticola* izolatlarında beyaz ve açık kahve renkte kolonilerin gözlendiğini ve izolatların PDA üzerinde inkübasyonun dördüncü haftasında 60 mm'lik koloni çapıyla yavaş miselyal gelişim gösterdiğini saptamışlardır. Bu çalışmada ise, Ege Bölgesinin bağ alanlarından elde edilen *Phomopsis* izolatları besi ortamında beyaz, gri ve krem renkte koloniler oluşturmuş ve inkübasyonun ikinci haftasında ortalama 5,54-7 cm (50,54-70 mm)'lik koloni çapıyla orta hızlı miselyal gelişim ile Urbez-Torres vd (2013)'nin çalışmasına göre nisbeten biraz hızlı miselyal gelişim göstermiştir. Akgül vd. (2015) Türkiye'de Ege Bölgesinin bağ alanlarından izole edilen *Diaporthe ampelina* (*P. viticola*), izolatlarının PDA ortamında krem renkte koloniler oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da Ege Bölgesinin bağ alanlarından elde edilen toplam 14 *Phomopsis* spp. izolatında inkübasyonun 3. gününde ve 12 *Phomopsis* spp. izolatında 14. gününde krem renkte kolonilerin meydana geldiği saptanmıştır. Ayrıca Akgül vd. (2015) *D. ampelina* (*P. viticola*) izolatlarının inkübasyonun 20. gününde 50-55 mm'lik koloni gelişim çapıyla yavaş miselyal gelişim oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Ancak bu çalışmada izolatlar besi ortamında inkübasyonun 14. gününde ortalama 5,54-7 cm (50,54-70,00 mm)'lik koloni çapıyla orta hızlı miselyal gelişim göstermişlerdir. Awan, (2017) Ege Bölgesi bağ alanlarından izole edilen *P. viticola* izolatları arasında her iki koloni rengine (beyaz ve gri) sahip izolatlar rastlandığını ve W tipi koloniye sahip olanların gelişme hızı ve virülensliğinin G tipte olanlara göre daha düşük olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada da izole edilen *Phomopsis* spp. izolatları besi ortamında inokülasyonun 14. gününde beyaz, gri ve krem renge sahip olan izolatlar gözlenmiş ve beyaz ve krem renkli kolonileri olan izolatlar hızlı ve orta hızda koloni gelişim göstermişken, kolonileri gri renkte olan izolatların birçoğu %70,8 oranında hızlı miselyal koloni gelişim hızı göstermişlerdir. Çalışmada elde edilen ve literatür bulgularına göre izolatlar arasında meydana gelen büyüme hızındaki farklılıkların, patojenin genetik yapısı ve virülenslik özelliklerine bağlı olarak değişiklik gösterebileceği ifade edilebilir.

P. viticola diğer *Phomopsis* türlerinde olduğu gibi α ve β sporları üretmekte ve piknidium içindeki sporların oranı ve boyutları önemli ölçüde değişebilmektedir (Uecker, 1998; Sergeeva vd., 2003; Özben, 2011; Awan, 2017). Schilder vd. (2005) Kuzey Amerika bağ alanlarından izole edilen 70 *P. viticola* izolatının 65'inde ortalama $9,8-12,6 \times 3,1-4,5$ μm arasında α konidia üretmiş olduğunu ve 5'inde ise sulu agar ortamı üzerindeki asma yapraklarında β conidia ürettiğini bildirmişlerdir. Bu elde ettikleri boyutların Mostert vd. (2001), ve Pearson ve Goheen (1994)'nin çalışmalarından farklı olduğunu ve farklılığın nedeninin büyüme ortamındaki farklılıklar veya izolatlar arasındaki genetik farklılık olabileceğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada da saptanan α sporlarının boyutlarının ($8-11,04 \mu\text{m} \times 1,7-2,8 \mu\text{m}$) Schilder vd. (2005)'in bulgularına (α konidia için $9,8-12,6 \times 3,1-4,5 \mu\text{m}$) çok yakın olmadığı ifade edilebilir. Baumgartner vd. (2013) Doğu Kuzey Amerika bağlarında toplanan *P. viticola* izolatlarının ortalama α konidya boyutu $9,5-10,5 \times 2-3 \mu\text{m}$ arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Aynı şekilde bu α konidi boyutu bulguları da (α : $9,5-10,5 \times 2-3 \mu\text{m}$) bu çalışmadaki α sporları boyutları ile farklılık göstermiştir. Ayrıca Akgül vd. (2015) tarafından *Diaporthe ampelina* (*P. viticola*), etmeninin sırasıyla $10,0 \times 2,4$ ve $22,5 \times 1,0$ olarak ölçülmüş olan α ve β sporlarının ortalama boyutları ise bu çalışmada belirlenen ($8-11,04 \mu\text{m} \times 1,7-2,8 \mu\text{m}$ ve $20,5-25,14 \mu\text{m} \times 0,83-1,06 \mu\text{m}$) α ve β sporları boyutlarına yakın olsa da genel olarak yine de farklı oldukları söylenebilmektedir. Bunun nedeninin de Schilder vd. (2005) in ifade ettiği gibi izolatların büyüme ortamındaki farklılıklardan veya izolatlar arasındaki genetik farklılıklardan olabileceğidir.

Phomopsis spp.'nin moleküler tanısı, birçok araştırmacı tarafından DNA'nın farklı gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve filogenetik analizler ile yapılmıştır (Gomes vd., 2013; Santos vd., 2010; Udayanga vd., 2011 ve van Niekerk vd., 2005). Schilder vd. (2005) Kuzey Amerika bağ alanlarında *Phomopsis* türlerinin tanılanması için sürgün ve yaprak lekesi belirtileri gösteren 70 *Phomopsis* izolatını translation elongation factor subunit 1- α (EF1- α) ve Calmodulin (CAL) gen bölgelerinin tanısını PCR ile yapmışlar ve DNA sekans analizi sonucu iki izolat dışında tüm izolatların *P. viticola* olduğunu ve EF1- α ve CAL gen bölgelerinin sırasıyla 346 bp ve 517 bp büyüklüğünde olduğunu saptamışlardır. Úrbez-Torres vd. (2009) Teksas bağ alanlarında asmalarda ekonomik kayıplarına neden olan fungal gövde hastalıklarının popülasyonu ve türlerinin tanımlanmasını fungal izolatların morfolojik yapılarına bakarak ve moleküler tekniklerini kullanarak yapmışlar ve *Botryosphaeriaceae* türleri ile birlikte *P. viticola* dahil olmak üzere toplam on bir tür tanımlamışlardır. Kuzey Amerika bağ alanlarında *Phomopsis* sürgün ve yaprak lekesi

izolatlarının morfolojik yapılarına bakılarak ribozomal dahili transkripsiyonlu aralayıcı (ITS) gen bölgesi PCR ile çoğaltılmış ve PCR ürünü DNA ların dizilerinin filogenetik analizleri sonucu *P. viticola*, *Phomopsis fukushii* ve *Diaporthe eres* türlerinin tanılanması Baumgartner vd. (2013) tarafından yapılmıştır. Ghnaya-Chakroun vd. (2014) moleküler yöntemler ve DNA sekans analizleri kullanarak ilk kez Tunus bağ alanlarından *P. viticola* ve *D. seriata* fungal etmenlerini tanılamışlardır. Yeni Zelanda bağ alanlarından asma kurumalarına neden olan asma gövde hastalığı etmenlerinin dağılımı ve tanımlanmasına yönelik yapılan çalışmada izolatların morfolojik özelliklerine bakarak ve DNA dizileme analizlerini yaparak *P. viticola* etmeni saptanmıştır (Mundy vd., 2020). Türkiye’de geçmişte yapılan birçok çalışmada *P. viticola*’nın tanısı sadece morfolojik özelliklerine bakılarak yapılmıştır (Çetinkaya ve Onoğur, 2006; Karaca ve Eroğlu, 1967; Özben, 2011 ve Yıldırım, 2014). Ancak son yıllarda birçok araştırmacı moleküler yöntemler kullanarak *P. viticola*’nın tanımlanmasını yapmışlardır (Akgül vd., 2015; Awan, 2017 ve Güngör Savaş, 2019). Türkiye’de yapılan çalışmalarda, Ege Bölgesinin İzmir ve Manisa İllerinin bağ alanlarından sultaniye çekirdeksiz asmalardan elde edilen ölükol izolatlarının kültürel özelliklerinin yanısıra ITS, TUB ve EF1- α gen bölgelerinin dizi analizleri ile tanısı Akgül vd. (2015) tarafından yapılmış ve çalışma sonucunda *P. viticola*’nın teleomorf *Diaporthe ampelina* ile ilişkilendirilmiştir. Daha sonra Awan, (2017) Ege Bölgesi bağ alanlarından izole edilen 23 *Phomopsis (Diaporthe)* spp. izolatın universal primerler kullanılarak PCR’ını yapmış ve elde edilen PCR ürünlerinin DNA dizilim analizini yaparak izolatların *P. viticola* olduklarını saptamıştır. Güngör Savaş, (2019) 2019 yılında Ege Bölgesinde Manisa ve Marmara Bölgesi Tekirdağ illerinden izole edilen odun dokusu fungal etmenlerin ITS1 ve ITS4, Bt2a ve Bt2b primerler kullanılarak PCR’larını yapmış ve ardından PCR ürünlerinin DNA dizi analizlerini yaparak *P. viticola*’nın tanısı yapılmıştır. Bu çalışmada ise Ege Bölgesinin farklı il ve ilçelerinden izole edilen 232 *Phomopsis* spp. izolatının ticari bir PCR kiti (*Phomopsis viticola* End-Point PCR kit) kullanılarak toplam 214 *P. viticola* izolatın moleküler tanısı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada *P. viticola* tanı kiti kullanıldığı için Akgül vd. (2015) ve Güngör Savaş, (2019) ün çalışmalarında olduğu gibi kullanılan gen bölgeleri belirtilememiştir. Ege Bölgesinde bağ alanlarında ölükol belirtisi gösteren bitkilerden elde edilen izolatların büyük bir çoğunluğunun %92,25 oranla *P. viticola* olduğu bu çalışma ile ortaya konmuştur. Bu bulgular Ege Bölgesi bağ alanlarında ölükol hastalığından sorumlu ana patojenin *P. viticola* olduğunu göstermektedir. Asmalarda diğer *Phomopsis* türlerinin yanısıra farklı *Diaporthe* türlerinin de ölükol hastalığına yakın belirtiler verdiği daha önceki çalışmalarda da belirtilmiştir (Akgül vd., 2015 ve Güngör

Savaş 2019). Ancak bu çalışma ile Ege Bölgesi bağ alanlarında diğer *Phomopsis* türlerinin varlığının fazla olmadığı anlaşılmaktadır.

5.2. dsRNA İçeren *P. viticola* İzolatlarından dsRNA'ların İzole Edilmesi ve Biyolojik Karakterizasyonu

Morfolojik ve moleküler yöntemler ile tanımlanması yapılan *P. viticola* izolatlarından dsRNA analizi yapılarak dsRNA varlığı yönünden değerlendirilmiştir. Asmada ölükol hastalığının neden olan *P. viticola* da dsRNA varlığı ile ilgili Hosseinalizadeh vd. (2020) tarafından yapılan çalışma dışında literatür taramalarında hangi bir başka çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma tarama niteliğinde yürütülmüş ve 80 *P. viticola* izolatının sadece sekizinde yaklaşık 18-20 kb büyüklüğünde olduğu tahmin edilen dsRNA profilleri tesbit edilmiştir (Hosseinalizadeh vd., 2020). Bu çalışmada, Baliija vd. (2008) nın izolasyon yöntemi ile 214 *P. viticola* izolatında dsRNA analizi yapılmış ve Ege Bölgesinin yoğun asma yetiştiriciliği yapılan 4 ilinden elde edilen toplam 214 *P. viticola* izolatından toplam 125 izolatta iki ve tek segmentli dsRNA profilleri tesbit edilmiştir. Daha sonra bu 125 dsRNA profilinden gel görüntüsü en iyi olan izolatlar belirlenmiştir. Ardından dsRNA'lar Morris ve Dodds, (1979) ve Valverde vd. (1990) tarafından geliştirilen yöntemler modifiye edilerek izole edilmişlerdir. Böylece izolatların her iki yöntem ile dsRNA analizleri yapılmış ve iki yöntemde de dsRNA bantları elde edilmiştir. Ancak her iki yöntemin izolasyon ve jel elektroforez aşamaları farklı olduğundan dsRNA'ların elektroforetik analiz sonuçları Baliija vd. (2008)'nin izolasyon yönteminde dsRNA profil bantları ~18 kb gibi görüntülenirken, Morris ve Dodds, (1979) yöntemi ile elde edilen dsRNA profilinin elektroforetik analiz sonucu bantların moleküler boyutları GelAnalyzer programı ile belirlendiğinde yaklaşık 9,4-2,5 kb olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bazı izolatlarda dsRNAlar ~9,4 kb uzunluğunda tek bant görülür iken bazı izolatlarda ~2,5 ve 9,4 kb uzunluğunda iki segment saptanmıştır. Elde edilen bu dsRNA boyutları *Phomopsis* spp.'in teleomorfik grubundan olan *Diaporthe ambigua*'da saptanan 4,3 ve 4 kb'lik (Preisig vd., 2000; Smit vd. 1996) dsRNA'lara göre daha büyük olduğu görülmüştür. Yine aynı şekilde *Diaporthe perijuncta* izolatlarında elde edilen iki mikovirüsün (*Diaporthe RNA Virus* (DaRV) ve *Diaporthe RNA virus 1* (DRV1) 4,1 kb'lik (Moleleki vd., 2003; Moleleki vd., 2011) dsRNA moleküler ağırlığı, *Diaporthe rudis* izolatlarından elde edilen (*Diaporthe rudis mitovirus 1*)

2,5 kb'lık (Kocanova vd., 2020) dsRNA moleküler ağırlığı bu çalışmada elde edilen dsRNA'lara göre daha küçük olduğu saptanmıştır. Buna benzer bir durum Çin'de patlıcanda *Phomopsis* yanıklığına neden olan *Phomopsis vexans*'dan saptanan iki yeni mikovirüsde (*Phomopsis vexans RNA virus 1* (PvRV1) ve *Phomopsis vexans partitivirus 1'*(PvPV1) de görülmektedir (Zhang vd., 2015; Zhang vd., 2020). Zhang vd. (2015) *P. vexans* izolatlarından üç segmentli *Phomopsis vexans RNA virüsü 1* (PvRV1) dsRNA profil boyutları dsRNA-L 12 kb, dsRNA-M 5 kb ve dsRNA-S 3 kb olarak belirlemişlerdir. Daha sonra Zhang vd. (2020) patlıcandaki *P. vexans* (PvHZ002) izolatlarından elde edilen 2 segmentli *Phomopsis vexans partitivirus 1'*(PvPV1) dsRNA'larının moleküler boyutlarının dsRNA1; 1,662 bp ve dsRNA2; 1,628 bp olduğunu saptamış bu dsRNA boyutların bu çalışmada elde edilen dsRNA boyutlarından çok daha küçük olduğu saptanmıştır. *Phomopsis longicolla* (ME711)'dan izole edilen (*Phomopsis longicolla RNA virusu 1-PIRV1*) iki segmentli dsRNA moleküler boyutlarının (~2,8 kb ve 4 kb) (Hrabakova vd., 2017) yine bu çalışmada elde edilen dsRNA'nın moleküler boyutlarından (~9,4 kb) oldukça küçük olduğu görülmüştür. Bu çalışmaya konu olan mikoviral dsRNA'nın diğer *Phomopsis vexans* ve *Phomopsis longicolla*'lerden elde edilen dsRNA'ların elektroforetik jel de belirlenen moleküler boyutlarından daha büyük olduğunu söyleyebiliriz. Bu çalışmada izole edilen dsRNA'ların boyutlarının yukarıda ifade edilen çalışmalar ile farklı olduğu tesbit edilmiştir. Ancak, Wang vd. (2016)'in Çin'de buğdaydan aldıkları *F. poae* izolatından elde ettikleri 9 ve 2,5 kb'lık iki segmentli (L-dsRNA ve S-dsRNA) dsRNA'ların segment sayısı ve genom uzunluğu yönünden *P. viticola* izolatlarından izole edilen iki segmentli dsRNA'lara yakın olduğu görülmektedir. Bu nedenle *F. poae* ve *P. viticola* dan izole edilen dsRNA'ların elektroforetik profillerindeki bant sayıları ve genom boyutlarının birbirine benzer olduğu belirlenmiştir.

P. viticola'da dsRNA'nın varlığı ve fungusun üzerinde oluşturduğu morfolojik farklılıkları ile ilgili daha önce yapılmış bir çalışmaya rastlanmamış olduğu için dsRNA'nın *P. viticola* koloni renklerinde, miselyal gelişim hızında veya piknit oluşumunda nasıl bir değişiklikler meydana getirdiği ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle dsRNA içeren toplam 125 adet *P. viticola* izolatlarının 3 dsRNA negatif *P. viticola* izolatıyla karşılaştırılması sonucu elde edilen bulgular *P. viticola* ile ilgili bir çalışma ile karşılaştırılamamıştır. Ancak mikovirüs dsRNA'nın konukçu fungusun koloni renklerinde oluşturduğu renk değişiklikleri ile ilgili *C. parasitica* etmenin üzerinde çok sayıda çalışma yürütülmüş (Anagnostakis, 1987; Chung vd., 1994; Erincik vd., 2018 ve Gürer vd., 2001)

olduğu için *C. parasitica* ile karşılaştırılabilmiştir. Kestane kanseri etmeninde hipovirüent izolatlarda dsRNA virüsü pigment azalmasına neden olabildiği için enfeksiyon sonrasında turuncu *C. parasitica* miselyal kolonilerinin renkleri beyaz, açık turuncu veya krem rengine dönmekte (Erincik vd., 2018) ve böylece dsRNA içeren izolatlar içermeyen izolatlardan morfolojik gözlem ile ayırt edilebilmektedir. Fakat bazı çalışmalarda turuncu miselyal koloniye sahip hipovirüent *C. parasitica* izolatlarının da varlığı bildirilmiştir (Anagnostakis, 1987). Gürer vd. (2001) toplam 24 hipovirüent *C. parasitica* izolatın koloni rengini incelemiş ve bunlardan 11'i beyaz, 4'ü krem ve 7'sinin beyazımsı krem olduğunu bildirmiştir. Kısacası her ne kadar koloni rengi hipovirüent izolatların belirlenmesinde önemli bir kriter olsa da tek başına yeterli bir özellik olmadığı Erincik vd. (2018) tarafından ifade edilmiştir. Bu çalışmada ise dsRNA içeren ve içermeyen *P. viticola* izolatlarının koloni renklerine göre ayırt edilememesi izolatları morfolojik olarak ayıramamıza neden olmaktadır. Bu da dsRNA pozitif ve negatif izolatları ayırabilmek için izolatlarda dsRNA izolasyon ve analizini zorunlu hale getirmiştir. Nitekim *Phomopsis* spp.'in telemorfik grubunda yer alan *Diaporthe perijuncta* etmeninden izole edilen *Diaporthe RNA virus 1* (DRV1) *D. ambigua* ve *Phomopsis* spp. izolatlarına *in vitro* koşullarda aktarılması ile elde edilen dsRNA içeren fungal izolatlarda morfolojik olarak herhangi bir renk farklılığın görülmemesi (Moleleki vd., 2011) bu çalışma ile benzerlik göstermiştir. dsRNA'nın var olup olmasının *P. viticola* izolatlarının koloni renklerine her hangi bir etkisinin olmadığı söylenebilir. Ancak kesin kanıtlara varmak için bu konu ile ilgili kapsamlı olarak çalışılması gerekmektedir.

Mikovirüs dsRNA'nın *C. parasitica* nın miselyal gelişme hızı üzerindeki etkisi ile ilgili yapılan çalışmaların bazılarında dsRNA içeren izolatlar ile fungal kültürün gelişme hızları arasında farklı ilişkilerin olduğu rapor edilmiştir (Erincik vd., 2018; Elliston, 1985; Moleleki vd., 2011 ve Robin vd., 2010). *C. parasitica*'da hipovirüent izolatların bazıları virüent izolatlar gibi petriyi hızla doldurduğu halde bazıları petriyi tam doldurmayan koloniler meydana getirmiştir (Elliston, 1985 ve Gürer vd., 2001). Robin vd. (2010) hipovirüent *C. parasitica* izolatlarının PDA'da oluşturdukları koloni büyüklükleri yönünden aralarında varyasyonun olduğunu ve bu durumu daha çok CHV1'in alttıpleri ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. *Diaporthe RNA virus 1* (DRV1) *in vitro* koşullarda *D. ambigua* ve *Phomopsis* spp.'ye aktarıldığında, mikoviral dsRNA *D. ambigua* izolatlarında misel gelişimi ve yoğunluğunun azalmasına neden olurken *Phomopsis* spp. izolatlarında ise herhangi bir etki gözlenmemiştir (Moleleki vd., 2011). Bu çalışmada da *C. parasitica*

CHV1'e (Robin vd., 2010) benzer şekilde *P. viticola* nın dsRNA içeren izolatları arasında farklı miselyal gelişim hızı gözlenmiştir. Bazı dsRNA içeren *P. viticola* izolatları dsRNA içermeyen izolatlar gibi petriyi hızla doldurduğu, bazılarında ise normal gelişme olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak dsRNA pozitif izolatların birçoğu inkübasyonun farklı günlerinde dsRNA negatif izolatlara göre daha yavaş miselyal gelişim göstermiştir. Ancak *P. viticola* dsRNA içeren izolatları arasında gözlenen farklı miselyal koloni gelişme hızı mikovirüs dsRNA'nın ve konukçu fungusun genom yapısı ve gelişme ortamından kaynaklanan bir durum olabileceği ifade edilebilir.

Mikovirüs dsRNA'ların fungusların piknit oluşumunda önemli miktarda azalmaya neden olduğu bilinmektedir. Ancak bu durum dış faktörlere, fungusun ve virüsün genetik yapısına bağlı olarak değişim gösterebilmektedir (Erincik vd., 2018). Nitekim Elliston, (1985) hipovirüent *C. parasitica* izolatlarının virüent izolatlarına göre daha az sayıda stroma oluşturduğunu belirtmiş ve hiçbir şekilde piknit oluşturmayan izolatların varlığından da söz etmiştir. dsRNA pozitif *P. viticola* izolatları arasında belirli sayılarda farklı piknit oluşumunun belirlenmesi Elliston, (1985) nun çalışması ile benzerlik göstermiştir. Gürer vd. (2001) kültürde beyaz koloni oluşturan 11 ve krem renğinde olan 4 hipovirüent izolatın hiçbir şekilde piknit oluşturmadığını ancak 7 beyaz ve krem renkli izolatın sınırlı sayıda büyük piknitler ile 1 krem renkli izolatın çok sayıda piknit oluşturduğunu bildirmiştir. Erincik vd. (2018) toplam 197 dsRNA pozitif *C. parasitica* izolatında 30 günlük inkübasyonlarının sonunda 32 beyaz izolatta sıfır piknit oluşurken 73'ü beyaz ve krem renkli izolatlarda 1 ile 50 arasında piknit oluştuğunu ve turuncu renkte olan izolatlarda ise 200 ve üzeri piknit oluşumunu bildirmişlerdir. *Phomopsis* spp.'in telemorfik grubunda yer alan *Diaporthe perijuncta*'dan izole edilen *Diaporthe RNA Virus* (DaRV)'ü fungusun sporulasyonunu ve pigmentasyonunu farklı miktarlarda azalttığı Moleleki vd. (2003) tarafından bildirilmiştir. Daha sonra yine *D. perijuncta* izolatlarından izole edilen *Diaporthe RNA virus 1* (DRV1) *in vitro* koşullarında *D. ambigua* ve *Phomopsis* spp. izolatlarına aktarılması ile dsRNA içeren *D. ambigua* izolatında piknit ve askospor oluşumu dsRNA içermeyen izolata göre önemli miktarda azalırken dsRNA içeren *Phomopsis* sp. izolatının piknit oluşumunda herhangi bir azalma gözlenmemesi (Moleleki vd., 2011) bu çalışma ile benzerlik göstermiştir. Shamsi vd. (2019) domatestede hastalığa neden olan *Alternaria alternata* etmeninden izole edilen *Alternaria alternata botybirnavirus 1* (AaBbV1) mikovirüsün dsRNA negatif ve pozitif fungal izolatlar arasında morfolojik olarak herhangi bir farklılıklar gözlenmediğini ve bu mikovirüs fungus konucusunda asemptomatik

enfeksiyona yola açabileceğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada da, Elliston, (1985) ve Moleleki vd. (2011) nin çalışmalarındaki gibi dsRNA pozitif *P. viticola* izolatları arasında belirli sayılarda farklı piknit oluşumu saptanmıştır.

Hipovirüent izolatlarda mikovirüsün sporulasyon sırasında konidilere dikey taşınımı hypovirülensliğin doğada yayılması açısından son derece önemlidir (García-Pedrajas vd., 2019). Mikovirüs dikey olarak konidiye taşınmadığı durumda, sporulasyon sırasında konidilere hipovirüent özellik geçmez ve bu durumda konidilerden oluşan bireyler mikovirüsten ari olarak virüent formda gelişirler böyle bir durum kestane kanseri etmeni *C. parasitica*'nın hipovirüent izolatlarında sıklıkla karşılaşılan bir durumdur (García-Pedrajas vd., 2019). Aydın ilinde kestane alanlarından elde edilen dsRNA pozitif bir *C. parasitica* izolatından elde edilmiş 10 tekspor izolatın hiçbirisinde dsRNA bulunmamıştır (Erincik vd., 2008). Bu çalışmada ise, seçilen 50 dsRNA pozitif *P. viticola* izolatında toplam 500 adet tek spor izolatı elde edilmiş ve bu izolatlardan 101 izolatta dsRNA saptanmıştır. Erincik vd. (2018) yürütmüş olduğu bir TÜBİTAK projesinde (TOVAG 114O403) toplam 33 dsRNA pozitif *C. parasitica* izolatından dikey taşınım testiyle elde etmiş olduğu 330 adet dsRNA pozitif *C. parasitica* izolatında dsRNA'nın dikey geçiş performansı %20-%100 arasında değiştiğini rapor etmiştir (Erincik vd., 2016). Bu çalışmada ise 50 dsRNA pozitif *P. viticola* izolatından dikey taşınım testiyle toplam 500 adet dsRNA içeren izolatlar elde edilmiş ve izolatlar arasında dsRNA'nın dikey geçiş performansının %0-%100 arasında değiştiği saptanmıştır. Ayrıca dsRNA pozitif *C. parasitica* izolatlarını dikey taşınım performansı ile ilgili ifade edilen bu bulgulara benzer bulgular *C. parasitica* ile yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir (Elliston, 1987; Garbelotto vd., 1992; Hillman ve Suzuki, 2004; Lin vd., 2007). *C. parasitica*'nın hipovirüent izolatlarında dikey taşınım oranı A. B. D.'inde yürütülen iki çalışmada %2-18 (Elliston, 1987) ve %71-100 (Lin vd., 2007), İtalya da yapılan bir çalışmada %65 (Garbelotto vd., 1992), arasında değiştiği bildirilmiştir. Bazı funguslarda saptanan mikovirüsler *C. parasitica*'da olduğu gibi farklı oranlarda (%3-%100) dsRNA'nın konidilere dikey taşınımı olduğu rapor edilmiştir (Ihrmark vd., 2002; Lemus-Minor vd., 2019 ve Wu vd., 2007). Nitekim Ihrmark vd. (2002) iki dsRNA içeren *Heterobasidion annosum* fungal izolatın birinde mikoviral dsRNA'nın dikey taşınım performansı %3 ve diğerinde ise %55 olduğunu ifade etmişlerdir. *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* de iki hipovirüent izolatın birinin dikey taşınım performansı %4 bulunurken diğerinin %100 olarak saptanmıştır (Lemus-Minor vd., 2019). Bu çalışmada *P. viticola* izolatına ait mikoviral dsRNA'nın %0-%100 arasında değişen dikey geçiş performansının

%3-%100 olan Lemus-Minor vd., (2019) ın dikey geçiş performansına oldukça yakın olduğu belirlenmiştir. Wu vd. (2007) hipovirulent *Botrytis cinerea* izolatından elde edilen toplam 94 tek spor izolatın 75 ninde dsRNA %79,8 dikey geçiş performansı gösterir iken 19 izolatın %20,2 sinin dikey geçiş yapmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise, Wu vd. (2007) nun çalışmasının tam tersi olarak elde edilen toplam 500 tek spor izolatın 101 ninde %20,2 dsRNA dikey geçiş performansı gözlemlenirken 399 izolatta %79,8 dikey geçiş gözlemlenmemiştir. İzolatlar arasındaki dikey geçiş farklılığı mikovirüs partiküllerinin konukçu fungusun hücrelerindeki birikme oranlarındaki farklılıktan kaynaklanmış olabileceği araştırıcılar tarafından bildirilmiştir (Lin vd., 2007; Suzuki vd., 2002). Bu çalışmada elde edilen bulgularda da elektroforezde dsRNA profili en belirgin olan izolatlarda (841Ku, 1216Na, 889G, 861, 780Se, 1091B, 1098B, 1061B, 903M, 962M, 961M ve 1027K) dikey geçiş performansı daha iyi (%40-100) bulunmuş, zayıf profil verenlerin (799Se, 910M, 1080B, 809Ku, 847Ku, 843Ku ve 830Ku) ise dikey taşınım oranı düşük (%0) olarak saptanmıştir. dsRNA'nın dikey geçişinin gözlemlenmediği dsRNA içeren *P. viticola* izolatları, çalışmanın diğer aşamalarında yapılacak virlenslik testlerinde hipovirulent özellikte bulunsalar dahi doğada biyolojik ajan olarak kullanılma olanağı bulunmamaktadır. Çünkü bu çalışma ile geliştirilecek hipovirulent izolatların doğaya spor süspansiyonu formulasyonu halinde uygulanacağı öngörülmektedir. Konidiye geçişi zayıf olan veya geçiş olmayan bir mikoviral dsRNA'nın spor süspansiyon halinde doğaya uygulanması sonrasında uygulanan alanlarda oluşacak bireyler hipovirulent değil virulent olacaktır. Böyle bir uygulama hastalığı kontrol etmekten çok şiddetinin daha da artmasına neden olacaktır. Bu da istenmeyen bir durumdur ve çalışmanın amacına ters düşmektedir. Bu çalışmada hipovirulent izolat seçimindeki yaklaşım Prof. Dr. Ömer ERİNCİK tarafından yürütülen 114O403 nolu kestane kanseri projesinde de kullanılmıştir. Nitekim dikey taşınımı %100 olan hipovirulent izolatlar biyolojik ajan olarak seçilerek arazi çalışmalarında değerlendirilmiş ve son derece başarılı kanser iyileşmeleri elde edilmiştir (Erincik vd., 2018). Bu çalışmanın ana hedefi olan lkolun biyolojik mücadelesinde kullanılabilecek hipovirulent izolat setinin oluşturulmasına katkı sağlamayacağı düşünülerek, dsRNA dikey geçişi olmayan *P. viticola* izolatları virlenslik testleri ve yatay taşınım testlerine alınmamasına karar verilmiş ve çalışmaya bu doğrultuda devam edilmiştir.

dsRNA pozitif *P. viticola* izolatlarının virlenslik belirleme çalışmalarında yukarıda ifade edildiği gibi dsRNA'nın dikey geçiş yapmadığı *P. viticola* izolatlarının virlenslik testlerine alınmaları gereksiz bulunmuş ve dikey taşınım test sonucunda belirlenen toplam

12 adet dsRNA pozitif izolat (841Ku, 1216Na, 889G, 861Ç, 780Se, 1091B, 1098B, 1061B, 903M, 962M, 961M ve 1027K) asma fidanları üzerinde virülenslik testine alınmıştır. Bölüm 4.7’de anlatılan virülenslik testleri sonucunda dsRNA pozitif izolatlar arasında virülenslik farklılıkları saptanmıştır. Bu virülenslik farklılıkların dsRNA içeren *C. parasitica* izolatları ile yapılan virülenslik testlerinde de meydana geldiği rapor edilmiştir (Erincik vd., 2018; Chung vd., 1994; Ringling vd., 1989; ve Zamora vd., 2014). Ringling vd. (1989) test ettikleri hipovirüent *C. parasitica* izolatlarında 7 ile 45 cm² arasında kanserlerin oluştuğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Zamora vd. (2014) hipovirüent izolatların kestane dalları üzerinde farklı büyüklükte lezyonlar oluşturduklarını bildirilmişlerdir. Erincik vd. (2018) kesilmiş kestane dallarında yaptıkları virülenslik test sonucunda toplam 187 dsRNA pozitif *C. parasitica* izolatının dal üzerinde oluşturdukları ortalama lezyon uzunluğunun 12-90 mm arasında değiştiğini ve toplam 86 izolat düşük virülenslik, 69 izolat orta virülenslik, 37 izolat yüksek virülensli ve 5 izolatta çok yüksek virülenslik olduğunu tesbit etmişlerdir. Böylece dsRNA pozitif izolatları arasında virülenslik farklılıklarının olduğunu ve bu farklılığın fungusun genetik yapısından veya dsRNA virüsünün genetik yapısından ve her iki faktörün interaksiyonundan ortaya çıkabilecek öngörülebilir bir durum olduğunu ifade etmişlerdir. Bu çalışmada da, asma fidanlarının yaprak ve dalları üzerinde yapılan virülenslik testinde hastalık şiddeti yapraklarda 7,6-36,7 ve dallarda %0,5-6,6 arasında değişmiş olup ve 10 izolatta yaprak ve sürgünde düşük hastalık şiddeti saptanırken iki izolatta orta ve yüksek virülenslik şiddeti saptanmıştır. dsRNA içeren *P. viticola* izolatları arasında virülenslik şiddeti yönünden farklılıkların olduğu belirlenmiştir. dsRNA içeren izolatlar arasında ortaya çıkan virülenslik farklılıklarının çeşitli nedenleri olabilir. *P. viticola* dsRNA içeren izolatların virülenslik farklılıkları ilk kez bu çalışmada ele alınmıştır. Ancak *P. viticola* dsRNA içeren izolatların hangi virüs familyası ve (genus) türüne ait olduğu henüz bilinmemektedir. Dikey taşınım performansına göre seçilen 12 dsRNA içeren izolatta bulunan her bir dsRNA nın farklı virüs türlerine ait olabileceği gibi bir virüsün farklı alt tipleri de olabilirler. Nitekim mikovirüsler konusunda üzerinde en çok çalışılmış *C. parasitica*’da yaygın olarak saptanmış CHV1, CHV2, CHV3 ve CHV4 olmak üzere dört farklı mikovirüsün varlığından söz edilmekte olup bunların içinde hipovirülenslik özelliği en güçlü olan CHV1 olarak kabul edilmekte ve biyolojik mücadelede bu tür kullanılmaktadır (Nuss, 2000). Ayrıca CHV1’in kendi içinde *C. parasitica*’nın virülensliğini farklı oranda etkileyen dört farklı alt tipi’nin varlığı da bildirilmiştir (Bryner vd., 2012). Bu çalışmada dsRNA pozitif *P. viticola* izolatları arasında görülen bu virülenslik ile ilgili

varyasyonunun virüs türü ile ilişkisinin olup olmadığının belirlenmesi için gelecekte saha ve labratuvar çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

dsRNA pozitif *P. viticola* izolatlarında belirlenen 5 vejetatif uyum (vc) grubunda grup 2'nin daha çok yaygınlık göstermesi Ege Bölgesinde *P. viticola*'nın vejetatif uyum grup çeşitliliğinin düşük olduğunu göstermektedir. *P. viticola*'da vejetatif uyum üzerine bugüne kadar yapılmış bir çalışma olmayıp dünya üzerinde fungusun kaç vc grubu olduğu da bilinmemektedir. Bununla birlikte *P. viticola*'da vejetatif uyumsuzluk sisteminin kaç gen (*vic* genleri) tarafından yönetildiğinin bilinmemesi bu fungusta maksimum kaç vc grubun olabileceği konusunda bir hipotezi mümkün kılamamaktadır. Örneğin *C. parasitica* da vejetatif uyumsuzluk her biri iki alleli 6 gen tarafından yönetildiği bilinmekte ve bunların kombinasyonu 64 farklı vc grubun oluşmasına sebep olmaktadır (Choi vd., 2012; Cortesi ve Milgroom, 1998). *P. viticola*'nın heterotallik bir fungus olması göz önünde bulundurulduğunda (Udayanga vd., 2012) eşeyli üremesi doğada sınırlı olacağından vejetatif uyum genlerinin rekombine olma olasılığı da düşüktür. Nitekim Hosseinalizade vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, Ege Bölgesinin bağ alanlarından izole edilen 150 *P. viticola* izolatının hepsinin *MAT1-2-1* olduğu ve Ege Bölgesinde *MAT-2*'nin yaygın bir tip olduğu saptanmıştır. Ege Bölgesinde *MAT-1*'in yoksunluğu *P. viticola*'nın eşeysiz çoğalmasına neden olmaktadır. Ayrıca vc grup çeşitliliğinin düşük olması da gelecekte bunun böyle kalma olasılığının yüksek olması sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Ancak yine de kesin kanıların oluşması için *P. viticola*'nın biyolojisinin ülkemizde daha kapsamlı olarak ele alınıp çalışılması gerekmektedir.

Ege Bölgesinde *P. viticola*'nın vc grup çeşitliliğinin düşük olması dsRNA'nın doğada yatay taşınımını kolaylaştıracak bir ortamın oluşmasını sağlamaktadır. Nitekim Kestane Kanseri etmeni *C. parasitica*'dan çok iyi bilinmektedir ki vc grup sayısı düşük olan popülasyonlarda bireylerin aralarında anastomosis yapma olasılığının yüksek olmasından dolayı hipovirüslenslik doğada kendiliğinden daha hızlı yayılmakta ve biyolojik mücadele başarılı olmaktadır (Liu ve Milgroom, 1996; Perlerou ve Diamandis, 2006; Sotirovski vd., 2004). Bu nedenle hipovirüslenslik temelli biyolojik mücadele uygulamalarında patojenin vejetatif uyum gruplarının mutlaka bilinmesi önem taşımaktadır.

dsRNA virüslerinin bir bireyden diğerine yatay taşınımını biyolojik mücadelenin başarısında rol oynayan en önemli faktörlerden birisidir (Cortesi vd., 2001). Çünkü bitkide hastalığa neden virüsent bir bireyin hipovirüente dönüşerek hastalık yapamaz hale gelmesi bu yolla olmaktadır (Nuss, 2005). Doğada yürütülen yapay hipovirüent ırk uygulamalarının

amacı budur. Bu aşama biyolojik ajanın patojene hipovirülensliği aktardığı ve ardından bitkide iyileşmenin olmasının beklendiği evredir. Geçmişten bugüne kadar dsRNA mikovirüslerinin yatay taşınım ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Erincik vd., 2018; Brusini vd., 2017; Papazova-Anakieva vd., 2008; Wu vd., 2007 ve Zhai vd., 2016). Bir hipovirüent *Botrytis cinerea* ve 21 virüent izolat arasında yapılan yatay taşınım testinde sadece bir izolatta dsRNA'nın geçişi meydana geldiği ve bu virüent izolatın hipovirüent izolata dönüştüğü Wu vd. (2007) tarafından rapor edilmiştir. Zhai vd. (2016) *Botryosphaeria dothidea RNA virus 1* (BdRV1) hipovirüent izolatın 88 dsRNA içermeyen virüent *B. dothidea* izolatına dsRNA'nın yatay taşınma kapasitesini ölçmüşlerdir. Çalışma sonucunda 9 izolata yatay taşınma gerçekleştiğini ve bu izolatların hipovirüente dönüştüğünü ifade etmişlerdir. Bu çalışmada ise, Wu vd. (2007) ve Zhai vd. (2016)'nin çalışmalarının aksine 12 dsRNA içeren *P. viticola* izolatı ile 3 dsRNA negatif *P. viticola* izolatları arasında yapılan yatay taşınım sonucunda 2 izolat (903M ve 1027K) dışında tüm izolatlarda dsRNA'nın yatay taşınım yaptığı saptanmıştır. Erincik vd. (2018) yatay taşınım testinde donör izolat ile alıcı izolat aynı vc grubunda olduklarında CHV-1 izolatlarının hepsi donör izolattan alıcı izolata yatay olarak başarılı bir şekilde taşınabildiğini ve izolatlar arasında yatay taşınım hızları yönünden farklılıkların olduğu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da, benzer şekilde dsRNA'nın yatay taşınımında donör izolat ile alıcı izolat aynı vc grubunda olan 8 izolatın 6'sında donör izolattan alıcı izolata dsRNA'nın yatay taşınım gerçekleşmiş ve izolatlar arasında yatay taşınımın kapasitesi ve hızları yönünden farklılıklar bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada donör izolat ile alıcı izolat farklı vc grubunda olan 961M ve 962M dsRNA pozitif ve 884Ç dsRNA negatif *P. viticola* izolatları arasında yatay taşınım ile dsRNA'nın geçiş yaptığı saptanmıştır.

Yukarıda anlatıldığı gibi yatay taşınımında en önemli koşul vejetatif uyum sonucu hif birleşmesi ve anastomosiz ile dsRNA'nın aktarılmasıdır. Çalışmada test edilen bütün izolatlarda değişen oranlarda bir yatay taşınım oranının olduğu görülmektedir. Bu orandaki farklılıklar virüsün kendinden kaynaklandığı gibi fungusun genetik yapısından da kaynaklanabilmektedir (Biella vd., 2002; Brusini ve Robin 2013; Glass vd., 2000 ve Papazova-Anakieva vd., 2008). Ayrıca bu çalışmada yapılan vejetatif uyum tiplerini belirlenmesi sonucunda 962M ve 961M izolatlarının her biri ayrı bir vc grubunda yer almıştır. Çünkü bu izolatlara vejetatif uyum sağlayacak dsRNA negatif izolat doğal olarak izolat kolleksiyonunda bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu iki izolat için tek spor izolatlarından dsRNA negatif izolatlar elde edilme yoluna gidilmiş ve toplam 40 adet tek

spor izolatu elde edilerek dsRNA analizi yapılmıştır. Fakat analiz sonucunda tek spor izolatların hepsi dsRNA pozitif çıkmıştır. Bu nedenle bu iki izolatın yatay taşınım testi yapılması için en çok izolatların yer aldığı vc grubundan dsRNA negatif izolat seçilmiştir.

Mikovirüsler üzerinde yapılan bazı çalışmalarda dsRNA'nın farklı vc gruplar arasında belirli oranda geçiş yaptığı bilinmektedir (Hamid vd., 2018; Liu ve Milgroom, 1996; Wu vd., 2017 ve Yaegashi vd., 2013). Liu ve Milgroom, (1996) *Cryphonectria hypoviruses* CHV1-EP43 ve CHV2-NB58 ile enfekte olan *C. parasitica* izolatın farklı vc tipleri arasında hypovirüsün yavaş ve düşük seviyede geçiş yaptığını saptamışlardır. Yaegashi vd. (2013) elma ağacın köklerine aralarında vejetatif uyumsuz olan dsRNA içeren ve dsRNA içermeyen iki *Rosellinia necatrix* izolatını inokule etmişler ve 2 ila 3 yıl sonra, inokule edilen ağaçlarda dsRNA içeren *R. necatrix* izolatlarını izole etmişlerdir. Wu vd. (2017) *Sclerotinia sclerotiorum mycoreovirus 4* (SsMYRV4) ile enfekte olan *S. sclerotiorum* izolatu dsRNA'yı arasında vejetatif uyumu olmayan bir virüent izolatına hissel anastomozis ile aktardığını ve virüent izolatu hipovirüente dönüştürdüğünü bildirilmiştir. Daha sonra Hamdi vd. (2018) ise, *Sclerotinia sclerotiorum deltaflexivirus 2* (SsDFV2) mikovirüsü vejetatif uyumsuzluğu olan iki *S. sclerotiorum* (hipovirüent ve virüent) izolatın arasında anastomozis yoluyla geçiş yaptığını rapor etmişlerdir. Aynı vc gruplar arasında çoğunlukla yatay taşınım sorunsuz gerçekleşmektedir. Bunun dışında birbirine yakın genetik yapıya sahip vc gruplar arasında az da olsa yatay geçiş olmakta, ancak birbirine uzak gruplar arasında yatay geçiş gerçekleşmemektedir. Bu çalışmada 962M ve 961M izolatları farklı vc grupta olmalarına rağmen 884Ç izolatu ile eşleştirildiklerinde dsRNA'nın belirli oranda yatay olarak taşınabildiği görülmüştür. Zhai vd. (2016) ve Erincik vd. (2018) in çalışmalarında olduğu gibi *P. viticola*'da da farklı vc gruplar arasında dsRNA'nın taşınabileceği ortaya konulmuştur.

Yatay geçiş performansı iyi olan izolatların biyolojik ajan olarak başarılı olmaları beklenen bir durumdur. Nitekim Deng vd. (2009) Çin'de yaptıkları bir çalışmada test ettikleri CHV1 virüsleri arasında yatay taşınım kapasitelerinin farklılıklar gösterdiğini ve kapasitesi yüksek olanların biyolojik mücadelede daha etkili sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. CHV1 virüsün üzerinde Kuzey Çin'de yapılan başka bir çalışmada yüksek yatay geçiş potansiyeline sahip bir hipovirüent izolatın tüm genom analizi yapılarak diğer hipovirüent izolatlar ile karşılaştırılmış ve gen diziliminin ve protein yapısının diğerlerine göre oldukça farklı olduğu bildirilmiştir (Du vd., 2017). Daha önceki çalışmaları gözönünde bulundurulduğunda, bu çalışmada da kullanılan dsRNA izolatlarının genetik yapısının yatay

taşınımı etkilemiş olabileceği düşünülebilir. Ancak tüm bunların gelecekte yapılacak çalışmalar ile açıklığa kavuşturulması gerekecektir. Bu çalışmada iki farklı vc grupları arasında yapılan yatay test sonuçları bu iki izolattaki (961M ve 962M) dsRNA'nın vc grubu farklı bir alıcı izolata yatay olarak taşınabildiğini göstermiştir. Böyle bir özelliğe sahip izolatlarda, dsRNA'nın doğada fungal bireyler arasında yayılma ve buna bağlı olarak biyolojik kontrol ajanı potansiyellerinin yüksek olması beklenmektedir.

Yatay test sonucunda dsRNA pozitif döndürülen virulent *P. viticola* izolatlarında dsRNA virüslerin hipovirulenslik üzerindeki etkisi (2. aşama virulenslik testleri) asma fidanların üzerinde yapılmış ve test sonucunda dsRNA negatif 3 izolat ile bunların dsRNA pozitif *P. viticola* izolatları kullanılarak yatay taşınım ile dsRNA pozitif döndürülmüş formları arasında sürgün ve yaprakta hastalık şiddeti yönünden farklılıklar bulunmuştur. Genel olarak dsRNA'ların konukçusu izolata geçtikten sonra onun virülensliğini değişen oranlarda azalttığı görülmüştür. Hipovirülensliğe neden dsRNA virüslerinin ilk saptandığı fungal patojen olan kestane kanseri etmeni *Cryphonectria parasitica* da dsRNA pozitif izolatlarda düşük virülenslik çok yaygın olarak görülen bir durumdur. Nitekim bu virüsler hastalığın biyolojik kontrolünde başarılı bir şekilde kullanılmaktadırlar (Erincik vd., 2018). Ancak her dsRNA virüsü veya izolatının *C. parasitica* da hipovirülensliğe neden olmayacağı da birçok araştırmada bildirilmiştir (Milgroom ve Cortesi 2004; Nuss ve Koltin 1990).

Ülkemizde, Gürer vd. (2001) 14 *C. parasitica* hipovirulent izolatu kestane dalında küçük lezyonlar (2-11 cm²) oluştururken 9 hipovirulent izolatu virulent izolatına benzer büyüklükte (12-18,5 cm²) lezyonlar oluştuğunu bildirmişlerdir. Hipovirulent *C. parasitica* izolatların virülensliği ile ilgili yapılan başka bir çalışmada hipovirulent izolatlarının virülensliğe etkisinin %38-100 arasında değiştiği rapor edilmiştir (Akıllı vd., 2013). Bu çalışmada da, toplam 10 adet dsRNA pozitif döndürülmüş formun 9'unda dsRNA negatif forma göre düşük hastalık şiddeti gözlemlenirken 1 izolatta (1215Na/1216Na) hem sürgünde hem de yaprakta dsRNA negatif izolata yakın hastalık şiddeti saptanmıştır. Test edilen döndürülmüş dsRNA pozitif formlarda virülensliğin yapraklarda %12,21-49,37 ve sürgünlerde %4,25-16,33 arasında azaldığı saptanmıştır. *Phomopsis* spp.'in teleomorfik grubunda yer alan bazı fungal etmenlerin izolatları arasında virülenslik yönünden farklılıkların olduğu görülmüştür (Moleleki vd., 2003 ve Moleleki vd., 2011). Moleleki vd. (2003) *Diaporthe perijuncta* nın CMW3407 nolu izolatından izole edilen *Diaporthe RNA Virus* (DaRV)'ünü *in vitro* koşullarında dsRNA içermeyen CMW8597-WT nolu virulent

izolatına yatay geçiş ile transfer ederek dsRNA içeren CMW8597-DaRV izolatı elde etmişlerdir. Elde edilen bu 3 izolatın virölenslik şiddetini yeşil elma üzerinde patojeniste testi yaparak belirlemişlerdir. Test sonucunda virölent (CMW8597-WT) ve dsRNA pozitif dnüşürölmüş virölent (CMW8597-DaRV) izolatlar arasında virölenslik yönünden farklılık olmadığı belirlenmiştir. dsRNA içeren orijinal CMW3407 izolatında (DaRV) hastalık şiddeti yönünden önemli bir azalma olduğu gözlenmiştir. Moleleki vd. (2003) nin bu çalışmasında da göröldüğü üzere mikoviral dsRNA'nın virölensliğe etkisi fungusun genetik yapısına göre değişmektedir. Bu çalışmada ise tüm dsRNA izolatları virölenslikte azalmaya neden olmuştur. İzolatlar arasında virölenslik azalmalarında meydana gelen bu farklılıklar yatay taşınımında dsRNA transfer edilirken farklı sitoplazmik organellerin ve nükleer genetik bilgilerin de transfer olabildiği yatay geçiş testlerinde kullanılmak üzere seçilen alıcı virölent izolat ile verici hipovirölent fungal izolatın ve mikoviral dsRNA'nın genom yapılarından kaynaklanan bir durum olabileceği ifade edilmiştir (Moleleki vd., 2003). Bu çalışmada ise, kullanılan 3 virölent ve 10 dsRNA pozitif dnüşürölmüş izolatlar arasında saptanan virölenslik farklılıklarının Moleleki vd. (2003)'nin ifade ettiği gibi fungusun ve mikoviral dsRNA'nın genom yapılarından kaynaklanan bir durum olduğu söylenebilir. *Diaporthe* üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise, Moleleki vd. (2011) *D. perjuncta* izolatından elde ettikleri *Diaporthe RNA virüs 1* (DRV1) mikovirüsünü yine *in vitro* koşullarında *D. ambigua*, *Phomopsis* sp. ve *D. perjuncta* izolatlarına yatay taşınım ile transfer etmişler ve elma dalında virölenslik testini yaparak izolatların virölensliğini belirlemişlerdir. *D. perjuncta* izolatları elma dallarında yüzeysel lezyonlar oluşturarak hastalığın virölensliğinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. *D. ambigua* izolatları ise, dal üzerinde küçük lezyonlar oluşturarak %51 ile %59 oranında virölenslikte azalma gözlemlenirken *Phomopsis* sp. izolatında daha küçük lezyonlar oluşturarak %32 oranında virölenslikte azalma olduğu saptanmış ve izolatlar arasında virölenslik yönünden farklılıkların olduğunu tesbit edilmiştir (Moleleki vd., 2011). Bu çalışmanın sonuçlarına göre ise; 884 dsRNA negatif *P. viticola* izolatın, dsRNA pozitif 962M, 961M, 780Se, 889G ve 861 izolatlar ile yatay taşınım ile dnüşürölmüş dsRNA pozitif formları asma fidanlarının hem yapraklarında (%26,32-49,37) hem sürgünlerinde (%14,11-16,33) düşük virölenslik göstermişlerdir. Dolayısıyla bu izolatlarda (962M, 961M, 780Se, 889G ve 861) bulunan dsRNA'nın hipovirölent özellikte olma ihtimallerinin olduğu ve biyolojik mücadele için ümitvar izolatlar olarak kabul edilebileceği düşünölmektedir. Çalışmada kullanılan diğer bir dsRNA pozitif izolat olan 1216Na diğer dsRNA pozitif izolatlardan farklı olarak düşük virölenslik göstermemiştir. Elde edilen bulėulara göre bu izolat (1216Na)

hipovirulent etkisinin düşük olduğu ve biyolojik mücadelede kullanmak için uygun bir izolat olmadığı yönünde değerlendirilmiştir.

5.3. *Phomopsis viticola*'dan İzole Edilen dsRNA'ların Genom Dizilenmesi ve Biyoinformatik Analizleri

Yapılan tüm biyolojik testlerin sonucunda en iyi performansı göstermiş olduğundan dolayı biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılma potansiyeli olan toplam 6 dsRNA pozitif *P. viticola* izolatı YND çalışmaları için seçilmiştir. Genellikle yeni mikoviral dsRNAların tüm genom dizi analizinde başlangıç materyali olarak fungal izolatlardan elde edilen dsRNA (Hrabakova vd. 2017; Zhang vd., 2015), total RNA, küçük RNA (Kocanova vd., 2020)'lar kullanılabilir. Bu çalışmada ise tüm genom dizi analizi için başlangıç materyali olarak dsRNA izole edilmiştir. Bu dsRNA diğer çalışmalarda (Hrabakova vd. 2017; Peyambari vd., 2014 ve Zhang vd., 2015) olduğu gibi *P. viticola* izolatlarından dsRNA izolasyonunda Morris ve Dodds (1979) ve Valverde vd. (1990) yöntemleri modifiye edilerek uygulanmıştır. Zhang vd., (2015) ve Peyambari vd., (2014)'nin çalışmalarında da olduğu gibi mikovirüsün RNA'sından cDNA kütüphanesi rastgele hexadeoxynucleotide primerleri kullanarak dizilenip ve cDNA ürünlerinin hepsi vektörde klonlanarak genom dizi analizleri yapılabilmektedir. İran'da şeker kamışında hastalığa neden olan *Cytospora sacchari* etmenininin 125 nolu izolatında CF11 selüloz kromatografisi kullanarak yaklaşık 1.85, 1.65 ve 1.27 kb lık 3 segmentli mikoviral dsRNA Peyambari vd. (2014) tarafından izole edilmiştir. Bu çalışmada da dsRNA analizleri CF11 selüloz kromatografisi kullanarak izole edilmiş, ancak her iki örnekte Peyambari vd. (2014) saptanmış oldukları 3 segmentli dsRNA bandlarından daha büyük (~2,5 ve 9,4 kb) iki segmentli dsRNA bandları saptanmıştır. Peyambari vd. (2014) rastgele hexamer primerler ile klonlama yaparak cDNA kütüphanesi oluşturmuşlar ve sekans analizleri yapmışlardır. Sekans sonuçları Geneious software version 6.1.2 programını kullanarak analiz edilip, genom dizilerinden spesifik primerler tasarlayarak sekans yapmışlar ve sonuçları NCBI veri tabanında BLASTn, BLASTx ve BLASTp yaparak kayıtlı olan diğer mikovirüsler ile karşılaştırmış ve RdRp proteinleri *Partitiviridae* familyasına %67-76 oranında özdeşlik gösterdiğini ve tek bir ORF olduğunu saptamışlardır. Ardından bu yeni mikovirüsü geçici olarak *Cytospora sacchari partitivirus* (CsPV) olarak isimlendirip kısmi nükleotid dizisini GeneBank'ta erişim no

KF697164 olarak kayıt etmişlerdir. Bu çalışmada da *P. viticola* izolatlarından elde edilen dsRNA'nın tüm genom dizi analizi YND tekniğinin Illumina platformu kullanarak yapılmıştır. Sekans sonucunda 961M de 3, 962M'dsRNA larında 5 ORF saptanmış ve NCBI da BLAST sonucunda RdRp proteinleri çok düşük oranda (%20) *Cytospora sacchari partitivirus* (CsPV) ile özdeş olduğu tesbit edilmiş olduğu için Peyambari vd. (2014)'nin çalışmasında saptanan mikovirüsle aynı familyanın üyesi olamayacağı belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada elde edilen ham DNA dizi verileri ilk önce NCBI SRA da PRJNA723482 (962M) ve PRJNA722503 (961M), ardından biyoinformatik analizlerin verileri Banklt MZ050804 ve MZ074321 (961M), MZ050805, MZ050806 ve MZ050807 (962M) Accession Number'ı ile kayıt altına alınmıştır.

Çinde buğday tarlalarında *Fusarium* spp. ile enfekte olan buğday örneklerinden izole edilen SX63 nolu fungal izolatın *Fusarium poae* etmeni olduğu Wang vd. (2016) tarafından PCR analizleriyle tesbit edilmiştir. Daha sonra bu izolattan Valverde vd. (1996)'nin yöntemini kullanarak 9 ve 2,5 kb'lık iki farklı dsRNA segmentini (L-dsRNA ve S-dsRNA) izole etmişler ve DNase I ile S1 nükleaza enzimlerini kullanarak bu iki dsRNA'nın gerçek bir dsRNA bandı olduğunu doğrulamışlardır. Bu çalışmada da izole edilen *Phomopsis* spp. izolatları spesifik primerler kullanarak *P. viticola* oldukları saptanmış ve Morris ve Dodds (1979) ile Valverde vd. (1990) tarafından geliştirilen yöntemler modifiye edilerek iki segmentli yaklaşık 2,5 ve 9,4 kb lık dsRNA izole edilmiş ve bu dsRNA'nın Wang vd. (2016)'nin izole ettikleri dsRNA ile büyüklük olarak birbirine yakın olduğu saptanmıştır. Wang vd. (2016) L-dsRNA bandını agaroz jelden keserek saflaştırılmışlar ve cDNA kütüphanesini rastgele primerler ile klonlayarak Sanger DNA dizi analizi yapmışlardır. Ardından sekans sonuçlarını Computer-assisted sequence assembly programını kullanarak analiz etmişlerdir. Sekans analiz sonucunda L-dsRNA'nın, birbirinin üstüne gelen iki dsRNA segmentinin yani ikili bir bileşeni olduğunu tesbit edilmiş ve L-dsRNA, L-1 ve L-2 ismini vermişlerdir. L-1 ve L-2 dsRNA'nın tam sekans uzunluğu sırasıyla 9,5 ve 9,4 kb olduğu belirlenmiştir. Daha sonra mikovirüs dsRNA L-1 ve L-2 geçici olarak sırasıyla *Fusarium poae dsRNA virus 2* (FpV2) ve *Fusarium poae dsRNA virus 3* (FpV3) adını vermişlerdir. Bu çalışmada ise, dsRNA izolasyonu sonrası enzim uygulanmayan örneklerden TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero H/M/R kitini kullanarak cDNA kütüphanesi hazırlanmıştır. Ardından YND tekniklerini kullanarak sekans analizleri yapılmış ve *de nova* assembly analizi ile virüs genomunun dışındaki sekansı yapılan diğer genomlardan temizlenmiştir. Böylece dsRNA izolasyonu sonrası enzim uygulanmayan

örneklerle yapılan dizilemenin *de nova* assembly analizi ile telafisi yapılmıştır. DNA dizileme sonucunda 961M'den 2 kontig (dsRNA-S 2,5 dsRNA-L 9 kb) oluşurken, 962M'den 3 kontig (dsRNA-S1 2,5 dsRNA-S2 2,5 dsRNA-L 9 kb) oluşmuş ve dsRNA-S kontigleri baz uzunluğu aynı olduğundan dolayı bunlar Wang vd. (2016)'nin ifade ettiği gibi birbirinin üstüne gelen iki dsRNA segment olabilir. DNA dizi okuma sırasında cihazda oluşan bazı faktörler nedeniyle de kontigler birleşmemiş ve iki ayrı kontig oluşmuş da olabilir.

Son yıllarda birçok araştırmacı yeni virüs ve mikovirüs dsRNAların tanımlanmasında Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing) tekniklerini kullanmışlardır (Hrabakova vd., 2017; Liu vd., 2019; Shamsi vd., 2019 ve Kocanova vd., 2020). Bu çalışmada da 961M ve 962M *P. viticola* izolatlarından izole edilen iki segmentli (~2,5-9,4 kb) dsRNA ların tüm genom dizi analizleri YND dizileme teknikleri kullanarak yapılmış ve Illumina platformunda çift-uç kütüphanesinden elde edilen 25.221.504 ve 34.337.890 okuma değerleri, Hrabakova vd. (2017) nin *P. longicolla* etmeninden izole edilen 2,8 kb boyutlarındaki dsRNA nın tüm genom dizi analizinde YND de Illumina platformunu kullanarak 30'un üzerinde kalite skoru ile yüksek kalite okuma olarak kabul ettiği 23 ila 24 milyon okuma değerlerinin üzerindedir. Hrabakova vd. (2017) nin saptamış oldukları yeni *Phomopsis longicolla RNA virus 1* (PIRV1) mikovirüsünün lineer genomu 2822 (nt) uzunluğunda ve G+C içeriği %54 iken bu çalışmada 961M izolatından 12141 (nt) lineer genom uzunluğu ile G+C içeriği %49,38 ve 962M nin ise, 14452 (nt) uzunluğuyla G+C içeriği %48,87 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen G+C % oranlarının Hrabakova vd. (2017)'nin değerlerine yakın olup yüksek kaliteli okumalar elde edilmiştir. *Trichoderma harzianum* izolatından sırasıyla 2,0 ve 1,5 kb'lık iki segmentli dsRNA Liu vd. (2019) tarafından tesbit edilmiştir. Ardından DNA sekans analizlerini Illumina HiSeq2500 platformunu kullanarak mikovirüsün tüm genomunu dizilenmiş ve sekans sonucunda dsRNA örneğinden dsRNA1 ve dsRNA 2 olarak isimlendirilen bu kontigler uzunluk olarak 961M ve 962M den daha kısa olmuştur.

Bu çalışmada 961M ve 962M nolu *P. viticola* izolatlarından dsRNAlar Morris ve Dodds, (1979) ve Valverde vd. (1990) yöntemlerini kullanarak izole edilmiş ve cDNA kütüphanesi ve DNA dizi analizleri Wang vd. (2019 ve 2020)'ın Çin'de susam bitkisinde kömür çürüklüğü hastalığına neden olan *Macrophomina phaseolina*'dan izole edilen total RNAlar TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero H/M/R kiti kullanarak cDNA kiti ile elde edilen cDNA ve yapılan YND teknikler ile aynı yöntemlerle yapılmış ve *de nova*

assembly yaparak Wang vd. (2019 ve 2020) gibi diziler filtrelenerek birleştirilmiş ve virüs genomuna benzer genomlar dışında başka diziler çıkartılmış, iki örnekten yaklaşık 2,5 ve 9 kb'lık toplam 961M için 2, 962M için 3 konting elde edilmiştir. Wang vd. (2019) ise bir totalRNA örneğinde fusagraviruslar benzer mikovirüsler tarafından kodlanan proteinlerle ilişkili iki varsayılan proteini kodlayan 9161 nt (9,1 kb) içeren uzun bir kontig tesbit etmişlerdir. Wang vd. (2020), aynı çalışmanın devamı olarak sekans sonucunda elde edilen ham okumaları farklı bir *de nova* assembly programı olan CLC Genomics Workbench'te (sürüm: 6.0.4) bitişik algoritmasını filtreliyerek temizlenmişler ve 12 totalRNA örneğinden sekans analizleri sonucunda toplam 40 kontig belirlemişlerdir. Shamsi vd. (2019) *P. viticola* için kullanılan benzer dsRNA izolasyonu yöntemini ve cDNA elde edilmesinde kullanılan aynı Illumina kiti kullanarak domatestte hastalığa neden olan *Alternaria alternata* izolatının YND sekans analizlerinin Illumina platformunda (HiSeq 2500, 100 bp single-end reads) Makrogen firması ile tüm genom DNA dizilenmesini yapmışlardır. Sekans sonucunda 961M ve 962M örneklerinden sırasıyla elde edilen 25.221.504 ve 34.337.890 okuma, Shamsi vd. (2019)'nin elde ettikleri toplam okumaya 30.684.321 yakın değerde olmuştur. Daha sonra Shamsi vd. (2019) çalışmalarında *de nova* assembly yaparak dizilerden toplam 7836 kontig (~1000-17.010 nt uzunluğunda) elde etmişler ve diğer kontigler çıkarıldıktan sonra virüs genomun dizisini benzer iki konting (konting-21 ve 114) elde etmişlerdir. Bu kontinglerde toplam 237,090 ve 146,884 okuma ile 5938 ve 5551 bp'lik uzunluklarında olduğu saptanmış ve bunlara dsRNA1 ve dsRNA 2 olarak adlandırmışlardır. Bu çalışmada da, *de nova* assembly analizlerin sonucunda 961M'de 36 ve 962M'de 87 konting elde edilmiş ve Shamsi vd. (2019)'nin yaptıkları gibi bu kontingler arasında virüsü genomuna benzer 961M den toplam 206,74 okuma ile 12,141 baz uzunluğunda (nt) 2 konting ve 962M den toplam 606,833 okumayla 14,452 baz uzunluğunda (nt) 3 konting tesbit edilmiş ve 961M kontiglerine dsRNA-L ve dsRNA-S ve 962M kontiglerine de dsRNA-L, dsRNA-S1 ve dsRNA-S2 isimleri verilmiştir.

Genellikle mikovirüs dsRNAlarda proteinleri kodlayan bölgelerin tesbit edilmesi için NCBI da kullanılan ORF Finder programı bu çalışmada da kullanılmış ve hypothetical protein ile RdRp proteinlerini kodlayan pozitif yönlü 2 (961M) ve negatif yönlü 5 (962M) ORF bölgelerin tesbit edilmiştir. Aynı şekilde Liu vd. (2019), *Trichoderma harzianum* dan, Wang vd. (2019) *M. phaseolina* dan izole edilen dsRNA'nın genom dizisinde RdRp (dsRNA1) ile hypothetical proteinlerini (dsRNA2) kodlayan pozitif sarmalı iki ORF (ORF1 ve ORF2) saptamışlardır. Wang vd. (2020) *M. phaseolina* dan izole edilen dsRNA'nın

genom dizisinde 40 kontig arasından seçilen 22, 116, 23 ve 110 kontiglerinden RdRp ve hypothetical proteinleri kodlayan iki ORF bölgesinin olduğunu bildirmişlerdir. Shamsi vd. (2019) *Alternaria alternata* dan izole edilen dsRNA nın genom dizisinde toplam 2 pozitif yönelimli ORF saptamışlardır. Wang vd. (2016) *Fusarium poae* dan izole edilen iki mikovirüsün DNAMAN Yazılımı (Lynnon Biosoft, San Ramon, CA, USA) programını ile yapılan genom dizi analizlerini NCBI da ORF Finder programını kullanarak hem *Fusarium poae dsRNA virus 2* (FpV2) hem de *Fusarium poae dsRNA virus 3* (FpV3)'de hypothetical ve RdRp proteinlerini kodlayan iki büyük, açık okuma çerçevesi (ORF1 ve 2) içerdiğini tesbit etmişlerdir.

Bu çalışmada 962M ve 961M tüm genomlarının ~9 kb'lık büyük bir kısmının protein dizileri NCBI veri tabanında BLASTp analizleri sonucunda *Fusarium poae dsRNA virus 2*, *Macrophomina phaseolina fusagravirus 1, 2, 3, 4 ve 5* mikovirüsleri ile en yakın benzerlik oranları göstermiş olduğundan dolayı her iki kontigin de mikovirüs olabileceğini ifade edilebilir. 962M ve 961M genomları ile yakın benzerlik saptanan mikovirüs dsRNAlarla ilişkiler aşağıda tartışılmıştır;

Wang vd. (2016) *Fusarium poae* dan elde edilen iki mikovirüsün hypothetical ve RdRp protein dizilerini NCBI da BLAST yaparak her iki dsRNA sınıflandırılmamış sekiz dsRNA virüsünün hypothetical protein (P1) düşük bir dizi benzerliği yüzdesine (%22-%49) sahip olduğunu saptamışlardır. Ayrıca FpV2'nin P1 dizisi dsRNA virüsü, *Papaya meleira virusu* (PmeV) ile dizi benzerlikleri olduğunu da ifade etmişlerdir. RdRp proteinleri ise, aynı dokuz sınıflandırılmamış virüs ile düşük bir dizi benzerliği (%28-%44) göstermişlerdir. Daha sonra ORF 2'de kodlanan RdRp proteinin amino asit dizilerinin çoklu hizalanmasında seçtikleri 10 mikovirüsün RdRp dizileri ile DNAMAN yazılımı programı kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. Böylece ORF2 de dsRNA virüslerinde RdRp'nin sekiz korunmuş motife (I-VIII) sahip olan korunmuş bir RdRp alanı içerdiğini saptamışlardır. Bu benzerliklerden dolayı FpV2 ve FpV3'ün bir dsRNA virüsü olduğunu ifade etmişlerdir. Filogenetik ağacı FpV2, FpV3 ve 33 seçilmiş RNA virüslerinin (*Totiviridae* ailesinin 14 üyesi, *Chrysoviridae* ailesinin dört üyesi, Phlegivirus cinsinin iki üyesi, tanımlanmayan dsRNA virüsleri ve *Megabirnaviridae* ve *Partitiviridae* ailelerinden ilave üç dsRNA virüsü) hizalamışlar ve RdRp proteinin amino asit dizilerini kullanarak MEGA 6 programının Neighbour Joining 1000 replicate bootstrap metodunu kullanarak filogenetik ağaç oluşturulmuş ve her iki mikovirüsün sınıflandırılmamış dsRNA virüsleri ile kümelenmiş olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca FpV2 tarafından kodlanan RdRp proteinlerini sırasıyla

Macrophomina phaseolina double-stranded RNA virus 2 (%36) ve *Phlebiopsis gigantea mycovirus dsRNA 2* (%36) ile en yüksek sekans özdeşliğini oluşturduğunu belirlemişlerdir. FpV3 tarafından kodlanan RdRp nin ise *Fusarium graminearum dsRNA mycovirus 3* (%44), *Sclerotinia sclerotiorum nonsegmented virus L* (44%) ve *Grapevine associated totivirus-2* (44%) en yüksek sekans özdeşliği gösterdiğini saptamışlardır. Sonuç olarak bu iki dsRNA nın yeni bir mikovirüs ailesini temsil ettiğini ve atanmamış bir dsRNA virüs grubuna ait olduğunu ifade etmişlerdir. Bu çalışmada ise, elde edilen genom dizileri *de nova* assembly yapılarak analiz yapılmış ve her iki örneğin de RdRp proteinlerinin amino asit dizileri ve benzerlik oranları ile yakın olan 8 mikovirüsün RdRp amino asit dizileri ile çoklu hizalama ClustalW kullanılarak toplam 8 motif tesbit edilmiştir. Bu motiflerde bulunan korunmuş amino asit dizilerin Wang vd. (2019) nın tesbit etmiş oldukları motiflere benzer olduğu saptanmıştır. Daha sonra NCBI da protein dizilerinin BLAST yapılması sonucu en yüksek özdeşlik oranının %44 ve 41 ile *Fusarium poae dsRNA virus 2* ile olduğu tesbit edilmiştir. Çalışmada filogenetik ağaç her iki dsRNA örneğinin protein dizileri MEGA7 programının Neighbour Joining 1000 replicate bootstrap metodu ile çıkartılmış ve her iki örnekte sadece FpV2 ile uzak kümelenme oluşturmuştur. Dolayısıyla 962M ve 961M dsRNA tanımlanmamış yeni bir familyanın yeni bir üyesi olabilir. Ancak bu çalışmada elde edilen dsRNA örneklerinin protein dizileri ile % 44 ve 41 lik özdeşlik gösteren ve filogenetik analizlerde aynı yerde kümelenmiş olan *Fusarium poae virus 2* ile aynı familya içerisinde olabileceği bundan sonra yapılacak çalışmalar ile doğrulanmasını gerektirmektedir. Bundan sonra bu iki yeni mikoviral dsRNAların sekans dizilerinin farklı bölgelerinden spesifik primerler tasarlanarak RT-PCR ile cDNA kütüphanesi ve DNA dizi sekans analizlerinin yapılması gerekmektedir. Aynı şekilde Wang vd. (2016) çalışmalarında izole etikleri iki yeni mikovirüsün genomundan spesifik primerler tasarlıyarak sekans analizlerini yapmışlardır. Sekans sonucunda elde edilen dizilerin Phytoreo_S7 Domain bölgelerinin ve Programmed -1 ribosomal frameshifting mekanizmalarını kullanarak her iki mikovirüsün moleküler özelliklerini karakterize etmişler ve genom organizasyonunun kapsamlı bir karşılaştırılma ile güçlü bir filogenetik analizlerini yaparak *Fusagraviridae* olarak adlandırılan yeni bir mikovirüs familyasını önermişlerdir (International Committee on Taxonomy of Viruses [ICTV 10th], 2021). Ardından FpV2 ve FpV3 mikovirüsünün *Fusagraviridae* aile üyesinde olduğu belirlenerek sırasıyla KU728180 ve KU728181 erişim numaraları ile GenBank veri tabanında kayıt altına almışlardır. Bu çalışmada ise, BLAST sonuçlarında en çok benzerlik oranı FpV2 ile %41 (RdRp) ve %44 (hypothetical) olarak saptanmıştır. Bu özdeşlik oranlarından dolayı bu çalışmada elde edilen bu iki yeni mikoviral

dsRNAlar *Fusagraviridae* familyasının yeni bir üyesine de ait olabileceği gibi yukarıda ifade edildiği gibi tanımlanmamış bir familyaya da ait olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu durum gelecekte yapılacak olan çalışmalar ile netlik kazanabilecektir.

Ayrıca Wang vd. (2016) *Fusagraviridae* familyasında yer alan mikovirüs FpV2 nin 9,5 kb ve FpV3 nin ise 9,4 kb gibi büyük genomlara sahip olduklarını belirlemiş ve *Fusagraviridae* üyelerinin genomlarının kb uzunluklarının büyük olduğunu ifade etmişlerdir. Bu çalışmada da 961M ve 962M dsRNA örneklerinin tüm genom uzunlukları sırasıyla toplam 12,141 ve 14,452 kb uzunluğunda iki büyük segmentli dsRNAlar saptanmış ve bu dsRNA ların birinci segmentlerinin yaklaşık 9 kb uzunluğundaki kontiklerin Wang vd. (2016) nin çalışmasındaki *Fusagraviridae* familyası üyesi FpV2 ve FpV3 mikovirüslerinin uzunluğuna yakın oldukları belirlenmiştir. Ancak 961M ve 962M in diğer ikinci segmentlerinin 2,5 kb lık kontingleri ise, Khalifa vd. (2013) ve Gilbert vd. (2019) çalışmalarında sırasıyla saptanmış olan 2,7 kb'lık *Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 4*'e ve 2,2 kb'lık *Colletotrichum falcatum mitovirus 1* uzunluk olarak yakinken Marzona vd. (2016)'nin saptadıkları 1,3 kb'lık *Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 13*'den büyük olduğu tesbit edilmiştir. Dolayısıyla her iki örneğin 2,5 kb lık kontinglerinin mitovirüs olabileceği de söz konusu olabilir. Bu durumun netlik kazanması ancak gelecekte yapılacak olan çalışmalar ile saptanabilecektir.

Wang vd. (2019) *Macrophomina phaseolina* etmeninden izole etmiş oldukları ve *Macrophomina phaseolina fusagravirus 1* (MpFV1) olarak isimlendirdikleri mikovirüse ait sekans dizilerinin NCBI da BLASTp sonucunda hypothetical ve RdRp proteinleri sırasıyla %58 ve %61 oranında *Macrophomina phaseolina RNA virüsü 2*'yle özdeşliği ve onbir diğer sınıflandırılmamış dsRNA virüsün RdRps'si ile %31-%38 oranında nisbeten düşük özdeşliğini bildirmişlerdir. Bu çalışmadaki 962M ve 961M'un hypothetical ve RdRp proteinlerin dizileri *Fusarium poae dsRNA virus 2* ile BLASTp'de en yüksek özdeşlik %44-41 oranı olurken Wang vd. (2019) elde ettikleri *Macrophomina phaseolina fusagravirus 1* ile %34-33 oranında düşük özdeşlik belirlenmiştir. Ayrıca Wang vd. (2019) MpFV1'in diğer mikovirüsler ile aralarındaki ilişkilerini incelemek için MEGA 7 programında maximum-likelihood (ML) 1,000 bootstrap metodunu kullanarak MpFV1 ve seçtikleri 20 mikovirüs ile filogenetik ağaç çıkarılarak MpFV1'in MpRV2 ve diğer sınıflandırılmamış 15 dsRNA mikovirüsleri ile kümelendiğini tesbit etmişlerdir. Böylece bu yeni mikovirüsünü yeni tanımlanan *Fusagraviridae* familyanın yeni bir üyesi olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da filogenetik ağacın çıkartılması için aynı program, MEGA 7 maximum-likelihood (ML)

1,000 bootstrap metodunu kullanılmıştır. Her iki örneğin proteinleri için iki ayrı filogenetik ağacı çıkarılmış ve örneklerin ikisi kendi aralarında kümelenirken *Fusagraviridae* familyasının üyeleriyle de uzak kümelenme meydana getirmişlerdir. Yine aynı araştırmacılar 2020 yılında *M. phaseolina* izolatlarından izole edilen mikovirüslerinin genom sekans analizleri sonucunda elde ettikleri kontinglerin protein dizilerini NCBI'de BLAST analizlerinde diğer mikovirüslerle %26 ila %99 arasında değişen özdeşlik oranlarında olduğunu saptamışlardır (Wang vd., 2020). Özdeşlik oranına göre virüslerin çoğunluğunun (%47) pozitif ssRNA genomuna sahipken, %43'ünün dsRNA genomlarına sahip olduğu ve *Totiviridae*, *Chrysoviridae*, *Partitiviridae* ve *Fusagraviridae* familyaları üyeleri olduğunu tahmin etmişlerdir. Elde ettikleri 22, 116, 23 ve 110 kontiglerin protein dizilerini BLASTp yaparak %62-96 (RdRp) ve %57-92 (hypothetical) arasında değişen özdeşlik oranıyla *M. phaseolina dsRNA virus 2* ile benzer olduğu saptamışlar ve bu kontinglerin *Fusagraviridae* familyasının yeni üyeleri olduğunu bildirmişlerdir. Bu 4 kontigi geçici olarak *M. phaseolina fusagravirus 2* (MpFV2), *M. phaseolina fusagravirus 3* (MpFV3), *M. phaseolina fusagravirus 4* (MpFV4) *M. phaseolina fusagravirus 5* (MpFV5) olarak isimlendirmişlerdir (Wang vd., 2020). Bu çalışmadaki 961M ile 962M protein dizileri, NCBI BLASTp'da *Fusarium poae dsRNA virus 2*'ile hypothetical protein %44 ve RdRp protein %41 oranında yüksek özdeşlik oranı saptanmıştır. Ancak 961M ve 962M protein dizileri ise Wang vd. (2020)'nin *M. phaseolina fusagravirus 2, 3, 4, 5* ile (RdRp protein %33-35 ve hypothetical protein %30-33) çok düşük oranlarda özdeşlik tesbit edilmiştir. Wang vd., (2020) tarafından saptanan bu 4 mikovirüsün RdRp proteinlerinin amino dizilerinin filogenetik analizine göre *Fusagraviridae* ailesine ait yeni virüs türleri olduğunu CLUSTALX programı (Sürüm 2.1) kullanarak çoklu hizalaması ve MEGA7 programı ile belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise 961M ve 962M'nin BLASTp sonuçlarına göre *Fusagraviridae* familyasına benzeliği yüksek olan RdRp protein için 15 ve hypothetical protein için 8 mikovirüsler seçilerek MEGA7 programı ile filogenetik analiz yapılmıştır. Nitekim Peyambari vd. (2014), Wang vd. (2016), Liu vd. (2019), Wang vd. (2019), Shamsi vd. (2019) ve Wang vd. (2020)'nin çalışmalarda görüldüğü gibi genelde mikoviral dsRNAların familya düzeyinde tanımlanması DNA dizi analizlerinden elde edilen protein dizilerinin NCBI veri tabanında BLAST analizlerinin yapılmasıyla belirlenmektedir.

ICTV verilerine göre mikoviral dsRNA'ların familya ve tür düzeyinde tanımlanabilmesi için, dsRNA'nın izole edildiği konukçu fungusu, dsRNA segment sayısı-boyutları ve 5'-UTR uzunlukları dikkate alınmakta ve BLAST sonuçlarına göre

dsRNA'ların amino asit dizi özdeşliği (Percen identity) oranının %50 den fazla olan fonksiyonları değerlendirilmektedir. *P. viticola*'dan ilk kez bu çalışma ile izole edilen dsRNA'ların, segment sayı ve boyutları yönüyle Wang vd. (2016)'in belirlediği dsRNA'lara yakın olduğu belirlenmesine rağmen, 961M ile 962M örneklerinin amino asit dizilerinden yapılan BLAST analizi sonuçlarında RdRP ve hypothetical proteinlerin en yüksek özdeşlik oranlarının %41 ve 44 olması nedeniyle bu iki dsRNA örneğinin tanımlanmayan yeni bir mikovirüs familyası üyeleri olabileceği ifade edilebilir.

Wang vd. (2020) *M. phaseolina* izolatlarından saptanmış oldukları mikovirüslerin konukçu fungusda nasıl bir etkisi olduğunu belirlemek için toplam 12 virüs içeren *M. phaseolina* izolatlarının 4 virüs içermeyen izolatları ile susam fidelerin üzerinde patojenite testlerini yapmışlar, ancak bu 12 izolatta her bir izolatta birden fazla mikovirüs içerdiğini ve sadece *M. phaseolina hypovirus 2*, *M. phaseolina fusagravirus virus 1-5*, *M. phaseolina endornavirus 1-2*, *M. phaseolina ourmia-like virus 1-3*, *M. phaseolina mitovirus 4* ve *M. phaseolina mycobunyavirus 1-4* mikovirüslerini içeren izolatlarda diğer izolatlara göre hastalık şiddetin azaldığını ve bu mikovirüslerin hipovirülanslikle ilişkili olduklarını ifade etmişlerdir. Bu çalışmada ise, mikovirüs dsRNA'nın moleküler karakterizasyon çalışmalarından önce dsRNA pozitif *P. viticola* izolatlarının üzerinde birçok biyolojik denemeler hem sera koşullarında hem laboratuvar koşullarında yapılmış ve biyolojik denemelere göre puan tablosu oluşturulmuş, tabluda en yüksek puanı olan izolatların hipovirulent olma özeliği sahip olabileceğini düşünerek seçilmiş ve YND çalışmaları yapılmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada yapılan Wang vd. (2020)'nin çalışmasıyla farklı olduğunu ve hipovirülenslik özeliğine sahip olabilecek izolatlarla DNA genom analizleri yapılmıştır.

Dünyada şu ana kadar buğdaydan izole edilen *F. poae* izolatlarından yaklaşık 55'inde mikoviral dsRNA ve kapsüllenmiş virüs benzeri partiküller saptanmıştır (Sharma vd., 2018). Ancak tüm *F. poae* izolatlarında saptanan bu RNA'ların yapılarının birbirleri ile farklı olduğu ve dsRNA içeren izolatlarda fungus morfolojisinde herhangi bir değişiklik gözlenmediği ifade edilmiştir (Sharma vd., 2018). Bu da *F. poae* izolatlarında saptanan mikovirüslerin konukçu fungusun virülensliği üzerinde etkisi olmadığını ifade edilmiştir (Sharma vd., 2018 ve Wang vd., 2016). Ancak bu çalışmada yapılmış olan tüm biyolojik testlerde sırasıyla 30 ve 28 ile en yüksek puanı almış olan dsRNA içeren her iki 962M ve 961M izolatlarının konukçusu fungal hastalığın virülensliğini azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca yatay geçiş ile dikey taşınım testlerinde bu iki mikoviral dsRNAlar en iyi performansı

göstermiş olduğu da saptanmıştır. Böylece bu saptanan iki yeni dsRNA içeren izolatın (962M ve 961M) sera ve laboratuvar koşullarındaki çalışma sonuçlarına göre fungal konukçununun virülensliğini azalttığı ve yatay taşınım ile dikey geçiş performansının yüksek olması onların gelecekte biyolojik mücadele çalışmalarında hipovirulent olma potansiyeline sahip izolat adayları olarak kullanılmasına olanak sağlayacağı düşünülmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ege Bölgesi, Türkiye’de hem bağ alanı, hem de üzüm üretim miktarı yönünden önemli bir yere sahiptir. Bağlarda birçok fungal etmen önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Bu etmenlerden birisi de ölükol hastalığı etmeni *Phomopsis viticola*’dır. Ölükol hastalığı dünyanın birçok yerinde olduğu gibi Ege Bölgesinde de önemli ürün kayıplarına yol açmakta ve hastalıkla mücadelede kültürel önlemler ile birlikte kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Fakat kültürel önlemler tek başına yeterli olmayıp hastalığa karşı etkili olan fungusitlerin aşırı ve düzensiz kullanımından dolayı bazı fungal etmenlerin fungusitlere dayanıklı olması riskinin yanısıra ürünler üzerinde fungusitlerin kalıntı bırakma riskini de barındırmaktadır. Bu durum insanlar, hayvanlar ve çevre üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bu nedenlerle son yıllarda araştırmacılar fungal patojenlerin kontrolünde çevreye ve insan sağlığına zarar vermeyen alternatif kimyasallar ve biyolojik ajanların kullanımı ile ilgili çalışmalara yoğunlaşmışlardır. Son yıllarda fungal hastalıkların biyolojik mücadelesinde mikovirüslerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Buna en iyi örnek olarak da kestane kanseri hastalığı verilmektedir. Bu nedenle Ege Bölgesinin bağ alanlarında ölükol hastalığı etmeni *P. viticola* izolatlarından elde edilmiş olan noval (yeni) dsRNA’nın tanılanması, moleküler ve biyolojik karakterizasyonu ile hipovirulent etkisinin belirlenmesi bu çalışmanın amacı olmuştur. Bu amaç doğrultusunda Ege Bölgesinin en fazla bağ alanlarına sahip olan Aydın, İzmir, Denizli ve Manisa illerinden ölükol hastalığı enfekteli örnekler toplanıp fungal izolatların morfolojik ve kültürel özellikleri belirlenmiştir. Toplam 214 *P. viticola* izolatın 125’inin dsRNA içerdiği belirlenip bu izolatların biyolojik karakterizasyonunun (kültürel özellikleri) dsRNA negatif *P. viticola* izolatıyla karşılaştırarak değerlendirilmiştir. dsRNA pozitif ve dsRNA negatif izolatların koloni renkleri arasında herhangi bir farklılık olmadığı saptanmıştır. Biyolojik özellikleri ve agar jel görüntüsü en iyi dsRNA profiline sahip olduğu için seçilen 50 izolatın dikey taşınma kapasitesi ölçülmüş ve en iyi dikey taşınım performansı gösteren 12 izolatın 3 dsRNA içermeyen *P. viticola* izolatı ile asma fidanları üzerinde virülenslik testi yapılmıştır. Test sonucunda izolatlar arasında sürgün ve yaprakta hastalık şiddeti yönünden farklılıklar bulunmuştur. İzolatlarda 5 vc (vejetatif uyum) grubu tesbit edilip bu vc gruplarına göre izolatların yatay taşınım testleri yapılmış ve dsRNA pozitif izolatların yatay taşınım kapasitelerinde farklılıklar olmasına rağmen çoğunda, dsRNA’nın yatay olarak alıcı izolata

taşınabildiği saptanmıştır. dsRNA virüslerinin hipovirülenslik üzerine etkisini belirlemek için 2. aşama virülenslik testleri için yatay taşınımında dsRNA pozitif dönüştürülen virulent izolatların asma fidanlarına inokülasyonu yapılmıştır. dsRNA negatif (virulent) izolatları ile inoküle edilen asma fidanlarının yaprak ve sürgünlerinde hastalık şiddeti dsRNA pozitif dönüştürülmüş virulent izolatlardan daha fazla olduğu saptanmıştır. Moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılacak dsRNA pozitif izolatların seçiminde çalışmada sera koşullarında yapılan tüm biyolojik testlerin sonuçlarına göre biyolojik mücadelede kullanılabilme özelliklere sahip ümitvar 6 izolat seçilerek yaklaşık 9,4 ve 2,5 kb boyutlarında iki segmente sahip dsRNAlar izole edilmiş, 961M ve 962M dsRNA örneklerinden illumina teknolojisi ile çift yönlü dizisileme oluşturulmuş ve toplam 24 ve 33 milyon okuma yapılmıştır. 961M’de 9,7 ve 2,5 kb’lık 2, 962M’de ise, 9,5 ve 2,5 kb’lık 3 konting olduğu saptanmıştır. Yapılan genom anotasyonu çalışmaları sonucunda 961M ve 962M de sırasıyla 3 ve 6 CDS saptanmış ve hypothetical protein ile RdRp proteinlerini kodlayan 961M’den 2 ile 962M’den ise 5 ORF bölgesi belirlenmiştir. Her iki örneğin genom dizileri NCBI’da BLASTn yapıldığında herhangi bir mikoviral dsRNA ile benzerliğinin olmadığı tesbit edilmiştir. 961M ve 962M dsRNA’larının protein dizileri BLASTp’de *Fusarium poae dsRNA virus 2* ile RdRp için %41 ve hypothetical protein için ise %44 oranlarında çok düşük özdeşlik olduğu saptandığından ve BLASTp sonuçlarına göre oluşturulan filogenetik ağaçta diğer mikoviral dsRNAlarla çok uzak küme oluşturduğu için bu iki yeni mikoviral dsRNAların (961M ve 962M) muhtemelen tanımlanmamış yeni bir familyanın üyesi veya *Fusagraviridae* familyasının yeni bir üyesi olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu durum gelecekte yapılacak olan çalışmalar ile netlik kazanabilecektir. 961M ve 962M noval dsRNA mikovirüslerin DNA dizi analizlerinden elde edilen ham veriler NCBI SRA da 961M için PRJNA722503 ve 962M için PRJNA723482 Accession Number’ı alınmış ve ardından bioinformatik analiz verileri ise NCBI BankIt de 961M’in 2 kontigi için 961M-L’e MZ050804 ve 961M-S’e MZ074321 ve 962M’in 3 kontigi için 962M-L’e MZ050805, 962M-S1’e MZ050806 ve 962M-S2’e MZ050807 Accession Number’leri alınmıştır.

P. viticola izolatlarından elde edilen bu iki yeni mikoviral dsRNA’ların sera ve laboratuvar koşullarında belirlenen biyolojik özellikleri, yatay taşınım ile dikey geçiş performansının yüksek olması ve fungal konukçunun virülensliğini azaltma özelliğine sahip olması onların hipovirulent olma potansiyeline sahip adaylar olabileceği ihtimalini güçlendirmektedir. Ayrıca, Ege Bölgesinde sadece MAT-2’nin belirlenmesi ve MAT-1’in bulunmaması nedeniyle *P. viticola*’nın eşeysiz çoğalması ve vc grup çeşitliliğinin düşük

olması dsRNA'nın doğada yatay taşınımını kolaylaştırarak gelecekte yapılacak olan biyolojik mücadele çalışmaları için uygun bir ortam sağlayacağı ve başarılı bir biyolojik mücadele uygulanabileceği düşünülmektedir.

P. viticola'nın mikoviral dsRNA varlığı konusunda herhangi bir bulguya şimdiye kadar rastlanmamış olup bu çalışmayla önemli bir dış satım ürünümüzde sorun oluşturan *P. viticola*'da var olan dsRNA'nın genom düzeyinde tanılanması ve biyolojik karakterizasyonu kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada elde edilen bulgular, dünya ve Türkiye mikoviral dsRNA literatürüne özgün katkı sağlayacak ve bağ yetiştiriciliği yapılan tüm ülkelerde ölükol gibi önemli bir bağ hastalığı için çevre dostu bir çözüm önerisi sunabilecektir. Bu nedenle tez olarak yapılan bu çalışmanın doğrudan ülke ekonomisine ve çevre sağlığına katkı sağlayacak nitelikleri barındırdığı söylenebilir. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular doğrultusunda *P. viticola* etmeninde saptanan yeni mikoviral dsRNAlar ıla ilgili aşağıda belirtilen çalışmaların yapılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir;

1. *P. viticola* etmeni birçok fungusite karşı direnç oluştuğu ve ölükol hastalığının mücadelesinde özellikle organik üzüm yetiştiriciliği yapılan alanlarda kullanılan mevcut yöntemlere yeterli olmayıp ve yıldan yıla önemli verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır. Bu nedenle entegre edilebilecek nitelikte düşünülen hipovirülenslik ilişkili bir biyolojik mücadele yöntemi ölükol hastalığının mücadelesinde yardımcı olabilecektir.

2. Biyolojik mücadelede istenen durum hipovirulent izolatın doğada çoğalarak hipovirulent bireyler olarak yayılması ve hastalıklarını azalmasına yol açmasıdır. Bu durum; dikey geçiş performansı iyi olan izolatlar ile daha etkin bir şekilde sağanabilir. Çalışmada, bazı dsRNA içeren izolatlarda konidiye geçişin zayıf veya hiç olmadığını görülmüştür. Böyle izolatların doğada virulent olarak çoğalarak hastalığın şiddetini artırma riskleri vardır. Laboratuvar ve sera koşullarında yapılan biyolojik testlerin hepsinin sonucunda izolatlar arasında performansı iyi olan izolatlar belirlenmiş, ancak bu izolatların doğada yayılma performansları üzerine henüz Türkiye ve dünyada bir veri bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu araştırmada elde edilen sonuçlara göre bağlarda hastalık oluşturan fungal etmen ve mikoviral dsRNA'nın arasındaki hipovirülenslik ilişkisi ileride yapılacak çalışmalar ile belirlenecek ve doğada biyolojik mücadele uygulamalarına imkan sağlayabilecektir.

3. 961M ve 962M dsRNA'ında saptanan 12,141 ve 14,452 kb'lık genomların büyük bir bölümü yani konting L (9,7 ve 9,5 kb)'ların RdRp ve hypothetical proteinlerinin amino asid dizileri hizalandığında her ikisinin protein dizileri birbirine %100 oranında benzer

olduğu için her iki dsRNA'nın konting L'lerinin aynı yeni bir mikovirüse ait olabileceği ifade edilebilir. Ayrıca her iki dsRNA'lardan elde edilen 2,5 kb'lık 3 kontig S'lerin protein amino asit dizileri hizalandığında iki dsRNA'nın birbirinden çok farklı olduğu ve bu küçük kontinglerin farklı mitovirüsler veya DNA dizileme aşamasında oluşan küçük anlamsız RNA parçaları olabileceği muhtemeldir.

4. Çalışmada iki yeni mikoviral dsRNA'nın tüm genom dizi analizleri yapılmış ve saptanan yeni mikoviral dsRNAların hangi familyaya ait olduğu henüz bilinmemekte olduğu için gelecekte yapılacak çalışmalarda bu iki yeni mikoviral dsRNA'nın genom dizileri kullanarak PCR ve sekans analizleri yapılarak familya ve tür düzeyinde tanıları yapılabilecektir. Çalışmada elde edilen veriler gelecekte yapılacak olan birçok çalışma için bir başlangıç oluşturacak niteliktedir.



KAYNAKLAR

- Açıkgöz, S., Döken, M.T., Erincik, Ö., Değirmenci, F. (2009). Determination of hypovirulent isolates of *cryphonectria parasitica* by dsRNA analysis in Aydın province, Turkey. *International Society for Horticultural Science Acta Hortic*, 866, 379-383. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.866.49>
- Açıkgöz, S., Erincik, Hosseinalizadeh, S., Döken M.T. (2017, August 14-18). *Influence of the various Cryphonectria hypovirus 1 (CHV1) isolates on conidial formation of Cryphonectria parasitica, the causal agent of chestnut blight* [Conference presentation abstract]. 3rd INTERNATIONAL AGRICULTURE CONGRESS, Skopje, Macedonia, pp.65-66.
- Adams, I.P., Glover, R.H., Monger, W.A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., Samuitiene, M., Boonham, N. (2009). Next-generation Sequencing and Metagenomic Analysis: A Universal Diagnostic Tool in Plant Virology. *Molecular Plant Pathology*, 10(4), 537-45.
- Adams, I.P., Miano, D.W., Kinyua, Z.M., Wangai, A., Kimani, E., Phiri, ... Boonham, N. (2013). Use of next-generation sequencing for the identification and characterization of Maize chlorotic mottle virus and Sugarcane mosaic virus causing maize lethal necrosis in Kenya. *Plant Pathology*, 62, 741–749.
- Adaskaveg, J., Gubler, D., Michailides, T., Holtz, B. (2010). Efficacy and Timing of Fungicides, Bactericides, and Biologicals for Deciduous tree fruit, nut, strawberry, and vine crops. *University of California*, <https://escholarship.org/uc/item/01p147g1>
- Ahn, I.I.P. and Lee, Y.H. (2001). A Viral Double-Stranded RNA Up Regulates the Fungal Virulence of *Nectria radicularis*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 14, 496-507.
- Akgül, D.S., Savas, N.G., Teker, T., Keykubat, B., Mayorquin, J. S., Eskalen, A. (2015). Fungal trunk pathogens of Sultana Seedless vineyards in Aegean region of Turkey. *Phytopathologia Mediterranea*, 54(2), 380.

- Akıllı, S., Serçe, Ç.U., Katırcıoğlu, Y.Z., Maden, S., Rigling, D. (2013). Characterization of hypovirulent isolates of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* from Marmara and Black Sea Region of Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, 135, 323-334.
- Akkurt, M., Mutlum Şenses, İ., Erdoğan, Ü. (2018). Türkiye’de Organik Bağcılığın Son Durumu ve Gelişme Olanakları. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6(11), 1511- 1516.
- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D., Islas, C., Rwahnih, A. (2015). Comparison of Next-Generation Sequencing Versus Biological Indexing for the Optimal Detection of Viral Pathogens in Grapevine. *The American Phytopathological Society*, 105(6), 758-63. <https://doi.org/10.1094/PHTO-06-14-0165-R>
- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Urbez-Torres, J. R. U., Cordero, F., Rowhani, A. (2011). Deep sequencing evidence from single grapevine plants reveals a virome dominated by mycoviruses. *Archives Virology*, 156, 397–403.
- Anagnostakis, S.L. (1977). Vegetative incompatibility in *Endothia parasitica*. *Experimental Mycology*, 1(4), 306-316
- Anagnostakis, S.L. (1987). Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia*, 79, 23–37
- Anagnostakis, S.L. and Day, P.R. (1979). Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. *American Phytopathological Society*, 69, 1226–29
- Anagnostakis, S.L., Jaynes, R.A. (1973). Chestnut blight control: use of hypovirulent cultures. *Plant Disease Report*, 57, 225-226.
- Anonim, (2014). *Biosynthesis /Quantification of dsRNA - Bio-Synthesis Inc.* www.biosyn.com_adresinden erişildi.
- Arı, M. E. (2000). A general approach for esca disease in the vineyards of Turkey. *Phytopathologia Mediterranea*, 39 (1), 35-37.
- Awan, Q.N. (2017). *Characterization of phomopsis isolates causing phomopsis dieback of grapevine and their sensitivity against some fungicides and hot water treatments.* Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı. Adana.

- Balcı, D. K. ve Açıkgöz, S. (2019) Pamuk Solgunluk Hastalık Etmeni *Verticillium dahliae* Kleb.'da Mikovirüs dsRNA Analizi ve RT-PCR İle Tanılanması. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 29(3), 516-525. <https://doi.org/0.29133/yyutbd.496476>
- Balijja, A., Kvarnheden, A., Turchetti, T. (2008). A non-phenol–chloroform extraction of double-stranded RNA from plant and fungal tissues. *Journal of Virological, Methods*, 152, 32–37.
- Bartholomaeus, A., Wibberg, D., Winkler, A., hler, A.P., Schlüter, A., and Varrelmann, M. (2016). Deep Sequencing Analysis Reveals the Mycoviral Diversity of the Virome of an Avirulent Isolate of *Rhizoctonia solani* AG-2-2 IV. *Journal pone*, 11(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165965>
- Baumgartner, K., Fujiyoshi, P.T., Travadon, R., Castlebury, L.A., Wilcox, W.F., and Rolshausen, P.E. (2013). Characterization of species of *Diaporthe* from wood cankers of grape in eastern North American vineyards. *Plant Disease*, 97(7), 912–920.
- Biella, S., Smith, M.L., Aist, J.R., Cortesi, P., Milgroom, M.G. (2002). Programmed cell death correlates with virus transmission in a filamentous fungus. *Proceeding of the Royal Society London B*, 269, 2269–2276.
- Bisseger, M., Rigling, D., Heiniger, U. (1997). Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European chestnut forests in the presence of natural hypovirulence. *The American Phytopathological Society*, 87, 50–59.
- Bruenn, J.A. (1993). A closely related group of RNA-dependent RNA polymerases from double-stranded RNA viruses. *Nucleic Acids Research*, 21, 5667–5669.
- Brusini, J. and Robin, C. (2013). Mycovirus transmission revisited by in situ pairings of vegetatively incompatible isolates of *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Virological Methods*, 187, 435-442.
- Brusini, J., Wayne, M.L., Franc, A., Robin, C. (2017). The impact of parasitism on resource allocation in a fungal host: the case of *Cryphonectria parasitica* and its mycovirus, *Cryphonectria Hypovirus 1*. *Ecology and Evolution*, 7, 5967–5976. <https://doi.org/10.1002/ece3.3143>

- Bryner S.F., Rigling D., Brunner P.C. (2012). Invasion history of demographic pattern of *Cryphonectria hypovirus* I across European populations of the chestnut blight fungus. *Ecology and Evolution*, 2(12), 3227-3241.
- Canizares, M., Pérez-artés, E., García-pedrajas, N.E., García-pedrajas, M.D. (2015). Characterization of a new partitivirus strain in *Verticillium dahliae* provides further evidence of the spread of the highly virulent defoliating pathotype through new introductions, *Phytopathologia Mediterranea* 54, 3, 516–523.
- Castillo, A., Cottet, L., Castro, M., Sepu'lveda, F. (2011). Rapid isolation of mycoviral double-stranded RNA from *Botrytis cinerea* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology Journal*, 8, 38. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-38>
- Castillo-Pando, M.S., Nair, N.G., Emmett, R.W., Wicks, T.J. (1997). Inhibition in pycnidial viability of *Phomopsis viticola* on canes *in situ* as an aid to reducing inoculum potential of cane and leaf blight disease of grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 26, 21-25.
- Choi, G.H., Dawe, A.L., Churbanov, A., Smith, M.L., Milgroom, M.G., Nuss, D.L. (2012). Molecular characterization of vegetative incompatibility genes that restrict hypovirus transmission in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Genetics*, 190, 113-127. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133983>
- Chung P., Bedker P.J. , Hillman B.I. (1994). Diversity of *Cryphonectria parasitica* hypovirulence-associated double-stranded RNAs within a chestnut population in New Jersey. *The American Phytopathological Society*, 84, 984–990.
- Cock, P.J., Fields, C. J., Goto, N., Heuer, M.L., Rice, P.M. (2010) The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Research*, 38(6), 1767-71. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1137>
- Coetzee, B., Freeborough, M. J., Maree, H. J., Celton, J. M., Rees, D. J. G., Burger, J. T. 2010. Deep Sequencing Analysis of Viruses Infecting Grapevines: Virome of a Vineyard. *Virology*, 400(2), 157-63.
- Cortesi, P. and Milgroom, M.G. (1998). Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2988-2994.

- Cortesi, P., McCulloch, C.E., Song, H., Lin, H., Milgroom, M.G. (2001). Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics*, 159, 107–118.
- Cucuzza, J.D. and Sall, M.A. (1982). Phomopsis cane and leaf spot disease of grape vine: Effect of chemical treatments on inoculum level, disease severity, and yield. *Plant Disease*, 66, 794-797.
- Çelik, H. (2013, Haziran 26-27). *Türkiye bağcılığında üretim hedefleri. VİZYON 2023 BAĞCILIK ÇALIŞTAYI*, Tekirdağ Bağcılık Araştırma İstasyonu.
- 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).
- Çetinkaya, N. ve Onoğur, E. (2006). Organik Yetiştiricilik Yapılan Yuvarlak Çekirdeksiz Üzüm Bağlarında Farklı Gübreleme Uygulamalarının Külleme Hastalığı Gelişimi ve Verime Etkileri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 43(1), 33-44.
- Dawe, A.L., and Nuss, D.L. (2001). Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. *Annual Review of Genetics*, 35, 1 –29.
- Deng, Q.C., Ye, Y., Miao M., Fang, Q., Li, T., Wang, K. (2009). The horizontal transmission of *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV1) is affected by virus strains. *Chinese Science Bulletin*, 54 (17), 3053–3060
- Domingo, D.D., Bawingan, P.A., Bharathan, S., Bharathan, N. (2014). Molecular Screening and Characterization of dsRNA from Wild-type and Mutant Strains of *Rhizoctonia solani* Kuhn Isolates. *Philippine Journal of Science*, 143(1), 61-72.
- Donaire, L., Pagán, I., Ayllón, M.A. (2016). Characterization of *Botrytis cinerea* negative-stranded RNA virus 1, a new mycovirus related to plant viruses, and a reconstruction of host pattern evolution in negative-sense ssRNA viruses. *National Center for Biotechnology Information*, 499, 212-218.
- Du, Y., Lin, Y., Zhou, X. Wang, K., Fang, S., Deng, Q. (2017). Full-length sequence and genome analysis of CHV1-CN280, a North China isolate of *cryphonectria hypovirus* 1. *Archives of Virology*, 162, 1811-1818.

- Elliston, J.E. (1985). Characteristics of dsRNA-free and dsRNA-containing strains of *Endothia parasitica* in relation to hypovirulence. *The American Phytopathological Society*, 75, 151-158.
- Erincik O., Açıkgöz S., Döken M.T. (2018). Aydın İlinde *Cryphonectria Parasitica*'nın Hypovirulent Strainleri Kullanılarak Kestane Kanseri Hastalığı İle Biyolojik Mücadele Olanaklarının Araştırılması ve Uygulanması. TÜBİTAK, TOVAG 114O403 nolu Proje Bitirme Raporu. Ankara.
- Erincik, O., Döken, M.T., Açıkgöz, S., Ertan, E. (2008). Characterization of *Cryphonectria parasitica* isolates collected from Aydın Province in Turkey. *Phytoparasitica Journal*, 36, 249–259.
- Erincik, O., Madden, L. V., Ferree, D.C., Ellis, M.A. (2001). Effect of growth stage on susceptibility of grape berry and rachis tissues to infection by *Phomopsis viticola*. *Plant Disease*, 85, 5,517-520.
- Erincik, Ö. (2002). *Studies to determine time of grape berry and rachis susceptibility, and environmental parameters required for leaf and cane infection by Phomopsis viticola*. Doctoral dissertation, Wooster, Ohio State University Press of American.
- Erincik, Ö., Açıkgöz, S., Mangil, E., Hosseinalizadeh, S., Yorgancı, S., Döken M.T. (2016, Eylül 5-8). *Hypovirulent Cryphonectria parasitica İzolatlarında Cryphonectria hypovirus 1 CHV1 in Dikey Taşınımı* [Sözlü sunum]. Uluslararası Katılımlı 6. Bitki Koruma Kongresi, Konya, Türkiye.
- Erkan, M. ve Larignom, P. (1998). Fungi associated with esca disease in grapevines in the Aegean Region. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 27, 2-3, 137-143.
- Espach, Y. (2013). *The detection of mycoviral sequences in grapevine using next-generation sequencing*. Thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree Master of Science in Genetics at Stellenbosch University, Tellenbosch, South African.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), (2018). *Crop Production Statistics, 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations*. www.fao.org adresinden erişildi.
- Garbelotto, M., Frigmelica, G., Mutto Accordi, S. (1992). Vegetative compatibility and conversion to hypovirulence among isolates of *Cryphonectria parasitica* from Northern Italy. *European Journal of Forest Pathology*, 22, 337–348.

- García-Pedrajas, M.D., Canizares, M.C., Sarmiento-Villamil, J.L., Jacquat, A.G., Dambolen, J.S. (2019). Mycoviruses in Biological Control: From Basic Research to Field Implementation. *The American Phytopathological Society*, 109, 1828-1839. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-19-0166-RVW>
- Geçioğlu Erincik, B., Erincik, Ö., Açıkgöz, S. (2020). The potential diversity of vegetative compatibility types in the population of *Cryphonectria parasitica* in Turkey. *Journal of Forest Pathology*, 00:e12646. <https://doi.org/10.1111/efp.12646>
- Ghabrial, S.A. and Suzuki, N. (2009). Viruses of plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 353–384.
- Ghabrial, S.A., Caston, J.R., Jiang, D., Nibert, M.L., Suzuki, N. (2015). 50-plus years of fungal viruses. *Journal of Virology*, 479–480, pp. 356-368. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.034>
- Ghnaya-Chakroun, A.B., Rezgui, A., Vallance, J., Kharoubi, I., Dridi, M., Hajlaoui, M.R., Rey, P., Sadfi-Zouaoui, N. (2014). First Molecular and Biochemical Characterization of *Phomopsis viticola* and *Diplodia seriata* two pathogens of Esca and black dead arm diseases of grapevine in the Northern region of the Tunisia. *International Journal Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(8), 977-987.
- Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü (TOB), (2016). *Zirai Mücadele Teknik Talimatları, 2016. Manisa-Akhisar İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü*. www.manisa.tarimorman.gov.tr.
- Gilbert, K.B., Holcomb, E.E., Allscheid, R.L., Carrington, J.C. (2019). Hiding in plain sight: New virus genomes discovered via a systematic analysis of fungal public transcriptomes. *PLoS ONE*, 14(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219207>.
- Glass, N.L., Jacobson, D.J., Shiu, P.T.K. (2000). The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics*, 34, 165–186.
- Gomes, R.R., Glienke, C., Videira, S.I.R., Lombard, L., Groenewald, J.Z., and Crous, P.W. (2013). *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia Journal*, 31, 1–41.

- Gramaje, D., Úrbez-Torres, J.R., Sosnowski, M.R. (2018). Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant Disease*, 102,12–39.
- Güngör Savaş, N. (2019, Nisan 19-21). *Asmalarda fungal odun doku hastalık komplekslerinin tanılanması ve yönetimi*. Uluslararası Multidisipliner Akademik Çalışmalar Sempozyumu, İzmir, Türkiye.
- Gürer, M., Ottaviani, M., Cortesi, P. (2001). Genetic diversity of subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in two chestnut- growing regions in Turkey. *Forest Snow and Landscape Research*, 76(3), 383- 386.
- Hadidi, A., Flores, R., Candresse, and T., Barba, M. (2016). Next-Generation Sequencing and Genome Editing in Plant Virology. *Front Microbiol Journal*, 7, 1325.
- Hamid, M. R., Xie, J., Wu, S., Maria, S. K., Zheng, D., Assane Hamidou, A., ... Jiang, D. (2018). A Novel deltaflexivirus that infects the plant fungal pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*, can be transmitted among host vegetative incompatible strains. *Viruses Journal*, 10(6), 295. <https://doi.org/10.3390/v10060295>
- Hewitt, W.B. and Pearson, R.C. (1988). Phomopsis cane and leaf spot. Compendium of Grape Diseases. *The American Phytopathological Society*, 17-18.
- Hillman, B.I. and Suzuki, N. (2004). Viruses of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Advances in Virus Research Journal*, 63, 423-473.
- Hoegger, P.J., Heiniger, U., Holdenrieder, O., Rigling, D. (2003). Differential transfer and dissemination of hypovirus and nuclear and mitochondrial genomes of a hypovirus-infected *Cryphonectria parasitica* strain after introduction into a natural population. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3767–3771.
- Hofstetter, V., Buyck, B., Croll, D., Viret, O., Couloux, A., Gindro, K. (2012). What if esca disease of grapevine were not a fungal disease?. *Fungal Diversity*, 54, 51–67. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0171-z>
- Horsfall, J. G. and Barratt, R. W. (1945). An improved grading system for measuring plant disease. *Phytopathology Journal*, 35, 655.
- Hosseinalizadeh, S., Açıkgöz, S. (2021). Yeni Nesil Dizileme Teknolojilerinin Mikovirolojide Uygulanması. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(1), 247 – 263.

- Hosseinalizadeh, S., Erincik, O., Açıkgöz, S. (2021). Mating types of *Phomopsis viticola* isolates from grapevine in Aegean Region/Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection*, <http://doi.org/10.1007/s41348-021-00492-5>.
- Hosseinalizadeh, S., Erincik, Ö., Açıkgöz, S. (2020). Screening of some plant pathogenic fungi for the presence of dsRNA mycoviruses. *Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin*, 60 (1), 57-62. <https://doi.org/10.16955/bitkorb.612275>.
- Hrabáková, L., Koloniuk, I., Petrzik, K. (2017). *Phomopsis longicolla* RNA virus 1 – Novel virus at the edge of myco- and plant viruses. *Virology*, 506, 14–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2017.03.003>
- Ihrmark, K., Johannesson, H., Stenstrom, E., Stenlid, J. (2002). Transmission of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*. *Fungal Genetics and Biology*, 36, 147–154
- Illana, A., Marconi, M., Rodríguez-Romero, J., Xu, P., Dalmay, T., Wilkinson, M.D., Ayllón, M.A., Sesma, A., (2016). Molecular characterization of a novel ssRNA ourmialike virus from the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Archive Virology*, <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-016-3144-9>.
- International Committee on Taxonomy of Viruses [ICTV]. (2021). *The 10th ICTV Report on Virus Taxonomy*. [https://talk.ictvonline.org/search-124283882/?q= Fusagraviridae %20#gsc.tab= 0&gsc.q=Fusagraviridae%20&gsc.page=1](https://talk.ictvonline.org/search-124283882/?q=Fusagraviridae%20#gsc.tab=0&gsc.q=Fusagraviridae%20&gsc.page=1) adresinden erişildi.
- Ion-Torrent. (2017). Ion-Torrent Next-Generation Sequencing Workflow. İnternet erişim: <http://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/sequencing/next-generationsequencing/iontorrent-next-generation-sequencing-workflow.html> adresinden erişildi [E.T. 17.03.2021].
- Kanematsu, S., Kobayashi, T., Kudo, A., Ohtsu, Y. (1999). Conidial Morphology, Pathogenicity and Culture Characteristics of *Phomopsis* Isolates from Peach, Japanese Pear and Apple in Japan. *Japanese Journal of Phytopathology*, 65(3), 264–273.
- Kanematsu, S., Minaka, N., Kobayashi, T., Kudo, A., Ohtsu, Y. (2000). Molecular Phylogenetic Analysis of Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Regions and Comparison of Fertility in *Phomopsis* Isolates from Fruit Trees. *Journal of General Plant Pathology*, 66(3), 191–201.

- Karaca, İ. ve Eroğlu, G. (1967). Türkiye Bağlarında Yeni Bir Hastalık Ölükol Üzerinde Araştırmalar. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 4, (2) 28-35.
- Kaşkaloğlu, N., Saydam, C., Kapkın, A. (1975). Asmalarda Sürgün Kuruması (Dead-Arm) Hastalığının Ege’de Yayılışı ve Mücadelesi Üzerine Araştırmalar. *TOAG-75 Nolu TÜBİTAK Projesi, Yayın No: 288*.
- Khalifa, M. E., Varsanib, A., Ganley, A. R. D., Pearson, M. N. (2016). Comparison of Illumina de novo assembled and Sanger sequenced viral genomes: A case study for RNA viruses recovered from the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virus Research Journal*, 219, 51–57.
- Khalifa, M.E. Pearson, M.N. (2013). Molecular characterization of three mitoviruses co-infecting a hypovirulent isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* fungus. *Journal of Virology*, 441, 20-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.03.002>
- Kızmaz, M. Z., Paylan, İ.C., Erkan, S. (2017). DNA Dizilemenin Tarihsel Gelişimi. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 6(2), 47-53.
- Kocanová, M., Eichmeier, A., Botella, L. (2020). A novel mitovirus detected in *Diaporthe rudis*, a fungus associated with Phomopsis dieback on grapevines. *Archives of Virology*, 165, 2405–2408. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04755-8>
- Koloniuk, I., El-Habbak, M.H., Petrzik, K., Ghabrial, S.A. (2014). Complete genome sequence of a novel hypovirus infecting *Phomopsis longicolla*. *Archive Virology*, 159, 1861–18
- Komarek, M., Cadkova, E., Chrastny, V., Bordas, F., Bollinger, J.C. (2010). Contamination of vineyard soils with fungicides. *A review of environmental and toxicological aspects, Environment International*, 36, 138 – 151.
- Kreuze, J.F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I., Simon, R. (2009). Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology*, 388, 1–7.
- 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.

- Kulski, J.K. (2015). Next-Generation Sequencing An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. *Intech Open Science Open Minds*, <http://dx.doi.org/10.5772/61964>
- Latinovic, N., Vuksa, P., Vucinic, Z., Latinovic, J. (2008). Time of treatment and selection of fungicides importance in control of Phomopsis cane and leaf spot disease of grapevine. *OBC/WPRS "Bulletin*, 36, 137-143
- Lemus-Minor, C.G., Cañizares, M.C., García-Pedrajas, M.D., Pérez-Artés, E. (2019). Horizontal and vertical transmission of the hypovirulence-associated mycovirus *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi virus 1*. *European Journal of Plant Pathology*, 153, 645–650. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1554-0>
- Li, P., Bhattacharjee, P., Wang, Sh., Zhang, L., Ahmadi, I., Guo, L. (2019). Mycoviruses in *Fusarium* Species: An Update. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 257
- Li, Q., Huang, W., Hai, D., Wang, Y., Xie, J., Wang, M. (2020). The complete genome sequence of a novel hypovirus infecting *Bipolaris oryzae*. *Archives of Virology*, 165, 1027–1031.
- Lin, H., Lan, X., Liao, H., Parsley, T. B., Nuss, D. L. and Chen, B. (2007). Genome sequence, full-length infectious cDNA clone, and mapping of viral double-stranded RNA accumulation determinant of hypovirus CHV1-EP721. *Journal of Virology*, 81, 1813–1820.
- Liu, C., Li, M., Redda, E.T., Mei, J., Zhang, J., Elena, S.F., Wu, B., and Jiang, X. (2019). Complete nucleotide sequence of a novel mycovirus from *Trichoderma harzianum* in China. *Archives of Virology*, 164, 1213–1216. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04145-9>
- Liu, Y. C. ve Milgroom M.G. (1996). Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (*vic*) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. *The American Phytopathological Society*, 86, 79–86.
- Macdonald, W.L. ve Fulbright, D.W. (1991). The biological control of chestnut blight: use and limitations of transmissible hypovirulence. *Plant Disease*, 75, 656-661.

- Mardis, E.R. (2011). A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature Perspective*, 470, 198-203. <https://doi.org/10.1038/nature09796>
- Marvelli, R.A., Hobbs, H.A., Li, Sh., McCoppin, n. K., Domier, L., Hartman, G.L., Eastburn, D.M. (2014). Identification of novel double-stranded RNA mycoviruses of *Fusarium virguliforme* and evidence of their effects on virulence. *Archives of Virology Journal*, 159, 349–352.
- Marzano, S.Y. and Domier, L. (2016). Novel mycoviruses discovered from metatranscriptomics survey of soybean phyllosphere phytobiomes. *Virus Research Journal*, 213, 332–342. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2015.11.002>.
- Marzano, S.Y., Nelson, B.D., Ajayi-Oyetunde, O., Bradley, C.A., Hughes, T.J., Hartman, G.L., Eastburn, D.M., Domier, L.L. (2016). Identification of diverse mycoviruses through metatranscriptomics characterization of the viromes of five major fungal plant pathogens. *Journal Virology*, 90 (15), 6846–6863. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00357-16>.
- Merrin, S. J., Nair, N. G. And Tarran, J. (1995). Variation in Phomopsis recorded on grapevine in Australia and its taxonomic and biological implications. *Australasian Plant Pathology*, 24, 44–56.
- Mersin, E., Açıkgöz, S., Erincik, Ö. (2018). *Cryphonectria parasitica*'nın Hipovirüent Strainlerinin Fenol ve Kloroform İçermeyen dsRNA Analiz Yöntemi ile Belirlenmesi ve *Cryphonectria hypovirus 1*'in RT-PCR ile Tanınması. *ADÜ ZİRAAT DERGİSİ*, 15(2), 25-32. <https://doi.org/10.25308/aduziraat.415060>
- Moleleki, N., van Heerden, S.W., Wingfield, M.J., Wingfield, B.D., Preisig, O. (2003). Transfection of *Diaporthe perijuncta* with *Diaporthe RNA* virus. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3952–3956.
- Moleleki, N., Wingfield, M.J., Wingfield, B.D., Preisig, O. (2011). Effect of *Diaporthe RNA virus 1* (DRV1) on growth and pathogenicity of different *Diaporthe* species. *European Journal of Plant Pathology*, 131, 261–268.
- Moller, W.J. and Kasimatis, A.N. (1978). Dieback of grapevine caused by *Eutypa armeniaca*. *Plant Disease Reporter*, 62, 254-258.
- Morris, T. J. and Dodds J.A. (1979). Isolation and analysis of double-stranded RNA from virusinfected plant and fungal tissue. *Phytopathology Journal*, 69, 854-858.

- Mostert, L., Crous, P.W., Kang, J.C., Phillips, A.J.L. (2001). Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. *The Mycological Society of America*, 93, 146–167.
- Mostert, L., Denman, S., Crous, P.W. (2000). In vitro screening of fungicides against *Phomopsis viticola* and *Diaporthe perijuncta*. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 21(2), 62-65.
- Mundy, D.C., Brown, A., Jacobo, F., Tennakoon, K., Woolley, R.H., Vanga, B., Tyson, J., Johnston, P., Ridgway, H.J., Bulman, S. (2020). Pathogenic fungi isolated in association with grapevine trunk diseases in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 48(2), 84–96
<https://doi.org/10.1080/01140671.2020.1716813>
- Nair, N.G., Emmett, R.W., Wicks, T.J., Clarke, K., Strawhorn, J., Castillo-Pando, M.S., ... Whitmore, S. (1998). Strategies for the control of *Phomopsis* leaf and cane blight on grapevine. *Grape and Wine Research and Development Corporation Final Report Project DAN*, 94/1.
- Nanopore, (2017). Oxford Nanopore Technologies. <https://www.nanoporetech.com> adresinden erişildi. [E.T. 17.03.2021].
- Newell, P.D., Fricker, A.D., Roco, C.A., Chandrangsu, P.,Merkel, S.M. (2013). A Small-Group Activity Introducing the Use and Interpretation of BLAST. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 238-243. <http://dx.doi.org/10.1128/jmbe.v14i2.637>.
- Niekerk, J.M., Groenewald, J.Z., Farr, D.F., Fourie, P.H., Halleen, F., Crous, P.W. (2005). Reassessment of *Phomopsis* species on grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 34, 27–39.
- Nita, M., Ellis, M.A., Wilson, L.L., Madden, L.V. (2006). Effects of application of fungicide during the dormant period on *Phomopsis* cane and leaf spot of grape disease intensity and inoculum production. *Plant Disease*, 90, 1195–1200.
- Nita, M., Ellis, M.A., Wilson, L.L., Madden, L.V. (2006). Evaluation of a Disease Warning System for *Phomopsis* Cane and Leaf Spot of Grape: A Field Study. *Plant Disease*, <https://doi.org/10.1094/PD-90-1239>.

- Nita, M., Ellis, M.A., Wilson, L.L., Madden, L.V. (2008). Variation in Disease Incidence of Phomopsis Cane and Leaf Spot of Grape in Commercial Vineyards in Ohio. *The American Phytopathological Society*, <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-7-1053>
- Nuss, D.L. (2000). Hypovirulence and chestnut blight: from the field to the laboratory and back. *Fungal pathology*, 149–170
- Nuss, D.L. (2005). Hypovirulence: mycoviruses at the Fungal-plant interface. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 632–642.
- Nuss, D.L. (2011). Mycoviruses, RNA silencing, and viral RNA recombination. *Advances in Virus Research Journal*, 80, 25-48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385987-7.00002-6>
- Nwokeoji, A. O., Kilby, M., Portwood, D.E., Dickman, M.J. (2017). Accurate Quantification of Nucleic Acids Using Hypochromicity Measurements in Conjunction with UV Spectrophotometry. *Analytical Chemistry*, 89, 13567–13574
- Özben, S. (2011), *Ankara ili bağ alanlarında görülen fungal hastalıkların ve yaygınlık oranlarının belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Özhendekçi, N. (1978). Kocaeli, Sakarya ve İstanbul illerinde bağlarda Ölükol hastalığını yapan etmen (*Phomopsis viticola*) üzerinde ön çalışmalar. *Zirai Mücadele Araştırma Yıllığı*, Sayı:12.
- PacBio, (2021). Pacific Biosciences. <http://www.pacb.com/> adresinden erişildi [E.T 17.07.2021].
- Pandey, B., Naidu, R.A., Grove, G.G. (2018). Detection and analysis of mycovirus-related RNA viruses from grape powdery mildew fungus *Erysiphe necator*. *Archives of Virology*, 163, 1019–1030.
- Papazova-Anakieva, I., Sotirovski, K., Cortesi, P., Milgroom, M.G. (2008). Horizontal transmission of hypoviruses between vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in Macedonia. *European Journal of Plant Pathology*, 120, 35–42.
- Pearson, R.C., Goheen, C. (1994). Phomopsis cane and leaf spot. In: Hewitt WB, Pearson RC, eds. Compendium of grape diseases. St. Paul, Minnesota: *The American Phytopathological Society*, 17-18.

- Perlerou C. and Diamandis S., (2006). Identification and geographic distribution of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* and occurrence of hypovirulence in Greece. *Forest Pathology*, 36, 413–421.
- Peyambari, M., Habibi, M., Fotouhifar, K.B., Dizadji, A., Roossinck, M.J. (2014). Molecular Characterization of a Novel Putative Partitivirus Infecting *Cytospora sacchari*, a Plant Pathogenic Fungus. *Plant Pathology Journal*, 30(2), 151-158. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.OA.01.2014.0005>
- Phillips, A.J.L. (1999). The relationship between *Diaporthe perijuncta* and *Phomopsis viticola* on grapevines. *Mycologia*, 91(6), 1001-1007.
- Preisig, O., Moleleki, N., Smit, W.A., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. (2000). A novel RNA mycovirus in a hypovirulent isolate of the plant pathogen *Diaporthe ambigua*. *Journal of General Virology*, 81, 3107–3114.
- Rawnsley, B., Wicks, T.J., Scott, E.S., Stummer, B.E. (2004). *Diaporthe perijuncta* does not cause Phomopsis cane and leaf spot disease of grapevine in Australia. *Plant Disease*, 88, 1005-1010.
- Rigling, D., Heiniger, U., Hohl, H.R. (1989). Reduction of laccase activity in dsRNA-containing hypovirulent strains of *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. *Phytopathology Journal*, 79, 219-233.
- Robin, C. and Heiniger, U. (2001). Chestnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica* hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow Landscape Research*, 76, 361–367
- 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.
- Santos, J.M., Correia, V.G., Phillips, A.J.L. (2010). Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. *Fungal Biology*, 114, 255–270
- Scheper, R.W.A. (2001). *Studies on the biology and genetic variation of Phomopsis on Grapevine*. Doctoral dissertation, Department of Applied and Molecular Ecology Faculty of Agricultural and Natural Resource Sciences, The University of Adelaide

- Scheper, R.W.A., Crane, D.C., Whisson, D.L., Scott, E.S. (2000). The *Diaporthe* teleomorph of *Phomopsis taxon 1* on grapevine. *Mycological Research*, 104(2), 226-231.
- Schilder, A.M.C., Erincik, O., Castlebury, L., Rossman, A., Ellis, M.A. (2005). Characterization of *Phomopsis* spp. Infecting Grapevines in the Great Lakes Region of North America. *Plant Disease*, 89, 755-762.
- Sergeeva, V., Nair, N.G., Barchia, A.I., Priest, M., Spooner-Hart, R. (2003). Germination of β conidia of *Phomopsis viticola*. *Australasian Plant Pathology*, 32, 105–107.
- Shamsi, W., Sato, Y., Jamala, A., Shahi, S., Kondo, H., Suzuki, N., Bhatti, M.F. (2019). Molecular and biological characterization of a novel botybirnavirus identified from a Pakistani isolate of *Alternaria alternata*. *Virus Research*, 263, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.01.006>
- Sharma, M., Guleria, S., Singh, K., Chauhan, A., Kulshrestha, S. (2018). Mycovirus associated hypovirulence, a potential method for biological control of *Fusarium* species. *Virus Disease*, 29(2), 134–140. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0438-4>
- Sinclair, J. (1993) *Phomopsis* seed decay of soybeans: a prototype for studying seed disease. *Plant Disease*, 77, 329–334
- Smit, W.A., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. (1996). Reduction of laccase activity and other hypovirulence associated traits in dsRNA-containing strains of *Diaporthe ambigua*. *Phytopathology*, 86, 1311–1316.
- Sotirovski, K., Papazova-Anakieva, I., Grunwald, N.J., Milgroom, M.G. (2004). Low diversity of vegetative compatibility types and mating type in *Cryphonectria parasitica* in the southern Balkans. *Plant Pathology*, 53, 325–333.
- Strauss, E.E., Lakshman, D.K., Tavantzis, S.M. (2000). Molecular characterization of the genome of a partitivirus from the basidiomycete *Rhizoctonia solani*. *Journal General Virology*, 81, 549–555.
- Suzuki, N. and D.L. Nuss. (2002). Contribution of protein p40 to hypovirusmediated modulation of fungal host phenotype and viral RNA accumulation. *Journal Virology*, 76, 7747–7759.

- Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGM), (2011). *Zirai Mücadele Teknik Talimatları 2011. Gıda, tarım ve hayvancılık bakanlığı, tarımsal araştırmalar ve politikalar genel müdürlüğü*. <https://arastirma.tarim.gov.tr/tepge> adresinden erişildi.
- Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGM), (2019). *Zirai Mücadele Teknik Talimatları 2019. Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü*. <https://arastirma.tarim.gov.tr/tepge> adresinden erişildi.
- Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü Müdürlüğü (TEPGEM), (2019). *Tarım Ürünleri Piyasaları, 2019. Tarımsal Ekonomi Politika Geliştirme Enstitüsü*. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge> adresinden erişildi.
- Teviotdale, B., Adaskaveg, J., Michailides, T., Gubler, D. (2003). Fungicide Efficacy and Timing for Deciduous tree fruit and nut crops and grapevines. *University of Californiai*.
- 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.
- Tuomivirta, T.T., Uotila, A., Hantula, J. (2002). Two independent double-stranded RNA patterns occur in the Finnish *Gremmeniella abietina* var. *abietina* type A. *Forest Pathology*, 32, 197–205. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2002.00285.x>
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), (2018). *Bitkisel Üretim İstatistikleri, 2018. Türkiye İstatistik Kurumu*. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselpp/bitkise.zul> adresinden erişildi.
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), (2019). *Bitkisel Üretim İstatistikleri, 2019. Türkiye İstatistik Kurumu*. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselpp/bitkise.zul> adresinden erişildi.
- Udayanga, D., Liu, X., Crous, P.W., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E., Hyde, K.D. (2012). A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (Phomopsis). *Fungal Diversity*, 56, 157–17. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0190-9>
- Udayanga, D., Liu,X., McKenzie, E.H.C., Chukeatirote, E., Bahkali, A.H.A., Hyde, K.D. (2011). The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity*, 50, 189–225. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0126-9>
- Uecker, F.A. (1998). A World list of *Phomopsis* names with notse on nomenclature, morphology and biology. *Mycologia Memoir*, 13, 1-231.

- Úrbez-Torres, J.R., Adams, P., Kamas, J., Gubler, W.D., (2009). Identification, Incidence, and Pathogenicity of Fungal Species Associated with Grapevine Dieback in Texas. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60(4), 497.
- Úrbez-Torres, J.R., Peduto, F., Smith, R.J., Gubler, W.D. (2013). Phomopsis dieback: a grapevine trunk disease caused by *Phomopsis viticola* in California. *Plant Disease*, 97, 1571-1579. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1072-RE>
- Úrbez-Torres, J.R., Peduto, F., Striegler, R.K., Urrea-Romero, K.E., Rupe, J.C., Cartwright, R.D., Gubler, W.D. (2012). Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. *Fungal Divers*, 52, 169-189.
- Ünal, R. ve Onoğur, E. (1991, October 7-11). *Recherches sur l'induction de la resistance contre la maladie d'excoriose de la vigne (Phomopsis viticola Sacc.)* [Abstracts of Papers]. 6. Turkish Phytopathological Congress, İzmir, Turkey, 20(2-3), 104.
- Valverde, R.A. and De La Torre-Almaraz, R. (2016). Extraction and purification of large dsRNAs from virus-infected plants and fungi; applications in virus detection and identification. *Mexican Journal of Phytopathology*, 35, 80-105. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1606-9>
- Valverde, R.A., Nameth, S., Jordan, S. (1990). Analysis of double-stranded RNA for plant virus Diagnosis. *Plant Disease*, 74(3), 255 – 258.
- Van Dijk, E.L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genetics Journal*, 30, 418–426.
- Van Niekerk, J.M., Groenewald, J.Z., Farr, D.F., Fourie, P.H., Halleen, F., Crous, P.W. (2005). Reassessment of Phomopsis species on grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 34, 27–39. <https://doi.org/10.1071/AP04072>
- Wang, J., Ni, Y., Liu, X., Zhao, H., Xiao, Y., Xiao, X., Li, S., and Liu, H. (2020). Divergent RNA viruses in *Macrophomina phaseolina* exhibit potential as virocontrol agents. *Virus Evolution*, 7(1): veaa095. <https://doi.org/10.1093/ve/veaa095>
- Wang, J., Xiao, Y., Zhao, H., Ni, Y., Liu, X., Zhao, X., Wang, G., Xiao, X and Liu, H. (2019) A novel double-stranded RNA mycovirus that infects *Macrophomina phaseolina*. *Archives of Virology*, 164, 2411–2416. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04334-6>

- Wang, L., Zhang, J., Zhang, H., Qiu, D., and Guo, L. (2016). Two novel relative double-stranded RNA mycoviruses infecting *Fusarium poae* strain SX63. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 641–654. <https://doi.org/10.3390/ijms17050641>
- Wang, Q., Cheng, S.h., Xiao, X., Cheng, J., Fu, Y., Chen, T., Jiang, D., and Xie, J. (2019). Discovery of Two Mycoviruses by High-Throughput Sequencing and Assembly of Mycovirus-Derived Small Silencing RNAs From a Hypovirulent Strain of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Front. Microbiol*, 10, 1415.
- Wicks, T. and Rawnsley, B. (2002). *Phomopsis viticola*: pathogenicity and management. Project No. SAR 99/1, GWRDC Final report.
- Wightwick, A. and Allinson, G. (2007). Pesticide residues in Victorian waterways a review. *Australasian Journal of Ecotoxicology*, 13, 9–112.
- Wilcox, A.H., Delwart, E., Díaz Muñoz, S.L. (2019). Next-generation sequencing of double stranded RNA is greatly improved by treatment with the inexpensive denaturing reagent DMSO. *Biorxiv Preprin*, <http://dx.doi.org/10.1101/644591>
- Wu, M.D., Zhang, L., Li, G.Q., Jiang, D.H., Hou, M.S., and Huang, H.C. (2007). Hypovirulence and double-stranded RNA in *Botrytis cinerea*. *The American Phytopathological Society*, 97, 1590-1599.
- Wu, S., Cheng, J., Fu, Y., Chen, T., Jiang, D., Ghabrial, S.A., Xie, J. (2017). Virus-mediated suppression of host non-self recognition facilitates horizontal transmission of heterologous viruses. *PLoS Pathog*, 13:e1006234.
- Xie, J. and Jiang, D. (2014). New Insights into Mycoviruses and Exploration for the Biological Control of Crop Fungal Diseases. *Annual Review Phytopathology*, 52, 45–68.
- Yaegashi, H., Nakamura, H., Sawahata, T., Sasaki, A., Iwanami, Y., Ito, T., and Kanematsu, S. (2013). Appearance of mycovirus-like double-stranded RNAs in the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*, in an apple orchard. *FEMS Microbiology Ecology*, 83, 49-62.
- Yao, Z., Zou, Ch., Peng, N., Zhu, Y., Bao, Y., Zhou, Q., Wu, Q., Chen, B., Zhang, M. (2020). Virome Identification and Characterization of *Fusarium sacchari* and *F. andiyazi* Causative Agents of Pokkah Boeng Disease in Sugarcane. *Front Microbiol Journal*, 11, 240.

- Yıldırım, I., (2014). Influence of some food additive chemicals to *Phomopsis viticola* sacc. *Review on Agriculture and Rural Development*, 3(1), 2063-4803.
- Yu, X., Li, B., Fu, Y., Jiang, D., Ghabrial, S.A., Li, G. (2010). A geminivirus related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 107, 8387–8392. <https://doi.org/10.1073>
- Zamora, P., Martín, A., San Martín, R., Martínez-Álvarez P., Diez, J. (2014). Control of chestnut blight by the use of hypovirulent strains of the fungus *Cryphonectria parasitica* in northwestern Spain. *Biological Control*, 79, 58-66.
- Zhai, L., Xiang, J., Zhang, M., Fu, M., Yang, Z., Hong, N., Wang, G. (2015). Characterization of a novel double-stranded RNA mycovirus conferring hypovirulence from the phytopathogenic fungus *Botryosphaeria dothidea*. *Virology*, 493, 75–85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.03.012>
- Zhang, C.J., Zhou, X.Y., Zhong, J., Guo, J., Yang, X.P., Zhu, H.J. (2020). Complete nucleotide sequence of a novel partitivirus infecting the plant-pathogenic fungus *Phomopsis vexans*. *Archives of Virology*, <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04835-9>
- Zhang, R.J., Zhong, J., Shang, H.H., Pan, X.T., Zhu, H.J., Gao, B.D. (2015). The complete nucleotide sequence and genomic organization of a novel victorivirus with two non-overlapping ORFs, identified in the plant-pathogenic fungus *Phomopsis vexans*, *Archives of Virology*, 160, 1805–1809.
- Zhang, Y. Z., Shi, M., Holmes, E.C. (2018). Using metagenomics to characterize an expanding virosphere. *National Center for Biotechnology Information*, 172, 1168–1172.
- Zheng, L., Zhang, M., Chen, Q., Zhu, M., Zhou, E. (2014). A novel mycovirus closely related to viruses in the genus Alphapartitivirus confers hypovirulence in the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Virology*, 456- 220.

EKLER

Ek 1. *Phomopsis* spp. izolatların α sporları ölçümünün sayısal verileri

Aydın			Denizli			Manisa			İzmir					
İzolat	Boy	En	İzolat	Boy	En	İzolat	Boy	En	İzolat	Boy	En	İzolat	Boy	En
754Ko	9,5	2,06	856Ç	9,31	2,31	964Sr	9,26	2,47	778Se	9,29	2,37	1055	9,45	1,97
755Ko	8,39	2,55	858Ç	8,63	2,2	965Sr	9,87	1,78	779Se	8,15	1,71	B	9,58	1,63
756Ko	9,82	1,71	860Ç	9,30	2,07	986Sr	9,33	2,37	780Se	9,21	1,8	1056	10,51	2,19
759Ko	8,92	2,47	861Ç	8,01	1,73	993Sr	9,45	2,35	781Se	9,52	1,7	B	8,65	2,27
762Ko	8,55	2,75	862Ç	8,33	2,8	995Sr	10,42	2,42	783Se	8,59	2,8	1057	9,52	1,51
763Ko	8,31	2,39	865ç	9	2,16	996Sr	9,55	1,76	784Se	8,49	1,77	B	8,67	2,29
765Ko	9,87	2,19	867Ç	10,53	2,81	997Sr	8,45	2,75	785Se	5,39	1,71	1060	8,77	2,51
770Sö	9,57	1,79	869Ç	9	2,8	998Sr	9,24	2,31	786Se	9,66	1,82	B	8,78	1,85
771Sö	8,7	2,3	870ç	9,30	2,03	1003Sr	9,81	2,38	788Se	9,41	2,46	1061	9,11	1,64
803Ku	8,37	2,75	878Ç	10,36	2,8	1005Sr	10,86	2,78	791Se	9,38	2,3	B	8,29	2,58
805Ku	8,82	2,2	880Ç	9,63	1,75	1006Sr	8,96	1,87	793Se	9,33	2,07	1065	8,39	1,64
812Ku	8,73	2,53	882Ç	9,88	2,18	1012Sr	8,7	1,74	799Se	9,11	2,27	B	9,15	2,38
813Ku	9,02	2,25	884ç	9,1	2,25	1014Sr	9,41	2,33	910M	9,46	1,8	1066	8,29	2,55
815Ku	8,57	1,82	885Ç	8,95	2,8	1018Sr	9,78	1,73	919M	9,45	2,25	B	9,17	2,15
818Ku	8,58	2,32	887Ç	9,46	1,76	1021Sr	9,44	1,86	927M	9,29	2,73	1071	9,20	1,87
820ku	8,88	2,3	888G	8,99	2,15	1106Sa	10,56	2,8	936M	8,69	1,78	B		
822Ku	8,85	2,78	889G	9,54	2,45	1107Sa	8,26	1,76	941M	10,41	2,36	906M		
823Ku	9,18	2,25	890G	9,28	2,5	1108Sa	10,87	1,74	947M	8,73	1,95	921M		
827Ku	8,89	1,88	891G	8,69	1,71	1109Sa	9,1	2,28	955M	9,76	2,17	933M		
828Ku	9,34	2,29	892G	9,63	2,25	1111Sa	9,21	2,34	959M	10,25	2,16	1052		
831Ku	11,04	2,32	894G	8,45	1,74	1112Sa	8,1	1,77	961M	10,32	2,33	B		
841Ku	8,45	1,79	896Bu	9,45	2,36	1115Sa	9,25	2,34	962M	8,77	1,83	774Se		
842Ku	8,9	2,27	1242Bu	9,44	1,74	1116Sa	8,92	2,23	1024K	5,42	1,79	1062		
843Ku	9,6	2,32	1243Bu	9,22	2,21	1117Sa	9,1	2,21	1027K	8,17	1,81	B		
844Ku	9,16	2,16	1244Bu	9,27	1,85	1118Sa	9,86	1,97	1028K	5,43	1,79	1058		
847Ku	9,9	2,68	1245Bu	9,41	2,27	1119Sa	9,48	2,41	1032K	9,62	1,73	B		
848Ku	8,6	2,41	1248Bu	9,36	8,18	1120Sa	10,75	1,87	1035K	8,91	2,8			
1208Na	9,54	2,75	1249Bu	9,31	2,1	1121Sa	9,34	2,47	1036K	10,69	1,72			
1209Na	8,46	1,76	1250Bu	9,48	2,46	1124Sa	8,23	1,72	1043K	10,41	2,52			
1210Na	9,48	1,78	1251Bu	9,65	2,85	1127Sa	9,31	1,71	1045K	9,61	1,73			
1211Na	9,29	2,26	1252Bu	10,19	2,78	1143Sa	9,17	1,73	1070B	9,31	1,84			
1212Na	9,2	2,27	1253Bu	8,71	2,2	1145Sa	9,79	2,44	1072B	8,88	1,77			
1213Na	8,65	1,76	1254Bu	9,11	2,34	1149Sa	9,83	1,26	1079B	5,65	1,82			
1215Na	9,34	2,29	1255Bu	8,75	2,24	1151Sa	9,54	1,85	1080B	9,35	1,86			
1216Na	11,03	2,78	1258Bu	9,85	1,85	1157Al	9,37	2,31	1084B	9,98	1,73			
1220Na	9,42	2,38	1259Bu	8,82	2,22	1158Al	8,48	2,34	1085B	10,61	1,77			
1221Na	9,22	2,33	1260Bu	9,22	2,2	1159Al	10,46	1,79	1086B	8,45	1,73			
1222Na	9,18	2,31	1262Bu	9,29	2,45	1160Al	8,98	2,37	1088B	9,32	2,29			
1223Na	9,42	2,34	1264Bu	9,31	2,3	1161Al	9,46	2,35	1091B	8,77	2,37			
1225Na	8,11	1,71	1265Bu	9,74	2,33	1164Al	9,17	2,38	1092B	8,67	1,71			
1226Na	9,71	2,54	1266Bu	9,1	2,33	1167Al	9,13	2,42	1095B	8,88	2,19			
1227Na	9,28	2,36	1267Bu	9,88	2,28	1173Al	9,38	2,39	1098B	9,1	2,41			
1229Na	9,18	2,31	1268Bu	9,42	2,36	1185Al	9,29	2,29	1100B	8,19	1,75			
1230Na	9,5	2,37	1269Bu	9,65	2,2	1194Al	8,53	1,12	1101B	8,49	1,74			
1233Na	9,85	1,71	1270Bu	9,45	2,32	1197Al	9,69	2,34	1102B	9,1	2,48			
809Ku	7,73	2,18	898Bu	9,5	2,1	1205Al	9,62	2,26	1273E	8,49	1,34			
808Ku	8,02	2,33	901Bu	9,51	2,23	1207Al	8,1	1,45	f	9,1	2,48			
811-Ku	7,57	2,23	899Bu	8,74	2,43	1128Sa	10,57	1,7	1286B	9,52	1,62			
821Ku	8,68	2,21	900Bu	9,20	2,68	1135Sa	9,69	1,8	a	8,71	2,58			
825Ku	8,98	2,54	903Bu	9,78	2,45	1141Sa	9,73	2,47	772Se	10,59	1,83			
830Ku	8,61	1,21				966Sr	9,84	2,25	904M	10,61	1,64			
832Ku	7,18	2,34				970Sr	8,37	2,48	913M	9,71	1,57			
837Ku	8,79	2,46				971Sr	8,98	2,22	922M	9,21	1,72			
						981Sr	10,26	2,29	926M	8,78	1,96			
						982Sr	8,78	2,39	1048B	5,85	1,43			
						979Sr	9,56	2,18	1049B					
						1129Sa	9,27	2,28	1050B					
						1137Sa	9,23	2,35						

Not: İzolat isimlendirmelerinde; Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Şöke, Ç Çal, Bu Buldan, Se Selçuk, M Menemen, Ef Efem Cukuru, K Kemalpaşa, B Bayındır, Sr Saruhanlı Sa Salihli, Al Alaşehir

Ek 2. Fungal izolatların β sporları ölçümünün sayısal verileri

İller	İzolat	Boy	En
Aydın	762Ko	22,09	0,89
	803Ku	23,31	0,83
	805Ku	24,85	0,95
Denizli	1229Na	23,95	0,97
	870Ç	23,26	0,95
Manisa	998Sr	23,917	0,91
	1109Sa	24,09	1,05
	1124Sa	20,5	0,89
İzmir	784Se	24,03	1,06
	910M	22,11	0,89
	919M	23,79	0,99
	927M	23,58	0,99
	1070B	25,14	1,01

Not: İzolat isimlendirmelerinde; Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Şöke, Ç Çal, Bu Buldan, Se Selçuk, M Menemen, Ef Efem Cukuru, K Kemalpaşa, B Bayındır, Sr Saruhanlı Sa Salihli, Al Alaşehir

Ek 3. dsRNA pozitif 12 *Phomopsis viticola* izolatlarının biyolojik ve kültürel özellikleri

İzolat	Kloni rengi	Koloni gelişim hızı ¹	Piknit skala değeri ²	Alfa spor boyutu		Dikey Geçiş	S.V ³	Y.V ⁴	Yatay Geçiş	S.V.A ⁵ (%)	Y.V.A ⁶ (%)
				Boy (µm)	En (µm)						
780Se	Gri	III	3	9.21	1.8	%100	0,5dd	16,6cd	++	14,11	46,57
1091B	Beyaz	III	1	8.77	2.37	%100	0,6d	17,5cd	++++	11,04	19,39
1061B	Beyaz	III	3	9.52	1.51	%60	0,7d	17,2cd	++++	11,27	17,63
861Ç	Gri	III	3	8.01	1.73	%70	0,8cd	27,5bc	++	16,33	42,83
1027K	Beyaz	II	2	8.17	1.81	%40	1,2cd	24,7bcdf	++++	-	-
889G	Gri	II	2	9.54	2.45	%100	1,5cd	7,6d	0	15,63	26,32
961M	Beyaz	III	2	10.32	2.33	%100	1,5cd	10,6cd	++	15,51	44,08
962M	Gri	III	3	8.77	1.83	%100	1,9cd	17,2cd	++	16,33	49,37
1098B	Gri	III	3	9.1	2.41	%100	2,3cd	14,8cd	++++	9,82	12,21
841Ku	Gri	II	3	8.45	1.79	%100	2,5cd	13,2cd	++	1,3	25,03
903M	Beyaz	II	2	9.78	2.45	%60	4,7bc	25,6bcd	++	-	-
1216Na	Beyaz	II	1	11.03	2.78	%80	6,6b	36,7bc	+++	4,12	12,31

Not: Na Nazilli, Ku Kuşadası, Ç Çal, Se Selçuk, G Gğney, M Menemen, K Kemalpaşa, B Bayındır, I: grup I (1,9-3,6), grup II (3,61-5,3) ve grup III (5,31-7), 2: 0-4 skalası (1 cm² lik alanda piknit sayısı): 0: piknit yok; 1: 1-25 piknit; 2: 26-50 piknit; 3: 50-100 piknit; 4: >100 piknit, 3: sürgünde virülenslik, 4: yaprakta virülenslik, 5: sürgünde virülenslik azalma, 6: yaprakta virülenslik azalma.

Ek 4. 961M den virüs genomun dışında saptanan fungal kontingler

Kontingler	Accession N.
Diaporthe longicolla mitochondrion, complete genome	KP137411.1
Diaporthe phaseolorum large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	AY779295.1
Colletotrichum acutatum strain KC05 mitochondrion, complete genome	KR349346.1
Colletotrichum tamarilloi mitochondrion, complete genome	KU196965.1
Colletotrichum lupini strain CBS 119142 culture-collection	KT918406.1
Colletotrichum falcatum mitovirus 1 strain CfMv1CoC 671, complete genome	MK279482.1
Stenocarpella maydis strain Sm.A1-1 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer	KP164561.1
Diaporthe sp. strain LFIT03 small subunit ribosomal RNA gene	MK299422.1
Phomopsis sp. M-32 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	KP067912.1
Phomopsis sp. U4A2-A genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA	AB665312.1
Phomopsis mali genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA	AB665315.1
Trichoderma citrinoviride N-terminal fungal transcription regulatory	XM_024895064.1
Colletotrichum graminicola M1.001 hypothetical protein partial mRNA	XM_008092529.1
Fusarium fujikuroi IMI 58289 related to zinc cluster transcription factor	XM_023579281.1
Fusarium verticillioides 7600 hypothetical protein (FVEG_02173), mRNA	XM_018889362.1
Fusarium verticillioides 7600 hypothetical protein (FVEG_02173), mRNA	XM_018889361.1
Diaporthe longicolla mitochondrion, complete genome	KP137411.1
Diaporthe eres isolate AFTOL-ID 935 12S small subunit ribosomal RNA gene	FJ190607.1
Diaporthe phaseolorum isolate AFTOL-ID 357 12S ribosomal RNA gene	AY584703.1
Diaporthe phaseolorum small subunit ribosomal RNA gene	AY779326.1
Phomopsis viticola STE-U2642 small subunit ribosomal RNA gene	AF230780.1
Stenocarpella maydis strain Sm.A1-1 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer	KP164561.1
Myceliophthora thermophila ATCC 42464 chromosome 7, complete sequence	CP003008.1
Chaetomium thermophilum var. thermophilum DSM 1495 26S ribosomal RNA	XR_002966752.1
Podospora anserina genomic DNA, chromosome 3	FO904938.1
Neurospora crassa 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1	FJ360521.1
Diaporthe longicolla mitochondrion, complete genome	KP137411.1
Cryphonectria parasitica InC9 insertion within small subunit ribosomal RNA	AF218209.1
Chrysosporthe cubensis mitochondrion, complete genome	KT380885.1
Chrysosporthe deuterocubensis mitochondrion, complete genome	KT380884.1
Chrysosporthe austroafricana mitochondrion, complete genome	KT380883.1
Metarhizium brunneum ARSEF 3297 hypothetical protein partial mRNA	XM_014691584.1
Metarhizium robertsii ARSEF 23 hypothetical protein mRNA	XM_007820038.2

Ek 5. 962M den virüs genomun dışında saptanan fungal kontingler

Kontingler	Accession N.
Stenocarpella maydis strain Sm.A1-1 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer	KP164561.1
Myceliophthora thermophila ATCC 42464 chromosome 7, complete sequence	CP003008.1
Podospora anserina genomic DNA, chromosome 3	FO904938.1
Fusarium proliferatum partial 18S rRNA gene for 18S ribosomal RNA	LT841264.1
Fusarium proliferatum partial 18S rRNA gene for 18S ribosomal RNA	LT841250.1
Diaporthe longicolla mitochondrion, complete genome	KP137411.1
Phomopsis viticola STE-U2642 small subunit ribosomal RNA gene	AF230780.1
Phomopsis viticola STE-U2662 small subunit ribosomal RNA gene	AF230782.1
Phomopsis sp. STE-U2680 small subunit ribosomal RNA gene	AF230776.1
Diaporthe phaseolorum isolate AFTOL-ID 357 12S ribosomal RNA gene	AY584703.1
Diaporthe longicolla mitochondrion, complete genome	KP137411.1
Diaporthe phaseolorum large subunit ribosomal RNA gene	AY779295.1
Colletotrichum acutatum strain KC05 mitochondrion, complete genome	KR349346.1
Colletotrichum tamarilloi mitochondrion, complete genome	KU196965.1
Colletotrichum lupini strain CBS 119142 culture-collection CBS:119142	KT918406.1
Colletotrichum gloeosporioides authority Colletotrichum gloeosporioides	AF264028.1
Oryzias latipes strain HSOK chromosome 9	CP020629.1
Diaporthe longicolla mitochondrion, complete genome	KP137411.1
Diaporthe eres isolate AFTOL-ID 935 12S small subunit ribosomal RNA gene	FJ190607.1
Diaporthe phaseolorum isolate AFTOL-ID 357 12S ribosomal RNA gene	AY584703.1
Diaporthe phaseolorum small subunit ribosomal RNA gene	AY779326.1
Phomopsis viticola STE-U2642 small subunit ribosomal RNA gene	AF230780.1
Cryphonectria parasitica mitochondrion, complete genome	KT428651.1
Chrysosporthe deuterocubensis mitochondrion, complete genome	KT380884.1
Chrysosporthe cubensis mitochondrion, complete genome	KT380885.1
Diaporthe longicolla mitochondrion, complete genome	KP137411.1
Diaporthe maritima strain NB365-71I 28S ribosomal RNA gene	KU552028.1
Colletotrichum higginsianum IMI 349063 C2H2 transcription factor mRNA	XM_018307805.1
Grosmannia clavigera kw1407 c2h2 transcription factor partial mRNA	XM_014312556.1
Fonsecaea multimorphosa CBS 102226 hypothetical protein partial mRNA	XM_016770895.1
Neurospora crassa OR74A C2H2 transcription factor (rpn-4), partial mRNA	XM_950915.2
Epichloe typhina strain E8 mitochondrion, complete genome	KX066185.1
Epichloe festucae strain AR5 mitochondrion, complete genome	KX066186.1
Epichloe hybrida strain Lp1 mitochondrion, complete genome	KX066187.1
Cryphonectria parasitica mitochondrion, complete genome	KT428651.1
Diaporthe longicolla mitochondrion, complete genome	KP137411.1
Phaeoacremonium minimum UCRPA7 putative zinc finger transcription	XM_007919753.1
Colletotrichum gloeosporioides isolate Cg14 zinc transcription	KU925876.1
Thermothelomyces thermophilus ATCC 42464 uncharacterized protein	XM_003659367.1
Myceliophthora thermophila ATCC 42464 chromosome 1	CP003002.1
Fusarium proliferatum ET1 probable Cys2-His2 zinc finger transcription factor	XM_031220059.1
Amoebidium parasiticum mitochondrial chromosome 0681iay42_mtg_cplt	AF538042.1
Ceratocystis albifundus isolate CMW17620 mitochondrion	NC_045185.1
Thermothelomyces thermophilus ATCC 42464 glycoside hydrolase	XM_003664102.1
Myceliophthora thermophila ATCC 42464 chromosome 4	CP003005.1
Pestalotiopsis fici W106-1 hypothetical protein mRNA	XM_007838923.1
Colletotrichum orchidophilum glycolipid anchored surface protein	XM_022612341.1
Trichoderma asperellum CBS 433.97 carbohydrate-binding module	XM_024901391.1
Sordaria macrospora k-hell uncharacterized protein (SMAC_05105)	XM_003346798.1
Grosmannia clavigera kw1407 glycoside hydrolase family 72 partial mRNA	XM_014314372.1
Nectria haematococca mpVI 77-13-4 hypothetical protein, mRNA	XM_003047746.1
Fusarium proliferatum ET1 uncharacterized protein (FPRO_01384)	XM_031232072.1
Fusarium fujikuroi strain Augusto2 chromosome I	CP023089.1
Pyricularia oryzae isolate MZ5-1-6 chromosome 5, complete sequence	CP034208.1
Pyricularia oryzae 70-15 uncharacterized protein (MGG_17531), mRNA	XM_003718974.1
Trichoderma atroviride IMI 206040 hypothetical protein partial mRNA	XM_014091929.1
Sodiomyces alkalinus F11 hypothetical protein (SODALDRAFT_204800)	XM_028607235.1

Trichoderma reesei QM6a chromosome V, complete sequence	CP016236.1
Pestalotiopsis fici W106-1 hypothetical protein mRNA	XM_007836151.1
Phialemoniopsis curvata uncharacterized protein (EOL32_004658)	XM_031139093.1
Colletotrichum higginsianum IMI 349063 C2H2 finger domain-containing protein	XM_018307965.1
Fusarium proliferatum ET1 uncharacterized protein (FPRO_11845)	XM_031221365.1
Sporothrix schenckii 1099-18 C2H2 finger domain protein (SPSK_05296)	XM_016732046.1
Phaeoacremonium minimum UCRPA7 putative gtp-binding protein partial mRNA	XM_007917114.1
Thermothelomyces thermophilus ATCC 42464 uncharacterized	XM_003661152.1
Myceliophthora thermophila ATCC 42464 chromosome 2	CP003003.1
Neurospora crassa OR74A GTP-binding protein EsdC (NCU03600)	XM_956234.3
Neurospora tetrasperma FGSC 2508 hypothetical protein mRNA	XM_009850103.1
Colletotrichum graminicola M1.001 glutamine synthetase partial mRNA	XM_008094824.1
Colletotrichum orchidophilum glutamine synthetase (CORC01_06809)	XM_022618448.1
Neurospora tetrasperma FGSC 2508 cross-pathway control protein 1 mRNA	XM_009856094.1
Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:002-155-A06, full insert sequence	AK109093.1
Diaporthe longicolla mitochondrion, complete genome	KP137411.1
Chrysosporthe cubensis mitochondrion, complete genome	KT380885.1
Chrysosporthe deuterocubensis mitochondrion, complete genome	KT380884.1
Chrysosporthe austroafricana mitochondrion, complete genome	KT380883.1
Cryphonectria parasitica mitochondrion, complete genome	KT428651.1
Cryphonectria parasitica enolase (Eno1) gene, complete cds	AY499570.1
Chrysosporthe deuterocubensis mitochondrion, complete genome	KT380884.1
Cryphonectria parasitica mitochondrion, complete genome	KT428651.1
Chrysosporthe cubensis mitochondrion, complete genome	KT380885.1
Diaporthe longicolla mitochondrion, complete genome	KP137411.1
Diaporthe longicolla mitochondrion, complete genome	KP137411.1

T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“BAĞ ALANLARINDA ÖLÜKOL HASTALIĞI ETMENİ *PHOMOPSIS VITICOLA* (SACC.) SACC. İZOLATLARINDA DSRNA’NIN TANILANMASI, MOLEKÜLER VE BİYOLOJİK KARAKTERİZASYONU İLE HİPOVİRÜLENT ETKİSİ” başlıklı Doktora tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Sahra HOSSEINALIZADEH

14/06/2021