

T.C.  
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİTKİ KORUMA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI  
2022-YL-034

**PAMUK SOLGUNLUK HASTALIK ETMENİ *Verticillium*  
*dahliae*'da BELİRLENEN MİKOVİRAL dsRNA'NIN  
TANILANMASI VE VİRÜLENSLİK ETKİSİNİN  
BELİRLENMESİ**

**FATMA SELİN TÜREMEN**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ**

Bu tez ZRF- 19015 numarası ile Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

**AYDIN-2022**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamda bilgi, tecrübe ve yardımını esirgemeyen sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ başta olmak üzere Sayın Prof. Dr. Ömer ERİNCİK ve Öğr. Gör. Dr. Birsen GEÇİOĞLU ERİNCİK hocama, tez konum ile ilgili tecrübe paylaşımında bulunan ve sorularımı yanıtlamaktan mutluluk duyan hocalarım; Prof. Dr. Seher BENLİOĞLU, Prof. Dr. Ayhan YILDIZ, Doç. Dr. Ümit ÖZYILMAZ ve Araş. Gör. Yunus KORKOM'a teşekkürü bir borç bilirim.

Değerli jüri üyelerimden Prof. Dr. Savaş Korkmaz hocama, tezimi dikkatli ve özverili bir şekilde incelemesi, yol göstermesi, geliştirip katkıda bulunmasından dolayı teşekkürlerimi saygıyla sunarım.

Tez dönemim boyunca gerek arkadaşlık gerek bilgi ve tecrübe paylaşımı olsun her konuda destek olan ablalarım; Arş. Gör. Sevdije YORGANCI ve Dr. Sahra HOSSEINALIZADEH'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayat boyunca desteklerini hep hissettiğim canım annem ve abime, maddi ve manevi yanımda olan arkadaşlarımın en başında gelen Zir. Yük. Müh. Canan ERDEM ve Zir. Yük. Müh. Göktürk Yiğit YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
RESİMLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ÖZET .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	7
2.1. Pamuk Solgunluk Hastalık Etmeni <i>Verticillium dahliae</i> .....	7
2.2. Türkiye’de <i>Verticillium dahliae</i> Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	8
2.3. <i>Verticillium dahliae</i> Mücadelesi ve Mikovirüs Çalışmaları.....	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1. Materyal.....	13
3.2. Yöntem .....	13
3.2.1. Örneklerin Elde Edilmesi .....	13
3.2.2. <i>Verticillium dahliae</i> İzolasyonu.....	14
3.2.3. <i>Verticillium dahliae</i> ’ nın Kültüre Alınması ve Tanılanması .....	15
3.2.4. <i>Verticillium dahliae</i> İzolatlarında Mikoviral dsRNA Varlığının Belirlenmesi .....	16
3.2.4.1. Selefon Disk Üzerinde <i>Verticillium dahliae</i> Kültüre Alınması.....	16
3.2.4.2. <i>Verticillium dahliae</i> İzolatlarında Fenol-Kloroform İçermeyen dsRNA İzolasyon Yöntemi .....	16

3.2.5. dsRNA İçeren ve İçermeyen <i>Verticillium dahliae</i> İzolatlarının Kültürel Özelliklerinin Karşılaştırılması.....	18
3.2.6. Virülenslik Testi .....	18
3.2.6.1. Gövde Enjeksiyon Yöntemi .....	19
3.2.6.2. Kök Daldırma Yöntemi .....	20
3.2.7. dsRNA Analiz Yöntemi .....	20
3.2.7.1. Patates Dekstroz (PD) Broth Ortamında Geliştirilmesi.....	21
3.2.7.2. <i>Verticillium dahliae</i> İzolatlarında CF-11 Selüloz Kolon Kromatografisi ile dsRNA Analiz Yöntemi .....	21
3.2.8. <i>Verticillium dahliae</i> 'dan İzole Edilen Mikoviral dsRNA'nın RT-PCR ile Tanılanması.....	23
3.2.8.1. Primer Tasarımı .....	23
3.2.8.2. <i>Verticillium dahliae</i> 'dan İzole Edilen Mikoviral dsRNA'nın Miktar Tayini.....	24
3.2.8.3. RT-PCR .....	24
3.2.9. Mikoviral dsRNA'nın Sekans Dizileme Analizi.....	25
3.2.9.1. Sekans Analizi .....	25
3.2.9.2. BLAST Analizi ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması.....	25
4. BULGULAR .....	26
4.1. <i>Verticillium dahliae</i> Örneklerindeki Belirtiler .....	26
4.2. <i>Verticillium dahliae</i> 'nin Tanılanması ve Kültüre Alınması .....	26
4.3. <i>Verticillium dahliae</i> İzolatlarında Mikoviral dsRNA Varlığının Belirlenmesi .....	28
4.4. dsRNA İçeren ve İçermeyen <i>Verticillium dahliae</i> İzolatlarının Kültürel Özelliklerinin Karşılaştırılması .....	29
4.5. Virülenslik Testi .....	30
4.5.1. Gövde Enjeksiyon Yöntemi .....	31
4.5.2. Kök Daldırma Yöntemi .....	33
4.6. Morris & Dodds (1979) Yöntemi ile dsRNA Analizi .....	34

4.7. <i>Verticillium dahliae</i> 'den İzole Edilen Mikoviral dsRNA'nın RT-PCR ile Tanılanması.....	35
4.7.1. Primer tasarımı .....	35
4.7.2. <i>Verticillium dahliae</i> 'dan İzole Edilen Mikoviral dsRNA'nın Miktar Tayini.....	36
4.7.3. RT-PCR .....	36
4.8. Mikoviral dsRNA'nın Sekans Dizileme Analizi .....	38
4.8.1. Sekans Analizi .....	38
4.8.2. Blast Analizi ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması .....	38
5. TARTIŞMA.....	40
5.1. Pamukta <i>Verticillium dahliae</i> 'nin Oluşturduğu Hastalık Belirtileri.....	40
5.2. <i>Verticillium dahliae</i> Kültürlerindeki Morfolojik Gözlemler.....	40
5.3. <i>Verticillium dahliae</i> Mikovirüsünün dsRNA Analizi ve Tanılanması .....	41
5.4. dsRNA İçeren ve İçermeyen <i>V. dahliae</i> İzolatlarının Karşılaştırılması .....	42
5.5. Virülenslik Testlerinin Değerlendirilmesi .....	42
5.6. <i>Verticillium dahliae</i> 'dan Elde Edilen dsRNA'nın RT-PCR ile Tanılanması .....	43
5.7. <i>Verticillium dahliae</i> 'dan Elde Edilen Mikovirüsün Sekans Analizi ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	43
6. SONUÇ.....	45
KAYNAKLAR.....	57
BİLİMSEL ETİK BEYANI .....	54
ÖZ GEÇMİŞ.....	55

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>dsRNA</b>	: double-stranded RNA-viruses
<b>g</b>	: Gram
<b>kbp</b>	: Kilobasepair
<b>mg</b>	: Miligram
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>NCBI</b>	: National Center for Biottechnology Informotion
<b>ng/µl</b>	: Mikrolitre başına Nanogram
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>RT-PCR</b>	: Reverse-Transtcriptase Polymerase Chain Reaction
<b>UV</b>	: Ultraviyole

## RESİMLER DİZİNİ

- Resim 3.1.** Aydın ili Söke ilçesi 2018 Kasım ayı pamuk alanlarından alınan solgunluk belirtisi gösteren dal örnekleri (A, B). ..... 14
- Resim 3.2.** Pamuk dal örneklerinden alınan parçaların izolasyon aşamaları; Solgunluk belirtisi gösteren pamuk bitkisi gövde kesiti (A), Örneklerin izolasyon için hazırlanması (B), Yüzey dezenfeksiyonu aşaması (C), İzolasyon işlemi yapılan örneklerin PDA besiyeri ortamına ekilmesi (D). ..... 15
- Resim 3.3.** *Verticillium dahliae* izolatlarının Balija vd. (2008) yöntemine göre dsRNA analiz aşamaları; *V. dahliae*'ya ait fungal miselyumların sıvı nitrojen ile ezilmesi (A), selüloz kolondan mikoviral dsRNA'ların süzülmesi (B). ..... 18
- Resim 3.4.** Pamuk bitkisine gövde enjeksiyon yöntemine göre dsRNA içermeyen ve içeren *V. dahliae* izolatlarından hazırlanan spor süspansiyonunun inokulasyon aşamaları; Pamuk bitkisine steril iğne ile inokulum enjekte edilmesi (A), İnokulum işlemi tamamlanan bitkilerin 4 tekerrürlü olarak etiketlenip iklim odasına yerleştirilmesi (B). ..... 19
- Resim 3.5.** Pamuk bitkisinin kök daldırma yöntemine göre dsRNA içermeyen ve içeren *V. dahliae* izolatlarından hazırlanan spor süspansiyonunun inokulasyon aşamaları; Pamuk fidelerinin spor süspansiyonu içerisinde bekletilmesi (A), Fidelerin 4 tekerrürlü olarak saksılara şaşırtılıp etiketlenerek iklim odasına yerleştirilmesi (B). ..... 20
- Resim 3.6.** PD (broth) ortamına ekimi yapılmış *Verticillium dahliae*'nin inkübasyon için Thermoshake cihazına yerleştirilmesi. .... 21
- Resim 3.7.** *V. dahliae* izolatlarının Morris ve Dodds (1979) analiz yöntemine göre dsRNA analiz aşamaları; İzolatların buz içerisinde shaker cihazına yerleştirilmesi (A), *V. dahliae* izolatlarının santrifüj sonrası üç faz oluşturması (B), CF-11 selüloz kolon kromatografisi ile mikoviral dsRNA'ların süzülmesi (C). ..... 23
- Resim 4.1.** Pamuk dal örneklerindeki iletim demetlerinde sararma ve kahverengileşme belirtileri (A, B). ..... 26

- Resim 4.2.** *Verticillium dahliae* izolatlarının makroskopik ve mikroskopik görüntüleri; *Verticillium dahliae*'nin PDA besiyeri üzerinde sırasıyla, gri, beyaz, siyah, renkte misel oluşturması (A, B, C), *Verticillium dahliae*'nin hiflerinin mikroskopik görüntüsü (D), Verticillant dallanma görüntüsü (E)..... 27
- Resim 4.3.** Baliya vd. (2008) yöntemine göre *Verticillium dahliae* izolatlarından elde edilen mikoviral dsRNA profillerinin jel elektroforez sonucu görüntüsü, Lambda DNA marker (HindIII) (M), pozitif kontrol (*Cryphonectria parasitica*) (1), dsRNA içeren izolatlar (2-N14), (4-N15), (5-N46), (6-N95), (8-N82), (9-N12), (11-N40). dsRNA içermeyen izolatlar (3-N76), (7-N42), (10-N70), (12-N38), (13-N85)..... 29
- Resim 4.4.** *Verticillium dahliae* izolatlarının arasından dsRNA içeren ve dsRNA içermeyen izolatların karşılaştırılması (A, B)..... 30
- Resim 4.5.** Soldan sağa doğru pamuk bitkilerinin gövde enjeksiyon yöntemi uygulandıktan sonraki görünüşleri; Kontrol bitkisi, dsRNA içermeyen *Verticillium dahliae* izolatı inokule edilen bitki, dsRNA içeren *Verticillium dahliae* izolatları inokule edilen bitkiler..... 32
- Resim 4.6.** Gövde enjeksiyon yöntemi uygulanmış *Verticillium solgunluk* belirtisi gösteren pamuk yaprak örnekleri..... 32
- Resim 4.7.** Soldan sağa doğru pamuk bitkilerinin kök daldırma yöntemi ile uygulandıktan sonraki görünüşleri; Kontrol bitkileri (1), dsRNA negatif izolat inokule edilen bitkiler (2), 3)dsRNA pozitif izolat inokule edilen bitkiler (3,4,5,6,7,8). ..... 34
- Resim 4.8.** Kök daldırma yöntemi uygulanmış *Verticillium solgunluk* belirtisi gösteren pamuk bitkileri..... 34
- Resim 4.9.** Morris ve Dodds (1979) yöntemine göre *Verticillium dahliae* izolatlarından elde edilen mikoviral dsRNA profillerinin jel elektroforezdeki görüntüsü; Lambda DNA Marker (HindIII) (M), pozitif kontrol (*Cryphonectria parasitica*) (1), dsRNA içermeyen izolat (2-N50), dsRNA içeren izolatlar (3-N95), (4-N77), (5-N58), (6-N15)..... 35



- Resim 4.10.** RT-PCR yapılan *Verticillium dahliae*'ya ait mikoviral dsRNA'ların jel elektroforez görüntüsü; (1-N95), (2-N77), (3-N58), (4-N15), (5-650), (6-612), (7-N97), (8-N34). ..... 37
- Resim 4.11.** RT-PCR sonucu pozitif sonuç veren izolatların GelAnalyzer 19.1 programı ile bant boyutlarının ölçülmesi 1) 100bp DNA Ladder 2) N77 3)N58 4)N15. 37
- Resim 4.12.** Mega11 programı yardımıyla Neighbour Joining 1000 replicate bootstrap metodu ile oluşturulmuş filogenetik ağacı, N58 ve 1484 numaralı izolat çalışmada elde edilen izolatlardır. .... 39



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1.</b> Dünya pamuk ekim alanı ve lif üretimi .....	2
<b>Çizelge 1.2.</b> Dünya pamuk üretimi yapan ülkelerin lif üretim miktar ve payları.....	2
<b>Çizelge 1.3.</b> 2019-2010 yılları arasında Türkiye'deki pamuk ekim alanları, kütlü üretim, lif üretim, kütlü verim ve lif verim miktarları. ....	3
<b>Çizelge 1.4.</b> Türkiye'nin pamuk yetiştirilen bölgelerindeki pamuk ekim alanı, kütlü üretimi, lif üretimi, kütlü ve lif verim miktarları .....	3
<b>Çizelge 1.5.</b> Aydın ilinin ilçelerine göre 2020 yılı pamuk ekim alanları, üretim ve verim miktarları.....	4
<b>Çizelge 4.1.</b> <i>Verticillium dahliae</i> olduğu belirlenen izolatların isimleri. ....	27
<b>Çizelge 4.2.</b> dsRNA analiz yöntemine göre analizleri yapılan ve dsRNA içeren ve içermeyen <i>Verticillium dahliae</i> izolatları .....	28
<b>Çizelge 4.3.</b> Her iki patojenisite yöntemi için kullanılmak üzere seçilen mikoviral dsRNA içeren ve içermeyen izolatların listesi.....	30
<b>Çizelge 4.4.</b> Gövde enjeksiyon yöntemi sonuç verilerinin SPSS analiz sonucu ve Hastalık şiddeti değerleri (%). ....	31
<b>Çizelge 4.5.</b> Kök daldırma yöntemi sonuç verilerinin SPSS analiz sonucu ve %Hastalık şiddeti değerleri. ....	33
<b>Çizelge 4.6.</b> VDPV1'in tüm genom dizisi kullanılarak tasarlanmış primer çifti. ....	36
<b>Çizelge 4.7.</b> Mikoviral dsRNA içeren seçilmiş <i>Verticillium dahliae</i> izolatlarının farklı dalga boylarındaki içerdiği dsRNA miktarları ve dsRNA konsantrasyonları. .	36

## ÖZET

### PAMUK SOLGUNLUK HASTALIK ETMENİ *Verticillium dahliae*'da BELİRLENEN MİKOVİRAL dsRNA'NIN TANILANMASI VE VİRÜLENSLİK ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Türemen F. S. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın 2021.

**Amaç:** Bu çalışma Aydın ilinde pamukta saptanan *Verticillium dahliae*'ya ait dsRNA'nın tanısının yapılması amacıyla ele alınmıştır.

**Materyal ve Yöntem:** Aydın ilinden elde edilen stok olarak bulunan *V. dahliae* izolatları ve Aydın ilinde pamuk üretiminin yoğun olarak yapıldığı Söke ilçesinden *Verticillium* solgunluk belirtileri gösterdiği tahmin edilen 76 adet pamuk dal örneğinden 33'nün *V. dahliae* olduğu belirlenmiştir. *V. dahliae* izolatlarından dsRNA analizleri Balija vd. (2008)'e göre yapılarak izolatlarda mikoviral dsRNA belirlenmiş ve tek basamaklı RT-PCR yöntemi ile tanısı yapılmıştır.

**Bulgular:** Elde edilen 20 ile 1 kb arasında profil boyutlarında dsRNA'ların tanısında Çin'de *V. dahliae* enfekteli pamuk bitkisinden izole edilmiş (Feng vd., 2013) *Verticillium dahliae* partitivirus 1'in NCBI'daki nükleotit dizisi kullanılarak tasarlanan Primer 3 programı ile primer çifti kullanılarak tanılanmıştır. dsRNA içeren ve içermeyen *V. dahliae* fungal izolatlarının virulenslikleri arasındaki farkların belirlenmesi için gövde enjeksiyon ve kök daldırma yöntemleri sonucu mikoviral dsRNA içeren fungal izolatlardan (650) birisinin dsRNA virülensliğinin en düşük, ikisinin (N34, N40) ise en yüksek olduğu SPSS analizi sonucu ile belirlenmiştir. Pozitif sonuç alınan dsRNA örneklerinden agar jel elektroforezde en net bant profili veren ve patojenisite denemesinde en iyi sonuç alınan 5 adet izolalat seçilerek sekans dizi analizi yapılmıştır.

**Sonuç:** Elde edilen dsRNA dizilerinin BLAST ve MEGA analizleri sonucunda Aydın ilinde saptanan dsRNA örneklerinin Feng vd. (2013) ve Canizares vd. (2015)'in çalışmalarındaki *Verticillium dahliae* partitivirus 1 ve *Verticillium dahliae* partitivirus ol-1 olarak

isimlendirilen mikovirüslere ortalama %94 ile 98 oranlarında benzer olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** sRNA, Mikovirüs, Patojenisite, RT-PCR, Sekans, *Verticillium dahliae*.



## ABSTRACT

### IDENTIFICATION of DSRNA MYCOVIRUSES IN VERTICILLIUM WILT AGENT AND EFFECT OF VIRULENCE ON COTTON

Türemen F. S. Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Plant Protection Program, Master Thesis, Aydın, 2022.

**Objective:** This study was carried out in order to diagnose the mycovirus of *Verticillium dahliae* detected in cotton at Aydın province.

**Material and Methods:** *V. dahliae* isolates found as stock obtained from Aydın province A total of 76 cotton branch samples were collected from Söke district in Aydın province where cotton production is intense. These samples were isolated and 33 isolates were determined to be *V. dahliae*. dsRNA analyzes of all isolates were performed by Baliya et al. (2008) mycovirus dsRNA detection was performed.

**Results:** Mycoviral dsRNA analysis was performed from *V. dahliae* isolates obtained from the districts of Aydın where cotton production is intense for the identification of the dsRNAs obtained by RT-PCR method firstly, *Verticillium dahliae* Partitivirus 1 which was isolated from *V.dahliae* infected cotton plant in China (Feng et al., 2013) was primer paired with the Primer 3 program using the nucleotide sequence in NCBI was designed. The resulting *V.dahliae* infected dsRNA isolates gave a positive reaction in one-step RT-PCR using the designed primer. As result of both stem injection and root immersion methods used to determine the differences between the virulence of *V.dahliae* fungal isolates with and without dsRNA it was determined by SPSS that one of the funga isolates (650) containing mycoviral dsRNA had the lowest virulence and the two (N34, N40) had the highest. Sequence analysis was performed by selecting 5 isolates from the dsRNA samples with positive results which gave the clearest band profile in agar jel electrophoresis and got the best results in the pathogenicity test.

**Conclusion:** As a result of the BLAST and MEGA analyzes of the obtained dsRNA sequences the dsRNA samples detected in Aydın province were determined by Feng et al.

(2013) and Canizares et al. (2015) were found to be similar to the mycoviruses named *V.dahliae* partitivirus 1 and *V. dahliae* partitivirus ol-1 in their studies with an average of %94 to %98.

**Key words:** dsRNA, Mikovirus, Pathogenicity, RT-PCR, Sequence *Verticillium dahliae*,



# 1. GİRİŞ

Pamuk bitkisi Malveles takımı, Malvaceae familyasından *Gossypium* cinsi içerisinde yer almaktadır (Lee vd., 2015). *Gossypium arboreum* L. ve *Gossypium herbaceum* L. olmak üzere iki tür eski dünya pamukları olarak adlandırılmaktadır. Buna karşın yeni dünya pamukları ise *Gossypium hirsutum* L., *Gossypium barbadense* L. ve *Gossypium tomentosum* L. türleridir. *Gossypium hirsutum* L. ve *Gossypium barbadense* L. türleri içerisinde yer alan çeşitlerin tarımı yoğun bir şekilde yapılmaktadır (Köken vd., 2020).

Dünya’da tarımı yapılan en eski kültür bitkilerinden biri olan pamuğun, geçmişte arkeolojik kazılara dayandırılmaktadır (Lee vd., 2015). M.Ö.300 yılında kumaş dokusunda kullanılan pamuğun birinci yüzyılda Anadolu’ya getirildiği arkeolojik kazılar sayesinde ortaya çıkmıştır. Pamuk bitkisinin anavatanının Asya, Amerika ve Afrika’nın sıcak bölgeleri olduğu tahmin edilmektedir (Gencer, 1987).

Pamuk değişen iklim koşullarına oldukça duyarlı olan tek yıllık bir bitkidir. Yetiştirme ortamı olarak dengeli sıcaklık ve dengeli koşullar istemektedir. Aniden değişen sıcaklık, yağış, don gibi hava olaylarına uygun bir bitki değildir. Pamuk için sıcaklığın çimlenene kadar 14°C, çimlendikten sonraki genç döneminde ise 25°C olması gerekmektedir. Çiçeklenme döneminde daha yüksek sıcaklıklara dayanabilmekte ve bu sıcaklıklar 37°C’ye kadar ulaşabilmektedir (Kara, 1988).

Toprak isteği bakımından her türlü toprakta yetişebilen bir bitki olmakla birlikte süzek ve alüvyalli toprakları sevmektedir. Asitlik bakımından toprak toleransı ve pH’sı 6.5-7.5 orta dereceli tuzsuz topraklarda iyi yetişmektedir. Pamuk tarımı için en elverişli topraklar derin, killi, kumlu, su tutma yeteneği yüksek, geçirgenliği, işlenmesi ve sulanması kolay topraklardır (Anonim, 2020).

Pamuk, lifinin tekstil sanayisinde kullanımı kadar, tohumunun yağ için ve kalıntılarının da hayvan yemi olarak kullanımı, endüstriyel selülozun da en önemli kaynaklarından biri olması (Gençer, 2010) ve birçok alanda istihdam imkânı sağlaması nedeniyle üretici ülkeler için büyük önem arz etmektedir (Lee, 2015).

Dünya’daki pamuk üretimi ve ithalatı yıllardır Çin’e ait olurken son zamanlarda rapor edilen verilere göre Hindistan, Çin’in önüne geçmiştir. 2019/20 sezonu tahmini rakamlarına

göre ülkemiz dünya üretim sıralamasında ilk 5 ülke içerisinde değilken, dünya tüketim sıralamasında ilk 5 ülke içerisinde yer almaktadır (TOB, 2020).

Dünya’da pamuk ekim alanları son yıllara bakıldığında artan bir seyir göstermektedir. Bunun yanısıra ekim alanlarının artmasına da bağlı olarak lif üretiminde de artış görülmektedir (Çizelge 1.1).

**Çizelge 1.1.** Dünya pamuk ekim alanı ve lif üretimi (TOB, 2021a).

Yıllar	Pamuk Ekim Alanı (Milyon ha)	Pamuk Lif Üretimi (Milyon ton)
2015/2016	30,8	20,9
2016/2017	29,9	23,2
2017/2018	33,7	26,9
2018/2019	33,4	25,8
2019/2020	35,3	26,6

2020/2021 sezonu ABD Tarım Bakanlığı verilerine göre Dünya’da pamuk üretimi yapan ülkelerin lif üretim miktarları ve payları Çizelge 1.2 de verilmiştir. Buna göre en çok artış %26 oranla Hindistan, %24 Çin, %13 ABD, %11 Brezilya, %4 Pakistan, %3 ile Türkiye ve Özbekistan’da görülmektedir (Çizelge 1.2).

**Çizelge 1.2.** Dünya pamuk üretimi yapan ülkelerin lif üretim miktar ve payları (TOB, 2021b).

Ülkeler	Lif Üretim Miktarı (Ton)	%Pay
Hindistan	6,4	26
Çin	5,9	24
ABD	3,2	13
Brezilya	2,6	11
Pakistan	0,936	4
Türkiye	0,784	3
Özbekistan	0,762	3
Dünya	24,6	

Pamuk fiyatlarında ve desteklerinde yaşanan olumlu gelişmeler neticesinde 2016/17 ürün sezonundan bu yana Türkiye’de pamuk ekim alanları yeniden artan bir seyir izlemiştir. TÜİK verilerine göre 2019/20 sezonunda pamuk ekim alanları bir önceki yıla kıyasla %8 gerileyerek 477 bin hektar olarak kayıtlara geçmiştir (Çizelge 1.3).



**Çizelge 1.3.** 2019-2010 yılları arasında Türkiye’deki pamuk ekim alanları, kütlü üretim, lif üretim, kütlü verim ve lif verim miktarları.

Yıl	Ekilen Alan (da)	Kütlü Üretim (ton)	Lif Üretim (ton)	Kütlü Verim (kg/da)	Lif Verim (kg/da) (ton)
2019	4 778 681	2 200 000	814 000	460	170
2018	5 186 342	2 570 000	976 000	496	188
2017	5 018 534	2 450 000	882 000	488	176
2016	4 160 098	2 100 000	756 000	505	182
2015	4 340 134	2 050 000	738 000	472	170
2014	4 681 429	2 350 000	846 000	502	181
2013	4 508 900	2 250 000	877 500	499	195
2012	4 884 963	2 320 000	858 400	475	176
2011	5 420 000	2 580 000	954 600	476	176
2010	4 806 500	2 150 000	816 705	447	170

Türkiye’de pamuk bitkisinin yetiştirilme alanları, Ege, Akdeniz, Güneydoğu Anadolu Bölgeleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ege Bölgesi kütlü ve lif üretimi içerisinde ikinci sırada yer almaktadır (Çizelge 1.4.). 2019 TÜİK verilerine göre, Türkiye’de üretilen pamuğun %84’ünü karşılayan 6 il sırasıyla Şanlıurfa (%37), Aydın (%11), Diyarbakır (%11), Hatay (%10), Adana (%9) ve İzmir (%6)’dir (Anonim, 2020).

**Çizelge 1.4.** Türkiye’nin pamuk yetiştirilen bölgelerindeki pamuk ekim alanı, kütlü üretimi, lif üretimi, kütlü ve lif verim miktarları (TÜİK, 2020).

Bölgeler	Ekilen Alan (da)	Kütlü Üretim (ton)	Lif Üretim (ton)	Kütlü Verim (kg/da)	Lif Verim (kg/da)
Ege	1.011.626	527.244	195.080	521	193
Güneydoğu	1.895.537	888.035	328.572	468	173
Akdeniz	679.991	356.311	131.838	524	194

Aydın ilinin ilçeleri arasında ekim alanı bakımından en yüksek değerle birinci sırayı Söke ilçesi almaktadır. Bunu takiben ikinci sırada Koçarlı, üçüncü sırada Germencik ilçesi bulunmaktadır (Çizelge 1.5.).

**Çizelge 1.5.** Aydın ilinin ilçelerine göre 2020 yılı pamuk ekim alanları, üretim ve verim miktarları (TÜİK, 2020).

İlçeler	Ekilen alan (da)	Üretim Miktarı (ton)	Verim (kg/da)
Buharkent	805	416	517
Didim	31.000	14.300	461
Efeler	33.150	17.162	518
Germencik	<b>40.000</b>	<b>19.300</b>	<b>483</b>
Koçarlı	<b>71.400</b>	<b>34.755</b>	<b>487</b>
Kuyucak	880	435	494
Köşk	3500	1735	496
Nazilli	15.645	8128	520
Sultanhisar	1800	876	487
Söke	<b>315.600</b>	<b>157.958</b>	<b>501</b>
Yenipazar	5700	2836	498
Çine	190	101	532
İncirliova	25.000	13.625	545

Dünya ve ülkemiz için en önemli kültür bitkilerinden biri olan pamukta 20 kadar fungal hastalık belirlenmiştir (Erdoğan, 2009). Bunlardan bazıları *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia solani* Kühn., *Alternaria spp.*'dir (Yılmaz, 2009). Ancak Antalya bölgesinde bu hastalıklardan en yaygınının pamuk solgunluk hastalık etmeni *Verticillium dahliae* olduğu Çelik vd, (2010) tarafından bildirilmiştir. *V.dahliae* Kleb. pamuk bitkisinin yanısıra; enginar, biber, patlıcan, antepfıstığı, zeytin, domates, çilek gibi birçok bitkide de hastalık yaptığı belirtilmiştir (Koike ve ark., 1994). Dünya'da *Verticillium* cinsi 1816'da Melouk (1992) tarafından tanımlanmış ve alt bölüm Deuteromycotina'nın, Hypomycetes sınıfına dahil etmiştir.

Solgunluğa neden olan bu hastalık etmeni *V. dahliae*'nin erken dönemde bodur bitki oluşumu belirtileri, kozaların küçük kalmasına ve koza sayısının normalden daha az olmasına sebep olduğu Karaca, (1974) tarafından bildirilmiştir. Solgunluk hastalığının oluşumundaki bir diğer etken ise; patojenin ksilemde kolonize olması ve ksilemin tıkanmasına yol açan tyloz oluşturmasıdır. Bu yapısal bozukluk besin maddesi ve su geçişine engel olduğu için bitkide solgunluk belirtisi oluşmaktadır (Korkmaz, 2005).

Ege Bölgesi İzmir, Aydın ve Manisa illerinde belirlenen *V. dahliae*'nin pamukta ürün kaybının %31 olduğu bildirilmiştir (Karaca, 1971). *V. dahliae*'nin ciddi oranda pamukta verim ve ürün kayıplarına neden olduğu ifade edilmiştir (Pegg, 1984). Dünya genelinde pamukta solgunluk hastalığı sebebiyle yıllık tahmini ürün kaybının 1,5 milyon balya olduğu ifade edilmiştir (Nemli, 2003). Çin'deki pamuk üretim alanlarının %50'sinden daha fazlasının her yıl pamuk solgunluk hastalığından etkilendiği ve yıllık 100 bin tonun üzerinde

verim kaybına sebep olduğu rapor edilmiştir (Li vd., 2003). Kaliforniya’da ise pamukta *Verticillium solgunluk* sebebiyle verim kaybının %75, Rusya’da %8-10, Suriye’de %4 olduğu bildirilmiştir (Bejerano vd., 1996).

Karaca (1971) ve Esentepe (1979), pamukta solgunluk hastalığının Ege ve Akdeniz Bölgesi başta olmak üzere pamuk yetiştirilen alanların tamamında yaygın olduğunu ve bu oranın da %96.80 olduğunu belirtmişlerdir. Pamuk solgunluk hastalığına yakalanma oranının, Ege Bölgesi illerinden İzmir’de %21.68, Aydın’da %36.64 ve Manisa’da %34.01 olduğu bildirilmiştir (Karaca, 1971). Batı Akdeniz Bölgesinde pamukta solgunluk hastalığına yakalanma oranının Antalya’da %14 iken Çukurova Bölgesinde Adana’da %25 olduğunu ve ürün kayıplarının ise Antalya’da %4, Adana’da %12 olduğu Sezgin (1985) tarafından belirlenmiştir. Sağır vd. (1995), Güneydoğu Anadolu Bölgesinde ise Adıyaman, Batman, Diyarbakır, Mardin, Şanlıurfa ve Siirt illerinde hastalığa yakalanma oranının %16 olduğunu bildirmişlerdir.

Pamuk solgunluk hastalığı ile mücadele kapsamında dayanıklı çeşit kullanımı, ekim nöbeti, yabancı ot mücadelesi hasat kalıntılarını azaltmak, dengeli sulama ve gübreleme gibi kültürel işlemler önerilmektedir (Sezgin, 1985). Ancak mücadele konusunda uygulanan kültürel önlemlerin yetersiz kaldığı bilinmekte ve hastalığın kimyasal mücadelesinde ruhsatlı bir fungusit bulunmamaktadır (Çelik vd., 2010). Pamukta *Verticillium solgunluk* hastalığının kimyasal mücadelesinin olmaması ve kültürel önlemlerin yetersiz kalması biyolojik mücadeleyi ön plana çıkarmaktadır. Alternatif mücadele yöntemi olarak *Verticillium solgunluk* hastalığı için araştırılan konulardan biri de biyolojik mücadelenin uygulanabilmesidir (Al-Rawahi ve Hancock, 1998). Bu nedenle fungal hastalıklardan korunma amaçlı biyolojik mücadele ajanı olarak dsRNA mikovirüslerinin kullanım olanakları araştırılmaktadır. Fungusların anastomosis özelliği ile mikovirüslerin hücrede taşınımı gerçekleşmektedir. Kestane kanseri hastalığının biyolojik kontrolünde *Cryphonectria hipovirus 1*’in kullanılması mikovirüs bazlı biyolojik mücadeleye verilebilecek en güzel örneklerden biridir (Anagnostakis ve Jaynes, 1973).

Çin’de pamuk üretiminin yoğun olarak yapıldığı bölgelerinden toplanan *V. dahliae* örneklerinde mikoviral dsRNA saptanmıştır (Coa vd., 2011). *V.dahliae*’ya ait 4 segment içeren mikoviral dsRNA bant ağırlıklarının 3.6-3.4, 3.3, 3.0 kb arasında değiştiği tespit edilmiştir. *V. dahliae*’dan izole edilen dsRNA’ların sekans analizi yapılarak tüm genom dizisi elde edilmiştir. Saptanan mikovirüs *V. dahliae* Chrysovirus 1 olarak isimlendirilmiş ve NCBI veri tabanına kaydı yapılmıştır. Fakat saptanan bu mikovirüs için spesifik primer

tasarımı yapılmamış ayrıca pamuk bitkisi kullanılarak *V. dahliae* Chrysovirus 1'in patojenisite testi de yapılmamıştır (Coa vd., 2011).

Coa vd. (2011)'nin çalışmasından sonra Çin'in pamuk üretimi yapılan üç bölgesinden *V. dahliae* örneklerinde mikoviral dsRNA varlığı üzerine yapılan araştırmada fungal etmene ait 2 segmentli mikoviral dsRNA saptanmış (Feng vd., 2013) ve bu dsRNA'nın moleküler boyutunun 1,7-1,5 kb olduğu tespit edilmiştir. *V. dahliae*'dan izole edilen dsRNA'ların sekans analizleri yapılarak tüm genom dizisi elde edilmiş ve NCBI'da *V. dahliae* partitivirus 1 olarak isimlendirilmiştir. *V. dahliae* partitivirus 1'e ait spesifik primer tasarımı yapılmamıştır. Ayrıca pamuk bitkisi üzerinde bu mikovirüs ile patojenisite testi de yapılmamıştır (Feng vd., 2013).

Türkiye Ege, Akdeniz, Güneydoğu Anadolu Bölgesindeki zeytinliklerinde yaptıkları çalışmada Kahramanmaraş ilinden elde edilen *V. dahliae* nin bir izolatında saptanan mikoviral dsRNA'nın tüm genom dizisi belirlenmiş ve ardından *V. dahliae* partitivirus 1-olive olarak isimlendirilerek NCBI kaydı ve spesifik primer tasarımı yapılmıştır (Canizares vd. 2015).

Aydın ilinin pamuk yetiştirilen Söke, Koçarlı ilçelerinden elde edilen 72 adet *V. dahliae* izolatından 12'sinde tek segmentli 18-20 kb ve üç segmentli 18-20 kb, 4-2 kb, 2-1 kb boyutlarında mikoviral dsRNA belirlenmiştir (Balcı ve Açıkgöz, 2019). Bu dsRNA'ların tanısı amacıyla, Canizares vd. (2015)'nin tasarlamış olduğu zeytindeki mikovirüs *V. dahliae* partitivirus olive 1'e spesifik primer kullanılarak RT-PCR yapılmış ancak sonuç alınamamış ve pamuktan izole edilen bu iki farklı dsRNA profilinin Canizares vd. (2015)'in saptadığı mikovirüsten farklı olduğu kanısına varılmıştır (Balcı ve Açıkgöz, 2019).

Bu çalışma kapsamında Aydın ili pamuk ekim alanlarından elde edilen *V. dahliae* izolatlarından elde edilen dsRNA profilinin moleküler boyut olarak Feng vd, (2013) tarafından elde edilen dsRNA profiline yakın olması nedeniyle *V. dahliae* partitivirus 1'e ait NCBI daki tüm genom dizisi (Feng vd., 2013) kullanılarak spesifik primer tasarlanmıştır. Bu primer ile yapılan RT-PCR pozitif sonuç vermiş ve böylece *V. dahliae*'dan izole edilen dsRNA'nın tanısı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürününün SANGER ile dizilemesi yapılarak dsRNA'nın *V. dahliae* partitivirus 1 ve *V. dahliae* partivirus 1-olive ile benzer olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *V. dahliae* mikovirüsünün pamukta patojenisite testi yapılmış ve bazı dsRNA'ların virülensliğinin yüksek olduğu, bazı dsRNA'ların ise virülensliğinin oldukça az olduğu, diğer dsRNA'ların da orta derecede etki gösterdiği belirlenmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Pamuk Solgunluk Hastalık Etmeni *Verticillium dahliae*

*Verticillium* solgunluk hastalığının 1914 yılında ilk defa ABD'nin Virginia eyaletinde serada yetiştirilen pamuk bitkisinde C.W. Carpenter tarafından (1914) teşhis edilmiş olduğu ifade edilmiştir (Fang vd., 2013). *Verticillium* cinsinin 1816 yılında tanımlanmış olduğunu Melouk (1992) bildirmiştir. 1817 yılında Nees von Esenbeck (1817) tarafından Almanya'da *Alcea rosea* (Gülhatmi) bitkisinden *Verticillium tenerum* patojeninin teşhis edilmiş olduğunu Subbarao ve Inderbitzin (2014) ifade etmişlerdir. *Verticillium* cinsinin ilk teşhis edilen türlerinden olan *Verticillium albo-atrum*'un 1879 yılında (Reinke vd., 1879) Almanya'da patateste solgunluk hastalığı oluşturduğunu yine Subbarao ve Inderbitzin (2014) bildirmiştir. Sonraki yıllarda *Verticillium* cinsinin daha fazla konukçuya sahip olduğu ve geniş bir ekolojiye yayılışı tespit edilmiş ve yıllar içinde tür teşhisi de artmıştır (Subbarao ve Inderbitzin, 2014). Tarla şartlarında ise hastalık etmeni 1927 yılında Tennessee'de ve 1930 yılında Kaliforniya'da saptanmıştır (Watkins, 1981). *V. dahliae*'nin 1935 yılında Çin'de pamuk bitkisinde görüldüğü tespit edilmiştir (Cai vd., 2009). Ardından *V. dahliae* Çin'deki pamuk yetiştirme alanlarında birincil patojen olmaya başlamıştır (Cai vd., 1982).

Fungal patojen *V. dahliae* kışı bitki artıkları üzerinde veya toprakta zor koşullara dayanabilen formu olan mikrosklerot yapısında geçirmektedir. Toprak kaynaklı bir fungus olup yaşamını toprakta 10-14 yıl boyunca sürdürebildiği gözlemlenmiştir (Agrios, 1997). Çalışmalarla birlikte fungusun bitkiye kök sistemi yoluyla girdiği ve hücreler arasında ilerleyerek ksileme kadar ulaştığı fakat floeme geçiş yapmadığı anlaşılmıştır (Schnathorst, 1981). Ksilemde, etmenin çoğalma yapısı olan konidiler oluşup buradan bitkinin diğer kısımlarından yapraklarına kadar ulaşmaktadır. Hastalık etmeni bitkiye giriş yaptıktan 14 gün sonra bitkide solgunluk belirtisi olduğu gözlemlenmiştir (Schnathorst, 1981). Bulaşık dokuların ve dökülen yaprakların toprağa karışmasıyla mikrosklerot yapısı oluşarak bu yaşam döngüsünün devam ettiği bildirilmiştir (Schnathorst, 1981).

Pamukta *Verticillium solgunluk* hastalığının oluşmasının, bitkinin dönemine, çevresel etkenlere ve sıcaklığa göre değişmekte olduğu saptanmıştır. Solgunluğun ilk belirtileri bitki gelişiminde yavaşlama olarak görülmekte ve bununla birlikte epinasti, yapraklarda renk açılmaları olarak devam etmekte ve ana damar hattı boyunca yaprak ucundan iç kısımlara doğru, sarı ve düzenli olmayan lekeler oluştuğu belirtilmiştir. Klorotik ve nekrotik lekeler yaşlı yapraklardan genç yapraklara doğru ilerleyip bitkinin gövdesinde olduğu gibi iletim demetlerinde de koyu ve kahverengi lekeler oluşturduğu Korkmaz, (2005) tarafından ifade edilmiştir. Etmen, bitkinin ksilem dokusunda koloni oluşturmakta ve bitki buna karşılık etmenin yayılmasını, gelişmesini engellemek amacıyla tyloz oluştururmasıyla ksilem tıkanmakta ve besin maddesi iletimi engellenerek solgunluk belirtileri oluşmaktadır (Ünal ve Aydın, 1980).

Pamuk solgunluk hastalığı ile ilgili çalışmalar devam ettikçe patojenin iki farklı straininin olduğu tespit edilmiştir (Karaca,1974). Yaprak dökme ve yaprak dökmeyen patotip olarak ayrımları yapılmıştır. *Verticillium solgunluğu* ilerledikçe ve hastalık şiddeti arttıkça yaprak dökümleri görülmektedir. Hastalık şiddeti fazla olsa da yaprak dökmeyen patotipinde, önce yapraklarda sararmalar, ilerleyen dönemlerinde ise kurumalar görülmektedir (Karaca, 1974).

## 2.2. Türkiye’de *Verticillium dahliae* Üzerine Yapılan Çalışmalar

Ülkemizde ilk defa bu hastalığın 1941 yılında Manisa Kırkağaç’da bulunduğunu İyriboz (1941) bildirmiştir. Karaca vd. (1971) tarafından ise etmenin *V. dahliae* Kleb. olduğu ifade edilmiştir.

Karaca vd. (1971) ve Esentepe (1979) *Verticillium solgunluğu* hastalığının pamuk yetiştirilen bölgeler içerisinde yer alan Ege Bölgesinde Aydın, Manisa, İzmir ve Akdeniz Bölgesinde ciddi verim kayıplarına neden olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarda hastalığa yakalanma oranının Aydın’da %36.64, Manisa’da 34.01, İzmir’de %21.68 olduğu belirlenmiştir (Karaca vd., 1971). Antalya’da ise bu oran 1970 yılında %4.83, 1971’de %13.85, 1976’da %6.54 olarak belirtilmiştir (Karaca vd., 1976). Esentepe (1979) pamukta *Verticillium solgunluğu*na yakalanma oranını Ege’de %27, verim kaybını %12 olarak ifade etmiştir. Kahramanmaraş, Hatay, Osmaniye, Mersin, Adana illerinde yapılan çalışmalarda *Verticillium solgunluğunun* %37.1 oranında yaygın olduğu, hastalık yoğunluğunun da %31.2 olduğu bildirilmiştir (Derviş ve Biçici, 2005).

Nazilli’de bazı pamuk çeşitlerinin ve çeşit adaylarının *V. dahliae*’ya karşı reaksiyonlarını belirlemek amacıyla 10 adet pamuk çeşit ve çeşit adayına gövde enjeksiyon yöntemi (Bugbee and Presley, 1967) uygulanarak iklim odası koşullarında 4 tekerrülü olarak saksı denemesi yapılmıştır (Erdoğan, 2009). İçeriğinde  $3 \times 10^7$  spor/ml içeren spor süspansiyonu her bitki 4-6 yapraklı dönemde iken steril iğne ile enjekte edilmiş ve denemenin 14. gününde Carmen çeşidi (%55.0) en düşük hastalık değerini gösterirken, bunu NGC (%63.5) ve GSN-12 (%66.0) çeşit adayları takip etmiştir. En yüksek hastalık şiddeti değerini gösteren grup ise Sayar 314 (%93.5) ile NMCH-11/4 (%91.0) çeşit adayları ve Nazilli 84S çeşidi olduğu belirlenmiştir (Erdoğan, 2009).

Ozan vd. (2004) Ankara ili Ayaş, Beypazarı, Nallıhan ilçelerinin domates ekim alanlarında solgunluk ve kök ve kökboğazı çürüklüğüne neden olan *V. dahliae*’nın ciddi verim kaybına neden olduğunu belirleyip kök daldırma yöntemi ile patojenisitesi üzerine çalışmışlardır. Bunun için dezenfekte edilen pamuk tohumları steril kum bulunan küvetlere ekilmiş ve 6 hafta sonra sökülerek temizlenen fide kökleri  $1 \times 10^6$  spor/ml içeren spor süspansiyonuna daldırılarak 45 dk bekletilmiştir. Ardından saksılara şaşırtılan fideler iklim odası koşullarında hastalık oluşumu için bekletilmiş ve yaklaşık 14 gün sonra solgunluk belirtisi vermeye başlayan bitkilerin hastalık oranı Hanson skalasına (Hanson, 2000) göre %0.52 olarak belirlenmiştir (Dikilitaş ve Smith 1998).

### **2.3. *Verticillium dahliae* Mücadelesi ve Mikovirüs Çalışmaları**

*Verticillium* solgunluk hastalığı ile mücadelede ruhsatlı bir fungusit bulunmadığı için kimyasal mücadele uygulanamamaktadır. Mücadele için; dengeli sulama, dengeli gübreleme, yabancı ot kontrolü gibi kültürel önlemler önerilmektedir (Sezgin, 1985). Ancak bütün bu önlemler tam anlamıyla *Verticillium* solgunluğu mücadelesinde yeterli olamamaktadır. *Verticillium* solgunluk hastalığı ile mücadelede mikovirüslerin biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılabilirliği son zamanlarda önem kazanmıştır. Fungal hastalıklarla mücadelede en iyi örnek kestane kanseri hastalığında biyolojik ajan olarak *Cyphonectria* hipovirüs 1’in kullanılması verilmektedir (Anagnostakis ve Jaynes, 1973). Çok yıllık bitki olan kestanede uygulanabilmesi tek yıllık bitkilerde de uygulanabilirliğinin araştırmasının önünü açmıştır. Tek yıllık olan çeltik bitkisinde mikoviral dsRNA içeren *Rhizoctonia solani* izolatları ile inokule edilen yapraklarda sclerotların oluştuğu, misel gelişiminin yavaşladığı tespit edilmiştir (Zheng vd., 2014). Ardından çeltikdeki *R.*

*solani*'nin biyolojik kontrolünde potansiyel rolü olan Partitivirus familyasının Alphapartitivirus genusuna ait bir dsRNA virüsü olduğu bildirilmiştir (Zheng vd., 2014). Endonezya'da yine çeltikten izole edilen *R. solani*'nin hipovirüent formundan hazırlanan inokulum solüsyonu çeltik bitkisinde hastalıklı yapraklar üzerine püskürtme yapılarak bulaştırılmış ve fungusun misel oluşumunun ve virülensliğinin azaldığı tespit edilmiştir (Supyani ve Hardjono, 2014). Çeltikteki bu bulgular tek yıllık bitkilerde de biyolojik kontrol ajanı olarak mikovirüs dsRNA'ların kullanılabilirliğini ve dsRNA içeren fungal izolatlardan hazırlanan inokulumun yapraklara püskürtülerek yapılacak uygulamanın başarılı olabileceğini göstermiştir.

Mikovirüsler fungal hücrelerde replike olan ve hücre içerisinde yayılış gösteren obligat parazitler olup replikasyon sırasında açığa çıkan single-stranded (ssRNA) ve double-stranded (dsRNA) genomlarını taşıyabilmektedirler. Fungal virüsler başlıca hifsel birleşme-anastomosis veya sporulasyon ile taşınmaktadır (Wang ve ark., 2017). Fungusların anastomosis özelliği, mikovirüslerin hücre içinde taşınması açısından önemlidir (Munoz-Adalia vd., 2016). Mikovirüsler, fungal virüs, mikofaj, virüs benzeri partikül olarak isimlendirilmektedir. Fungal virüsler genellikle gizli veya semptom vermeden devam eden infeksiyonlara neden olmaktadır. İnfekte ettikleri fungusların gelişimini yavaşlatma, virülensliğini azaltma, pigmentasyonu ve sporulasyonu azaltma gibi fenotipik özelliklerini değiştirebilen mikovirüsler konukçu fungusta olumsuz etkiler yaratmaktadırlar (Deng ve ark., 2007). Hipovirülenslik bitki patojeni fungusların virülensliğini azaltan bir durumdur. Hipovirülenslik fungal virüslerin bitki fungal hastalıklarının biyolojik kontrolünde kullanılabilen bir etki mekanizmasına sahip olduğu için bu konudaki çalışmalar ivme kazanarak devam etmektedir (Nuss, 2011).

İlk mikovirüs Hollings tarafından (1962) yılında *Agaricus bisporus*'da elde edilmiştir (Ghabrial vd., 2015). 1962 yılından bugüne kadar bazı bitki fungal hastalıklarda çok sayıda mikovirüs araştırmacılar 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 NCBI'da kaydı oluşturulmuştur (Li vd., 2019). Mikoviral dsRNA içeren funguslar genellikle genom özelliklerine göre beş familya içerisinde sınıflandırılırlar; Partitiviridae (2 segment, 1,4-2,3 kbp), Totiviridae (segment yok, 4.6-7 kbp), Chrysoviridae (4 segment, 2.4-3.6 kbp), Reoviridae (10-12 segment, 0.7-5 kbp), Megabirnaviridae (2 segment, 7-9 kbp) (Feng vd., 2013).



Çin’de pamuk tarımının yoğun olarak yapıldığı Sanyuan, Ningwei ve Weinan bölgelerinden elde edilen 11 adet *V. dahliae* izolatının sadece birinde mikoviral 4 segmentten oluşan dsRNA belirlenmiştir (Coa vd., 2011). Bu dsRNA profili azalan boyutlara göre; 1’den 4’e kadar numaralandırılmış ve dsRNA 1 yaklaşık 3.6 kbp, dsRNA 2 yaklaşık 3.3 kb, dsRNA 3 ve dsRNA 4’ün 3.0 kb’den daha az moleküler boyutta profil bantları görüntüsü verdiği saptanmıştır. Çift yönlü sekans analizi sonucunda 4 dsRNA segmentinin de NCBI veri tabanında BLASTn sekmesinden diğer mikovirüsler ile benzerlik oranlarına bakılmış ve %64-45 oranlarında Cryoviridae familyası ile benzer olduğu olduğu belirlenmiş ve *V. dahliae* Chrysovirus 1 olarak isimlendirilmiştir. Nükleotit dizilerinin erişim numaraları HM004067, HM004068, HM004069 ve HM004070 ile GenBank’a kaydı yapılmıştır. Bu mikovirüse ait spesifik bir primer tasarımı henüz yapılmamıştır (Coa vd., 2011).

Yine Çin’de pamuk üretim alanları Xinjiang, Yellow River and Yangtze River bölgelerinden elde edilen 30 adet *V. dahliae* izolatında mikoviral dsRNA varlığı Xie vd. (2006)’nın geliştirdiği yöntem ile araştırılmış ve Vd08284 numaralı izolatta 2 segmentli dsRNA varlığı saptanmıştır (Feng vd., 2013). Bu dsRNA profili dsRNA 1 ve dsRNA 2 olarak isimlendirilmiş ve boyutları 1768-1587 bp olarak belirlenmiştir. Mikovirüs dsRNA’nın sekanslaması yapıp Blastn ve Blastp analizi sonucu Partitiviridae familyasına %65-85 oranla Partitiviridae familyası ile benzer olduğu belirlenmiştir. *V. dahliae* Partitivirus 1 olarak isimlendirilip NCBI’ya Genbank ulaşım numaraları, KC422244.1 ve KC422243.1 olarak giriş yapılmıştır (Feng vd., 2013). Ancak bu mikoviral dsRNA dizilimine ait herhangi bir primer tasarımı henüz yapılmamıştır.

Derviş vd. (2010) Türkiye’de Ege (Aydın, Denizli, İzmir, Manisa ve Muğla), Akdeniz (Hatay, Kahramanmaraş ve Osmaniye), Marmara (Balıkesir, Bursa ve Çanakkale) ile Güneydoğu Anadolu (Gaziantep, Kilis ve Mardin) bölgelerindeki solgunluk belirtisi gösteren zeytin bitkilerinden *V. dahliae* izole etmişlerdir. Canizares vd. (2015) çalışmasında Derviş vd. (2010)’nın izole etmiş olduğu *V. dahliae* izolatları arasından sadece Kahramanmaraş’dan alınan Vd-253 izolatından mikoviral dsRNA’nın varlığını Morris ve Dodds, (1979)’un yöntemini kullanarak belirlemişlerdir. İki segment içerdiği saptanan bu mikoviral dsRNA’ların moleküler ağırlıkları 1.7-1.5 kbp olarak saptanmıştır. Elde edilen dsRNA’nın, heksamer ve spesifik primerler kullanılarak oluşturulan cDNA kütüphanesi ile sekans analizi yapılmış ve Partitivirus genusuna ait bir mikovirüs olduğu saptanmıştır. Bu mikovirüsün nükleotid dizilimini Feng vd. (2013)’in Çin’de pamuk bitkisinden elde etmiş

olduğu Partitiviridae familyasına ait olan mikovirüs VdPV1 ile karşılaştırmışlar ve ikisinin birbiri ile benzer olduğunu tespit etmişlerdir. Dolayısıyla, *V. dahliae* mikovirüsünün aynı Partitivirüsün iki farklı ırkı oldukları sonucuna varmışlardır. Bu nedenle, *V. dahliae* partitivirus 1-olive (VdPV1-ol) olarak adlandırmışlardır. Canizares vd., (2015) zeytin ağaçlarından elde ettikleri mikovirüsün sekanslarını KJ700651 ve KJ700652 erişim numaraları ile GenBank veri tabanına ilave etmişler ve bu dsRNA mikovirüsüne özgü primer tasarlamışlardır.

İspanya'nın güneyindeki Guadalquivir vadisinin zeytin yetiştirme alanlarından solgunluk belirtisi gösteren örnekler toplanmış ve 3 adet *V. dahliae* izolatında (B4.3, V94, V1431) mikoviral dsRNA varlığı tespit edilmiştir. Sekans analizi sonucu bu mikovirüslerin Tombusviridae familyasına ait olduğu belirlenmiştir. *V.dahliae* RNA Virus 1 olarak isimlendirilip her bir izolat için KY563742, KY563742, KY563741 olarak NCBI kaydı yapılmıştır (Canizares vd., 2017).

Ege Bölgesi'nin İzmir, Manisa, Denizli, Aydın illerinden alınan örneklerde bazı önemli fungal patojenlerin mikoviral dsRNA varlığı üzerine yapılan çalışmada; zeytin alanlarından elde edilen 50 adet *V. dahliae* izolatta Balija (2008) yöntemi ile dsRNA analizi yapılmıştır (Hosseinalizadeh vd., 2020). Sadece bir izolatta tek segmentli moleküler boyutu 18-20 kb olan mikoviral dsRNA varlığı saptanmıştır. Aynı çalışmada, pamuk bitkisinden elde edilen 50 *V. dahliae* izolatının üçünde 18-20 kb boyutlarında mikoviral dsRNA' varlığı belirlenmiştir (Hosseinalizadeh vd., 2020).

Aydın ilinin pamuk yetiştirilen Koçarlı ve Söke yörelerindeki solgunluk ve kuruma belirtisi gösteren pamuk bitkilerinin gövde kısımlarından örnekler alınmıştır. Bu örneklerden 72 adet *V. dahliae* izolatu elde edilmiştir. İzolatların 12'sinin mikoviral dsRNA içerdiği saptanmıştır (Balcı ve Açıkgöz, 2019). *V. dahliae* izolatındaki mikoviral dsRNA'nın tanısı için RT-PCR yönteminde *Verticillium dahliae* Partitivirus 1 VdPV1-ol mikovirüsüne ait spesifik primerlerin (Canizares vd., 2015) kullanılması mikovirüsün tanısı için uygun olmamıştır. Bu nedenle saptanan dsRNA mikovirüsünün *V. dahliae* Partitivirus 1 VdPV1-ol den farklı olabileceği ifade edilmiştir (Balcı ve Açıkgöz, 2019).

## 3. MATERİYAL VE YÖNTEM

### 3.1. Materyal

Aydın ADÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji laboratuvarında stok olarak bulunan 80 adet *V. dahliae* izolatları ve buna ilave olarak Aydın ilinin pamuk yetiştirilen alanlarından toplanılan 76 örnek ve bu örneklerden elde edilen 33 adet *V. dahliae* izolatu bu çalışmada materyal olarak kullanılmıştır.

dsRNA analizlerinde pozitif kontrol olarak kestane kanseri hastalığında hipovirulent olduğu bilinen USA-2 (CHV1) izolatu kullanılmıştır. Patojenisite denemeleri için Nazilli 84S pamuk tohum çeşidi kullanılmıştır. Sekans analizi için patojenisite testinde en iyi sonuç veren ve dsRNA analizlerinde agar jelde en iyi bant görüntüsünü veren 5 adet *V. dahliae* izolatu seçilmiştir.

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Örneklerin Elde Edilmesi

Aydın ilinin pamuk üretiminin yoğun olarak yapıldığı Söke (Güllübahçe) ilçesindeki pamuk arazilerinden Kasım ayında örnekler toplanmıştır. Örnekler hastalık belirtisi gösteren bitkilerin gövde belirtilerinin çok belirgin olmadığı yerlerden 8-10 cm kadar steril bağ makası ile kesilerek alınmıştır (Resim 3.1). Alınan örneklerin GPS kodları yazılarak numaralandırılmış ve kese kağıtlarına yerleştirilmiştir. Örnekler gün boyunca buz kutusu içerisinde tutulmuş ve Aydın ADÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji laboratuvarına getirilip buzdolabında 4°C’de izolasyon işlemine kadar muhafaza edilmiştir.



**Resim 3.1.** Aydın ili Söke ilçesi 2018 Kasım ayı pamuk alanlarından alınan solgunluk belirtisi gösteren dal örnekleri (A, B).

### 3.2.2. *Verticillium dahliae* İzolasyonu

Aydın ADÜ Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji laboratuvarına getirilen pamuk dal örnekleri (Resim 3.2a), hastalıklı ve sağlıklı dokuyu içerecek şekilde steril budama makası ve kalın uçlu bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılmıştır. Petri kapları içerisinde her bir örnek GPS kodlarına göre etiketlenerek hazırlanmıştır (Resim 3.2b). Bu parçalar yüzey dezenfeksiyonu için %2'lik sodyum hipoklorit içerisinde 2 dk, durulama için ise steril saf suda 2 dk süre ile bekletilmiştir (Resim 3.2c). Daha sonra örneklerin kuruması için steril petri kapları içerisinde bulunan kurutma kağıtlarının aralarına pens yardımıyla pamuk dal örneklerinden alınan parçalar bırakılmıştır. Kuruyan örneklerin PDA (patates dekstroz agar) besiyeri ortamına ekimleri yapılarak (Resim 3.2d) inkübatöre yerleştirilmiştir. İzolatların gelişim durumları günlük olarak kontrol edilerek *V. dahliae* olabileceği düşünülen izolatlar daha net incelenebilmek amacıyla SA (su agar) ortamına ekilmiş ve tekrar inkübasyona bırakılmıştır (Anagnostakis ve Jaynes, 1973).



**Resim 3.2.** Pamuk dal örneklerinden alınan parçaların izolasyon aşamaları; Solgunluk belirtisi gösteren pamuk bitkisi gövde kesiti (A), Örneklerin izolasyon için hazırlanması (B), Yüzey dezenfeksiyonu aşaması (C), İzolasyon işlemi yapılan örneklerin PDA besiyeri ortamına ekilmesi (D).

### 3.2.3. *Verticillium dahliae*'nin Kültüre Alınması ve Tanınması

PDA ve SA ortamında geliştirilen örnekler hem makroskobik hem de mikroskobik olarak mikolog Prof. Dr. Ömer ERİNCİK tarafından incelenmiştir. Örneklerin, spor yapıları, verticillant dallanma durumları, miselyum yapıları, konidioforlarının şekillerine göre *V. dahliae* olduğu belirlenmiştir. *V. dahliae* olduğu belirlenen izolatlardan alınan küçük diskler 9 cm'lik petrilerin orta kısmına yerleştirilmiş ve petriler inkübatörde 14 gün süre ile 25 °C'de inkübe edilmiştir.

### 3.2.4. *Verticillium dahliae* İzolatlarında Mikoviral dsRNA Varlığının Belirlenmesi

*V.dahliae* izolatlarından mikoviral dsRNA analizi iki farklı yöntem kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntemler için fungal miselyum elde edilme şekilleri de farklıdır. Yöntemlerden ilki; Baliija vd. (2008)'in fenol-kloroform içermeyen dsRNA analiz yönteminde, daha az miktarda fungal miselyuma ihtiyaç duyulması nedeniyle selefondisk üzerinde *V. dahliae* yetiştirilmesidir. İkincisi ise; CF-11 Morris ve Dodds (1979)'un selüloz kolon kromatografisi ile dsRNA analiz yöntemi için, daha fazla fungal miselyuma ihtiyaç duyulması nedeniyle *V. dahliae*'nin Patates Dekstroz (PD) broth ortamı kullanılarak yetiştirilmesidir.

#### 3.2.4.1. Selefondisk Üzerinde *Verticillium dahliae* Kültüre Alınması

Baliija vd. (2008) yöntemi analiz protokolüne göre içerisinde PDA besiyeri ortamı bulunan petri kaplarına, 3 gün boyunca otoklavda steril edilmiş selefondiskler besiyerinin üzerini kaplayacak şekilde steril pens yardımıyla yerleştirilmiştir. PDA ortamında geliştirilen *V. dahliae* izolatlarından alınan küçük fungal parçalar bu selefondisklerin üzerine konulmuştur. 14 gün süre ile inkübasyon için 25°C'de inkübatöre bırakılmıştır. Gelişimini tamamlayan izolatların fungal miselyumları selefondisk üzerinden kalın uçlu bistüri yardımıyla kazınarak alınmıştır. 200 mg olacak şekilde fungal miselyum tartılmıştır. Miselyumlar dsRNA analizinde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

*V.dahliae* izolatlarından mikoviral dsRNA analizi Baliija vd. (2008)'in fenol-kloroform içermeyen dsRNA analiz yöntemine göre yapılmıştır. Bu analiz yönteminin detayları aşağıda belirtilmiştir.

#### 3.2.4.2. *Verticillium dahliae* İzolatlarında Fenol-Kloroform İçermeyen dsRNA İzolasyon Yöntemi

1) Kolon tüpler hazırlanıp üzerine 600 µl selüloz eklenmiştir. Sonrasında 1×STE (10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) + EtOH % 20 eklenerek kolon aktif hale getirilmiştir.

2) 1,5 ml ependorf tüpler içerisine 600 µl EBA (50 Mm Tris-HCl pH 8,5, 50 mM EDTA, %3 SDS, %1 β-Merkaptoethanol, %1 PVPP-40) eklenmiş ve örneklerin koyulacağı tüpler hazırlanmıştır.

3) -20 °C'deki örnekler çıkarılmış ve sıvı azot yardımıyla steril havan içerisinde ezilmiştir (Resim 3.4A). Ezilen miselyumlar (200 mg) 2 ml'lik tüplere aktarılmıştır.

4) 16110 g'de 15 dakika +4 °C'de santrifüj yapılmıştır. Sonra steril 1,5 ml'lik ependorf tüplere süpernatantın üst sıvısı alınmıştır. Alınan sıvının %20'si kadar ethanol eklenmiştir.

5) Örnekler kolon tüplere aktarılmış ve 100 g'de 2 dakika +4 °C'de santrifüj yapılmıştır.

6) 1×STE + Ethanol (%20) solüsyonu ile 2 defa yıkama işlemi santrifüj yardımıyla yapılmıştır.

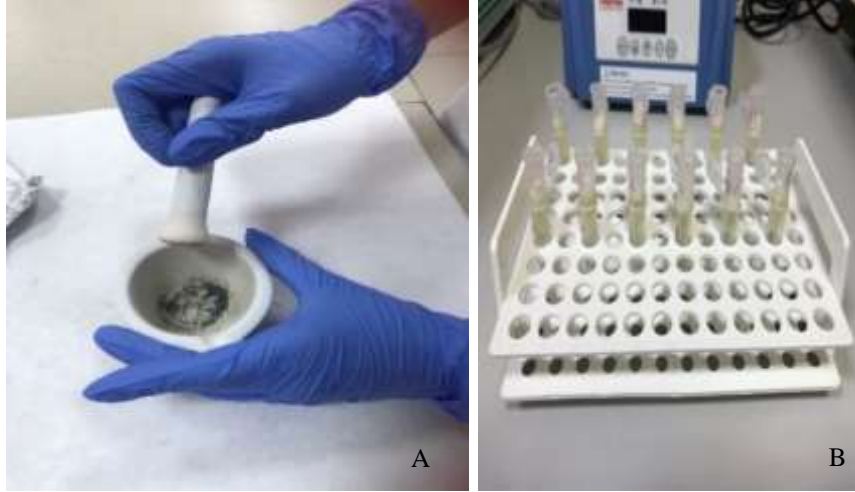
7) Kolon tüpler kaldırılarak 1×STE solüsyonu ile 2 defa yıkama işlemi yapılmış ve dsRNA'nın steril tüplere akması sağlanmıştır (Resim 3.4B).

8) 800 µl isopropanol eklenerek tüpler Rotator'a konulmuştur. 10 dak. süre ile döndürülerek homojen bir şekilde tüplerin içindeki sıvıların karışımı sağlanmıştır.

9) 1 saat boyunca örnekler +4 °C'de bekletilmiştir. Ardından 30 dak., 16110 g, +4 °C'de santrifüj yapılmıştır.

10) Tüplerin içerisindeki sıvı dökülmüştür. 700 µl Ethanol ile tüpler yıkanıp ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır.

11) Tüplerin içi kuruduktan sonra dsRNA'lar 30 µl RNase free water ile resüspanse edilmiş ve ardından % 0,8 agaroz jelde 1×TBE tampon solüsyon kullanılarak analiz edilmiştir. dsRNA'lar moleküler ağırlıkları gereği jelde ilerlemelerine göre değerlendirilmiştir. HindIII-Eco R1 ile kesilmiş Lambda DNA marker olarak, USA-2 CHV1 pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.



**Resim 3.3.** *Verticillium dahliae* izolatlarının Balija vd. (2008) yöntemine göre dsRNA analiz aşamaları; *V. dahliae*'ya ait fungal miselyumların sıvı nitrojen ile ezilmesi (A), selüloz kolondan mikoviral dsRNA'ların süzülmesi (B).

### 3.2.5. dsRNA İçeren ve İçermeyen *Verticillium dahliae* İzolatlarının Kültürel Özelliklerinin Karşılaştırılması

PDA üzerinde geliştirilmiş mikoviral dsRNA içeren ve içermeyen *V. dahliae* izolatlarına ait kolonilerin genç kısımlarından 4 mm çapında diskler alınmıştır. İçerisinde PDA besiyeri bulunan 9 cm'lik petrilerin orta kısmına yerleştirilmiş ve inkübatörde 14 gün süre ile 25 °C'de geliştirilmiştir. dsRNA içeren ve içermeyen izolatlar 14. günün sonunda koloni gelişimi, misel rengi ve hissel gelişim gibi kültürel özellikler yönünden karşılaştırılmıştır.

### 3.2.6. Virülenslik Testi

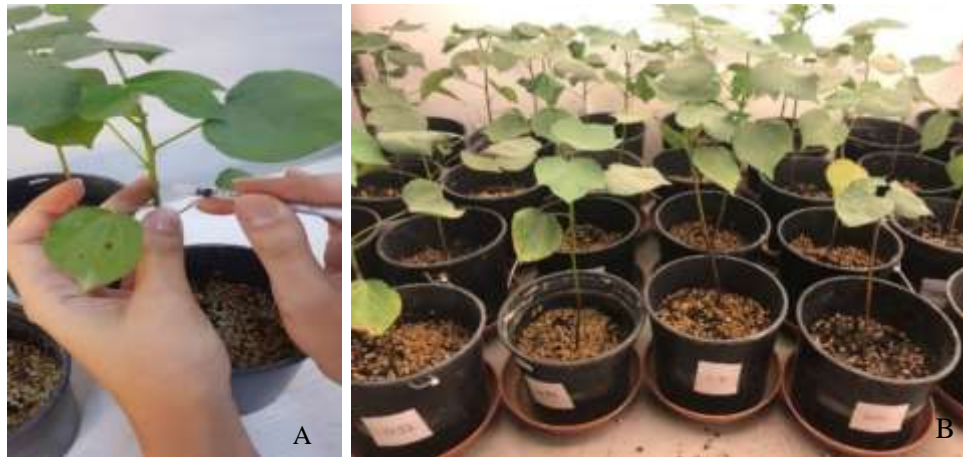
*V.dahliae*'nın dsRNA içeren izolatlarının virülenslik testi iki farklı yöntem kullanılarak yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak inokulasyon yöntemi aynı olan sadece steril saf su uygulaması yapılmış 4 tekerrürlü pamuk bitkisi kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak da dsRNA içermeyen *V. dahliae* izolatı inokule edilmiş 4 tekerrürlü pamuk bitkisi kullanılmıştır. dsRNA içeren *V. dahliae* izolatları da 4 tekerrürlü olacak şekilde pamuk bitkisine inokule edilmiştir. Deneme sonuçlarının değerlendirilmesi için 0-4 skalası kullanılmıştır (Zhu vd., 2012). Sonuçlar SPSS (Anova tek yönlü varyans analizi, Duncan



testi) programı ile istatiki açıdan değerlendirilmiştir. Hastalık şiddetinin yüzde olarak hesaplanması Tawsend-Heuberger Formülü'ne göre yapılmıştır (Zhu vd., 2012). Bu test yöntemleri; Gövde Enjeksiyon Yöntemi ve Kök Daldırma Yöntemi'dir.

### 3.2.6.1. Gövde Enjeksiyon Yöntemi

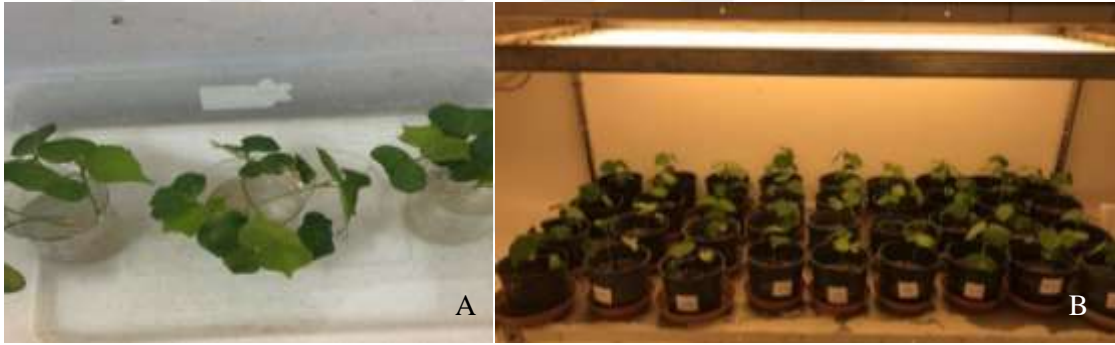
Dört tekerrürlü saksı denemeleri kurulmuştur. Bu denemelerin saksıda bitki yetiştirme ortamı steril edilmiş 1/3 perlit, 1/3 kum, 1/3 toprak olarak hazırlanmıştır. Her saksıya 4 tane pamuk tohumu ekilmiştir. Fideler büyüdüğü her saksıda 1 bitki olacak şekilde seyreltme ve şaşırtma yapılmıştır. Deneme için 14 günlük *V. dahliae* izolatları kullanılmıştır. Petri kaplarının kapağı açılarak içerisine tüm yüzeyi kaplayacak kadar saf su konulmuş hafifçe çalkalanmıştır. Çamaşır suyunda bekletilen ve steril saf suda durulaması yapılan steril fırça yardımıyla misellerin üzeri süpürür gibi fırçalanmıştır. Steril iki katlı tülbent kullanılarak petrinin içindeki sıvı süzülmüştür. Thoma lamı ile spor sayımı yapılarak konsantrasyon  $3 \times 10^6$  olarak hesaplanmıştır. Fideler 6-8 yapraklı döneme geldiğinde steril iğne yardımıyla birinci kotiledon boğumunun hemen altına (Yıldız ve Benlioğlu, 2008) yara dokusu açılmış spor süspansiyonundan steril iğne yardımıyla 5 µl enjekte edilmiştir (Resim 3.6A). Saksılar etiketlenerek iklim odasına (10saat aydınlık, 14 saat karanlık) yerleştirilmiştir (Resim 3.6B) (Erdoğan, 2009).



**Resim 3.4.** Pamuk bitkisine gövde enjeksiyon yöntemine göre dsRNA içermeyen ve içeren *V. dahliae* izolatlarından hazırlanan spor süspansiyonunun inokulasyon aşamaları; Pamuk bitkisine steril iğne ile inokulum enjekte edilmesi (A), İnokulum işlemi tamamlanan bitkilerin 4 tekerrürlü olarak etiketlenip iklim odasına yerleştirilmesi (B).

### 3.2.6.2. Kök Daldırma Yöntemi

Steril perlit bulunan uzun saksıların içerisine pamuk tohumları ekilerek iklim odası koşullarında 5 hafta süre ile köklenmesi beklenmiştir. Spor süspansiyonu  $1 \times 10^6$  spor/ml miktarda son hacim 150 ml olacak şekilde gövde enjeksiyon yönteminde olduğu gibi hazırlanmıştır. Köklenen fideler perlitlerden çıkarılarak musluk suyu altında yıkanıp kökleri temizlenmiştir. Steril edilmiş makas yardımıyla kökte yara dokuları açılmıştır. Fideler spor süspansiyonlarına daldırılarak 45 dakika boyunca bekletilmiştir (Resim 3.7A). İnokulum işlemi tamamlanan fideler saksılara şaşırtılmış izolat isimleri etiketlenerek iklim odasına (10 saat aydınlık, 14 saat karanlık) bırakılmıştır (Resim 3.7B) (Ozan vd., 2004).



**Resim 3.5.** Pamuk bitkisinin kök daldırma yöntemine göre dsRNA içermeyen ve içeren *V. dahliae* izolatlarından hazırlanan spor süspansiyonunun inokulasyon aşamaları; Pamuk fidelerinin spor süspansiyonu içerisinde bekletilmesi (A), Fidelerin 4 tekerrürlü olarak saksılara şaşırtılıp etiketlenerek iklim odasına yerleştirilmesi (B).

### 3.2.7. dsRNA Analiz Yöntemi

Baliya vd. (2008) dsRNA analizini doğrulamak amacıyla CF-11 selüloz kolon kromatografisi temeline dayanan Morris ve Dodds (1979) dsRNA analiz yöntemi yapılmıştır. Bu analiz için dsRNA içerdiği belirlenen izolatlardan en iyi band görüntüsünü ve patojenisite testinde en iyi sonuç veren izolatlardan seçilmiş ve *V. dahliae*'dan tekrar mikoviral dsRNA analizi yapılmıştır. Bu analiz için seçilen dsRNA içeren izolatlar N95, N77, N15, N58 ayrıca dsRNA içermeyen N50 ve pozitif kontrol olarak kullanılan USA-2 CHV1 izolatıdır (709).

### 3.2.7.1. Patates Dekstroz (PD) Broth Ortamında Geliştirilmesi

Morris ve Dodds (1979) CF-11 selüloz kolon kromatografisi yöntemi analiz protokolüne göre *V. dahliae*'dan daha fazla fungal miselyum elde edebilmek amacıyla sıvı besiyeri (PDbroth) hazırlanmıştır. 250 ml'lik erlenlere 14 günlük *V. dahliae* izolatlarından diskler alınarak sıvı besiyerine ekimi yapılmış ve 14 gün süre ile oda koşullarında Thermoshake cihazında inkübasyona bırakılmıştır (Resim 3.6). 14 günün sonunda izolatlardan oluşan fungal miselyumu toplayabilmek amacıyla steril tülbent yardımı ile miselyumlar süzülüp steril kurutma kağıtları arasında kurutulmuştur. Toplanan fungal miselyum, 5 gr olarak tartılmıştır. Alüminyum folyolara sarılarak dsRNA analizinde kullanılmak üzere -20 °C de muhafaza edilmiştir.



**Resim 3.6.** PD (broth) ortamına ekimi yapılmış *Verticillium dahliae*'nin inkübasyon için Thermoshake cihazına yerleştirilmesi.

### 3.2.7.2. *Verticillium dahliae* İzolatlarında CF-11 Selüloz Kolon Kromatografisi ile dsRNA Analiz Yöntemi

#### 1. gün

İçerisinde, 10 ml 2×STE (200 mM NaCl, 100 mM Tris, 1 mM EDTA) + 0.5 ml % 10'lük SDS + 11 ml fenol-8 hidroksiquinolin + 5 ml kloroform:isoamilalkol (24:1) bulunan steril falkon tüplere, likit nitrojen yardımıyla ezilen örnekler aktarılmıştır. Tüpler buz içerisine yerleştirilerek çalkalayıcıda 2 saat boyunca çalkalanmıştır (Şekil 3.5A). 8000 g'de 25 dakika santrifüj yapılmış ve oluşan 3 fazdan (Şekil 3.5B) en üstteki faz yeni tüplere

aktarılmıştır. Üzeri 1×STE ile tamamlanmış ardından 4 ml Ethanol ilave edilerek bir gece boyunca +4 °C’de beklemeye kaldırılmıştır.

## **2. gün**

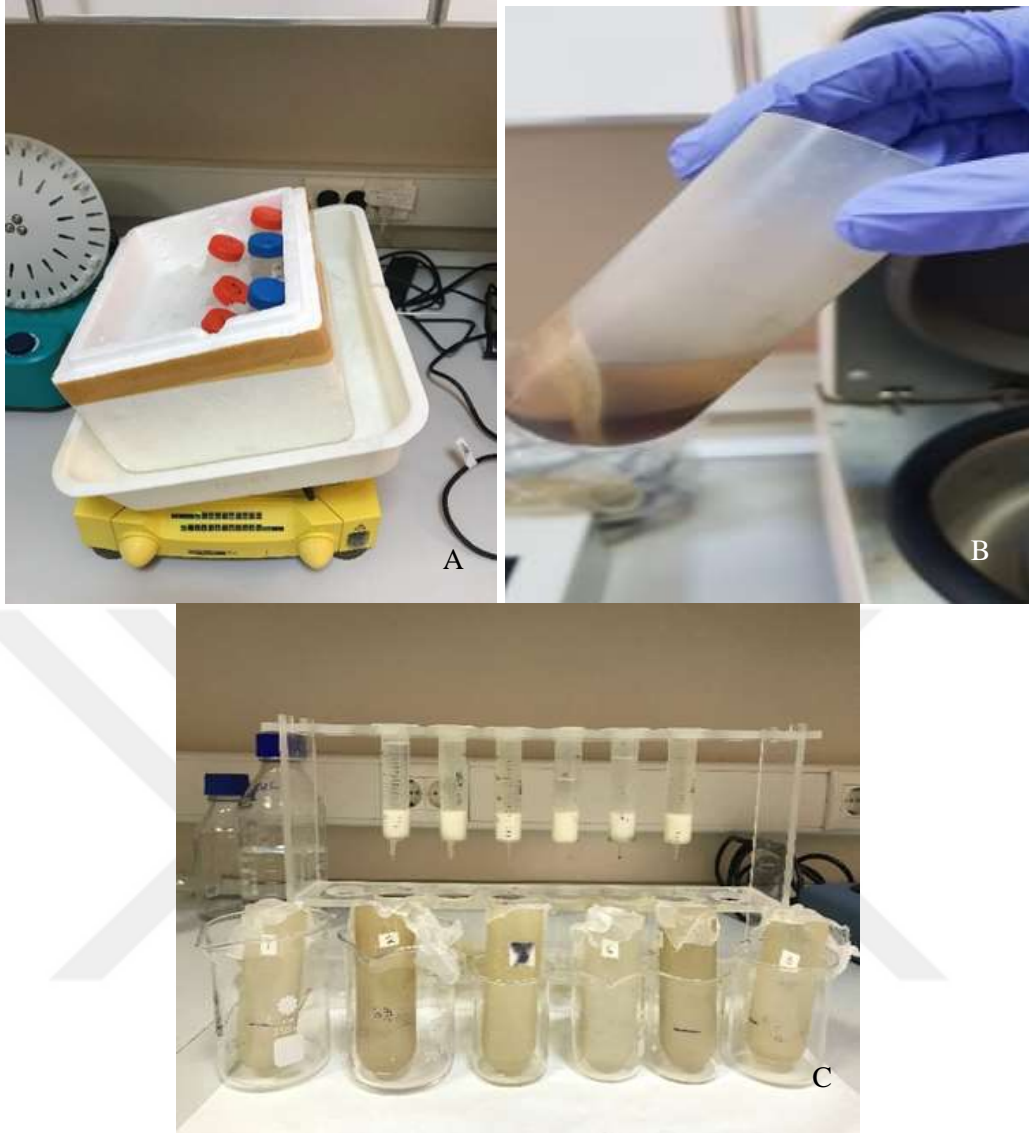
CF-11 selüloz kolon kromatografisine göre örnekler 1'er gr CF-11 selüloz içeren kolonlara aktarılmıştır. Toplamda 80 µl olacak şekilde kolonlar %16'lık ethanol içeren 1×STE tampon solüsyon yıkanmıştır. Kolonlardan son damla gelinceye kadar akması beklenmiştir. Son damla akınca kolonlara 6 ml 1×STE ilave edilerek yeni tüplere süspaniyonun akması sağlanmıştır (Şekil 3.5C). Tüplere 18 ml Ethanol ve 500 µl Sodyum Asetat eklenerek 1 gece boyunca -20 °C de bekletilmiştir.

## **3. gün**

-20 °C’deki örnekler 8000 g devirde +4 °C de 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda tüplerin içerisindeki sıvı boşaltılıp peletin kurumaması beklenmiştir. Pelet kuruduktan sonra 1×TBE ilave edilip resüspanse edilmiştir. Tüplere 10 saniye kadar spin yapıldıktan sonra tüp içerisindeki sıvılar steril ependorf tüplere aktarılmıştır. Üzerine 900 µl %95'lik ethanol ve 30 µl 3M sodyum asetat eklenmiştir. Örnekler -20 °C’de 1 gün muhafaza edilmiştir.

## **4. gün**

-20 °C’den çıkarılan örnekler +4 °C’de 5000 g devirde 20 dakika santrifüj edilmiştir. Sonrasında tüpler içerisindeki sıvı boşaltılıp tüpler kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan tüplere 20 µl steril su ile resüspanse edilmiştir. Saflaştırılan dsRNA’lar %0.8' lik agaroz jelde 80 V’da 1 saat süre ile 1×TBE tampon solüsyon kullanılarak elektoroforezde yürütülmüştür.



**Resim 3.7.** *V. dahliae* izolatlarının Morris ve Dodds (1979) analiz yöntemine göre dsRNA analiz aşamaları; İzolatların buz içerisinde shaker cihazına yerleştirilmesi (A), *V. dahliae* izolatlarının santrifüj sonrası üç faz oluşurması (B), CF-11 selüloz kolon kromatografisi ile mikoviral dsRNA'ların süzülmesi (C).

### 3.2.8. *Verticillium dahliae*'dan İzole Edilen Mikoviral dsRNA'nın RT-PCR ile Tanınması

#### 3.2.8.1. Primer Tasarımı

*V.dahliae*'ya ait dsRNA'nın tanısında kullanılacak primerin tasarımı için Feng vd. (2013)'in Genbank'asına kaydetmiş olduğu (KC422244.1) NCBI'daki *V. dahliae*

Partitivirus 1 (VdPV1)'in tüm genom dizisi kullanılmış ve primer3 programı ile primer tasarımı yapılmıştır. Uygun bir primer tasarımı için gereken Tm değeri, %GC değerleri, primer uzunluğu gibi optimum koşulları oluşturacak değerler kullanılmıştır. RT-PCR'da verimli çalışmak için primer çifti uygunluk ve özgünlük açısından kontrol edilmiştir. VdPV1'in genom dizisi ile tasarlanan primerin bu çalışmada kullanılabilirliği açısından değerlendirilmesi ve doğrulanması Dr. Francisco M. Ochoa Corona (Oklohoma State University) tarafından yapılmıştır.

### **3.2.8.2. *Verticillium dahliae*'dan İzole Edilen Mikoviral dsRNA'nın Miktar Tayini**

*V.dahliae*'dan elde edilen mikovirüsün tanınması için kullanılacak RT-PCR kiti protokolüne göre PCR tüplerine eklenmesi gereken dsRNA miktarını hesaplayabilmek amacıyla bu işlem yapılmıştır. *V. dahliae*'dan elde edilen mikoviral dsRNA'nın farklı dalga boylarındaki yoğunluk miktarı nanodrop cihazı kullanılarak seçilen izolatlar üzerinden ölçümleri yapılmıştır. Bu dalga boyları A260/A280 nm ve A320/A340 nm olarak ayarlanmıştır. Ölçüm sonucunda toplam dsRNA miktarı üzerinden konsantrasyon hesaplaması  $Concentration = (A260/A320) \times 100$  formülü ile yapılmıştır.

### **3.2.8.3. RT-PCR**

RT-PCR analizi Invitrogen SuperScript IV One-Step RT-PCR kiti kullanılarak yapılmıştır. RT-PCR işlemi için 16,5 µl Nükleazfree su, 25 µl 2×Platinum Super Fi RT-PCR Master Mix, 2,5 µl Forward primer GTTCAGATGGATTGGCGTTAG (10 µM), 2,5 µl Reverse primer GCCTTGCCCACTTCTTGT (10 µM), 0,5 µl SuperScript IV RT-Mix, master mix hazırlanmış ve 47 µl olarak tamamlanmıştır. Master Mix her PCR tüpüne 47 µl olacak şekilde dağıtıldıktan sonra üzerine 3 µl dsRNA ilave edilmiştir. 40 döngü olarak planlanan RT-PCR, reverse transkripsiyon 55 °C de 10 dk, başlangıç denatürasyon 98 °C'de 2 dk olarak başlatılacak ve 98 °C'de 10 sn boyunca denatürasyon, 60 °C'de 10 sn annealing, 72 °C'de 30 sn extension ve 72 °C'de 5 dk final ekstension şeklinde uygulanmıştır. %0,8'lik agoroz jelde 1×TBE buffer ile elektroforez işlemi yapılmış ve UV ışık altında bant oluşumları gözlemlenmiştir. Marker olarak 100 bp DNA Ladder kullanılmıştır.

### **3.2.9. Mikoviral dsRNA'nın Sekans Dizileme Analizi**

#### **3.2.9.1. Sekans Analizi**

Çalışmada elde edilen mikoviral dsRNA'lar arasından, hem patojenisite testlerinde iyi sonuç veren hem de yapılan RT-PCR sonucu agar-jelde en iyi profil görüntüsü veren 5 adet izolat seçilmiştir. Bu izolatlar N58, N15, N82, N46, 1484'dür. İzolatlar 30µl olarak, RT-PCR aşamasında kullanılan primer çifti ise 100nmol/mL konsantrasyonlarında hazırlanarak Macrogen firmasına Sanger dizileme metodu için balonlu zarf içerisinde gönderilmiştir. Bu izolatlar Macrogen firması tarafından kalite kontrolü ve dsRNA miktarı yönünden incelenmiştir. Gerekli incelemelerden sonra çift yönlü okuma yapılarak sekans dizileri elde edilmiştir.

#### **3.2.9.2. BLAST Analizi ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması**

Sekans dizi analizlerinin sonucunda elde edilen nükleik asitlerin dizilerinin benzerlik açısından karşılaştırılması NCBI (National Center for Biotechnology Information)'da bulunan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sekmesinden yapılmıştır.

Dizileme işlemi yapılmadan önce BioEdit programı ile Fasta formatında tüm okumalar filtrelenmiştir. Bu filtreleme işleminde sekans okumasının tekrarlayan kısımları, bozuk veya yanlış dizi okumasına sebebiyet verecek kısımları temizlenmiştir. Her bir okuma için bu işlem yapıldıktan sonra diziler alt alta çoklu hizalama şeklinde sıralanarak Fasta formatında kayıt edilmiştir. Fasta formatındaki sekanslar Mega 11 programı aracılığıyla Mega formatına çevrilmiştir. Daha sonra 5 örneğe ait nükleik asit dizileri kullanılarak, NCBI'da BLASTn analizi yapılarak en çok benzerlik gösteren mikovirüslerin sekansı kullanılarak MEGA11 programı yardımıyla Neighbour Joining 1000 replicate bootstrap metodu ile analiz edilerek filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

## 4. BULGULAR

### 4.1. *Verticillium dahliae* Örneklerindeki Belirtiler

Aydın ilinin 2019 yılı Kasım ayında, Söke (Güllübahçe) ilçesinden örnek alınan toplam 76 adet pamuk bitki örneklerinde solgunluk ve kuruma belirtisi olduğu belirlenmiştir. Steril bağ makası ile kesilen pamuk dallarının gövde kısmı incelendiğinde iletim demetlerinin çevresinde sararma ve kahverengileşme olduğu gözlemlenmiştir (Resim 4.1.).



**Resim 4.1.** Pamuk dal örneklerindeki iletim demetlerinde sararma ve kahverengileşme belirtileri (A, B).

### 4.2. *Verticillium dahliae*'nın Tanılanması ve Kültüre Alınması

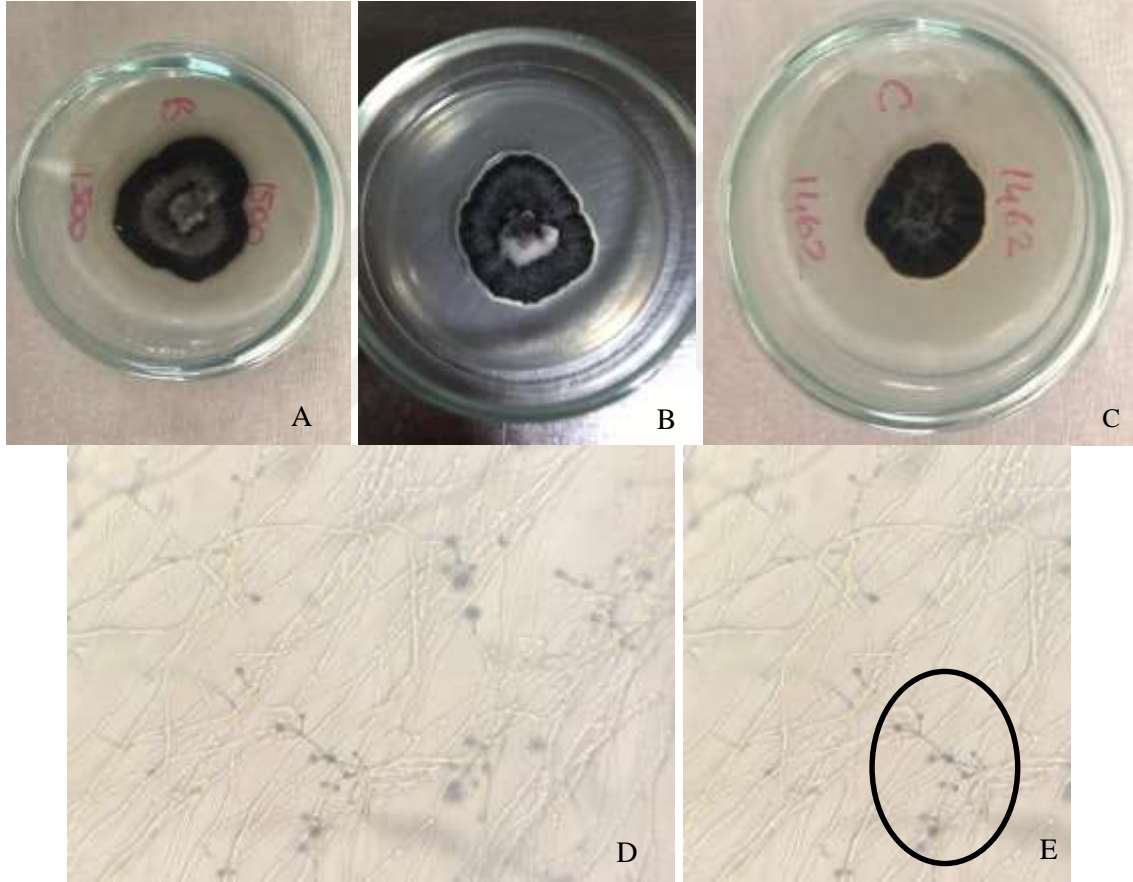
PDA besiyeri ortamında geliştirilen 76 adet örnek makroskobik olarak; gri, beyaz, siyah renkte misel oluşturmaları, mikroskobik olarak ise; fungusun hif yapısı, konidioforlarının durumu, verticillant dallanmaları dikkate alınarak incelenmiştir (Resim



4.2.). İzolatların makroskobik ve mikroskobik inceleme sonuçları Prof. Dr. Ömer ERİNCİK tarafından analiz edilmiş ve teşhisi yapılan izotların isimleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** *Verticillium dahliae* olduğu belirlenen izolatların isimleri.

İzolat İsmi	Söke (Güllübahçe)
1457 – 1458 – 1459 – 1460 – 1461 – 1462 – 1463 – 1464 – 1465 – 1469 – 1470 – 1471 – 1472 – 1473 – 1475 – 1476 – 1477 – 1479 – 1482 – 1484 – 1485 – 1486 – 1498 – 1499 – 1500 – 1501 – 1502 – 1503 – 1504 – 1505 – 1506 – 1507 – 1508	
<b>Toplam</b>	33



**Resim 4.2.** *Verticillium dahliae* izolatlarının makroskobik ve mikroskobik görüntüleri; *Verticillium dahliae*'nin PDA besiyeri üzerinde sırasıyla, gri, beyaz, siyah, renkte misel oluşturması (A, B, C), *Verticillium dahliae*'nin hiflerinin mikroskobik görüntüsü (D), Verticillant dallanma görüntüsü (E).

### 4.3. *Verticillium dahliae* İzolatlarında Mikoviral dsRNA Varlığının Belirlenmesi

Baliya vd. (2008)'in geliştirdikleri fenol-kloroform içermeyen dsRNA analiz yöntemine göre toplamda 113 adet *V. dahliae* izolatı ile yapılan mikoviral dsRNA analizi sonucu, 38 adet izolatın mikoviral dsRNA içerdiği bulunmuştur. Bu analizde kullanılan izolatlar ve sonuçları dsRNA içeren ve içermeyen *V. dahliae* izolatları olarak Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Baliya vd. (2008)'in yöntemine göre elde edilen 38 adet izolattan bir adet izolat 3 segmentli 20-18 kb, iki adet izolat 2 segmentli 4-2 kb, 35 adet izolatın ise tek segmentli 2-1 kb moleküler boyutlu mikoviral dsRNA içerdiği tahmin edilmektedir (Resim 4.3.). Elde edilen dsRNA'nın 20-18 kb boyutlarında olduğu kullanılan pozitif kontrole (USA-2 CHV1) göre yapılmıştır.

**Çizelge 4.2.** dsRNA analiz yöntemine göre analizleri yapılan ve dsRNA içeren ve içermeyen *Verticillium dahliae* izolatları

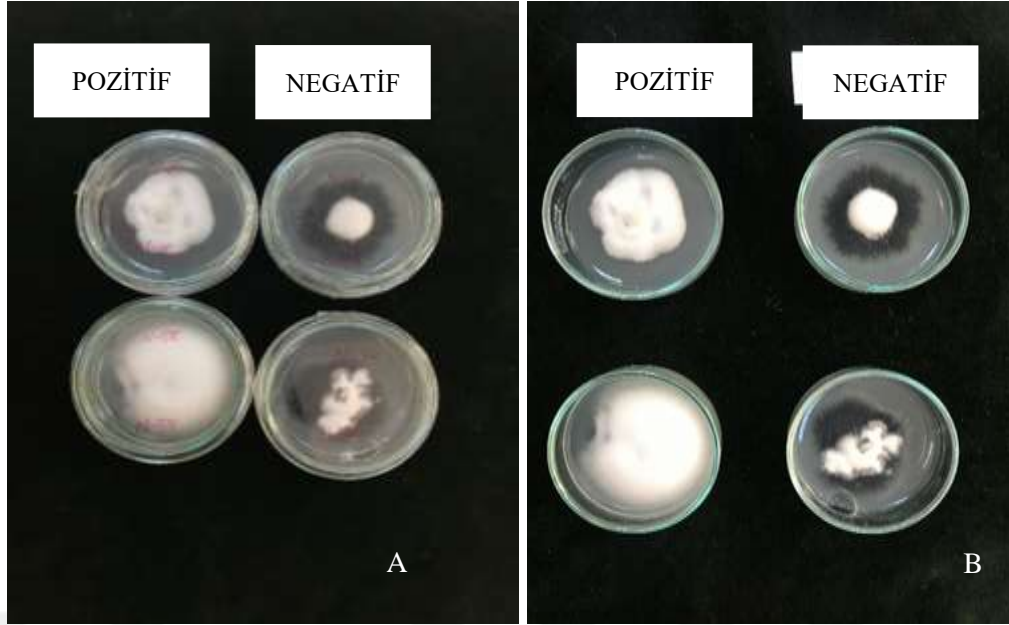
Aydın (İlçeler)	Baliya vd. (2008) Yöntemi	
	dsRNA içeren izolatlar	dsRNA içermeyen izolatlar
<b>Nazilli</b>	N96-N92-N34-N20-N33-N14-N15-N46-N95-N82-N12-N40-N9-N93-N32-N77-N94-N90-N10-N87-N54-N48-N17-N58-N72-N19-N30-N97-N18	N11-N21-N31-N35-N36-N37-N38-N39-N41-N42-N45-N47-N50-N53-N55-N56-N57-N59-N60-N61-N62-N66-N67-N68-N69-N70-N71-N76-N78-N80-N81-N83-N84-N85-N88-N89-N91-N98-N100
<b>Söke</b>	1484-650-655	1457-1458-1459-1460-1461-1462-1463-1464-1465-1469- 1470-1471-1472-1473-1475-1476-1477-1479-1482-1485-1486-1498-1499-1500-1501-1502-1503-1504-1505-1506- 1507-1508
<b>Koçarlı</b>	620-614-685-697-612-693	613-622-674-647
<b>Toplam</b>	38	75



**Resim 4.3.** Balija vd. (2008) yöntemine göre *Verticillium dahliae* izolatlarından elde edilen mikoviral dsRNA profillerinin jel elektroforez sonucu görüntüsü, Lambda DNA marker (HindIII) (M), pozitif kontrol (*Cryphonectria parasitica*) (1), dsRNA içeren izolatlar (2-N14), (4-N15), (5-N46), (6-N95), (8-N82), (9-N12), (11-N40). dsRNA içermeyen izolatlar (3-N76), (7-N42), (10-N70), (12-N38), (13-N85)

#### 4.4. dsRNA İçeren ve İçermeyen *Verticillium dahliae* İzolatlarının Kültürel Özelliklerinin Karşılaştırılması

PDA besiyeri üzerinde 14 gün süre ile geliştirilen *V. dahliae* izolatları dsRNA içeren ve dsRNA içermeyen izolatlar olarak incelenmiştir. 14. gün yapılan incelemede dsRNA içeren izolatların misel renklerinin gri, siyah renklerinden çoğunlukla beyaza doğru döndüğü gözlemlenmiştir. dsRNA içermeyen izolatların ise karışık misel renklerinde bulunduğu gri, siyah, beyaz misel renginin bir arada olduğu gözlemlenmiştir (Resim 4.5.). Değerlendirme sonucunda izolatlar arasında koloni gelişimi ve hifsel gelişim yönünden farklılık olmadığı gözlemlenmiştir.



**Resim 4.4.** *Verticillium dahliae* izolatlarının arasından dsRNA içeren ve dsRNA içermeyen izolatların karşılaştırılması (A, B)

#### 4.5. Virülenslik Testi

Pamuk bitkisindeki *Verticillium dahliae*'dan izole edilen 38 adet mikoviral dsRNA içeren *Verticillium dahliae* izolatları içerisinde en iyi profil görüntüsü veren izolatlardan seçilen 20 adet izolat ve bir adet negatif kontrol dsRNA içermeyen izolat (Çizelge 4.3) ile pamuk bitkisi üzerinde yapılan patojenisite denemelerinde iki farklı yöntem uygulanmış ve skala değerlendirmeleri iki ayrı yöntem için de 21. günün sonunda 0-4 sklasına (Zhu vd., 2012) göre değerlendirmeleri yapılmıştır. 14. günün sonunda bitkilerde belirtiler görülmeye başlanmış ve 21. günün sonunda Tawsend-Heuberger Formülü'ne göre yapılan yüzde hastalık (Zhu vd., 2012) sonuçlara göre N20 ve N50 izolatları her iki yöntem için de yaprak dökme patotip olarak belirlenmiştir. Kullanılan diğer izolatlar ise yaprak dökme patotip olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.3.** Her iki patojenisite yöntemi için kullanılmak üzere seçilen mikoviral dsRNA içeren ve içermeyen izolatların listesi

Aydın (İlçeler)	Patojenisite Testi İçin Seçilen İzolatlar
Nazilli	N14- N15-N17-N19- N20- N32- N33-N34- N40-N46-N58-N77-N82-N95-N97- -N50 (dsRNA negatif)
Söke	1484
Koçarlı	612-620-650-685
<b>Toplam</b>	<b>21</b>

#### 4.5.1. Gövde Enjeksiyon Yöntemi

Gövde enjeksiyon yöntemi sonuçlarına göre elde edilen SPSS (Anova tek yönlü varyans analizi, Duncan testi) analiz sonuçları ve hastalık şiddetinin yüzde olarak saptanan sonuçları Çizelge 4.4’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; N97, 650, 620 numaralı izolatlar ait dsRNA’ların virülenslik etkisinin en düşük olduğu, N34 ve N40 numaralı izolatlar ait dsRNA’ların ise virülenslik etkisinin en yüksek olduğu saptanmıştır. Yukarıdaki diğer izolatlar ait dsRNA’ların orta derecede virülens olduğu saptanmıştır. Nazilli 84S pamuk çeşidi ile yapılan patojenisite deneme sonuçlarına ait pamuk bitki ve yaprak örneklerinin fotoğrafları Resim 4.6. ve Resim 4.7.’de verilmiştir.

**Çizelge 4.4.** Gövde enjeksiyon yöntemi sonuç verilerinin SPSS analiz sonucu ve Hastalık şiddeti değerleri (%).

Gövde Enjeksiyon Yöntemi Sonuçları		
İzolatlar	Hastalık indeksi	Hastalık şiddeti %
<b>Kontrol</b>	0 g	0
<b>N97</b>	1 f	6,25
<b>650</b>	1 f	25
<b>620</b>	1 f	25
<b>N95</b>	1,5 ef	37,5
<b>N15</b>	1,75 def	43,75
<b>N82</b>	1,75 def	43,75
<b>N33</b>	1,75 def	43,75
<b>N77</b>	1,75 def	43,75
<b>N46</b>	2 cde	50
<b>N20</b>	2,25 bcde	56,25
<b>N32</b>	2,25 bcde	56,25
<b>N14</b>	2,25 bcde	56,25
<b>1484</b>	2,25 bcde	50
<b>N50</b>	2,5 bcd	62,5
<b>N19</b>	2,5 bcd	62,5
<b>612</b>	2,5 bcd	62,5
<b>N58</b>	2,75 abc	68,75
<b>N17</b>	2,75 abc	68,75
<b>685</b>	2,75 abc	68,75
<b>N40</b>	3 ab	75
<b>N34</b>	3,5a	87,5
<b>Sig.</b>		

\*Aynı harfi alan izolatlar arasındaki farklılık Duncan testine göre istatiki olarak önemli değildir (p=0,05).



**Resim 4.5.** Soldan sağı doğru pamuk bitkilerinin gövde enjeksiyon yöntemi uygulandıktan sonraki görünüşleri; Kontrol bitkisi, dsRNA içermeyen *Verticillium dahliae* izolatı inokule edilen bitki, dsRNA içeren *Verticillium dahliae* izolatları inokule edilen bitkiler.



**Resim 4.6.** Gövde enjeksiyon yöntemi uygulanmış *Verticillium* solgunluk belirtisi gösteren pamuk yaprak örnekleri

#### 4.5.2. Kök Daldırma Yöntemi

Pamuk bitkisinden izole edilen *V. dahliae* izolatlarına ait mikoviral dsRNA içeren ve içermeyen izolatların patojenisite testi materyal metotta belirtildiği gibi yapılmıştır. Patojenisite çalışmasının sonuçlandırılması ise 14. günün sonunda belirtiler görülmeye başlanmış ve 21. günün sonunda yapılmıştır. Deneme sonuçlarına ait bazı pamuk bitkilerinin fotoğrafları Resim 4.8. ve Resim 4.9.'da verilmiştir. Kök daldırma yöntemi ile elde edilen skala değerleri SPSS analiz sonucu Çizelge 4.5'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; N77, 650, N82 numaralı izolatlara ait mikoviral dsRNA'ların en düşük virülensliğe sahip olduğu, 685, N33, N17, N14, N34, N40 numaralı izolatlardaki mikoviral dsRNA'ların en yüksek virülensliğe sahip olduğu saptanmıştır. Diğer izolatlardaki dsRNA'ların virülensliği ise orta derece olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.5.) Bu sonuçlar bize mikoviral dsRNA'ların virülenslik açısından farklı olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.5.** Kök daldırma yöntemi sonuç verilerinin SPSS analiz sonucu ve %Hastalık şiddeti değerleri.

<b>Kök Daldırma Yöntemi Sonuçları</b>		
<b>İzolatlar</b>	<b>Hastalık indeksi</b>	<b>Hastalık şiddeti %</b>
<b>Kontrol</b>	0 h	0
<b>N77</b>	2 gh	0,5
<b>650</b>	0,5 gh	12,5
<b>N82</b>	1 fgh	25
<b>620</b>	1.25 efg	31,25
<b>N95</b>	1.5 efg	37,5
<b>N46</b>	1.5 efg	37,5
<b>N97</b>	1.75 def	43,75
<b>612</b>	2.5 def	43,75
<b>N15</b>	2 cdef	50
<b>N32</b>	2 cdef	50
<b>N58</b>	2 cdef	50
<b>N50</b>	3.25 bcde	62,5
<b>1484</b>	2.5 bcde	62,5
<b>N20</b>	1.25 abcd	31,25
<b>N19</b>	2.75 abcd	68,75
<b>N40</b>	3 abc	75
<b>N34</b>	3.25 ab	81,25
<b>N14</b>	3.25 ab	81,25
<b>N17</b>	3.25 ab	81,25
<b>N33</b>	3.5 ab	87,5
<b>685</b>	3.75 a	93,75
<b>Sig.</b>		

\* Aynı harfi alan izolatlar arasındaki farklılık Duncan testine göre istatistiki olarak önemli değildir. (p=0,05)



**Resim 4.7.** Soldan sağa doğru pamuk bitkilerinin kök daldırma yöntemi ile uygulandıktan sonraki görünüşleri; Kontrol bitkileri (1), dsRNA negatif izolat inokule edilen bitkiler (2), 3) dsRNA pozitif izolat inokule edilen bitkiler (3,4,5,6,7,8).



**Resim 4.8.** Kök daldırma yöntemi uygulanmış *Verticillium* solgunluk belirtisi gösteren pamuk bitkileri

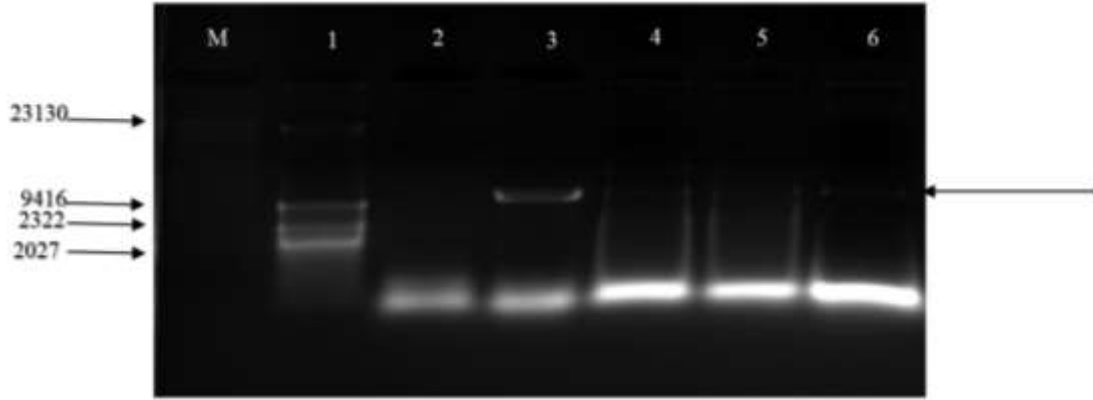
#### 4.6. Morris & Dodds (1979) Yöntemi ile dsRNA Analizi

Balija vd. (2008) yöntemi sonucunda en iyi dsRNA profil görüntüsü veren ve patojenisite sonuçlarının değerlendirilmesine göre en iyi virülenslik etkisi gösteren *V.*



*dahliae* izolatlarından seçilen 4 adeti ile Morris ve Dodds (1979) yöntemi kullanılarak dsRNA analizi yapılmıştır. Negatif kontrol için 1 adet mikoviral dsRNA içermeyen izolat ve pozitif kontrol için ise mikoviral dsRNA içeren *Cryphonectria parasitica* kullanılmıştır. Böylece toplamda seçilen 5 adet *V. dahliae* izolatının dsRNA analizi tekrarlanarak Balija vd. (2008) yöntemindeki bulguların doğrulanması yapılmıştır.

Morris ve Dodds (1979) analiz yöntemine göre Balija vd. (2008) yöntemi doğrulanarak 2 segmentli 4-2 kb ve tek segmentli 2-1 kb boyutlarında mikoviral dsRNA profilleri elde edilmiştir (Resim 4.9).



**Resim 4.9.** Morris ve Dodds (1979) yöntemine göre *Verticillium dahliae* izolatlarından elde edilen mikoviral dsRNA profillerinin jel elektroforezdeki görüntüsü; Lambda DNA Marker (HindIII) (M), pozitif kontrol (*Cryphonectria parasitica*) (1), dsRNA içermeyen izolat (2-N50), dsRNA içeren izolatlar (3-N95), (4-N77), (5-N58), (6-N15).

#### 4.7. *Verticillium dahliae*'den İzole Edilen Mikoviral dsRNA'nın RT-PCR ile Tanınması

##### 4.7.1. Primer tasarımı

Pamuk bitkisinden elde edilen *V. dahliae*'ya ait olduğu saptanan mikoviral dsRNA'ların tanınması için Feng vd. (2013)'de pamuktan izole ettiği *V. dahliae* izolatında tespitini yaptığı *V. dahliae* partitivirus 1'e ait tüm genom dizisi kullanılarak primer tasarımı yapılmıştır. Primer3 programı ile tasarlanan birkaç tane primer çiftinin (forward ve reverse) içerisinde seçilen bir adet primer çiftinin doğruluğu BLASTn ile belirlenmiştir. Çalışmamız için kullanılabilirlik durumu Dr. Francisco M. Ochoa Corona (Oklohoma State University) tarafından BLASTn sonuçlarına göre değerlendirilmiştir.

**Çizelge 4.6.** VDPV1'in tüm genom dizisi kullanılarak tasarlanmış primer çifti.

Primer Dizisi	Sekans 5'>3'	Uzunluk	Tm	GC%	Self Complementarity	Self 3' Complementarity
Forward	GTT CAG ATG GAT TGG CGT TAG	21	57.05	47.62	3.00	0.00
Reverse	GCG TTG CCC ACT TCT TGT	18	58.57	55.56	3.00	0.00

#### 4.7.2. *Verticillium dahliae*'dan İzole Edilen Mikoviral dsRNA'nın Miktar Tayini

*V. dahliae*'dan elde edilen mikoviral dsRNA'nın farklı dalga boylarındaki yoğunluk miktarı nanodrop cihazı kullanılarak seçilen izolatlar üzerinden ölçümleri yapılmıştır. A260/A280 nm ve A320/A340 nm dalga boylarındaki ölçüm değerleri Çizelge 4.7.'deki gibidir. Ölçüm sonucunda toplam dsRNA miktarı üzerinden konsantrasyon hesaplaması  $Concentration = (A260/A320) \times 100$  formülü ile yapılarak konsantrasyon değerleri çizelgeye girilmiştir. RT-PCR döngüsü için hesaplanmış olan dsRNA konsantrasyonları dikkate alınarak PCR tüplerine eklenecek olan dsRNA miktarı 3 µl olarak belirlenmiştir.

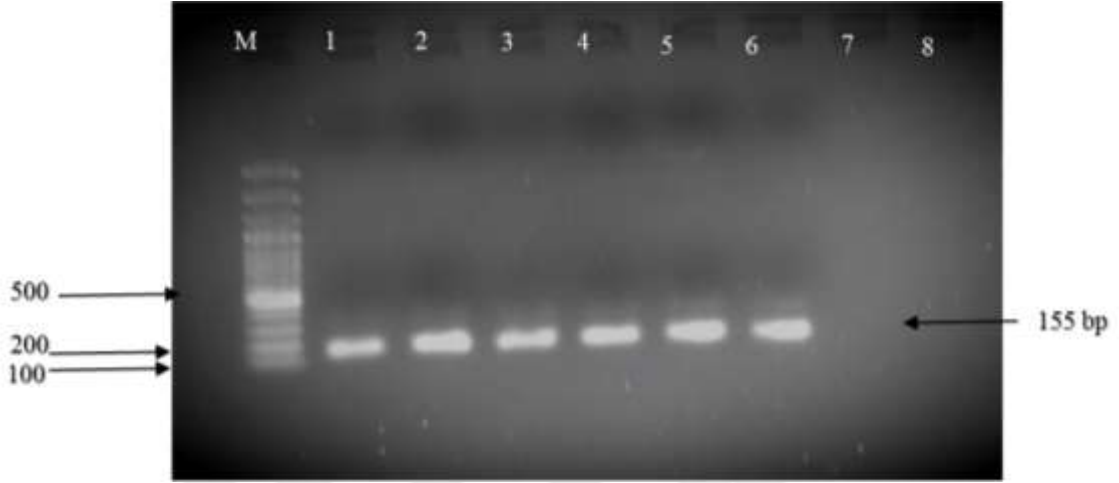
**Çizelge 4.7.** Mikoviral dsRNA içeren seçilmiş *Verticillium dahliae* izolatlarının farklı dalga boylarındaki içerdiği dsRNA miktarları ve dsRNA konsantrasyonları.

İzolat İsmi	dsRNA Ölçüm Değerleri		dsRNA Konsantrasyonu (A260nm/A320nm x 100)
	260 / 280 nm	320 / 340 nm	
N50	0,17 µg / µl	0,31 µg / µl	54,83 ng / µl
N95	0,22 µg / µl	0,53 µg / µl	11,66 ng / µl
N77	4,28 µg / µl	1,29 µg / µl	331,7 ng / µl
N58	5,36 µg / µl	1,78 µg / µl	301,1 ng / µl
N15	13,08 µg / µl	3,39 µg / µl	385,8 ng / µl
650	4,82 µg / µl	2,30 µg / µl	209,5 ng / µl
612	5,20 µg / µl	2,63 µg / µl	197,7 ng / µl
N97	3,36 µg / µl	1,25 µg / µl	268,8 ng / µl
N34	4,52 µg / µl	1,30 µg / µl	347,6 ng / µl

#### 4.7.3. RT-PCR

Pamuktan elde edilen *V. dahliae*'daki mikoviral dsRNA'ların nükleotit dizisi (Feng vd., 2013) kullanılarak tasarlanan primer çiftleri, Aydın ilindeki pamuklardan izole edilen *V.dahliae* izolatlarındaki mikoviral dsRNA içeren mikovirüsün tanılanması için RT-PCR

aşamasında kullanılmıştır. Elde edilen jel elektroforez görüntüsünde *V. dahliae*'ya ait dsRNA'ların RT-PCR da pozitif sonuç vererek bant oluşturduğu saptanmıştır. Oluşan PCR ürününün moleküler boyutu GelAnalyzer 19.1 programı ile belirlenerek 155 bp olduğu görülmüştür (Resim 4.10.). Marker olarak 100 bp DNA Ladder kullanılmıştır.



**Resim 4.10.** RT-PCR yapılan *Verticillium dahliae*'ya ait mikoviral dsRNA'ların jel elektroforez görüntüsü; (1-N95), (2-N77), (3-N58), (4-N15), (5-650), (6-612), (7-N97), (8-N34).



**Resim 4.11.** RT-PCR sonucu pozitif sonuç veren izolatların GelAnalyzer 19.1 programı ile bant boyutlarının ölçülmesi 1) 100bp DNA Ladder 2) N77 3)N58 4)N15.

## 4.8. Mikoviral dsRNA'nın Sekans Dizileme Analizi

### 4.8.1. Sekans Analizi

Materyal-metod bölümünde anlatılan ölçütlere göre seçilen 5 adet izolatın, sekans dizi analizleri her bir izolat için forward ve reverse primer ile ayrı ayrı yapılmıştır. Yani her bir örneğin forward primer ile nükleotit dizilimi ve aynı şekilde reverse primer ile nükleotit dizilimi yapılmıştır.

Elde edilen bulgulara göre;

1. N58 numaralı sekans analizi sonucunda; %98 oranla Canizares vd., (2011)'in elde ettiği NCBI'da KJ7006521 kayıtlı olan mikovirüse *Verticillium dahliae* partitivirus 1-ol (VDP1-ol) ve %96 oranla Feng vd., (2013)'ün elde ettiği KC4222431 olarak kayıtlı olan *Verticillium dahliae* partitivirus 1 (VDPV1) mikovirüsüne benzerlik göstermiştir. %98 oranında VDPV1-ol (Canizares vd., 2015), %96 oranında VDPV1 (Feng vd., 2013)'e benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

2. N15 numaralı izolatın sekans dizi analizi sonucunda bir veri elde edilememiştir.

3. N82 numaralı izolatın sekans dizi analizi sonucunda bir veri elde edilememiştir.

4. N46 numaralı izolatın sekans dizi analizi sonucunda %97 oranla VDPV1-ol ve %97 oranla VDPV1'e benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. %97 oranla VDPV1 (Feng vd., 2013) ve %95 oranla VDPV1-ol (Canizares vd., 2015)' benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

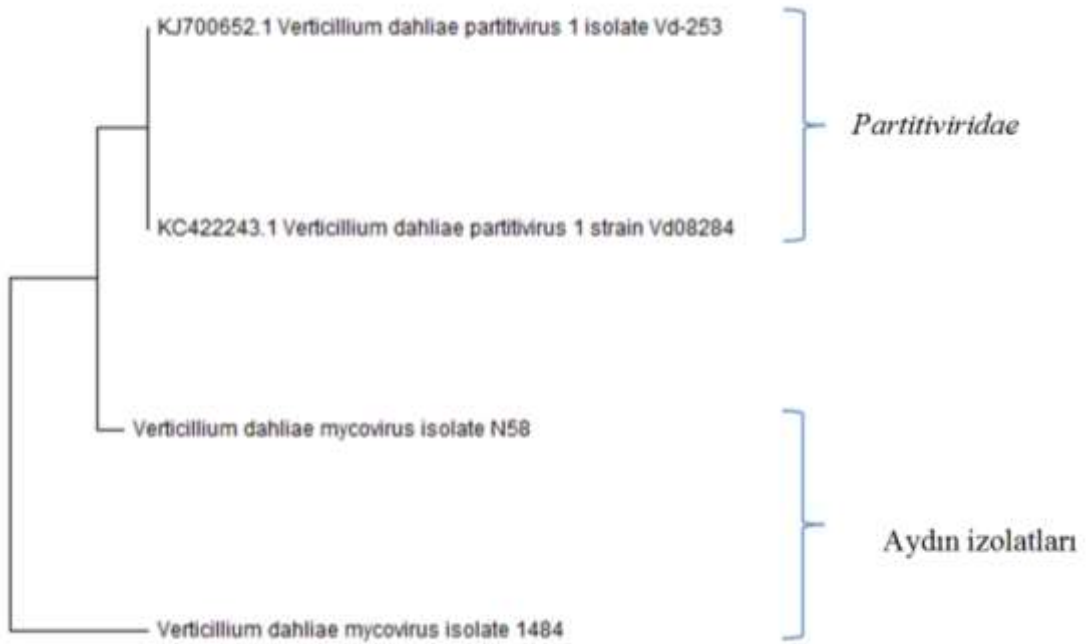
5. 1484 numaralı izolatın sekans analizi sonucunda %98 oranında VDPV1-ol (Canizares vd., 2011) ve %97 oranında VDPV1 (Feng vd., 2013)'e benzerlik göstermiştir. %94 oranla VDPV1-ol (Canizares vd., 2015) ve %92 oranla VDPV1 (Feng vd., 2013)'e benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

### 4.8.2. Blast Analizi ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması

Sekans dizi analizleri yapılan izolatların diğer mikovirüslerle benzerlik oranları NCBI veri tabanındaki BLASTn sekmesi ile sekanslar fasta formatında yüklenerek analiz edilmiştir. Analiz sonucunda çalışmamızda elde ettiğimiz mikovirüsün *Verticillium dahliae*

partitivirus 1 (Feng vd., 2013) ve *Verticillium dahliae* partitivirus 1-ol (Canizares vd., 2015) ile yüksek oranda benzediği tespit edilmiştir.

Sekansların her biri BioEdit programı yardımıyla yanlış okumalardan ve tekrarlanan kısımlardan temizlenerek düzenlenmiştir. Düzenlenen sekanslar Fasta formatında çoklu hizalama yapılarak biraraya getirilmiştir. Bu sekansların toplamı Mega 11 programı ile Mega formatına çevirilerek filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Oluşturulan filogenetik ağaç Resim 4.12.'de verilmiştir.



\*Virüslere ait numaralar GenBank erişim numaralarıdır.

**Resim 4.12.** Mega11 programı yardımıyla Neighbour Joining 1000 replicate bootstrap metodu ile oluşturulmuş filogenetik ağacı, N58 ve 1484 numaralı izolat çalışmada elde edilen izolatlardır.

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Pamukta *Verticillium dahliae*'nın Oluşturduğu Hastalık Belirtileri

Aydın ilinin pamuk üretiminin yoğun olarak yapılan Söke ilçesinden elde edilen pamuk örneklerinin dal ve gövde üzerinde; kahverengileşme, sararma, rengi giderek koyulaşan lekelerin olduğu görülmüştür. Pamukta *V. dahliae* enfekteli bitkilerin ana gövdesinde, dallarında ve yaprak saplarında açıktan koyu kahverengiye kadar damarlarda renk değişikliğinin belirgin olduğu bu gözlem El-Zik (1985)'ın *V. dahliae* enfekteli bitkiler için kullandığı ifadeler ile uygundur. Ayrıca El-Zik (1985) enfekteli dal örneklerinin gövde kesitlerinin sarı lekelerden oluştuğunu ve lekelerin giderek koyu kahverengiye doğru döndüğünü de gözlemlemiştir. Buna benzer olarak Erdoğan vd., (2015) da çalışmasında pamuk bitkisi gövdesinin enine doğru kesildiğinde ksilem iletim demetlerinin kahverengileştiğini belirlemiştir. El-Zik (1985) ve Erdoğan vd., (2015) tarafından ifade edilen gövde kesitlerinde gözlenen semptomlar Aydın ilindeki örneklerde de benzer şekilde gözlenmiştir.

### 5.2. *Verticillium dahliae* Kültürlerindeki Morfolojik Gözlemler

Pamuktan izole edilen *V. dahliae* izolatları PDA besiyerinde beyaz, gri, siyah renkte miselyal koloniler oluşturmuştur. Bu gözlemlere benzer şekilde Devay vd. (1977) *V. dahliae*'nin PDA besiyeri üzerinde gelişimini incelediklerinde, izolatlardan bazılarının beyaz koloniler oluşturduğunu bazılarının gri veya siyah renkte miselyal koloniler oluşturduğunu ifade etmişlerdir. Aydın *V. dahliae* izolatlarının SA besiyeri üzerindeki gelişimi sonucu konidioforlarının verticillant dallanmalarının mikroskop altındaki görüntüleri Ebihara vd. (2003)'nın patatesten elde ettiği *V. dahliae* mikroskop görüntülerindeki konidioforlarının verticillant dallanma gözlemleri ile benzerlik içerisindedir. Dinler ve Benlioğlu (2013) de çalışmalarında pamuk bitkisinden izole ettikleri *V. dahliae* izolatlarını miselyum yapısı, konidi ve konidioforlarının dallanma durumu, mikrosiklerotolup olmadığını göre değerlendirmişlerdir. Ardından Aydın izolatları ile benzer şekilde PDA besiyeri ortamında *V. dahliae* izolatların beyaz ve gri renklerde miseller

oluşturduğunu belirlemişlerdir. Aydın *V. dahliae* izolatlarının morfolojik görüntüleri Devay vd. (1977) ile mikroskop görüntüleri ise Ebihara vd. (2003)'nın bulgularıyla uyumlu sonuç vermiştir.

### 5.3. *Verticillium dahliae* Mikovirüsünün dsRNA Analizi ve Tanınması

Aydın-Söke'de pamuktan izole edilmiş *V. dahliae*'nın Baliya vd. (2008)'a göre yapılan dsRNA analizi sonucunda 21 adet izolatın dsRNA içerdiği belirlenmiştir. Bu elde edilen dsRNA'ların bazısı 3 segmentli 18-20 kb boyutlarında, bazısı 2 segmentli 2-4 kb boyutlarında, bazısı ise tek segmentli 2-1,5 kb boyutlarında olduğu belirlenmiştir.

Aydın-Söke *V. dahliae* izolatlarından elde edilen dsRNA'lar, Coa vd., (2011) tarafından Çin'in pamuk üretimi yapılan bölgelerindeki *V. dahliae* izolatlarında belirlenen moleküler boyutları 3.6-3.0 kb arasında olan 4 segmentli dsRNA ile benzerlik göstermemektedir. Yine Çin'in pamuk üretimi yapılan farklı bölgelerinden *V. dahliae* izolatlarından Feng vd., (2013)'in elde ettiği 1,7-1,5 kb moleküler boyutlarındaki 2 segmentli VDPV1'e ait dsRNA'ların moleküler boyut ve profil görüntüleri yönünden Aydın-Söke *V. dahliae* izolatlarındaki dsRNA'lar ile benzer olduğu görülmüştür. Balcı vd. (2019) Aydın ili pamuk yetiştirilen alanlarındaki 12 adet *V. dahliae* izolatının bazılarının 20-18 kb, 4-2 kb, 2-1 kb boyutlarında 3 segmentli bazılarının ise 2-1 kb boyutlarında tek segmentli dsRNA profillerine sahip olduğunu saptamışlardır. Bunun üzerine bu dsRNA'nın saptanmış olan diğer mikovirüslerden farklı olabileceği düşünülmüştür. Balcı vd. (2019) tarafından Aydın ilindeki pamuk alanlarından elde edilen *V. dahliae*'ya ait dsRNA içeren izolatların dsRNA analizi uzun süreli depolamada dsRNA kaybının olup olmadığını belirleyebilmek için bu çalışmada tekrar ele alınmıştır. Sonuçta 12 adet dsRNA içeren izolatın sadece 8'inin hala dsRNA içerdiği saptanmıştır. Aydın-Söke pamuk alanlarındaki *V. dahliae* dan elde edilen diğer 30 adet dsRNA'ların Balcı vd. (2019)'nın yine Aydın ilinde saptadığı dsRNA'lar ile hem moleküler ağırlık hem de dsRNA profili yönünden benzediği görülmüştür.

Canizares vd. (2015) ve Derviş vd. (2010) tarafından ülkemiz zeytin alanlarından Kahramanmaraş ilinden elde edilen *V. dahliae* izolatında saptanan 2 segmentli dsRNA ile Aydın-Söke dsRNA'larının hem band profili yönünden hem de moleküler ağırlık yönünden benzer olmadığı saptanmıştır. Ege bölgesi zeytinliklerinden elde edilen *V. dahliae*

örneklerinde tek segmentli dsRNA profili saptanmıştır. Bu dsRNA'nın 20-18 kb moleküler boyutlarında olduğu tesbit edilmiştir (Hosseinalizadeh vd., 2020).

#### 5.4. dsRNA İçeren ve İçermeyen *V. dahliae* İzolatlarının Karşılaştırılması

Çalışmada yapılan Baliya vd. (2008) dsRNA analizi sonucunda dsRNA içeren ve içermeyen izolatlar PDA besiyeri ortamında geliştirilmiştir ve bu izolatların morfolojik olarak karşılaştırılması yapılmıştır. Aydın ilinde pamuk alanlarından elde edilen dsRNA içeren ve dsRNA içermeyen *V. dahliae* izolatları kullanılarak (Balcı vd. 2019) yapılan karşılaştırmada dsRNA içeren ve dsRNA içermeyen izolatlar arasında oluşan misel renklerinde herhangi bir farklılık olmadığı saptanmıştır. Fakat bu çalışmadaki *V. dahliae*'ya ait dsRNA'ların virülensliğinin farklı olduğu düşünüldüğü için misel görüntülerinde renk değişimi olduğu tahmin edilmektedir. Akıllı vd. (2009), kestane kanseri hastalığının (*Cryphonectria parasitica*) hipovirulent formunun PDA besiyeri üzerinde beyaz koloniler oluşturduğunu dsRNA içermeyen izolatların ise turuncu koloniler oluşturduğunu ifade etmişlerdir. Akıllı vd. 2009'un bulguları ile uyumlu olarak bu çalışmada elde edilen *V. dahliae*'ya ait dsRNA içeren ve dsRNA içermeyen izolatlar arasında renk değişimi olduğu gözlemlenmiştir. dsRNA içeren izolatların misel rengi siyah ve koyu griden beyaza doğru, dsRNA içermeyen izolatların renginin ise koyu gri, siyah ve beyaz renkte olduğu görülmüştür.

#### 5.5. Virülenslik Testlerinin Değerlendirilmesi

Yapılan literatür araştırmasında dsRNA içeren *V. dahliae* da daha önce yapılan herhangi bir patojenisite testine rastlanmamış olduğu için ilgili karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak pamuk çeşitlerinin *V. dahliae*'a reaksiyonları ile ilgili çalışmalar ele alınabilmektedir.

Erdoğan (2009)'ın Nazilli'de bazı pamuk çeşitleri ve çeşit adaylarının *V. dahliae*'ya karşı reaksiyonlarını belirlemek amacıyla iklim odası koşullarında saksı denemesinde gövde enjeksiyon yöntemini (Bugbee and Presley, 1967) uygulamıştır. Bu uygulamayı  $3 \times 10^7$  spor/ml içeren spor süspansiyonundan her bitki 4-6 yapraklı dönemde iken steril iğne ile enjekte ederek gerçekleştirmiştir. Denemenin 14. günde alınan sonuçlarına göre Nazilli84S çeşidinin en yüksek hastalık şiddeti gösteren grupta olduğu ifade edilmiştir. Erdoğan



(2009)'ın uyguladığı inokulasyon yöntemi bu çalışmada aynı şekilde uygulanmış ve virülenslik çalışmalarında Nazilli84S pamuk çeşidi kullanılarak *V. dahliae* belirtileri net olarak gözlenmiştir.

Çalışmada iklim odası koşullarında diğer bir inokulasyon yöntemi olan kök daldırma yöntemi Ozan vd. (2004) nın Ankara ili ve ilçeleri domates ekim alanlarından elde edilen *V. dahliae* izolatları için uyguladıkları inokulasyon yöntemi ile aynı olup değerlendirilme de aynı skala değerleri (0-4 skalası) ile yapılmıştır. Denemenin 14. günden sonra değerlendirilmesi Hanson skalasına (Hanson, 2000) göre yapılmıştır.

### **5.6. *Verticillium dahliae*'dan Elde Edilen dsRNA'nın RT-PCR ile Tanınması**

Aydın ilinde saptanan *V. dahliae*'ya ait dsRNA'lar (Balcı ve Açıkgöz, 2019) spesifik primer ve heksamer primerler (Canizares vd., 2015) kullanılarak yapılan RT-PCR sonucunda tanınamamıştır. Bu nedenle Aydın-Söke'den elde edilen *V. dahliae*'ya ait dsRNA'lar, profil ve moleküler boyut olarak benzer olan Feng vd. (2013)'in pamuk bitkisinden elde ettiği *V. dahliae*'ya ait dsRNA'nın tüm genom dizisi kullanılarak primer çiftleri elde edilmiştir. Bu primer ile yapılan RT-PCR sonucunda Aydın-Söke'den elde edilen *V. dahliae*'ya ait dsRNA'ların tanısı yapılmıştır. Bu mikovirüsün saptanan diğer mikovirüslerden farklı olarak Feng vd. (2013)'in pamukdaki *V. dahliae*'dan elde ettiği dsRNA mikovirüsü ile profil ve moleküler boyut olarak benzer bir mikovirüs olabilir.

### **5.7. *Verticillium dahliae*'dan Elde Edilen Mikovirüsün Sekans Analizi ve Sonuçların Değerlendirilmesi**

Yapılan dsRNA analizleri ve virülenslik deneme sonuçlarına göre biyolojik mücadelede kullanılabileceği düşünülen en iyi izolatlar sekans analizi için seçilmiştir. Sekans analizi için gerekli olan genetik materyal, Cao vd. 2011, Feng vd., 2013 ve Canizares vd., 2015'in de kullandığı temeli CF-11 selüloz kolon kromatografisine dayanan Morris & Dodds (1979)'un geliştirdiği dsRNA analiz yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Mikovirüsün dsRNA'sı klonlama yapılarak cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Cao vd., (2011) Çin'de pamukta solgunluk hastalığına etmeni *V. dahliae*'a ait 4 segmentli ve 3.6, 3.3,

3-4 kb moleküler boyutlarında dsRNA'dan klonlama yapılarak cDNA kütüphanesi oluşturmuşlar ve sekans analizlerini rastgele hexamer primer kullanarak yapmışlardır. Cao vd., (2011) tarafından NCBI veri tabanında BLASTn sekmesinde %64-45 oranla Crysoviridae familyasına benzer olduğu, HM004067, HM004068, HM004069, HM004070 erişim numaraları ile Genbank'a kaydı yapılan ve *Verticillium dahliae* crysovirus 1 olarak isimlendirilen pamukta solgunluk hastalığına etmeni *V. dahliae*'a ait dsRNA'ların Aydın-Söke'deki *V. dahliae* a ait dsRNA profili ve moleküler boyut yönünden farklı olduğu görülmektedir.

Feng vd., (2013) tarafından yine Çin'de yapılan çalışmada, Aydın-Söke'deki *V. dahliae* a ait dsRNA profili ve moleküler boyut yönünden farklı olan pamukdaki *Verticillium dahliae*'dan elde edilen 2 segmentli ve 1.7-1.5 kb boyutlarındaki dsRNAların Partitiviridae familyasına %65-85 oranla benzediği Blastn ve Blastp analizi ile belirlenmiş ve KC422244.1 ve KC422243.1 erişim numaraları ile Genbank'a kaydedilerek *Verticillium dahliae* partitivirus 1 olarak isimlendirilmiştir.

Derviş vd. (2010)'nin Ege, Akdeniz, Marmara Güneydoğu Anadolu Bölgeler'indeki zeytin alanlarından izole etmiş olduğu *V. dahliae* izolatlarını kullandığı çalışmasında Canizares vd. (2015) sadece Vd-253 izolatından elde ettikleri 1,5 -1,7 kb moleküler ağırlığında iki bant içeren ve Partitivirus genusuna ait mikovirüs dsRNA'nın nükleotid diziliminin, Feng vd. (2013)'in Çin'de pamuk bitkisinden elde etmiş olduğu Partitiviridae familyasındaki VdPV1 mikovirüsü ile benzer olup Partitivirüsün farklı bir üyesi olduğu sonucuna varmışlardır. Ardından *Verticillium dahliae* partitivirus 1-olive (VdPV1-ol) olarak adlandırılan ve mikovirüsün sekansları, KJ700651 ve KJ700652 erişim numaraları ile GenBank veri tabanında verilmiş olan bu mikovirüs dsRNA'nın diziliminin, Aydın-Söke pamuk alanlarından elde edilen *V. dahliae*'a ait dsRNA'nın dizilimi ile %98-94 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir.

Aydın-Söke'deki solgunluk belirtisi gösteren pamuk bitkilerinde belirlenen dsRNA'ların, Çin'de Feng vd., (2013) tarafından izole edilen *Verticillium dahliae* partitivirus 1'in tüm genom dizisinden tasarlanan spesifik primerler kullanılarak elde edilen RT-PCR ürünleri ile Sanger dizileme ve Blastn analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucunda, Aydın-Söke'den elde edilen dsRNA'nın diziliminin Partitivirüsün *Verticillium dahliae* partitivirus 1-olive (Canizares vd., 2015) den farklı bir üyesi olan *Verticillium dahliae* partitivirus 1 dizilimi ile %98-94 oranlarında benzer olduğu belirlenmiştir.

## 6. SONUÇ

Bu çalışmada Türkiye genelinde pamuk üretimi açısından önemli bir yere sahip olan Ege Bölgesi'nde yer alan Söke Ovası'nda yetişen ve solgunluk belirtisi sergileyen pamuk bitkilerinden alınan dal örnekleri kullanılmıştır. İlave olarak Aydın ilinin pamuk üretiminin yoğun olarak yapıldığı Nazilli, Koçarlı, Söke ilçelerindeki pamuk bitkilerinden daha önce elde edilmiş olan ve Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Laboratuvarında stok olarak bulunan *V. dahliae* izolatları da materyal olarak bu çalışmada değerlendirilmiştir. Tüm *Verticillum dahliae* izolatları dsRNA varlığı yönünden analize tabi tutulmuş ve toplamda 113 adet *V. dahliae* izolatının 38 adetinin mikoviral dsRNA içerdiği saptanmıştır. Bu moleküler boyutları 18-20 kb, 2-4 kb, 1-2 kb arasında olan *V. dahliae*'a ait mikovirüs dsRNA'ların tanısı, RT-PCR yönteminde Primer 3 programı ile tasarlanan primer kullanılarak yapılmıştır.

Saptanan mikoviral dsRNA'ların virülenslik etkisinin belirlenmesi için pamuk bitkisi kullanılarak patojenisite denemeleri yapılmıştır. Patojenisite testleri iki farklı yöntem kullanılarak uygulanmıştır. Bu yöntemlerden elde edilen sonuçların benzerliği ele alınarak iki yöntemin de sağlıklı bir şekilde kullanılabilmesi ortaya konulmuştur. İlk kez bu çalışmada ele alınmış olan patojenisite testleri sonucunda elde edilen verilere göre bazı dsRNA'ların virülensliğinin yüksek derecede düşük olduğu, bazı dsRNA'ların ise virülensliğinin yüksek olduğu, aynı zamanda diğer dsRNA'ların da orta derecede etki gösterdiği belirlenmiştir. Sonuçlarla birlikte virülensliği açısından düşük olan mikoviral dsRNA'ların biyolojik mücadelede kullanılabilmesi için daha ileri düzeyde çalışma yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır.

*V. dahliae*'a izolatlarına ait dsRNA'nın yine pamuktan Feng vd. (2013)'in elde ettiği mikovirüs dsRNA'nın ün NCBI daki genom dizisi kullanılarak tasarlanan primerler ile dsRNA'ların RT-PCR ile tanılanması için kullanılabilmesi saptanmıştır.

Patojenisite testleri ve *V. dahliae*'a izolatlarının RT-PCR ürünleri arasından biyolojik mücadelede kullanılabilir olduğu bu çalışma ile tahmin edilen izolatlar seçilerek sekans analizi yapılmıştır. Sekans analizlerinin sonucunda; Çin'deki pamuk bitkisinden Feng vd. (2013) tarafından izole edilmiş olan mikovirüs dsRNA'sının, Aydın-Söke'de saptanan mikovirüs dsRNA ile benzer olduğu biyoenformatik analiz ile tespit edilmiştir. Bu benzer

mikovirüs dsRNA'ların pamuk solgunluk etmeni *V. dahliae* ile yapılacak olan biyolojik mücadelede yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Bu araştırma, pamuk bitkisinde mikovirüs dsRNA'nın biyolojik ajan olarak *V. dahliae* ile mücadelede kullanılabilme potansiyelini ortaya çıkarması yönü ile önemlidir. Bu çalışmanın sonuçları, gelecekte bu konuda yapılabilecek olan daha fazla ve daha üst düzey akademik araştırmaların başlangıcı olabilecektir. *V. dahliae*'a ait mikovirüs dsRNA'ların biyolojik mücadelede kullanılabilmesi ile ilgili uygulamalı araştırmaların sürdürülmesi gerekmektedir.

Pamukta *V. dahliae* ile mücadelede elde edilen virülenslik etkisinin en düşük olduğu mikovirüsün biyolojik ajan olarak kullanılabilmesi için *V. dahliae*'nın toprak kaynaklı bir patojen olması sebebiyle tohum kaplama yapılabilir. Ayrıca dsRNA'nın toprağa karışması sağlanarak uygulama yapılabileceği düşünülmektedir. Bu doğrultuda daha kapsamlı ve ileri düzeyde çalışmalar yapılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Agrios, G.N. (1997). *Plant Pathology*. Akademik Press. 635 p. Florida.
- Akıllı, S., Katircioğlu, Z.K., Maden, S. (2009). Biological control of chestnut canker, caused by *Cryphonectria parasitica*, by antagonistic organisms and hypovirulent isolates. *TÜBİTAK*. 35 (2011), 515-523.
- Al-Rawahi, A.K., & Hancock, J.G. (1998). Parasitism and biological control of *Verticillium dahliae* by *Pythium oligandrum*. *Plant Disease*, 82, 1100-1106.
- Anagnostakis, S.L., & Jaynes, R. A. (1973). Chestnut blight control: use of hypovirulent cultures. *Plant Disease*, Rep. 57, 225-226.
- Anonim, 2020. *Pamuk nereelerde yetiştirilir?* [www.urfanatik.com/makale/3524996/erhan-subasi/pamuk-nperelerde-yetistirilir](http://www.urfanatik.com/makale/3524996/erhan-subasi/pamuk-nperelerde-yetistirilir) adresinden erişildi. (Erişim Tarihi: 10.01.2021)
- Anonim, 2020. *Pamuk yetiştiriciliği ve tarımı* <https://www.turktob.org.tr/en/pamuk-yetistiriciligi-ve-tarimi/4912> adresinden erişildi. (Erişim Tarihi: 04.01.2021)
- Balcı, K.D., Açıkgöz, S. (2019). Pamuk solgunluk hastalık etmeni *Verticillium dahliae* Kleb.'da Mikovirüs dsRNA analizi ve RT-PCR ile tanılanması. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 29 (3), 516-525.
- Balijja, A., Kvarnheden, A., Turchetti, T. (2008). A non-phenol–chloroformextraction of double-stranded RNA from plant and fungal tissues. *Journal of VirologicalMethods*, 152: 32–37.
- Bejarano-Alcázar J., M. Blanco-López, J. Melero-Vara and R.M. Jiménez-Díaz, (1996). Etiology, importance, and distribution of *Verticillium* wilt of cotton in southern Spain. *Plant Disease*, 80, 1233–1238.
- Bugbee, W.M., and Presley, J.T. (1967). A rapid inoculation technique to evaluate the resistance of cotton to *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology*, 57: 1264.
- Cai, Y., Xiaohong, H., Mo, J., Sun, Q., Yang, J., Liu, J. (2009) Molecular research and genetic engineering of resistance to *Verticillium* wilt in cotton: A review. *African Journal of Biotechnology*, Vol.8 (25) syf. 7363-7372.

- Canizares, M., Lopez-Escudero, F., Pérez-artés, E., García-pedrajas, M.D. (2017). Characterization of novel single-stranded RNA mycovirus related to invertebrate viruses from the plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Archives of Virology*, 163, 771-776.
- 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.
- Cao, Y-F., Zhu, X-W., Xiang, Y., Li, D-G., Yang, J-R., Mao, Q-Z., & Chen, J-S. (2011). Genomic characterization of a novel dsRNA virus detected in the phytopathogenic fungus *Verticillium dahliae* Kleb. *Virus Research*, 159, 73–78.
- Çelik, İ., Soysal, M., İnan, Önal., Çetinkaya, M. (2010). Antalya bölgesinde pamuk solgunluk hastalığı (*Verticillium dahliae*) surveyi. *Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi*, 27 (1): 18-32
- Deng, F., Allen, T.D., Hillman, B. L., Nuss, D. L. (2007). Comparative analysis of alterations in host phenotype and transcript accumulation following hypovirus and mycoreovirus infections of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Eukaryotic Cell*, 6 (8), 1286-1298.
- Derviş, S., Biçivi, M., (2005). Distribution of *Verticillium Wilt* in Cotton Areas of Southern Turkey. *Plant Pathology Journal*, 4 (2) 126-129.
- DeVay, J.E., Weir, B.L., Wakeman, R.L., Stapleton, J.J. (1997). Effects of *Verticillium dahliae* infection of cotton plants (*Gossypium hirsutum*) on potassium levels in leaf petioles. *Plant Disease*, 81, 1089-1092.
- Dikilitaş, M., Smith, C.J. (1998, 21-25 Eylül). *Verticillium albo-atrum* izolatlarının yonca ve domates bitkileri üzerine fizyolojik ve patolojik etkilerinin araştırılması. Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Ankara.
- Dinler, H., Benlioğlu S. (2013). Aydın İli'nde pamuk alanlarından elde edilen *V.dahliae* Kleb. izolatlarının vejetatif uyum grupları. *Bitki Koruma Bülteni* 2013, 53 (2): 85-99.

- Ebihara, Y., Nagao, H., Uematsu, S., Morawaki, J., Kimishima, E. (2003). First report *Verticillium tricorpus* isolated from potato tubers in Japan. *Mycoscience*, 44, 481-488.
- El-Zik. (1985). Integrated control of verticillium wilt of cotton. *Plant Disease*, 1025-1032.
- Erdoğan O. (2009). Bazı Pamuk Çeşit Adaylarının *Verticillium Solgunluk Hastalığı Etmeni (Verticillium dahliae* Kleb.)'ne Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi. *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6 (2): 9-16, Aydın.
- Esentepe M. (1979). Adana ve Antalya illerinde pamuklarda görülen solgunluk hastalığının etmeni, yayılışı, kesafeti ve zarar derecesi ile ekolojisi üzerinde araştırmalar. İzmir Bölge Ziraat Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Araştırma Eserleri Serisi No:32, 45.
- Fang, H., Zhou H., Sanago S., Flynn R., Percy G.R., Hughs E., Uloa M., Janes C.D., Zhang J. (2013). Quantative trait locus mapping for Verticillium wilt resistance in a backcross inbred line population of cotton (*Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense*) based on RGA-AFLP analysis. *Euphytica*, 194:79-91.
- Feng Z., Zhu H., Shi Y., Zhao L., Liu L., Jiang D. (2013). Complete genome sequence of a novel dsRNA mycovirus isolated from the phytopathogenic fungus *Verticillium dahliae* Kleb. *Annotated Sequence Record*, 158:2621–2623.
- Fulbright, D.W. (1984). Effect of eliminating dsRNA in hypovirulent *Endothia parasitica*. *Phytopathology*, 74: 722- 724.
- Gencer, O. (1987). Genel Tarla Bitkileri. Ç. Ü. Ziraat Fakültesi. Adana, 135s
- Gencer, O. (2010). Lif bitkileri dersi, Ders notları, Çukurova üniversitesi, ziraat fakültesi, tarla bitkileri bölümü, Adana (yayınlanmamış).
- Gencer, O., Mert, M., & Kurt, Ş. (2001, 17-21 Eylül). Bazı Pamuk hat ve çeşitlerinin solgunluk hastalığına (*V.dahliae* Kleb.) tepkisi ile bunların tarımsal ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi. IV. Tarla Bitkileri Kongresi, Tekirdağ.
- 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>

- Ghabrial, S.A., Suzuki, N. (2009). Viruses of plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol*, 47: 353–384M
- Hanson, L.E. (2000). Reduction of Verticillium wilt symptoms in cotton following seed treatment with *Trichoderma virens*. *The Journal of Cotton Science*, 4, 224-231.
- Hollings, M. (1962). Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. *Nature*. 196, 962-965.
- Hosseinalizadeh, S., Erincik, Ö., Açıkgöz, S. (2019). Screening of some plant pathogenic fungi for the presence of dsRNA mycoviruses. *Bitki Koruma Bülteni*, 60 (1): 57-62.
- Hosseinalizadeh, S., Erincik, Ö., Açıkgöz, S. (2020). Screening of some plant pathogenic fungi for the presence of dsRNA mycoviruses, *Plant Protection Bulletin*, 60 (1): 57-62. <https://doi.org/10.16955/bitkorb.612275>
- Kara, H. (1988). Türkiye’de pamuk üretim alanları. *Ankara Üniversitesi Yayınları*, 71-90.
- Karaca İ., Karcılıoğlu A. and Ceylan S. (1971). Wilt Disease of Cotton in The Ege Region of Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology*, 5-49.
- Karaca, İ. (1974). Sistematik Bitki Hastalıkları. Deuteromycetes (Fungi Imperfecti), Cilt, IV. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:217*. 148-159 s.
- Koike, S.T., Subbarao, K.V., Davis, R.M., Gordon, T.R., Hubbard, J.C. (1994). Verticillium wilt of cauliflower in California. *Plant Diseases*, 78, 1116-1121.
- Korkmaz, H.Y. (2005). *Pamuk Solgunluk Hastalığı Etmeni V. dahliae Kleb. izolatlarının morfolojik ve Patolojik Özellikleri ve Bazı Pamuk Çeşitlerinin Hastalığa Tepkisi*. KSÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş.
- Köken, İ., İlker, E. (2020). Ege Bölgesine uygun pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerinde verim ve kalite özelliklerinin belirlenmesi. *Adü Ziraat Dergisi*, 17 (1), 15-20.
- Lee, A.J., Fang, D.D. (2015). Origin, history and current status Cotton as World crop. 1-25.
- Li, D., Ashby, A.M., Johnstone, K. (2003). Molecular evidence that the extracellular cutinase PbcI is required for pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on oilseed rape. *Molecular. Plant Microbe Interact*, 16: 545-552.



- 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
- Maden, S., Ozan, S., (2004). Ankara ili domates ekiliş alanlarında solgunluk ve kök ve kökboğazı çürüklüğüne neden olan fungal hastalık etmenleri. *Bitki Koruma Bülteni*, 44 (1-4): 105-120.
- Melouk, H.A. (1992). Methods for Research on Soil-Borne Phytopathogenic Fungi. (L. Singleton, J.D. Mihall, C.M. Rusheds. Aps St. Paul) *Verticillium*. 175 -177 p.
- Morris, T.J., & Dodds, J.A. (1979). Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*, 69, 854–858.
- Munoz-Adalia, E. J., Fernandez, M. M., Diez, J. J. (2016). The use of mycoviruses in the control of forest diseases. *Biocontrol Science and Technology*, 26 (5), 577-604.
- Nemli, T. (2003). Pamuk hastalıkları ve savaşım yöntemleri. Pamukta eğitim semineri, 14-17 Ekim 2003, İzmir. S, 103-111.
- Nuss, D.L. (2011). *Mycoviruses, RNA silencing, and viral RNA recombination*. *Advances in Virus Research Journal*, 80, 25-48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385987-7.000026>
- Pegg, G.F. 1984. The impact of *Verticillium* diseases in agriculture. *Phytopathology Mediterr*, 23: 176-192.
- Reinke, J., Berthold, G. (1879). Die Krauselkrankheit der Kartoffel. Untersuchungen aus dem *Botanischen Laboratorium der Universität Göttingen*, 1: 67-96.
- Sağır, A., Tatlı, F. (1995, 26-29 Eylül). Pamuk Solgunluk Hastalığı Etmeni (*Verticillium dahliae* Kleb) "ne Karşı Pamuk Çeşitlerinin Duyarlılıklarının Belirlenmesi Üzerinde Araştırmalar. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri. Adana, 5-9.
- Schnathorst, W.C. (1981). Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. Pages 81- 111 in: *Fungal Wilt Diseases of Plants*, M. E. Mace, A. A. Bell, and C. H. Beckman, eds. Academic Press, New York, 640 pp.
- Sezgin, E. (1985). Pamuk solgunluk hastalığı ile savaşımında kültürel işlemlerin önemi. *Yıllık* 3 (3), 23- 31, İzmir

- Subbarao, V.K., Inderbitzin, P. (2014). Verticillium systematics and evolution: How confusion impedes Verticillium wilt management and how to resolve it. *Phytopathology*, 104:564-574.
- Supyani, S., Hardjono, S.G. (2014). Hypovirulent isolates of *Rhizoctonia solani* collected from Rice karaganyar ergency, Central Java. Inonesia. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, Vol. 9, No. 1.
- T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı [TOB]. (2020). *Pamuk Bülteni*. Ankara. <https://www.tarimorman.gov.tr/BUGEM/Belgeler/MİLLİ%20TARIM/Ürün%20Masaları%20Ocak%20Ayı%20Bülteni/Pamuk%20Ocak%20Bülteni.pdf> adresinden erişildi. (Erişim Tarihi: 05.01.2021).
- T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı [TOB]. (2021). *Pamuk Bülteni*, (Sayı. 17). Ankara. [http://www.istib.org.tr/resim/siteici/files/418\\_Pamuk%20Bülteni%20-%20Ürün%20Masaları%20\(Ağustos%202021\).pdf](http://www.istib.org.tr/resim/siteici/files/418_Pamuk%20Bülteni%20-%20Ürün%20Masaları%20(Ağustos%202021).pdf) adresinden erişildi. (Erişim Tarihi: 12.08.2021).
- T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı [TOB]. (2021a). *Pamuk Bülteni*, (Sayı. 14). Ankara. <https://www.tarimorman.gov.tr/BUGEM/Belgeler/Bültenler/OCAK%202021/Pamuk%20Ocak%20%20Bülteni.pdf> adresinden erişildi. (Erişim Tarihi: 12.04.2021).
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), (2020). Bitkisel Üretim İstatistikleri, 2019. Türkiye İstatistik Kurumu. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselpp/bitkise.zul> adresinden erişildi.
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), (2020). Bitkisel Üretim İstatistikleri, 2020. Türkiye İstatistik Kurumu. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselpp/bitkise.zul> adresinden erişildi.
- Ünal, M., Aydın, G. (1980). Verticillium Solgunluğuna Dayanıklı Pamuk Islahı, *Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsü Yayınları*, Yayın No:27. Sayfa No: 23.
- Wang, S., Ongena, M., Qiu, D., Guo, L. (2017). Fungal viruses: Promising fundamental research and biological control agents of fungi. *SM Virol*, 2 (1), 1011
- Watkins, G.M. (1981). Compendium of cotton Diseases. Published by the *American Phytopathological Society*, 41-44 pp.
- Xie J, Wei DM, Jiang DH, Fu YP, Li GQ, Ghabrial S, Peng YL (2006). Characterization of hypovirulence-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Gen Virol*, 87:241-249.

- Yıldız, A., Benlioğlu, S. (2008). Trichoderma harzianum'un Pamuklarda ökerten (*Rhizoctonia solani* Kühn.) ve Verticillium solgunluğu hastalığı (*Verticillium dahliae* Kleb.)'na etkisinin in-vivo koşullarda saptanması. *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6 (1), 3-7.
- Yılmaz, Ö., (2009). Pamuk alanlarında ökertene yol açan patojenlere karşı bazı ilaçların etkinliğinin saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- 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 phtytopathogenic fungus *Rhizoctonia soloni*". *Virology*, 456-220.
- Zhu H.Q., Feng Z., Shi Y., Zhao L., Liu L., Jiang D. (2012). Characterization of two fungal isolets from cotton and evaluat,on of their potential for biocontrol of Verticillium wilt of cotton. *Journal of Pyhtopathology*. 161:70-77.

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

**BİLİMSEL ETİK BEYANI**

‘PAMUK SOLGUNLUK HASTALIK ETMENİ *VERTICILLIUM DAHLIAE*’DA BELİRLENEN MİKOVİRAL DSRNA’NIN TANILANMASI VE VİRÜLENSLİK ETKİSİNİN BELİRLENMESİ’ başlıklı yüksek lisans tezimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Fatma Selin TÜREMEN

...../...../2022

# ÖZ GEÇMİŞ

**Soyadı, Adı:** TÜREMEN, Fatma Selin

**Yabancı Dil:** İngilizce

## EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi (Yıl)
Y. Lisans		
Lisans	Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü	2018

## BURSLAR ve ÖDÜLLER

2019-2020, TÜBİTAK Araştırma Projesi-1001 Proje No: 2170293, Bursiyer

## İŞ DENEYİMİ

Yıl	Kurum	Unvan
2021-devam	Anka Frucht Gıda İç ve Dış Tic. Ltd. Şti.	Ziraat Mühendisi,

## AKADEMİK YAYINLAR

### 1. MAKALELER

### 2. PROJELER

### 3. BİLDİRİLER

#### A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

#### B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

- 1) Yaranlı, H., **Türemen, S.F.**, Irmak, Ali. ‘Bal Arılarının Ekosistemdeki Yeri ve Neslinin Tükenmesi Riski.’ 6. Ulusal Çevre ve Ekoloji Öğrenci Kongresi. 25-26 Nisan 2015. sy-36. Ankara.

2) Yaranlı, H., **Türemen, S.F.**, Irmak, Ali. 'Topraksız Serada Organik Tarım.' 6. Ulusal Tarım Öğrenci Kongresi. 4-6 Mayıs 2016. sy-411. Ankara

3) Yaranlı, H., **Türemen, S.F.**, Irmak, Ali. 'Yumurta Parazitoiti Trichogramma Türleri ve Kullanım Durumları' Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi 12. Öğrenci Kongresi. 21 Nisan 2016. Ankara.

