



Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Tarım Bilimleri Dergisi
(YYU Journal of Agricultural Science)



http://dergipark.gov.tr/yyutbd

Araştırma Makalesi (Research Article)

Pamuk Solgunluk Hastalık Etmeni *Verticillium dahliae* Kleb.'da Mikovirüs dsRNA Analizi ve RT-PCR İle Tanınması

Deniz Kübra BALCI¹, Serap AÇIKGÖZ²

¹Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Korum Bölümü, Aydın, Türkiye

²Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Korum Bölümü, Aydın, Türkiye

*Sorumlu yazar e-posta: deniz_kubra_93@hotmail.com

Makale Bilgileri

Geliş: 13.12.2018

Kabul: 19.08.2019

Online Yayınlanma 30.09.2019

DOI: 10.29133/yyutbd.496476

Anahtar kelimeler

DsRNA,
Mikovirüs,
RT-PCR,
Verticillium dahliae Kleb.

Öz: *Verticillium dahliae* Kleb. pamuk ve zeytin üretimi yapılan her yerde ciddi verim ve bitki kayıplarına neden olan önemli bir fungal hastalıktır. Hastalığın toprak kökenli olması mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Fungal hastalıklarda biyolojik mücadele gün geçtikçe ön plana çıkmakta olup biyolojik ajan olarak mikoviral dsRNA'lar da kullanılmaya başlamıştır. *Verticillium dahliae* mikoviral dsRNA'lar ile ilgili ikisi pamukta biri zeytinde olmak üzere toplamda dört çalışma yapılmıştır. Ancak Türkiye'de pamuk bitkisinde solgunluk hastalığına neden olan *V. dahliae*'da mikovirüs dsRNA'nın varlığı hakkında bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada Aydın ili Söke ve Koçarlı ilçelerinin pamuk alanlarından solgunluk belirtisi gösteren 100 örnekten elde edilen 72 *V. dahliae* izolatında mikovirüs dsRNA'nın varlığı araştırılmış ve on iki *V. dahliae* izolatında dsRNA belirlenmiştir. *V. dahliae* mikoviral dsRNA'nın RT-PCR ile tanınması zeytindeki *Verticillium dahliae* partitivirus 1-olive (VdPV1-ol) mikovirüsü için tasarlanan spesifik primerler ve rastgele hegzamer primeri kullanılarak yapılmıştır. Sonuçta kullandığımız bu primerler ile pamuktaki *V. dahliae* izolatlarındaki dsRNA mikovirüsünün tanılanamayacağı saptanmıştır. Çalışmada dsRNA içeren *V. dahliae* izolatlarının virülensliğini belirlemek için elma testi uygulanmış ancak sonuç alınmamıştır.

Analysis and Diagnosis of Mycovirus dsRNA in *Verticillium dahliae*, The Causal Agent of Verticillium Wilt Disease of Cotton

ArticleInfo

Received: 13.12.2018

Accepted: 19.08.2019

Online Published 30.09.2019

DOI: 10.29133/yyutbd.496476

Keywords

DsRNA,
Mycovirus,
RT-PCR,
Verticillium dahliae Kleb.

Abstract: *Verticillium dahliae* (Kleb), one of the important diseases that causes significant yield losses wherever the cotton and olive were produced. Because the pathogen is soil-borne which makes the management of the disease difficult. Therefore, biological control in fungal diseases is becoming more essential, one of them is use the mycovirus dsRNAs. Three studies on *Verticillium dahliae* mycoviral dsRNAs have been carried out so far, two of them in cotton and one in olives. In Turkey, no studies were found on the presence of mycoviral dsRNA in *V. dahliae*, which causes cotton wilting. In this study, the presence of mycovirus dsRNA in 72 *V. dahliae* isolates obtained from the cotton fields of Aydın/Söke and Koçarlı districts was investigated method. In 12 *V. dahliae* isolates dsRNA was determined. The specific primers and random hexamer primer designed for the mycovirus of *V. dahliae* (VdPV1-ol) in olive were used in RT-PCR identification of this determined dsRNA. These primers have been reported to have identical genome sequences with *V. dahliae* micovirus (VdPV1) in cotton. Furthermore, *V. dahliae* isolates containing dsRNA did not respond to the apple pathogenicity test.

1. Giriş

Pamuk, *Malvales* takımı, *Malvaceae* familyası, *Gossypium* cinsi içerisinde yer alan bir kültür bitkisidir (Anonim, 2017a). Pamuk tarımının 5 000 yıl önce ilk Hindistan'da yapıldığı bildirilmiştir. Pamuk bitkisinin anavatanı tam bilinmemekle birlikte Asya, Amerika ve Afrika'nın sıcak bölgelerinde olduğu tahmin edilmektedir (Gencer, 1987). Türkiye'de pamuk bitkisi, Ege, Akdeniz, Çukurova ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde yetiştirilmektedir. Pamuk, daha çok nehir yatakları etrafında veya arasındaki yerlerde bulunmaktadır aynı zamanda yüksek nemin ve sıcaklık farkının az olduğu yerlerde iyi yetişmektedir. Ülkemiz Ege Bölgesi ve Aydın için önemli bir ürün olan pamuk bitkisinde yaklaşık 20 tane önemli fungal hastalık belirlenmiştir (Pegg, 1984).

Pamuk bitkisinde önemli fungal hastalıklarından biri de *Verticillium dahliae* etmenin sebep olduğu solgunluk hastalığıdır (Pegg, 1984). *Verticillium* cinsi ilk kez 1816'da Melouk (1992) tarafından tanımlanmıştır. Bu solgunluk hastalığı ilk defa 1941 yılında ülkemizde Manisa Kırkağaç'ta İyriboz (1941) tarafından belirlenmiştir. Karaca ve ark. (1971) ise solgunluk hastalığına neden olan etmenin *V. dahliae* Kleb. olduğunu saptamıştır. Toprak kaynaklı bir fungus olan *V. dahliae* kışı toprakta 10-120 µm boyutunda mikrosklerot adı verilen zor koşullara dayanıklı yapılar oluşturarak geçirmektedir. Bu kışlama yapısı sayesinde yaşamını sürdürüp toprakta 10-14 yılı aşkın canlı kalabildiği bildirilmiştir (Agrios, 1997). Kök salgıları ile çimlenen mikrosklerotlar konukçu bitkiye kök meristeminden giriş yapıp hücreler içi ve hücreler arasından merkeze doğru ilerler ve odun (xylem) ksilem borusuna ulaşırlar. Ksilem yolu ile fungusun üretmiş olduğu konidiler bitkinin diğer kısımlarına geçiş yaparak bitkide solgunluk belirtisini oluşturmaktadırlar (Agrios, 1997). Solgunluk belirtisi daha çok çiçek dönemine yakın zamanlarda görülmektedir. Hastalığın bazı ırkları yaprak dökümüne sebep olurken bazı ırkları yaprakların kuruyup yaprak dalı üzerinde asılı kalmasına neden olmaktadır. Solgunluk arttıkça bitki yapraklarını döker ardından sararma görülür, sararan yapraklar kurur ve dalda asılı kalır veya dökülürler. Yaprak dokusunda kurumaların gerçekleşmesinin nedeninin patojenin salgıladığı toksik maddeler olduğu bildirilmiştir (Karaca, 1974). Hastalık eğer erken başlarsa ya da tohum ekim zamanı geçmiş ise bitki boyu kısa kalır, kozalar küçülür ve koza sayısı azalmaktadır (Karaca, 1974). Tüm dünyada solgunluk hastalığından dolayı yıllık tahmini ürün kaybının 1.5 milyon balya olduğu ifade edilmiştir (Nemli, 2003). Esentepe (1979) Ege Bölgesinde, İzmir, Manisa, Aydın illerinde bu hastalığın ciddi ürün kayıplarına neden olduğunu bildirmiştir. Hastalığın Batı Akdeniz, Çukurova ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde de bulunduğu ve bu bölgelerde ciddi ekonomik kayıplara neden olduğu saptanmıştır (Sezgin, 1985; Sağır ve Tatlı, 1995).

Hastalığın toprak kaynaklı bir fungus olması ve kimyasal mücadelesinin olmayışı hastalık ile mücadeleyi zorlaştırmaktadır (Wilhelm ve ark., 1974; El-Zik, 1985; Godoy ve ark., 1995; Biçici ve Kurt, 1998; Moshirabadi ve ark., 2000; Gencer ve ark., 2001; Galanopoulo, 2006; Karademir ve ark., 2009). Hastalığın mücadelesinde; ekim nöbeti, dengeli gübreleme, sulama zamanı, sulama yöntemi, yabancı ot mücadelesi ve dayanıklı çeşit geliştirme gibi kültürel yöntemler önerilmektedir (Wilhelm ve ark., 1974; Schnathorst ve Cooper, 1975; El-Zik, 1985; Erdoğan ve ark., 2006).

İnsan sağlığı çevre kirliliği, doğal dengenin bozulması ve ilaçlara bağımlılık kazanma gibi nedenlerle kimyasal mücadeleden uzaklaşmaya çalışıldığı günümüzde, hastalıklarla biyolojik savaş gün geçtikçe ön plana çıkmaktadır. Bu nedenle *Verticillium* solgunluğuna karşı üzerinde durulan mücadele yöntemlerinden biri de biyolojik mücadeledir (Al-Rawahi ve Hancock, 1998). Fungal hastalıklarla biyolojik mücadele yöntemlerinden biri de mikovirus dsRNA'ların kullanılmasıdır. Buna en güzel örnek ise kestane kanseri hastalığının biyolojik kontrolünde kullanılan *Cryphonectria hipovirus* (Anagnostakis ve Jaynes, 1973; Macdonald ve Fulbright, 1991; Heiniger ve Rigling, 1994; Bissegger ve ark., 1997; Sotirovski ve ark., 2000; Robin ve Heiniger, 2001; Trestic ve ark., 2001; Krstin ve ark., 2008).

V. dahliae izolatlarında mikoviral dsRNA'nın varlığı ve genom yapısı üzerinde sadece üç araştırma yapılmıştır (Cao ve ark., 2011; Feng ve ark., 2013; Canizares ve ark., 2015). Bunlardan ikisi pamuk (Cao ve ark., 2011; Feng ve ark., 2013) birisi ise zeytin (Canizares ve ark., 2015) bitkisindeki *V. dahliae* izolatlarının mikoviral dsRNA'ları üzerindeki çalışmalardır. Bu çalışmalar sonucunda Cao ve ark. (2011) pamuktaki dsRNA *Verticillium dahliae chrysovirus* 1 (VdCV1) olarak Feng ve ark. (2013) ise *Verticillium dahliae partitivirus* 1 (VdPV1) olarak adlandırmışlardır. Zeytindeki *V. dahliae*'dan elde edilen dsRNA, *Verticillium dahliae partitivirus* 1-olive (VdPV1-ol) olarak adlandırılmıştır. *V. dahliae* izolatlarının mikoviral dsRNA varlığı ve tanınması ile ilgili literatürde

herhangi bir çalışmaya ve buna bağlı olarak *V. dahliae*'nin dsRNA içeren izolatlarının patojenisitesini belirleyecek herhangi bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmanın amacı; Aydın yöresinde solgunluk ve kuruma belirtisi gösteren bitkilerin gövde kısmından alınan örneklerden elde edilen *V. dahliae* izolatlarının mikoviral dsRNA varlığının araştırılması, bu dsRNA'ların RT-PCR yöntemi ile tanınması ve dsRNA içeren izolatların elma testi ile patojenisitesinin belirlenmesidir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Aydın ilinin Söke, Koçarlı ilçeleri ve köylerinde yetiştirilen pamuk üretim alanlarında solgunluk hastalığı belirtisi gösteren bitkilerin gövdelerinden alınan 100 adet örnek ile çalışılmıştır. Toplam 100 adet örnekten 72 adet *V. dahliae* izolatı elde edilmiştir. *V. dahliae* izolatları dsRNA analizi için kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak *Cryphonectria parasitica*'nın hipovirulent olduğunu bildiğimiz USA-2 (CHV1) izolatı kullanılmıştır. dsRNA içeren *V. dahliae* izolatlarının patojenisite testi Granny Smith elma çeşidi ile yapılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Sörvey çalışmaları

2016 yılının Ekim ayında, TÜİK 2016 verilerine göre Aydın ilinin ilçe ve köylerinden pamuk örnekleri alınmıştır. Pamuk üretiminin yoğun olduğu bölgelerden hastalık belirtisi gösteren pamuk bitkilerinin gövdelerinden 8-10cm kadar parçalar steril bağ makası yardımı ile kesilerek alınmıştır. Alınan örnekler kese kağıtlarına yerleştirilmiş ve her örnek için GPS ile numaralandırma yapılmıştır. Her bir örnek alma işleminden sonra yüzeysel dezenfeksiyon sağlamak için sodyum hipoklorit kullanılarak kesici aletler silinmiş ve alınan örnekler tüm gün buz kutusunda muhafaza edilmiştir. Toplanan örnekler Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Mikoloji laboratuvarına getirilip +4°C' de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

2.2.2. *Verticillium dahliae*'nin izolasyonu

+4°C' de muhafaza edilen pamuk gövde örneklerinin iletim demetlerinde kahverengileşme gösteren kısımlarından sağlıklı dokuları da içerecek şekilde küçük parçalar steril bistüri ile kesilerek alınmıştır. Bu doku parçalarının yüzey dezenfeksiyonu % 2'lik sodyum hipoklorid çözeltisinde 2 dakika bekletilerek yapılmıştır. Bunu takiben steril saf su ile durulanmış ve steril filtre kağıtları ile kurutulmuştur. Yüzey dezenfeksiyonu yapılmış olan bu doku parçaları Su Agar (SA) ortamına yerleştirilip 24°C' deki inkubatörde gelişmeye bırakılmıştır (Anagnostakis ve Jaynes, 1973).

2.2.3. *Verticillium dahliae*'nin tanınması ve kültüre alınması

Su agar ortamında geliştirilen 100 adet fungal izolatların misel yapıları makroskopik olarak hiflerise mikroskopik yönden incelenmiştir.

2.2.4. *Verticillium dahliae* izolatlarında mikoviral dsRNA varlığının belirlenmesi

Elde edilen 72 adet *V. dahliae* izolatının dsRNA varlığını belirlemek için Balijja ve ark. (2008)'nin fenol- kloroform içermeyen dsRNA analiz yöntemi kullanılmıştır. Balijja ve ark. (2008) yöntemini doğrulamak için dsRNA içerdiği belirlenen altı izolat CF-11 selüloz kolon kromotografisinin kullanıldığı Morris ve Dodds (1979)'ün yöntemi ile tekrar analiz edilmiştir.

2.2.5. *Verticillium dahliae*'den izole edilen mikoviral dsRNA'nın RT-PCR ile tanınması

Aydın yöresinde pamuk bitkilerinden elde edilen *V. dahliae* izolatlarında bulunan mikoviral dsRNA'nın RT-PCR ile tanınması Canizares ve ark. (2015)'in zeytin örneklerinden elde edilen *V.*

dahliae izolatındaki mikoviral dsRNA'nın tanısı için kullandığı rastgele hegzamer primer ve spesifik primerler kullanılmıştır (Çizelge 1). RT-PCR analizi Thermo Scientific Verso 1 tek basamaklı RT-PCR Hot-Start Kit ile gerçekleştirilmiştir. RT-PCR sonrası elde edilen ürünler %1' lik agoroz jelde 1XTBE buffer ile elektroforezde yürütülmüş ve UV ışık altında görüntülenmiştir.

Çizelge 1. *Verticillium dahliae* dsRNA mikovirüsünün spesifik primerler dizimleri ve elde edildiği bölgeler (Canizares ve ark., 2015)

Spesifik primerler	Bölgeler	Dizim(5'-3')
Vd1-R	RdRp ORF	CATCGAAGATTGCTGACTAG
Vd1-F	RdRp ORF	TCTGGTGACCAGTTTGATCT
Vd1C-F	RdRp ORF	GCTTGATTGGCATGAAGTGG
Vd1C-R	RdRp ORF	CATGAGGATTGGCGTGTTG
Vd2-R	CP ORF	TGCTTGACGTTTCAGCCTTAC
Vd2-F	CP ORF	AAGTCTTATCGTGATGCTCC
Vd2-F	CP ORF	CATGAGTTCACCAAGGATC
Vd2-F	CP ORF	GGACGATCACGATAAGACTT

2.2.6. Mikoviral dsRNA içeren *Verticillium dahliae* izolatlarının elma patojenisite testi

Pamukta (Cao ve ark., 2011; Feng ve ark., 2013) ve zeytinde (Canizares ve ark., 2015) yapılan çalışmalarda *V. dahliae* mikoviral dsRNA içeren izolatların virülensliklerini belirleyecek herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bundan dolayı çalışmada *V. dahliae*'da ilk defa Granny Smith elma çeşidinde virülenslik testi uygulanmıştır. Homojen büyüklükte ve olgunlukta olan Granny Smith elma meyveleri seçilerek yıkanmış ve %70'lik alkol ile yüzey dezenfeksiyonu yapılmıştır. Patojenisite testinde pozitif kontrol olarak dsRNA içeren *V. dahliae* izolatları, negatif kontrol olarak dsRNA içermeyen izolat, kontrol için ise steril patates dekstroz agar kullanılarak ve üç tekerrürlü olarak uygulanmıştır. Her meyveden mantar delici ile 6 mm çapında 4 mm derinliğinde iki adet disk çıkarılmıştır. dsRNA içeren *V. dahliae* izolatları, negatif izolatlar ve patates dekstroz agar'dan alınan diskler elma meyvesinin yüzeyinde açılmış olan ikişer adet yaranın içerisine yerleştirilmiş ve parafimle yara bölgeleri sarılmıştır. İnokule edilen bölgelerin kurummasını engellemek için elmalar tek tek plastik poşet içerisine yerleştirilmiş ve ağzı kapatılıp iklim odasında karanlıkta 10 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Ölçümler 5. 10. ve 27. günler olmak üzere üç defa lezyonların çaplarını ölçmek amacıyla kontrol edilmiştir (Adams ve Hammer, 1989)

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Sörvey çalışmaları ve semptomatolojik bulgular

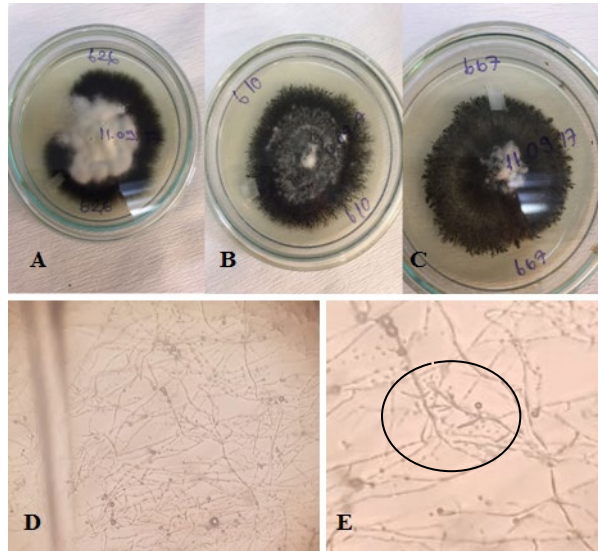
Aydın ilinin Söke ve Koçarlı ilçelerinde Çakırbeyli, Tekeli, Yeniköy, Bağarası, Karaatlı mahallelerinden elde edilen toplam 100 adet bitki örneğinde solgunluk ve kuruma belirtisi gözlenmiştir. Yapraklarda içe kıvrılma, yaprak damar aralarında uçtan içe doğru sararma ve hastalığın en tipik belirtisi olan iletim demetinde kahverengileşme (Şekil 1) semptomları belirlenmiştir. El-Zik (1985) ve Agrios (1997)' in yaptıkları çalışmada hastalıklı olduğunu düşündükleri bitkilerde yaprak ve sürgünlerde yeşilimsi rengin kahverengiye dönüştüğünü, yapraklarda içe kıvrılmaların gerçekleştiği ve gövdenin boyuna kesitler aldıklarında ksilemin koyu kahverengine dönüştüğünü belirlemişlerdir.



Şekil 1. Pamuk bitkisinde iletim demetinde kahverengileşme.

3.2. *Verticillium dahliae*'nın kültüre alınması ve tanılanması

Fungal yapıların makroskopik ve mikroskopik incelenmesi sonucu 100 adet örnekten 72 adetinin tanısı *V. dahliae* olarak mikolog Prof.Dr.Ömer ERİNCİK tarafından yapılmıştır. Fungal izolatların miselyal renkleri gri, siyah ve beyaz olarak belirlenmiş, mikroskopik incelenmesi sonunda hifler ve fungusun verticillat dallanma yapısı gözlemlenmiştir. Domsch ve ark. (1980)'de yaptıkları çalışmada elde etmiş oldukları *V. dahliae* izolatlarında konidioforları vejetatif hiften çok farklılaşmış olup, vertisillat dallanma gösterdiklerini ve elde ettikleri fungal yapıların renklerinin gri ve siyah renkte miselyal yapı oluşturduğunu bildirmişlerdir.

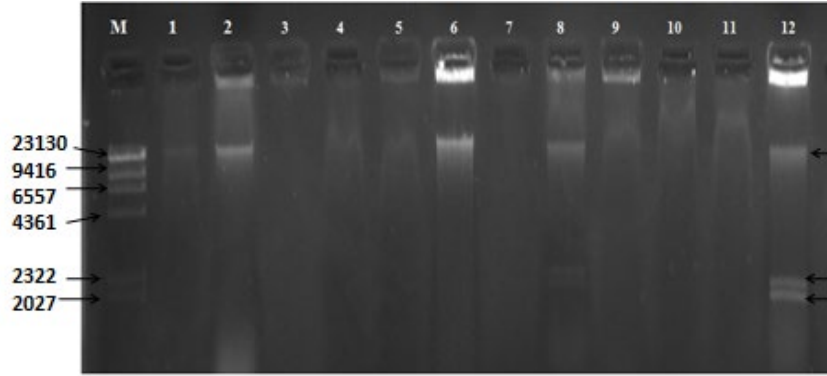


Şekil 2. *Verticillium dahliae* izolatlarının patates dekstroz agar ortamındaki gelişimi A) beyaz B)koyu gri C) siyah miselyal yapı D)hiflerin mikroskopik görüntüsü E) verticillat dallanma.

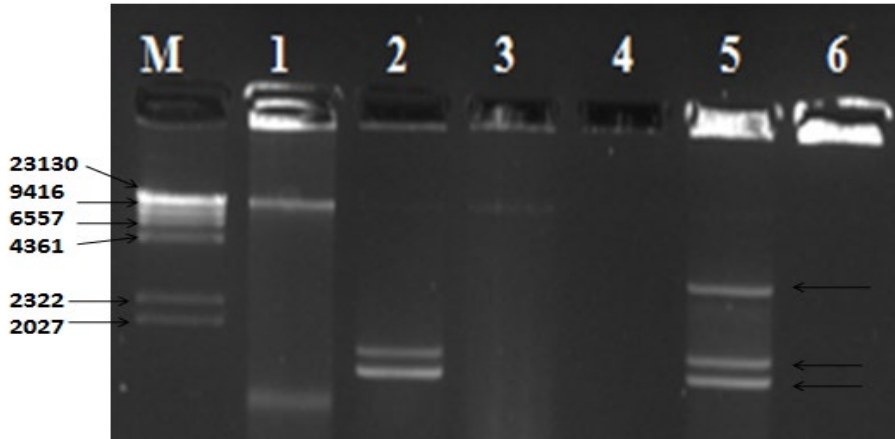
3.4. *Verticillium dahliae* izolatlarında mikoviral dsRNA varlığının belirlenmesi

72 adet *V. dahliae* izolatından 12 izolatta *V. dahliae* mikoviral dsRNA profiline rastlanılmıştır. dsRNA profili içeren örneklerin bazıları bir segmentli ve 18-20 kbp moleküler boyutlarında, bazılarının ise üç segmentli ve 18-20 kbp, 4-2 kbp, 2-1 kbp boyutlarında olduğu tahmin edilmektedir. Elde edilen 18-20 kbp'lık dsRNA'nın moleküler boyutunun pozitif kontrolün (USA-2 (CHV1, 12 700 bp) moleküler boyutuna

yaklaşık olduğu gözlemlenmiştir. Balijja ve ark. (2008) yöntemine göre pozitif çıkan 12 örnekten 6 tanesinin dsRNA varlığı Morris ve Dodds (1979) yöntemi kullanılarak doğrulanmıştır. Uygulanan her iki analiz sonucunda elde edilen dsRNA profillerinin aynı moleküler boyutlarda olduğu saptanmıştır.



Şekil 3. *Verticillium dahliae* izolatlarından Balijja ve ark. (2008) yöntemi ile izole edilen mikoviral dsRNA profillerinin elektroforezdeki görüntüsü; Lambda DNA marker (HindIII) (M), pozitif kontrol (*Cryphonectria parasitica* USA-2) (1), *Verticillium dahliae* mikoviral dsRNA içeren izolatlar (2-674)(4-647)(5-655)(6-622)(8-612)(9-620)(10-693)(11-685)(12-650), *Verticillium dahliae* mikoviral dsRNA içermeyen izolatlar (3-649)(7-615).



Şekil 4. *Verticillium dahliae* izolatlarından Morris ve Dodds (1979) yöntemi ile elde edilen mikoviral dsRNA profillerinin agar jel elektroforez görüntüsü; Lambda DNA marker (HindIII) (M), pozitif kontrol (*Cryphonectria parasitica*) (1), *Verticillium dahliae* mikoviral dsRNA izolatları (2-612)(3-674)(4-622)(5-650), negatif örnek (6-635).

Pamuktaki *V.dahliae*'da 2 adet mikoviral dsRNA Cao ve ark. (2011) ve Feng ve ark.(2013) tarafından saptanmıştır. Bu mikoviral dsRNA' lardan birisi 4 segmentli (3.6, 3.3 3.0 ve < 3.0 kbp) (Cao ve ark.,2011), diğerinin ise 2 segmentli (1.7kbp ve 1.5kbp) (Feng ve ark., 2013) olduğu belirlenmiştir.

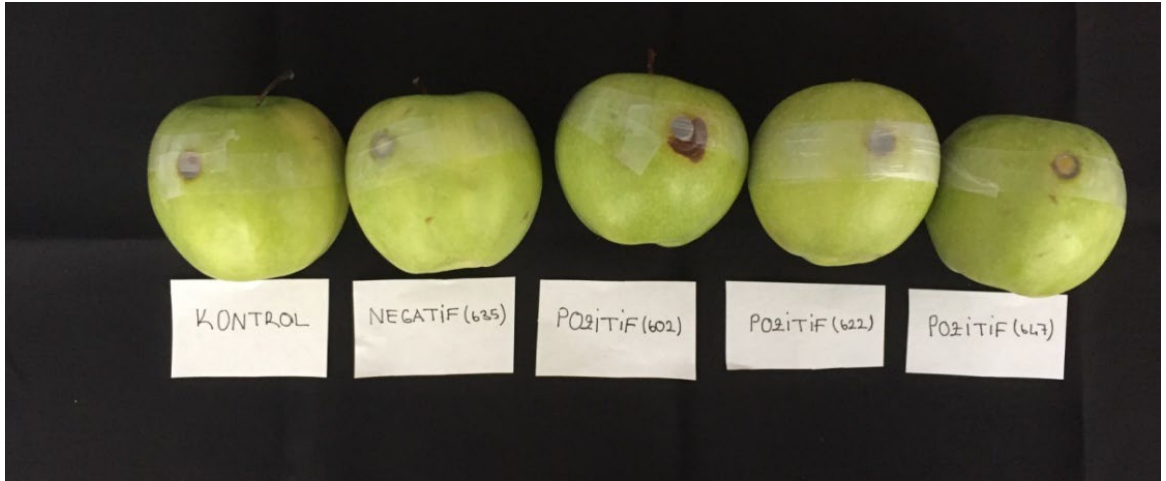
Türkiyede Kahramanmaraş ilindeki zeytinlerden elde edilen *V.dahliae* izolatlarının birinde dsRNA saptanmıştır. Elde edilen bu bir adet *V.dahliae* (Vd-253) izolatının 1,7 ve 1,5 kbp boyutlarında iki bant içeren mikoviral dsRNA olduğu belirlenmiştir (Canizares ve ark., 2015). Saptanmış oldukları bu dsRNA,Feng ve ark. (2013)'in saptanmış olduğu dsRNA profile benzer olduğunu Canizares ve ark. (2015) tarafından ifade edilmiştir. Pamuk ve zeytindeki *V. dahliae*'da saptanan bu dsRNA' profilinin moleküler boyutları ve bant sayıları yönünden Aydın izolatlarından elde edilen dsRNA'dan farklı olduğu belirlenmiştir. Bu da saptanan dsRNA'nın farklı bir mikovirüs olabileceğini düşündürmektedir.

3.5. *Verticillium dahliae*'den izole edilen mikoviral dsRNA'nın RT-PCR ile tanınması

Pamukdaki *V.dahliae* mikoviral dsRNA'ların tüm genom dizilerini çıkartılmasına rağmen tasarlanmış bir primere rastlanılmaması (Cao ve ark., 2011; Feng ve ark.,2013) ve Aydın pamuk izolatlarındaki dsRNA içeren mikovirüsün tanınması için zeytinden (Canizares ve ark., 2015) ve pamuktan (Feng ve ark., 2013) elde edilen dsRNA ların nükleotid dizilerinin aynı olması nedeni ile Canizares ve ark. (2015)'nın kullandığı rastgele hegzamer primer ve spesifik primer çiftleri kullanılmıştır .Ancak yapılan RT-PCR sonucunda herhangi bir Bandar astlanmamıştır. Bu sonucun beklenen bir durum olmasının nedeni Aydın pamuk izolatlarındaki dsRNA'ların moleküler boyutları ve bant sayıları yönünden pamuk (Feng ve ark., 2013) ve zeytindeki (Canizares ve ark., 2015) *V. dahliae*'da saptanan dsRNA'lardan farklı olmasıdır.

3.6. Mikoviral dsRNA içeren *Verticillium dahliae* izolatlarının elma patojenisitesi

12 adet dsRNA içeren izolat kullanılarak yapılan elma patojenisite testinde patojenin elma meyvelerinde oluşturduğu lezyon büyüklüklerini 10.,17.,ve 24. Günlerde yapılan gözlemler sonucu elma meyvelerinde lezyon büyüklükleri yönünden kontrole göre herhangi farklılığa rastlanılmamıştır. Böylece dsRNA içeren *V. dahliae* izolatlarının elma testine cevap vermediği belirlenmiştir.



Şekil 5. Mikoviral dsRNA içeren *Verticillium dahliae* izolatlarının elma meyvelerine inokulasyonunun 24. Günündeki lezyon büyüklüklerinin görüntüsü.

Pamukta(Cao ve ark., 2011; Feng ve ark., 2013) ve zeytinde (Canizares ve ark., 2015) yapılan çalışmalarda *V. dahliae* mikoviral dsRNA içeren izolatlarının patojenisitesini belirleyecek herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Mikoviral dsRNA içeren *Cryphonectria parasitica* (Elliston, 1985; Bisiach ve ark., 1988; Lee ve ark., 1992; De Lange ve ark., 1998; Akıllı ve ark., 2012) ve *Leucostoma spp.*, (Töngüslü, 2015) elma testi kullanarak izolatlarının patojenisitesini belirlemişlerdir. Elliston (1985) ve De Lange ve ark. (1998) bu test ile lezyon çaplarının birbirinden farklı olduğunu saptanmış ve *C. parasitica* izolatlarının virulent veya hipovirulent olduklarını kısa sürede ölçülebilen bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Bisiach ve ark. (1988) elma testinde *C. parasitica*'nın virulent ve hipovirulent izolatlarının oluşturduğu lezyonların büyüklüklerinin yaklaşık olması nedeniyle güvenilir olmadığını ifade etmişlerdir. Akıllı ve ark. (2012) *C. parasitica*'daki patojenisite testi ile virulent izolatların hipovirulent izolatlardan daha düşük nekroz alanı oluşturduğu belirlemişler ve elmada oluşan nekrozlardan yapılan re-izolasyon sonucunda *Trichoderma spp.* elde etmişlerdir. Bundan dolayı elma testinin her zaman güvenilir sonuçlar vermediğini ve patojenisite çalışmalarının diğer testlerle desteklenmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Lee ve ark. (1992)'da doku farklılığı nedeniyle *C. parasitica* için elma testi sonuçlarının kestenede yapılacak test sonuçlarını yansıtmayacağını, izolatların virülensliklerinin kestane dokuları üzerinde yapılmasının daha doğru olacağını belirtmişlerdir.

Başka bir çalışmada ise *Leucostoma* spp. izolatlarında elma ve dal patojenisite testi uygulanmıştır. Yapılan patojenisite testleri sonucunda hipovirulent izolatların virulent izolatlara göre daha az lezyon oluşturduğu gözlemlenmiş ve elma patojenisite testinin *Leucostoma* spp.' de cevap verdiği belirlenmiştir (Töngüşlü, 2015).

Yukarıdaki çalışmalardan da anlaşıldığı gibi bazı fungus elma patojenisite tesleri pozitif sonuç verdiği halde bazılarında güvenilir sonuçlar alınmamaktadır. Bunun için diğer patojenisite testleri ile desteklenmesi gerekmektedir.

4. Sonuç ve Öneriler

Aydın ilinde pamuktaki *V.dahliae* izolatlarında mikoviral dsRNA' ların elde edilmiş olması bundan sonra bu konuda yapılacak olan araştırmalarda sadece bir başlangıç oluşturacak niteliktedir. Bu çalışmada elde edilen *V.dahliae* mikoviral dsRNA'larının sekans analizi yapıp primerleri sentezlenmeli ve tanılanması gerçekleştirilmelidir. Ardından Ege Bölgesinde yetiştiriciliği yapılan pamuk bitkisinden elde edilen *V.dahliae* mikovirüs dsRNA'nın biyolojik mücadelede kullanılabilirliği ve hastalığın mücadelesindeki etkisinin belirlenmesi üzerine çalışmalar yapılmalıdır.

Teşekkür

Bu çalışma tezden elde edilmiştir. Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından desteklenmiştir. Bu çalışmanın yürütülmesinde yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ'e, *Verticillium dahliae* ile ilgili tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Ömer ERGNCGK, ve tez çalışmam boyunca maddi ve manevi destek olan başta ailem üzere, Zir. Yük. Müh. Saha HOSSEINALIZADEH ile diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Kaynakça

- Adams, G.C., & Hammer, SA. (1989). Optimum sample size for detecting virulence in *Leucostoma* isolates from peach. *Plant Disease*, 73, 754-759.
- Agrios, G.N.(1997) Plant Pathology. Akademik Press. 635 p. Florida.
- Al-Rawahi, A.K., & Hancock, J.G. (1998) Parasitism and biological control of *Verticillium dahliae* by *Pythium oligandrum*. *Plant Disease*, 82, 1100-1106.
- Anonim. (2017a) Pamuk (<http://www.bahçe.Biz/bitki/tarla/endüstri/pamuk.Htm>) Erişim Tarihi: 05.04.2018.
- Anagnostakis, S.L., & Jaynes, R. A. (1973). Chestnut blight control: use of hypovirulent cultures. *Plant Dis. Rep.* 57, 225-226.
- Akıllı, S., Ulubaş-Serçe, Ç., Katircioğlu, Y.Z., Maden, S., & Rigling, D. (2012). Characterization of hypovirulent isolates of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* from the Marmara and Black Sea regions of Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, 135 (2), 323-334.
- Balijja, A., Kvarnheden, A., & Turchett, T. (2008). A non-phenol-chloro form extraction of double-stranded RNA from plant and fungal tissues. *Journal of Virological Methods*, 152, 32-37.
- Biçiçi, M., & Kurt, Ş. (1998). *Etiology, Incidence and Prevalence of Cotton Wilt Disease and Strains of The Wilt Pathogen in Çukurova*. World Cotton Research Conference. 6-12 September, Athens, Greece.
- Bisiach, M., De Martino, A., Gobbi, E., Intropido, M., & Vegetti, G. (1988). Studies on chestnut blight: activity report. *Rivista di Patologia Vegetale S. IV*, 24, 3-13.
- Bisseger, M., Rigling, D., & Heiniger, U. (1997). Population structure and disease development of *Cryphonectriaparasitica* in European chestnut forests in the presence of natural hypovirulence. *Phytopathology* 87, 50-59.
- 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.
- De Lange, W.J., Wingfield, B.D., & Wingfield, M.J. (1998). A rapid, apple-based test for virulence in *Cryphonectria cubensis* isolates. *Eur. J. For. Phytopathology* 28, 409-412.
- Domsch, K.H., Gams, W., & Anderson, T.H. (1980). *Compendium of Soil Fungi*, Volume I. Academic Press, 859 pp.
- Elliston, J.E. (1985). Characteristics of dsRNA-containing strains of *Endothia parasitica* in relation to hypovirulence. *Phytopathology*, 75, 151-158.
- El-Zik, K.M. (1985) Integrated Control of Verticillium Wilt of Cotton. *Plant Disease* ,1025-1032.
- Erdoğan, O., Sezener, V., Özbek, N., Bozbek, T., Yavaş, İ., Ünay, A. (2006). The effects of Verticillium wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.) on cotton yield and fiber quality. *Asian Journal of Plant Science*, 5, 867-870.
- Esentepe, M. (1979). *Adana ve Antalya illerinde pamuklarda görülen solgunluk hastalığının etmeni, yayılışı, kesafeti ve zarar derecesi ile ekolojisi üzerinde araştırmalar*. İzmir Bölge Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Araştırma Eserleri Serisi, Yayın No:32, Sayfa No: 45
- 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.
- Galanopoulou, S. (2006). <http://www.ressources.ciheam.org/om/pdf/s14/CI01190> Erişim Tarihi: 18.06.2018
- Gence, O. (1987). *Genel Tarla Bitkileri*. Ç. Ü. Ziraat Fakültesi. Adana, 135s.
- Gencer, O., Mert, M., & Kurt, Ş. (2001). *Bazı Pamuk hat ve çeşitlerinin solgunluk hastalığına (V.dahliae Kleb.) tepkisi ile bunların tarımsal ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi*. IV. Tarla Bitkileri Kongresi, 17-21 Eylül 2001, Tekirdağ, 193-197.
- Godoy, A., Palomo, G., & Garcia, C. (1995) Performance of New Cotton Cultivars on *Verticillium dahliae* Kleb. Infested Soils at the Comarca Lagunera, Mexico, Proceedings Beltwide Cotton Conference 498-500, Tennis.
- Heiniger, U., & Rigling, D. (1994). Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol*, 32, 581-99.
- İyriboz, N. (1941). *Mahsül Hastalıkları*. Ziraat Vekaleti Neşriyatı Umum no: 237.
- Karaca, İ. (1974). *Sistematik Bitki Hastalıkları*. Deuteromycetes (Fungi Imperfecti), Cilt, IV. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:217. 148-159 s.
- Karaca, İ., Karcıoğlu, A., & Ceylan, S. (1971). Wilt Disease of Cotton in the Ege Region of Turkey. *J. Turkish Phytopath*, 1, 4-11. Agris, 1997.
- Karademir, E., Karademir, Ç., Ekinci, R., Bars, A., & Çelik, İ. (2009). *Solgunluk Hastalığı (V.dahliae Kleb.) Etmenine Karşı F5 Pamuk Hatlarının Reaksiyonlarının Belirlenmesi*. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi 15-18 Temmuz 2009, Van. S, 179.
- Krstin, L., Novak-Agbaba, S., Rigling, D., Krajacic, M., & Curkovic Perica, M. (2008). Chestnut blight fungus in Croatia: diversity of vegetative compatibility types, mating types and genetic variability of associated *Cryphonectria hypovirus*, 1. *Plant Pathology*, 57, 1086-1092.
- Lee, J.K., Tattar, T.A., Berman, P.M., & Mount, M.S. (1992). A rapid for testing the virulence of *Cryphonectria parasitica* using excised bark and wood of American chestnut. *Phytopathology* 82, 1454-1456.
- Macdonald, W.L., & Fulbright, D.W. (1991). The biological control of chestnut blight: use and limitations of transmissible hypovirulence. *Plant Dis.*, 75, 656- 661.
- Melouk, H.A. (1992) *Methods for Research on Soil-Borne Phytopathogenic Fungi*. (L. 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.
- Moshirabadi, H., Janlou, M., & Gajar, A. (2000). *The Study of Verticillium Wilt In Preliminary Variety Trials and Common Variety Trials*. The Interregional Cooperative Research Network on Cotton. A Joint Workshop and Meeting of the All Working Groups 20-24 September, 99-100, Adana-TURKEY.

- Heiniger, U., & Rigling, D. (1994) Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol*, 32, 581-99.
- Nemli, T. (2003). *Pamuk hastalıkları ve savaşım yöntemleri. pamukta eğitim semineri*, 14-17 Ekim 2003, İzmir. S, 103-111.
- Pegg, G.F. (1984). The impact of *Verticillium* diseases in agriculture. *Phytopathol Mediterr*, 23, 176-192.
- Robin, C., & Heiniger, U. (2001.) Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and Land scape Research* 76, 361–367.
- Sağır, A., & Tatlı, F. (1995). *Pamuk solgunluk hastalığı etmeni (Verticillium dahliae Kleb)'ne karşı pamuk çeşitlerinin duyarlılıklarının belirlenmesi üzerinde araştırmalar*, VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri. 26-29 Eylül 1995, Adana, 5-9.
- Sezgin, E. (1985). Pamuk solgunluk hastalığı ile savaşımında kültürel işlemlerin önemi. *Yıllık 3 (3)*, 23-31, İzmir.
- Schnathorst, W.C., & Cooper, J.R. (1975). *Anomalies in Field and Green house Reaction of Certain Cotton Cultivars in Fected with Verticillium dahliae*. In *Proc. Beltwide Cotton Prod. Conf.*, 6-8 January, New Orleans, National Cotton Council, Memphis, p. 148-149.
- Sotirovski, K. (2000). *Hypovirulence, Vegetative-Compatibility Groups and Mating Types of Cryphonectria parasitica (Murr.) Barr. in the Republic of Macedonia*. PhD thesis. Skopje: University Ss. Kiril i Metodij.
- Töngüşlü, M. (2015). *Ege Bölgesi Kiraz Alanlarında Leuco stoma spp. İzolatlarının Virülenslik ve dsRNA Varlığı Yönünden İncelenmesi*. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, 55, Aydın. Türkiye.
- Trestic, T., Uscuplic, M., Colinas, C., Rolland, G., Giraud, A., & Robin, C., (2001). Vegetative compatibility type diversity of *Cryphonectriaparasitica* in Bosnia-Herzegovina, Spain and France. *Forest Snow and Land scape Research*, 76, 391–396.
- Wilhelm, S., Sagen, J.E., & Tietz, H. (1974). Resistance to *Verticillium* Wilt in cotton: source, techniques of identification inheritance trends and resistance potential of Multipline Cultivars. *Phytopathology*, 64, 924-931