ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI ULTRAVİYOLE IŞIĞA MARUZ KALMIŞ KÜLTÜRLERDE *CRYPHONECTRIA HYPOVİRUS'*ÜN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Aslı ÖZCAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Aslı ÖZCAN tarafından hazırlanan **"Farklı ultraviyole ışığa maruz kalmış kültürlerde *Cryphonectria hypovirus'*ün aktivitesinin belirlenmesi"** adlı tez çalışması 26/10/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyolojii Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof.Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK

Eş Danışman :

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof.Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Aysel SARI
Kimya Anabilim Dalı
Fırat Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Farklı ultraviyole ışığa maruz kalmış kültürlerde *Cryphonectria hypovirus'*ün aktivitesinin belirlenmesi**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (26/10/2022).

Aslı ÖZCAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI ULTRAVİYOLE IŞIĞA MARUZ KALMIŞ KÜLTÜRLERDE *CRYPHONECTRİA HYPHOVİRUS'*ÜN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Aslı ÖZCAN

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK

Cryphonectria parasitica (Murill) Barr, kestane ağaçlarında kabuk altında ilerleyerek kanserlere neden olmaktadır. Kestane kanseri ile en etkili mücadele için kültürel önlemlerle (mekanik önlemler) biyolojik önlemlerin birlikte uygulanması önerilmektedir. Biyolojik mücadele hipovirülent strainler kullanılarak patojen fungusun virülensliğini düşürmeye çalışmaktır. Biyolojik mücadelenin başarısı hipovirüse bağlıdır. Ancak hipovirüsün fungus içindeki durumunu etkileyen birçok farklı etmenin mevcut olduğu düşünülmektedir. Bunlardan hipovirüsün gelişimine ışığın etkisi bu çalışmanın konusunu oluşturmuştur. Biyolojik mücadele çalışmalarında, hipovirüs içeren *C. parasitica* izolatları yani hipovirülent izolatlar kanserli kabuğa uygun yöntemlerle uygulanma ile yapılmaktadır. Çalışmada Avrupa uyum grubu EU-1'e giren Sinop ilinden elde edilen hipovirülent izolatlarla, EU-12'ye giren Makedon orjinli bir hipovirülent ve Bursa orjinli hipovirüs aktarımı yapılmış EU-12 (BU06) izolatı kullanılmıştır. Hipovirülent izolatlar 5 farklı ışık kombinasyonlarında tutularak hipovirüs gelişimi kültürel özelliklerine göre değerlendirilmiştir. Işığa tabi tüm izolatlar Bavendamm testine de alınmıştır. Farklı ışık boylarının virüs gelişimini olumsuz etkilediği, ultraviyole ışık altında tutulan hipovirülent izolatlarda virüsün gelişmediği görülmüştür.

2022, 36 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Cryphonectria parasitica*, kestane, hypovirülent, ultraviyole

ABSTRACT

Master of Science Thesis

DETERMINATION OF THE ACTIVITY OF *CRYPHONEECTRIA HYPOVIRUS* IN DIFFERENT ULTRAVIOLET LIGHT EXPOSED CULTURES

Aslı ÖZCAN

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK

Cryphonectria parasitica (Murill) Barr causes cankers by progressing under the bark of sweet chestnut trees. For the most effective fight against sweet chestnut canker, it is recommended to apply cultural measures (mechanical measures) and biological measures together. Biological control is to try to reduce the virulence of the pathogenic fungus by using hypovirulent strains. The success of biological control depends on the hypovirus. However, it is thought that there are many different factors that affect the state of the hypovirus in the fungus. The effect of light on the development of hypovirus was the subject of this study. In biological control studies, hypovirus-containing *C. parasitica* isolates, that is, hypovirulent isolates, are applied to the canckerous bark with appropriate methods. In the study, hypovirulent isolates obtained from Sinop province, which is included in the European compatibility group EU-1, and a hypovirulent isolate of Macedonian origin, which entered EU-12, and EU-12 (BU06) isolates from Bursa origin, which were transferred hypovirus, were used. Hypovirulent isolates were kept under 5 different light combinations and the development of hypovirus was evaluated according to their cultural characteristics. All isolates subjected to light were also included in the Bavendamm test. It was observed that different light lengths adversely affected virus development, and the virus did not develop in hypovirulent isolates kept under ultraviolet light.

2022, 36 pages

Keywords: *Cryphonectria parasitica*, sweet chestnut, hypovirulent, ultraviolet

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında yardımcı olan Öğr. Gör. Dr. Deniz ÇAKAR'a, arazi çalışmalarında yardımcı olan Soğuksu Orman İşletme Şefi Sefer ALKAN'a, laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Biyolog Beyza AKSOY'a ve tez danışmanım Prof.Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK'e sabrı, rehberliği ve anlayışı için teşekkür ederim.

Aslı ÖZCAN
Çankırı, 26/10/2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **v**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **viii**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
3. MATERYAL VE METOT **10**
3.1 Örneklerin Toplanması **10**
3.2 Hipovirülent İzolatların Geliştirilmesi **11**
3.3 Tester izolatların Temini **11**
3.4 Uyum Tiplerinin Tespiti **11**
3.5 Kullanılacak Hipovirülent İzolatların Seçimi **12**
3.6 Fenol oksidaz Enzim Aktivitesi (Bavendamm Testi) **13**
3.7 Hipovirülent İzolatların Ultraviyole Işık Altında Tutulmaları **14**
3.8 Farklı Işık Altında İnkübasyona Bırakılan İzolatlar İçin Fenol oksidaz Enzim Aktivitesi (Bavendamm testi) **15**
4. BULGULAR **16**
4.1 İyileşmiş Kanserlerden Elde Edilen Funguslar ve *Cryphonectria parasitica*'nın Uyum Tipleri **16**
4.2 Farklı Işık Altında İnkübasyona Bırakılan İzolatla için Fenol oksidaz Enzim Aktivitesi (Bavendamm testi) Değerlendirilmesi **16**
5. TARTIŞMA VE SONUÇ **21**
KAYNAKLAR **23**
EKLER **30**
ÖZGEÇMİŞ **36**

SİMGELER DİZİNİ

dk	dakika
g	gram
mg	miligram
ml	mililitre
mm	milimetre
Nm	nanometre
^{o}C	santigrat
%	yüzde

KISALTMALAR DİZİNİ

CHV	*Cryphonectria hypovirus*
dsRNA	Çift sarmallı Ribonükleik asid
EU	Avrupa uyum grubu
F	Fransız alttipi
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FS	Fizibilite çalışmaları
NaOH	Sodyum hidroksit
PDA	Patates dekstroz agar
RNA	Ribonükleik asid
UV	Ultraviyole
Vc	Vegetative compatibility

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Erfelek Orman İşletme Müdürlüğü sınırlarındaki iyileşmiş kanserlerden örnek alınması.....10
Şekil 3.2 İyileşmiş kanserlerden alınan kabuk örneklerinin izolasyon için hazırlanması……... 11
Şekil 3.3 Si 23 izolatının EU-1 uyum tipi ile aralarında oluşturdukları baraj zonlarından görünüm…….12
Şekil 3.4 Bavendamm testinde virülent (koyu renkte) ve hipovirülent (açık renkte) izolatların gelişimi 13
Şekil 3.5 Hipovirülent izolatların yakın ultraviyole ışık (NUV) ve ultraviyole ışık (UV) altındaki görünümleri……. 14
Şekil 4.1 Farklı ışık koşullarında gelişen M7060 Makedon izolatının Bavendamm testinde virülent (koyu renkte) ve hipovirülent (açık renkte) izolatların gösterdiği renk reaksiyonu.....18
Şekil 4.2 7 gün karanlık +5 gün tek ultraviyole (260 nm) ışık altında (KOD E) gelişen hipovirülent kültürler……..20

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Hipovirülent izolatlara uygulanan farklı ışık kombinasyonlarının kodları .. 15
Çizelge 4.1 KOD A (karanlık) ve KOD B (normal gelişim ışığı) inkübasyon koşulları altında hipovirüslü *C. parasitica* izolatlarının farklı kombinasyonlarının gelişimi 17
Çizelge 4.2 KOD C ve KOD D inkübasyon koşulları altında hipovirüslü *C. parasitica* izolatlarının farklı kombinasyonlarının gelişimi 19
Çizelge 4.3 KOD E (Tek ultraviyole) inkübasyon koşulları altında hipovirüslü *C. parasitica* izolatlarının farklı kombinasyonlarının gelişimi 20

1.GİRİŞ

Kestane kanseri olarak adlandırılan hastalık, *Cryphonectria parasitica* adlı fungus tarafından meydana getirilen ve kestane ağaçlarında kabuk ölümlerine dolayısıyla da ağaçların kurumalarına yol açan bir hastalıktır. Hastalık etmeni kestane ağaçlarında verim kayıbına yol açmaktadır ve bu durumdan üreticiler olumsuz etkilenmektedir. Oysaki kestane ağacı, meyvesi, odunu ve balı ile ekosistemimizin önemli bir ağacıdır. Bu hastalık etmeninde meydana gelen kanserlerde zamanla iyileşmeler görülmeye başlanmıştır.

Bu iyileşmelere *C. parasitica*'nın sitoplazmasında yaşayan bir hipovirüs neden olmaktadır. Bu hipovirüs, patojenin hastalık yapma yeteneğini, sporolasyonunu ve renk pigmentlerini etkilemektedir. Patojenin sitoplazmasında yaşayan hipovirüsün tipleri, etkinliği gibi konular üzerine Türkiye'de ve dünyada birçok çalışma yapılmıştır (Akıllı *et al*. 2013, Çakar ve ark. 2021). Hipovirüsün dağılımını birçok faktör etkilemektedir. Bunlardan en önemlisi fungusun vejetatif uyum tipleri olmasına rağmen yapılan çalışmalar fungus içindeki virüsün çoğalmasına ekolojik koşulların da etki ettiğini bildirmektedir.

Türkiye'de hipovirülenslik Karadeniz ve Marmara Bölgesi'nde yaygın olarak görülmekte iken Ege Bölgesi'nde doğal olarak görülmemektedir. Akıllı ve ark. (2013) yapmış oldukları hipovirülent uygulama çalışmalarında da Ege Bölgesi kestane sahalarında hipovirüsün yayılımının Karadeniz ya da Marmara Bölgesi kadar hızlı olmadığını görmüştür. Bu tez kestane kanseri etmeni ile çalışan birçok araştırıcının da gözlemlediği hipovirüsün gelişimi üzerine ultraviyole ışığın olumsuz etkisi olduğuna dair yapılan yorumun bilimsel olarak açığa çıkarılması amaçlı hazırlanmıştır. Özellikle üzerinde durulan ise hipovirüsün gelişimine ışığın etkisidir. Böylece özellikle Ege Bölgesi'ne birçok yerden aşı kalemleri, fidanlar getirilmesine rağmen yapılan uygulama sonuçlarına bakıldığında doğal hipovirüslük yayılımın zayıf olmasının nedeni de açıklanabilecektir.

Kestane kanseri ile mücadelede en etkili yöntem sanitasyon önlemleri ile birlikte hipovirülent uygulamaların yapıldığı biyolojik savaştır. Kestane kanserlerine iyileştirmek amaçlı hipovirülent uygulamaları yapmanın yanında virüsün doğal olarakta kestane sahalarında hızlı bir şekilde yayılması mücadele yöntemine başarı ve destek açısından önemlidir. Türkiye' de Orman Genel Müdürlüğü bünyesindeki Batı Karadeniz Araştırma Enstitüsü'nde farklı bölgelerde kestane kanserlerine hipovirülent izolatlar uygulanarak biyolojik savaş çalışmaları yürütülmektedir. Bu tez verileri yapılacak hipovirülent uygulamalarının yeniden planlanmasında ışığın durumunun dikkate alınması ve uygulama sayısının ışığın etkisine göre belirlenmesi için de kullanılabilecektir. Ayrıca yapılan literatür taramasında hipovirülensliğin yayılımında etkili olduğu bildirilen ışık faktörü ilk kez bilimsel olarak değerlendirilmiş olacaktır.

Bu kapsamda Sinop'dan elde edilen hipovirülent izolatlar ve çalışmada kullanılan diğer hipovirülent izolatların, ultraviyole ve yakın ultraviyole ışık altındaki gelişimleri incelenmiştir. Bu şekilde *C. parasitica*'nın sitoplazmasında bulunan hipovirüsün varlık durumu, bu ışıklar altında iken fungusda meydana getirdiği değişimler, Bavendamm Testi ile araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Kestane ağacı (*Castanea sativa* (Mill.)), 30-35 m boylanabilen, göğüs çevresi 10 m kadar ulaşabilen, orta büyüklükte, uzun ömürlü (Türkiye'de Antalya, Akseki'de bulunan İbradi kestaneleri şu anda 600 yaşına yakın (Asan ve Artar 1987)) yaprak döken bir ağaçtır (Avanzato 2009). Avrupa kestanesi, Kuzey Batı Afrika'da, İngiltere ve Belçika'nın bulunduğu Kuzey-Batı Avrupa'da, Hazar Denizi'nden başlayarak Kafkaslar ve Türkiye'nin bulunduğu Güney Batı Asya'da, Portekiz, İspanya'dan başlayarak Fransa, İtalya ve Balkanlardan Yunanistan'a kadar olan tüm Güney Avrupa'da yayılmaktadır (Conedera *et al*. 2016, Barstow and Khela 2018). Avrupa'da kestane 2,5 milyon hektardan fazla bir alanı kaplamaktadır (Conedera *et al*. 2004). Türkiye'de ise doğuda Gürcistan sınırından başlayarak, İstanbul'a kadar tüm Karadeniz sahili boyunca uzanır ve Marmara Bölgesi'nden Batı Anadolu'ya geçmektedir. Aydın, Isparta ve Antalya illerinde lokal olarak doğal ve kültürel yayılış göstermektedir (Genç ve Güner 2000). Türkiye'de kestane meşcereleri saf ve karışık olarak toplamda 81.232 ha alanda yayılışı göstermektedir (OGM 2021).

Dünya'da kestanelerin yayılışını ve sağlığını (böcek zararları, fungal etmeler, vs) etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Literatüre göre, Kestane ağaçlarının verim ve hayatiyetini etkileyen iki önemli hastalık etmeninden bahsedilmektedir. Bu hastalıklardan biri *Cryphonectria parasitica* (Murill) Barr. isimli fungusun neden olduğu kestane kanseri bir diğeri ise *Phytophthora* spp.'lerin neden olduğu kök çürüklüğü hastalığıdır (Vettraino *et al*. 2005, Rigling and Prospero 2018, Akıllı Şimşek *et al*. 2019). Bu hastalıklardan *Cryphonectria parasitica* aynı zamanda önemli bir istilacı türdür ve istilacı türlerin baskısı ve iklim değişikliğinin orman sağlığını etkileyen en önemli stres faktörleri arasında olduğu öne sürülmüştür (Trumbore *et al*. 2015). İstilacı bitki patojenleri, dramatik ve kalıcı ekolojik değişikliklere neden olabildikleri için orman ekosistemleri için büyük bir tehdit oluşturmaktadır (Ellison *et al*. 2005).

Cryphonectria parasitica, *Ascomycete* (*Diaporthales*) familyasına ait bir fungustur. Fungus ilk olarak *Diaporthe parasitica* Murrill. olarak tanımlandıktan daha sonra *Endothia* cinsine aktarılmış (Anderson and Anderson 1912) ve son olarak 1978 yılında

şimdiki kullanılan *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr ismini almıştır (Barr, 1978). Bu patojenin ana konukçusu *Castanea* (familya *Fagaceae*) cinsleridir(Rigling and Prospero 2018). Etmen fungus yara paraziti olduğu için, kestane (*Castanea* spp.) ağaçlarında açık yaralardan giriş yaparak ağacı enfekte ederek kabuk dışından içlere doğru ilerlemektedir (Jakobi 2005). Etmenin askosporları 10 x 4 µm boyutunda bölmede daralmış ve şeffaf iki hücreli olup peritesleri 10-20'li gruplarda bulunmaktadır. Düz veya hafif bükük olan konidler şeffaf 2-3 x 1 µm boyutunda sarımtırak iplikçikler şeklindedir. Etmenin sporları stroma içinde hem eşeysiz hem de eşeyli üreyebilmektedir. Peritesler, stroma içinde belirgin bir şekilde oluşmaktadır. Eşeysiz sporlar ise stroma içinde kadehe benzeyen geniş ağızlı bir yapı içinde oluşmaktadır (EPPO 2005).

Patojen fungus ilk olarak 1904 yılında New York'ta bir Zooloji Parkı'nda, Amerikan kestanesinde (*Castanea dentata* (Marsh.) Borkh.) rapor edilmiştir. Bu türün doğal olarak bulunduğu yer Çin, Japonya ve Kore'dir. Fungusun orjinini belirlemek için yapılan genetik analizler, etmen fungusun Amerika'ya, Japonya, Çin ve Kore'den giriş yaptığını göstermektedir (Dutech *et al*. 2012). Avrupa'da ise ilk olarak 1938 yılında, İtalya'da görülmüştür (Heiniger and Rigling 1994). Türkiye'de ise bu etmen ilk defa Marmara Bölgesi'nde 1967'li yıllarda kayıt altına alınmıştır (Coşkun ve Kural 1994, Gürer *et al*. 2001). Hastalık etmeni daha sonra, Delen (1979) tarafından Zonguldak, Kastamonu, Sinop ve Bolu'da; Çoşkun ve Kural (1994) tarafındna Bartın'da, Demir ve Çeliker (1996) tarafından Manisa, İzmir, Balıkesir ve Çanakkale'de, Erincik *et al*. (2003) tarafından Aydın ilinde kayıt altına alınmıştır.

Avrupa Bitki Koruma Organizasyonu tarafından, bu fungus A2 karantina listesine alınmış ancak uygulanan tedbirler hastalığın yayılmasını engelleyememiş ve hastalık birçok Avrupa ülkesinde ve Türkiye'de yayılmıştır (EPPO 2005).

Kestane kanseri etmeni birçok bölgede ağaçları önemli ölçüde olumsuz etkilemiştir. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda hastalığın şiddetinin azaldığı ve ağaçlarda iyileşmelerin başladığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak iyileşme

nedenleri araştırılmış olup bu sonuç *C. parasitica*'nın hipovirülent strainine bağlanmıştır. Hipovirülans, *Hypoviridae* ailesindeki mikovirüslerin neden olduğu *C. parasitica*'daki viral bir hastalığı ifade eder (Choi and Nuss 1992).

Cryphonectria parasitica'nın hipovirülent strainleri, fungusun birkaç mikovirüs tarafından enfekte edilmesiyle oluşmaktadır. Enfekte edilen fungusun virülensliğini bu mikovirüs azaltmaktadır. *Hypoviridae* familyasında bulunan bu virüsler dsRNA içermektedirler. Bu virüsler konukçu hücrenin sitoplazmasında yaşamaktadır (Choi and Nuss 1992). Hipovirüsler, fungusda üreme kapasitesinde düşüşe neden olur. Funguları enfekte eden bu virüsler, enfekteli olmayan diğer virüslere ancak hifsel uyumluluk (anastomosis) yoluyla geçebilmektedir (Anagnostakis 1977, Jaynes and Elliston 1980, Griffin *et al*. 2004, Milgroom and Cortesi 2004, Perlerou and Diamandis 2006). Bu virüsler *Hypoviridae* familyasında, *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV1), CHV2, CVH3 ve CHV4 olarak isimlendirilmektedir (Heiniger and Rigling 1994, Perlerou and Diamandis 2006). CHV-1, Japonya, Çin ve Avrupa'da (Peever *et al*. 2000, Allemann *et al*. 1999); CHV-2, Kuzey Amerika ve Çin'de (Hillman *et al*. 1992, Peever *et al*. 2000) ve CHV-3, Kuzey Amerika'da rapor edilmiştir (Peever *et al*. 2000). CHV-4, Kuzey Amerika'nın batısı Appalachian'da geniş bir alanda yayılış göstermektedir.

En çok kullanılan hipovirüs, Avrupa'da kestane yanıklığının biyolojik kontrol ajanı olarak görev yapan *Cryphonectria hypovirus* 1'dir (CHV-1). CHV-1, patojen büyümesini ve sporlaşma kapasitesini azaltarak *C. parasitica*'da hipovirülent bir fenotipi indükler (Rigling and Prospero 2018). CHV1 etkileşimi, mikovirüsün aracılık ettiği başarılı bir doğal biyokontrol sistemidir. Hipoviral enfeksiyon, *C. parasitica*'da azalmış aseksüel sporülasyon, cinsel üreme ve pigmentasyonu içeren ilişkili semptomlarla birlikte hipovirülans olarak adlandırılan bir fenomen olan konakçı fungusun patojenik potansiyelini azaltır (Van Alfen *et al*. 1975, Nuss 1992). Dört CHV türü arasında, CHV1, üzerinde en çok çalışmanın yapıldığı türdür ve hipoviral enfeksiyonun tüm tipik semptomlarını gösterir (Hillman and Suzuki 2004, Nuss 2005). *Cryphonectria parasitica*'nın CHV-1 ile enfeksiyonu, fungusu öldürmez ancak parazitik büyümesini güçlü bir şekilde azaltır, aseksüel sporülasyonu ve pigmentasyonu azaltır (Milgroom and Cortesi 2004). *Cryphonectria* hipovirüsleri CHV-2, CHV-3 ve CHV-4

taksonomik olarak CHV-1 ile ilişkili olup farklı genom organizasyonlarına ve *C. parasitica* üzerinde farklı etkilere sahiptir (Hillman and Suzuki 2004). CHV-2 ve CHV-3 *C. parasitica'*da hipovirülensliği sağlarken, CHV-4'ün ise hiovirülensliğe etkisi bulunmamaktadır (Bryner and Rigling 2011).

Avrupa'da genetik olarak farklı birkaç CHV-1 alt tipi tanımlanmıştır (Gobbin *et al*. 2007). İtalyan alt tipi (alt tip I) en yaygın olanıdır ve genellikle yüksek doğal hipovirülans prevalansı ile ilişkilidir. Bu alt tip İtalya, İsviçre, güneydoğu Fransa, Bosna-Hersek, Hırvatistan, Slovenya, Makedonya, Yunanistan ve Türkiye'de baskındır (Sotirovski *et al*. 2011, Krstin *et al*. 2008, Akıllı *et al*. 2013). Diğer CHV-1 alt tipleri (F1, F2, D, E) Fransa (Feau *et al*. 2014), İspanya (Zamora *et al*. 2012), Almanya (Peters *et al*. 2014) ve Türkiye'de (Akıllı *et al*. 2013) bulunmuştur. Virüs alt tiplerinden Fransız alttipi (F1 ve F2)'nin fungusun gelişimini önemli derecede azalttığı ispatlanmış olsa da, İtalyan alt tipi (subtype I)'nin kansere karşı daha etkili olduğu bildirilmiştir (Robin *et al*. 2010, Rigling and Prospero 2018).

Hipovirülenslik 1950'li yıllarda ilk kez İtalya'da iyileşen kanserlere rastlanması ile ortaya çıkmıştır (Heiniger and Rigling 1994). Türkiye'de görülmesi ise 1968'de hastalığın ilk kayıdından yaklaşık 30 yıl sonra hipovirüs varlığından bahsedilmektedir (Robin and Heiniger 2001). Hipovirülensliğin saptanamadığı ülkeler de bulunmaktadır. Örneğin, Bulgaristan (Risteski *et al*. 2013), İspanya (Zamora *et al*. 2012, Castano *et al*. 2015), Portekiz (Bragança *et al*. 2007), İsviçre' nin kuzeyi (Hoegger *et al*. 2000), Romanya (Adamcikova *et al*. 2015),) ve Türkiye'de ise Ege Bölgesi'dir (Erincik *et al*. 2011).

Hipovirüs, izolatlar arasında hifsel kaynaşma (anastomosis) yoluyla dsRNA' yı transfer ederek dağılırlar (Heiniger and Ringling 1994). Bu durumda fungusun vejetatif yani, hifsel uyumu önemlidir. Hifsel funguslarda fungal popülasyon yapısını ve çeşitliliğini tanımlamak için Vejetatif uyum veya somatik uyum gibi ifadeler kullanılmaktadır. (Glass and Kuldau 1992).

Hipovirülent *C. parastica* ile enfeksiyonlu kestane ağaçlarında yeni kallus dokusu

geliştiği için kanserlerin etkinliği azalmakta ve ağaçlar iyileşmektedirler. Bu tip kanserlerin görünümleri hafif şişkin ve çatlaklı, kahverengi kabuk oluşumları şeklindedir. Bu şekildeki kanserlere iyileşen kanserler denmektedir ve bu kanserlerin varlığı ağaca az ya da hiç zarar vermemektedir (Milgroom and Cortesi 2004). Kestane kanserine en etkili mücadele yöntemi olan biyolojik mücadele uygulamalarının başarısı, bir yerde hipovirüslerin varlığına, etkinliğine ve vejetatif uyum tiplerinin (Vegetative compatibility, vc) çeşitliliği hakkındaki bilgilere göre çok önemlidir (Anagnostakis *et al*. 1986, MacDonald and Fulbright 1991, Heiniger and Rigling 1994, Cortesi and Milgroom 1998, Robin *et al*. 2010, Çakar ve ark. 2021). Hipovirüsün dağılım yolu hifsel uyumla olduğundan populasyondaki yüksek vejetatif uyum tipi çeşitliliği biyolojik savaşın başarısını olumsuz etkilemektedir (Anagnostakis *et al*. 1986, Heiniger and Rigling 1994, Robin *et al*. 2000, Cortesi *et al*. 2001).

Avrupa'da birçok farklı ülkede hipovirülent uygulamalarının başarılı sonuçları görülmüştür. Uygulama yöntemi, seçilen kanserlerin etrafının mantar delici ile delinip disk ya da macun şekiline getirilen hipovirülent izolatların açılan çukurlara yerleştirilerek sonuçların değerlendirilmesi şeklindedir. Hipovirülent uygulamada, özellikle pürüzsüz kabuklu genç kestane ağaçları üzerinde daha kolay uygulanabilir ve sonuçları daha etkilidir. Hipovirülent uygulamasının kanserleri tedavi edici özelliği olsa da uygulama yapılamayan kanserlerde etmenin yayılımı daima görülmektedir (Milgroom and Cortesi 2004). Kestane populasyonlarında hipovirüsün yayılımını etkileyen vc tip dışında da bazı ana faktörler olduğu görülmüştür. Öncelikle fazla uygulama yapılması (Heiniger and Rigling 2009, Diamandis *et al*. 2014), ikinci önemli faktör ise biyolojik kontrol ajanı olarak seçilen hipovirüsün etkinliğidir (MacDonald and Fulbright 1991).

Cryphonectria parasitica (Murr.) Barr. adlı fungus kestane ağaçlarında önemli boyutta zarara neden olduğu için hastalıkla mücadele çalışmaları önem kazanmıştır. Türkiye'de, Karadeniz Bölgesi'nde hastalık etmeninin yaygınlığı birçok araştırıcı tarafından (Coşkun *et al*. 1999, Gürer *et al*. 2001) ortaya konulmuştur. Konu üzerine en güncel çalışmalardan biri olan "Karadeniz Bölgesinde Kestane Kanserinin Biyolojik Mücadelesi Üzerinde Araştırmalar" isimli Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma

projesinde detaylı olarak belirlenmiştir. Orman Genel Müdürlüğü ve FAO arasında 2008-2009 yılında yapılan "Support to Turkish Government in development and implementation of a Feasibility Study (FS) for management of chestnut blight in chestnuts and other hardwoods"adlı ön projede hastalığın durumu ve yapılması gerekenler hakkında tespitler rapor edilmiştir. Sonrasında 'TCP/TUR/615676 FAO-Management of Chestnut Blight And Increased Capacity For Improving Forest Health And Vitality' isimli bir proje yapılmıştır. Bu projenin sonucuna göre seçilen pilot sahalarda OGM tarafından biyolojik mücadele çalışması başlatılmıştır. Çeliker ve ark. (2017) Manisa-Turgutlu-Hacıisalar köyünde EU-1 uyum tipine giren kanserlere hipovirülent izolat disk yöntemi ile uygulamış olup kanserlerin iyileştiğini ve doğal yayılımının başladığını ifade etmiştir.

Biyolojik savaş için CHV-1'i başarılı ve uyumlu yapan konukçu ile yani *C.parasitica* ile olan uyumudur. Bu uyumda, hipovirüsün konukçunun virülansını, sporulasyonunu düşürürken, konukçu ile virüsün dağılımını da sağlanmaktadır. *C. parasitica* da düşük ve yüksek virülanslı olan CHV-1'in genomik kıyasları ve mutasyon analizleri viral genomdaki varyasyonları ilişkili spesifik bölgeleri açığa çıkarmıştır (Chen and Nuss 1999, Lin *et al*. 2007). Hipovirüs virülansındaki gözlenen varyasyonun viral RNA genomunun mutasyon oranı ile ilişkili olduğu muhtemeldir ve bu da hipovirüsün evrim potansiyelinin göstergesidir. Bryner and Rigling (2011) hipovirüsün seviyesinin sadece konukçu ve virüsle ilişkili olmadığını ayrıca sıcaklık gibi çevresel faktörlerinde hipovirüs üzerinde etkili olabileceğini bildirmiştir.

Hipovirülent izolatlar kültürel yönteme göre, laboratuvar ortamında incelendiğinde uygun besi ortamında virülent izolatlar turuncu renkli koloni gelişimi gösterirken dsRNA virüsü ile enfekteli olanlar da ise açık renkli (beyaz-kremsi) miselyal koloni gelişimi gözlenmiş ve hipovirüslülerin çok az konidi meydana getiren gelişme gösterdiği tespit edilmiştir (Van Alfen *et al*. 1978, Anagnostakis and Day 1979, Heiniger and Rigling 1994, Bissegger *et al*. 1997, Milgroom and Cortesi 2004). Fenotipik özelliklere göre izolatların virülenslerinin belirlenmesi her zaman pratik olmayabilir, normal görünüşlü turuncu renkli kültürlerin de hipovirülent olabileceği, bu nedenle hipovirülensliğe yol açan dsRNA'nın her zaman anormal görünüşlü kültür

oluşturmayacağı da belirtilmiştir (Fulbright 1984, Chung *et al*. 1994). Bu da turuncu renkte gelişen kültürlerde de hipovirülentlerin bulunabileceğini göstermektedir. Beyaz renkte gelişen kültürlerdeki renk değişiminin hipovirüslerin enfeksiyonu ile meydana geldiği birçok araştırıcı tarafından ileri sürülmüştür. Hipovirülensliğe neden olan bir virüs olduğuna göre, turuncu renkli gelişen izolatlarda da düşük oranlarda hipovirüs enfeksiyonu olabilir. Örneğin, Van Alfen *et al.* (1978)'de Bonifacio ve Turchetti'nin kültür rengi turuncu olan İtalyan-hipovirülent izolat bulduklarını bildirmiştir. Ayrıca araştırıcılar laboratuvar koşullarında geliştirilen ve beyaz renk oluşturan kültürlerin çoğunlukla hipovirülent izolatlar olduğu görüşündedirler. Fakat inkübasyon koşulları değişirse, mesela kuvvetli gün ışığı veya yakın ultraviyole ışık altında inkübasyona alınan kültürlerde hipovirülent izolatlar bu özelliklerini kaybederek, sonucunda turuncu renkli gelişme gösterecektir. Hipovirülensin, fungal etmenin Sikloheksimid içeren ortamlarda geliştirilmesi ile yok olduğu, yine bazı hipovirülent izolatların tek spor kültürlerinin dsRNA içermediği dolayısıyla turuncu renkte geliştiği ve patojen olduğu tespit edilmiştir (Fulbright 1984). Van Alfen *et al*. (1978) ise ultraviyole ışığa tutulan izolatların hipovirülent özelliğini kaybettiğini belirlemişlerdir (Akıllı 2008). Bu literatürleri Bryner ve Rigling (2011)'in de yapmış olduğu araştırmada çevresel faktörlerin hipovirülenslik üzerinde etkili olduğunu belirterek desteklemiştir. Bu amaçla hipovirüsün doğal şekilde yayılımını etkilediği düşünülen etkenlerden ışık faktörü değerlendirilecektir. Bu ilgili kamu ve özel kurumlarla, bilim insanları ve üreticiler için yeni bir bilgi olacaktır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Örneklerin Toplanması

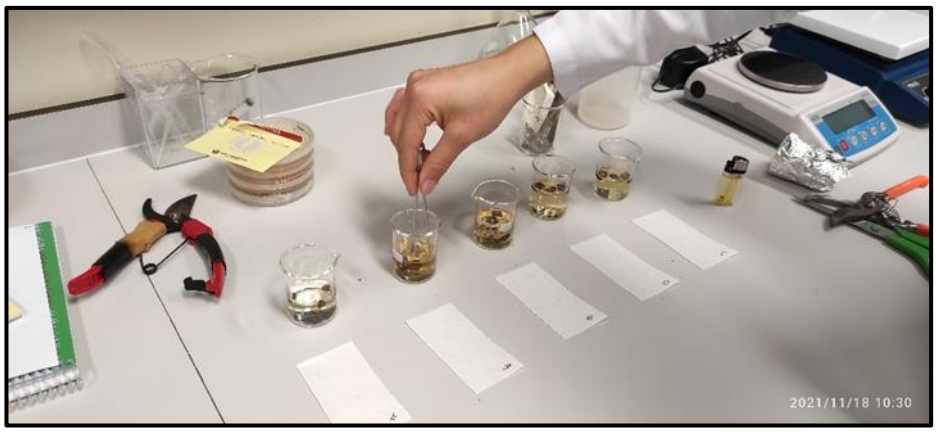
29 Ekim 2021 tarihinde Sinop Orman Bölge Müdürlüğü Sinop Orman İşletme Müdürlüğü Erfelek Orman İşletme Şefliği sınırları içerisinde, hipovirülent izolat elde etmek amacıyla saf kestane meşcerelerinde yer alan iyileşmiş kanserlerden 40 örnek alınmıştır. İyileşmiş kanserlerden örnek alımı steril 1 cm çaplı mantar deliciler (cork borer) kullanılarak ağaca en az zarar verecek şekilde, sağlam doku ile kanserin birleştiği yerden kambiyum dokusunuda içererek kanserin iki ucu ve ortası olmak üzere 3 yerinden kabuk örneği alınmıştır (Şekil 3.1). Alınan örneklere ait bilgiler kayıt altına alınarak havlu kâğıtlara sarılı olarak farklı poşetlere yerleştirilmiştir.



Şekil 3.1 Erfelek Orman İşletme Şefliği sınırlarındaki iyileşmiş kanserlerden örnek alınması

3.2 Hipovirülent İzolatların Geliştirilmesi

İyileşmiş kanserlerden alınan kabuk parçaları önce %1'lik sodyum hipoklorit içeren beherde 3 dk tutulup, steril kurutma kağıdında kurutulmuştur (Şekil 3.2). Bu parçalardan alınan 2-3 mm büyüklüğünde parçalar PDA (PDA 40g, saf su 1000 ml) besi ortamı içeren petrilere yerleştirilmiş ve 24-25 ºC sıcaklıkta, yedi gün karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen *C. parasitica* izolatları, PDAmb (PDA 40g, methionin 100mg, biotin 1mg, saf su 1000 ml) besi ortamında tek spor izolatları elde edilmiş yedi gün karanlık ardından beş gün ışığında bırakılmış olup daha sonra saf izolatlar eğik agarda + 4 ºC' de buzdolabında saklanmıştır.



Şekil 3.2 İyileşmiş kanserlerden alınan kabuk örneklerinin izolasyon için hazırlanması

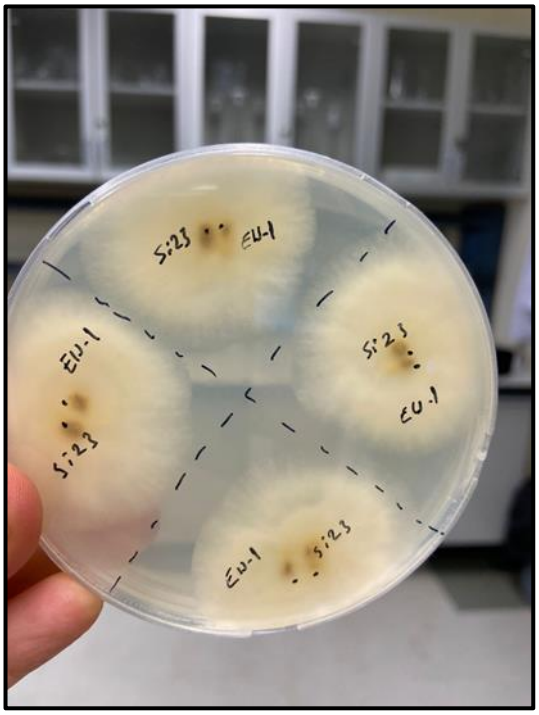
3.3 Tester İzolatların Temini

Türkiye'de varlığı bilinen Avrupa uyum tiplerinden EU-1, EU-12'nin tester izolatları Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK' in laboratuvarından temin edilmiştir.

3.4 Uyum Tiplerinin Tespiti

İzole edilen *C. parasitica* izolatlarının vejetatif uyum tipleri tespiti yapılmıştır. Bu amaçla izolatların PDAmb kültürlerinden steril iğne ile sporulasyon yapan kısımdan bir disk alınarak, yine PDAmb ortamında 2 mm aralıklarla öncelikle Karadeniz Bölgesi'nde

tespit edilen uyum tipleri ile eşleştirilerek (eğer uyumlu olmazsa diğer tester Avrupa uyum tipleri ile eşleştirilmek üzere) yapılmıştır. Kültürler yedi gün karanlık bir ortamda, yedi gün de gün ışığında tutulmuştur. Eşleştirilen diskler arasında kuvvetli baraj zonları ve sporulasyon zonları oluşturanlar ya da sporulasyon oluşturdan baraj zonları oluşturanlar uyumsuz, baraj zonları oluşturmayanlar ise uyumlu olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.3) (Anagnostakis *et al*. 1986, Bissegger *et al*. 1997). Vejatatif uyum grubu çalışmaları iki tekrarlı olarak yapılmıştır.



Şekil 3.3 Sİ-23 izolatının EU-1 uyum tipi ile aralarında oluşturdukları baraj zonlarından görünüm

3.5 Kullanılacak Hipovirülent İzolatların Seçimi

Çalışmada iki farklı Avrupa uyum tipine giren hipovirülent izolatlar kullanılmıştır. Sinop Orman Bölge Müdürlüğü kestane sahalarından elde edilen EU-1 vejetatif uyum tipinde Sİ-05, Sİ-21 ve Sİ-23 olmak üzere 3 izolat kullanılmıştır. EU-12 uyum tipinde ise Makedon orjinli M7060 (Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research WSL (İsviçre Ormancılık, Kar ve Peyzaj Araştıma Enstitüsü)) izolatı ile Bursa orjinli virüs aktarımı yapılan hipovirulent EU-12 izolatı (Deniz Çakar doktora

çalışmasından) kullanılmıştır. Seçilen hipovirülentlerden 2 tanesinin farklı araştırıcılar tarafından moleküler yöntemlerle hipovirüs içerdiği saptanmıştır.

3.6 Fenol oksidaz Enzim Aktivitesi (Bavendamm Testi)

Çalışmada kullanılacak 5 izolat (Sİ-05, Sİ-21, Sİ23, M7060 ve hipovirulent EU-12 (BU06 hipovirulent izolatından virus aktarımı yapıldı)) Bavendamm testine tabi tutulmuştur. Bu test Rigling *et al*. (1989)'in yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Bavendamm ortamı (5 g Tannic asit, 15 g Malt ekstract, 20 g agar, 1000 ml saf su) hazırlamak için önce malt extract agar hazırlanmış pH' sı NaOH ile 4,5' a ayarlanmış olup, ayrı bir kapta tannik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Tüm karışımlar ayrı ayrı otoklav edilerek, petri kaplarına dökülmüştür. PDAmb'de geliştirilen *C. parasitica* izolatlarından 5 mm çaplı diskler alınarak bu ortama yerleştirilmiştir. Tüm petriler 20 ºC karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Dört gün sonra izolatlarda koloninin oluşturduğu kuvvetli renk reaksiyonu gösterenlere virülent, zayıf bir renk reaksiyonu ya da renk reaksiyonu göstermeyenler hipovirülent strainler denilerek değerlendirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Bavendamm testinde virülent (koyu renkte) ve hipovirülent (açık renkte) izolatların gelişimi

3.7 Hipovirülent İzolatların Ultraviyole Işık Altında Tutulmaları

Saflaştırılan izolatlar yedi gün karanlıkta inkübasyona tabi tutulduktan sonra bu izolatlar 22-23ºC de üç farklı kombinasyonda yakın ultraviyole ışık (NUV), ultraviyole ışık (UV) ve beyaz gün ışığı florasan lambalar kullanılarak, ışıklara maruz bırakılmış olup, yapılan (Çizelge 3.1, Kod B) 1. kontrol yöntemi klasik yöntemle bu örnekler 7 günde karanlıkta devamında ise beş gün laboratuvarda yaygın ışıkta bekletilmiştir. 2. kontrol de ise örnekler 12 gün karanlıkta bekletilmiştir (Çizelge 3.1, Kod A).

Her bir izolat için çalışmalar beş tekerrürlü yapılmıştır. Beş farklı inkübasyon koşulu olduğundan 25 adet ekim yapılmıştır (5 tekerrür x 5 farklı inkübasyon koşulu). Petrilerin eşit miktarda ışık kombinasyonunu alabilmesi için uygun bir tasarım hazırlanmıştır (Şekil 3.5). Yakın ultraviyole ışık (NUV), ultraviyole ışık (UV) kombinasyonları için hazırlanan kabinde, ışıkların kültür yüzeyine uzaklığı 45 cm olarak ayarlanmıştır. Kültürler 7 gün karanlıkta inkübasyonu sonrası, NUV ve UV ışık denemelerinde kültürler 5 gün 24 saat boyunca ışığa maruz bırakılmıştır. Klasik yöntemde ise bu örnekler yaygın ışıkta 12 saat ışık +12 saat karanlık şeklinde 5 gün tutulmuştur.



Şekil 3.5 Hipovirülent izolatların yakın ultraviyole ışık (NUV) ve ultraviyole ışık (UV) altındaki görünümleri

Çizelge 3.1 Hipovirülent izolatlara uygulanan farklı ışık kombinasyonlarının kodları

Çalışmada Kullanılan Kodlama Harfi	Açıklama
A	7 gün karanlıkta + 5 gün karanlıkta inkübasyon
B	7 gün karanlıkta + 5 gün laboratuvarda yaygın ışıkta (330 lüks) inkübasyon
C	7 gün karanlıkta +5 gün ışıkta (2 NUV (yaklaşık 300nm)+ 1 Beyaz ışık altında inkübasyon)
D	7 gün karanlık +5 gün ışıkta (1 NUV (yaklaşık 300nm)+ 1 Beyaz ışık altında inkübasyon)
E	7 gün karanlık +5 gün ışıkta (tek ultraviyole (260 nm) ışık altında inkübasyon)

Kullanılan ışıklar hakkında bilgi aşağıda verilmiştir.

Yakın ultraviyole ışık (NUV) dalga boyu 400 nm (320-400 nm) (Sylvania F 40 W 368)=görülemeyen gün ışığı=UVA.

Ultraviyole ışık (UV) 260 nm (Osram 36W UVC (253,7 nm)=UVC.

Beyaz gün ışığı florasan lambaları 800 ışık tayfı üzeri (Philips TLD 36-40 W 865))= görülebilen gün ışığı.

3.8 Farklı Işık Altında İnkübasyona Bırakılan İzolatlar İçin Fenol oksidaz Enzim Aktivitesi (Bavendamm Testi)

Farklı ışıklar altında bekletilen toplamda 125 *C. parasitica* izolatı (5 farklı izolat* 5tekerrür* 5 farklı inkübasyon koşulu) inkübasyonun 5. gününde 3.5 Fenol oksidaz enzim aktivitesi (Bavendamm Testi) başlığında belirtildiği gibi teste tabi tutulmuştur. Bu teste Avrupa uyum grubu EU-12 pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 İyileşmiş Kanserlerden Elde Edilen Funguslar ve *Cryphonectria parasitica*'nın Uyum Tipleri

Kırk adet kabuk örneğinden 35 adet *C. parasitica*, 5 adet *Diplodina castanea*, *Pestalotiopsis* gibi funguslar tespit edilmiştir. Elde edilen 35 adet *C. parasitica* izolatının uyum tipi (vc) çalışmaları yapılmış olup, Türkiye'de en çok bulunan EU-1 ve EU-12 Avrupa uyum gruplarıyla eşleştirilmiş ve 33 adet EU-1 uyum tipi tespit edilmiş, 2 izolatın ise uyum tipi tespit edilememiştir. 40 adet kabuktan 35 adet *C. parasitica* izolatı elde edilmiştir. Bunların 25 tanesi kültürde beyaz renk gelişimi göstererek hipovirülent olarak ayrılmıştır.

4.2 Farklı Işık Altında İnkübasyona Bırakılan İzolatlar İçin Fenol oksidaz Enzim Aktivitesi (Bavendamm Testi) Değerlendirilmesi

Yirmibeş *C. parasitica* izolatı Fenol oksidaz enzim aktivitesi testine tabi tutulmuştur. Yedi gün karanlıkta inkübasyona tutulup +5 gün ışığında bekletilmiştir. Sonuçlara göre tüm izolatlar Bavendamm ortamında renk reaksiyonu göstermeyen koloniler oluşturmuştur. Işık denemesinde kullanılmak üzere iyi koloni gelişimi gösteren ve spor veren izolatlar arasından hipovirülent izolat seçilmiştir.

Hipovirülent izolatlardan hepsi EU-1 uyum tipinde olduğu için EU-12 uyum tipinden hipovirülent izolat araştırıcılarca çalışmalarında daha önce kullanılan yurt dışından temin edilen M7060 ve Bursa orjinli (BU-06) hipovirülent bir izolattan dönüştürülen EU-12 (BU-06) izolatları kullanılmıştır.

Beş hipovirülent izolatla 5 tekerrürlü olarak yapılan farklı ışık tiplerinde hipovirüslerin fungus içindeki gelişimini incelemek için deneme kurulmuştur. Işık altında kültürlerin tutulmasından sonra renk ayrımına bakılmaksızın her bir izolat tekererrüründen (Sİ-05, Sİ-21, Sİ-23, M7060 ve EU-12 (BU-06)) fungus diskleri alınarak 2 tekrarlı olacak

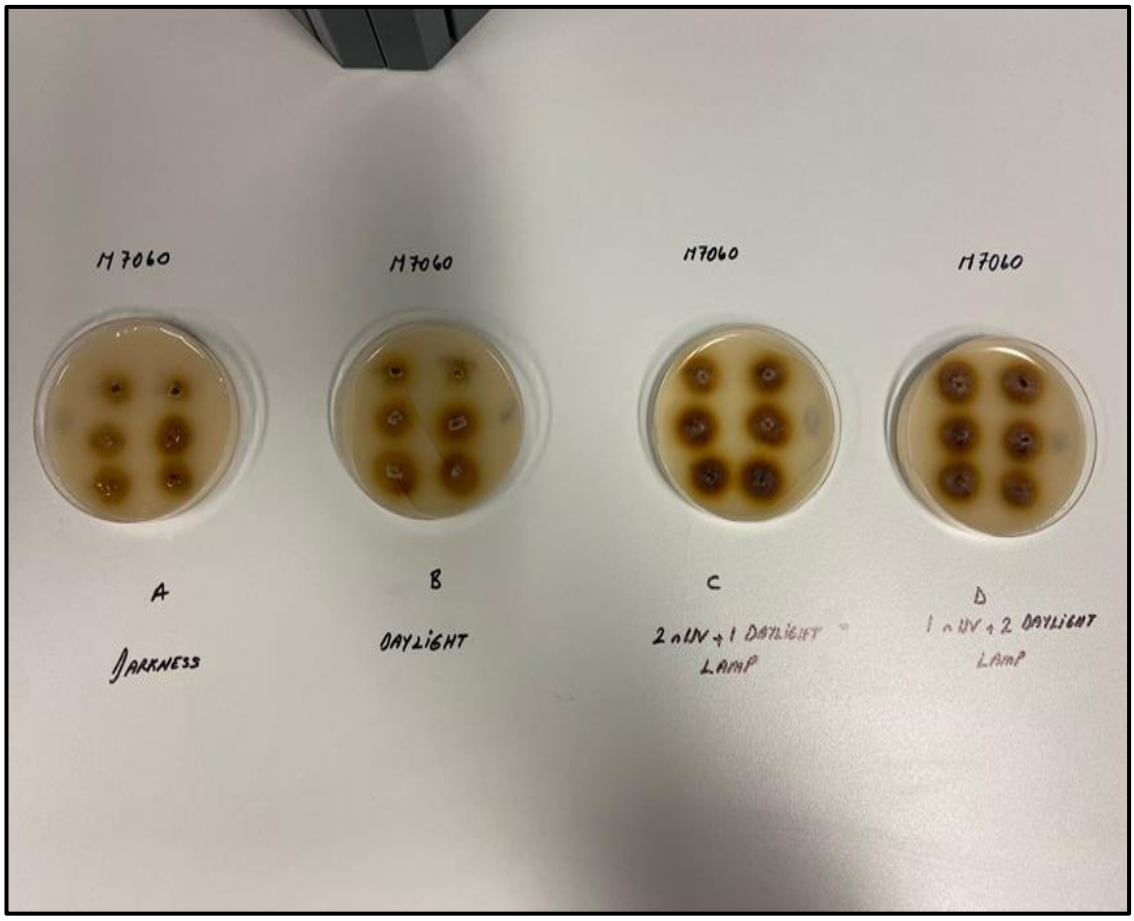
şekilde Bavendamm testine tabi tutulmuştur. Böylece her bir hipovirülent izolat farklı ışık kombinasyonlarında 10 kez hipovirülenslik değerlendirmesi için test edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonundaki kontrollerde 12 gün karanlıkta inkübasyon (Kod A) edilen kültürlerin sonuçları uyumluluk göstermiştir. A koşulunda izolatlar beyaz renkli gelişim göstermiş olup, Bavendamm test sonuçlarına göre de hipovirülent izolat olarak değerlendirilmiştir. 7 gün karanlık + 5 gün laboratuvar yaygın ışığında inkübasyon (Kod B) edilen kültürler kendi arasında kıyaslandığında, hipovirülent izolatlarda hipovirüsün gelişimi açısından farklı sonuçlar vermiştir. Yani hipovirülent izolat geliştirmek için istenen standart yöntem olarak bilinen (7 gün karanlık+ 5 gün yaygın ışıkta) bu inkübasyon koşulunda, bazı izolatların kültür rengi ile Bavendamm test sonuçları uyuşmuş, bazı izolatlarda ise uyumluluk göstermemiştir (Çizelge 4.1, Ek 1ve Ek 2).

Çizelge 4.1 KOD A (karanlık) ve KOD B (normal gelişim ışığı) inkübasyon koşulları altında hipovirüslü *C. parasitica* izolatlarının farklı kombinasyonlarının gelişimi

İzolat Adı	A inkübasyon koşulları altında				B inkübasyon koşullları altında			
	Kültür rengi		Kuvvetli	Reaksiyon yok	Kültür rengi		Kuvvetli	Reaksiyon yok
	B*	T**			B*	T**		
Sİ-05	10	-	-	10	10	-	-	10
Sİ-21	10	-	-	10	9	1	1	9
Sİ-23	10	-	-	10	7	3	3	7
EU-12 (BU06)	10	-	-	10	10	-	-	10
M7060	10	-	-	10	4	6	6	4
EU-12	-	10	10	-	10	-	10	-

B* Beyaz kültür
T**Turuncu kültür



Şekil 4.1 Farklı ışık koşullarında gelişen M7060 Makedon izolatının Bavendamm testinde virülent (koyu renkte) ve hipovirülent (açık renkte) izolatların gösterdiği renk reaksiyonu

C ve D inkübasyon koşullarına bakıldığında Bavendamm testi ve kültür rengi arasında bir farklılık görülmemiştir. Ancak ışıkların özelliklerinden dolayı hipovirüsün bazı izolatlarda gelişiminin virulent olarak değerlendirilmesine neden olmuştur. C inkubasyon koşulunda, hipovirülent izolatların fenotipik olarak değerlendirildiğinde, bazı izolatlar beyaz renkten turuncu renge dönüşüm gösterip, aynı zamanda Bavendamm test sonuçlarına göre de virülent olarak değerlendirilmiştir. Bazı izolatlar ise hem fenotipik hem de Bavendamm test sonuçlarına göre hipovirülent olarak değerlendirilmiştir. Beyaz renkli olan hipovirülent izolatların ışık altında 3. günden itibaren renklerinin turunculaştığı ve süre sonunda tamamen turuncu olan izolatların Bavendamm testinde de kuvvetli reaksiyon verdiği tespit edilmiştir. D inkubasyon koşulunda 1 NUV+ 1 beyaz ışık koşullarında ise kültürel gelişimlerinde değişimler görülmüştür. Örneğin Sİ-23 beyaz

renkli iken 10 ayrı petride gelişen izolatın 9 tanesi turuncuya dönüşmüş ve kültürlerin uç kısımlarından alınan parçalar Bavendamm testinde de kuvvetli reaksiyon vermiştir. Yani Sİ-23 de hipovirüsün varlığı ışıktan etkilenmiş görünmektedir (Çizelge 4.2, Ek 3 ve Ek 4).

Çizelge 4.2 KOD C ve KOD D inkübasyon koşulları altında hipovirüslü *C. parasitica* izolatlarının farklı kombinasyonlarının gelişimi

İzolat Adı	C inkübasyon koşullları altında 2NUV+1beyaz				D inkübasyon koşullları altında 1NUV+1 beyaz			
	Kültür rengi		Kuvvetli	Reaksiyon yok	Kültür rengi		Kuvvetli	Reaksiyon yok
	B*	T**			B*	T**		
Sİ-05	8	2	2	8	10	-	-	10
Sİ-21	-	10	10	-	6	4	4	6
Sİ-23	-	10	10	-	1	9	9	1
EU-12 (BU06)	10	-	-	10	10	-	-	10
M7060	-	10	10	-	-	10	10	-
EU-12	-	10	10	-	-	10	10	-

B* Beyaz kültür
T**Turuncu kültür

Kod E inkübasyon koşulunda ise tüm beyaz renkli gelişen ve hipovirülent olduğu bilenen izolatlar ışığa alındığında 2. günden itibaren turuncu renge dönmüştür. İzolatların uç kısımlarından alınan parçalar Bavendamm testine tabi tutulmuştur. Turuncu renkte gelişim gösteren bazı izolatlar ise Bavendamm testinde virülent kontrol izolatı ile kıyaslandığında daha zayıf bir reaksiyon vermiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.2 ve Ek 5)



Şekil 4.2 7 gün karanlık +5 gün tek ultraviyole (260 nm) ışık altında (KOD E) gelişen hipovirülent kültürler

Çizelge 4.3 KOD E (Tek ultraviyole) inkübasyon koşulları altında hipovirüslü *C. parasitica* izolatlarının farklı kombinasyonlarının gelişimi

İzolat Adı	E inkübasyon koşullları altında			
	İnkübasyon sonrası kültürdeki gelişim rengi		Kuvvetli	Reaksiyon yok
	B	T		
Sİ-05	-	10	8	2
Sİ-21	-	10	10	-
Sİ-23	-	10	10	-
EU-12 (BU06)	-	10	3	7
M7060	-	10	10	-
EU-12	-	10	10	-

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kestane ağacının ekolojik olarak kendisi için uygun iklim şartlarında yetiştirildiğinde bile *C.parasitica* adlı fungusun hastalık oluşturduğu bilinmektedir ve bu fungus hızla yayılarak kestanenin olduğu her yerde görülmüştür. Yapılan çalışmalar incelendiğinde fungusun hızlı yayılımına karşı hipovirüsünün aynı hızda yayılmadığı hatta bazı alanlarda hiç olmadığı görülmüştür. Bunun da en büyük nedeni, vejetatif uyum tipleri olarak düşünülmektedir. Ancak bazı yerlerde doğal olarak görülen hipovirülensliğin hiç olmaması dikkat çekici bir durum olmuştur. Birçok araştırıcı bu durumu çevre faktörleri özellikle de ışık faktörüne bağlamıştır. Bu nedenle farklı dalga boylarındaki ışığın, hipovirüsün gelişimine yani fungusun kültürel ve morfolojik etkilerine bakılmıştır.

Virüslerin gelişmeleri üzerine UV ve violet ışığın etkisi, özellikle sağlık alanında yapılan çalışmalardan bilinmektedir. Çalışma sonuçlarında NUV'ye tabi tutulan hipovirüslü izolatlarda virüs gelişiminin azaldığı ya da yok olmaya başladığı görülmüştür.

Bu çalışmada, mikroorganizma ekimi yapılmış katı besiyeri yüzeyine doğrudan UV ışık uygulaması yapılmıştır. Uygulanan ışık dozu hesaplanırken, havanın etkisi haricinde (hava %99.8 geçirgenliğe sahiptir) başka bir etki dikkate alınmamıştır. Gabriel *et al*. (2015) yaptıkları çalışmada ışık ile inaktif edilmek istenilen mikroorganizma arasındaki maddelerin yoğunluğunun UV'nin etkinliğini yüksek miktarda etkilediğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada herhangi absorbans madde olmadığı mikroorganizmaların UV yöntemiyle inaktivasyonu için gerekli doz miktarının gerçek değerini verdiği düşünülmektedir.

Farklı ışık boyları da virüs gelişimini olumsuz etkilerken, ultraviyole ışık altında tutulan hipovirülent izolatlarda virüsün gelişmediği görülmüştür. Ayrıca kültürel olarak değerlendirildiğinde hipovirülent olduğu düşünülen bir izolatın Bavendamm testinde koyu renk reaksiyon vermesi virüs içermediği anlamına gelmemektedir (Akıllı *et al*. 2013) Bu virüs miktarının az olabileceği şeklinde de değerlendirİlebilir. Hipovirüsün

dağılımını birçok faktör etkilemektedir. Bunlardan en önemlisi fungusun vejetatif uyum tipleri olmasına rağmen yapılan çalışmalar fungus içindeki virüsün çoğalmasına ekolojik koşulların da etki ettiğini bildirmektedir. Önceki çalışmalarda ışığın hipovirüsün gelişiminde etkili olduğu gözlemlenmiştir. Araştırıcıların önceden gerçekleştirilen hipovirülent uygulama çalışmalarında da Ege Bölgesi kestane sahalarında hipovirüsün yayılımının Karadeniz ya da Marmara Bölgesi kadar hızlı olmadığı görülmüştür (Akıllı *et al*. 2019). Bu sebeple, bu konuda çalışan birçok araştırıcının hipovirüsün gelişimi üzerine ultraviyole ışığın olumsuz etkisi olduğuna dair yaptığı yorum, bilimsel olarak ortaya konmuştur.

KAYNAKLAR

Adamcikova, K., Ondruskova, E., Kadasi-Horakova, M., Botu, M., Kobza, M. and Achim, G. 2015. Distribution and population structure of the chesnut blight fungus in Romania. Plant Protect Sci, 51:141-149.

Akıllı, S. 2008. Karadeniz bölgesinde kestane kanseri (*C. parasitica*)'nin biyolojik mücadelesi üzerine araştırmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Bölümü, Doktora Tezi, 5-52 s, Ankara.

Akıllı, S., Ulubaş Serçe, Ç., Katırcıoğlu, Y. Z., Maden, S. and Rigling, D. 2013. Characterization of hypovirulent isolates of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* from the Marmara and Black Sea regions of Turkey. European Journal of Plant Pathology, 135(2):323-334.

Akıllı Şimşek, S., Katırcıoğlu, Y. Z., Çakar, D., Rigling, D. and Maden, S. (2019). Impact of fungal diseases on common box (*Buxus sempervirens* L.) vegetation in Turkey. European Journal of Plant Pathology, 153(4):1203-1220.

Allemann, C., Hoegger, P., Heiniger, U. and Rigling, D. 1999. Genetic variation of *Cryphonectria parasitica* (CHV1) in Europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. Molecular Ecology, 8:843-854.

Anagnostakis, S. 1977. Vegetative incompatibility in *Endothia parasitica*. Experimental Mycology, 1:306-316.

Anagnostakis, S.L. and Day, P.R. 1979. Hypovirülence conversion in *Endothia parasitica*. Phytopathology, 69: 1226-1229.

Anagnostakis, S.L., Hau, B. and Kranz, J. 1986. Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in connecticut and Europe. Plant Disease, 70:536-538.

Anderson, P.J. and Anderson, H.W. 1912. The chestnut blight fungus and a related saprophyte. Phytopathology, 2:204-210.

Asan, Ü. ve Artar, P. 1987. İbradi kestaneleri. Orman Mühendisliği, 10:24-25.

Avanzato, D. 2009. Following chestnut footprints (*Castanea* spp.): cultivation and culture, folkrore and history, traditions and uses. International Society for Horticultural Science (ISHS), Scripta Horticulturae.

Barr, M.E. 1978. The Diaporthales in North America with emphasis on Gnomonia and its segregates. Mycotaxon, 7:1-232.

Barstow, M. and Khela, S. 2018. *Castanea sativa*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T202948A67740523.

Bissegger, M., Rigling, D. and Heiniger, U. 1997. Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European Chestnut forest in the presence of natural hypovirülence. Phytopathology, 87:50-59.

Bragança, H., Simoes, s., Onofre, N., Tenreiro, R. and Rigling, D. 2007. *Cryphonectria parasitica* in Portugal: diversity of vegetative compatibility types,mating types, and occurrence of hypovirulence. Forest Pathol, 37:391-402.

Bryner, S.F. and Rigling, D. 2011. Temperature-dependent genotype-by-genotype interaction between a pathogenic fungus and its hyperparasitic virus. The American Naturalist, 177:65-74.

Castano, C., Bassie, L., Oliach, D., Gomez, M., Medina, V. and Liu, B. 2015. *Cryphonectria hypovirus* I as inferred from gene genealogies and the coalescent. Genetics, 166:1611-1629.

Chen, B. S. and Nuss, D. L. 1999. Infectious cDNA clone of hypovirus CHV1-Euro7: A comparative virology approach to investigate virüs-mediated hypovirulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. Journal of Virology, 73:985-992.

Choi, G.H. and Nuss, D.L. 1992. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. Science, 257:800-803.

Chung, P., Bedker, P.J. and Hillman, B.I. 1994. Diversity of *Cryphonectria parasitica* hypovirulence- associated double-stranded RNAs within a chestnut populationin New Jersey. Phytopathology, 84:984-990.

Conedera, M., Manetti, M. C., Giudici, F.and Amorini, E. 2004. Distribution and economic potential of the Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Europe. Ecologia Mediterranea, 30(2):179-193.

Conedera, M., Tinner, W., Krebs, P., de Rigo, D. and Caudullo, G. 2016. Castanea sativa in Europe: distribution, habitat, usage and threats. J. San-Miguel-Ayanz, D. de Rigo, G. Caudullo, *et al*. (Eds.), European Atlas of Forest Tree Species, Publ. Off. EU, Luxembourg

Cortesi, P., McCulloch, C.E., Song, H.Y., Lin, H. Q. and Milgroom, M. G. 2001. Genetic control of horizontal virus transmission in the chesnut blight fungus: *Cryphonectria parasitica*. Genetics, 159:107-118.

Cortesi, P. and Milgroom, M. G. 1998. Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. Applied and Environmental Microbiology, 64(8):2988-2994.

Coskun, H. ve Kural, I. 1994. Kestane kanseri *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. hastalığının mücadelesi üzerinde araştırmalar. Tarım ve Köyisleri Bakanlıgı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlügü BKA/01/F-094 Nolu Proje.

Coşkun, H., Turchetti, T., Maresi, G. and Santagada, A. 1999. Preliminary investigations into *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr isolates from Turkey. Phytopathologia Mediterranea, 38:101-110.

Çakar, D., Akıllı, S., Can, T., Katırcıoğlu, Y. ve Maden, S. 2021. Bolu ve İzmir Orman Bölge Müdürlüğü kestane ormanlarında kestane kanseri etmeni *Cryphonectria parasitica*'nın uyum tiplerinin tespiti ve hipovirülenslik değerlendirilmesi. Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi, 7(1):41-55.

Çeliker, N. M., Kaplan, C., Onoğur, E., Çetiner, B., Poyraz, D. and Uysal, A. 2017. Natural dissemination of hypovirulent *Cryphonectria parasitica* strain used for biological control of chestnut blight . Turk J Agric For. 41:278-284

Delen, N. 1979. Studies on the control possibilities of chestnut blight [*Endothia parasitica* (Murr.) A. and A.] ın Turkey. J. Turkısh Phytopath. 8 (2-3):51-76.

Demir, S. T. ve Çeliker, N. M.1996. Ege bölgesinde meyve fidanlarında fungal hastalıkların ve çözüm yollarının belirlenmesi üzerine araştırmalar. Zirai Mücadele Araştırma Yıllığı, No:28.

Diamandis, S., Perlerou, C., Nakopoulou, Z., Christopoulos, E., Topalidou, E. and Tziros, G. 2014. Application of biological control of chestnut blight on a nationwide scale in Greece: results and prospects. Acta Hortic. 1043:23-34.

Dutech, C., Barres, B., Bridier, J., Robin, C., Milgroom, M. G. and Ravigne, V. 2012. The chesnut blight fungus world tour: successive introduction events from diverse origins in an invasive plant fungal pathogen. Mol Ecol, 21:3931-3946.

Ellison, A. M., Bank, M. S., Clinton, B. D., Colburn, E. A., Elliott, K., Ford, C. R., ... and Webster, J. R. 2005. Loss of foundation species: consequences for the

structure and dynamics of forested ecosystems. Frontiers in Ecology and the Environment, 3:479-86.

EPPO. 2005. European and mediterranean plant protection organization. *Cryphonectria parasitica*. Bulletin, 35:295-298.

Erincik, O., Ozdemir, Z., Durdu, O. F., Doken, M. T. and Acikgoz, S. 2011. Diversity and spatial distribution of vegetative compatibility types and mating types of *Cryphonectria parasitica* in the Aydın Mountains, Turkey. Eur J Plant Pathol, 129:555-566.

Erincik, Ö., Döken, T.M., Açıkgöz, S. and Ertan, E. 2003. Frist report for Aydın, Turkey: *Cryphonectria parasitica* (Murrill.) Barr. threatens the chestnut orchards.J. Turk. Phytopath, 32:41-44.

Feau, N., Dutech, C., Brusini, J., Rigling, D. and Robin, C. 2014. Multiple introductions and recombination in *Cryphonectria hypovirus* 1: Perspective for a sustainable biological control of chestnut blight. Evolutionary applications, 7(5):580-596.

Fulbright, D.W. 1984. Effect of eliminating ds-RNA in hypovirulent *Endothia parasitica*. Phytopathology, 74:722-724.

Gabriel, A. A., Aguila, M. L. C. and Tupe, K. A. M. 2015. Application of ultraviolet-C radiation to inactivate acid-and-desiccation stressed *Salmonella enterica* in young and mature coconut liquid endosperm mix beverage. Food Control, 51:425-432.

Genç, M. and Güner, Ş. T. 2000. A new monumental chestnut (*Castanea sativa* Mill.) stand found in Isparta. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 24(1):37-44.

Glass, N. L. and Kuldau, G. A. 1992. Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. Annual Review of Phytopathology, 30(1):201-224.

Gobbin, D., Hohl, L., Conza, L., Jermini, M., Gessler, C. and Conedera, M. 2007. Microsatellite-based characterization of the *Castanea sativa* cultivar heritage of southern Switzerland. Genome, 50(12):1089-1103.

Griffin, G.J., Robbins, N., Hogan, E.P. and Farias-Santopietro, G. 2004. Nucleotide sequence identification of *Cryphonectria Hypovirus* ınfecting *Cryphonectria parasitica* on grafted american chesnut trees 12-18 years after ınoculation with a hypovirulent strain mixture. Forest Path, 34:33-46.

Gürer, M., Turchettı, T., Bıagıonı, P. and Maresi,G. 2001. Assessment and characterisation of turkish hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. Phytopathology, 40:265-275.

Heinger, U. and Ringling, D. 1994. Biological control of chestnut blight in Europa. Annu. Rev. Phytopathology, 32:581-599.

Heiniger, U. and Rigling, D. 2009. Application of the *Cryphonectria Hypovirus* (CHV-1) to control the chestnut blight, experience from Switzerland. Acta Hortic, 815:233-245.

Hillman, B. I., Tian, Y., Bedker, P. J. and Brown, M. P. (1992). A North American hypovirulent isolate of the chestnut blight fungus with European isolate-related dsRNA. Journal of General Virology, 73(3):681-686.

Hillman, B.I. and Suzuki, N. 2004. Viruses of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. Adv. Virus Res. 63:423-472.

Hoegger, P. J., Rigling, D., Holdenrieder, O. and Heiniger, U. 2000. Genetic structure of newly established populations of *Cryphonectria parasitica*. Mycol Res, 104:1108-1116.

Jakobi, S.R. 2005. The effects of Hypovirülent *Cryphonectria parasitica* ınoculum, developmental stages of cankers a time of year of wounding on the survival of the American chestnut. UMI, United States.

Jaynes, R.A. and Elliston, J.E. 1980. Pathogenicity and canker control by mixtures of hypovirülent strains of *Endothia parasitica* in American chestnut. Phytopathology, 70:453-456.

Krstin, L., Novak-Agbaba, S., Rigling, D., Krajačić, M., and Curkovic Perica, M. 2008. Chesnut blight fungus in croatia: diversity of vegetative compatibility types, mating types and genetic variability of associated *Cryphonectria hypovirus* 1. Plant Pathol, 57:1086-1096.

Lin, H., Lan, X., Liao, H., Parsley, T. B., Nuss, D. L. and Chen, B. 2007. Genome sequence, full-length ifectious cDNA clone, and mapping of viral double-stranded RNA accumulation determinant of hypovirus CHV1-EP721. J Virol, 81:1813-1820.

Macdonald, W.L. and Fulbright, D. W. 1991. Biological control of chesnut blight- use and limitations of transmissible hypovirulence. Plant Dis, 75:656-661.

Milgroom, G.M. and Cortesi, P. 2004. Biologıcal control of chestnut blight with hypovirülence; a critical analysis. Aninu. Rev. Phytopathol, 42:311-338.

Nuss, D. L., 1992: Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. Microbiol. Rev., 56:561- 576.

Nuss, D.L. 2005. Hypovirulence: mycoviruses at the fungal–plant interface. Nat. Rev. Microbiol, 3:632- 642.

OGM. 2021. 2020 Türkiye orman varlığı. OGM Ofset, Ankara.

Peever, T. L., Lıu, Y., Cortesi, P. and Milgroom, M.G. 2000. Variation in tolerance and virülence in the chestnut blight fungus-hypovirüs ınteraction. Applied and Enviromental Microbiology, 4863-4869.

Perlerou, C. and Diamandis, S. 2006. Identification and geographic distribution of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* and occurrence of hypovirulence in Greece. Forest Pathology, 36:413-421.

Peters, F.S., Busskamp, J., Prospero, S., Rigling, D. and Metzler, B. 2014. Genetic diversification of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* and its associated hypovirus in Germany. Fungal Biol., 118:193-210.

Robin, C., Anziani, C. and Cortesi, P. 2000. Relationship between biological control, incidence of hypovirulence, and diversity of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in France. Phytopathology, 90(7):730-737.

Rigling, D., Heiniger, U. and Hohl, H.R. 1989. Reduction of laccase activity in dsRNA-containing hypovirulent strains of *Cryphonectria* (*Endothia*) *parasitica*. Phytopathology, 79:219-223.

Rigling, D., & Prospero, S. 2018. *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: Invasion history, population biology and disease control. Molecular Plant Pathology, 19:7-20.

Risteski, M., Milev, M., Rigling, D., Milgroom, M. G., Bryner, S. F. and Sotirovski, K. 2013. Distribution of chesnut blight and diversity of *Cryphonectria parasitica* in chesnut forests in Bulgaria. Forest Pathol, 43:437-443.

Robin, C. and Heiniger, U. 2001. Chesnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. Forest Snow and Landscape Research, 76:361-367.

Robin, C., Lanz, S., Soutrenon, A. and Rigling, D. 2010. Dominance of natural over

released biological control agents of the chesnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in south-eastern France is associated with fitness-related traits. Biol Control, 53:55-61.

Sotirovski, K., Rigling, D., Heinger, U. and Milgroom M. G. 2011. Variation in virulence of *Cryphonectria hyphovirus* 1 in Macedonia For Pathol, 41:59-65.

Trumbore, S., Brando, P., and Hartmann, H. 2015. Forest health and global change. Science, 349(6250), 814-818.

Van Alfen, N.K., Jaynes, R.A. and Bowman, J.T. 1978. Stability of *Endothia parasitica* hypovirülence in culture. Phytopathology 68, 1075-1079.

Vettraino, A. M., Morel, O., Perlerou, C., Robin, C., Diamandis, S. and Vannini, A. 2005. Occurrence and distribution of *Phytophthora* species in European chestnut stands, and their association with ink disease and crown decline. European Journal Plant Pathology, 111:169– 180.

Zamora, P., Martin, A. B., Rigling, D. and Diez, J. J. 2012. Diversity of *Cryphonectria parasitica* in western Spain and identification of hypovirus-infected isolates. Forest Pathol, 42:412-419.

EKLER

EK.1 A inkübasyon koşullları altında inkübasyona bırakılan hipovirülent izolatların Bavendamm test değerlendirilmesi

EK 2. B inkübasyon koşullları altında inkübasyona bırakılan hipovirülent izolatların Bavendamm test değerlendirilmesi

EK 3. C inkübasyon koşullları altında inkübasyona bırakılan hipovirülent izolatların Bavendamm test değerlendirilmesi

EK 4. D inkübasyon koşullları altında inkübasyona bırakılan hipovirülent izolatların Bavendamm test değerlendirilmesi

EK 5. E inkübasyon koşullları altında inkübasyona bırakılan hipovirülent izolatların Bavendamm test değerlendirilmesi

EK.1 A inkübasyon koşullları altında inkübasyona bırakılan hipovirülent izolatların Bavendamm test değerlendirilmesi

İzolat Adı	İnkübasyon Koşulları A*									
	Tekerrür 1**		Tekerrür 2		Tekerrür 3		Tekerrür 4		Tekerrür 5	
	Bavendamm Testi		Bavendamm Testi		Bavendamm Testi		Bavendamm Testi		Bavendamm Testi	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
Sİ-05	HV***	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV
Sİ-21	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV
Sİ-23	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV
EU-12 (BU06)	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV
M7060	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV

*7 gün karanlık + 5 gün Karanlıkta inkübasyon (Kod A) (Kontrol)

**Tekerrür 1: 1. Bavendamm petrisi

***HV: Bavendamm testinde zayıf reaksiyon veren

EK 2. B inkübasyon koşullları altında inkübasyona bırakılan hipovirülent izolatların Bavendamm test değerlendirilmesi

İzolat Adı	**İnkübasyon Koşulları B***									
	Tekerrür 1**		**Tekerrür 2**		**Tekerrür 3**		**Tekerrür 4**		**Tekerrür 5**	
	Bavendamm Testi		**Bavendamm Testi**		**Bavendamm Testi**		**Bavendamm Testi**		**Bavendamm Testi**	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
Sİ-05	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV
Sİ-21	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	V
Sİ-23	V	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	V	V
EU-12 (BU06)	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV
M7060	HV	HV	V	V	V	V	V	V	HV	HV

*7 gün karanlık + 5 gün laboratuvar gün ışığında inkübasyon (Kod B) (Kontrol)
7 gün karanlık + 5 gün Karanlıkta inkübasyon (Kod A) (Kontrol)
**Tekerrür 1: 1. Bavendamm petrisi
***HV: Bavendamm testinde zayıf reaksiyon veren
**** V: Bavendamm testinde kuvvetli reaksiyon veren

EK 3. C inkübasyon koşullları altında inkübasyona bırakılan hipovirülent izolatların Bavendamm test değerlendirilmesi

İzolat Adı	İnkübasyon Koşulları C*									
	Tekerrür 1**		Tekerrür 2		Tekerrür 3		Tekerrür 4		Tekerrür 5	
	Bavendamm Testi		Bavendamm Testi		Bavendamm Testi		Bavendamm Testi		Bavendamm Testi	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
Sİ-05	HV	HV	V	HV	HV	V	HV	HV	HV	HV
Sİ-21	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
Sİ-23	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
EU-12 (BU06)	HV	HV	HV	HV	V	HV	HV	HV	HV	HV
M7060	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V

*7 gün karanlık +5 gün 2 NUV (yaklaşık 300nm)+ 1 Beyaz ışık altında inkübasyon (Kod C)

**Tekerrür 1: 1. Bavendamm petrisi

***HV: Bavendamm testinde zayıf reaksiyon veren

**** V: Bavendamm testinde kuvvetli reaksiyon veren

EK 4. D inkübasyon koşullları altında inkübasyona bırakılan hipovirülent izolatların Bavendamm test değerlendirilmesi

İzolat Adı	İnkübasyon Koşulları D*									
	Tekerrür 1**		Tekerrür 2		Tekerrür 3		Tekerrür 4		Tekerrür 5	
	Bavendamm Testi		Bavendamm Testi		Bavendamm Testi		Bavendamm Testi		Bavendamm Testi	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
Sİ-05	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV
Sİ-21	HV	HV	V	V	V	V	HV	HV	HV	HV
Sİ-23	V	V	V	V	V	V	V	V	HV	V
EU-12 (BU06)	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV	HV
M7060	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V

*7 gün karanlık +5 gün 1 NUV (yaklaşık 300nm)+ 1 Beyaz ışık altında inkübasyon (Kod D)

**Tekerrür 1: 1. Bavendamm petrisi

***HV: Bavendamm testinde zayıf reaksiyon veren

**** V: Bavendamm testinde kuvvetli reaksiyon veren

EK 5. E inkübasyon koşullları altında inkübasyona bırakılan hipovirülent izolatların Bavendamm test değerlendirilmesi

İzolat Adı	İnkübasyon Koşulları E*									
	Tekerrür 1**		Tekerrür 2		Tekerrür 3		Tekerrür 4		Tekerrür 5	
	Bavendamm Testi		Bavendamm Testi		Bavendamm Testi		Bavendamm Testi		Bavendamm Testi	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
Sİ-05	V	V	HV	HV	V	V	V	V	V	V
Sİ-21	HV	V	HV	V	HV	HV	V	HV	V	HV
Sİ-23	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
EU-12 (BU06)	V	V	V	HV	V	HV	V	V	V	HV
M7060	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V

*7 gün karanlık +5 gün tek ultraviyole (260 nm) ışık altında inkübasyon (Kod E)
**Tekerrür 1: 1. Bavendam petrisi
***HV: Bavendamm testinde zayıf reaksiyon veren, virülent kontrol izolatına göre zayıf reaksiyon verdiği için HV olarak değerlendirilmiştir.
**** V: Bavendamm testinde kuvvetli reaksiyon veren

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Aslı ÖZCAN

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Ankara Üniversitesi Çankırı Orman Fakültesi Orman Mühendisliği Bölümü	2000-2005

İş Deneyimi

Yıl	**Kurum**	**Görev**
2010-Halen	Orman Genel Müdürlüğü	Mühendis