ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

TÜRKİYE'NİN FARKLI BÖLGELERİNDEN ELDE EDİLEN KESTANE KANSERİ ETMENİ *CRYPHONECTRIA PARASITICA* VE *CRYPHONECTRIA HYPOVIRUS* İZOLATLARININ KARAKTERİZASYONU

Deniz ÇAKAR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Deniz ÇAKAR tarafından hazırlanan "**Türkiye'nin Farklı Bölgelerinden Elde Edilen Kestane Kanseri Etmeni *Cryphonectria parasitica* ve *Cryphonectria hypovirus* İzolatlarının Karakterizasyonu**" adlı tez çalışması 02/11/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman **:** Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK

Jüri Üyeleri **:**

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

Üye **:** Doç. Dr. Göksel ÖZER
Bitki Koruma Anabilim Dalı
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi Hayrettin SAYGIN
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi Pınar ARSLAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Türkiye'nin Farklı Bölgelerinden Elde Edilen Kestane Kanseri Etmeni *Cryphonectria parasitica* ve *Cryphonectria hypovirus* İzolatlarının Karakterizasyonu**" 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 ile 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 Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (02/11/2022).

Deniz ÇAKAR

Bu çalışma Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FF210621D05 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

Doktora Tezi

TÜRKİYE'NİN FARKLI BÖLGELERİNDEN ELDE EDİLEN KESTANE KANSERİ ETMENİ *CRYPHONECTRIA PARASITICA* VE *CRYPHONECTRIA HYPOVIRUS* İZOLATLARININ KARAKTERİZASYONU

Deniz ÇAKAR

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK

Ülkemizde kestane üretiminin yaygın olduğu 13 farklı ilden kestane kanseri etmeni *Cryphonectria parasitica* ile enfekteli olması muhtemel 215 ağaçtan örnekler alınmış ve bu örneklerden 183 adet *C. parasitica* izolatı elde edilmiştir. Kültürel özelliklerine göre değerlendirildiğinde, bu izolatların 40'nın hipovirülent, 143'ünün ise virülent olduğu tespit edilmiştir. Klasik yöntemler kullanılarak yapılan vejetatif uyumluluk testleri sonucunda; 135 izolatın EU-1 (%82,32), 29 izolatın EU-12 (%17,68) Avrupa uyum tipi olduğu belirlenmiş fakat 19 izolatın uyum tipi belirlenememiştir. Moleküler markörler yöntemiyle yapılan çalışmalarda ise 149 izolatın EU-1 (%81,42), 34 izolatın ise EU-12 (%18,58) Avrupa uyum tipi olduğu bulunmuştur. Mating type (eşey tipi) testlerinde 134 izolatın (%73,2) MAT-1 ve 44 izolatın (%24) MAT-2 eşleşme tipi olduğu, 5 izolatta ise (%2,8) her iki eşleşme tipi ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Hipovirülent izolatların içerdiği hipovirüslerin sekans analizleri sonucunda 19 virüs izolatının hepsinin Avrupa *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV1) olduğu, virüslerin Italyan alt tipi (Subtype I) olduğu belirlenmiştir. Hipovirülent izolatların hepsi tek bir uyum tipi (EU-1) içerisinde yer almıştır. EU-1 uyum tipinde yer alan 10 hipovirülent izolattan sadece bir allel farklılığı bulunan 6 diğer Avrupa uyum tiplerine (EU-2, EU-3, EU-5, EU-7, EU-26 ve EU-44) hipovirüs aktarımı gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu çalışma ile EU-12 Avrupa uyum tipine ülkemizden elde edilen hipovirülent izolattan hipovirüs aktarımı ilk defa gerçekleştirilmiştir. Hipovirüs aktarımını, vejetatif uyumsuzluğu belirleyen *vic* lokuslarındaki farklılığın etkilediği tespit edilmiştir. Uyum tipleri arasındaki farklı allelin hangi *vic* lokusunda olduğu aktarım çalışmaları için önemli bulunmuştur. Ayrıca *C. parasitica* izolatlarında tür içi polimorfizmi belirlemek amacıyla iki farklı markör (iPBS ve SCoT) sistemiyle çalışılmış ve izolatların klonal bir yapıda olduğu, tür içinde polimorfizm bulunmadığı belirlenmiştir.

2022, 95 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Vejetatif uyumluluk, Mikovirüs, *C. parasitica*

ABSTRACT

Phd Thesis

CHARACTERISATION OF *CRYPHONECTRIA PARASITICA*, THE CAUSAL AGENT OF CHESTNUT BLIGHT, AND *CRYPHONECTRIA HYPOVIRUS* ISOLATES OBTAİNED FROM DIFFERENT REGIONS OF TURKEY

Deniz ÇAKAR

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

Advisor: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK

Hundred-eighty-three *Cryphonectria parasitica* isolates were obtained from 215 infected chestnut bark samples collected from 13 different locations having significant chestnut production. Based on the cultural characteristics, 143 of these isolates were classified as virulent and the rest 40 were hypovirulent. Majority of the *C. parasitica* isolates, 135 out of 183 (82.32%) morphologically determined as EU-1 of the European vegetative compatibility type, while 29 (17.68%) were EU-12. The remaining nineteen isolates did not match any of the two vc types (EU-1 and EU-12). Molecular vc distinction of the isolates gave almost similar results, 149 (81.42%) of them being EU-1 and 34 (18.58%) of them EU-12. Mating types of the *C. parasitica* isolates were also determined by using molecular methods and 73.2% (134 isolates) was belong to MAT-1 and 24% (44 isolates) was MAT-2 while 2.8% (5 isolates) showed both of the MAT types. Sequence analysis showed that all 19 viral isolates belonged to Italian subtype I of *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV1). All the hypovirulent isolates were EU-1 vc type.

The hypovirus, found in 10 Turkish EU-1 isolates was transmitted to the isolates of six vc types; EU-2, EU-3, EU-5, EU-7, EU-26 and EU-44, which were found in Turkey at low percentages and has one different allele in turn in the six known di-allelic *vic* loci. By this way, Turkish CHV1 subtype I was also transmitted to the European vc type EU-12 for the first time. Two different markers systems (iPBS ve SCoT) were used to evaluate the polymorphism among the *C. parasitica* isolates, all of them were found structurally clonal without any polymorphism.

2022, 95 pages

Keywords: Vegetative type, Mycovirus, *C. parasitica*

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

"Türkiye'nin Farklı Bölgelerinden Elde Edilen Kestane Kanseri Etmeni *Cryphonectria parasitica* ve *Cryphonectria hypovirus* İzolatlarının Karakterizasyonu" adlı tez çalışması Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne 2019-2022 yılları arasında hazırlanarak "Doktora Tezi" olarak sunulmuştur. Araştırmanın amacı, ülkemizin kestane yetiştiriciliği yapılan farklı bölgelerinden elde edilen kestane kanseri etmeni *Cryphonectria parasitica* fungusunun ve bu fungusu enfekte eden *Cryphonectria hypovirus'*ün karakterizasyonunu yapmak ve yeni çıkabilecek fungusun uyum tiplerine karşı hipovirüs aktarım çalışmaları yaparak biyolojik mücadele planlamalarına katkı sağlamaktır.

Çalışmanın her aşamasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, danışman hocam Prof. Dr. Seçil Akıllı ŞİMŞEK'e, çalışmanın yapılmasından gerçekleşmesine kadar yol gösteren, bilgi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren Bolu İzzet Baysal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Göksel ÖZER'e ve Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü öğretim üyesi değerli hocam Prof. Dr. Salih MADEN'e teşekkür ederim. Bu çalışmada kullanılan Avrupa uyum tipleri temininde yardımcı olan Dr. Daniel RIGLING'e (Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research) ayrıca çalışmayı destekleyen Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Çalışma esnasında materyal temininde ve arazi çalışmalarında yardımcı olan, Tarım ve Orman Bakanlığı / Orman Genel Müdürlüğüne, Orman Genel Müdürlüğü personeline, orman köylülerine ve Batı Karadeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne teşekkür ederim.

Deniz ÇAKAR
Çankırı, Kasım 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **viii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xi**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
3. MATERYAL VE METOT **17**
3.1 Deneme Alanlarının Seçimi ve Örnekleme **17**
3.2 *Cryphonectria parasitica* İzolatlarının Eldesi ve Saflaştırılması **17**
3.2.1 *Cryphonectria parasitica* izolasyonu **17**
3.2.2 Kültürel özelliklerine göre *Cryphonectria parasitica* izolatlarının hipovirülent ya da virülent olarak ayrılması **18**
3.2.3 Ribozomal DNA'nın ITS bölgesine dayalı tür teşhisi **19**
3.2.3.1 Miselyum çoğaltımı ve DNA izolasyonu **19**
3.3 Hipovirülent *Cryphonectria parasitica* İzolatlarının Ayrılması **21**
3.3.1 Phenol oxidase enzim aktivitesi (Bavendamm Testi) **21**
3.3.2 Hipovirülensliğin moleküler yollarla belirlenmesi **22**
3.3.2.1 Miselyum çoğaltımı ve total RNA izolasyonu **22**
3.3.2.2 cDNA sentezi ve PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) **23**
3.4 Hipovirüs'ün ve Alt Tiplerinin Tanımlanması **23**
3.4.1 Filogenetik analizler ve alt tip tanımlanması **23**
3.5 *Cryphonectria parasitica*'nın Vejetatif Uyum ve Eşleşme (Mating) Tiplerinin Belirlenmesi **25**
3.5.1 Morfolojik eşleştirmelerle uyum tiplerinin belirlenmesi **25**
3.5.2 Vejetatif uyum ve mating tiplerinin moleküler markörler ile belirlenmesi ... **26**
3.6 *Cryphonectria parasitica* İzolatındaki Hipovirüs'ün (CHV) Allel Farklılığı Olan İzolatlara Vejetatif Yolla Aktarılması **28**

3.6.1 Avrupa uyum tipi EU-1'deki hipovirüsün bir allel farklılık gösteren diğer Avrupa uyum tiplerine aktarımı 29

3.6.2 Avrupa uyum tipi EU-1 hipovirülent izolatından, EU-12 Avrupa uyum tipine hipovirüs aktarımı 30

3.6.3 Hipovirüs aktarımı yapılan izolatların phenol oxidase enzim aktivitesi (Bavendamm Testi) ile belirlenmesi 30

3.6.4 Virüs aktarımının moleküler yollarla belirlenmesi 30

3.7 *Cryphonectria parasitica* İzolatları İçerisindeki Tür İçi Genetik Varyasyonlarının Belirlenmesi 31

3.7.1 İzolatlar içerisindeki genetik varyasyonun iPBS veya SCoT moleküler markör teknikleri ile belirlenmesi 31

3.7.1.1 iPBS retrotransposon markörleri ile DNA amplifikasyonu 31

3.7.1.2 SCoT markörleri ile DNA amplifikasyonu 32

4. BULGULAR 34

4.1 Kestane Kanseri Örneklerinden Elde Edilen *Cryphonectria parasitica* İzolatları 34

4.1.1 Kültürel özelliklerine göre tanı 34

4.1.2 Ribozomal DNA'nın ITS bölgesine dayalı tanı 35

4.2 *Cryphonectria parasitica* İzolatlarında Hipovirülensliğin Dağılımı 35

4.2.1 Phenol oxidase enzim aktivitesi (Bavendamm Testi) ve moleküler test sonuçlarına göre dağılım 36

4.3 CHV1'in Alt Tipi Tespiti ve Dağılımı 38

4.4 *Cryphonectria parasitica* İzolatlarının Uyum ve Mating Tipleri 41

4.4.1 Klasik yöntemler kullanılarak belirlenen vc uyum tipleri 41

4.4.2 Moleküler yöntemler kullanılarak belirlenen vc uyum ve mating tipleri 41

4.5 *Cryphonectria parasitica'*nın Virülent İzolatlarına Hipovirüs Aktarım Sonuçları 44

4.5.1 Bavendamm testi sonuçları 45

4.5.2 Moleküler tespit sonuçları 48

4.5.3 EU-12 Avrupa tester izolatına Bursa orjinli izolattan hipovirüs aktarım sonuçları 51

4.6 İzolatlar İçerisindeki Tür İçi Genetik Varyasyonlar 54

4.6.1 *Cryphonectria parasitica* izolatlarında iPBS retrotransposon markör sonuçları 54

4.6.2 *Cryphonectria parasitica* izolatlarında SCoT markör sonuçları.....56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....57
KAYNAKLAR 64
EKLER.....78
ÖZGEÇMİŞ.....95

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat Derece
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
g	Relative Centrifugal Force (RCF) veya g-force
ha	Hektar
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
rpm	Revolutions per minute
s	Saniye
%	Yüzde
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar

KISALTMALAR DİZİNİ

BAP	Bilimsel Araştırma Projeleri
bp	Baz çifti
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CHV	*Cryphonectria hypovirus*
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
dsRNA	Çift sarmallı Ribonükleik Asit
EPPO	Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü
EU	Avrupa Birliği
MAT	Eşleşme tipi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	Patates Dekstroz Agar
PDAmb	Patates Dekstroz Agar methionin biotin
TAE	Tris-Asetat EDTA
UV	Ultraviyole
vb	ve bunun gibi
vc	vejetatif uyum
vd	ve diğerleri
vic	vejetatif uyumsuzluk

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 *Cryphonectria parasitica*'nın PDA ortamında virülent (a) ve hipovirülent (b) izolatının morfolojik görünümü.....18

Şekil 3.2 *Cryphonectria parasitica*'nın a) eşeysiz spor yığınları b) eşeysiz sporları (conidium) (scale bar 10µm) 19

Şekil 3.3 DS-11 FX+ serisi cihaz ile DNA'nın saflık ve konsantrasyon ölçümü.....20

Şekil 3.4 Phenol oxidase enzim aktivitesi testinde koyu renk koloni (EU-1 tester, virülent) ve açık renk koloni gelişimi (BL01, hipovirülent) (a) koyu renk koloni (EU-1 tester, virülent ve BL07 virülent) gelişimi (b).....22

Şekil 3.5 hvep1 ve hvep2 primeleri kullanılarak *Cryphonectria parasitica*'nın total RNA'sından çoğaltılan *Cryphonectria hypovirus*'un ORFA bölgesi (391 bp) ve 12F ve 12R primerleri kullanılarak çoğaltılan virüsün ORFB bölgesi (741 bp). M: 100 bp DNA Ladder (Solis BioDyne, Tartu, Estonya), Hipovirülent izolatlar; KS04, AM03, Sİ02, KS01, BL13, BL01, BL09, Sİ04……..25

Şekil 3.6 Hipovirülent izolatın (BU06) Avrupa tester izolatı EU-12 ile oluşturduğu baraj zonu (a), hipovirülent izolatın (BU06) EU-1 Avrupa tester izolatı ile baraj zonu oluşturmaması (b) 26

Şekil 3.7 *Cryphonectria parasitica*'nın vejetatif uyumsuzluğunu belirleyen 6 *vic* lokusunun, 3 panelde gerçekleştirilen PCR çalışmalarının jel elektroforez görüntüsü (M: Marker; 1. Panel: *vic 4* (257 bp)+ MAT (145 bp), 2. Panel *vic1* (461 bp)+ *vic2* (448 bp)+ *vic3* (368 bp), 3. Panel *vic6* (328 bp)+ *vic7* (225 bp); DE: Denizli izolatları, EU-42: Avrupa uyum tipi).....28

Şekil 4.1 Hipovirülent *Cryphonectria parasitica* izolatlarının toplandığı iller ve *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV1)'in İtalyan alt tip dağılımı.....39

Şekil 4.2 CHV1'in ORFA bölgesine dayandırılarak, IQ-TREE kullanılarak Maximum-Likelihood ve Ultra-Fast bootstrap metotu ile oluşturulan filogenetik ağaç (Mavi renkte belirtilen bu çalışmada elde edilen CHV1 izolatları için GenBank'tan sağlanan erişim numaraları. I: Italian subtype, F: French subtype, D: German subtype).....40

Şekil 4.3 *Cryphonectria parasitica* izolatlarının toplandığı iller ve illere göre vejetatif uyum ve mating eşleşme tip dağılımı.....42

Şekil 4.4 EU-1 (YL09) Hipovirülent izolatından (a), Avrupa uyum tiplerine (EU-3) virüs aktarımı (b) 44

Şekil 4.5 EU-7 Avrupa uyum tipine hipovirüs aktarımının sağlandığı ve Bavendamm testinde zayıf reaksiyon gösteren izolat.....47

Şekil 4.6 EU-1 uyum tipinde olan Sİ02 ve KS01 hipovirülent izolatların, *vic* lokuslarında 1 allel farklılığı bulunan (EU-2, EU-3, EU-5, EU-7, EU-26 ve EU-44) virülent Avrupa tester uyum tiplerine hipovirüs aktarımı sonucu jel elektroforezinde *Cryphonectria hypovirus*'ün ORFA ve ORFB bölgelerinin görünümü (pozitif kontrol: hipovirülent izolatlar Sİ02, M7080; negatif kontrol: virülent izolatlar DE02, MN01).....49

Şekil 4.7 EU-30(BU06) izolatının phenol oxidase testinde verdiği zayıf reaksiyon (a) EU-29(BU06) izolatının phenol oxidase testinde verdiği zayıf reaksiyon (b) EU-29(BU06) izolatından EU-12 tester izolatına virüs aktarımı (c,d).....53
Şekil 4.8 iPBS 2389, 2393, 2277, 2395, 2219, 2237, 2077, 2271, 2415, 2390, 2239 ve 2386 primerleri ile elde edilen bant profilleri (1: DE13 izolatı; 2: BU01 izolatı).....55
Şekil 4.9 iPBS 2077, 2219, 2395, 2393 primerleri ile *Cryphonectria parasitica* izolatlarında elde edilen bant profilleri (1-10: Farklı *Cryphonectria parasitica* izolatları).....55
Şekil 4.10 SCoT 32 primeri ile *Cryphonectria parasitica* izolatlarında elde edilen bant profilleri.....56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Sekans için kullanılan ORFA ve ORFB primerleri 24
Çizelge 3.2 Multiplex PCR için kullanılan primer listesi (Cornejo *et al*. 2019)..... 27
Çizelge 3.3 EU-1 Avrupa uyum tipinden bir allel farklı olan hipovirüs aktarımı yapılan tester izolatlar..... 29
Çizelge 3.4 EU-12 Avrupa uyum tipine aşamalı virüs aktarımı 30
Çizelge 3.5 *Cryphonectria parasitica* izolatları içerisindeki genetik varyasyonun iPBS moleküler markör teknikleri ile belirlenmesi için kullanılan primer listesi..... 32
Çizelge 3.6 *Cryphonectria parasitica* izolatları içerisindeki genetik varyasyonun SCoT moleküler markör teknikleri ile belirlenmesi için kullanılan primer listesi..... 33
Çizelge 4.1 Örnek alınan iller ve çalışmada elde edilen izolatların dağılımı 34
Çizelge 4.2 *Cryphonectria parasitica* izolatlarının ribozomal DNA'nın ITS bölgesine dayandırılarak tür teşhisi yapılan örnekler..... 35
Çizelge 4.3 Sekiz bölgeden elde edilen hipovirülent izolatların karakterizasyonu 36
Çizelge 4.4 *Cryphonectria parasitica*'nın bölgelere göre uyum ve mating (eşleşme) tip dağılımı 43
Çizelge 4.5 Hipovirüs aktarımı yapılan hipovirülent izolatların, altı farklı Avrupa uyum tipine virüs geçişleri..... 46
Çizelge 4.6 EU-2 ve EU-7 tester izolatlarına hipovirüs aktarımı 48
Çizelge 4.7 Hipovirüs aktarımı yapılan izolatların Bavendamm test ve moleküler tespit sonuçları..... 51
Çizelge 4.8 Avrupa uyum tipi EU-12'ye, hipovirülent BU06 izolatından CHV1'in aktarım sırası ve sonuçları 52

1. GİRİŞ

Avrupa kestanesi (*Castanea sativa* Mill), diğer bir adıyla Anadolu kestanesi; kerestesi, taneni, balı, birçok mutfak ürünü ve sürdürülebilir ormanlar da dahil birçok kullanım alanına sahip önemli bir orman ağacıdır. Ayrıca meyve ağacı olarak da bahçeleri tesis edilmektedir. Orman Genel Müdürlüğü 2021 yılına ait verilere göre ormanlık alanların asli ağaç türlerine dağılımında, kestane ağacı 81,232 ha alan kaplayarak, asli ağaç türleri içinde %0,35'lik bir alana sahiptir (Anonim 2021).

Dünyada, kestane ağaçlarında ciddi kurumalara neden olan önemli hastalıklar ortaya çıkmıştır. Bu hastalıklar arasında en yaygın olanı *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr (syn: *Endothia parasitica* (Murr.), (anamorf: *Endothiella* sp.)'nın neden olduğu kestane kanseri olarak adlandırılan hastalıktır. Bu hastalık etmeni Doğu Asya (Çin, Japonya ve Kore) kökenli bir fungus olup (Myburg *et al*. 2004, Lee *et al*. 2005), 20. yüzyılda Asya'dan enfekteli bitki materyallerinin taşınması yoluyla Kuzey Amerika ve oradan Avrupa'ya giriş yapmıştır (Griffin 1986, Roane *et al*. 1986, Heiniger and Ringling 1994).

Hastalık etmeni fungus, Amerika'da ilk olarak 1904 yılında (Merkel 1905), Avrupa'da 1938 yılında (Biraghi 1946) ülkemizde ise 1967 yılında (Akdoğan ve Erkam 1968, Delen 1975) kaydedilmiş, günümüzde ise kestane yetişen tüm alanlarımızda rapor edilmiştir (Çeliker and Onoğur 2001, Erincik *et al*. 2008, Akıllı *et al*. 2009, Anonymous 2014).

Bu etmen, kestane sahalarında önemli derecede zarara neden olsa da yapılan çalışmalarda bazı yerlerde hastalık etmeninin virülensliğinin azaldığı ve ağaçlarda iyileşen kanserlerin olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum hastalık etmeninin doğada var olan hipovirülent strainine dayandırılmaktadır (Choi and Nuss 1992, Heiniger and Rigling 1994, Milgroom and Cortesi 2004). Hipovirülenslik, Hipoviridae familyasında bulunan mikovirüslerin *C. parasitica* adlı bu fungusta neden olduğu viral bir enfeksiyonu tanımlamaktadır (Choi and Nuss 1992). Hipovirülenslik ilk kez 1950'li yıllarda İtalya'da yoğun bir şekilde *C. parasitica* ile enfekteli kestane sahalarında

gözlemlenmiştir (Heiniger and Rigling 1994). Ülkemizde ise *C. parasitica*'da hipovirülenslik ilk kez 1998 yılında, İzmit'te tespit edilmiştir (Çeliker and Onoğur 1998). İlerleyen yıllarda doğal iyileşmelerin olduğu kanserler Marmara ve Karadeniz bölgeleri boyunca görülmüş (Çeliker and Onoğur 2001, Gürer *et al.* 2001a, b, Akıllı *et al*. 2009, Akıllı Şimşek *et al*. 2019) fakat Ege Bölgesinde doğal iyileşen kanserler gözlemlenmemiştir.

Bu etmen ile en etkili mücadele yöntemi olarak karşımıza biyolojik mücadele çalışmaları çıkmaktadır. Biyolojik mücadelede amaç hipovirüs içeren *C. parastica* izolatının kullanımı ile hipovirüsün doğada yayılmasını sağlamak ve iyileşen tip kanserler elde etmektir. Hipovirüsün dağılımı ise hipovirüs enfekteli fungal etmenden enfekteli olmayan fungal etmene hifsel birleşme (anastomosis) ile virüsün transferi yoluyla gerçekleşmektedir (MacDonald and Fulbright 1991, Bisiach *et al*. 1995, Rigling *et al*. 2021).

Bu hipovirüsün aktarım şekli, bir bölgede biyolojik mücadele çalışmasının başlatılabilmesi için o bölgede hastalık etmeni fungusun hifsel uyumluluk (vegetatif compatibility=vc) tipinin, eşeyli üreme tipinin (MAT=mating type), biyolojik mücadele de kullanılacak virüsün tipi ve virüs alt tiplerinin bilinmesi gerekmektedir.

Biyolojik çalışma için önem arz eden bu konularla ilgili olarak bu tezin amaçları; (i) ülkemizin kestane yetiştiriciliği yapılan Aydın, Bursa, Düzce, Denizli, Çanakkale, İzmir, Kastamonu, Kütahya, Manisa, Samsun, Sinop, Yalova ve Zonguldak illerinden elde edilen *C. parasitica* izolatlarının vc ve mating tiplerinin güncel dağılımlarının belirlenmesi, (ii) hipovirüsün ORFA bölgesi analizlerine dayandırılarak alt tiplerinin belirlenmesi, (iii) ülkemizde EU-1 uyum tipinde mevcut olan *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV 1)'in EU-1 uyum tipinden bir *vic* lokusu farklılığı bulunan Avrupa uyum tiplerine (EU-2, EU-3, EU-5, EU-7, EU-26, EU-44) ve ülkemizde hipovirüs içeren izolatı tespit edilemeyen Avrupa uyum tipi EU-12'ye aktarım yapmak ve böylece hastalık etmenine karşı en etkili mücadele stratejisi olan biyolojik mücadele planlamalarına yardımcı olmak, (iv) izolatlar içerisindeki tür içi genetik varyasyonların farklı DNA markörleri ile ortaya konularak popülasyon analizlerinin yapılmasıdır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Avrupa kestanesi, 2 milyon hektardan fazla alanı kaplayarak 25 Avrupa ülkesinde yaygın olarak bulunan ve ekonomik olarak önemli bir ağaç türüdür (Conedera *et al*. 2004). *Castanea sativa* ülkemizde de farklı birçok alanda kullanımı ile önemli bir orman ağacı olmuştur. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization of the United Nations=FAO)'nün 2020 yılı istatiksel verilerine göre; Türkiye 76,045 bin ton üretim ile Çin, İspanya ve Bolivya'dan sonra Dünya'da 4. sırada yer almaktadır (http://www.fao.org/faostat/, 2022**).** Türkiye'de Avrupa kestanesi saf ve karışık orman olarak bulunmaktadır (Anonim 2014).

Kestane ağaçlarının önemli bir hastalığı olan *C. parasitica*, birçok bitki patojeninde olduğu gibi, doğal dağılım alanının dışında doğal olmayan bir konukçuda ilk kez tanımlanmıştır (Rigling and Prospero 2018). Hastalık etmenin sporlarının ilk kez görüldüğü New York şehrinden 1904 yılından itibaren, yılda 30 km ilerleyerek Kuzey Doğu Amerika'ya ulaştığı ve 50 yıl içerisinde ülkede kestane ağaçlarında ekonomik ve ekolojik önemli kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Roane *et al*. 1986, Anagnostakis 1987, Elliott and Swank 2008, Evans and Finkral 2010). Hastalığa neden olan *C. parasitic*a'nın orjinini belirlemek için yapılan genetik çalışmalar sonucunda bu etmenin Amerika'ya, Japonya, Çin ve Kore'den giriş yaptığı tespit edilmiştir (Dutech *et al*. 2012).

Cryphonectria parasitica'nın Amerika'da tespitinden yaklaşık 34 sene sonra Avrupa'da, ilk kez 1938 yılında İtalya'da Cenova yakınlarında görülmüştür. Yapılan genetik analizler etmeninin İtalya'ya ilk girişinin Kuzey Amerika'dan olduğunu fikrini desteklemektedir (Duetch *et al*. 2012). Hastalık İtalya'dan hızlı bir şekilde Fransa, İsviçre ve Slovenya'ya yayılmıştır (Heiniger and Rigling 1994, Krstin *et al*. 2011, Prospero and Rigling 2012). İlerleyen dönemlerde hastalık, Doğu ve Güneydoğu Avrupa ile Türkiye'de kestane yetişen bölgelere de yayılmıştır (Robin and Heiniger 2001).

Türkiye'deki kayıtlara göre, kestane kanseri etmeni C. *parasitica* ilk olarak 1967 yılında Marmara Bölgesinde tespit edilmiştir. O zamandan bugüne kadar hastalığın tüm kestane alanlarında görüldüğü ve önemli derecede kurumalara neden olduğu bildirilmiştir (Coşkun *et al*. 1999, Gürer *et al*. 2001, Akıllı *et al*. 2009). Hastalık etmenine karşı etkin ve hızlı bir mücadele olmaması nedeniyle etmen kestane ağaçları arasında hızla yayılmış, ağacın odunu ve meyvesini etkilemiş, verimini ve kalitesini düşürmüştür. Kestane ağacındaki bu çok yönlü verim kaybı orman köylüsünü de ekonomik olarak etkilemiştir. Bu hastalığın, karantina hastalıklarından biri olması ve bu nedenle alınan önlemler bile bu etmenin Dünyada yayılmasına engel olamamıştır (EPPO 2005).

Cryphonectria parasitica, Sordariomycete (Ascomycete) sınıfında, Cryphonectriaceae (Order Diaporthales) familyasında bir fungustur. Ayrıca kestane, bu etmenle yakın ilişkili olan *Cryphonectria radicalis, Cryphonectria naterciae* ve *Cryphonectria japonica* türlerinin de konukçusu olarak bildirilmektedir (Rigling and Prospero 2018). Hastalık etmeni *C. parasitica*'nın ana konukçuları Amerikan kestanesi (*C. dentata* (Marsh.) Borkh.), Avrupa kestanesi (*C. sativa*), Çin kestanesi (*C. mollissima* Blume) ve Japon kestanesi (*C. crenata* Siebold & Zucc)'dir (Rigling and Prospero 2018). Hastalık etmeni bir yara parazitidir ve yalnızca ağacın toprak üstü kısımlarını yani gövde, dal ve ince dallarını enfekte etmektedir (Heinger and Rigling 1994).

Etmenin hem eşeyli hem de eşeysiz sporları enfeksiyona neden olabilir. Fungusun dokuya girişi ile spor çimlenmesinden sonra ilk lezyonlar görülmeye başlar ve sonrasında kabuk kanseri gelişir. Daha sonra etmen enfekteli kabukta ve ölü kestane odununda spor yığınları oluşturabilir (Prospero *et al.* 2006).

Cryphonectria parasitica'nın eşeyli dönem üreme yapıları olan peritesleri 10-20'li gruplar şeklinde bulunmaktadır. Askosporları şeffaf (hiyalin), iki hücreli, bölmede daralmış olup 10 x 4 µm boyutlarındadır. Eşeysiz üremede konidiler ise sarımtırak iplikçikler şeklinde çıkarlar, hiyalin, düz veya hafif kıvrılmış olup, 2-3 x 1 µm'dir. Stroma içerisinde hem eşeyli hem de eşeysiz sporlar oluşmaktadır. Peritesler, stroma içinde çok belirgin bir şekilde oluşmakta iken eşeysiz sporlar stroma içinde kadehe benzeyen geniş ağızlı bir yapı içinde oluşmaktadır (EPPO 2005).

Cryphonectria parasitica'da mating (eşleşme), tek bir mating tip (*MAT*) lokusu tarafından kontrol edilir. Bu lokus ya *MAT-1* ya da *MAT-2* alleli içerir (Marra and Milgroom 2001). Bu yüzden fungus kendi içinde eşeyli üreyememektedir. Bir bölgede eşeyli üremenin olabilmesi için eşey yönünden iki mating tipin o bölgede bulunması gerekmektedir (Milgroom *et al*. 2008). Hastalık etmeninin doğal popülasyonlarındaki araştırmalar, değişik frekanslarda meydana gelen kendi dölleme (self-fertilization) ve karşı dölleme (outcrossing) ile karışık bir mating sisteme sahip olduğunu göstermiştir (Marra *et al*. 2004). Kendi döllenen izolatlar, mating tip için heterokaryotiktir (McGuire *et al*. 2004). Böyle heterokaryonlar çift ebeveynli eşleşme ya da mitotik crossing over içeren paraseksüel rekombinasyon yoluyla oluşmaktadır (Milgroom *et al*. 2009).

Vejetatif uyumsuzluk funguslarda yaygın olarak görülen bir durumdur. Bu şekilde funguslar sitoplazmik olarak geçen hastalıklara karşı bireyler arasında sitoplazmik değişim ve hifsel birleşmeyi önleyerek bir nevi savunma mekanizması fonksiyonu göstermektedir (Caten 1972). Vejetatif uyumsuzluk *C. parasitica*'da ilgi çekici olmuştur çünkü bu durum fungal bireyler arasında virülensi düşüren mikovirüslerin yatay geçişini kısıtlamaktadır (Anagnostakis 1977).

Hücresel tanıma (hücrenin diğer bir hücreyi ayırt etmesi=cellular recognition) fungusların eşeyli ve vejetatif yaşam döngüsünde önemli bir rol oynamaktadır (Ni *et al.* 2011). Vejetatif (somatik) hifler arasında tanıma süreçleri genellikle birkaç *vic* lokusu içeren bir vejetatif uyumsuzluk sistemi (vegetative incompatibility=*vic*) tarafından yönetilir (Paoletti 2016). Uyumsuz hiflerin birleşmesi ile uyumsuz *vic* gen proteinleri arasındaki reaksiyon programlanmış bir hücre ölümüne neden olmaktadır, böylece sitoplazmik değişim ve heterokaryon şekli önlenmektedir (Cornejo *et al*. 2019).

Hipovirülent strainler, hifsel kaynaşma (anastomosis) yoluyla çift iplikçikli RNA virüsünü (double-stranded RNA viruses=dsRNA) virülent strainlere aktararak, onları hipovirülent hale çevirebilir **(**Heiniger and Ringling 1994**)**. Böylelikle virüs hastalık etmeni fungusu enfekte ederek fungusun virülensliğinin düşmesine sebep olmaktadırlar (Heiniger and Rigling 1994, Perlerou and Diamandis 2006). Etmenin sitoplazmasında bulunan bu virüsler, virüsün olmadığı diğer funguslara, sadece uyumlu fungus hiflerinin

birleşmesi (anastomosis) yoluyla geçmektedirler (Anagnostakis 1977, Jaynes and Elliston 1980, Griffin *et al*. 2004, Milgroom and Cortesi 2004, Perlerou and Diamandis 2006). Aktarım sırasında fungusun vejetatif (hifsel) uyumu önemlidir. Şimdiye kadar iki allelli, altı adet *vic* lokusu ve 2^6= 64 *vic* genotipleri veya vejetatif uyumluluk (vegetative compatibility=vc) tipleri tanımlanmıştır. Aynı vc tipe ait olan *C. parasitica* izolatları, tüm *vic* lokuslarında aynı allellere sahiptir ve vejetatif uyumluluk göstermektedir (Biella *et al*. 2002).

Yapılan çalışmalarda, bilinen tüm *vic* lokusuna sahip fakat daha önce bilinen uyum tipleri ile uyum göstermeyen yeni farklı uyum tipleri tespit edilmiştir (Short *et al*. 2015). Elde edilen bulgular doğrultusunda, *C. parasitica*'da vejetatif uyumsuzluğu kontrol eden *vic* lokusunun altıdan fazla olduğu ya da bilinen *vic* lokusuna ek alellerin var olduğunu göstermektedir (Rigling and Prospero 2017). *Cryphonectria parasitica*'nın belirlenen 64 uyum tipi bulunmaktadır ve Cornejo *et al.* (2019) yaptıkları çalışmada 10 yeni uyum tipi varlığını daha tespit etmiştir.

Genetik olarak tanımlanan 6 *vic* lokusu moleküler düzeyde karakterize edilmiştir (Choi *et al*. 2012, Zhang *et al*. 2014). Bu çalışmalar kompleks allelik ve allelik olmayan interaksiyonları açığa çıkarmıştır. Ayrıca 6 *vic* lokusunun moleküler karakterizasyonuna dayanan, bilinen 64 *vic* genotiplerini tanımlamak için polimeraz zincir reaksiyonuna (polymerase chain reaction=PCR) dayalı bir method geliştirilmiş (Short *et al*. 2015). Short *et al*. (2015) ve Mlinarec *et al*. (2017) üç farklı cycle (döngü) da 6 duplex reaksiyonu içeren PCR çalışmalarını geliştirmişlerdir. Cornejo *et al*. (2019) tarafından *C. parasitica*'nın klasik vc tip belirleme yani bilinen bir tester izolat ile bilinmeyen bir izolatın eşleştirilerek yapılan çalışmaların her zaman güvenilir sonuç vermemesi ve oldukça zaman alması nedenleriyle, *vic* ve *MAT* genlerini belirlemek için, floresan işaretli markör kullanılarak multiplex PCR çalışması geliştirmişlerdir.

Funguslarda vejetatif uyumsuzluğun, bireyler arasında virüs geçişini engellediği bilinmektedir. Cortesi *et al*. (2001) *C. parasitica* izolatları arasında virüs geçişinin, başlıca vejetatif uyumsuzluk genleri tarafından kontrol edildiğini kesin olarak göstermiştir. Fungal izolatların *vic* genotipleri çoğaltılarak, virüs geçişinde altı *vic*

lokusunun her birinde heterotallizm etkisi nicelikleştirilmiştir. Alıcı ve verici izolatlar aynı *vic* genotiplerine sahip olduğunda, virüs transferinin %100 frekansla, fakat heteroallelizm bir veya daha fazla *vic* lokusunda olduğunda virüs geçişinin düştüğünü belirtmişlerdir. Tek heteroallelik lokuslar arasında virüs geçişi değişkendir. Heteroallizm, *vic4* lokusunda olduğunda virüs geçişine etkisi yoktur. *vic2* lokusunda, heteroallelik eşleştirmelerde virüs geçişi yalnızca %21 olmuştur. *vic3* (%76) ve *vic6* (%36) lokusunda heteroallelik olduğunda, virüs geçişi orta frekansta elde edilmiştir. *vic1, vic2* ve *vic7* lokusu heteroallelik olduğunda, virüs transferinin frekansı alıcı ve vericide bulunan allelere bağlıdır. *vic* genotipleri arasında virüs transferini öngörmek için bir lojistik regrasyon modeli geliştirilmiştir. *vic* lokusunda heteroallelizm, asimetri ve epistasis (bir genin etkisinin ilgili olmayan diğer bir gen ile baskılanması) virüs geçişini kontrol eden dominant faktörlerdir. Ayrıca konukçu bilgisi (background) de istatiksel olarak önemli bulunmuştur. Virüs transferinde tüm varyasyonların yalnızca *vic* genleriyle açıklanamayacağına işaret edilmektedir. Choi *et al.* (2012) *C. parasitica*'nın dört vejetatif uyumsuzluk lokusları (*vic2, vic4, vic6* ve *vic7*) ile ilişkilendirilen yedi aday polimorfik genini tanımlamak için kıyaslamalı bir genomik yaklaşım kullanmışlardır. Bu genlerin susturulması ile virüs taşınımındaki rolü araştırılmıştır. *vic2, vic6* veya *vic7*'de heteroallelik olan iki strainden birinin aday genlerinin hasarı, artan virüs geçişi ile sonuçlanmıştır fakat hifsel uyumsuzlukla ilişkilendirilen baraj oluşumunu önlememiştir. Fonksiyonel analizler, virüs geçişinin sınırlanmasında bu üç *vic* lokusunun katkı sağladığını onaylamışlardır. Bu çalışmalar, daha önce yalnızca genetik kanıta dayalı olan virüs transferinde *vic* lokusunun bir rolü için moleküler ve fonsiyonel doğrulama sağlamıştır. Patatin benzeri proteini kodlayan aday *vic2* allelinin hasarı (mutant) *vic2-2* mutantı alıcı durumda olduğunda virüs transferinde %5'ten %100'e oldukça büyük bir artişla sonuçlanmıştır. Bu mutant verici olduğunda virüs transferi çok küçük bir farklılıkla sonuçlanmıştır. Benzer sonuç *vic6-2* mutantı verici olduğunda da elde edilmiştir. *vic7-2* allelinin hasarı strainde bir artışla sonuçlanmamıştır. Fakat mutant strain donör olduğunda daha yüksek virüs taşınımı görülmüştür.

Zhang *et al.* (2014) genetik olarak tanımlanan *C. parasitica*'nın *vic* lokusları ile *vic1* ve *vic3* lokuslarının moleküler karakterizasyonunu tamamlamak için polimorfizme dayalı

bir kıyaslamalı genomik yaklaşım kullanmışlardır. Referans strain olarak kullanılan EP155'te gen susturulması gerçekleştirilerek, *vic1* lokusu için mutant *vic1a-2* ve *vic1b-2* diyazn edilmiştir. EP155 izolatında ya *vic1a-2* ya da *vic1b-2*'nin gen hasarı, *vic1* lokusunda heterotallik olan bir izolatla eşleştirildiğinde virüs geçişi kısıtlamalarını ortadan kaldırmıştır. Fakat yalnızca *vic1a-2* hasarı, programlanmış hücre ölümü (PCD) reaksiyonunu bozmuştur. EP155 izolatının *vic3* lokusu için mutant *vic3a-1* ve *vic3b-1* dizayn edilmiştir. Ya *vic3a-1* ya da *vic3b-1*'in gen hasarı, artan virüs geçişi ile sonuçlanmıştır. Fakat PCD'nin ortadan kaldırılması için *vic3a* ve *vic3b* her ikisinin de hasarı gerekmiştir.

Stauder *et al.* (2019) altı *vic* lokusunun dördünde gen hasarı meydana getirerek süper verici olarak iki tasarlanmış *C. parasitica* izolatı, *vic* genotipinden bağımsız bir şekilde laboratuvarda izolatlara hipovirüs transferi gerçekleştirmiştir. Bu mutant izolatlarla (SD328/82) Amerikan kestanesini enfekte eden doğal *C. parasitica* popülasyonlarında çalışmalar gerçekleştirmişler ve bunu *vic* gen hasarı olmayan (EU-5/6) izolatla karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar aynı virüsü (CHV-1-EP713) kullanmışlardır. Hipovirüs enfekteli EU-5/6 izolatıyla tedavi edilen kanserlerin %51'i, hipovirüs enfekteli SD328/82 izolatıyla tedavi edilen kanserlerin %94'ü iyileşmiştir.

Kestane kanseri ile biyolojik mücadele çalışmalarında, hipovirülent izolatların bu etmene karşı kullanılabilmesi için vejetatif uyumluluk testlerinin yapılması ve fungal popülasyonun uyum tipi çeşitliliğinin belirlenmesi yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Milgroom and Cortesi 1999, Hoegger *et al*. 2000, Anonymous 2014, Akıllı Şimşek *et al*. 2019, Çakar vd. 2021).

Cryphonectria parasitica'nın uyum tipi çeşitliliği birçok ülkede belirlenmiştir. Örneğin; İtalya, Yunanistan, Slovakya ve Avrupa'nın doğusunda EU-12 Avrupa uyum tipi yaygın olarak tespit edilmiş olup, Kuzey İtalya, Güney Fransa, Batı İspanya ve İsviçre'de ise EU–1, EU-2, EU–5 Avrupa uyum tipleri yaygın bir şekilde bulunmaktadır (Anagnostakis and Day 1979, Anagnostakis and Waggoner 1981, Anagnostakis *et al*. 1986, Cortesi *et al.* 1998, Adamčíková *et al*. 2006). Cortesi *et al*. (1998) İtalya'da EU-10 uyum tipinin, Milgroom and Cortesi (1999) ise EU-11, EU-14, EU-40 ve EU-17'nin

de bulunduğunu bildirmişlerdir. Radócz (1999) EU-13, EU-6 ve EU-1 Avrupa uyum tiplerinin Macaristan'da bulunduğunu bildirmiş ve düşük oranlarda ise EU-2, EU-3, EU-5, EU-9, EU-11, EU-12, EU-14, EU-16, EU-21, EU-22 uyum tiplerinin bulunduğunu saptamıştır. Radócz (2001) Romanya ve Ukrayna'da EU-12 uyum tipi saptamıştır. Bragança *et al.* (2007) EU-11, EU-12 ve EU-66 uyum tiplerinin sırasıyla Portekiz'de en yaygın uyum tipi olduğunu bildirmektedir. Krstin *et al*. (2008) Hırvatistan'da en yaygın uyum tipinin EU-1 olduğunu ve bu uyum tipini EU-2 ve EU-12'nin izlediğini rapor etmiştir. Ayrıca EU-3, EU-4, EU-5, EU-7, EU-9, EU-11, EU-13, EU-14, EU-17, EU-18, EU-20, EU-21, EU-28, EU-22 ve EU-29 uyum tipleri bulunmuştur.

Agayeva *et al*. (2017) Azerbaycan'da, *C. parasitica*'nın popülasyon yapısını değerlendirmek için çalışma yürütmüşlerdir. İzolatların %93'ünün tek bir vc tip içerisinde olduğunu belirlemişlerdir. Geriye kalan diğer izolatlar arasında ek 6 vc tip tanımlanmıştır. Baskın vc tipin Avrupa'da olmayan bir uyum tipi olduğu, fakat komşu sınırı olan Gürcistan'da yaygın bulunduğu belirtilmiştir.

Romon-Ochoa *et al*. (2021) 2019-2020 yılında İngiltere'de yaptıkları survey çalışmasında, 52 çalışma alanından toplanan 189 örnekte çalışmalar gerçekleştirmişleridir. Kırküç bölgeden 123 adet örnek hem izolayon hem de real time PCR ile pozitif olarak test edilmiştir. Mating tipi, vejetatif uyum tipi ve CHV-1 için 115 örnek test edilmiştir. Oniki vc uyum tipi tespit edilmiş ve bunların dördü İngiltere'de ilk kayıt olmuştur. En yüksek vc tip çeşitliliği Devon'da bulunmuş olup, bu bölgeyi Batı Sussex takip etmiştir. En düşük vc tip çeşitliliği ise London ve Derbyshire'de bulunmuştur. Her iki mating tipi de %41 MAT-1, %59 MAT-2 oranında bulunmuştur ve heterokaryon gözlenmemiştir.

Vejetatif uyumluluk çalışmaları farklı bölgelerde ve farklı ülkelerde baskın vc tip çeşitliliği göstermiştir. EU-1, EU-2 ve EU-5 vc tipleri Avusturya, Fransa, Almanya, İtalya, İspanya ve İsviçre'de dominant uyum tipidir (Cortesi *et al*. 1998, Robin *et al*. 2000, 2010, Robin and Heiniger 2001). EU-12 ise Doğu ve Kuzey Avrupa'da baskın uyum tipidir (Sotirovski *et al*. 2004, Perlerou and Diamandis 2006).

Ülkemizde uyum tiplerinin belirlenmesi amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Çeliker ve Onoğur (1998, 2009) Marmara, Ege ve Karadeniz Bölgelerinden toplamda 388 *C. parasitica* izolatını 19 farklı alandan toplamışlardır. Bu izolatlarda %93,3 oranında EU-1, %6,7 oranında EU-12 olmak üzere iki uyum tipi tespit etmişlerdir. Bu çalışmada EU-1 uyum tipini tüm çalışma bölgelerinde tespit ederken, EU-12 uyum tipini ise belirli bölgelerde (Marmara Bölgesi (Balıkesir-İvrindi), Ege Bölgesi (İzmir-Beydağı ve Aydın)) bulmuşlardır. Coşkun *et al*. (1999) Marmara, Doğu ve Batı Karadeniz Bölgelerine ait toplamda 181 sahada çalışma gerçekleştirmişler. 10 İtalyan uyum tipi ve 2 Avrupa uyum tipi (EU-4, EU-5) kullanarak 265 izolat üzerinde uyum tipi tespit çalışmalarını gerçekleştirmelerine rağmen, izolatların uyum tipleri anlaşılmamıştır. Gürer *et al*. (2001) yaptıkları çalışmada 63 Avrupa uyum tipini kullanarak, Marmara ve Karadeniz Bölgesinden elde edilen 134 *C. parasitica* izolatında uyum tipi çalışmışlardır. İzolatların EU-1 uyum tipine girdiklerini belirtmişlerdir. Döken *et al*. (2004) Aydın Bölgesinden elde edilen 97 *C. parasitica* izolatında uyum tipi çalışmaları gerçekleştirilmiş olup, 2 uyum tipi (EU-1, EU-12) tespit etmişlerdir. Akıllı *et al*. (2009) Karadeniz Bölgesinden, 11 farklı ilden toplamda 32 lokasyondan elde ettiği 296 izolat üzerinde çalışmalar yürütmüşlerdir. Sonuç olarak izolatların EU-1, EU-2, EU-5, EU-12, EU-14 olmak üzere 5 uyum tipi saptamışlardır. Çalışmada tespit edilen beş uyum tipinin tümünün sadece Kastamonu Orman Bölge Müdürlüğü içerisinde olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca uyum tiplerinden EU-1 %90,8 ile tüm bölgede görülürken, EU-12 %6,8, EU-14, EU-2 ve EU-5 ise %1,5 oranında belirlenmiştir. Erincik *et al*. (2011) Aydın ve İzmir'de iki uyum tipi tespit etmişlerdir. Aydın'da %23 EU-12, %77 EU-1 uyum tipi elde ederken, İzmir'de %30 EU-1, %70 oranında EU-12 tespit etmişlerdir. Akıllı (2012) Bursa ve Yalova illerinde 15 lokasyondan 198 *C. parasitica* izolatı elde etmiş olup, tüm izolatların Avrupa uyum tipinin EU-1 olduğu tespit edilmiştir. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Orman Genel Müdürlüğü (OGM)'nün iş birliği ile yürütülen bir proje kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda İzmir yöresinde iki uyum tipinin (EU-1, EU-12) yaygın olduğu belirtilmiştir (Anonymous 2014). Daldal (2015) İzmir, Manisa, Muğla ve Denizli illerinden 19 köyden, toplamda 268 izolat elde etmiştir. İzolatlar üzerinde yapılan uyum tipi çalışmalarına göre, İzmir ilinde 3 uyum tipi (EU-1, EU-2 ve EU-12), Denizli ve Manisa illerinde 2 uyum tipi (EU-1 ve EU-12) tespit etmiştir.

Mangıl (2017) Artvin, Rize ve Trabzon illerinden 3 farklı bölgeden, toplamda 344 izolat elde etmiştir. İzolatlar üzerinde yapılan uyum tipi çalışmasına göre, 235'i EU-1 (%68,3), 23'ü EU-17 (%6,7), 21'i EU-12 (%6), 14'ü EU-3 (%4) olarak tespit edilmiş olup, 51 izolatın herhangi bir uyum tipine girmediği bildirilmiştir. Hatipoğlu (2019) Doğu Karadeniz Bölgesinde *C. parasitica*'nın vc tiplerini, *vic* genlerine dayalı markör sistemi kullanarak, konvensiyonal polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile belirlemiştir. 20 adet araziden elde edilen *C. parasitica* izolatı, 30 adet tek askospor izolatlarının 6 *vic* lokusları belirlenerek tespit edilmiştir. Arazi izolatlarında EU-2, EU-3, EU-7, EU-8, EU-12, EU-17, EU-21, EU-22, EU-30 ve EU-55 vc uyum tipleri tespit edilirken, tek askospor izolatları arasında ise EU-1, EU-2, EU-3, EU-5, EU-8, EU-11, EU-12, EU-17, EU-21, EU-22, EU-29, EU-35, EU-36, EU-51 ve EU-58 tespit edilmiştir. Çakar vd. (2021) Bolu ve İzmir Orman Bölge Müdürlüğünde yaptıkları çalışmalarda İzmir yöresinden 2015 yılında 34, 2016 yılında ise 7 farklı köyden seçilen aktif kanserlerden örnekler toplamışlar ve 409 izolat üzerinde yaptıkları uyum tipi çalışmasının sonuçlarına göre 255 tanesinin Avrupa uyum tiplerinden EU-12, 154 tanesi EU-1 uyum tipinde yer aldığını belirtmişlerdir. Bolu Orman Bölge Müdürlüğü 4 Orman İşletme Müdürlüklerine bağlı kestane sahalarından iyileşen kanserden elde edilen 76 adet izolattan 2 adedini EU-12, 72 adedini ise EU-1 uyum tipi olarak tespit etmişler. İki izolatın ise uyum tipi saptanamamıştır. Ülkemizde *C. parasitica*'nın vc tip çeşitliliği özellikle Ege ve Marmara bölgelerinde (Akıllı *et al*. 2009, Çeliker and Onoğur 2001, Erincik *et al*. 2008, 2011, Akıllı Şimşek *et al*. 2019, Çakar *et al*. 2020, 2021) düşük görülmekte, EU-1 ve EU-12 baskın vc tipleri olarak saptanmıştır. Ancak son zamanlarda Ege Bölgesinde EU-2 uyum tipi tespit edilmiş olup, dağılımı düşük bulunmuştur (Daldal 2015).

Hypoviridae familyasında bulunan mikovirüsler, *C. parasitica*'da viral bir hastalığa neden olmaktadır (Choi and Nuss 1992). Hipovirüsler positive-strand RNA virüsleridir ve konukçunun sitoplazmasında bulunurlar. *Cryphonectria parasitica*'da hastalığa yol açan dört hypovirüs bulunmaktadır. Bunlar; *Cryphonectria hipovirus* 1 (CHV-1), CHV-2, CHV-3 ve CHV-4 olarak adlandırılmakta ve dsRNA içermektedir. Bu virüsler filogenetik olarak CHV-1 ile ilişkilidir fakat fungal konukçuda farklı etkilere sahiptir. CHV-2 ve CHV-3, *C. parasitica*'da hipovirülensliğe neden olmaktadır ancak CHV-4

etkili değildir ve hipovirülensliği sağlamamaktadır (Rigling *et al*. 2021). CHV-4 genom yapısı nedeniyle taksonomik olarak hipovirüstür ancak diğer hipovirüslere benzemekle birlikte virülensliği diğerlerine göre az ya da hiç görülmemektedir (Enebak *et al*. 1994, Peever *et al*. 2000, Milgroom and Cortesi 2004). Avrupa'da sadece CHV-1'in bulunduğu kayıt edilmiştir. Avrupa'da en çok yayılım alanına sahip olan ve en çok bilinen CHV-1'dir (Allemann *et al*. 1999). Kuzey Amerika'da birkaç alan dışında CHV-1'e rastlanmamış, en yaygın hipovirüs CHV-3 ve CHV-4 olup (Griffin 1999, Peever *et al*. 1997, Anagnostakis 2001, Liu *et al*. 2002) ayrıca CHV-2 de bulunmaktadır (Hillman *et al*. 1992, 1994, Chung *et al*. 1994). Asya'da ise hem CHV-1 hem de CHV-2 bulunmaktadır (Peever *et al*. 1998, Liu *et al*. 2003).

Dünyada ormanlardaki kestane kanseri zararını restore etmek amacıyla yapay inokulasyon ile hipovirüs bulaştırma yaygın bir uygulamadır. Avrupa'da kestane kanserine karşı bir biyolojik ajan olarak CHV-1'in en iyi çalışan hipovirüs olduğu bildirilmiştir (Rigling and Prospero 2018). Avrupa'da CHV-1 yaygın olarak bulunmaktadır (Bissegger *et al*. 1977, Kristin *et al*. 2008, Kristin *et al*. 2011, Bryner and Rigling 2012). Avrupa'da genetik olarak CHV-1'in belirgin alt tipleri (subtype) tanımlanmıştır (Alleman *et al*. 1999, Gobbin *et al*. 2003). İtalyan alt tipi (subtype I) en yaygın olanıdır ve hipovirülensliğin doğada yaygın bir şekilde bulunmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu alt tipin; İtalya, İsviçre, Güneydoğu Fransa, Bosna Hersek, Hırvatistan, Slovenya, Makedonya, Yunanistan ve Türkiye'de baskın olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Alleman *et al*. 1999, Sotirovski *et al*. 2006, Krstin *et al*. 2011, Akıllı *et al*. 2013). Diğer CHV-1 alt tipleri olarak Fransa'da F1 ve F2 (Feau *et al*. 2014), İspanya'da F1, F2, E ve D (Gobbin *et al*. 2003, Zamora *et al*. 2012) Almaya'da E ve D (Peters *et al*. 2014) ve Türkiye'nin doğusunda F2 alt tipi (Akıllı *et al*. 2013) tespit edilmiştir.

CHV-1, iki bitişik open reading frames (Açık Okuma Alanı; ORFA ve ORFB) içeren bir RNA genomuna sahiptir. Bu ORF bölgeleri otokatalitik olarak işlenen poliproteinleri kodlamaktadır. Viral polimeraz ve helikaz genleri viral genomun daha büyük ORFB bölgesinde bulunmaktadır (Nuss 2005). Akıllı *et al*. (2013) yaptıkları çalışmada, ORF'nin bir bölgesini set A (EP 713-5/R2280) olarak seçilen primer seti ile ve

ORFB'nin bir bölgesi set B (EP 713-6/EP 713-7) olarak seçilen primerlerle çoğaltmışlardır. Hipovirüsün ORFA bölgesine dayalı sekans sonuçları kullanılarak ülkemizdeki hipovirüsün alt tipleri belirlenmiş olup, İtalyan ve Fransız olmak üzere iki alt tip bulmuşlardır. Diğer bir primer seti de ORFB (OB-10193F/OB-11161R) helikaz baskınlığında bir bölge için spesifik ve diğeri de ORFA (OA-427F/OA-1323R)'da bir bölge için kullanılmıştır. Elde edilen CHV filogenetik analizleri ve alt tipleri tanımlamak için, Gobin *et al*. (2003) tarafından tanımlanan hvep 1 ve hvep 2 primerleri kullanılarak her iki iplikçik üzerinde ORFA'nın PCR ürünleri sekanslatılmış ve alt tipleri ortaya çıkarılmıştır.

Feau *et al*. (2014) tarafından yapılan çalışma da CHV1'in iki bölgesi sekanslatılmış olup, ORFA'da bir bölge (CHV1/EP713 nükleotit dizinde 1495-1792 pozisyonu) için hvep1 ve hvep2 (Gobbin *et al*. 2003) ile bu bölge çoğaltılmış olup, ORFB' den bir bölge (CHV1/EP713 nükleotit dizisinde 6252–6991 pozisyonu) bu çalışma için geliştirilen ORFB-12F ve ORFB-12R primeleri ile çoğaltılmış ve her bir ORF bölgesi için filogenetik analizler yapılmıştır. Rigling *et al*. (2018) tarafından Gürcistan'da yapılan bir çalışma da özgün bir CHV-1'in alt tipini açığa çıkaran her bir ORFA ve ORFB viral genomun iki spesifik bölgesi sekanslanmıştır. Bu bölgeden elde edilen tüm hipovirüs strainleri belirgin bir şekilde farklı bir filogenetik grupta yer almış ve araştırmacılar Georgian CHV1 alt tipi (subtype G) isimli yeni bir hipovirüs alt tipi önermişlerdir.

Genomik DNA içerisindeki ribozomal DNA'nın Internal transcribed spacer (ITS) bölgesindeki varyasyonlar DNA parmak izi çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (White *et al*. 1990). ITS bölgesi funguslar için başlıca barkod olarak seçilmiştir (Schoch *et al*. 2012). DNA dizi analizleri fungusların filogenetik ilişkilerini belirlemek için birçok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır. Azerbaycan'ın, Ismailli, Oghuz ve Zagatala ormancılık bölgelerinden 2006 yılında toplanan *C. parasitica* izolatları için ribozomal DNA'nın ITS bölgesine dayandırılarak tür teşhisi yapılmıştır (Aghayeva and Harington 2007). Güney İspanya'da bulunan Andalusia bölgesinde 2013 yılında, Yunanistan'ın kuzeybatı bölgesinde bulunan Corfu adasında 2016 yılında, hastalık ilk kez kestane bahçelerinde görülmüş ve tür tanımlaması için ribozomal DNA'nın ITS bölgesi çoğaltılmıştır (Bascón *et al*. 2014, Tziros and Diamandis 2016).

Yirminci yüzyılda Kuzey Amerika ve Avrupa'ya kestane kanseri etmeni *C. parasitica*'nın istilasından sonra, bu istila tarihinin kökenine inmek ve popülasyon genetik parametrelerini anlamak için çeşitli genetik markörler kullanılmıştır (Milgroom and Lipari 1995, Milgroom *et al*. 1996, Hoegger *et al*. 2000, Marra *et al*. 2004). *Cryphonectria parasitica* popülasyonlarının genetik yapısı ve çeşitliliği izozim, RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), DNA fingerprintler ve RFLP (Restriction fragment length polymorphism) teknikleri ile araştırılmıştır (Ding *et al*. 1997, Milgroom *et al*. 1992, 1996, Hoegger *et al*. 2000, Wang *et al*. 2004, Xu *et al*. 2005, Yan *et al*. 2007). Popülasyonlar ve türler arasında spatial genetic pattern (lokal genetik yapı= Popülasyondaki bireyler arasında rastgele olmayan dağılım)'deki farklılıklar, onların üreme sistemleri, dağılma karakteristikleri ve yaşam geçmişlerinde farklılıkların sonuçlarını yansıtmaktadır (Tani *et al*. 1998). Yan *et al*. (2007) yaptıkları çalışmada Liu'nun altı kültür çeşidi bölgesinde, 17 kestane popülasyonundan *C. parasitica* izolatlarını toplamışlar ve RAPD analizleri kullanılarak popülasyon yapısı ve genetik çeşitliliği çalışmışlardır. Bu çalışmada RAPD markörleri ile açığa çıkarılan *C. parasitica*'nın genetik çeşitliğinin, izozim (Ding *et al*. 1997) ve RFLP'ye (Milgroom *et al*. 1996, Wang and Milgroom 1996) dayalı çalışmaların sonuçlarından oldukça düşük bulunduğunu belirtmişleridir.

Çeşitli çalışmalarda bitki patojeni funguslarda, epidemolojik süreçleri anlamak için mikrosatelitler (mikro uydu) veya basit dizi tekrarları (Simple Sequence Repeats=SSR) moleküler belirteçleri (marker) kullanılmıştır (Atallah *et al*. 2004, Giraud 2004, Agayeva *et al*. 2017).

Tür içi genetik varyasyonların tespiti amacıyla farklı markör sistemleri kullanılarak funguslarda çalışmalar yapılmıştır. PCR temelli moleküler markör yöntemleri DNA'yı karakterize ederek tür içi ve türler arası genetik farklılıklarının incelenmesinde oldukça faydalı bilgiler sağlama potansiyeline sahiptir. Bu nedenle farklı yöntemler geliştirilmiştir.

Yeni bir markör sistemi Start Codon Targeted Polymorphism (SCoT) markör yönteminin kullanımı Collard and Mackill (2009) tarafından tanımlandıktan sonra hızla

kullanımı artmıştır. Tür içi ve türler arası genetik varyasyonları belirlemek için sıklıkla kullanılmaktadır. DNA başlangıç kodunun (ATG) çevresindeki gen bölgesini hedef alan bir DNA markör sistemi olan SCoT yöntemi ökaryotik canlılarda tür içi genetik farklılıkların açığa çıkarılmasında oldukça yararlı bilgiler sağlamıştır. Bu yöntem, bitkilerin kısa korunan bölgesinin ATG translasyon start kodonu tarafından çevrelendiği gözlemine dayanmaktadır (Sawant *et al*. 1999). Bu teknikte her iki DNA iplikçiğinin ATG başlatma kodonunun yan bölgelerine bağlanarak, tasarlanan tek bir primer kullanılır. Genomik sekans bilgisine ihtiyaç olmaksızın translasyon başlatma kodonunu çevreleyen korunan bölgeye dayalı primeleri dizayn etmek çok kolaydır (Joshi *et al*. 1997, Sawant *et al*. 1999). Fungal popülasyonların DNA markörleri ile incelenmesi popülasyon yapılarının açığa çıkarılmasında oldukça faydalı bilgiler sağlamaktadır.

Moleküler karakterizasyonu gerçekleştirmek ayrıca türler arası ve tür içi genetik farklılıklarını incelemek amacıyla kullanılan markör yöntemlerinden biri de inter-Primer Binding Site (iPBS) yöntemi retrotranspozon temelli bir DNA markör yöntemi olup, temel olarak ekzon bölgelerini hedef almaktadır (Kalendar *et al*. 2010). Transpozonlar (Jumping Genes=Zıplayan Genler) genomun bir bölgesinden başka bir bölgesine taşınabilen DNA dizilerdir. Genomun boyunun uzamasından ve ekzon bölgelerde çok fazla miktarda bulunmalarından dolayı, tür içi ve türler arası genetik farlılıkların araştırılmasında yüksek spesifikliğe sahiptir. Retrotranspozonların replikasyonları genetik çeşitliliği oluşturduğundan iyi bir moleküler markör kaynağı olarak kabul edilmektedir (Feschotte and Pritham 2007).

Retrotranspozon temelli olan iPBS markörleri, Fungi alemine giren farklı Ascomycota ve Basidiomycota üyelerinin moleküler karakterizasyonunu belirlemek için kullanılmıştır (Özer *et al*. 2016, Aydın *et al*. 2020). Bu markörler genetik karakterizasyon çalışmalarında, genetik farklılıkların belirlenmesi amacıyla yararlı bilgiler sağlama kapasitesine sahiptir. Moleküler markör olarak retroposonları kullanmak için sınırlayacı faktörlerden biri, Long terminal repeats (LTR) sekanslarının bilinmesi gerekliliğidir. Muhtemel bir bilgi yok ise, LTRs klonlanmalı ve çoğaltılmalıdır. Kalendar *et al*. (2010) tarafından geliştirilen iPBS tekniği, tRNA'ların sınırlı bir kısmını tamamlayıcı 18 nükleotid ile LTR transpozonları tarafından paylaşılan

retropozonların PBS alanlarını kullanarak bu durumun üstesinden gelmektedir (Mak 1997). Değişken uzunluktaki primerler bu bölgere bağlanmak için tasarlanmıştır. iPBS için retropozonlar karşıt yönlülüğe sahip ve genler arası bölgeleri çoğaltmak için birbirine yeterli yakınlıkta olmak zorundadır (Poczai *et al*. 2013).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Deneme Alanlarının Seçimi ve Örnekleme

Çalışmada kestane üretiminin yoğun olduğu 13 il seçilmiştir. Bu illerde çalışılmasının nedeni, kestane kanseri hastalığının ve hipovirülensliğin dağılımının daha önce yapılan çalışmalarda değerlendirilmiş olması ve bu sahalarda tespit edilmesidir. İllerdeki örneklemede kestane üretimi değil kestane kanserinin yöredeki durumu değerlendirilmiştir. Türkiye'de 2021 yılında toplam kestane meyvesi üretimi 77,792 ton olup, bu 13 ilin kestane meyve üretimi toplam meyve üretiminin %87,88 (68,363 ton)'ine karşılık gelmektedir (TÜİK 2022) . Seçilen 13 ilden toplamda 215 aktif ve iyileşen kanserlerden kabuk örneği toplanmıştır.

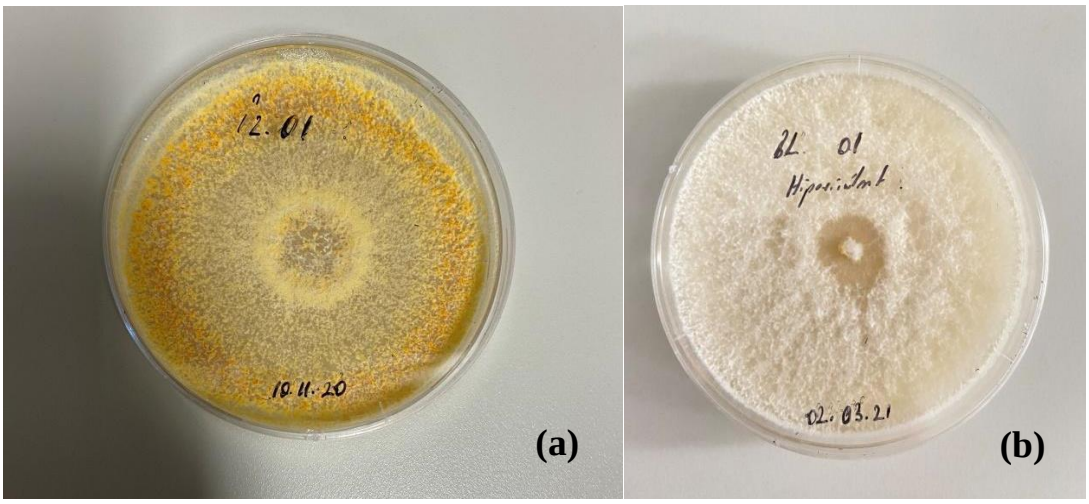
3.2 *Cryphonectria parasitica* İzolatlarının Eldesi ve Saflaştırılması

3.2.1 *Cryphonectria parasitica* izolasyonu

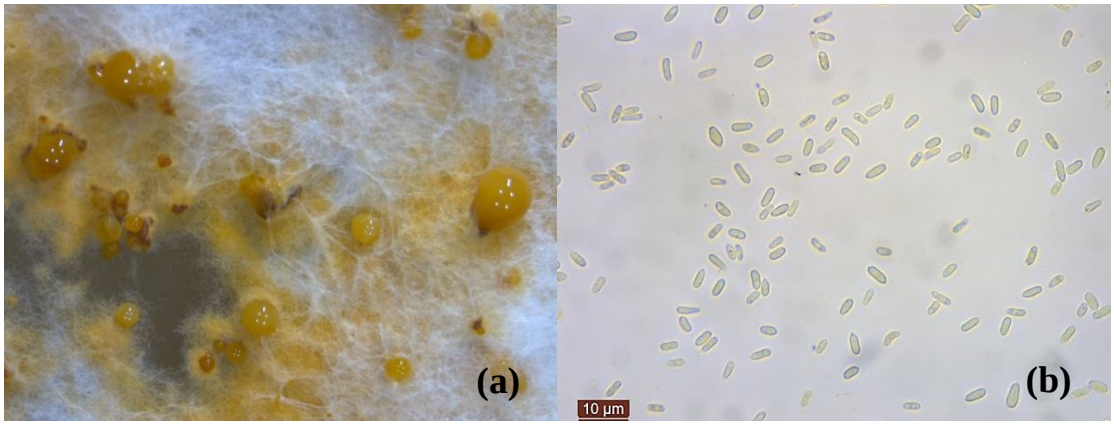
Kanserli dokulardan 1 cm mantar delici kullanılarak, kambiyum dokusunu da içerecek şekilde, nekrozlu ve sağlam dokuları içeren en az 3 adet kabuk parçaları alınmış ve laboratuvara getirilmiştir. Kabuk parçaları ilk olarak %1'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonu içinde 3 dk bekletilmiş ve daha sonra steril kurutma kağıtlarında kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işleminden sonra, parçalar mikroskop altında incelenerek, sağlıklı doku ve nekrozlu dokuların birleşme kısmından 2-3 mm büyüklüğünde parçalar alınarak patates dekstroz agar (PDA; Difco, Sparks, MD, USA) besi ortamı içeren petrilere yerleştirilmiş, 25 °C sıcaklıkta, karanlıkta 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen funguslar stereo mikroskop altında incelenmiş ve hif ucu tekniği kullanılarak fungusun saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tüm izolatlar PDA içeren tüplerle birlikte +4 °C'de buzdolabında ve cryotüplerde -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.2 Kültürel özelliklerine göre *Cryphonectria parasitica* izolatlarının hipovirülent ya da virülent olarak ayrılması

İzolasyon sonrası kabuk parçalarından gelişen funguslar, mikroskop altında incelenerek *C. parasitica* özelliği gösteren, yani turuncu veya beyazımtırak tozumsu bir gelişme gösteren; düz veya çok az kıvrık, bölmesiz (septasız) ve şeffaf, 5 × 1,5-2 µm ölçülerinde konidileri olan kolonilerin hif uçlarından küçük bir parça alınarak PDAmb (PDA 40 g, methionin 100 mg, biotin 1 mg, saf su 1000 ml) ortamına aktarılarak saf *C. parasitica* kültürleri elde edilmiştir (EPPO 2005) (Şekil 3.1, Şekil 3.2). Bu kültürler, 7 gün 25 °C karanlıkta inkübasyona bırakılmış ve 5 gün de yaygın laboratuvar ışığında tutulmuştur.



Şekil 3.1 *Cryphonectria parasitica*'nın PDA ortamında virülent (a) ve hipovirülent (b) izolatının morfolojik görünümü



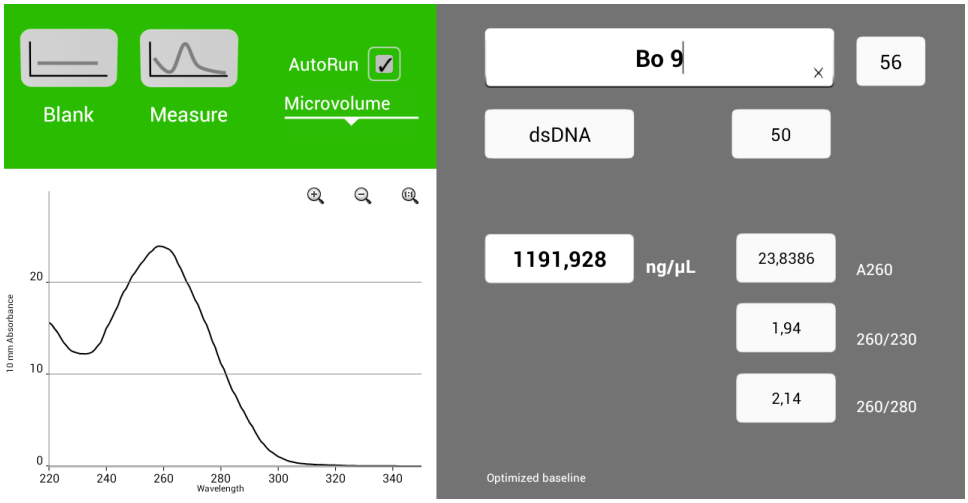
Şekil 3.2 *Cryphonectria parasitica*'nın a) eşeysiz spor yığınları b) eşeysiz sporları (conidium) (scale bar 10µm)

3.2.3 Ribozomal DNA'nın ITS bölgesine dayalı tür teşhisi

3.2.3.1 Miselyum çoğaltımı ve DNA izolasyonu

Bu amaçla karanlıkta 25 °C'de 7 gün boyunca PDA üzerinde geliştirilen her izolatın 50 mg miselyal kütlesi ve sporları doğrudan kültür yüzeyinden hafifçe kazınarak 2 ml Eppendorf tüplere aktarılmıştır. DNA izolasyonu çalışması DArT DNA izolasyon yönteminde (http://www.diversityarrays.com) belirtildiği gibi "fresh buffer" (125 mM pH 8,0 Tris-HCl, 25 mM pH 8,0 EDTA, 0,8 M NaCl, %1 CTAB, %1 sarkosil, %2 PVP-40, %0,5 sodium disulfite) kullanılarak yapılmıştır. Çalışmaya geçilmeden önce 65 °C'de ısıtılmış olan fresh buffer (ekstraksiyon–lizis tamponu) her bir örnek için Eppendorf tüplere 750 µl eklenmiş olup, kuru blok ısıtıcıda 65 °C sıcaklıkta 60 dk bekletilmiştir. Örnekleri homojen hale getirmek amacıyla steril çelik uçlu bir homojenizatör kullanılmış, kuru blok ısıtıcıda inkübasyona bırakılan örnekler her 15 dk'da bir ters-düz işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra, kuru blok ısıtıcıdan örnekler alınmış ve oda sıcaklığına soğumaya bırakılmıştır. Örneklerin sıcaklığı oda sıcaklığına geldiğinde, örneklerin üzerine 750 µl kloroform/izoamil alkol (24:1 w/w) eklenmiş ve 10 dakika yavaşça ters düz edilerek 12000 g'de 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işlemi sonrasında supernatantlar (çökeltinin üstünde kalan kısım) yeni steril 1,5 ml'lik Eppendorf tüplere alınmış, DNA'yı çökeltmek için üzerlerine, süpernatantın 0,6 katı hacmi kadar soğuk isopropanol eklenmiştir. Yeni tüpler 12000 g'de 5 dk santrifüj işlemine tabi tutulmuş olup, santrifüj işlemi sonrasında ortamdan

süpernatantlar atılmış ve pelletler %70'lik soğuk etanolle 2 defa yıkanarak, 30 dk oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kurutulmuş olan pellet 100 µl steril ultra saf su içinde çözülerek, DNA konsantrasyonu DS-11 FX+ serisi spektrofotometre (Denovix Inc., Wilmington, DE, ABD) cihazı ile ölçülmüş (Şekil 3.3) ve PCR çalışmaları için elde edilen DNA steril saf su kullanılarak 4 ng/µl'ye seyreltilmiştir. Farklı fenotipik özellik gösteren ve farklı orijine sahip izolatlar universal primer setleri olan ITS-1/ITS-4 (White *et al*. 1990), kullanılarak ITS bölgeleri çift taraflı amplifiye edilmiş ve PCR amplifikasyonları, 25 µl reaksiyon miksinde Dream Taq PCR Master Mix (2×) (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, ABD), 0,4 µM primer ve 4 ng DNA kullanarak bir termal cycler içinde gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları başlangıç denatürasyonu için 95 °C 2 dk; denatürasyon için 30 döngü 95 °C'de 30 s, anneling sıcaklığı (erime sıcaklığı) 52 °C'de 30 s, extension (uzama) 72 °C'de 1 dk gerçekleştirilmiş ve final extension (son uzama) 72 °C'de 5 dk yapılarak tamamlanmıştır. Ürünlerin varlığının doğrulanması için PCR ürünleri 1× TAE tampon çözeltisi kullanılarak %1,2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve etidyum bromür ile boyanarak UV altında jel görüntüleme sistemi ile fotoğrafları çekilmiştir. Kalan PCR ürünleri, bir Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, ABD) ile üreticinin talimatlarına göre saflaştırılmış ve ITS-1 primeri kullanılarak doğrudan sekanslamaya (Macrogen, Inc., Seoul, Kore) tabi tutulmuştur.



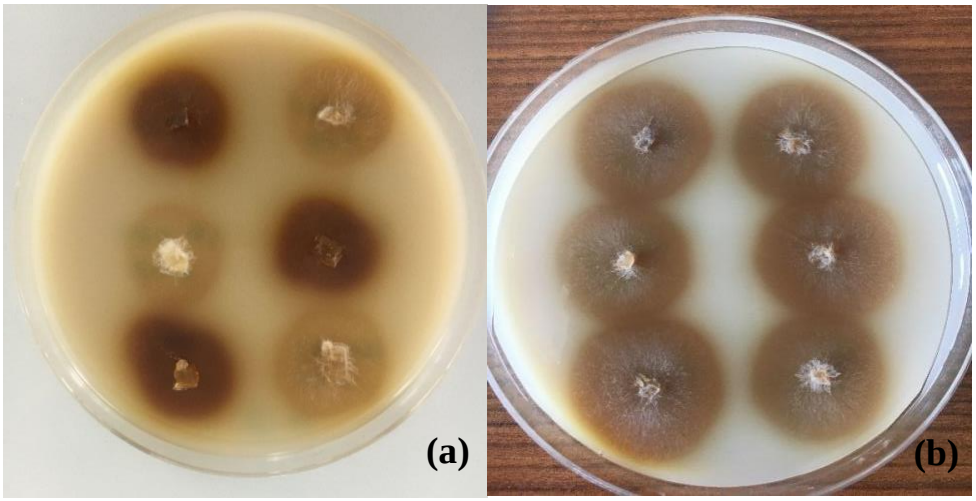
Şekil 3.3 DS-11 FX+ serisi cihaz ile DNA'nın saflık ve konsantrasyon ölçümü

Ham sekans dataları MEGAX (Kumar *et al.* 2018) programı ile işlenmiş ve GenBank veritabanına (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) karşı BLAST araştırmasıyla, tüm National Center for Biotechnology Information (NCBI) nükleotid koleksiyonu (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) ile karşılaştırmış ve tür tespiti gerçekleştirilmiştir.

3.3 Hipovirülent *Cryphonectria parasitica* İzolatlarının Ayrılması

3.3.1 Phenol oxidase enzim aktivitesi (Bavendamm Testi)

Bu test, izolatların hipovirüs içerip içermediklerini belirlemek için Bavendamm testi Rigling *et al.* (1989)'in tarifine göre yapılmıştır. Bavendamm ortamı (5 g Tannic asit, 15 g Malt ekstract, 20 g agar, 1000 ml saf su) hazırlamak amacıyla ilk olarak malt extract agar hazırlanmış, ortam pH'sı sodyum hidroksit (NaOH) ile 4,5'e ayarlanmıştır. Ayrı bir yerde tannik asit çözeltisi hazırlanmış olup, elde edilen iki çözelti ayrı bir şekilde otoklav edilerek besiyerleri petri kaplarına dökülmeden önce birleştirilip, karıştırılmıştır. PDAmb besi ortamında gelişen fungus izolatlarından alınan 5 mm çaplı diskler bu ortama yerleştirilmiş ve 20 ºC karanlıkta inkübasyona tabi bırakılmıştır. Dört gün sonra ortamda kuvvetli renk reaksiyonu gösterenler virülent, zayıf renk reaksiyonu veya hiç reaksiyon oluşturmayanlar hipovirülent strainler olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.4). Çalışmada pozitif kontrol olarak Avrupa uyum tiplerinden EU-1 tester izolatı kullanılmıştır. Bu test 2 tekrarlı yapılmıştır.



Şekil 3.4 Phenol oxidase enzim aktivitesi testinde koyu renk koloni (EU-1 tester, virülent) ve açık renk koloni gelişimi (BL01, hipovirülent) (a) koyu renk koloni (EU-1 tester, virülent ve BL07 virülent) gelişimi (b)

3.3.2 Hipovirülensliğin moleküler yollarla belirlenmesi

3.3.2.1 Miselyum çoğaltımı ve total RNA izolasyonu

Kültürel ve Phenol oxidase enzim aktivitesi testine göre hipovirülent olduğu tespit edilen *C. parasitica* izolatlarında hipovirüsün varlığını tespit etmek için total RNA izolasyonu yapılmıştır. Bunun için -80 °C'de muhafaza edilen *C. parasitica* izolatları PDAmb besiyerine yeniden ekim yapılmış ve 25 °C'de 7 gün karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra total RNA izolasyonu için miselyum steril bir iğne yardımıyla kültür yüzeyinden toplanmıştır. Yaklaşık 100 mg *C. parasitica*'nın miselyumu sıvı nitrojen içinde ezilmiş ve RNA'yı çöktürmek için, NucleoZOL (Macherey-Nagel, Düren, Almanya) kullanım protokolünde belirtildiği şekilde, her steril tüp için 500 µl NucleoZOL üzerine 200 µl nükleaz içermeyen su eklenerek içerisine alınan misel parçalarıyla hareketli bir şekilde 15 s kadar tüpler çalkalanmış ve daha sonra 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında 12000 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir.

Santrifüj işleminden sonra, steril yeni bir tüpe RNA içeren süpernatant kısımdan 500 µl pipetle alınmış ve üzerine RNA'yı çöktürmek için 500 µl isoproponal eklenmiş ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra 12000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısım kaldırılıp, RNA'nın yıkanma aşamasına geçilmiştir. 1,5 ml tüplerde RNA çöktürülürken 500 µl %75'lik soğuk ethanol üzerine eklenmiş olup, 8000 g'de 3 dk santrifüj edilmiş ve yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Oluşan pelletin üzerindeki ethanol pipetlenerek uzaklaştırılmıştır. RNA pelleti nükleaz içermeyen 40 µl suda çözündürülmüştür. Etkili bir çözündürme için oda sıcaklığında 3 dk vorteks yapılmış ve -80 °C'de saklanmıştır.

3.3.2.2 cDNA sentezi ve PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

İlk olarak tek sarmallı cDNA, EURX cDNA Sentez Kiti (Eurx Ltd, Gdańsk, Polanya) kullanılarak, total RNA'dan sentezlenmiştir. EURX cDNA sentez kiti protokolünde belirtiği gibi, 1 µg total RNA, 4 µl 5x cDNA Buffer, 1µl mix RT (reverse transkriptaz enzimi), 1 µl oligo (dT), 1 µl random hexamers, 12 µl nükleaz free su ile karışım 20 µl'ye tamamlanmıştır. Bir thermal cycler içerisinde; 20 °C'de 10 dk, 50 °C'de 40 dk, 85 °C'de 5 dk, 4 °C'de 10 dk cDNA protokolünde çalıştırılmıştır.

3.4 Hipovirüs'ün ve Alt Tiplerinin Tanımlanması

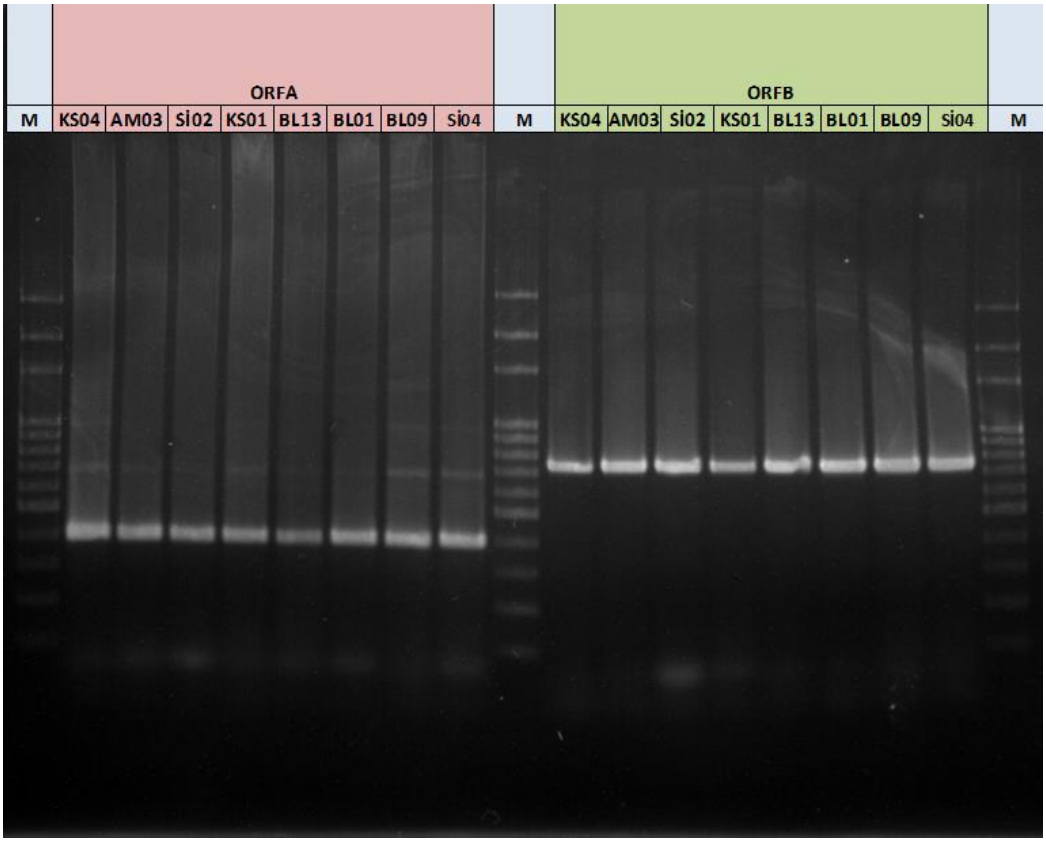
3.4.1 Filogenetik analizler ve alt tip tanımlanması

CHV-1 izolatlarının alt tiplerini tanımlamak için, hvep1 ve hvep2 primerleri kullanılarak her iki iplikçikte ORFA bölgesinin PCR ürünleri sekanslatılmıştır (Gobbin *et al*. 2003). Virüsün diğer bir bölgesi ORFB için 12F ve 12R primeleri kullanılmıştır (Feau *et al*. 2004) (Çizelge 3.1, Şekil 3.5). PCR, 50 µl reaksiyon için, cDNA içeriği 1 µl, primer çiftleri (0,8 µM her biri için), 200 µM dNTPs, 1,5 mM $MgCl_2$, reaksiyon buffer (final konsantrasyonu 10 mM Tris–HCl pH 8,8, 50 mM KCl ve 0,08 % Nonidet P40), *Taq* DNA polymerase (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, ABD) 1 U kullanılmıştır. PCR protokolü, başlangıç denatürasyonu 94 °C'de 2 dk, 40 döngü

denatürasyon 94 °C'de 1 dk, anneling sıcaklığı 50 °C'de 1,5 dk, extension 72 °C'de 2 dk ve 72 °C'de 8 dk final extension ile tamamlanmıştır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforez yapılmış ve ethidyum bromürde boyanıp UV altında görüntülenmiştir. NCBI BLAST analizi gerçekleştirilen sekanslar GenBank veritabanına kaydedilerek accession numaraları alınmıştır. GenBank'tan elde edilen referans izolatlar ile çalışmadan elde edilen sekanslar ClustalW kullanılarak hizalandıktan sonra filogenetik ağaç CIPRES platformunda IQ-TREE 1.6.12 programı kullanılarak Maximum Likelihood ve Ultra-Fast bootstrap methodları ile elde edilmiştir.

Çizelge 3.1 Sekans için kullanılan ORFA ve ORFB primerleri

Gen Bölgesi	**Kullanılan Primerler**	**Primer Dizilimi (5'-3')**	**Referans Kaynaklar**
ORFA	hvep1	TGACACGGAAGCTGAGTGTC	Gobbin *et al*. (2003)
	hvep2	AGCGCGAATTTCTTGTCG	Gobbin *et al*. (2003)
ORFB	12F	AGACCTCAATCGGGTCTCCCT	Feau *et al*. (2004)
	12R	TTCAACCACACGACGAGTTCG	Feau *et al*. (2004)



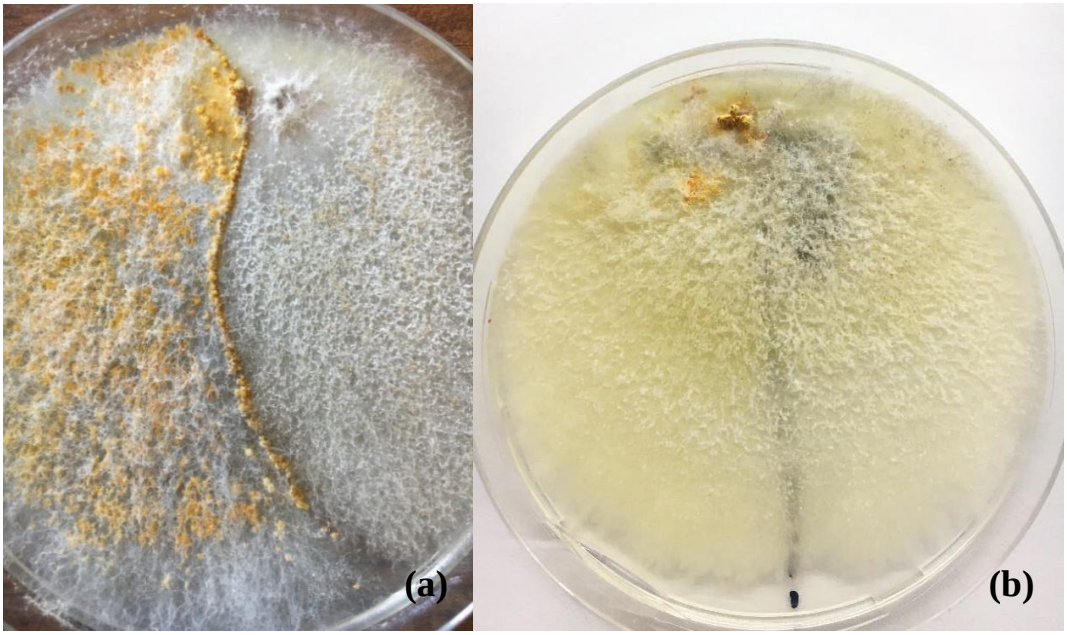
Şekil 3.5 hvep1 ve hvep2 primeleri kullanılarak *Cryphonectria parasitica*'nın total RNA'sından çoğaltılan *Cryphonectria hypovirus*'un ORFA bölgesi (391 bp) ve 12F ve 12R primerleri kullanılarak çoğaltılan virüsün ORFB bölgesi (741 bp). M: 100 bp DNA Ladder (Solis BioDyne, Tartu, Estonya), Hipovirülent izolatlar; KS04, AM03, Si02, KS01, BL13, BL01, BL09, Si04

3.5 *Cryphonectria parasitica*'nın Vejetatif Uyum ve Eşleşme (Mating) Tiplerinin Belirlenmesi

3.5.1 Morfolojik eşleştirmelerle uyum tiplerinin belirlenmesi

Kanserli kestane kabuk örneklerinden elde edilen *C. parasitica* izolatlarının vejetatif uyum tiplerinin belirlenmesi için izolatlar önce Avrupa uyum tipleri ile eşleştirilerek morfolojik özelliklere göre değerlendirilmiştir. Eşleştirmede Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research, WSL (İsviçre Federal Orman, Kar ve Peyzaj Araştırmaları Enstitüsü) fitopatoloji takım lideri Dr. Daniel Rigling'den temin edilen mevcut 64 Avrupa uyum tipi kullanılmıştır. Bu amaçla, PDAmb besi ortamında saf

olarak gelişen EU uyum tipi izolatlarından, steril bir iğne yardımıyla fungusun sporulasyon yaptığı kısımlardan bir miktar alınmış, yine PDAmb ortamında 2 mm aralıklarla, ilk olarak daha önce ülkemizde varlığı tespit edilmiş ve en yaygın bulunan EU-1 ve EU-12 vc tipleri ile eşleştirilmiştir. Burada uyum tipi anlaşılamayan izolatlar için EU-2, EU-5, EU-14 tester izolatları ile ayrıca eşleştirme yapılmıştır. Eşleştirilen izolatlar, 7 gün 25 °C karanlıkta inkübasyona bırakılmış ve 7 gün ise yaygın gün ışığında tutulmuştur. Eşleştirilen izolatlar arasında kuvvetli baraj ve sporulasyon zonları meydana getirenler veya sporulasyon oluşturmayıp sadece baraj zonları oluşturanlar uyumsuz, baraj zonları meydana getirmeyenler ise vejetatif uyumlu olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.6) (Anagnostakis *et al*. 1986, Bissegger *et al*. 1997). Vejetatif uyum çalışmaları 2 tekrarlı yapılmıştır.



Şekil 3.6 Hipovirülent izolatın (BU06) Avrupa tester izolatı EU-12 ile oluşturduğu baraj zonu (a), hipovirülent izolatın (BU06) EU-1 Avrupa tester izolatı ile baraj zonu oluşturmaması (b)

3.5.2 Vejetatif uyum ve mating tiplerinin moleküler markörler ile belirlenmesi

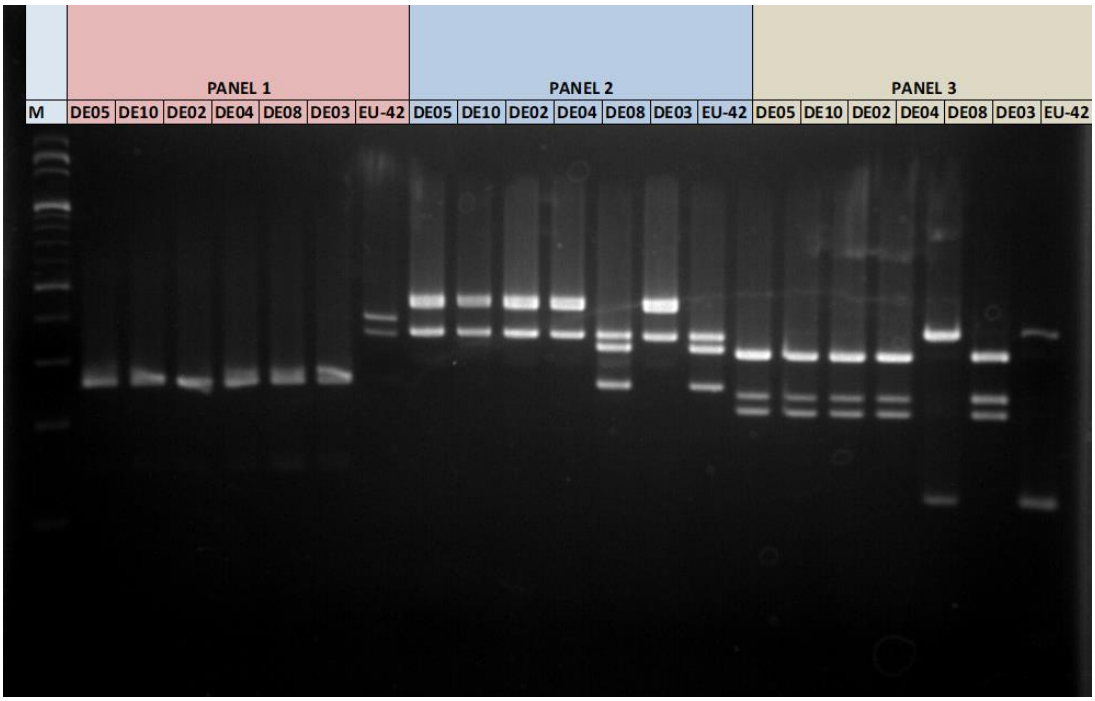
Çalışmanın bu aşamasında her bir *C. parasitica* izolatından DNA izolasyonu 3.2.3.1 Miselyum çoğaltımı ve DNA izolasyonu başlığında verildiği gibi yapılmıştır. PCR çalışmaları için elde edilen DNA steril saf su kullanılarak 4 ng/µl'ye seyreltilmiştir. Vc

tiplerini PCR'a dayalı belirlemek için vejetatif uyumsuzluğu belirleyen yedi *vic* lokusunu ve mating uyum tiplerini belirlemek için multiplex PCR, üç panelde gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu için, 15 µl eriyik içeriği 4 ng/µl genomik DNA, reaksiyon başına 0,5 µl primer (2,5 µM primer) (Çizelge 3.2), 2 µl su, 7,5 µl 1× Multiplex PCR Master (Jena Bioscience GmbH, Jena, Germany) kullanılmıştır. PCR çalışmaları bir T100 thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) kullanarak yapılmıştır. PCR koşulları, başlangıç denetürasyonu için 95 °C'de 12 dk, denatürasyon 95 °C'de 45 s, anneling 55 °C'de 45 s, extension 72 °C'de 1 dk ve final extension için 72 °C'de 10 dk, 34 döngü olarak yapılmıştır. İzolatların uyum tipleri Cornejo *et al*. (2019)'a göre DNA bantları değerlendirilerek tanımlanmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Multiplex PCR için kullanılan primer listesi (Cornejo *et al*. 2019)

Gen	Allel	Primer Adı	Primer Dizilimi (5'-3')	Hacim (µl)	Fragment Uzunluğu (bp)
vic1a	1	Cp-vic1a-1	F: ATAGCAAAAGCCACAACCAC	0,5	263
			R: AGCCAACATATACACTCCG	0,5	
	2	Cp-vic1a-2	F: TGCGACAGTCAAGGAAGATG	0,5	461
			R: ACGAGTGTCCTGCAAATTAA	0,5	
vic2	1	Cp-vic2-1	F: TGCGACGGATAAGGTGACTA	0,5	340
			R: TCGGTTGGCCTCGATATTG	0,5	
	2	Cp-vic2-2	F: TATACGGCAAAAGGGAGGG	0,5	448
			R: CTGGGAAGTCTTTGAGCAT	0,5	
vic3a	1	Cp-vic3a-1	F: CTGCAGACAACAACCGGTC	0,25	368
			R: GGGCACGACAAATGGCACT	0,25	
	2	Cp-vic3a-2	F: ACCGAAGACCACATGCGCAA	0,38	191
			R: AGGTTCCCCACCAGCGTCA	0,38	
MAT1-1-2	1	Cp- MAT1-1	F: ACATCAGTCGTGGAAATGAAAA	0,50	145
			R: ACATCACAAGTCGGCTCCCA	0,50	
MAT1-2-1	2	Cp- MAT1-2	F: AGGAATGTGATCTGTGGTGTTCT	0,59	400
			R: AATTTACTTTCACCGCGATTATG	0,59	
vic 4	1	Cp- vic4-1	F: CTTTCTTCTCCAACCTGCT	0,83	359
			R: TTCTTCTTCCGGCTTGCTT	0,83	
	2	Cp- vic4-2	F: GCCGAGTCATCCAAAGCAG	0,77	257
			R: GGGAGGCAGAATGGAAGAAA	0,77	
vic6	1	Cp- vic6-1	F: CTTTTGCCTGCGAGGTCTTTCC	0,54	381
			R: TCAGCTCTTCTTCCTGTACGTG	0,54	
	2	Cp- vic6-2	F: ATCCATGACCCTCTGCCAA	0,48	328
			R: CCAGCCACCGACTACTTTG	0,48	
vic7	1	Cp- vic7-1	F: TTGTCGAAAGGAACGCGGCT	0,64	128
			R: TTCTTCCTCTACCATCATCTGTGG	0,64	
	2	Cp- vic7-2	F: ACTTCAAACACGAATTCTGGC	0,77	225
			R: ACCATCTCCGTCTCGCATTCT	0,77	

PCR'dan elde edilen ürünler, 1× TAE buffer kullanılarak hazırlanan %1,5'lik agaroz jelde 80 V'da 30 dk koşturulmuş ve ethidyum bromürde ortalama 15-20 dk kadar boyanması beklenmiş ve jel görüntüleme cihazı (G:Box F3, Syngene, Cambridge, İngiltere) ile oluşan bantlar gözlemlenerek EK-1'de verilen değerlendirme skalasına göre izolatların uyum tipleri belirlenmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 *Cryphonectria parasitica*'nın vejetatif uyumsuzluğunu belirleyen 6 *vic* lokusunun, 3 panelde gerçekleştirilen PCR çalışmalarının jel elektroforez görüntüsü (M: Marker; 1. Panel: *vic 4* (257 bp)+ MAT (145 bp), 2. Panel *vic1* (461 bp)+ *vic2* (448 bp)+ *vic3* (368 bp), 3. Panel *vic6* (328 bp)+ *vic7* (225 bp); DE: Denizli izolatları, EU-42: Avrupa uyum tipi)

3.6 *Cryphonectria parasitica* İzolatındaki Hipovirüs'ün (CHV) Allel Farklılığı Olan İzolatlara Vejetatif Yolla Aktarılması

Bu çalışma ile elimizde bulunan EU-1 uyum tipinde yer alan 10 farklı hipovirülent izolatlarda bulunan hipovirüs sadece bir allel farklılığı olan Avrupa uyum tiplerine transfer edilmiştir. Ayrıca EU-1 uyum tipinde bulunan hipovirülent bir izolattan Avrupa uyum tipi EU-12 izolatına hipovirüs aktarımı aşamalı bir şekilde transfer edilmiştir.

Cortesi and Milgroom (1998)'a göre; EU-1'in allelleri 2212-22'dir. EU-12 için ise 1112-11'dir.

3.6.1 Avrupa uyum tipi EU-1'deki hipovirüsün bir allel farklılık gösteren diğer Avrupa uyum tiplerine aktarımı

Türkiye'de yapılan çalışmalarda doğal olarak sadece EU-1 uyum tipinde hipovirülent izolat tespit edilmiştir. İzolasyonlardan elde ettiğimiz hipovirülent izolatlardan besi ortamında koloni gelişimine göre, koloni rengi tamamen beyaz olan, kolonin kenar gelişimi düzenli ve yoğun spor verebilen EU-1 uyum tipinde olan 10 hipovirülent izolat seçilmiştir. İlk olarak PDAmb ortamında geliştirilen Avrupa uyum tipi EU-1'den 1 allel fark bulunan Avrupa uyum tiplerine (EU-2, EU-3, EU-5, EU-7, EU-26 ve EU-44) (Çizelge 3.3) PDAmb kültürlerinden steril iğne ile sporulasyon yapan kısımdan bir miktar alınmış, yine PDAmb ortamında geliştirilen 1 allel fark bulunan doğal hipovirülensliğin görüldüğü farklı bölgelerden elde edilen 10 hipovirüslü izolatla (EU-1) ayrı petri kaplarında 1 mm aralıklarla öncelikle eşleştirilmiş ve 10 gün karanlıkta 5 gün ise diffuze yani yansıyan gün ışığında tutulmuştur (Anagnostakis *et al.* 1986, Bissegger *et al.* 1997). Virüs aktarım çalışmaları 2 tekrarlı yapılmıştır. Çalışmada hipovirüsün geçişinde başarı sağlanamayan EU-2 ve EU-7 Avrupa uyum tiplerine ise virüs aktarım çalışmaları 10 tekrarlı yapılmıştır.

Çizelge 3.3 EU-1 Avrupa uyum tipinden bir allel farklı olan hipovirüs aktarımı yapılan tester izolatlar

EU Tipi	***vic1a***	***vic2***	***vic3a***	***vic4***	***vic6***	***vic7***
EU-1	**2**	**2**	**1**	**2**	**2**	**2**
EU-2	2	1	1	2	2	2
EU-3	2	2	1	2	1	2
EU-5	2	2	1	1	2	2
EU-7	2	2	1	2	2	1
EU-26	1	2	1	2	2	2
EU-44	2	2	2	2	2	2

3.6.2 Avrupa uyum tipi EU-1 hipovirülent izolatından, EU-12 Avrupa uyum tipine hipovirüs aktarımı

Virüs aktarımı çalışmasında EU-1 Avrupa uyum tipinde yer alan hipovirülent BU06 izolatı donör olarak kullanılmış ve aşamalı olarak bir allel farklılık gösteren uyum tiplerine sırası ile (Çizelge 3.4) BU06 izolatında bulunan hipovirüs 3.6.1 Avrupa uyum tipilerinden EU-1 deki hipovirüsün bir allel farklılık gösteren diğer Avrupa uyum tiplerine aktarımı başlığında belirtildiği gibi aktarılmıştır.

Çizelge 3.4 EU-12 Avrupa uyum tipine aşamalı virüs aktarımı

Hipovirüs Transferi için Aktarım Sırası	**EU-12 VC Tipine CHV1'in Aşamalı Transferi**				
	EU-1*	EU-3	EU-30	EU-29	EU-12
	2212-22	2212-12	1212-12	1112-12	1112-11

*EU-1= BU06 hipovirülent izolat

3.6.3 Hipovirüs aktarımı yapılan izolatların phenol oxidase enzim aktivitesi (Bavendamm Testi) ile belirlenmesi

Virüs aktarımı yapılan izolatların kontrolü için, hipovirüsün aktarıldığı düşünülen toplamda 200 *C. parasitica* izolatı 3.3.1 Phenol oxidase enzim aktivitesi (Bavendamm Testi) başlığında verildiği gibi uygulamaya tabi tutulmuştur.

3.6.4 Virüs aktarımının moleküler yollarla belirlenmesi

3.3.2.1 Miselyum çoğaltımı ve total RNA izolasyonu ve 3.3.2.2 cDNA sentezi ve PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) başlıklarında belirtildiği gibi aynı işlemler uygulanmıştır.

3.7 *Cryphonectria parasitica* İzolatları İçerisindeki Tür İçi Genetik Varyasyonlarının Belirlenmesi

3.7.1 İzolatlar içerisindeki genetik varyasyonun iPBS veya SCoT moleküler markör teknikleri ile belirlenmesi

3.7.1.1 iPBS retrotransposon markörleri ile DNA amplifikasyonu

Cryphonectria parasitica izolatları arasında tür içi polimorfizmi belirlemek amacıyla Kalendar *et al.* (2010) tarafından dizayn edilen ve evrensel olarak belirtilen 13 iPBS retrotranspozon DNA moleküler markörleri kullanılmıştır (Çizelge 3.5). Bu amaçla 2 izolat seçilmiş (BU01 ve DE13) olup, seçilen 13 markörle primer denemeleri yapılmıştır. PCR karışımı 1× reaction buffer, 1,25 unit Dream *Taq* DNA polymerase (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, ABD), 0,2 mM dNTPs, 0,8 µM primer,4 ng DNA ve steril su ile 25 µl'ye tamamlanmıştır. PCR koşulu, başlangıç denatürasyonu 95 °C'de 4 dk denatürasyon, 30 döngü olarak 95 °C'de 15 s, anneling 50-65 °C'de 1 dk (primere bağlı olarak değişmek üzere), extension 68 °C'de 1 dk ve 72 °C'de 5 dk final extension ile tamamlanmıştır. iPBS analizleri için elde edilen PCR ürünleri 1× TAE tampon çözeltisi kullanılarak %1,6 (w/v)'lik agaroz jelde yürütülmüş ve etidyum bromür ile boyanarak, UV altında jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

Çizelge 3.5 *Cryphonectria parasitica* izolatları içerisindeki genetik varyasyonun iPBS moleküler markör teknikleri ile belirlenmesi için kullanılan primer listesi

iPBS Primer ID	Primer Dizilimi (5'-3')	Çalışılan Annealing Sıcaklığı (°C)	GC Oran (%)
2389	ACATCCTTCCCA	50	50,0
2393	TACGGTACGCCA	50	58,3
2277	GGCGATGATACCA	50	53,8
2395	TCCCCAGCGGAGTCGCCA	66	72,2
2219	GAACTTATGCCGATACCA	52	44,4
2237	CCCCTACCTGGCGTGCCA	65	72,2
2077	CTCACGATGCCA	50	58,3
2271	GGCTCGGATGCCA	55	69,2
2415	CATCGTAGGTGGGCGCCA	62	66,7
2390	GCAACAACCCCA	50	58,3
2239	ACCTAGGCTCGGATGCCA	60	61,1
2386	CTGATCAACCCA	50	50,0
2395	TCCCCAGCGGAGTCGCCA	66	72,2

3.7.1.2 SCoT markörleri ile DNA amplifikasyonu

Tür içi polimorfizmi belirlemek için, Collard and Mackill (2009) tarafından dizayn edilen 14 SCoT DNA moleküler markörleri kullanılmıştır (Çizelge 3.6). Bu amaçla 2 izolat seçilmiş (BU01 ve DE13) olup, seçilen 14 markörle primer denemeleri yapılmıştır.

PCR karışımları 1× reaction buffer, 0,8 µM primer, 0,8 unit Dream *Taq* DNA polymerase, 5 mM dNTPs ve 4 ng DNA, steril su ile 25 µl'ye tamamlanmıştır. PCR koşulu; başlangıç denatürasyonu 94 °C'de 3 dk, denatürasyon 94 °C'de 60 s, anneling 50 °C'de 1 dk, extension 72 °C'de 2 dk ve final extension 72 °C'de 5 dk, 35 döngü olarak yapılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri 1× TAE tampon çözeltisi kullanılarak %1,6 (w/v)'lik agaroz jelde yürütülmüş ve etidyum bromür ile boyanarak, UV altında jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

Çizelge 3.6 *Cryphonectria parasitica* izolatları içerisindeki genetik varyasyonun SCoT moleküler markör teknikleri ile belirlenmesi için kullanılan primer listesi

SCOT Primer ID	**Primer Dizilimi (5'-3')**	**Çalışılan Annealing Sıcaklığı (°C)**	**GC Oran (%)**
12	ACGACATGGCGACCAACG	50	61,1
16	ACCATGGCTACCACCGAC	50	55,5
17	ACCATGGCTACCACCGAG	50	61,1
18	ACCATGGCTACCACCGCC	50	66,6
20	ACCATGGCTACCACCGCG	50	66,6
21	CACCATGGCTACCACCAT	50	55,5
24	CACCATGGCTACCACCAT	50	55,5
26	ACCATGGCTACCACCGTC	50	61,1
28	CCATGGCTACCACCGCCA	50	66,6
29	CCATGGCTACCACCGGCC	50	72,2
31	CCATGGCTACCACCGCCT	50	67,0
32	CCATGGCTACCACCGCAC	50	67,0
33	CCATGGCTACCACCGCAG	50	61,1
34	ACCATGGCTACCACCGCA	50	72,2

4. BULGULAR

4.1 Kestane Kanseri Örneklerinden Elde Edilen *Cryphonectria parasitica* İzolatları

4.1.1 Kültürel özelliklerine göre tanı

On üç ilden elde edilen 215 kanserli kabuk örneğinden yapılan izolasyonda spor şekli, özellikleri ve spor boylarına göre 183 adet *Cryphonectria parasitica* izolatı elde edilmiştir (Çizelge 4.1). Bu izolatların besi ortamında oluşturmuş olduğu koloni pigment rengine göre ilk değerlendirme yapılmıştır. Besi ortamında gelişen *C. parasitica* izolatları arasında, turuncu renk gelişim gösterenler "virülent", renk oluşumunun azalması, beyaz veya krem rengi gelişim gösterenler ise "hipovirülent" izolat olarak ayrılmıştır (Bissegger *et al*. 1997). Turuncu renk gelişim gösteren 143 adet, beyaz renk gelişim gösteren 40 adet izolat eğik agarda saklamaya alınmıştır. İzolatların bazılarında *C. parasitica* ile gelişen farklı funguslar, bazılarında ise *C. parasitica* dışında fungal gelişmeler (*Pestalotiopsis* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Diplodina castaneae*) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1 Örnek alınan iller ve çalışmada elde edilen izolatların dağılımı

Örnek Alınan İller ve İllere Verilen Kod	Kabuk Örneği Sayısı	İzolat Sayısı
Aydın (AY)	20	20
Bursa (BU)	15	6
Çanakkale (ÇK)	25	22
Denizli (DE)	15	14
Düzce (BL)	20	18
İzmir (İZ)	25	24
Kastamonu (KS)	15	11
Kütahya (KT)	15	15
Manisa (MN)	10	10
Samsun (AM)	15	11

Çizelge 4.1 Örnek alınan iller ve çalışmada elde edilen izolatların dağılımı (Devam)

Örnek Alınan İller ve İllere Verilen Kod	Kabuk Örneği Sayısı	İzolat Sayısı
Sinop (Sİ)	15	7
Yalova (YL)	10	10
Zonguldak (ZN)	15	15
Total	**215**	**183**

4.1.2 Ribozomal DNA'nın ITS bölgesine dayalı tanı

Cryphonectria parasitica izolatlarının tür teşhisi için, İzmir (İZ), Kütahya (KT), Samsun (AM) ve Denizli (DE) illerine ait seçilen 1'er izolat olmak üzere toplamda 4 izolat (AM04, DE13, İZ03 ve KT04) kullanılmıştır. İzolatlar için, universal primer setleri olan ITS-1/ITS-4 (White *et al.* 1990) kullanılarak ITS bölgesi amplifiye edilmiş ve tür teşhisleri yapılmıştır (Çizelge 4.2). Dört izolatın *C. parasitica* olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2 *Cryphonectria parasitica* izolatlarının ribozomal DNA'nın ITS bölgesine dayandırılarak tür teşhisi yapılan örnekler

Örnek No	İzolat	GenBank Erişim Numarası	%100 benzerlik Gösteren İzolatların GenBank Erişim Numaraları
1	AM04	OM833060	KF220299, JN942325
2	DE13	OM833061	
3	İZ03	OM833062	
4	KT04	OM833063	

4.2 *Cryphonectria parasitica* İzolatlarında Hipovirülensliğin Dağılımı

İzolasyonlar sonucunda, kabuk örneği toplanan 5 ilde (Aydın, Denizli, İzmir, Manisa ve Kütahya) hipovirülent izolat tespit edilmemiştir. Bursa, Düzce, Çanakkale, Kastamonu, Samsun, Sinop, Yalova ve Zonguldak olmak üzere 8 ilden toplam 100 *C. parasitica* izolatı elde edilmiş olup bu izolatların 40 adedi kültürel özelliklerine (beyaz

renkli koloni gelişimi) göre hipovirülent olarak değerlendirilmiş ve bu izolatların hipovirülensliği diğer yöntemlerle de kontrol edilmiştir. Virülent kontrol izolatı olarak daha önce çalışmalarda elde ettiğimiz ZN14 izolatı kullanılmıştır.

4.2.1 Phenol oxidase enzim aktivitesi (Bavendamm Testi) ve moleküler test sonuçlarına göre dağılım

Fenotipik özelliklerine göre hipovirülent olarak değerlendirilen 40 adet izolatın Bavendamm testinde 31'i (%77,5) zayıf renkli koloni oluşumu nedeniyle hipovirülent, 9'u (%22,5) ise koyu renkli koloni oluşturduğu için virülent olarak değerlendirilmiştir. Bavendamm testine tabi tutulan 40 izolat sonuçları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Cryphonectria hypovirus'un varlığını moleküler yöntemlerle belirlemek amacıyla, 40 izolatta virüsün iki gen bölgesi ORFA ve ORFB'ye bakılmıştır. Tüm hipovirülent izolatlar üzerinde yapılan *Cryphonectria hypovirus'*un moleküler olarak tespiti çalışmasında 35 hipovirülent izolatta virüsün iki gen bölgesi ORFA ve ORFB, 1 izolatta virüsün tek gen bölgesi ORFB tespit edilmiş olup, 4 izolatta virüsün iki gen bölgesi de tespit edilmemiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Sekiz bölgeden elde edilen hipovirülent izolatların karakterizasyonu

Örnek No	İller	İzolat Kodları	Kültür Rengi	Bavendamm Test	PCR ORFA hvep1-2 391 kb	PCR ORFB 12F-R 741 kb
1	Samsun	AM 01	Krem	Zayıf	+	+
2		AM 02	Krem	Zayıf	+	+
3		AM 03	Krem	Zayıf	+	+
4		AM 04	Krem	Zayıf	+	+
5		AM 05	Beyaz	Zayıf	+	+
6		AM 06	Krem	Zayıf	+	+

Çizelge 4.3 Sekiz bölgeden elde edilen hipovirülent izolatların karakterizasyonu (Devam)

Örnek No	İller	İzolat Kodları	Kültür rengi	Bavendamm test	PCR ORFA hvep1-2 391 kb	PCR ORFB 12F-R 741 kb
7	Düzce	BL01	Beyaz	Zayıf	+	+
8		BL02	Krem	Zayıf	+	+
9		BL03	Beyaz	Zayıf	+	+
10		BL08	Krem	Zayıf	+	+
11		BL09	Krem	Zayıf	+	+
12		BL10	Krem	Zayıf	-	-
13		BL13	Krem	Kuvvetli	+	+
14		BL14	Krem	Zayıf	+	+
15		BL16	Beyaz	Kuvvetli	-	-
16		BL17	Krem	Zayıf	+	+
17		BL18	Beyaz	Kuvvetli	-	-
18	Bursa	BU02	Beyaz	Kuvvetli	-	-
19		BU06	Beyaz	Zayıf	+	+
20	Çanakkale	ÇK01	Beyaz	Zayıf +Kuvvetli	+	+
21	Kastamonu	KS01	Krem	Zayıf	+	+
22		KS03	Beyaz	Zayıf	+	+
23		KS04	Beyaz	Zayıf +Kuvvetli	+	+
24		KS07	Krem	Zayıf	+	+
25		KS09	Krem	Zayıf	+	+
26		KS10	Krem	Zayıf	+	+
27		KS11	Krem	Zayıf	+	+
28	Yalova	YL01	Krem	Zayıf	+	+
29		YL09	Krem	Kuvvetli	+	+
30		YL10	Krem	Kuvvetli	+	+
31	Sinop	Sİ01	Beyaz	Kuvvetli	+	+
32		Sİ02	Krem	Kuvvetli	+	+
33		Sİ03	Krem	Zayıf	+	+
34		Sİ04	Beyaz	Kuvvetli	+	+
35		Sİ05	Krem	Zayıf	+	+
36		Sİ07	Beyaz	Zayıf	+	+

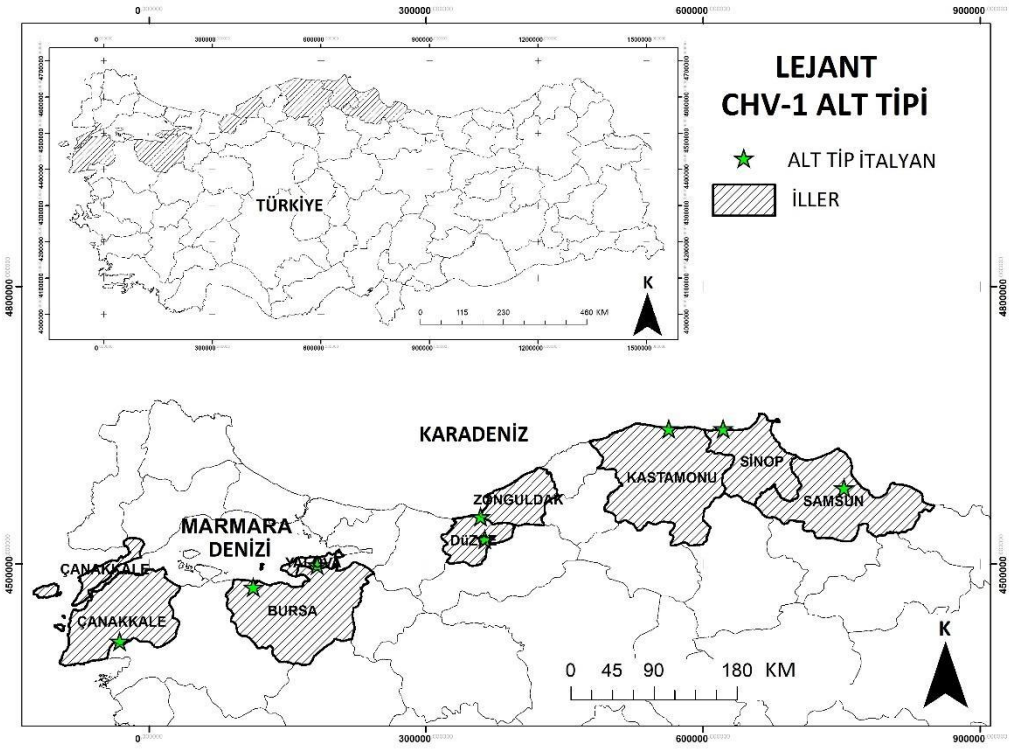
Çizelge 4.3 Sekiz bölgeden elde edilen hipovirülent izolatların karakterizasyonu (Devam)

Örnek No	İller	İzolat Kodları	Kültür rengi	Bavendamm test	PCR ORFA hvep1-2 391 kb	PCR ORFB 12F-R 741 kb
37	Zonguldak	ZN02	Beyaz	Zayıf	+	+
38		ZN04	Beyaz	Zayıf +Kuvvetli	+	+
39		ZN10	Krem	Zayıf	-	+
40		ZN12	Beyaz	Zayıf	+	+
*41		ZN14	Turuncu	Kuvvetli	-	-

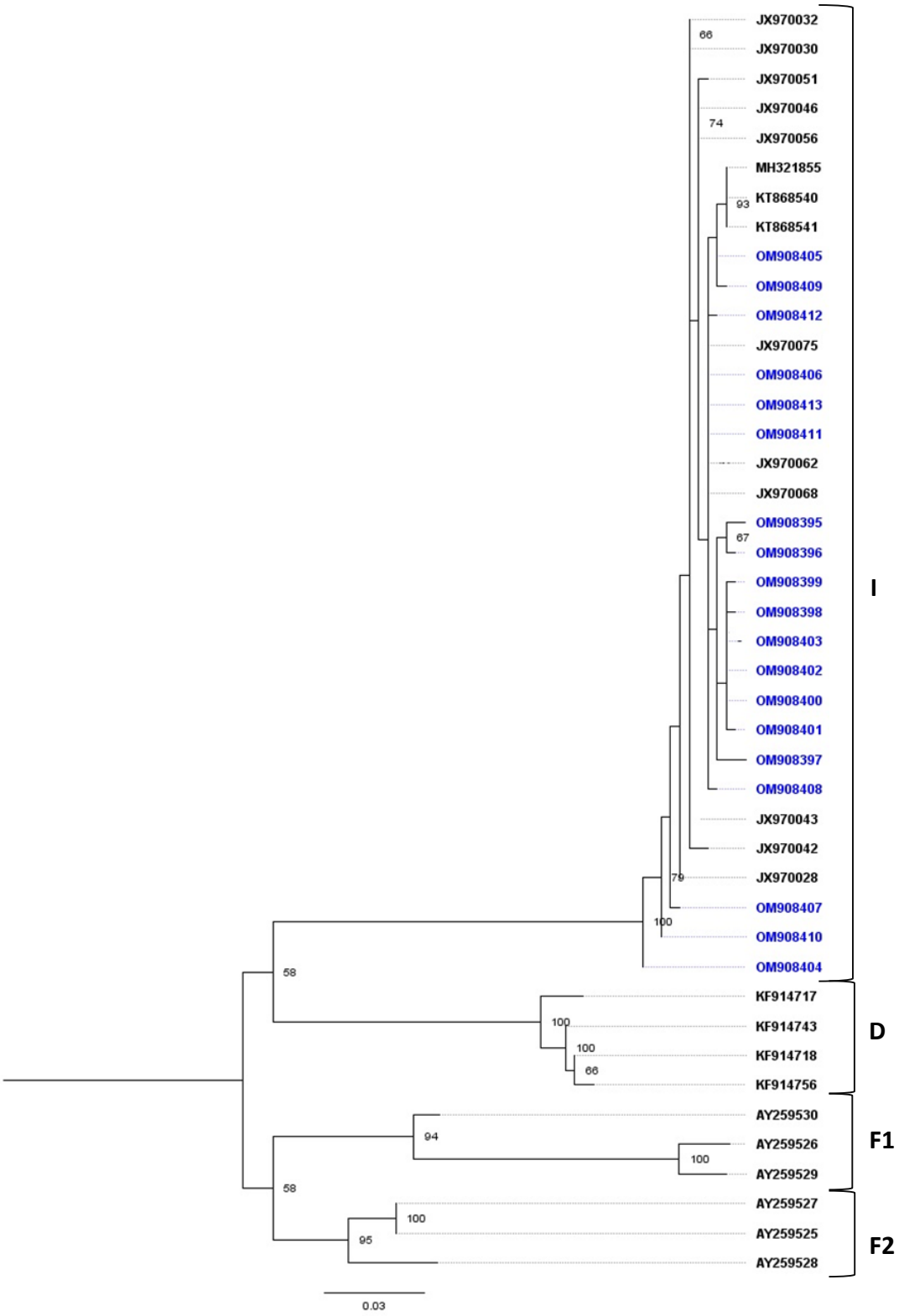
*ZN14: Pozitif kontrol

4.3 CHV1'in Alt Tipi Tespiti ve Dağılımı

Virüsün alt tiplerinin belirlenmesi amacıyla toplamda 19 izolat; AM01, AM02, AM03, AM04, AM05, AM06, BL01, BL03, BU06, ÇK01, KS01, KS04, KS07, Sİ02, Sİ03, YL01, YL09, ZN04, ZN12 sekanslatılmıştır. Bu izolatların hepsinin İtalyan - CHV1 alt tipinde (Subtype I) olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2). İzolatlara ait GenBank erişim numaraları ve benzerlik gösterdiği izolatlara ait bilgiler EK-2'de verilmiştir.



Şekil 4.1 Hipovirülent *Cryphonectria parasitica* izolatlarının toplandığı iller ve *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV1)'in İtalyan alt tip dağılımı



Şekil 4.2 CHV1'in ORFA bölgesine dayandırılarak, IQ-TREE kullanılarak Maximum-Likelihood ve Ultra-Fast bootstrap metotu ile oluşturulan filogenetik ağaç (Mavi renkte belirtilen bu çalışmada elde edilen CHV1 izolatları için GenBank'tan sağlanan erişim numaraları. I: Italian subtype, F: French subtype, D: German subtype)

4.4 *Cryphonectria parasitica* İzolatlarının Uyum ve Mating Tipleri

4.4.1 Klasik yöntemler kullanılarak belirlenen vc uyum tipleri

İncelenen 183 izolatın laboratuvar çalışmaları yürütülmüş ve klasik kültürde eşleştirme yöntemi ile ilk olarak ülkemizde en yaygın vc uyum tipi olan EU-1 ve EU-12 ile eşleştirme yapılmıştır. Bu yöntemle yapılan tespitlerde 19 adet izolatın uyum tipi tespit edilememiştir. Bu izolatlar öncelikle ülkemizde daha önce tespit edildiği literatürlerde bildirilen uyum tipleri (EU-2, EU-5, EU-14) ile eşleştirilmiş ancak uyum tipi tespiti yapılamamıştır. Bunun dışındaki 164 izolatın 135 adedi EU-1 (%82,32) Avrupa uyum tipi, 29 adedi ise EU-12 (%17,68) Avrupa uyum tipi olarak belirlenmiştir (EK-3).

4.4.2 Moleküler yöntemler kullanılarak belirlenen vc uyum ve mating tipleri

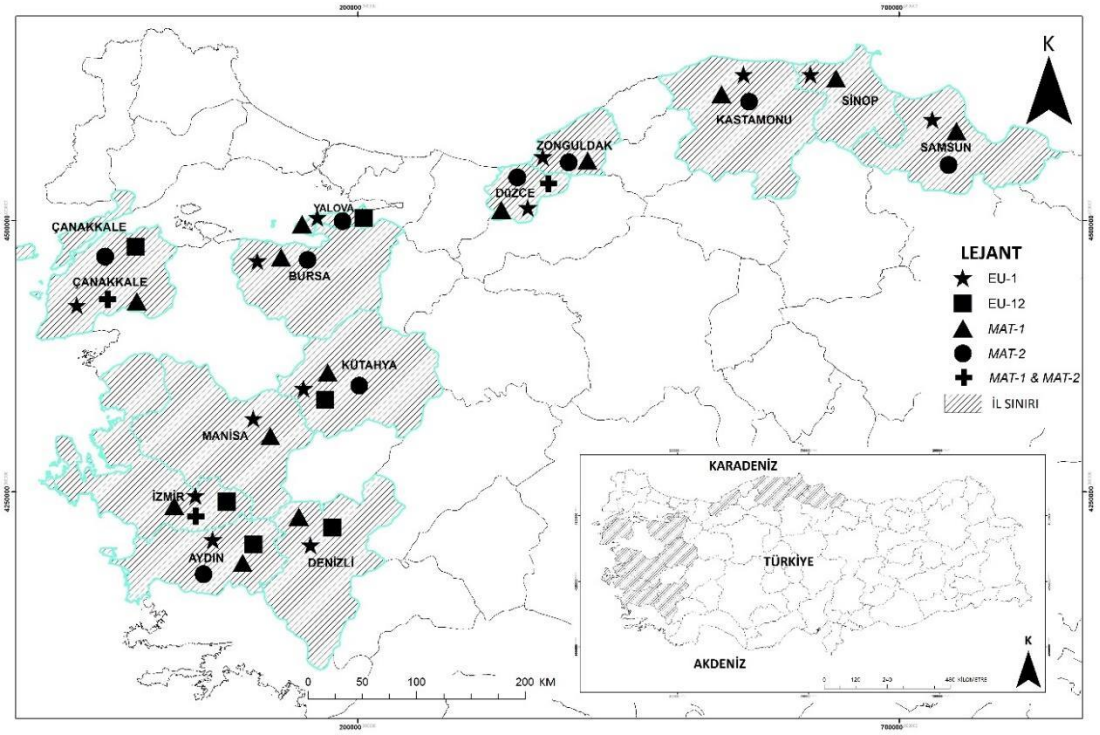
İzole edilen 183 izolatın moleküler yöntemle yapılan Avrupa uyum tipi tespit çalışmasında (Şekil 4.3) izolatların 149 adedi EU-1 (%81,42), 34 adedi ise EU-12 (%18,58) Avrupa uyum tipi olarak belirlenmiştir (EK-4'te detaylı olarak verilmiştir).

İllere göre uyum tipleri Bursa, Düzce, Kastamonu, Manisa, Samsun, Sinop ve Zonguldak illerinde tek bir Avrupa uyum tipi EU-1 tespit edilmiştir. Aydın, Çanakkale, Denizli, İzmir, Kütahya ve Yalova illerinde iki Avrupa uyum tipi EU-1 ve EU-12 tespit edilmiştir.

Moleküler yöntemlerle, 183 izolatın mating tipi tespit çalışmasında 134 adedi (%73,2) MAT-1, 44 adedi (%24) MAT-2 ve 5 izolatta ise (%2,8) iki Mating uyum tipi (MAT-1 ve MAT-2) birarada görülmüştür (EK-4).

Mating tip dağılımı Denizli, İzmir, Manisa ve Sinop için tek bir eşleşme tipi MAT-1 tespit edilmiştir. Aydın, Bursa, Çanakkale, Düzce, Kastamonu, Kütahya, Samsun, Yalova ve Zonguldak için ise iki eşleşme tipi MAT-1 ve MAT-2 tespit edilmiştir.

Ayrıca Çanakkale, Düzce ve İzmir'de ise iki eşleşme tipi aynı izolatta tespit edilmiştir (Şekil 4.3, Çizelge 4.4).



Şekil 4.3 *Cryphonectria parasitica* izolatlarının toplandığı iller ve illere göre vejetatif uyum ve mating eşleşme tip dağılımı

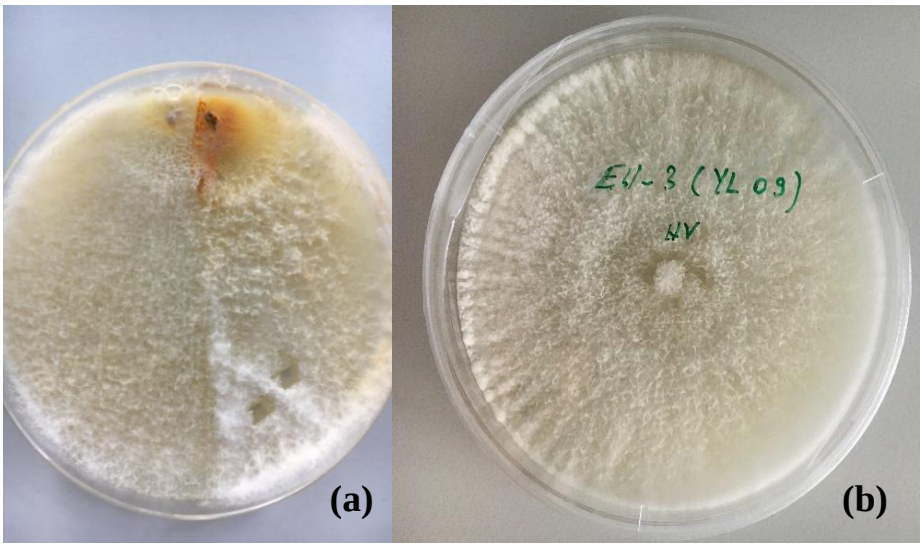
Çizelge 4.4 *Cryphonectria parasitica*'nın bölgelere göre uyum ve mating (eşleşme) tip dağılımı

Örnek Alınan İller	İzolat sayısı	VC Type		Mating Type			
				EU-1		EU-12	
		EU-1	EU-12	MAT1	MAT2	MAT1	MAT2
Aydın (AY)	20	10	10	8	1	11	-
Bursa (BU)	6	6	-	4	2	-	-
Çanakkale (ÇK)*	22	21	1	17	1	-	1
Denizli (DE)	14	10	4	10	-	4	-
Düzce (BL)*	18	18	-	7	10	-	-
İzmir (İZ)*	24	8	16	8	-	15	-
Kastamonu (KS)	11	11	-	5	6	-	-
Kütahya (KT)	15	13	2	8	5	2	-
Manisa (MN)	10	10	-	10	-	-	-
Samsun (AM)	11	11	-	9	2	-	-
Sinop (Sİ)	7	7	-	7	-	-	-
Yalova (YL)	10	9	1	4	5	1	-
Zonguldak (ZN)	15	15	-	4	11	-	-
Total	**183**	**149**	**34**	**101**	**43**	**33**	**1**

***Çanakkale (ÇK), Düzce (BL) ve İzmir (İZ) illeri heterokaryon izolatlara sahiptir.

4.5 *Cryphonectria parasitica*'nın Virülent İzolatlarına Hipovirüs Aktarım Sonuçları

Çalışmada hipovirüs aktarımı için kullanılan hipovirülent izolatlar, sporulasyonu çok ve koloni rengi beyaz olan hipovirülent izolatlardan seçilmiştir. Avrupa uyum tiplerinden EU-1'e giren ve CHV1 subtype I altipi virüs içeren 10 hipovirülent izolat, Samsun (AM03, AM04), Düzce (BL01, BL03), Bursa (BU06), Çanakkale (ÇK01), Kastamonu (KS01), Sinop (Sİ02), Yalova (YL09) ve Zonguldak (ZN04) kullanılmıştır. Daha önce Cortesi and Milgroom (1998) göre allel farklılığı tespit edilmiş olan Avrupa uyum tipi EU-1'den 1 allel farklı olan; virülent EU-2, EU-3, EU-5, EU-7, EU-26 ve EU-44 Avrupa uyum tiplerine bu hipovirülent izolatlarla kültürde eşleştirme yapılarak CHV1 (subtype I) hipovirüsü (Şekil 4.4a) aktarılmıştır. 10 EU-1/hipovirülent izolatla eşleşen 6 farklı uyum tipindeki virülent izolat eşleştirildikten 4 gün sonra hifler kaynaşmaya başlamıştır. Renk değişimi ise ortalama 10 günde gözlenmiştir. Her iki izolatın birleşim yerinin virülent izolata yakın beyaz renkli gelişim gösteren tarafından bir parça alınarak steril PDA besi ortamına aktarılmıştır. Bu parçalardan besi ortamında beyaz renkli gelişim görülmüştür (Şekil 4.4b).



Şekil 4.4 EU-1 (YL09) hipovirülent izolatından (a), Avrupa uyum tiplerine (EU-3) virüs aktarımı (b)

4.5.1 Bavendamm testi sonuçları

Hipovirüs aktarımı denemesinde kullanılan 10 farklı hipovirülent izolatın (AM03, AM04, BL01, BL03, BU06, ÇK01, KS01, Sİ02, YL09 ve ZN04) Avrupa uyum tiplerine (EU-2, EU-3, EU-5, EU-7, EU-26 ve EU-44) aktarımı farklılık göstermiştir (Çizelge 4.5).

Hipovirüs aktarımı çalışması sonucunda kullanılan EU-1 tipinden üç hipovirülent izolattan (AM03, BL01, YL09), sadece EU-3, EU-5, EU-26 ve EU-44 tester izolatlarına fenotipik olarak virüs aktarımı sağlandığı gözlenmiştir. Kültür rengi beyaz geliştiği için hipovirüsün aktarıldığı düşünülen bu izolatlar, Bavendamm (phenol oxidase reaksiyonunda) testinde de zayıf reaksiyon göstermiştir.

Amasya iline ait diğer bir hipovirülent izolattan (AM04) sadece EU-3 ve EU-5 tester izolatlarına hipovirüs aktarımı gerçekleşmiştir. Tester izolatlar beyaz renge dönüşmüş ve Bavendamm testinde de zayıf bir reaksiyon göstermiştir.

Diğer altı hipovirülent izolattan (BL03, BU06, ÇK01, KS01, Sİ02, ZN04) ise sadece EU-3, EU-5 ve EU-26 tester izolatlarına virüs aktarımı sağlanmıştır. Fenotipik olarak da bu tester izolatlar değerlendirildiğinde beyaz renk dönüşümü sağlanmış olup Bavendamm testinde de zayıf bir koloni renk gelişimi görülmüştür (EK-5).

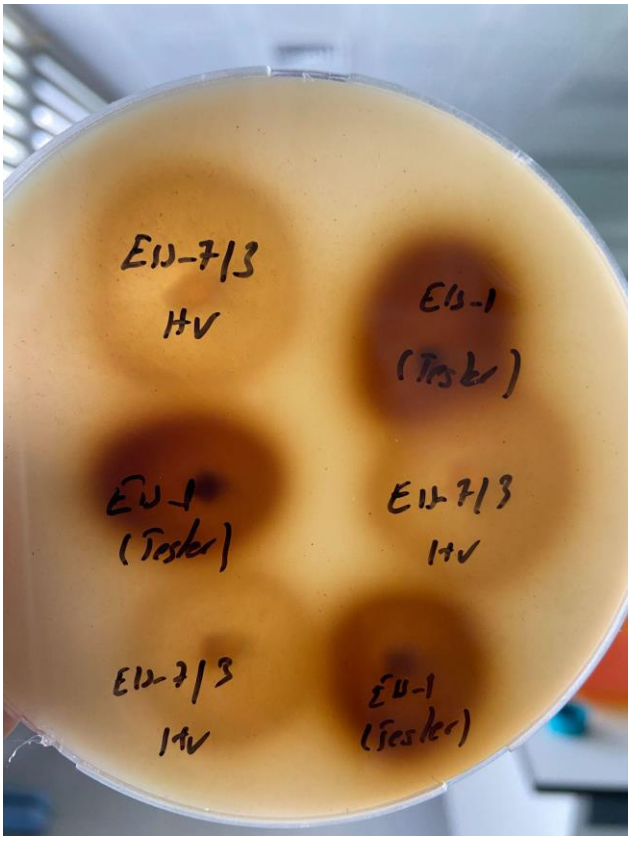
EU-2 ve EU-7 tester izolatlarına iki tekrarlı çalışmalarda, 10 hipovirülent izolatın hiçbirinden hipovirüs aktarımı gerçekleşmemiş olup, dönüşüm sağlamamış ve Bavendamm testinde de kuvvetli bir reaksiyon göstermiştir.

Çizelge 4.5 Hipovirüs aktarımı yapılan hipovirülent izolatların, altı farklı Avrupa uyum tipine virüs geçişleri

Örnek No	CHV1'in Aktarımı için Kullanılan Hipovirülent İzolatlar	Avrupa Vejetatif Uyum Tipleri (EU-1 uyum tipinden allel farklılıkları)						Virüs Aktarımın Yapıldığı Avrupa Uyum Tipi Sayısı
		EU-2 (*vic2*)	EU-3 (*vic6*)	EU-5 (*vic4*)	EU-7 (*vic7*)	EU-26 (*vic1*)	EU-44 (*vic3*)	
1	AM03	-*	+**	+	-	+	+	4/6
2	AM04	-	+	+	-	-	-	2/6
3	BL01	-	+	+	-	+	+	4/6
4	BL03	-	+	+	-	+	-	3/6
5	BU06	-	+	+	-	+	-	3/6
6	ÇK01	-	+	+	-	+	-	3/6
7	KS01	-	+	+	-	+	-	3/6
8	Sİ02	-	+	+	-	+	-	3/6
9	YL09	-	+	+	-	+	+	4/6
10	ZN04	-	+	+	-	+	-	3/6
CHV1'in transfer edildiği izolat sayıları		0	10	10	0	9	3	

Bu çalışmada kullanılan 10 adet hipovirülent izolatla hipovirüs aktarımı yapılamayan tester izolatlar EU-2 ve EU-7 için tekerrür sayısı arttırılarak yeniden eşleştirmeler yapılarak denenmiştir. Bu amaçla, aktarım çalışmasında kullanılan izolatlardan biri olan BU06 izolatı donör olarak seçilmiş ve bu defa 10 tekürrülü olarak EU-2 ve EU-7 tester izolatlarıyla eşleştirilmiştir. BU06'dan EU-2'ye hipovirüs aktarmada 10 tekerrürlü yapılan çalışmada 2 tekerrürde hipovirüs aktarımının olduğu düşünülen beyaz renk gelişimi görülmüştür. Tüm tekerrürlerden alınan fungus parçasından gelişen kültürden yapılan Bavendamm testinde 4 izolat zayıf bir reaksiyon göstermiş ve hipovirülent olarak değerlendirilmiştir. BU06'dan, EU-7'ye hipovirüs aktarım çalışmasında 10 tekerrürün 3'ünde hifler arasında hipovirüs geçişi morfolojik değerlendirmede başarılı görülmüştür.

Bu 10 tekerrüden elde edilen 10 izolattan Bavendamm testinde 4 izolat zayıf bir reaksiyon göstermiş ve hipovirülent olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.5, Çizelge 4.6).



Şekil 4.5 EU-7 Avrupa uyum tipine hipovirüs aktarımının sağlandığı ve Bavendamm testinde zayıf reaksiyon gösteren izolat

Çizelge 4.6 EU-2 ve EU-7 tester izolatlarına hipovirüs aktarımı

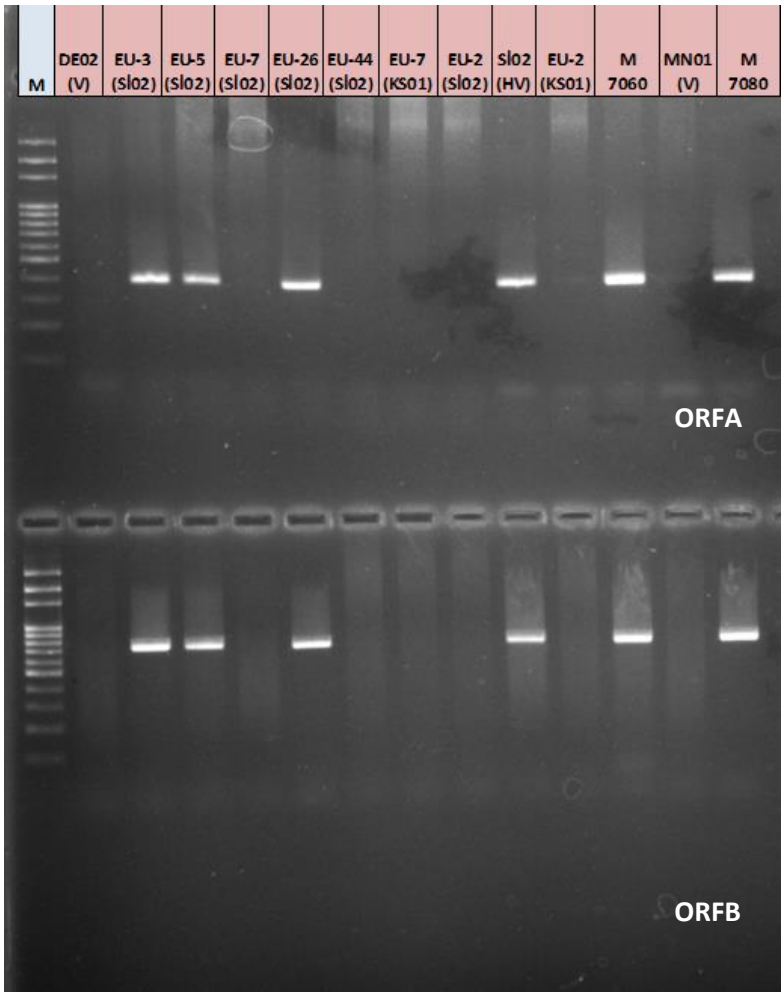
Hipovirülent İzolat Adı	S.No	Tester İzolatlar Tekrarları	Virülent İzolatın Hipovirülent İzolata Dönüştürülmesi (Kültürel Değerlendirme)	Phenol Oxidase Enzim Aktivitesi (Bavendamm test)
BU06	1	EU-2	-	Kuvvetli
	2	EU-2	-	Kuvvetli
	3	EU-2	+	Zayıf
	4	EU-2	-	Zayıf
	5	EU-2	+	Zayıf
	6	EU-2	-	Zayıf
	7	EU-2	-	Kuvvetli
	8	EU-2	-	Kuvvetli
	9	EU-2	-	Kuvvetli
	10	EU-2	-	Kuvvetli
BU06	1	EU-7	-	Zayıf+Kuvvetli
	2	EU-7	+	Zayıf+Kuvvetli
	3	EU-7	+	Zayıf
	4	EU-7	+	Zayıf
	5	EU-7	-	Kuvvetli
	6	EU-7	-	Kuvvetli
	7	EU-7	-	Kuvvetli
	8	EU-7	-	Kuvvetli
	9	EU-7	-	Kuvvetli
	10	EU-7	-	Kuvvetli

Sonuçta EU-1 uyum tipinde olup kendi izolatlarımızda bulunan hipovirüsü Avrupa uyum tipi EU-2, EU-7'ye hifsel anastomosis yoluyla aktarım yapılabilmiştir.

4.5.2 Moleküler tespit sonuçları

Hipovirüs aktarımı yapılan Avrupa uyum tipi tester izolatları ilk olarak besi ortamında gözlenmiştir. Fenotipik olarak ilk değerlendirme yapılarak, turuncu izolatı beyaz renge dönüştürüp, aynı zamanda Bavendamm testinde de zayıf renk reaksiyonu veren

(HPV=Hipovirülent), 5 izolat HPV-EU-5(BL03), HPV-EU-26(BL03), HPV-EU-3(Sİ02), HPV-EU-5(Sİ02), HPV-EU-26(Sİ02) için moleküler tespit çalışmalarında virüsün iki gen bölgesine de rastlanmıştır. Fenotipik olarak değerlendirme yapılarak, turuncu izolatı beyaz renge dönüştürmeyip, aynı zamanda Bavendamm testinde de kuvvetli renk reaksiyonu veren 12 izolat (EU-2(BL01), EU-2(BL03), EU-44(BL03), EU-44(BU06), EU-7(KS01), EU-44(KS01), EU-2(Sİ02), EU-7(Sİ02), EU-44(Sİ02); EU-7(ÇK01); EU-7(ZN04), EU-44(ZN04)) için moleküler tespit çalışmalarında virüsün iki gen bölgesine de rastlanmamıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 EU-1 uyum tipinde olan Sİ02 ve KS01 hipovirülent izolatların, *vic* lokuslarında 1 allel farklılığı bulunan (EU-2, EU-3, EU-5, EU-7, EU-26 ve EU-44) virülent Avrupa tester uyum tiplerine hipovirüs aktarımı sonucu jel elektroforezinde *Cryphonectria hypovirus*'ün ORFA ve ORFB bölgelerinin görünümü (pozitif kontrol: hipovirülent izolatlar Sİ02, M7080; negatif kontrol: virülent izolatlar DE02, MN01)

PCR çalışmalarında Makedonya orjinli iki hipovirülent izolat (M7080, M7060) pozitif kontrol olarak kullanılmış ve 2 izolatta virüsün iki gen bölgesine de rastlanmıştır. Avrupa uyum tiplerinden virülent izolatlar (EU-10, EU-38) ve Denizli orjinli virülent izolat (DE02) negatif kontrol olarak kullanılmış, bu 3 izolatta virüsün iki gen bölgesine de rastlanmamıştır.

Moleküler tespit çalışmaları için seçilen 17 izolat üzerinde yapılan çalışmada, 12 izolata virüs geçişinin olmadığı morfolojik özelliği, Bavendamm testi ve moleküler yöntemlerle tespit edilmiştir. 5 izolata ise hipovirüs aktarımının olduğu morfolojik testlerle ve Bavendamm ile olumlu sonuç vermiş ayrıca moleküler yöntemlerle de kanıtlanmıştır. Moleküler tespit sonuçlarına göre EU-1 uyum tipinde yer alan hipovirülent izolatlarda bulunan hipovirüsü, Avrupa uyum tipleri EU-3, EU-5, EU-26 aktararak 3 farklı uyum tipinde Türkiye'deki izolatlardan elde edilen hipovirüs taşıyan hipovirülent izolat elde edilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 Hipovirüs aktarımı yapılan izolatların Bavendamm test ve moleküler tespit sonuçları

Hipovirülent İzolat Adı	Tester İzolatlar	Virülent İzolatın Hipovirülent İzolata Dönüştürülmesi (Kültürel Değerlendirme)	Phenol Oxidase Enzim Aktivitesi	PCR ORFA hvep1-2 391 kb	PCR ORFB 12F-R 741 kb
ZN04	EU-7	-	Kuvvetli	-	-
	EU-44	-	Kuvvetli	-	-
BL03	EU-2	-	Kuvvetli	-	-
	EU-5	+	Zayıf	+	+
	EU-26	+	Zayıf	+	+
	EU-44	-	Kuvvetli	-	-
BU06	EU-44	-	Kuvvetli	-	-
BL01	EU-2	-	Kuvvetli	-	-
ÇK01	EU-7	-	Kuvvetli	-	-
KS01	EU-7	-	Kuvvetli	-	-
	EU-44	-	Kuvvetli	-	-
Sİ02	EU-2	-	Kuvvetli	-	-
	EU-3	+	Zayıf	+	+
	EU-5	+	Zayıf	+	+
	EU-7	-	Zayıf+Kuvvetli	-	-
	EU-26	+	Zayıf	+	+
	EU-44	-	Kuvvetli	-	-

4.5.3 EU-12 Avrupa tester izolatına Bursa orjinli izolattan hipovirüs aktarım sonuçları

Hipovirüs aktarımı 3.6.1 Avrupa uyum tipi EU-1'deki hipovirüsün bir allel farklılık gösteren diğer Avrupa uyum tiplerine aktarımı başlığında belirtildiği gibi yapılmış olan Avrupa tester izolatı HPV-EU-3 (HPV=hipovirülent, hipovirülent izolat BU06'dan virüs aktarılan) bu çalışmada donör olarak kullanılmıştır. HPV-EU-3 izolatı ilk olarak 1 allel farklı olan EU-30 tester izolatı ile 5 tekerrürlü eşleştirilmiştir. İlk deneme de hipovirüs aktarımı sağlanamamıştır. Çalışma 5 tekerrürlü olarak tekrarlanmıştır. Bu tekrardan da 5 eşleşmiş kültürden sadece 1 tanesinde beyaz izolatın turuncu izolatı beyaz renge dönüştürdüğü gözlemlenmiş ve bu kısımdan fungus ayrılmıştır.

EU-30 tester izolatına BU06 hipovirülent izolatı aktarılmış ve HPV-EU-30 (BU06 hipovirüs) izolatı Bavendamm testine 2 tekerrürlü tabi tutulmuş ve testte verdiği renk reaksiyonuna göre hipovirülent izolat olarak değerlendirilmiştir.

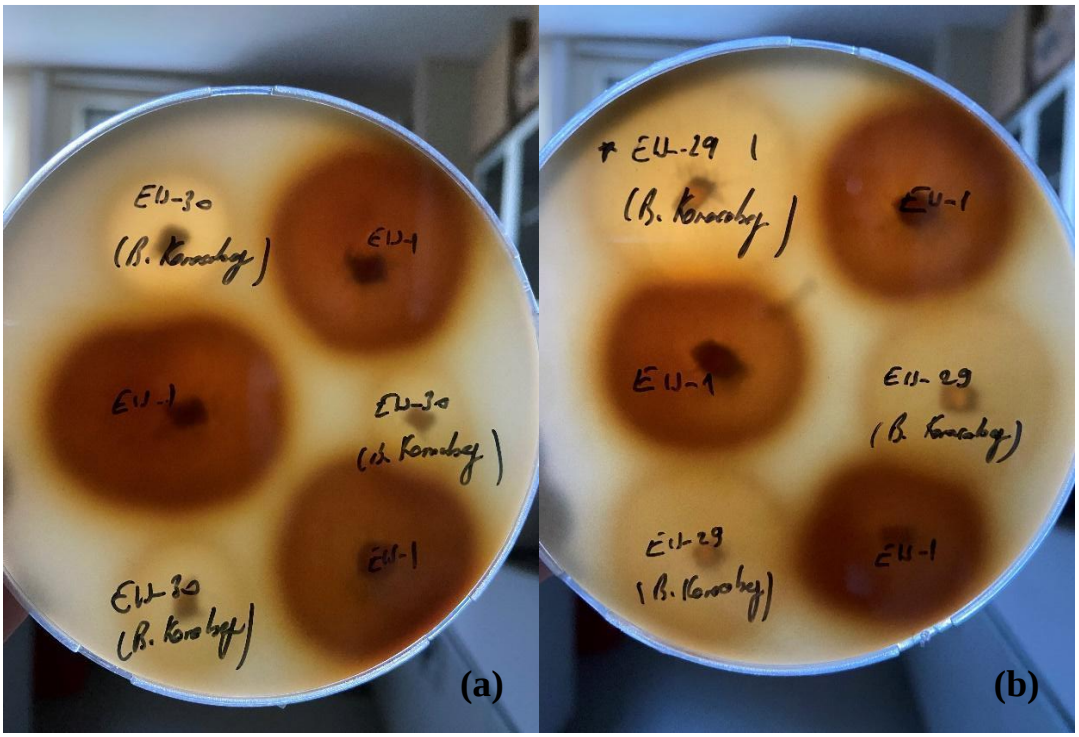
HPV-EU-30 hipovirülent izolatı, 1 allel farkı bulunan virülent EU-29 tester izolatına virüs hifsel anastomosis yoluyla 5 tekerrürlü olacak şekilde eşleştirme yapılmıştır. Bunlardan 2 tanesinde EU-29 tester izolatını beyaz renge dönüştürdüğü gözlemlenmiştir. Bu izolatlarda Bavendamm testinde koloni renk reaksiyonuna göre hipovirülent izolat olarak değerlendirilmiştir.

HPV-EU-29 izolatı, 1 allel farkı bulunan EU-12 tester izolatına virüs aktarımı için 5 tekerrürlü ekimle aktarılmaya çalışılmıştır. Beş tekerrürün hiçbirinde virüs geçişi sağlanamamıştır. Çalışmalar 22 tekrarlı yeniden denenmiş ve 27 tekkürden sadece 2 izolata virüs aktarımı gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.7) ve bavendamm testine tabi tutulmuş ve 2 izolat zayıf renk reaksiyonuna göre değerlendirilmiştir. Böylece BU06 daki hipovirüs virülent EU-12 tester izolatına da aktarılmıştır.

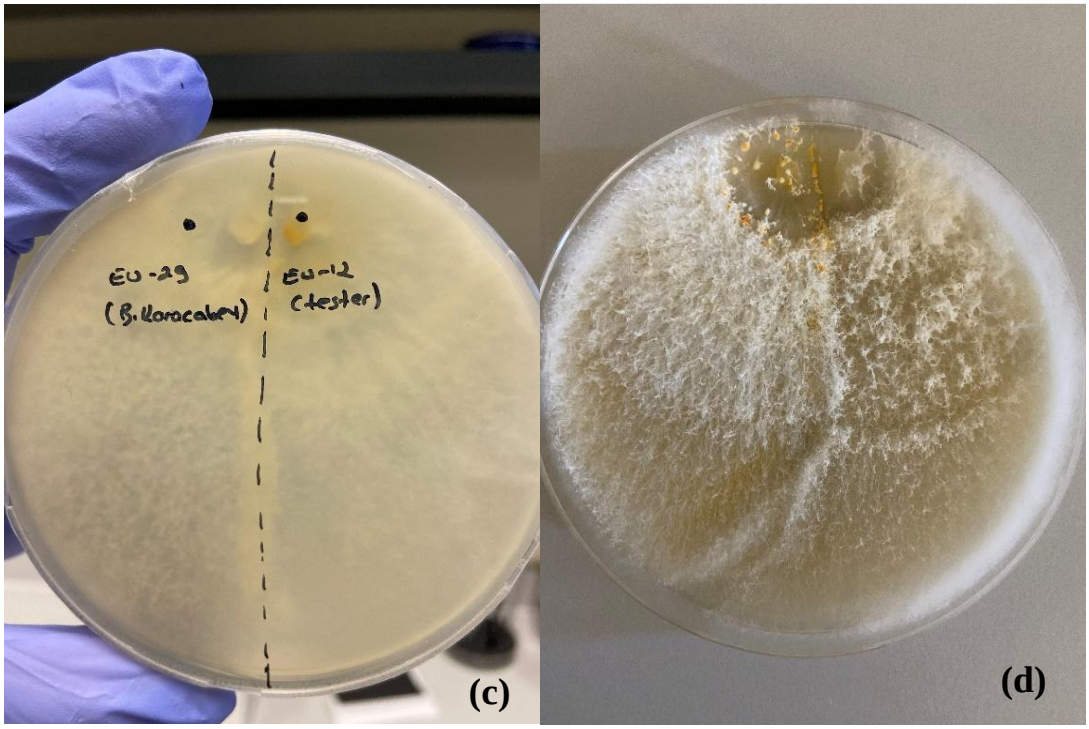
Çizelge 4.8 Avrupa uyum tipi EU-12'ye, hipovirülent BU06 izolatından CHV1'in aktarım sırası ve sonuçları

Hipovirüs Transferi için Kullanılan Hipovirülent İzolat	**EU-12 VC Tipine CHV1'in Aşamalı Transferi**				
	EU-1 2212-22	EU-3 2212-**1**2	EU-30 **1**212-12	EU-29 1**1**12-12	EU-12 1112-**1**1
BU06	+	+	+ (1/10)*	+ (2/5)**	+ (2/27)***

* CHV1'in transferi EU-3 uyum tipinden, EU-30 uyum tipine 10 tekrarlı yapıldı. Sadece 1 izolata virüs aktarımı sağlanmıştır.
** EU-30 uyum tipinden virüs, EU-29 uyum tipine 5 tekrarlı çalışmayla gerçekleştirilmiş ve 2 izolata virüs aktarımı gerçekleşmiştir.
*** EU-12 uyum tipine, EU-29 uyum tipinden virüs aktarımı zor olmuş. Yirmiyedi tekrarın 2'sinde virüs geçişi sağlanmıştır.



Şekil 4.7 EU-30(BU06) izolatının phenol oxidase testinde verdiği zayıf reaksiyon (a) EU-29(BU06) izolatının phenol oxidase testinde verdiği zayıf reaksiyon (b) EU-29(BU06) izolatından EU-12 tester izolatına virüs aktarımı (c,d)



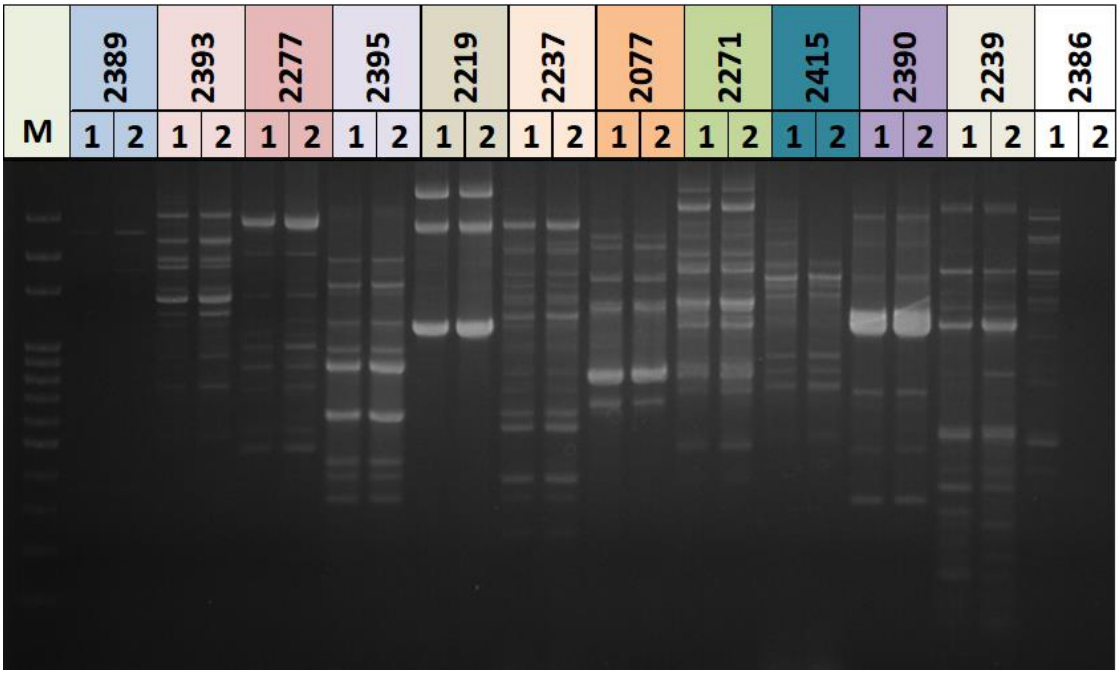
Şekil 4.7 EU-30(BU06) izolatının phenol oxidase testinde verdiği zayıf reaksiyon (a) EU-29(BU06) izolatının phenol oxidase testinde verdiği zayıf reaksiyon (b) EU-29(BU06) izolatından EU-12 tester izolatına virüs aktarımı (c,d) (Devam)

4.6 İzolatlar İçerisindeki Tür İçi Genetik Varyasyonlar

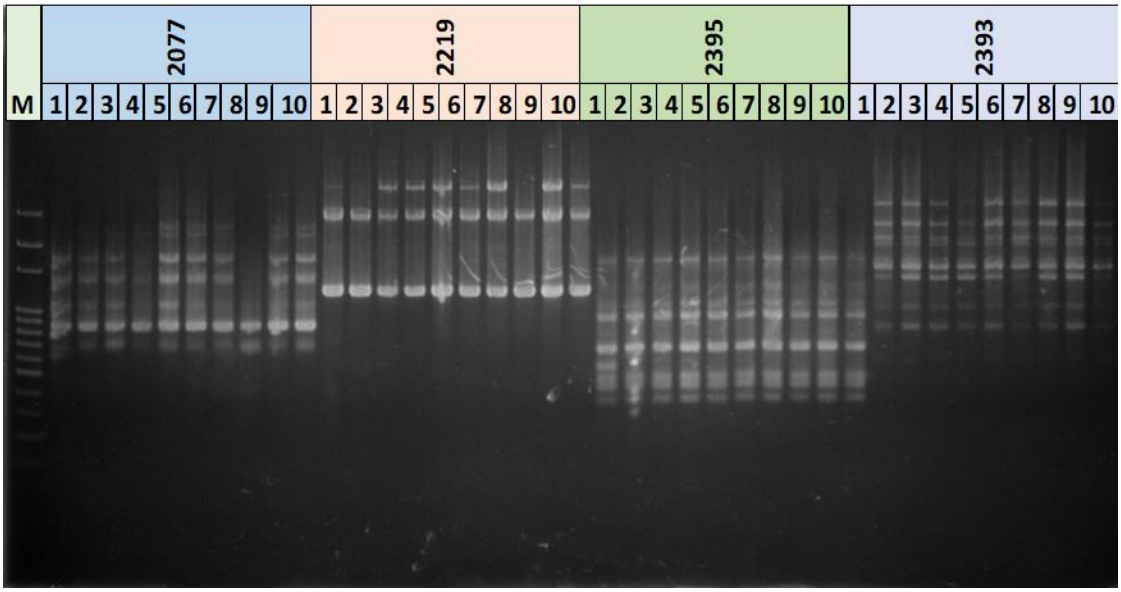
Tür içi genetik çeşitliliğin belirlenmesi için seçilen iPBS ve SCoT markörları ile yapılan ön deneme çalışmalarında polimorfizm görülmediği için her iki markör çalışması için rastgele seçilen 4 farklı primer kullanılmıştır.

4.6.1 *Cryphonectria parasitica* izolatlarında iPBS retrotransposon markör sonuçları

iPBS markörler kullanılarak yapılan ön denemelerin sonucunda (Şekil 4.8), rastgele seçilen 4 iPBS primeri (2077, 2219, 2393 ve 2395) 183 izolat için kullanılmıştır. *Cryphonectria parasitica* izolatları arasında tür içi polimorfizm görülmemiştir (Şekil 4.9).



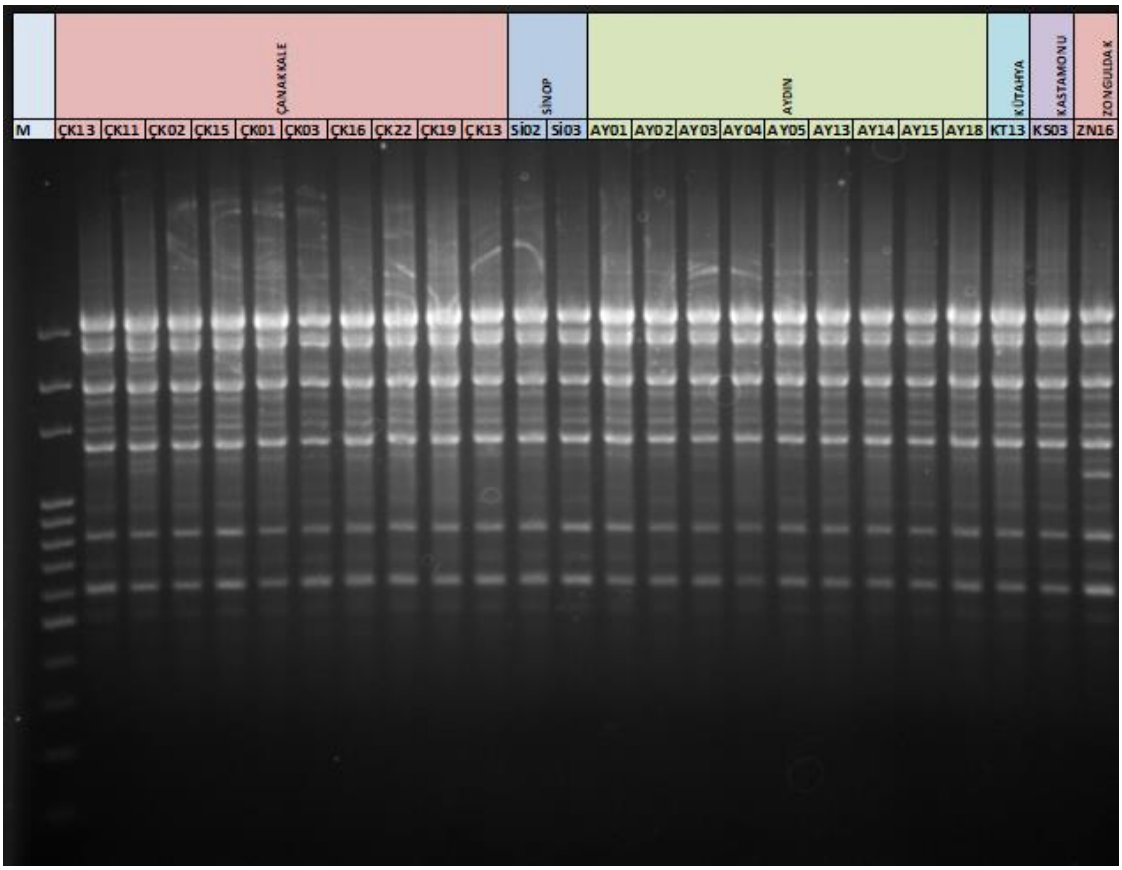
Şekil 4.8 iPBS 2389, 2393, 2277, 2395, 2219, 2237, 2077, 2271, 2415, 2390, 2239 ve 2386 primerleri ile elde edilen bant profilleri (1: DE13 izolatı; 2: BU01 izolatı)



Şekil 4.9 iPBS 2077, 2219, 2395, 2393 primerleri ile *Cryphonectria parasitica* izolatlarında elde edilen bant profilleri (1-10: Farklı *Cryphonectria parasitica* izolatları)

4.6.2 *Cryphonectria parasitica* izolatlarında SCoT markör sonuçları

Ön denemeler sonucunda, rastgele seçilen 4 SCoT primeri (16, 17, 24 ve 32) 183 izolat için kullanılmış ve *C. parasitica* izolatları arasında tür içi polimorfizm görülmemiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 SCoT 32 primeri ile *Cryphonectria parasitica* izolatlarında elde edilen bant profilleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kestane, Dünyada ve ülkemizde önemli bir orman ve meyve ağacıdır. Kestane kanseri bu ağacın en önemli hastalıklarından biridir (Akıllı *et al.* 2009, Rigling and Prospero 2018). Ülkemizde bu hastalık 1960'lı yıllardan günümüze kadar tüm kestane alanlarında görülmüş ve kestane ağaçlarında önemli derecede kurumaya neden olmuştur (Coşkun *et al.* 1999, Çeliker and Onoğur 2001, Gürer *et al.* 2001, Erincik *et al.* 2008, Akıllı *et al.* 2009). Dünyada ve ülkemizde bu hastalığa karşı savaşta genellikle sadece biyolojik mücadele çalışmaları yapılmıştır (Anagnostakis 1982, MacDonald and Fulbright 1991, Robin *et al.* 2000, Milgroom and Cortesi 2004, Heiniger and Rigling 2009, Anonymous 2014, Çakar *et al.* 2020). Kestane kanseriyle mücadelede en etkili ve en yaygın kullanılan yöntem hipovirülent izolatlarla biyolojik mücadeledir. Biyolojik mücadele çalışmalarında; kestane kanseri etmeni *C. parasitica*'yı enfekte ederek onun virülansını azaltan, doğada kendiliğinden var olan *Hipoviridea* familyasında yer alan *Cryphonectria hypovirus* 1 tarafından enfekte edilmesi sonucunda saldırganlığı ve sporulasyon yeteneği azalan fungus izolatları yani hipovirülent strainleri kullanılmaktadır (Choi and Nuss 1992). Bir yerde biyolojik mücadele başlatıldığında başarılı olmasının en önemli kriterlerinden biri o bölge de uyum tipi çeşitliliğinin ve dağılımının bilinmesidir (Heiniger and Rigling 1994). Ayrıca bu mücadele yönteminin başarılı olması için çalışma yapılacak alanda vejetatif uyum çeşitliliğinin az olması da gerekmektedir. Bu çalışmada; bu nedenle bu hastalıkla biyolojik savaşta ana etken olan ülkemizin kestane yetiştiriciliği yapılan alanlarından elde edilen *C. parasitica* izolatların vejetatif uyum tipi ve eşleşme tiplerinin güncel dağılımı belirlenmiştir.

Türkiye'de en yaygın uyum tipi EU-1 ve EU-12 için hipovirülent izolatlar bulunmaktadır. Ancak yeni vejetatif uyum tiplerinin oluşumu biyolojik mücadelede farklı uyum tipinde hipovirülent izolatlara ihtiyaç göstermektedir. Bu amaçla ülkemizde ortaya çıkma ihtimali olan EU-1 uyum tipinden, 1 allel farklı *vic* alleleri olan (EU-2, EU-3, EU-5, EU-7, EU-26 ve EU-44) uyum tiplerine elimizde var olan 10 adet hipovirülent izolattan virüs aktarımları yapılmıştır. Ülkemizde şimdiye kadar doğal olarak EU-12 uyum tipinde hipovirülent izolat bulunamamıştır ve biyolojik mücadele çalışmalarında Makedon orjinli EU-12 uyum tipinde olan hipovirülent izolatlar

kullanılmıştır. Çalışmada Bursa orjinli bir hipovirülent izolattan EU-12 tester izolatına hipovirüs aktarımı yapılmış olup yapılacak olan biyolojik mücadele çalışmalarında bu izolat kullanılabilecektir. Ancak elde edilen hipovirulent izolatla Makedon izolatının etkinliklerinin karşılaştırılması doğru olacaktır.

Dünyada ve ülkemizde önceki çalışmalarda İtalyan alt tipi hipovirüsün yaygın olduğu bulunmuş ve biyolojik mücadele çalışmalarında daha etkin olduğu belirlenmiştir (Allemann *et al*. 1999, Sotirovski *et al*. 2006, Krstin *et al*. 2008, Robin *et al*. 2010, Krstin *et al*. 2011, Akıllı *et al.* 2013). Bu nedenle hipovirüs alt tip çalışmaları yapılmış olup, biyolojik mücadelede kullanılacak hipovirüsün altipinin bilinmesi de amaçlanmıştır. Bu çalışma ile elde edilen hipovirülent izolatlarda var olan hipovirüsün ORFA bölgesine dayandırılarak virüsün alt tiplerinin belirlenmesi etmene karşı en etkili mücadele stratejisi olan biyolojik mücadele planlamalarına yardımcı olacaktır. Ülkemizde yapılan hipovirüs alt tip çalışmalarında İtalyan alt tipinin baskın olduğu ve bunun yanında sadece Doğu Karadeniz Bölgesinde Fransız alt tipi tespit edilmiştir (Akıllı *et al*. 2013).

Çalışma kapsamında Aydın, Bursa, Düzce, Çanakkale, Denizli, İzmir, Manisa, Kastamonu, Kütahya, Samsun, Sinop, Yalova ve Zonguldak olmak üzere 13 ilden toplanan kabuk örneklerinden 183 *C. parasitica* izolatı elde edilmiştir. Fenotipik özelliklerine göre bu izolatların 40 adedinin hipovirülent, 143 adedinin ise virülent olduğu belirlenmiştir. Çalışma alanının Ege Bölgesinde hiç hipovirülent izolata rastlanmamıştır (Erincik *et al*. 2011, Anonymous 2014, Çakar vd. 2021). Bu sonuçlar da diğer çalışmaların sonuçlarını doğrulamaktadır.

Elde edilen 183 örneğin 149 tanesi Avrupa uyum tiplerinden EU-1, 34 tanesi ise EU-12 uyum tipinde yer almış olup bunların oranları sırasıyla %81,42 ve %18,58'dir. Mating tipi çalışmalarında 183 örneğin 134 adedi (%73,2) MAT-1 ve 44 adedi ise (%24) MAT-2 olarak tespit edilmiş olup, 5 örnekte (%2,8) ise iki mating tip bir arada tespit edilmiştir (EK-4). Bu durum farklı mating eşleşme tipine sahip, aynı vc uyum tipinde olan iki miselyumun karışımı ya da heterokaryon ile açıklanabilir (Rigling and Prospero 2018) ve self-fertilize izolatlar doğal populasyonlarda olabilir (McGuire *et al*. 2004). Bazı

çalışmalarda her iki mating eşleşme tipine sahip izolatlar bulunmuştur (Cornejo *et al.* 2019, Aghayeva *et al.* 2017). Eşeyli üreme tipi bazı bölgelerde yalnızca MAT-1 veya MAT-2, bazı bölgelerde ise her iki eşleşme tipinde görülmüştür (Çizelge 4.4).

Kırk adet hipovirülent izolatın hepsinin uyum tipi EU-1 olarak belirlenmiştir. Klasik yöntemler kullanılarak laboratuvarda yapılan uyum tipi çalışmalarında bazı izolatların sonuçları anlaşılamamıştır. Klasik yöntemlerle yapılan eşleştirme çalışmalarında 19 örneğin uyum tipi net olarak belirlenememiştir. Bu örnekler EU-1 ve EU-12 uyum tipleriyle eşleştirilmiş fakat net olarak uyum anlaşılamamıştır. Moleküler yöntemler kullanılarak yapılan çalışmaların sonuçları daha kesin ve doğru sonuçlar vermiştir. Birçok araştırmacının da belirlediği gibi (Short *et al*. 2015, Mlinarec *et al*. 2017, Cornejo *et al*. 2019, Hatipoğlu 2019) uyum tiplerinin belirlenmesinde en uygun yöntem moleküler belirlemedir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda farklı uyum tipleri bulunmuş (Akıllı *et al*. 2009, Erincik *et al*. 2011, Daldal 2015, Mangıl 2017, Hatipoğlu 2019), en hakim uyum tipi EU-1 ve EU-12 olarak bildirilmiştir (Anonymous 2014, Akıllı Şimşek *et al*. 2019, Çakar *et al.* 2020, Çakar vd. 2021). Bu çalışmanın sonucunda 13 bölgeden toplanan örneklerde sadece EU-1ve EU-12 olmak üzere sadece 2 uyum tipi hakim bulunmuştur. Bu bulgular önceki çalışmalarla da uyumlu bulunmuştur (Anonymous 2014, Akıllı Şimşek *et al*. 2019, Çakar *et al.* 2020, Çakar vd. 2021). Mating eşleşme tipleri de önceki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (Akıllı *et al.* 2013).

Bu sonuçlardan yola çıkılarak bu bölgeler için arazide genel olarak uyum tipi dağılımının EU-1 ve EU-12 olduğu söylenebilir. Morfolojik özelliklerine göre hipovirülent olduğu belirlenen izolatlar Bavendamm testine tabi tutularak hipovirülenslikleri bir bakıma doğrulanmıştır. Bu değerlendirmeye göre morfolojik olarak değerlendirme ile test sonuçlarında bazı örneklerde Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi uyum olmadığı görülmüştür. Kültürel özelliklerine göre değerlendirmede hipovirülent olan bazı örneklerin, bavendamm testinde hem kuvvetli reaksiyon vermesi hem de zayıf reaksiyon vermesi, izolatı enfekte eden virüs konsantrasyonu ile açıklanabilir.

Bavendamm test sonuçlarına göre 31 izolat (Çizelge 4.3) hipovirülent, 9 izolat (Çizelge 4.3) virülent olarak değerlendirilmiştir.

Hipovirülenslik her bölge görülmemiş olup, bölgelerde de dağılımı EK-3'te görüldüğü gibi homojen bir dağılım sergilememiştir. Bazı bölgelerde hipovirülensliğin görülmemesinin nedeni sıcaklık, ışık gibi çevresel etmenler olabilir (Bryner and Rigling 2011, Van Alfen *et al*. 1978). Hipovirülent izolatların hepsi EU-1 uyum tipinde yer almış ve şimdiye kadar yapılan çalışmaların hepsinde de bu durum doğrulanmıştır (Gürer *et al*. 2001, Akıllı *et al*. 2013, Çakar vd. 2021). *Cryphonectria hypovirus* 1'in varlığını moleküler yöntemlerle tespit etmek için virüsün iki gen bölgesi ORFA ve ORFB bölgelerine bakılmıştır. İlk olarak Bavendamm testinde yapılan değerlendirmeler moleküler yöntemlerle karşılaştırılmış olup, moleküler yöntemlerle virüs varlığı belirlenmesi Bavendamm testi sonuçları her zaman uyumlu olmamıştır (Çizelge 4.3).

Sonuçlardan yola çıkılarak moleküler yöntemlerle, Bavendamm testi uyumluluğu karşılaştırıldığında %100 tutarlılık görülmemiştir. Bavendamm testinde kuvvetli reaksiyon verip virülent olduğu düşünülen bir izolat hipovirülent izolat olabilmektedir (Akıllı *et al.* 2013). Bavendamm testinde zayıf reaksiyon veren bir izolatın, moleküler tespitlerde ORFA ve ORFB bölgesi tespit edilememiştir. Bavendamm testinde kuvvetli reaksiyon vermesi, hipovirülent izolatın virüs konsantrasyonuna, diğer izolatlara göre çokça spor vermesine bağlanabilir. Akıllı (2008) çalışmasında, fenotipik özelliklerine göre hipovirülent olarak değerlendirilen 2 izolatın, Bavendamm testinde virülent olduğunu saptamıştır.

Bavendamm testinde izolatların zayıf reaksiyon vermesi her zaman hipovirülenslikle ilişkilendirilmemelidir. Nitekim Del Carratore *et al*. (2021) yaptıkları çalışmada düşük lakkaz aktivitesi CHV1 ile ilişkilendirilirken bu durumun her zaman böyle olmadığı belirtilmiş ve Azerbaycan'dan elde edilen CHV-1'in olmadığı izolatlarda düşük lakkaz aktivitesi tespit edilmiştir. *Cryphonectria hypovirus*'ün alt tiplerinin belirlenmesi için 19 adet hipovirülent izolatın ORFA bölgesine dayalı sekansları elde edilmiş ve hepsinin CHV-1 alt tip I olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Türkiye'de daha önce yürütülen çalışmalarla uyumluluk göstermiştir. Daha önceki çalışmadan elde edilmiş olan CHV-

1'in F2 alt tipi yalnızca Doğu Karadeniz Bölgesinde nadir bulunmuştur (Akıllı *et al.* 2013). Bu çalışmada Doğu Karadeniz Bölgesinden örnekleme yapılmamıştır. CHV-1 İtalyan alt tip biyolojik mücadele de en çok kullanılan ve daha etkili virüs tipidir (Robin *et al*. 2010, Rigling and Prospero 2018). Filogenetik analizlerde elde edilen virüsler tek bir clusterda gruplanmıştır. CHV1 İtalyan alt tipi, D, F1 ve F2 referans izolatlarından açıkça ayrılmıştır.

Çalışmada ileride çıkabilecek yeni uyum tipleri için virüs aktarımı çalışmaları yapılmıştır. Virüs aktarımı için CHV1 virüs alt tipi italyan olan hipovirülent izolatlar (EU-1) *vic* allelinde 1 farklılık bulunan uyum tiplerine aktarılmıştır. Heteroallelik durumda iki izolat arasında virüs geçişinde heteroallelik olan *vic* allenin kaçıncı allel olduğu bu geçişi etkilemiştir. Virüs aktarımı için kullanılan 10 hipovirülent izolatların hiç biri EU-2 ve EU-7 tester izolatlarına iki tekerrürlü çalışmalarla transfer edilememiştir. Tekerrür sayısı arttırılarak 10 tekerrürlü çalışmalarda Bavendamm test sonuçlarına göre EU-2 ve EU-7 için hipovirüs %40 oranında aktarılmıştır. Hipovirülent izolatların EU-3 ve EU-5 uyum tipine virüs aktarımı iki tekrarlı denemede %100 sağlanmış olup, EU-26 uyum tipine virüs aktarımı iki tekrarlı denemede %90 sağlanmıştır. Bu sonuç Bavendamm testi ve temsili seçilen örneğinde moleküler çalışmalarla da desteklenmiştir. *vic3* heteroallelik olduğunda EU-1 ile EU-44 arasında olduğu gibi, EU-44 uyum tipine geçiş oranı %30 olmuştur. Cortesi *et al*. (2001) çalışmasında bu oranı %70 olarak belirtmiş ve bu da bizim sonuçlarımızla kısmen uyuşmaktadır. *vic2*'de farklılığın olması yani EU-1 ve EU-2 arasında olduğu gibi, hipovirüs aktarımı zor olmuştur. Hipovirüs aktarımında *vic4*'de olan bir farklılığın geçişi etkilemediği belirtilmiş ve bulgularımızda olduğu gibi EU-1 ve EU-5 arasında virüs geçişi %100 olmuştur. Bu sonuçlarımızı diğer çalışmalar desteklemektedir (Cortesi *et al*. 2001). *vic2* heteroallelik durumununda virüs transferinde güçlü bir engel oluşmuştur (Cortesi *et al*. 2001, Choi *et al*. 2012). Çalışmanın sonuçlarına göre virüs aktarımı çalışmalarında tekrar sayısının arttırılmasıyla virüs geçişleri sağlanmıştır. Anagnostakis and Day (1979) ve Anagnostakis (1987) *vic* lokusu farklılıklarında anastomosis olurken bazılarında hücre ölümü çok hızlı olduğundan örneğin *vic2* de (EU-1 ve EU-2 arasında olduğu gibi) olduğu gibi virüs geçisinin zor olacağı, eğer iki izolat anastomosis sırasında hücre ölümü yavaş oluyorsa örneğin *vic 4* (EU-1 ve EU-5

arasında olduğu gibi) virüsün daha kolay geçebileceğini ön görmüşlerdir. Bu çalışma ile ülkemizde çıkabilecek yeni uyum tiplerine virüs aktarımı yapılmış ve bu izolatlar biyolojik savaş etkinliğini artırmak üzere ileriki çalışmalarda kullanılabilecektir.

Hipovirülent EU-1 izolatından virülent EU-12 tester izolatına virüs aktarımı ilk kez bu çalışma ile yapılmıştır. İleride yapılacak biyolojik mücadele çalışmalarında Bursa orjinli bir hipovirülent izolat kullanılabilecektir.

Cryphonectria parasitica izolatlarında, SCoT ve iPBS markörleri kullanılarak yapılan çalışmada 13 farklı ilden elde edilen izolatlar içinde tür içi polimorfizme rastlanmamıştır. Düşük genetik çeşitlilik ile karakterize edilen klonal soyun populasyon biyolojisi ve epidemolojisini araştırmak için markörlerin (SSR gibi) kısıtlılıkları vardır. Çünkü bu markörler her zaman yakın ilişkili genotipleri çözemeyebilir. Bu yüzden genom çapında çalışmalar, tek nükleotit polimorfizm (SNP=single nucleotide polymorphism) gibi çalışmaların daha iyi bir alternatif olabileceği belirtilmiştir (Agayeva *et al*. 2017). Stauber *et al*. (2021), *C. parasitica*'nın Güneydoğu Avrupa'da ki istilasını açığa kavuşturmak için, 230 strainin tüm genomunu sekanslamışlar ve istila zonunun dışında genotipler yüksek seviyede çeşitlilik göstermiştir.

*Cryphonectria hypovirus'*un *C. parasitica*'nın biyolojik mücadelesinde kullanılmadan önce vc uyum tipi ve eşeyli üreme tiplerinin bilinmesi gerekmektedir (Ringling and Prospero 2018). Etmen patojenin vejetatif uyumluluğunun klasik karakterizasyonu, bilinen bir vc tip tester izolatı kullanılarak eşleştirme deneylerine dayanılarak yapılır (Cortesi and Milgroom 1998) ya da son zamanlarda daha çok kullanılmaya başlanılan konvensiyonel (klasik) PCR çalışmalarıyla belirlenmektedir (Short *et al*. 2015, Mlinarec *et al*. 2017). Cornejo *et al*. (2019) florasan işaretli markörler kullanarak multiplex PCR çalışmaları ile *vic* ve *MAT* tiplerini belirlemişleridir. Klasik yöntem şeklinde yapılan çalışmalarda, eşleştirmelerde yanlış değerlendirmeler yapılabilmekte çünkü eşleştirme çalışmalarında baraj çizgileri net olarak ayrılamaya bilmektedir. Nitekim bu çalışmada moleküler yöntemlerde uyum tipleri EU-1 ve EU-12 olduğu tespit edilen 19 izolat, klasik eşleştirme çalışmalarında izolatların net bir şekilde birleşmemesinden dolayı ayrımı sağlanamamıştır.

Bu aynı zamanda bilinen 6 *vic* lokusuna ek allelerin olabileceği görüşünü de düşündürmektedir (Cornejo *et al*. 2019, Ringling and Prospero 2018).

Kestane kanseriyle biyolojik mücadele çalışmalarında, etmen fungusun vejetatif uyum, eşleşme tip çeşitliliği ve coğrafik dağılımlarının güncel durumunun belirlenmesi biyolojik mücadele çalışmalarının başarısı için önemlidir. Bir alanda başlatılacak olan mücadele çalışmaları için öncelikle güncel durumun ortaya çıkarılması uygun olacaktır. Biyolojik mücadele çalışmalarında kullanılacak hipovirülent izolatın *Cryphonectria hypovirus'*un alt tipleri ve etkinlikliği de bilinirse uygun ve etkili hipovirülent seçimi daha kolay yapılabilecektir.

KAYNAKLAR

Adamčíková, K., Juhásová, G., & Kobza, M. 2006. Genetic diversity of *Cryphonectria parasitica* population in the Štiavnicko-krupinská subpopulation in Slovakia. Plant Protection Science, 42(4), 119-124.

Aghayeva, D. N., & Harrington, T. C. 2007. First report of *Cryphonectria parasitica* on chestnut (*Castanea sativa*) in Azerbaijan. New Disease Reports, 15, 33.

Aghayeva, D. N., Rigling, D., & Prospero, S. 2017. Low genetic diversity but frequent sexual reproduction of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in Azerbaijan. Forest Pathology, 47(5), e12357.

Allemann, C., Hoegger, P., Heiniger, U., & Rigling, D. 1999. Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV1) in Europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. Molecular Ecology, 8(5), 843-854.

Akdoğan, S., & Erkan, E. 1968. Dikkat! Kestane kanseri görüldü. Tomurcuk 1: 4-5.

Akıllı, S. 2008. Karadeniz Bölgesinde kestane kanseri (*C. parasitica*)'nin biyolojik mücadelesi üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 88 sayfa, Ankara.

Akıllı, S., Katırcıoğlu Y. Z., & Maden S. 2009. Vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica*, chestnut blight agent, in Black Sea region. Forest Pathology, 39(6), 390–396.

Akıllı, S. 2012. Feasibility of biological control of chestnut blight caused by *Cryphonectria parasitica*, in Marmara region of Turkey. African Journal of Agricultural Research, 7(45), 6068-6072.

Akıllı, S., Ulubaş-Serçe, Ç., Katırcıoğlu, Y. Z., Maden, S., & 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. A., Katırcıoğlu, Y. Z., Borst, N., Çakar, D., Prospero, S., Rigling, D., & Maden, S. 2019. Identification and characterization of hypovirus-infected *Cryphonectria parasitica* isolates from biological control plots in İzmir, Kütahya, and Sinop. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 43(6), 527-537.

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

Anagnostakis, S. L., & Day, P. R. 1979. Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. Phytopathology, 69(12), 1226-1229.

Anagnostakis, S. L. & Waggoner, P. E. 1981. Hypovirulence, vegetative incompatibility and the growth of cankers of chestnut blight. Phytopathology, 71(1), 1198-1202.

Anagnostakis, S. L. 1982. Biological control of chestnut blight. Science, 215(4532), 466-471.

Anagnostakis, S. L., Hau, B., & Kranz, J. 1986. Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. Plant Disease, 70(6), 536-538.

Anagnostakis, S. L. 1987. Chestnut blight- the classical problem of an introduced pathogen. Mycologia, 79(1), 23-37.

Anagnostakis, S. L. 2001. American chestnut sprout survival with biological control of the chestnut-blight fungus population. Forest Ecology and Management, 152(1-3), 225-233.

Anonim. 2014. FAO ve Orman Genel Müdürlüğü, Kestane Hastalıklarına Karşı Standart Çalışma Yöntemleri. 63 sayfa, Ankara.

Anonim. 2021. Orman Genel Müdürlüğü, Türkiye Orman Varlığı. 56 sayfa, Ankara.

Anonymous. 2014. Management of chestnut blight and for improving forest health and vitality (2012-2014), Report, TCP/TUR/615676.

Atallah, Z. K., Larget, B., Chen, X., & Johnson, D. A. 2004. High genetic diversity, phenotypic uniformity, and evidence of outcrossing in *Sclerotinia sclerotiorum* in the Columbia basin of Washington state. Phytopathology, 94(7), 737-742.

Aydın, F., Özer, G., Alkan, M., & Çakır, İ. 2020. The utility of iPBS retrotransposons markers to analyze genetic variation in yeast. International Journal of Food Microbiology, 325, 108647.

Barr, M. E. 1978. The Diaporthales in North America with emphasis on *Gnomonia* and its sagregates. Mycologia Memoir, 7, 1-232.

Bascón, J., Castillo, S., Borrero, C., Orta, S., Gata, A., & Avilés, M. 2014. First report of chestnut blight caused by *Cryphonectria parasitica* in a chestnut orchard in Andalusia (southern Spain). Plant Disease, 98(2), 283-283.

Biella, S., Smith, M. L., Aist, J. R., Cortesi, P., & Milgroom, M. G. 2002. Programmed cell death correlates with virus transmission in a filamentous fungus. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 269(1506), 2269-2276.

Biraghi, A. 1950. La distribuzione del cancro del castagno in Italia. L'italia Forestale e Montana, 5, 18-21.

Bisiach, M., Cortesi, P., De Martino, A. & Intropido, M. 1995. Biological control of chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. En: Proceedings of the International Congress "Microbial control agents in sustainable agriculture field experience, industrial production and registration". Saint Vincent (Aosta), 167.

Bissegger, M., Rigling, D. & Heiniger, U. 1997. Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European Chestnut forest in the presence of natural hypovirülence. Phytopathology, 87(1), 50-59.

Bragança, H., Simoes, S., Onofre, N., Tenreiro, R. & Rigling, D. 2007. *Cryphonectria parasitica* in Portugal: diversity of vegetative compatibility types,mating types, and occurrence of hypovirulence. Forest Pathology, 37(6), 391-402.

Bryner, S. F., & Rigling, D. 2011. Temperature-dependent genotype-by-genotype interaction between a pathogenic fungus and its hyperparasitic virus. The American Naturalist, 177 (1), 65-74.

Bryner, S. F., & Rigling, D. 2012. Hypovirus virulence and vegetative incompatibility in populations of the chestnut blight fungus. Phytopathology, 102(12), 1161-1167.

Caten, C. E. 1972. Vegetative incompatibility and cytoplasmic infection in fungi. Journal of General Microbiology, 72(2), 221-229.

Choi, G. H., & Nuss, D. L. 1992. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. Science, 257(5071), 800-803.

Choi, G. H., Dawe, A. L., Churbanov, A., Smith, M. L., Milgroom, M. G. & Nuss, D. L. 2012. Molecular characterization of vegetative incompatibility genes that restrict hypovirus transmission in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. Genetics, 190(1), 113-127.

Chung, P., Bedker, P. J., & Hillman, B. I. 1994. Diversity of *Cryphonectria parasitica* hypovirulence-associated double-stranded RNAs within a chestnut population in New Jersey. Phytopathology, 84(9), 984-990.

Collard, B. C., & Mackill, D. J. 2009. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. Plant Molecular Biology Reporter, 27(1), 86-93.

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

Cornejo, C., Šever, B., Kupper, Q., Prospero, S., & Rigling, D. 2019. A multiplexed genotyping assay to determine vegetative incompatibility and mating type in *Cryphonectria parasitica*. European Journal of Plant Pathology, 155(1), 81-91.

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

Cortesi, P., McCulloch, C. E., Song, H., Lin, H., & Milgroom, M. G. 2001. Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. Genetics, 159(1), 107-118.

Coşkun, H., Turchettı, T., Maresi, G. & Santagada, A. 1999. Preliminary investigations into *Cryphonectria parasitica* (Murr) Barr isolates from Turkey. Phytopathology Mediterranean, 38, 101-110.

Çakar, D., Akıllı Şimşek, S., Katırcıoğlu, Y. Z., & Maden, S. 2020. Biological control of chestnut canker caused by *Cryphonectria parasitica* (Murr.) by hypovirulent strains at selected orchards in İzmir and Aydın Provinces of Turkey. Current Researches in Science and Mathematics Sciences, 12.

Çakar, D., Akıllı Şimşek, S., Can, T., Katırcıoğlu, Y. Z., & 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., & Onoğur, E. 1998. Determining the hypovirulence in the chestnut blight (*Cryphonectria parasitica* [Murr.] Barr.) in Turkey. The Journal Turkish Phytopathology, 27, 145-146.

Çeliker, N. M., & Onoğur, E. 2001. Evaluation of hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* for the biological control of chestnut blight. Forest Snow and Landscape Research, 76(3), 378-382.

Çeliker, N. M., & Onoğur, E. 2009. Biological control of chestnut blight and prospect for future: Turkey as a case study. Acta Horticulturea, 815, 221-226.

Daldal, M. 2015. İzmir, Manisa, Muğla ve Denizli illerinde *Cryphonectria parasitica* populasyonlarının vejetatif uyum grupları ve mating tipler yönünden karakterizasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Bölümü Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 53 sayfa, Aydın.

Del Carratore, R., Aghayeva, D. N., Ali-zade, V. M., Bartolini, P., Della Rocca, G., Emiliani, G., Pepori, A., Podda, A., & Maserti, B. 2021. Detection of *Cryphonectria hypovirus 1* in *Cryphonectria parasitica* isolates from Azerbaijan. Forest Pathology, 51(5), e12718.

Delen, N. 1975. Distribution and the biology of chestnut blight (*Endothia parasitica*) (Murrill) Anderson and Anderson. Journal of Turkish Phytopathology, 4, 93-113.

Ding, G., Wang, K., & Zhou, E. 1997. Comparison of population structures of *Cryphonectria parasitica*. Mycosystema, 16(4), 81-290.

Döken, M. T., Açıkgöz, S., Erincik, Ö., & Ertan, E. 2004. Studies in the chestnut growing areas of Aydın-Turkey to determine the incidence of *Cryphonectria parasitica* (Murill) Barr infections (Chestnut Blight) and vegetative compatibility group diversity among the isolates. Türkiye 1. Bitki Koruma Kongresi, 8-10 Eylül, Samsun.

Dutech, C., Barres, B., Bridier, J., Robin, C., Milgroom, M.G. & Ravigne, V. 2012. The chestnut blight fungus world tour: successive introduction events from diverse origins in an invasive plant fungal pathogen. Molecular Ecology, 21(16), 3931-3946.

Elliott, K. J., & Swank, W. T. 2008. Long-term changes in forest composition and diversity following early logging (1919-1923) and the decline of American chestnut (*Castanea dentata*). Plant Ecology, 197(2), 155-172.

Enebak, S. A., MacDonald, W. L., & Hillman, B. I. 1994. Effect of dsRNA associated with isolates of *Cryphonectria parasitica* from the central Appalachians and their

relatedness to other dsRNAs from North America and Europe. Phytopathology, 84(5), 528-34.

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

Erincik, Ö., Döken M. T, Acikgöz, S., & Ertan, E. 2008. Characterization of *Cryphonectria parasitica* isolates collected from Aydın province in Turkey. Phytoparasitica, 36(3), 249-259.

Erincik, Ö., Özdemir, Z., Durdu, Ö. F., Döken, M. T. & Acikgöz, S. 2011. Diversity and spatial distribution of vegetative compatibility types and mating types of *Cryphonectria parasitica* in the Aydın Mountains, Turkey. European Journal of Plant Pathology, 129(4), 555-566.

Evans, A. M., & Finkral, A. J. 2010. A new look at spread rates of exotic diseases in North American forests. Forest Science, 56(5), 453-459.

FAOSTAT 2022. Web sitesi. Food and agriculture organization of the United Nations. Statistical database. http://www.fao.org/faostat. Erişim tarihi: 27.06.2022.

Feau, N., Dutech, C., Brusini, J., Rigling, D., & 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.

Feschotte, C., & Pritham, E. J. 2007. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. Annual Review of Genetics, 41, 331-368.

Giraud, T., 2004. Patterns of within population dispersal and mating of the fungus *Microbotryum violaceum* parasitising the plant *Silene latifolia*. Heredity, 93(6),559–565.

Griffin, G. J. 1986. Chestnut blight and its control. Horticultural Reviews, 8, 291–336.

Griffin, G. J. 1999. Frequencies and spatial patterns of white hypovirulent and pigmented strains of *Cryphonectria parasitica* within blight-controlled cankers on grafted American chestnut trees 15–16 years after inoculation. European Journal of Forest Pathology, 29(6), 377-390.

Griffin, G. J., Robbins N., Hogan, E. P., & Farıas-Santopıetro, G. 2004. Nucleotide sequence identification of Cryphonectria hypovirus infecting *Cryphonectria parasitica* on grafted American chestnut trees 12-18 years after inoculation with hypovirulent strain mixture. Forest Pathology, 34(1), 33-46.

Gobbin, D., Hoegger, P. J., Heiniger, U., & Rigling, D. 2003. Sequence variation and evolution of *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV-1) in Europe. Virus Research, 97(1), 39-46.

Gürer, M., Ottaviani, M. P., & Cortesi, P. 2001a. Genetic diversity of subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in two chestnut-growing regions in Turkey. Forest Snow and Landscape Research, 76(3), 383-386.

Gürer, M., Turchetti, T., Biagioni, P., & Maresi, G. 2001b. Assessment and characterisation of Turkish hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* (Murr) Barr. Phytopathologia Mediterranea, 40(3), 265-275.

Hatipoğlu, E. 2019. Doğu Karadeniz Bölgesinde *Cryphonectria parasitica* populasyonunda vejetatif uyumsuzluk (vic) genlerinin dağılımının PCR ile belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Bitki Koruma Bölümü Anabilim Dalı, 53 sayfa, Aydın.

Heiniger, U., & Rigling, D. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. Annual Review Phytopathology, 32(1), 581-599.

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

Hillman, B. I., Tian, Y., Bedker, P. J., & 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., Halpern, B. T., & Brown, M. P. 1994. A viral dsRNA element of the chestnut blight fungus with a distinct genetic organization. Virology, 201(2), 241-250.

Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A.; Minh, B.Q., & Vinh, L.S. 2018. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. Molecular. Biology and Evolution, 35, 518-522.

Hoegger, P. J., Rigling, D., Holdenrieder, O., & Heiniger, U. 2000. Genetic structure of newly established populations of *Cryphonectria parasitica*. Mycological Research, 104(9), 1108-1116.

Jaynes, R. A., & Elliston, J. E. 1980. Pathogenicity and canker control by mixtures of hypovirülent strains of *Endothia parasitica* in American chestnut. Phytopathology, 70(5), 453-456.

Joshi, C., Zhou, H., Huang, X., & Chiang, V. L. 1997. Context sequences of translation initiation codon in plants. Plant Molecular Biology, 35(6), 993-1001.

Kalendar, R., Antonius, K., Smýkal, P., & Schulman, A. H. 2010 iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation, Theoretical and Applied Genetics, 121(8), 1419-1430.

Krstin, L., Novak-Agbaba, S., Rigling, D., Krajačić, M., & Ćurković 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(6), 1086-1096.

Krstin, L., Novak-Agbaba, S., Rigling, D., & Ćurković-Perica, M. 2011. Diversity of vegetative compatibility types and mating types of *Cryphonectria parasitica* in Slovenia and occurrence of associated *Cryphonectria hypovirus* 1. Plant Pathology, 60(4), 752-761.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K., 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analyses across computing platforms, Molecular Biology and Evolution, 35(6), 1547-1549.

Lee, S. H., Park, J. Y., Kim, K. H., & Lee, J. K. 2005. Characteristics of hyovirulent strains of chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* isolated in Korea. Proceedings of Third International Chestnut Congress. Acta Horticulture, 693, 611-616.

Liu, Y. C., Double, M. L., MacDonald, W. L., & Milgroom, M. G. 2002. Persistence of *Cryphonectria hypoviruses* after their release for biological control of chestnut blight in West Virginia forests. Forest Pathology, 32(6), 345-356.

Liu, Y. C., Hillman, B. I., Linder-Basso, D., Kaneko, S., & Milgroom, M. G. 2003. Evidence for interspecies transmission of viruses in natural populations of filamentous fungi in the genus *Cryphonectria*. Molecular Ecology, 12(6),1619-28.

MacDonald, W. L., & Fulbright, D. W. 1991. Biological control of chestnut blight: use and limitations of transmissible hypovirulence. Plant Disease, 75(7), 656-661.

Mak, J., & Kleiman, L. 1997. Primer tRNAs for reverse transcription. Journal of Virology, 71(11),8087-8095.

Mangıl, E. 2017. Doğu Karadeniz Bölgesinde kestane kanseri etmeni *Cryphonectria parasitica*'nın vejetatif uyum tipi çeşitliliğinde eşeyli üremenin rolü. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Bitki Koruma Bölümü Anabilim Dalı, 55 sayfa, Aydın.

Marra, R. E. & Milgroom, M. G. 2001. The mating system of the fungus *Cryphonectriaparasitica*: selfing and self-incompatibility. Heredity, 86(2), 134-143.

Marra, R. E., Cortesi, P., Bissegger, M. & Milgroom, M.G. 2004. Mixed mating in natural populations of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. Heredity, 93(2), 189-195.

Merkel, H. W. 1905. A deadly fungus on the American chestnut. N.Y. Zoological Society, 10th Annual Report, pp. 97-103.

McGuire, I. C., Marra, R. E., & Milgroom, M. G. 2004. Mating-type heterokaryosis and selfing in *Cryphonectria parasitica*. Fungal Genetics and Biology, 41(5), 521-533.

Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In Proceedings of the 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE); IEEE: New Orleans, LA, USA, 1-8.

Milgroom, M. G, Lipari, S. E., & Powellt, W. A. 1992. DNA fingerprinting and analysis of population structure in the chestnut blight fungus, *Cyphonectria parasitica*. Genetics, 131(2), 297-306.

Milgroom, M. G., & Lipari, S. E. 1995. Spatial-analysis of nuclear and mitochondrial RFLP genotypes in populations of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. Molecular Ecology, 4(5), 633-642.

Milgroom, M. G., Wang, K. R., Zhou, Y., Lipari, S. E., & Kaneko, S. 1996. Intercontinental population structure of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. Mycologia, 88(2), 179-190.

Milgroom, M. G. & Cortesi, P. 1999. Analysis of population structure of the chesnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. Proceedings of the

National Academy of Sciences of the United States of America, 96(18), 10518-10523.

Milgroom, G. M., & Cortesi, P. 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence; a critical analysis. Annual Review Phytopathology, 42, 311–338.

Milgroom, M. G., Sotirovski, K., Spica, D., Davis, J. E., Brewer, M. T., Milev, M., & Cortesi, P. 2008. Clonal population structure of the chestnut blight fungus in expanding ranges in southeastern Europe. Molecular Ecology, 17(20), 4446-4458.

Milgroom, M. G., Sotirovski, K., Risteski, M. & Brewer, M. T. 2009. Heterokaryons and parasexual recombinants of *Cryphonectria parasitica* in two clonal populations in southeastern Europe. Fungal Genetics and Biology,. 46(11), 849-854.

Mlinarec, J., Ježić, M., Ćosić, J., & Ćrković-Perica, M. 2017. Multilocus PCR assay reveals high diversity of vegetative compatibility types in populations of *Cryphonectria parasitica* in Croatia. Plant Pathology, 67(3), 741-749.

Myburg, H., Gryzenhout, M., Wingfield, B. D., Milgroom, M. G., Kaneko, S., & Wingfield, M. J. 2004. DNA sequence data and morphology define *Cryphonectria* species in Europe, China and Japan. Canadian Journal of Botany, 82(12), 89-98.

Ni, M., Feretzaki, M., Sun, S., Wang, X., & Heitman, J. 2011. Sex in Fungi. Annual Review of Genetics, 45, 405-430.

Nguyen, L. T, Schmidt, H. A, von Haeseler, A., & Minh, B. Q. 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. Molecular Biology and Evolution, 32, 268-274. pmid:25371430.

Nuss, D. L. 2005 Hypovirulence: mycoviruses at the fungal–plant interface. Nature Reviews Microbiology, 3(8), 632-642.

Özer, G., Bayraktar, H., & Baloch, F. S. 2016. iPBS retrotransposons 'A Universal Retrotransposons' now in molecular phylogeny of fungal pathogens. Biochemical Systematics and Ecology, 68, 142-147.

Paoletti, M. 2016. Vegetative incompatibility in fungi: From recognition to cell death, whatever does the trick. Fungal Biology Reviews, 30(4), 152-162.

Peever, T. L., Liu Y., Cortesi, P., & Milgroom, M. G. 2000. Variation in tolerance and virulence in the chestnut blight fungus-hypovirus interaction. Applied and Environmental Microbiology, 66 (11), 4863-4869.

Peever, T. L., Liu, Y. C., & Milgroom, M. G. 1997. Diversity of hypoviruses and other double-stranded RNAs in *Cryphonectria parasitica* in North America. Phytopathology, 87(10), 1026-1033.

Peever, T. L., Liu, Y. C., Wang, K., Hillman, B. I., Foglia, R., & Milgroom, M. G. 1998. Incidence and diversity of double-stranded RNAs occurring in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in China and Japan. Phytopathology, 88(8), 811-817.

Perlerou, C., & Diamandis, S. 2006. Identification and geographic distribution of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* and occurrence of hypovirulence in Greece. Forest Pathology, 36(6), 413-421.

Peters, F. S., Bußkamp, J., Prospero, S., Rigling, D., & Metzler, B. 2014. Genetic diversification of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* and its associated hypovirus in Germany. Fungal Biology, 118(2), 193-210.

Prospero, S., Conedera, M., Heiniger, U., & Rigling, D. 2006. Saprophytic activity and sporulation of *Cryphonectria parasitica* on dead chestnut wood in forests with naturally established hypovirulence. Phytopathology, 96(12), 1337-1344.

Prospero, S., & Rigling, D. 2012. Invasion genetics of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in Switzerland. Phytopathology, 102(1),73-82.

Poczai, P., Varga, I., Laos, M., Cseh, A., Bell, N., Valkonen, J., & Hyvönen, J. 2013. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. Plant Methods, 9(1), 1-32.

Rigling, D., Heiniger, U., & Hohl, H. R. 1989. Reduction of laccase activity in dsRNA-containing hypovirulent strains of *Cryphonectria* (*Endothia*) *parasitica*. Phytopathology, 79(2), 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(1), 7-20.

Radocz, L. 1999. Chestnut blight and the hypovirulence in the Carpathian basin. Acta Horticulturae 494, ISHS Press, Leuven-Belgium, 501-508.

Radócz, L. 2001. Study of subpopulations of the chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*) fungus in the Carpathian basin. Forest Snow and Landscape Research, 76(3), 368–372.

Rigling, D., Borst, N., Cornejo, C., Supatashvili, A., & Prospero, S. 2018. Genetic and phenotypic characterization of *Cryphonectria hypovirus 1* from Eurasian Georgia. Viruses, 10(12), 687.

Rigling, D., Robin, C., & Prospero, S. 2021. Mycovirus-Mediated Biological Control. Encyclopedia of Virology, 4 (s), 468-477.

Roane, M. K., Griffin, G. J., & Elkins, J. R. 1986. Chestnut blight, other *Endothia* diseases, and the genus *Endothia*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.

Robin, C., Anziani, C., & 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.

Robin, C., & Heiniger, U. 2001. Chestnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. Forest Snow and Landscape Research, 76(3), 361-367.

Robin, C., Lanz, S., Soutrenon, A., & Rigling, D. 2010. Dominance of natural over released biological control agents of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in south-eastern France is associated with fitness-related traits. Biological Control, 53(1), 55-61.

Romon-Ochoa, P., Kranjec Orlović, J., Gorton, C., Lewis, A., van der Linde, S., & Pérez-Sierra, A. 2022. New detections of chestnut blight in Britain during 2019-2020 reveal high *Cryphonectria parasitica* diversity and limited spread of the disease. Plant Pathology, 71(4), 793-804.

Sawant, S. V., Singh, P. K., Gupta, S. K., Madnala, R., & Tuli, R. 1999. Conserved nucleotide sequences in highly expressed genes in plants. Journal of Genetics, 78(2), 123-131.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(16), 6241-6246.

Short, D. P. G., Double, M., Nuss, D. L., Stauder, C. M., MacDonald, W. & Kasson, M. T. 2015. Multilocus PCR assays elucidate vegetative incompatibility gene profiles

of *Cryphonectria parasitica* in the United States. Applied and Environmental Microbiology, 81(17), 5736-5742.

Sotirovski, K., Papazova-Anakieva, I., Grünwald, N. J., & Milgroom, M. G. 2004. Low diversity of vegetative compatibility types and mating type of *Cryphonectria parasitica* in the southern Balkans. Plant Pathology, 53(3), 325-333.

Sotirovski, K., Milgroom, M. G., Rigling, D., & Heiniger, U. 2006. Occurrence of *Cryphonectria hypovirus 1* in the chestnut blight fungus in Macedonia. Forest Pathology, 36(2), 136-143.

Stauder, C. M., Nuss, D. L., Zhang, D. X., Double, M. L., Macdonald, W. L., Metheny, A. M., & Kasson, M. T. 2019. Enhanced hypovirus transmission by engineered super donor strains of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, into a natural population of strains exhibiting diverse vegetative compatibility genotypes. Virology, 528, 1-6.

Stauber, L., Badet, T., Feurtey, A., Prospero, S., & Croll, D. 2021. Emergence and diversification of a highly invasive chestnut pathogen lineage across southeastern Europe. Elife, 10.

Tani, N., Tomaru, N., Tsumura, Y., Araki, M., & Ohba, K. 1998. Genetic structure within a Japanese stone pine (*Punus pumula* Regel) population on Mt. Aino-Dake in central. Honshu, Japan. Journal of Plant Research, 111(1),7-15.

TÜİK, 2022. Web sitesi. Türkiye İstatistik Kurumu, Bitkisel Üretim İstatistikleri. https://data.tuik.gov.tr. Erişim Tarihi: 02.10.2022.

Tziros, G. T., & Diamandis, S. 2016. First report of chestnut blight caused by *Cryphonectria parasitica* on European chestnut (*Castanea sativa*) on Corfu island, Greece. Plant Disease, 100(7), 1502-1502.

Wang, K. R., & Milgroom, M. G. 1996. Genetic diversity in the populations of *Cryphonectria parasitica* from Eastern China. Acta Mycologica Sinica, 15(2), 135-142.

Wang, K. R., Zhou, Y., & Milgroom, M. G. 2004. Comparison of genetic structures among *Cryphonectria parasitica* populations from China, Japan and the USA. Scientia Silvae Sinice, 40(5), 127-131.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: a guide to methods and applications, 18(1), 315-322.

Xu, C. X, Zhou, X. Y, & Wang, K. R 2005. Genetic diversity of *Cryphonectria parasitica* populations in Asia, Europe and North America. Act Ecologyca Sinica, 25(2), 232-236.

Van Alfen, N. K., Jaynes, R. A., & Bowman, J. T. 1978. Stability of *Endothia parasitica* hypovirulence in culture. Phytopathology, 68(1), 75.

Yan, B., Li, Z., Huang, H., & Qin, L. 2007. Genetic diversity and population differentiation of chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in China as revealed by RAPD. Biochemical Genetics, 45(5), 487-506.

Zamora, P., Martín, A. B., Rigling, D., & Diez, J. J. 2012. Diversity of *Cryphonectria parasitica* in Western Spain and identification of hypovirus-infected isolates. Forest Pathology, 42(5), 412-419.

Zhang, D. X., Spiering, M. J., Dawe, A. L., & Nuss, D. L. 2014. Vegetative incompatibility loci with dedicated roles in allorecognition restrict mycovirus transmission in chestnut blight fungus. Genetics, 197(2), 701-714.

EKLER

EK-1. ***Cryphonectria parasitica*** **izolatlarının Avrupa vejetatif uyum tiplerini belirleyen *vic* lokusları (Cornejo *et al*. 2019)**

EK-2. Çalışmada elde edilen, moleküler olarak tanılanan hipovirüsler ve onların %99-100 benzerlik gösterdiği örneklerin erişim numaraları

EK-3. Çalışmada elde edilen *Cryphonectria parasitica* izolatlarının moleküler ve klasik yöntemlerle belirlenen vejetatif uyum tiplerinin karşılaştırılması

EK-4. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının vejetatif uyum tiplerinin *vic* lokusları ve mating tipleri

EK-5. Hipovirüs aktarımı yapılan izolatların karakterizasyonu

EK-1. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının Avrupa vejetatif uyum tiplerini belirleyen *vic* lokusları (Cornejo *et al*. 2019)

EU Tipi	***vic1a***	***vic2***	***vic3a***	***vic4***	***vic6***	***vic7***
EU-1	2	2	1	2	2	2
EU-2	2	1	1	2	2	2
EU-3	2	2	1	2	1	2
EU-4	1	1	1	2	2	2
EU-5	2	2	1	1	2	2
EU-6	2	1	1	1	2	2
EU-7	2	2	1	2	2	1
EU-8	1	1	1	2	2	1
EU-9	2	1	1	1	1	1
EU-10	2	1	2	2	1	1
EU-11	1	2	1	2	1	1
EU-12	1	1	1	2	1	1
EU-13	1	2	1	1	1	1
EU-14	2	1	1	2	1	2
EU-15	2	2	1	1	1	1
EU-16	2	1	1	1	2	1
EU-17	2	1	1	2	1	1
EU-18	2	2	1	1	2	1
EU-19	1	2	1	1	2	1
EU-20	1	1	1	1	2	2
EU-21	2	2	1	1	1	2
EU-22	2	1	1	2	2	1
EU-23	2	1	1	1	1	2
EU-24	1	2	1	1	1	2
EU-25	1	2	1	2	2	1
EU-26	1	2	1	2	2	2
EU-27	1	1	1	1	1	2
EU-28	2	2	1	2	1	1
EU-29	1	1	1	2	1	2
EU-30	1	2	1	2	1	2
EU-31	1	2	1	1	2	2
EU-32	2	1	2	2	1	2
EU-33	2	2	2	2	1	1
EU-34	1	1	2	1	1	1
EU-35	2	2	2	2	1	2
EU-36	2	1	2	1	1	1
EU-37	1	2	2	1	1	1

EK-1 (Devam)

EU Tipi	***vic1a***	***vic2***	***vic3a***	***vic4***	***vic6***	***vic7***
EU-38	2	1	2	2	2	2
EU-39	2	1	2	2	2	1
EU-40	1	1	2	2	1	1
EU-41	2	2	2	2	2	1
EU-42	1	1	1	1	1	1
EU-43	1	1	1	1	2	1
EU-44	2	2	2	2	2	2
EU-45	1	2	2	2	1	1
EU-46	2	2	2	1	1	1
EU-47	1	2	2	2	2	1
EU-48	1	2	2	2	1	2
EU-49	1	1	2	2	2	1
EU-50	1	1	2	1	1	2
EU-51	2	2	2	1	1	2
EU-52	1	2	2	1	1	2
EU-53	1	1	2	1	2	1
EU-54	1	2	2	2	2	2
EU-55	1	2	2	1	2	2
EU-56	1	1	2	2	1	2
EU-57	2	1	2	1	2	1
EU-58	2	1	2	1	1	2
EU-59	2	1	2	1	2	2
EU-60	2	2	2	1	2	2
EU-61	1	1	2	1	2	2
EU-62	1	1	2	2	2	2
EU-63	1	2	2	1	2	1
EU-64	2	2	2	1	2	1
EU-65	2	2	2	2	2	1
EU-66	2	1	1	1	1	1
EU-67	1	1	1	2	2	2
EU-68	2	1	2	2	2	2
EU-69	1	2	1	1	2	1
EU-70	1	2	1	1	1	1
EU-71	2	2	2	1	1	1
EU-72	1	2	2	1	1	1
EU-73	2	2	2	2	1	1
EU-74	1	2	1	1	1	1

EK-2. Çalışmada elde edilen, moleküler olarak tanılanan hipovirüsler ve onların %99-100 benzerlik gösterdiği örneklerin erişim numaraları

Örnek No	İzolat	GenBank Erişim Numarası	Benzelik Gösterdiği İzolatların GenBank Erişim Numarası
1	AM01	OM908395	MH321855, KT868540
2	AM02	OM908402	MH321832, JX970075
3	AM03	OM908405	MH321855, KT868541
4	AM04	OM908412	MH321855, KT868541
5	AM05	OM908411	MH321832, JX970075
6	AM06	OM908400	MH321832, JX970075
7	BL01	OM908396	MH321832, JX970075
8	BL03	OM908398	MH321832, JX970075
9	BU06	OM908397	MH321832, JX970049
10	ÇK01	OM908413	MH321832, JX970075
11	KS01	OM908399	MH321832, JX970075
12	KS04	OM908409	MH321855, MH321832
13	KS07	OM908404	MH321855, JX970028 *
14	Sİ02	OM908407	MH321855, JX970028
15	Sİ03	OM908401	MH321832, JX970075
16	YL01	OM908406	MH321832, JX970075
17	YL09	OM908403	MH321832, JX970075
18	ZN04	OM908410	JX970028, MH321855
19	ZN12	OM908408	MH321832, JX970075

*Benzerlik oranı %98,90 ve %98,62

EK-3. Çalışmada elde edilen *Cryphonectria parasitica* izolatlarının moleküler ve klasik yöntemlerle belirlenen vejetatif uyum tiplerinin karşılaştırılması

Örnek No	Örnek	Moleküler Yöntemler EU Tipi	Klasik Yöntemler EU Tipi	Kültür Özelliği
1	AM01	EU-1	EU-1	HV
2	AM02	EU-1	EU-1	HV
3	AM03	EU-1	EU-1	HV
4	AM04	EU-1	EU-1	HV
5	AM05	EU-1	EU-1	HV
6	AM06	EU-1	EU-1	HV
7	AM07	EU-1	EU-1	V
8	AM08	EU-1	EU-1	V
9	AM09	EU-1	EU-1	V
10	AM10	EU-1	EU-1	V
11	AM11	EU-1	EU-1	V
12	AY01	EU-12	EU-12	V
13	AY02	EU-1	EU-1	V
14	AY03	EU-1	EU-1	V
15	AY04	EU-1	EU-1	V
16	AY05	EU-12	EU-12	V
17	AY06	EU-1	EU-1	V
18	AY07	EU-1	EU-1	V
19	AY08	EU-12	EU-12	V
20	AY09	EU-1	EU-1	V
21	AY10	EU-1	EU-1	V
22	AY11	EU-12	EU-12	V
23	AY12	EU-1	EU-1	V
24	AY13	EU-12	EU-12	V
25	AY14	EU-1	EU-1	V
26	AY15	EU-1	EU-1	V
27	AY16	EU-12	EU-12	V
28	AY17	EU-12	EU-12	V
29	AY18	EU-12	EU-12	V
30	AY19	EU-12	EU-12	V
31	AY20	EU-12	EU-12	V
32	BL01	EU-1	EU-1	HV

EK-3 (Devam)

Örnek No	Örnek	Moleküler Yöntemler EU Tipi	Klasik Yöntemler EU Tipi	Kültür Özelliği
33	BL02	EU-1	EU-1	HV
34	BL03	EU-1	EU-1	HV
35	BL04	EU-1	EU-1	V
36	BL05	EU-1	EU-1	V
37	BL06	EU-1	EU-1	V
38	BL07	EU-1	EU-1	V
39	BL08	EU-1	EU-1	HV
40	BL09	EU-1	EU-1	HV
41	BL10	EU-1	EU-1	HV
42	BL11	EU-1	EU-1	V
43	BL12	EU-1	EU-1	V
44	BL13	EU-1	EU-1	HV
45	BL14	EU-1	EU-1	HV
46	BL15	EU-1	EU-1	V
47	BL16	EU-1	EU-1	HV
48	BL17	EU-1	EU-1	HV
49	BL18	EU-1	EU-1	HV/V
50	BU01	EU-1	EU-1	V
51	BU02	EU-1	EU-1	HV
52	BU03	EU-1	EU-1	V
53	BU04	EU-1	EU-1	V
54	BU05	EU-1	EU-1	V
55	BU06	EU-1	EU-1	HV
56	ÇK01	EU-1	EU-1	HV
57	ÇK02	EU-1	EU-1	V
58	ÇK03	EU-1	EU-1	V
59	ÇK04	EU-1	EU-1	V
60	ÇK05	EU-1	EU-1	V
61	ÇK06	EU-1	EU-1	V
62	ÇK07	EU-1	EU-1	V
63	ÇK08	EU-1	EU-1	V
64	ÇK09	EU-1	EU-1	V
65	ÇK10	EU-1	EU-1	V

EK-3 (Devam)

Örnek No	Örnek	Moleküler Yöntemler EU Tipi	Klasik Yöntemler EU Tipi	Kültür Özelliği
66	ÇK11	EU-1	EU-1	V
67	ÇK12	EU-1	EU-1	V
68	ÇK13	EU-1	EU-1	V
69	ÇK14	EU-1	EU-1	V
70	ÇK15	EU-12	EU-12	V
71	ÇK16	EU-1	EU-1	V
72	ÇK17	EU-1	EU-1	V
73	ÇK18	EU-1	EU-1	V
74	ÇK19	EU-1	*-	V
75	ÇK20	EU-1	-	V
76	ÇK21	EU-1	-	V
77	ÇK22	EU-1	EU-1	V
78	DE01	EU-12	EU-12	V
79	DE02	EU-1	EU-1	V
80	DE03	EU-1	EU-1	V
81	DE04	EU-1	EU-1	V
82	DE05	EU-1	EU-1	V
83	DE06	EU-1	EU-1	V
84	DE07	EU-1	-	V
85	DE08	EU-12	EU-12	V
86	DE09	EU-12	EU-12	V
87	DE10	EU-1	EU-1	V
88	DE11	EU-1	-	V
89	DE12	EU-1	-	V
90	DE13	EU-1	EU-1	V
91	DE14	EU-12	-	V
92	İZ01	EU-12	EU-12	V
93	İZ02	EU-1	EU-1	V
94	İZ03	EU-12	EU-12	V
95	İZ04	EU-12	EU-12	V
96	İZ05	EU-12	EU-12	V
97	İZ06	EU-12	EU-12	V
98	İZ07	EU-1	EU-1	V

EK-3 (Devam)

Örnek No	Örnek	Moleküler Yöntemler EU Tipi	Klasik Yöntemler EU Tipi	Kültür Özelliği
99	İZ08	EU-12	EU-12	V
100	İZ09	EU-1	EU-1	V
101	İZ10	EU-12	EU-12	V
102	İZ11	EU-12	-	V
103	İZ12	EU-1	EU-1	V
104	İZ13	EU-12	EU-12	V
105	İZ14	EU-1	EU-1	V
106	İZ15	EU-12	EU-12	V
107	İZ16	EU-1	EU-1	V
108	İZ17	EU-12	EU-12	V
109	İZ18	EU-12	EU-12	V
110	İZ19	EU-12	EU-12	V
111	İZ20	EU-1	-	V
112	İZ21	EU-12	-	V
113	İZ22	EU-12	-	V
114	İZ23	EU-12	-	V
115	İZ24	EU-1	-	V
116	KS01	EU-1	EU-1	HV
117	KS02	EU-1	EU-1	V
118	KS03	EU-1	EU-1	HV
119	KS04	EU-1	EU-1	HV
120	KS05	EU-1	EU-1	V
121	KS06	EU-1	EU-1	V
122	KS07	EU-1	EU-1	HV
123	KS08	EU-1	EU-1	V
124	KS09	EU-1	EU-1	HV
125	KS10	EU-1	EU-1	HV
126	KS11	EU-1	EU-1	HV
127	KT01	EU-1	EU-1	V
128	KT02	EU-1	EU-1	V
129	KT03	EU-1	EU-1	V
130	KT04	EU-1	EU-1	V
131	KT05	EU-1	EU-1	V
136	KT06	EU-12	EU-12	V

EK-3 (Devam)

Örnek No	Örnek	Moleküler Yöntemler EU Tipi	Klasik Yöntemler EU Tipi	Kültür Özelliği
133	KT07	EU-1	EU-1	V
134	KT08	EU-12	EU-12	V
135	KT09	EU-1	EU-1	V
136	KT10	EU-1	EU-1	V
137	KT11	EU-1	EU-1	V
138	KT12	EU-1	EU-1	V
139	KT13	EU-1	EU-1	V
140	KT14	EU-1	EU-1	V
141	KT15	EU-1	EU-1	V
142	MN01	EU-1	EU-1	V
143	MN02	EU-1	EU-1	V
144	MN03	EU-1	EU-1	V
145	MN04	EU-1	EU-1	V
146	MN05	EU-1	EU-1	V
147	MN06	EU-1	EU-1	V
148	MN07	EU-1	EU-1	V
149	MN08	EU-1	EU-1	V
150	MN09	EU-1	EU-1	V
151	MN10	EU-1	EU-1	V
152	Sİ01	EU-1	EU-1	HV
153	Sİ02	EU-1	EU-1	HV
154	Sİ03	EU-1	EU-1	HV
155	Sİ04	EU-1	EU-1	HV
156	Sİ05	EU-1	EU-1	HV
157	Sİ06	EU-1	EU-1	V
158	Sİ07	EU-1	EU-1	HV
159	YL01	EU-1	EU-1	HV
160	YL02	EU-1	-	V
161	YL03	EU-1	-	V
162	YL04	EU-1	-	V
163	YL05	EU-1	EU-1	V
164	YL06	EU-12	EU-12	V
165	YL07	EU-1	EU-1	V
166	YL08	EU-1	EU-1	V

EK-3 (Devam)

Örnek No	Örnek	Moleküler Yöntemler EU Tipi	Klasik Yöntemler EU Tipi	Kültür Özelliği
167	YL09	EU-1	EU-1	HV
168	YL10	EU-1	EU-1	HV
169	ZN01	EU-1	EU-1	V
170	ZN02	EU-1	-	HV
171	ZN03	EU-1	EU-1	V
172	ZN04	EU-1	-	HV
173	ZN05	EU-1	EU-1	V
174	ZN06	EU-1	EU-1	V
175	ZN07	EU-1	EU-1	V
176	ZN08	EU-1	EU-1	V
177	ZN09	EU-1	EU-1	V
178	ZN10	EU-1	-	HV
179	ZN11	EU-1	EU-1	V
180	ZN12	EU-1	EU-1	HV
181	ZN13	EU-1	EU-1	V
182	ZN14	EU-1	EU-1	V
183	ZN15	EU-1	EU-1	V

*(-) laboratuvar çalışmalarında uyum tipi belirlenemeyen izolatlar

EK-4. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının vejetatif uyum tiplerinin *vic* lokusları ve mating tipleri

Örnek	**EU Tipi**	***vic1a***	***vic2***	***vic3a***	***vic4***	***vic6***	***vic7***	***Mating type***
AM01	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
AM02	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
AM03	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
AM04	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
AM05	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
AM06	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
AM07	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
AM08	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
AM09	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
AM10	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
AM11	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
AY01	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
AY02	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
AY03	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
AY04	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
AY05	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
AY06	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
AY07	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
AY08	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
AY09	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
AY10	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
AY11	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
AY12	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
AY13	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
AY14	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
AY15	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
AY16	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
AY17	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
AY18	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
AY19	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
AY20	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
BL01	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
BL02	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
BL03	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
BL04	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
BL05	EU-1	2	2	1	2	2	2	1

EK-4 (Devam)

Örnek	**EU Tipi**	***vic1a***	***vic2***	***vic3a***	***vic4***	***vic6***	***vic7***	***Mating type***
BL06	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
BL07	EU-1	2	2	1	2	2	2	1/2*
BL08	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
BL09	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
BL10	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
BL11	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
BL12	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
BL13	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
BL14	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
BL15	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
BL16	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
BL17	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
BL18	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
BU01	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
BU02	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
BU03	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
BU04	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
BU05	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
BU06	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
ÇK01	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ÇK02	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ÇK03	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ÇK04	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ÇK05	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ÇK06	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ÇK07	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ÇK08	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ÇK09	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ÇK10	EU-1	2	2	1	2	2	2	1/2
ÇK11	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ÇK12	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ÇK13	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ÇK14	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ÇK15	EU-12	1	1	1	2	1	1	2
ÇK16	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ÇK17	EU-1	2	2	1	2	2	2	1/2
ÇK18	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ÇK19	EU-1	2	2	1	2	2	2	2

EK-4 (Devam)

Örnek	**EU Tipi**	***vic1a***	***vic2***	***vic3a***	***vic4***	***vic6***	***vic7***	***Mating type***
ÇK20	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ÇK21	EU-1	2	2	1	2	2	2	1/2
ÇK22	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
DE01	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
DE02	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
DE03	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
DE04	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
DE05	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
DE06	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
DE07	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
DE08	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
DE09	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
DE10	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
DE11	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
DE12	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
DE13	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
DE14	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
İZ01	EU-12	1	1	1	2	1	1	1/2
İZ02	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
İZ03	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
İZ04	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
İZ05	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
İZ06	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
İZ07	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
İZ08	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
İZ09	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
İZ10	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
İZ11	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
İZ12	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
İZ13	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
İZ14	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
İZ15	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
İZ16	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
İZ17	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
İZ18	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
İZ19	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
İZ20	EU-1	2	2	1	2	2	2	1

EK-4 (Devam)

Örnek	**EU Tipi**	***vic1a***	***vic2***	***vic3a***	***vic4***	***vic6***	***vic7***	***Mating type***
İZ21	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
İZ22	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
İZ23	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
İZ24	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
KS01	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
KS02	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
KS03	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
KS04	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
KS05	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
KS06	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
KS07	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
KS08	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
KS09	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
KS10	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
KS11	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
KT01	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
KT02	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
KT03	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
KT04	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
KT05	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
KT06	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
KT07	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
KT08	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
KT09	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
KT10	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
KT11	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
KT12	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
KT13	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
KT14	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
KT15	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
MN01	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
MN02	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
MN03	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
MN04	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
MN05	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
MN06	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
MN07	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
MN08	EU-1	2	2	1	2	2	2	1

EK-4 (Devam)

Örnek	**EU Tipi**	***vic1a***	***vic2***	***vic3a***	***vic4***	***vic6***	***vic7***	***Mating type***
MN09	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
MN10	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
Sİ01	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
Sİ02	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
Sİ03	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
Sİ04	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
Sİ05	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
Sİ06	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
Sİ07	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
YL01	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
YL02	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
YL03	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
YL04	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
YL05	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
YL06	EU-12	1	1	1	2	1	1	1
YL07	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
YL08	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
YL09	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
YL10	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
ZN01	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ZN02	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
ZN03	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
ZN04	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
ZN05	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
ZN06	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
ZN07	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ZN08	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
ZN09	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ZN10	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
ZN11	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
ZN12	EU-1	2	2	1	2	2	2	1
ZN13	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
ZN14	EU-1	2	2	1	2	2	2	2
ZN15	EU-1	2	2	1	2	2	2	2

*Heterokaryon izolatlar

EK-5. Hipovirüs aktarımı yapılan izolatların karakterizasyonu

Hipovirülent İzolat Adı	Tester İzolatlar	Virülent İzolatın Hipovirülent İzolata Dönüştürülmesi (Fenotipik Değerlendirme)	Phenol Oxidase Enzim Aktivitesi
Z04	EU-2	-*	Kuvvetli
	EU-3	+**	Zayıf
	EU-5	+	Zayıf
	EU-7	-	Kuvvetli
	EU-26	+	Zayıf
	EU-44	-	Kuvvetli
YL09	EU-2	-	Kuvvetli
	EU-3	+	Zayıf
	EU-5	+	Zayıf
	EU-7	-	Kuvvetli
	EU-26	+	Zayıf
	EU-44	+	Zayıf
BL03	EU-2	-	Kuvvetli
	EU-3	+	Zayıf
	EU-5	+	Zayıf
	EU-7	-	Kuvvetli
	EU-26	+	Zayıf
	EU-44	-	Kuvvetli
BL01	EU-2	-	Kuvvetli
	EU-3	+	Zayıf
	EU-5	+	Zayıf
	EU-7	-	Kuvvetli
	EU-26	+	Zayıf
	EU-44	+	Zayıf
ÇK01	EU-2	-	Kuvvetli
	EU-3	+	Zayıf
	EU-5	+	Zayıf
	EU-7	-	Kuvvetli
	EU-26	+	Zayıf
	EU-44	-	Kuvvetli
KS01	EU-2	-	Kuvvetli
	EU-3	+	Zayıf
	EU-5	+	Zayıf
	EU-7	-	Kuvvetli
	EU-26	+	Zayıf
	EU-44	-	Kuvvetli

EK-5 (Devam)

Hipovirület İzolat Adı	Tester İzolatlar	Virülent İzolatın Hipovirülent İzolata Dönüştürülmesi (Fenotipik Değerlendirme)	Phenol Oxidase Enzim Aktivitesi
BU06	EU-2	-	Kuvvetli
	EU-3	+	Zayıf
	EU-5	+	Zayıf
	EU-7	-	Zayıf+Kuvvetli
	EU-26	+	Zayıf
	EU-44	-	Kuvvetli
AM04	EU-2	-	Kuvvetli
	EU-3	+	Zayıf
	EU-5	+	Zayıf
	EU-7	-	Kuvvetli
	EU-26	-	Kuvvetli
	EU-44	-	Kuvvetli
AM03	EU-2	-	Kuvvetli
	EU-3	+	Zayıf
	EU-5	+	Zayıf
	EU-7	-	Zayıf+Kuvvetli
	EU-26	+	Zayıf
	EU-44	+	Zayıf
Sİ02	EU-2	-	Kuvvetli
	EU-3	+	Zayıf
	EU-5	+	Zayıf
	EU-7	-	Zayıf+Kuvvetli
	EU-26	+	Zayıf
	EU-44	-	Kuvvetli

*(-) Turuncu renkte gelişim gösteren izolat
** (+) Beyaz veya krem renkte gelişim gösteren izolat

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Deniz ÇAKAR

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2018
Yüksek Lisans (Tezsiz)	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ortaöğretim Alan Öğretmenliği	2009
Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2008

İş Deneyimi

Yıl	**Kurum**	**Görev**
2021-Halen	ÇAKÜ/ Merkez Araştırma Laboratuvarı	Öğretim Görevlisi
2013-2021	Tarım ve Orman Bakanlığı	Biyolog

Akademik Aktiviteler

1. Akıllı Şimşek, S., Katırcıoğlu, Y. Z., Çakar, D., Rigling, D., & Maden, S. 2018. Impact of fungal diseases on common box (*Buxus sempervires* L.) vegetation in Turkey. European Journal of Plant Pathology, 153(4), 1203-1220.
2. Akıllı Şimşek, S., Katırcıoğlu, Y. Z., Borst, N., Çakar, D., Prospero, S., Rigling, D., & Maden, S. 2019. Identification and characterization of hypovirus-infected *Cryphonectria parasitica* isolates from biological control plots in İzmir, Kütahya and Sinop. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 43(6), 527-537.
3. Akıllı Şimşek, S., Katırcıoğlu, Y. Z., Ulubaş Serçe, Ç., Çakar, D., Rigling, D., & Maden, S. 2019. Phytophthora species associated with dieback of sweet chestnut in Western Turkey. Forest Pathology, 49(4), e12533.