

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
2019-YL-154

DOĞU KARADENİZ BÖLGESİNDE
Cryphonectria parasitica **POPULASYONUNDA**
VEJETATİF UYUMSUZLUK (*vic*) GENLERİNİN
DAĞILIMININ PCR İLE BELİRLENMESİ

Esra HATİPOĞLU

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Ömer ERİNCİK

AYDIN

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

Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Esra HATİPOĞLU tarafından hazırlanan, ‘Doğu Karadeniz Bölgesinde *Cryphonectria parasitica* Popülasyonunda Vejetatif Uyumsuzluk (*vic*) Genlerinin Dağılımının PCR ile Belirlenmesi’ başlıklı tez 22/11/2019 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Ömer ERİNCİK	ADÜ Zir. Fak.	
Üye : Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ	ADÜ Zir. Fak.	
Üye : Prof. Dr. Pervin KINAY TEKSÜR	E. Ü. Zir. Fak.	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Gönül AYDIN

Enstitü Müdürü



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

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

22/11/2019

Esra HATİPOĞLU



ÖZET

DOĞU KARADENİZ BÖLGESİNDE *Cryphonectria parasitica* POPULASYONUNDA VEJETATİF UYUMSUZLUK (*vic*) GENLERİNİN DAĞILIMININ PCR İLE BELİRLENMESİ

Esra HATİPOĞLU

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ömer ERİNCİK

2019, 53 sayfa

Son yıllarda Türkiye’de kestane kanseri etmeni *Cryphonectria parasitica*’nın vejetatif uyum gruplarının sayısında önemli artışların olduğu gözlemlenmektedir. Bu çalışma, vejetatif uyum grup çeşitliliğinin yüksek bulunduğu Doğu Karadeniz Bölgesinde *C. parasitica*’nın vc gruplarının, vejetatif uyumsuzluk (*vic*) genlerine ait moleküler belirteçler kullanılarak, PCR ile belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Çalışmada, 20 adet arazi ve 30 adet tek askospor izolatının *vic* genotipleri, *vic1*, *vic2*, *vic3*, *vic4*, *vic6* ve *vic7* gen bölgelerine ait spesifik primerler ile belirlenmiştir. Arazi izolatları arasında, EU-2, EU-3, EU-7, EU-8, EU-12, EU-17, EU-21, EU-22, EU-30 ve EU-55 olmak üzere, 11 vc grup, 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 olmak üzere, 15 vc grup bulunmuştur. Ardından her bir izolat, ait olduğu *vic* genotipine ait Avrupa vc grup testerleri ile klasik test olan besi yerinde eşleştirme testine tabi tutulmuştur. Arazi izolatlarından 15’i, tek askospor izolatlarından ise, 21’inde, PCR ile eşleştirme testlerinin sonuçları örtüşmüştür. Ancak 5 arazi ile 9 tek askospor izolatında, iki testin sonuçları örtüşmemiştir. Bu bulgular, 2 allelli 6 *vic* geni ile kontrol edildiği düşünülen *C. parasitica*’ya ait vejetatif uyumsuzluk sisteminde, başka *vic* geni veya allellerin var olduğu görüşünü kuvvetlendirmektedir. Vc grup tanısında kullanılan PCR testinin, eşleştirme testine göre, çok daha pratik ve hızlı sonuç vermesine rağmen, iki yöntem sonuçlarının her zaman tutarlı olmaması, *vic* genleri üzerinde daha çok çalışmaların yapılmasının gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Kestane, Kestane kanseri, *Cryphonectria parasitica*, vejetatif
eri



ABSTRACT

DETECTION OF DISTRIBUTION OF VEGETATIVE INCOMPATIBILITY GENES (*vic*) of *Cryphonectria parasitica*, POPULATION in THE EASTERN BLACKSEA REGION

Esra HATİPOĞLU

Ms.C. Thesis, Department of Animal Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Ömer ERİNCİK

2019, 53 pages

In recent years, it has been observed that the number of vegetative compatibility group of chestnut blight agent, *Cryphonectria parasitica*, increased significantly. The aim of this study was to determine vc groups of *C. parasitica* in the Eastern Black Sea Region, where vegetative compatibility group diversity was high, by using PCR with molecular markers being developed from 6 vegetative incompatibility loci. In this study, *vic* genotypes of 20 field and 30 single ascospore isolates were determined by using specific primers belonging to *vic1*, *vic2*, *vic3*, *vic5*, *vic6* and *vic7* gene regions. Among field isolates, 11 vc groups were identified as EU-2, EU-3, EU-7, EU-8, EU-12, EU-17, EU-21, EU-22, EU-30 and EU-55. Single ascospore isolates divided into 15 vc groups as EU-1, EU-2, EU-3, EU-5, EU-8, EU-11, EU-12, EU-17, EU-21, EU-22, EU-29. According to PCR genotyping each isolate was subjected to pairing in coculture testing with European vc group tester. In 15 of the field isolates and in 21 of the single ascospore isolates, there is good agreement between PCR and coculturing testing. But, in 5 field and 9 single ascospore isolates, there are disagreement between tests. These findings suggested that there is another *vic* genes or alleles related to *vic* genes in vegetative incompatibility system in *C. parasitica* which has been thought to be controlled by 6 *vic* genes with 2 alleles. Although PCR based assay is much more practical and faster than coculture test, the results of the two methods are not always consistent and it is necessary to make more studies on *vic* genes.

Key words: Chestnut, Chestnut blight, *Cryphonectria parasitica*, vegetative incompatibility types, *vic* genes.



ÖNSÖZ

Kestane, başta Ege Bölgesi olmak üzere ülkemizin Marmara ve Karadeniz Bölgelerinde yaygın olarak yetişmektedir. Kestane ağacının en önemli problemlerinden biri ağaçlarda ölümlere neden olan Kestane Kanseri hastalığıdır. Bu hastalığa neden olan etmen *Cryphonectria parasitica* adında bir fungustur. İç ve dış karantinaya tabi olan bu hastalık, bulaşık olduğu yerlerde daha çok kültürel mücadele ile kontrol edilmeye çalışılmaktadır. Bunun dışında etmenin hipovirü lent ırklarının doğal olarak bulunduğu yerlerde biyolojik mücadele ile hastalık kendiliğinden ya da yapay uygulamalar ile kontrol edilebilmektedir. Hipovirü lent ırklar, sadece konukçu hücre içinde yaşayabilen dsRNA virüsleri içermektedir. Uygun koşullarda, hipovirü lent ırk, virü lent ırka anastomosis yoluyla dsRNA'sını aktarmakta ve bu dsRNA virü lent ırkta çoğalarak, virü lent ırkı, hipovirü lent ırka dönüştürmektedir. Bu şekilde öldürücü hastalık, öldürücü olmayan, kallus dokuları ile yeni kambiyum tabakası oluşturarak, ağacı öldürmeyen bir forma dönüştürmektedir. Fakat pratikte herşey bu kadar kolay olmamaktadır. Fungusun vejetatif uyumsuzluk (*vic*) genleri, anastomosis olayının olma olasılığını düşürmektedir.

Ayrıca fungusun eşeyli üremesiyle genetik rekombinasyonlar olması ve tip çeşitliliğini arttırarak, hipovirü lensliğin yayılmasını engellemektedir. Bu nedenle birçok ülkede ve grupları çalışılarak, biyolojik mücadelenin başarısını tahmin etmek amacıyla kullanılmıştır. Ülkemizde Doğu Karadeniz Bölgesinde yapılan bir çalışmada ve tip çeşitliliğinin arttığı saptanmıştır. Bu çeşitliliğin ortaya çıkışı *C. parasitica*'da 2 allelli 6 adet *vic* geninin farklı kombinasyonlarda biraraya gelmesiyle olmaktadır. Bu çalışmada Doğu Karadeniz Bölgesinden toplanan izolatlar arasında, farklı ve gruplarından seçilen *C. parasitica* izolatlarında *vic* genlerinin dağılımı incelenmiştir. Elde edilen bulgular, ülkemizde *C. parasitica* populasyonunda ortaya çıkan bu değişimin anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Yüksek lisansa başladığım günden, çalışmalarımın sonuna kadar tecrübelerinden yararlandığım, danışman hocam sayın Prof. Dr. Ömer ERİNCİK'e, çok teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	8
2.1.Genel Tanım.....	8
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	24
3.1.Materyal	24
3.2.Yöntem.....	24
3.2.1. İzolatların Kültürde Yetiştirilmesi ve Misel Eldesi.....	24
3.2.2. DNA Ekstrasyonu	25
3.2.3.Vic Gen Bölgeleri için Kullanılacak Primerler ve PCR Koşulları	25
3.2.4. Jel Elektroforez	26
3.2.5. <i>Cryphonectria parasitica</i> İzolatlarının Klasik Eşleştirme Testi ile Vc Gruplarının Belirlenmesi	29

4.BULGULAR	31
4.1. <i>Vic1</i> Gen Bölgesi.....	31
4.2. <i>Vic2</i> Gen Bölgesi.....	31
4.3. <i>Vic3</i> Gen Bölgesi.....	32
4.4. <i>Vic4</i> Gen Bölgesi.....	33
4.5. <i>Vic6</i> Gen Bölgesi.....	33
4.6. <i>Vic7</i> Gen Bölgesi.....	34
4.7. İzolatların Allelleri ve <i>Vic</i> Genotipleri.....	35
4.8. <i>Vic</i> Allellerinin Bulunma Oranları	37
4.9. PCR <i>Vic</i> Genotiplerinin Eşleştirme Testi ile Teyit Edilmesi	38
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	41
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	53

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

TARBİYOMER	: Tarımsal Biyoteknoloji ve Gıda Güvenliği Uygulama ve Araştırma Merkezi
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
FAO	: Food Agriculture Organization
EPPO	: European and Mediterranean Plant Protection
PCR	: Polymerase Chain Reaction
CHV	: <i>Cryphonectria hypovirus</i>
PDA	: Potato Dextrose Agar
DNA	: Deoxyribo Nucleic Acid
MAT	: Mate
dsRNA	: double stranded Ribo Nucleic Acid
dNTP	: deoxy Nucleotide Tri Phosphate
SSR	: Simple Sequence Repeats
UV	: Ultra Violet
<i>vic</i>	: vegetative incompatibility
rpm	: rotatory per minute
bp	: base pair
M	: Molar

xvi

mg : miligram

gr : gram

kg : kilogram

μ l : microliter

: yüzde



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarından elde edilen PCR ürünlerinin % 1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü (üst jel: <i>vic</i> 1 [allel 1: 308 bp, allel 2: 1470 bp] alt jel: <i>vic</i> 3 [allel 1: 538 bp, allel 2: 1203 bp])	27
Şekil 3.2. PCR için örneklerin hazırlanması	28
Şekil 3.3. Jel-elektroforez görüntüsünün bilgisayara aktarılması	28
Şekil 3.4. <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının vc grup testleri	30
Şekil 3.5. <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatları ile Avrupa testerları arasındaki vejetatif uyum ve uyumsuzluk	30
Şekil 4.1. <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının <i>vic1a</i> -F, <i>vic1a</i> -1R ve <i>vic1a</i> -2R primerleri ile yapılan PCR testleri sonrasında elde edilen DNA bantlarının elektroforez görüntüsü	31
Şekil 4.2. <i>Cryphonectria. parasitica</i> izolatlarının <i>vic2a</i> -F, <i>vic2a</i> -1R ve <i>vic2a</i> -2R primerleri ile yapılan PCR testleri sonrasında elde edilen DNA bantlarının elektroforez görüntüsü	32
Şekil 4.3. <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının <i>vic3a</i> -1F, <i>vic3a</i> -2F, <i>vic3a</i> -1R ve <i>vic3a</i> -2R primerleri ile yapılan PCR testleri sonrasında elde edilen DNA bantlarının elektroforez görüntüsü.....	32
Şekil 4.4. <i>Cryphonectria. parasitica</i> izolatlarının <i>vic4</i> -pF, <i>vic4</i> -1pR ve <i>vic4</i> -2pR primerleri ile yapılan PCR testleri sonrasında elde edilen DNA bantlarının elektroforez görüntüsü	33
Şekil 4.5. <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının <i>vic6</i> -1F, <i>vic6</i> -2F, <i>vic6</i> -1R ve <i>vic6</i> -2R primerleri ile yapılan PCR testleri sonrasında elde edilen DNA bantlarının elektroforez görüntüsü.....	34

Şekil 4.6. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının *vic7-F*, *vic7-1R* ve *vic7-2R* primerleri ile yapılan PCR testleri sonrasında elde edilen DNA bantlarının elektroforez görüntüsü 34



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünyadaki 2016 yılı kestane üretim miktarları.....	2
Çizelge 1.2. 2017 yılı Türkiye’de bölgelere göre kestane üretimi miktarları.....	2
Çizelge 1.3. 2017 yılı Türkiye’de illere göre kestane varlığı ve kestane üretim miktarları	3
Çizelge 1.4. Yıllara göre Türkiye kestane ihracatı	4
Çizelge 1.5. 2008-2018 yıllarında Türkiye genelinde kestane üretimi	4
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primer dizilimleri ve elde edilen bant büyüklükleri.....	26
Çizelge 4.1. Arazi <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının <i>vic</i> genlerinin allel dağılımları ve <i>vic</i> genotipleri	36
Çizelge 4.2. Tek askospor <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının allel dağılımları ve <i>vic</i> genotipleri	37
Çizelge 4.3. <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarında <i>vic</i> allellerinin bulunma oranları.....	38
Çizelge 4.4. Arazi <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının eşleştirme testinde, PCR <i>vic</i> genotipi testeri ile vejetatif uyum durumu.....	38
Çizelge 4.5. Tek askospor <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının eşleştirme testinde PCR <i>vic</i> genotipi testeri ile vejetatif uyum durumu	39



1. GİRİŞ

Fagaceae familyasının *Castanea* cinsinde bulunan kestane, daha çok Kuzey Yarım Kürede yetişen ve coğrafik bölgelere göre, farklı türler altında varolan bir orman ağacıdır. En yaygın olarak bilinen kestane formları, Avrupa, Çin, Japon ve Amerikan kestaneleridir. Avrupa kestanesi, *Castanea sativa* diye bilinen tek tür olup, adından da anlaşılacağı gibi başta ülkemiz olmak üzere, Avrupa’da yayılım gösteren ve meyvesinin özelliğinden dolayı ‘tatlı kestane’ olarak da bilinen türdür. Asya kökenli türler olan Japon kestanesi, tek tür olan *Castanea crenata*’yı, Çin kestanesi ise, *Castanea mollissima*, *Castanea davidii*, *Castanea henryi* ve *Castanea seguinii* türlerini içerisinde barındırmaktadır. Amerika kıtasında bulunan kestane türleri ise, başta *Castanea dentata* olmak üzere, *Castanea pumila*, *Castanea alnifolia*, *Castanea ashei*, *Castanea floridana* ve *Castanea paucispina*’dır. Sözü edilen bu türler morfolojileri, biyolojileri ve yaşam istekleri yönünden birbirinden farklılıklar gösterirler. Örneğin; Japon kestane ağaçlarının boyları ortalama 10 m olurken, Çin kestaneleri 15 m, Avrupa kestaneleri 30 m, Amerikan kestaneleri ise 60 m’ye kadar ulaşabilmektedir (Anonim, 2018a).

Kestanenin meyvesinin yenilebilir olması, odunundan elde edilen kerestenin mobilya sanayinde değerlendirilmesi, dokularından elde edilen tanenin deri boya sanayinde kullanıyor olması ve bir orman ağacı olarak ekolojik öneminin olması gibi sebepler kestane çok değerli kılmaktadır. Kestane meyvesi, sahip olduğu lezzeti sebebiyle, gıda sektöründe çok çeşitli şekillerde değerlendirilen, pazar değeri yüksek bir üründür. Kuru ve soyulmuş kestane meyvesinde, yüksek oranda karbonhidrat (57,8 g./100 g.), çok az yağ (3,4 g./100 g.) ve protein (6 g./100 g.) bulunmakta olup, gluten bulunmamaktadır. Bazı bölgelerde kestane ağaçları, meyvelerinden, kestane unu yapılması sebebiyle ‘ekmek ağaç’ diye de adlandırılmaktadır. Kestane, C vitamini (65 mg/100 g.) içeren tek kuruyemiştir (Karabulut, 2017).

Dünyada toplam kestane üretimi, 2016 yılında, 2.197.017 tondur. Kestane üretimi yapan başlıca ülkeler, Çin, Türkiye, Güney Kore, İtalya, Yunanistan, Portekiz, Japonya ve İspanya’dır. FAO’nun 2016 yılı rakamlarına göre, 1.903.939 ton ile Çin ilk sırada yer almaktadır. Türkiye, 64.750 ton ile ikinci sırada, 53.600 ton ile Güney Kore üçüncü sırada yer almaktadır. Bunu sırasıyla İtalya, Yunanistan, Portekiz, Japonya ve İspanya takip etmektedir. Çin, dünya kestane üretiminin % 86,7’si gibi, çok büyük bir bölümünü karşılamakta olup, Türkiye’nin payı ise, % 2,9’dur.

Türkiye, kestane üretiminde dünyada ikinci, Avrupa’da ise, birinci ülkedir (Anonim, 2017).

Çizelge 1.1. Dünyadaki 2016 yılı kestane üretim miktarları (Anonim, 2017)

Ülkeler	Üretim(ton)	Dünyadaki payı (%)
Çin	1.903.939	86,7
Türkiye	64.750	2,9
Güney Kore	53.600	2,4
İtalya	52.240	2,4
Yunanistan	28.280	1,3
Portekiz	26.780	1,2
Japonya	16.500	0,8
İspanya	16.178	0,7
Diğer	34.750	1,6
Toplam (dünya)	2.197.017	100

Türkiye’de kestane üretimine, bölgeler bazında baktığımızda, 2017 verilerine göre, Ege Bölgesi 42.278 ton ile birincidir. Karadeniz Bölgesi ise, 15.040 ton ile ikinci gelmektedir. Marmara Bölgesinin 2017 yılı kestane üretimi ise, 5.495 ton olmuştur. Türkiye’nin kuzey kıyıları kestane için çok elverişli bölgelerdir. Marmara’da, İstanbul, Kocaeli ve Sakarya’dan sonra, Karadeniz’de, Düzce, Zonguldak, Bartın, Kastamonu, Sinop, Samsun, Ordu, Giresun, Trabzon, Rize ve Artvin’de kestane alanları kesintisiz devamlılık göstermektedir. (Karabulut, 2017).

Çizelge 1.2. 2017 yılı Türkiye’de bölgelere göre kestane üretimi miktarları (Karabulut, 2017)

Bölgeler	Kestane üretimi (ton)
Marmara Bölgesi	5.495
Ege Bölgesi	42.278
Akdeniz Bölgesi	79
Karadeniz Bölgesi	15.040
Doğu Anadolu Bölgesi	12
Toplam	62.904

Türkiye’de kestane üretimine iller bazında baktığımızda, Aydın, kestane üretiminin %39’unu karşılayarak birinci sırada yer almaktadır. Yıllara göre değişiklik göstermekle beraber, Aydın’da kestane üretimi 20-25 bin ton arasında olmaktadır. İzmir, 11.542 ton ile ikinci, Bartın, 4.090 ton ile üçüncü sırada yer almaktadır. Kestanenin türev ürünleri ile meşhur il olan Bursa ise, 1.990 ton ile 8. sıradadır (Karabulut, 2017).

Çizelge 1.3. 2017 yılı Türkiye’de illere göre kestane varlığı ve kestane üretimi miktarları (Karabulut, 2017)

Şehirler	Meyve veren ağaç sayısı	Meyve vermeyen ağaç sayısı	Alan (dekar)	Üretim (ton)
Aydın	670.082	114.165	70.633	24.304
İzmir	365.150	66.944	25.169	11.542
Bartın	118.380	7.840	11	4.090
Sinop	157.350	44.720	129	3.755
Kastamonu	88.777	10.487	3.252	3.124
Manisa	56.605	14.955	4.054	2.354
Kütahya	101.851	52.489	65	2.075
Bursa	53.597	13.123	4.358	1.990
Denizli	67.095	7.157	808	1.898
Zonguldak	49.416	2.026	0	1.246
Balıkesir	35.670	10.752	751	1.118
Çanakkale	28.040	3.328	287	1.113
Diğer	186.749	29.248	5.987	4.295
Toplam	1.978.762	377.234	115.504	62.904

Avrupa’nın en büyük kestane üreticisi olan Türkiye’nin, son yıllarda kestane meyve ihracatında önemli artışlara sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 1.4). 2015 yılında 5 bin ton dolaylarında olan kestane ihracatının 2017 yılında iki kat artarak, yaklaşık 10 bin tona çıktığı görülmektedir. Buna paralel olarak 2015 yılında yaklaşık 14 milyon dolar olan ihracat geliri, 2017 yılında 38 milyon dolara yükselmiştir. Türkiye, 2017 yılı dünya kestane ihracatında, Çin ve İtalya’dan sonra üçüncü sırada yer alarak, dünya kestane ihracatındaki payı % 12,9 olmuştur (Karabulut, 2017). Türkiye’nin 64 bin tonluk üretim potansiyeli düşünüldüğünde, bu ihracat miktarının yine de istenilen düzeyde olmadığı söylenebilir. Türkiye’nin kestane ihracatı yaptığı ülkeler çoğunlukla Avrupa ülkeleri olup, en fazla ihracat yapılan ülke, son yıllarda Avrupa kestane birinciliğini Türkiye’ye kaptırmış olan İtalya’dır.

Çizelge 1.4. Yıllara göre Türkiye kestane ihracatı (Karabulut, 2017)

Ülkeler	2017 (kg)	2017 (ABD \$)	2016 (kg)	2016 (ABD \$)	2015 (kg)	2015 (ABD \$)
İtalya	6.907.885	26.560.848	4.791.925	16.314.045	2.476.430	6.364.806
Lübnan	1.742.131	6.116.470	2.056.413	5.423.330	1.912.269	5.404.957
Almanya	295.235	1.420.088	286.285	1.057.608	186.711	610.155
İngiltere	166.720	600.553	102.263	289.327	96.280	283.022
Fransa	127.940	442.022	4.190	14.364	10.315	36.507
Ürdün	172.260	429.687	340.980	593.865	388.675	928.450
İspanya	64.000	299.697	42.000	135.493	21.500	64.580
Macaristan	66.000	155.705	44.100	52.258		
Hollanda	35.239	155.642	43.778	151.857	28.782	94.966
Avusturya	30.258	143.037	11.143	33.577	15.896	56.078
Toplam	9.820.501	36.793.529	7.903.077	24.065.454	5.136.858	13.843.521

Geçmişte Türkiye’de her yıl belirli oranda kestane vermeyen ağaçların üretime dahil olması ile kestane üretiminde düzenli bir artış görülmüştür. 2008 yılında 55.395 ton olan meyve üretimi, 2014 yılında 64 bin tonlara ulaşmıştır. Ancak son beş yılın verilerine bakıldığında, kestane üretiminde artışın durduğu dikkat çekmektedir. 2016 yılında yeni ekimler sayesinde 64.750 tona ulaşmış, 2018 yılında ise, 63.580 ton olmuştur (Anonim, 2019).

Çizelge 1.5. 2008-2018 yıllarında Türkiye genelinde kestane üretimi (Anonim, 2019).

Yıllar	Türkiye kestane üretim miktarı (ton)
2008	55.395
2009	61.697
2010	59.171
2011	60.270
2012	57.881
2013	60.019
2014	63.762
2015	63.750
2016	64.750
2017	62.904
2018	63.580

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de kestane üretimini olumsuz etkileyen bir takım faktörler bulunmaktadır. Bunlar kestane kanseri, mürekkep hastalığı gibi fungal hastalıklarla, kestane iç kurdu, kestane kirpi güvesi, kestane kurdu, yumru arıcığı ve kestane gal arısının neden olduğu zararlardır (Anonim, 2008). Bu

problemlerden en önemlisi şüphesiz kestane ağaçlarında ölümlere neden olan kestane kanseri hastalığıdır (Anonim, 2012). Bir fungal patojen olan *Cryphonectria parasitica*'nın neden olduğu kestane kanserinin ülkemizde varlığı 1967 yılından beri bilinmektedir (Akdoğan ve Erkan, 1968). Günümüzde hastalık neredeyse kestanenin yetiştiği tüm alanlara yayılmış olup, girdiği birçok yerde önemli sayıda ağaç ölümlerine neden olmuştur. Ülkemizde kestanenin en fazla üretildiği yer olan Ege Bölgesinde hastalık yaklaşık 20 yıldır zarar vermektedir. Aydın ilinde ilk görüldüğü yerlerde, günümüzde % 100'e yakın oranlarda ağaç ölümlerinin meydana geldiği görülmektedir. Çok yıllık yavaş büyüyen bir ağaç olan kestanede, ölen ağaçların yerine yenisinin yetiştirilmesi çok uzun zaman alacağından hastalık sebebiyle ortaya çıkacak verim kayıplarının etkisi, uzun yıllar hissedilecektir (Anonim, 2008).

Amerikan kestanesi ve Avrupa kestanesi gibi duyarlı kestane türlerinde hastalığın mücadelesi oldukça zordur. Bir karantina patojeni olmasına rağmen, dünyada hastalığın yayılmasının önüne geçilememiştir. Kimyasal kontrolü olmayan hastalığın mücadelesinde, sanitasyon ve hipovirulent ırklar kullanılarak yapılan biyolojik mücadele önemli bir yer tutmaktadır. Sanitasyon, fungal patojenin inokulum kaynaklarının azaltılması veya yok edilmesi amacıyla yapılırsa da, çok bulaşık alanlarda etkisi düşük olmaktadır. Biyolojik mücadelede ise, hastalığın kontrolü doğada kendiliğinden var olan hipovirulent ırklar tarafından sağlandığı gibi, bu hipovirulent ırkların yapay uygulamaları ile de gerçekleştirilmektedir (Heiniger ve Ringling, 1994). Bugüne kadar kestane kanserinin mücadelesinde en etkili sonuç veren mücadele yöntemi olan biyolojik kontrol, hipovirulent ırklarda bulunan sitoplazmik dsRNA virüsleri aracılığıyla olmaktadır. Hipoviridae familyasından, *Hipovirüs* cinsine ait bu dsRNA virüsleri, *C. parasitica*'da virülensliğin azalmasına neden olarak patojenin ölümcül seviyede kanser oluşturmamasına neden olurlar. Hipovirülenslik olarak adlandırılan bu olay dsRNA virüsünün virulent bireylere bulaşması ile doğada ölümcül kanserleri hipovirülente dönüştürerek ağacın iyileşmesini sağlarlar (Choi vd., 1992). *C. parasitica*'da, *Cryphonectria hipovirüs 1* (CHV-1), CHV-2, CHV-3 ve CHV-4 olmak üzere dört hipovirüs türünün varlığı bilinse de, bunlar içerisinde CHV1 en etkili biyolojik kontrol sağlayan türdür (Hillman ve Suzuki, 2004). Başarılı biyolojik mücadele sonuçlarının elde edildiği Avrupa'da CHV-1 türü yaygın olarak bulunmaktadır (Heiniger ve Ringling, 1994).

Yukarıda da belirtildiği gibi hipovirülenslik, doğada kendiliğinden olmakla beraber,

birçok Avrupa ülkesinde yapay olarak da kestane ağaçlarında uygulanmaktadır. Ancak gerek kendiliğinden yayılan hipovirülenslikte, gerekse de yapay uygulamalar da biyolojik mücadelenin başarılı olmasında kestane bitkisi, *C. parasitica* ile CHV1'in populasyon yapıları ve çevresel faktörler önemli rol oynamaktadır. Bu faktörlerin başında *C. parasitica*'nın vejetatif uyum grupları gelmektedir. *C. parasitica*'da hipovirülensliğe neden olan dsRNA virüsünün bir fungal bireyden diğerine geçişi, iki birey arasında oluşan anastomosis adı verilen hif birleşmesi ile gerçekleşmektedir. Anastomosis oluşumu ise, aynı vc grubundan olan bireyler arasında meydana gelirken farklı vc grupları arasında apoptosis adı verilen programlı hücre ölümü ile engellenmektedir. Böyle durumlarda hipovirülen izolat hif temasında bulunduğu virulent izolata sitoplazmasında bulundurduğu dsRNA virüsünü aktaramamaktadır (Biella vd., 2002). Biyolojik mücadelede başarıyı, dsRNA virüsünün doğada kendiliğinden yayılma potansiyeli önemli oranda etkilemektedir. Bu nedenle biyolojik mücadele uygulaması yapılacak alanlarda *C. parasitica*'nın vc grup çeşitliliğinin bilinmesi son derece önemlidir. *C. parasitica*'nın Avrupa'da tanısı yapılmış en az 64 adet vc grubu bulunmakta olup, bunlar farklı coğrafyalarda değişen bulunma yoğunlukları ile dağılım göstermektedirler. Vc grup çeşitliliğinin az olduğu coğrafyalarda biyolojik mücadelenin daha etkili bir kontrol sağladığı birçok çalışmada öne sürülmüştür. Bu görüşler doğrultusunda hemen hemen *C. parasitica*'nın görüldüğü her ülkede, vc gruplar en çok ilgi gösterilen çalışma konuları olmuştur.

Ülkemizde de, kestane kanserinin biyolojik mücadelesine temel olması amacıyla geçmişte *C. parasitica*'nın vc grupları birçok bölge için çalışılmıştır. Yapılan ilk çalışmalarda *C. parasitica*'nın vc grup sayısının birçok bölgede 1 ve 2 ile sınırlı olduğu saptanmıştır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda ülkemizde vc grup sayısının giderek arttığı yönünde bulgular elde edilmiştir. İlk olarak Akıllı vd. (2009) Karadeniz Bölgesinde 5 farklı vc grup varlığını rapor etmiştir. Daha sonra Daldal ve Erincik (2018) tarafından Ege Bölgesinde üçüncü bir vc grup olan EU-2'nin varlığı bildirilmiştir. En son olarak da, Mangil ve Erincik (2018) Doğu Karadeniz Bölgesinde 10 farklı vc grubun varlığını saptamıştır. Aynı çalışmada 6 vc grubun Avrupa uyum grupları ile uyum sağlamadığı rapor edilmiştir. Ülkemizde vc grup artışının nedeni tam olarak anlaşılmasa da, Mangil ve Erincik (2018) Doğu Karadeniz Bölgesinde *C. parasitica* vejetatif uyuşmazlık genlerinin eşeyli üreme ile rekombinasyonu sonucu, yeni vc grupların ortaya çıktığını, doğada elde ettikleri peritesyumlardan izole ettikleri tek askospor izolatlar üzerinde ortaya koymuşlardır.

Ayrıca bazı vc grupların hiçbir Avrupa uyum grubu ile eşleşmemelerinden dolayı, bu bölgede farklı *vic* genleri barındıran bir popülasyonun varlığının olabileceğini de öne sürmüşlerdir. Nitekim mikrosatellit analizleri, *C. parasitica*'nın Gürcistan popülasyonunun, Avrupa'dan gelen genotiplerden farklılık gösterdiğini ve bu bölgede farklı bir gen havuzunun olduğunu ortaya koymuştur (Prospero vd., 2013'e atfen Rigling ve Prospero, 2018). Hem Gürcistan, hem de Doğu Karadenizde etmenin eşeyli ürettiği bilinmektedir. Rüzgarla yayılma özelliğine sahip eşeyli spor olan askosporların ülkelerin sınırlarını geçerek, her iki ülkede popülasyon karışımlarına neden olma ihtimali oldukça yüksektir. Nitekim Mangil ve Erincik (2018), Gürcistan sınırına yakın olan Artvin ve Rize illerinde, vc grup çeşitliliğini yüksek bulmuşlar ve bunların bir kısmının Avrupa testerları ile de uyum göstermediklerini bildirmişlerdir.

C. parasitica'nın genetiği üzerine yapılan ilk çalışmalarda (Cortesi vd., 1998) Avrupa popülasyonları içerisinde 2 allelli, en az 6 *vic* geni tanımlanmış ve bunların eşeyli üreme sonucu kombinasyonlarının, $2^6=64$ vc grup oluşumuna neden olmuştur. Bir kısmı laboratuvar koşullarında oluşturulmuş bu 64 vc grup, *C. parasitica*'nın popülasyon genetiği çalışmalarında tester olarak uzun yıllardır kullanılmıştır. Bunun dışında son yıllarda moleküler düzeyde yapılan çalışmalarla vc gruplarını tanımlayan *vic* genlerini belirleyen primerler de tasarlanarak, kullanıma sunulmuş ve moleküler yöntemler ile vc grupların saptanması mümkün olmuştur (Cortesi ve Milgroom, 1998).

Ülkemizde Doğu Karadeniz Bölgesinde *C. parasitica* popülasyonunda meydana gelen bu değişimin anlaşılması, ülkemizde kestane kanserinin mücadelesinin başarılı bir şekilde yapılması için önem arz etmektedir. Ülkemiz, hem Avrupa, hem de Gürcistan kaynaklı vc grup çeşitliliğinin bulunduğu nokta konumunda olduğu görülmektedir. Yakın bir gelecekte, vc grup çeşitliliğinde büyük artış görülebilir. *C. parasitica* popülasyonlarındaki değişimin hızlı ve güvenilir bir şekilde takip edilmesini sağlayacak moleküler tanı yöntemlerinin kullanılacağı bu çalışma ülkemizde ilk defa yürütülmüş olacaktır. Bu çalışma ile vc grup çeşitliliğinin arttığı Doğu Karadeniz Bölgesinde, *C. parasitica*'nın *vic* genlerinin allel dağılımları PCR kullanılarak ortaya konulmuştur.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Genel Tanım

Kestane kanseri etmeni, 1906 yılında Murrill tarafından *Diaporthe parasitica* olarak, daha sonra 1912 yılında, *Endothia* cinsine ait olduğu düşünülerek, *Endothia parasitica* olarak adlandırılmıştır (Shear v.d., 1917). *Endothia* ve *Cryphonectria* cinsi, benzer turuncu üreme yapıları olduğundan genellikle karıştırılmaktadır (Barr, 1978). 1978 yılında yapılan çalışmalarla, etmenin cinsi, *Cryphonectria* olarak değiştirilmiştir (Micales ve Stipes, 1987). Kestane kanseri etmeni, Ascomycota şubesinin, Pezizomycota alt şubesi, Sordariomycetes sınıfı, Diaporthales takımı ve Valsaceae familyasına ait bir fungustur (Anonim, 2018b).

C. parasitica'nın hem seksüel, hem de aseksüel sporları enfeksiyona neden olabilmektedir. Etmenin seksüel sporları peritesyumlarda, aseksüel sporları, piknidyumlarda üretilmektedir. Bu yapılar, renkleri sarı-turuncudan, kırmızı-kahverengine kadar değişen, çapları 0,5 - 4 mm, yükseklikleri 2,5 mm olan stroma adı verilen fungal yapılar üzerinde gelişmektedir. Peritesyum, 300 – 400 µm çapında, küre şeklinde bir yapı olup, 200 µm çapında ve 600 µm uzunluğunda ostiol denilen açıklığı olan silindirik bir boyuna sahiptir. Peritesyumların içinde, 32 – 55 x 7 – 8,5 µm boyutlarında silindirik, ince duvarlı, askus denilen spor keseleri bulunmaktadır. Askusların içinde, 7 -12 x 3,5 – 5 µm boyutlarında, eliptik şekilde, 8'er adet askospor bulunmaktadır. Askosporlar, ostiol denilen açıklıktan, havaya hızla fırlatılmakta ve rüzgarla yüzlerce metre uzağa taşınmaktadırlar. Rüzgarlı bölgelerde hastalığın yayılmasındaki en önemli etken, askosporlardır. Piknidyumlar ise, stromaların içinde yeralan, 100 – 300 µm çapında düzensiz oyuklardır. Boyutları 3,5 x 1,5 - 2 µm, şekilleri elipsoitten, basiliforma kadar değişen yapışkan konidileri barındırmaktadırlar. Konidiler zaman zaman kıvrık ve saydam görünebilmektedirler. Nemli havalarda, piknidyumdan çıkarak, 1 cm'den uzun olabilen sarı, kıvrık sirrhus denilen yapıları oluşturmaktadırlar. Konidyumlar ıslandıklarında yapışkan, kuruduklarında ise, sert olduğundan, rüzgarla taşınamayıp, yağmur suyuyla yıkanarak ve sıçrayarak yayılmaktadırlar. Ancak, kuşlar, böcekler, akarlar veya rüzgarın taşıdığı tozlar, konidileri çok uzaklara taşıyabilmektedir. Kullanılan alet ve malzemeler ve de hastalıktan ölmüş ya da kesilmiş ağaçlar da sporların yayılmasında rol oynamaktadırlar (EPPO, 2005).

Kestane kanseri etmeni *C. parasitica*, Doğu Asya orijinlidir (Rigling ve Prospero, 2018). 20. yüzyılda patojen enfekteli kestane bitkileri ile Kuzey Amerika ve Avrupa'ya taşınmıştır (Dutech vd., 2012). İlk olarak hastalık, H. W. Merkel (1905) tarafından, 1904 yılında New York hayvanat bahçesindeki, Bronx parkında görülmüştür. Kurtarma çalışmaları için belirli bir bütçe ayrılmasına karşın, 1905 yılında Bronx parkında bütün kestane ağaçlarının % 98'i enfekte olmuştur. 1904 yılında New York'ta görüldükten sonra, her yıl 30 km'den uzak bir alana ulaşarak, Kuzey Amerika'nın doğu kısmına yayılmıştır (Anagnostakis, 1987). Amerikan kestanesine bağımlı olan, kereste, fiçı, tannin, elyaf levhası ve kuruyemiş endüstrileri için, felaket olmuştur (Diller, 1965). 1911 yılında, finansal kayıp 25 milyon dolar olarak bildirilmiştir (Metcalf ve Collins, 1911). Genetik analizler kadar, tarihi kayıtlar da, *C. parasitica*'nın Japonya'nın Honshu adasından, Kuzey Amerika'ya geldiğini göstermektedir (Dutech v.d., 2012). Avrupa'da ilk olarak, İtalya'nın Cenova şehri yakınlarında 1938 yılında görülmüştür. Yapılan genetik analizler, etmenin Kuzey Amerika'dan İtalya'ya geldiğini göstermiştir (Dutech vd., 2012). Türkiye'de varlığı 1967 yılında saptanmıştır (Akdoğan ve Erkan, 1968). *C. parasitica*'nın yayılma nedeni, 1920 ve 1950'li yıllarda Amerika ve Asya'dan, Avrupa'ya yapılan kestane bitkisi ihracatlarıdır (Dutech vd., 2012). Bu ihracatların nedeni ise, o sıralarda kestane bitkisinin en önemli hastalığı olan *Phytophthora cinnamomi* ve *Phytophthora cambivora*'nın neden olduğu mürekkep hastalığına karşı, dayanıklı kestane elde etmektir. Kestane kanseri, Avrupa kıtasının kestane yetişen bütün bölgelerinde görülmüştür (Heiniger ve Rigling, 1994).

1951 yılında, İtalya'nın Cenova şehrinde, bitki patoloğu Antonio Biraghi, bazı kanser yaralarında iyileşmeler görmüştür. Biraghi (1954), bu iyileşmelerin konukçu, patojen veya çevreden kaynaklanabileceğini düşünmüştür. Enfeksiyona karşı, kallus dokusunun oluşumunu, dayanıklı Asya kestanelerine benzettiği için, bu iyileşmelerin Avrupa kestanelerindeki doğal dayanıklılığın sonucu olduğunu belirtmiştir. Bunun nedeninin araştırılması için, İtalyan, İspanyol, İsveç ve Fransız bitki patalogları ile bağlantıya geçilmiştir. Fransız bilim adamı Grente (1965), iyileşmelerin konukçudan çok patojen kaynaklı olduğunu düşünmüştür. Avrupa kestanesinden, iki farklı tipte kanser yarasından izolasyon yapmış, tipik kanser izolatının çok fazla sayıda piknidyum içeren parlak turuncu renkte, iyileşen kanser yaralarından alınan izolatın ise, çok az piknidyum içeren, beyazdan açık turuncu rengine giden renkte olduğunu görmüştür. Farklı morfolojiden iki izolat üzerinde yapılan patojenisite testlerinde, beyaz koloniye sahip izolatın, normal turuncu

görünümlü izolata göre, virülensliğinin daha düşük olduğu, ortaya konmuştur. Bunun üzerine, Grente, beyaz koloniye sahip izolatu ‘hipovirulent’ veya ‘H-strains’ olarak isimlendirmiştir.

Grente ve Sauret (1969a), kestane kanseri olan ağaca, hipovirulent ırk inokule edildiğinde, ağaçta iyileşme gözlendiğini belirtmişlerdir. Grente ve Sauret (1969b), hipovirülensliğin, bulaşıcı bir stoplazmik determinant ile kontrol edildiğini ve bir bireyden, diğerine geçtiğini öne sürmüştür. Bu görüşleri doğrultusunda, beyaz izolat ile normal turuncu izolatı besi ortamında yanyana geliştirmiş ve turuncu izolatın beyaza dönüştüğünü gözlemlemiştir. Bunun üzerine hipovirülensliğe neden olan elementin anastomosis yoluyla aktarıldığı görüşünü öne sürmüştür. Grente ve Sauret, bu konuda çalışmalarına devam etmiş ve birden fazla izolatın birbiriyle eşleştirdiğinde, bazılarında dönüşümün olmadığını gözlemlemiştir. Hatta böyle reaksiyon veren eşleştirmelerde, protoplast bozulması olduğunu ve anastomosisin gerçekleşmediğini bildirmişlerdir. Vejetatif uyumsuzluk olarak adlandırılan bu olayın, biyolojik mücadele uygulamalarında dikkat edilmesi gereken önemli bir husus olduğunu vurgulamışlardır.

Grente’nin bu bulgularından sonra, kestane kanserinin biyolojik mücadelesine yönelik olarak hipovirulent ırklar ve *C. parasitica*’nın vejetatif uyum grupları, bir çok ülkede en çok çalışılan konulardan biri olmuştur. Özellikle, Van Alfen v.d. (1975) tarafından hipovirülensliğin sebebinin dsRNA elementinin olduğunun ve hastalığın kontrolünde bu dsRNA’nın patojenik ırka hifsel anastomosis ile aktarılmasıyla meydana geldiğinin anlaşılması üzerine, kestane kanserinin biyolojik mücadelesi ile ilgili çalışmalar tüm dünyada hız kazanmıştır. Andes (1961), *C. parasitica* izolatlarını, PDA besi ortamında eşleştirdiğinde, bazı izolatların kolonilerinin birleştiğinin, bazılarının ise, aralarında engellenme çizgisi ya da yoğun piknit oluşumu ile bir baraj oluşumu gözlemlenmesi ve bu baraj oluşumunun *C. parasitica* vejetatif uyumsuzluk sistemi ile ilişkilendirilmesi ile daha sonraki yıllarda birçok araştırmacının vejetatif uyum gruplarını belirlemede kullanılabilecek vejetatif uyum testinin geliştirilmesinin önünü açmıştır.

Anagnostakis (1977), İtalya, Fransa ve Kuzey Amerika kökenli *C. parasitica* izolatlarını bir petri kabında, PDA üzerine, 1 cm. arayla yerleştirerek, eşleştirme yöntemi ile vejetatif uyum testini gerçekleştirmiştir. Aralarında baraj oluşturan 28 farklı vejetatif uyum grubunun varlığının bildirildiği çalışmada, *C. parasitica*’da vejetatif uyumsuzluk sisteminin her biri, iki allelli en az 5 gen tarafından

yönetildiği öne sürülmüştür.

Anagnostakis (1978), farklı vc gruplarının aralarında çaprazlaması sonucu elde ettiği vc grup sayıları üzerinden *C. parasitica*'da vejetatif uyumsuzluk gen sayısının en az 6 ve her bir genin iki allelinin olduğunu ve toplamda 64 farklı vc grup olabileceğini öne sürmüştür. Aynı zamanda, virülent gruplarla, hipovirülent grupları çaprazlayarak, kanser kontrolü için gerekli kombinasyonları bulmak üzere, çalışmalar yapmıştır.

MacDonald ve Double (1978), ABD'de West Virginia eyaletinde, 16 farklı lokasyondan elde ettikleri 202 *C. parasitica* izolatının vejetatif uyum gruplarını belirlemişlerdir. Çalışmada 179 izolat, 14 farklı vc grubu oluşturmuştur. Geri kalan 23 izolat ise, kendi aralarında çoğunlukla herhangi bir uyum göstermemiştir. Hastalık yoğunluğunun yüksek olduğu lokasyonlarda, vc grup çeşitliliği yüksek bulunmuştur. Çoklu kanser barındıran ağaçların, sadece % 25'inde tek vc grubu bulunmuştur. Bu çalışma, West Virginia'da, ne sıklıkla farklı vc grupların bulunduğunu anlamak üzere, hipovirulens arazi denemeleri ile birlikte yürütülmüştür.

Liu ve Milgroom (1996), hipovirüs yatay taşınımı ile farklı vc gruplarında, farklı olan *vic* gen sayısı arasındaki negatif korelasyonun varlığını araştırmışlardır. Çalışmada bütün vejetatif yönden uyumlu olan izolatlar arasında, hipovirüsün yatay taşınımı gerçekleşirken, aralarında sadece tek bir *vic* geninde farklılık olan izolatlar arasında, % 50'lere varan bir yatay taşınım gözlemlenmiştir. *Vic* gen sayı farklılığı ikiye düştüğünde, yatay taşınım oranı % 13'lere düşmüştür. Farklı olan *vic* gen sayısı, 2'nin üzerine çıktığında, yatay taşınım % 3'lere kadar gerilemiştir. Bu çalışma ile iki izolat arasında farklı olan *vic* genlerinin sayısının artması ile hipovirüs geçişinin olumsuz etkilenmekte olduğu gösterilmiştir.

Cortesi vd. (1996)'nın çalışmasında, İtalya'nın 11 farklı kestane bölgesinden toplanan 716 *C. parasitica* izolatı, vejetatif uyum yönünden test edilmiştir. Çalışma sonunda, toplam 20 vc grubu belirlenmiştir. Vc tiplerinden dördü, tüm örneklerin % 85'ini oluşturmuştur. Vc tiplerinin dağılımı coğrafik bölgelere göre, önemli oranda farklılık göstermektedir. En dominant 3 vc tip (I-1, I-2 ve I-5) Kuzey İtalya'da bulunurken, bu bölgede vc tip çeşitliliği de, güney İtalya'ya göre yüksek bulunmuştur. Güney İtalya'yada I-10 ve I-12 dominant bulunmuştur.

Bissegger vd. (1997), İsviçre’de iki kestane bölgesinden (Limuno ve Gnosca) elde ettiği *C. parasitica* izolatlarının karakterizasyonunu yapmıştır. Lumino’da toplanan 86 izolat, 14 vc grubuna, Gnosca’da toplanan 56 izolat, 16 vc grubuna ayrılmıştır. Toplamda 21 vc grup tanımlanmıştır. Geçmişte (1976-1979) sadece 10 vc grubun bulunduğu İsviçre’de, vc grup çeşitliliğinin arttığı ve bunun sebeplerinin bölgede etmenin eşeyli üremesi ile oluşan rekombinasyonlar, İtalya gibi kestane kanserinin olduğu ülkelerden yeni patojen girişleri, ve *vic* genlerindeki mutasyonlar olabileceği öne sürülmüştür.

Cortesi v.d. (1998)’nin çalışmasında, 11 İtalyan altpopulasyonundan 20 vc grup ve 5 İsviçre altpopulasyonundan 26 vc grup aralarında vejetatif uyum yönünden test edilmişlerdir. Test sonuçlarına göre, 31 farklı vc grup bulunmuştur, 15’inin her iki ülkede de bulunduğu, 5 İtalyan vc grubun sadece İtalya’da, 11 İsviçre vc grubunun sadece İsviçre’de olduğu tespit edilmiştir. Grupları standardize etmek amacıyla 31 vc grup EU ile başlayan ve numara ile devam eden EU-1’den EU-31’e kadar olacak şekilde bilimsel adlandırma yapılmıştır. Bu isimlendirme günümüzde de geçerliliğini korumaktadır. Çalışma da her iki ülkede dominant olan vc grup EU-2 olarak belirlenirken, EU-1 ve EU-5 her iki ülkede birer popülasyonda dominant bulunmuştur. EU-12, İtalya’nın güney kısımlarında ve İsviçre’de iki lokasyonda bulunmuştur.

Cortesi ve Milgroom (1998) çalışmalarında, Avrupa popülasyonu içerisinde *C. parasitica*’da vejetatif uyumsuzluğun genetik yapısını incelemişlerdir. Daha önceleri rapor edilen *vic1*, *vic2*, *vic3*, ve *vic4* genlerinin yanında *vic6* ve *vic7* olarak adlandırılan 2 genin varlığını saptamışlardır. Her bir gen bölgesinin 2 allelinin olduğu ve bunların farklı kombinasyonları $2^6 = 64$ farklı vc grubunun oluşmasına neden olmuştur. Çalışmada farklı vc grupların aralarında çaprazlanmaları sonucunda elde edilen 64 vc grup, genotipik olarak karakterize edilmiştir. Bu izolatlar, vc tester izolat seti olarak standart hale getirilerek, daha sonraki yapılan çalışmalarda bir çok araştırmacı tarafından kullanılmıştır.

Milgroom ve Cortesi (1999), ABD’nin Maryland eyaletinden 57, Batı Virginia eyaletinden 59 ve New York eyaletinden 60 *C. parasitica* izolatının vc gruplarını belirlemek için yaptıkları çalışmalarda, Avrupa vc grupları ile uyumlu Maryland’da, 23 Batı Virginia’da 22, New York’ta ise, 20 vc grubu tanımlanmıştır. Hiçbir Avrupa vc grubu ile uyummayan Maryland’ta 3, Batı Virginia’da 8, New York’ta 14 vc grubu saptanmıştır. Vc çeşitliliğin yüksek olması, ABD’de biyolojik mücadelenin

başarısızlığının bir nedeni olabileceği öne sürülmüştür.

Robin vd. (2000) tarafından Fransa'nın 6 farklı bölgesinden toplanan 1113 *C. parasitica* izolatının vc grupları belirlenmiştir. Çalışma sonucunda 30 farklı vc grup bulunmuştur. En fazla vc grup, 14 ile Dordogne bölgesinde bulunmuştur. Sörvey yapılan altı bölgeden beşinde, ortalama % 56 bulunma oranı ile EU-2 en dominant vc grup bulunmuştur. Bu grubu, EU-1 ve EU-5 izlemiştir. EU-33 ve EU-38 vc grupları doğada ilk olarak bu çalışma ile bulunmuştur. Bunun dışında Avrupa grupları ile uyumlu olmayan 10 yeni vc grup bulunmuş ve bunlar EU-65'ten EU-74'e kadar isimlendirilmişlerdir. Bu sonuçlar gözönünde bulundurulduğunda, Fransa'nın özellikle Dordogne Bölgesinde, *C. parasitica*'nın farklı bir popülasyonunun olduğu ileri sürülmüştür. Daha önce rapor edilen iki alleli 6 gen sistemi, bu çalışmada bulunan yeni vc grupları kapsamamaktadır. Araştırmacılar, 7. vic geni yada 3. allelin var olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca çalışma sonuçları, 1981 yılında yapılan bir çalışmanın sonuçları ile karşılaştırılmış ve Fransa'da vc grup sayısının önemli oranda arttığı bildirilmiştir.

Hoegger vd. (2000), İsviçre'de kestane kanserinin yeni görüldüğü kuzey kestaneliklerinde 3 bölgedeki (Choeöx, Weggis ve Murg) *C. parasitica* popülasyonlarını, hastalığın uzun zamandır varlığının bilindiği güney bölgesindeki (Claro) popülasyonları ile karşılaştırmışlardır. Choeox ve Murg'de bir dominant vc tip ve 3 DNA fingerprint bulunurken, Weggis'te 2 dominant vc tip ve 5 DNA fingerprint bulunmuştur. Buna karşılık hastalığın geçmişinin daha uzun olduğu Claro bölgesinde 9 vc grup ve 33 DNA fingerprintin varlığı ortaya konmuştur. Bu sonuçlar fungus popülasyonunda genetik çeşitliliğin hastalığın yeni girdiği bölgelerde düşük bulunurken, geçmişinin uzun olduğu bölgelerde yüksek olduğunu göstermektedir.

Cortesi v.d. (2001), 6 vic lokasyonunun herbirindeki heteroallelizmin etkilerini ölçmüştür. Alıcı ve verici izolatların genotipleri aynı olduğunda, virüs geçişinin % 100 olduğunu, bir vic lokasyonunda heteroallelizm olduğunda ise, virüs geçişinin nadiren olduğunu tespit etmiştir. Vic4'teki heteroallelizmin, virüs geçişine etkisi olmadığını, vic2'de ise, izolat çiftlerinin sadece % 21'inde virüs geçişi olduğunu, vic3'te, % 76, vic6'da ise, % 32 virüs geçişinin olduğunu göstermiştir. Vic1, vic2 ve vic7'nin heteroallelilik olması durumunda, virüs geçişinin, alıcı ve vericide hangi alellerin olduğuna bağlı olduğunu, yani asimetric özelliğe sahip olduklarını, tespit etmiştir. İki vic lokasyonundaki heteroallelizmin etkileri

birbirinden bağımsız olmasına karşın, diğer 4 *vic* lokasyonunda küçük ama, istatistiki açıdan önemli epistasis gözlenmiştir. *Vic* lokasyonlarındaki heteroallelizmde, asimetrik özellik ve epistasisin, virüs geçişini kontrol eden baskın faktörler olduğu, fakat genetik geçmişin de önemli olduğu sonucuna varmıştır.

Trestic vd. (2001), Bosna-Hersek'ten topladıkları 920 *C. parasitica* izolatında Avrupa testerları ile uyumlu olan 29 *vc* grup bulmuşlardır. Baskın olarak bulunan *vc* grupları, EU-12, EU-2 ve EU-1'dir. Ülkenin coğrafik bölgelerine göre, *vc* grup çeşitliliği ve dominant *vc* tipler farklılıklar göstermiştir. Yimidokuz *vc* grubun tamamı, ülkenin kuzey batı kısmında bulunmuştur. Ülkenin doğu kısmında sadece 1 *vc* tip (EU-12) bulunmuştur. Orta ve kuzey doğuda EU-1 ve EU-2, kuzeybatıda EU-13 dominant olarak bulunmuştur. İspanya'nın Katalonya bölgesinde ise, dokuz *vc* grup bulunmuştur. Dominant *vc* gruplar EU-2, EU-1, EU-12 ve EU-5 olarak belirlenmiştir. Daha önce ilk olarak Fransa'da rapor edilen EU-65, EU-66, EU-67 ve EU-72 ve Avrupa *vc* grup ile uyumlu olmayan bir grupta varlığı bildirilmiştir. Fransa'da ise, incelenen 3 bölgenin popülasyonu birbirinden farklılıklar göstermiştir. Dordogne bölgesinde incelenen 44 izolat içerisinde, 17 *vc* grup bulunmuştur. Bunların arasında, EU-33 dominant bulunmuştur. Pyrenes Atlantiques'te 9 farklı *vc* grup içerisinde, EU-72 dominant *vc* grup, Gard'ta ise, 8 farklı grup içerisinde, EU-1 ve EU-5 dominant *vc* gruplar olarak bulunmuştur. Dordogne'da sekiz farklı *vc* grup oluşturan 19 izolat, Pyrenes Atlantiques'te 6 farklı *vc* grup oluşturan 10 izolat, Gard'ta 1 izolat, Avrupa uyum grupları (EU-1-EU-74) ve İspanya'daki yeni *vc* gruplar ile uyumlu bulunmamıştır.

Sotirovski vd. (2004), Makedonya'dan 20 farklı popülasyondan topladıkları 786 *C. parasitica* izolatında, 5 *vc* grubunun (EU-1, EU-2, EU-10, EU-12, EU-22) varlığını, Yunanistan'dan 10 farklı popülasyondan topladıkları 379 izolatın tamamının ise, bir *vc* grupta (EU-12) olduğunu bildirmişlerdir. Daha önce Güney İtalya'da dominant olarak bildirilmiş EU-12, Makedonya'da % 94 bulunma oranı ile tüm popülasyonlarda en dominant *vc* grup olarak bulunmuştur. Makedonya'da 20 popülasyondan 13'ünde ve Yunanistan'ın tüm popülasyonlarında, EU-12 tek başına bulunmuştur. EU-2 ise, dört lokasyonda bulunurken, Osoj lokasyonunda % 29 bulunma oranına sahip olmuştur. Test edilen izolatların % 98'inin MAT-1 eşey tipinde olması, etmenin eşeyli üreme olasılığını çok düşürmüştür. Bu durum, hem Makedonya, hem de Yunanistan'da *vc* çeşitliliğinin düşük olması ile ilişkilendirilmiştir. Nitekim hiçbir örnekte etmenin eşeyli üreme yapısı olan peritesyumlara rastlanmamıştır.

Adamcikova v.d. (2006)'nin, Slovakya'da topladıkları 215 *C. parasitica* izolatu, 4 vc grup içerisinde yer almıştır. Yüzde 93 bulunma oranı ile tüm popülasyonlarda bulunan dominant vc grup EU-12 olmuştur. Diğer gruplardan EU-2, 1 izolat ile bir popülasyonda; EU-8, 2 izolat ile bir popülasyonda ve EU-13 ise, 12 izolat ile 2 popülasyonda bulunmuştur.

Perlerou ve Diamindis (2006), Yunanistan'da 11 farklı popülasyondan topladıkları 627 *C. parasitica* izolatının, % 88'inin EU-12, % 6'sının EU-2, % 3'ünün EU-10 ve % 2'sinin EU-1 olduğunu bildirmişlerdir. İncelenen 11 popülasyonun 10'unda EU-12 bir hayli dominant bulunurken, Güney Yunanistan'ın Arcadia Bölgesinde, EU-2 dominant bulunmuştur. EU-2'nin varlığına, bunun dışında 4 popülasyonda daha rastlanmıştır. EU-1 ve EU-10, sadece birer popülasyonda bulunmuştur. Kanseri örneklerinde peritesyumun olmaması, tek mating tipi olması ve doğal hipovirülensliğin bulunmasından dolayı, biyolojik mücadelenin başarılı bir şekilde gerçekleştirilebileceği sonucuna varılmıştır.

Spica vd. (2006), Güney İtalya'nın Calabria bölgesinden topladıkları 179 adet *C. parasitica* izolatlarının, 4 vc grubunun (EU-1, EU-2, EU-10 ve EU-12) içerisinde yer aldığını bildirmişlerdir. Bunlardan İtalya'nın tüm bölgelerinde rastlanılan EU-2, üç popülasyonda dominant vc grup olarak bulunmuştur. İtalya'nın güneyinde daha önce varlığı bildirilen EU-12 ve EU-10 ve İtalya'nın kuzeyinde yaygınlık gösteren EU-1, çalışılan tüm popülasyonlarda bulunmuştur. Eşey tipleri MAT-1 ve MAT-2'nin her ikisinin de, bütün popülasyonlarda bulunması ve 1:1 bulunma oranında dağılım göstermesi, etmenin bu bölgede eşeyli ürediğinin kanıtı olarak öne sürülmüştür. Ancak eşeyli üremenin, vc tip çeşitliliğini henüz etkileyen bir faktör olmadığı belirtilmiştir.

Kubisiak ve Milgroom (2006), *C. parasitica*'da vejetatif uyumsuzlıktan sorumlu *vic* genlerine ait markör geliştirme çalışmaları yürütmüşlerdir. Çalışmada ilk olarak birbirine yakın genler olan *vic1* ve *vic2*'nin kromozomlar üzerindeki konumları belirlenmiştir. Ardından bu genler ile ilintili *vic4*, *vic6* ve *vic7* genleri için, markörler geliştirilmiştir.

Bragança vd. (2007), Portekiz'in, anakarası ile Madeira ve Azores adalarından topladıkları 617 *C. parasitica* izolatında, 9 vc grup bulmuşlardır. Bu 9 gruptan 7'si Avrupa uyum grupları ile uyumlu bulunurken, 2 grup uyumsuz bulunmuştur. En yaygın vc grup, % 80,2 ile EU-11 olmuştur. Sırasıyla % 7,1 ile EU-2 ve % 6,6 ile

EU-66 gelmiştir. Populasyon başına vc tip sayısı 1 ile 4 arasında değişmektedir. Bu durum, Portekiz’de vc grup çeşitliliğinin düşük olduğunu göstermektedir. Peritesyum ve mating tiplerinin ikisinin de varlığı, etmenin eşeyli ürediğini göstermiştir.

Liu ve Milgroom (2007), Japonya’dan 6 popülasyondan topladıkları 79 *C. parasitica* izolatında, 71 vc grup bulmuşlardır. Çin’den topladıkları iki popülasyonda, her bir izolatın ayrı vc gruba ait olduğunu, üçüncü Çin popülasyonunda ise, 25 izolatta, 15 vc grup tespit etmişlerdir. Çin’den toplanan hiçbir izolat, Avrupa testereleri ile uyumlu bulunmamıştır. Japonya’da bulunan 71 vc gruptan, sadece 3’ünün, Avrupa testerelerinden EU-24 ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, Cortesi ve Milgroom (1998)’un daha önce rapor ettiği iki alleli 6 *vic* sistemine uymamaktadır. Bu 6 *vic* geninin haricinde, başka genlerin olabileceği yada bazı *vic* gen lokuslarında 2’den fazla allelin olabileceği bildirilmiştir.

Montenegro v.d. (2008), İspanya’nın kuzeybatısında, A Coruna, Lugo, Ourense, Pontevedra ve Leon’dan topladıkları 539 *C. parasitica* izolatı içinde 6 vc grubu bulmuşlardır. Bunlardan 2’si EU-1 ve EU-66 olarak tanımlanırken, diğer 4 vc grup, Avrupa vc grupları ile uyuşmamıştır. Bu gruplar, E-1, E-2, E-3 ve E-4 olarak adlandırılmışlardır. Bunlardan E-1’in varlığı üç bölgede bulunurken, Lugo ve Ourense’te oldukça dominant olduğu belirlenmiştir. E-2, Leon hariç dört bölgede bulunurken, E-3 ve E-4 sadece Leon bölgesinde bulunmuştur. Lugo bölgesinde ise, hiçbir izolat Avrupa uyum grupları ile eşleşmemiştir. İncelenen bölgenin batı kısmı olan Leon bölgesinde ise, EU-1’in bir hayli dominant olduğu belirlenmiştir. Çalışmada son zamanlarda yeni vc grupların rapor edildiği Fransa’dan Robin vd., (2000) ve Portekiz’den Braganca’nın bulgularına atıf yapılarak, yeni bir *vic* geninin ya da üçüncü bir allelin, *C. parasitica* vejetatif uyum sistemini etkilemiş olacağı öne sürülmüştür.

Kristin v.d. (2008), Hırvatistan’ın 10 farklı lokasyonundan topladıkları 338 *C. parasitica* izolatında, 18 vc grup bulmuşlardır. En yaygın vc grup, % 42,9 ile EU-1 olmuştur. Bu vc tipi, bir popülasyon hariç tümünde saptanmış ve dördünde en dominant vc grup olarak belirlenmiştir. EU-2, % 21 bulunma oranı ile sekiz popülasyonda varlığı belirlenmiş ve dört popülasyonun en dominant vc grubu olduğu ortaya konmuştur. Doğu Avrupa ülkelerinin en dominant vc grubu olan EU-12, % 14,2 bulunma oranı ile beş popülasyonda varlığı bildirilmiştir. Bu vc tiplerin

dışında bulunma oranı düşük olan diğer bazı vc grupların, etmenin eşeyli üremesi sonucu vic genlerinin rekombinasyonu sonucu oluşmuş olabileceği öne sürülmüştür. Nitekim tüm popülasyonlarda etmenin eşeyli üreme yapıları olan peritesyumlara rastlanmıştır. Ayrıca Hırvatistan'ın *C. parasitica*'nın Merkez ve Doğu Avrupa popülasyonlarının karıştığı bir bölge olması, vc grup çeşitliliğinin yüksek olmasına neden olabileceği de belirtilmiştir.

Milgroom vd. (2008), Bulgaristan, Romanya ve İtalya'nın Sicilya bölgesinde, toplam 10 farklı popülasyondan elde ettikleri 528 *C. parasitica* izolatu içerisinde, 4 vc grup (EU-12, EU-1, EU-2, EU-10) saptamışlardır. Tüm lokasyonlarda bulunan EU-12, % 82 bulunma oranı ile 9 lokasyonda en dominant vc grup olarak bulunmuştur. Bulgaristan'ın Barziya ve İtalya'nın Nebrodi/Peloritani popülasyonları, bu genel durumun dışında özellik gösteren iki popülasyon olmuştur. Bulgaristan'ın Barziya popülasyonunda, 85 izolattan 54'ü (% 64) EU-10 bulunmuştur. İtalya'nın Nebrodi/Peloritani popülasyonunda EU-12'nin yanında % 24 oranında EU-2 ve % 5 oranında EU-1 bulunmuştur. Ayrıca EU-2, % 7 bulunma oranı ile İtalya'da 4, Romanya'da 1 lokasyonda saptanmıştır. Test edilen izolatların % 98'i, MAT-1 eşey tipinde bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, etmenin eşeyli üreme şansının düşük olması ve karantina uygulamalarının bölgede yeni vc grupların oluşmasına engel olan faktörler olabileceği görüşü öne sürülmüştür.

Adamçıkova vd. (2009)'nin Slovakya'da bir kestane araştırma merkezinin deneme alanında yaptıkları araştırmada, 31 *C. parasitica* izolatu içerisinde EU-2, EU-12, EU-13, EU-14, EU-17 ve EU-19 olmak üzere toplam 6 vc grup bulunmuştur. Bunlardan EU-19, % 36 ve EU-2, % 32 bulunma oranı ile dominant vc gruplar olarak belirlenmiştir. Bu çalışma ile EU-19, Slovakya'da ilk kez rapor edilmiştir. Ülkede yapılan ilk vc çalışmasından 13 yıl sonrasında, vc grup sayısının önemli oranda arttığı saptanmıştır. Özellikle EU-19'un, komşu ülkelerden hiçbirisinde varlığı bildirilmemiştir. *C. parasitica*'da vc uyum gruplarına yönelik popülasyon değişimlerinin, gelecekte biyolojik mücadelenin başarı şansını azaltacak bir faktör olarak karşımıza çıkabileceği belirtilmiştir.

Robin v.d. (2009), Fransa'nın batısından ve İspanya'nın kuzeyinden, Hautes Pyrenees, Pyrenees Atlantiques, Navarra, Landes ve Dordogne'den topladıkları 682 *C. parasitica* izolatında, 61 vc grubu bulmuşlar ve 95 izolatın (% 14) herhangi bilinen Avrupa vc grubu ile uyumlu olmadığını bildirmişlerdir. Bu uyumsuz izolatlar, kendi arasında 47 farklı izolat oluşturmuştur. Bu bulguların, *C.*

parasitica'da vejetatif uyumsuzluk sisteminin, iki alleli, 6 gen sistemi ile açıklanamayacağı öne sürülmüştür. Dordogne dışındaki bütün bölgelerde, dominant gruplar, EU-66 ve EU-72 (% 50'nin üzerinde bulunma oranı), Dordogne'de ise, EU-33 ve EU-2 olarak bulunmuştur. Eşey tipleri olan MAT-1 ve MAT-2'ye tüm bölgelerde rastlanmıştır. Eşeyli üremenin, vc çeşitliliğinin yüksek olmasında etkisinin olabileceği öne sürülmüştür.

Kristin v.d. (2011), Slovenya'da 11 ayrı lokasyondan topladıkları 254 *C. parasitica* izolatu, içerisinde 15 vc grubu (EU1, EU2, EU-3, EU-4, EU-5, EU-7, EU-10, EU12, EU13, EU-15, EU-17, EU-19, EU-21, EU-28 ve EU-31) bulmuşlardır. Dominant vc gruplar % 40 bulunma oranı ile EU-13 ve % 20 ile EU-1 olmuştur. EU-13 tüm popülasyonlarda bulunurken, EU-1 ise, 10 popülasyonda saptanmıştır. EU-2, % 12'lik bulunma payı ile 8 lokasyonda, EU-12 ise, % 9'luk bulunma oranı ile 9 lokasyonda bulunmuştur. Diğer vc grupların bulunma oranları % 5 ile % 0,3 arasında değişmiştir. Slovenya'da vc çeşitliliğin yüksek oluşu, kestane kanserinin uzun süreden beri varlığı bilinen Kuzey İtalya, İsviçre ve Güney Fransa bölgelerine yakın olması ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Hatta Doğu Avrupa'da yaygın olan EU-13'ün sözü edilen bölgeye, Slovenya üzerinden yayılmış olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca etmenin tüm popülasyonlarda eşeyli ürettiği bildirilmiş ve Slovenya'da yeni vc grupların oluşumu, özellikle EU-13 ile EU-1 ve EU-2'nin eşeyli üremesi sonucu, çaprazlanması sonucu olabileceği bildirilmiştir.

Zamora v.d. (2012), İspanya'nın batısından, Leon, Avila, Salamanca ve Zamora'dan topladıkları 1232 *C. parasitica* izolatını, vc grup yönünden araştırmışlardır. EU1, EU-11, EU-12, EU-28 ve EU-66 olmak üzere, 5 bilinen Avrupa grubu ve 6 bilinmeyen ve CL4, CL5, CL6, CL8, CL9, CL10 olarak adlandırdıkları vc grupları bulmuşlardır. Tüm bölgelerde bulunan EU-11, % 48,9 oranında dominant olarak bulunmuştur. EU-1, üç bölgede % 39 oranında bulunmuştur. EU-12, EU-28, EU-66, CL5, CL6 bir veya iki ilde % 2,4 – 3 arasında bulunmuştur. CL5, sadece Avila'da 33 izolat ile en dominant vc grup olmuştur. CL6 ise, 36 izolat ile Salamanca'da üçüncü dominant izolat olmuştur. Batı İspanya'da bulunan birçok vc grup, komşu ülkeler Portekiz ve Fransa'da daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Mating tiplerine baktıklarında, Leon ve Avila'da, MAT-1, büyük oranda baskın, Salamanca ve Zamora'da ise, iki mating tipin birarada bulunduğu bildirilmiştir.

Choi vd . (2012), *C. parasitica*'da 6 vejetatif uyumsuzluk geninden dördü olan *vic2*,

vic4, *vic6* ve *vic7*'nin virüs taşınımında rolünü anlamak amacıyla bu genlerin susturulması ile oluşan mutant bireyler üzerinde çalışma yapmışlardır. *Vic2*, *vic6* ve *vic7* genleri devre dışı bırakılan mutantlarda virüs taşınımı artmış, fakat baraj oluşumu engellenmemiştir. Örneğin *vic2-2* mutantı alıcı konumda olduğunda, virüs taşınımı % 100'e çıkmış, ancak mutant donör olduğunda, virüs taşınımında bir değişiklik olmamıştır. Benzer sonuçlar *vic6-2* mutantı için de elde edilmiştir. *Vic7-2* mutantında ise, mutantı donör konumda olması, virüs taşınımını arttırmıştır. *Vic6* geninin detaylı incelenmesi sonucu, iki gen arasında nonallelik bir interaksiyonun olduğu saptanmıştır. Çalışmada Kubisiak ve Milgroom'a (2006) atfen kullanılan SSR markörlerin yardımıyla *vic2*, *vic4*, *vic6* ve *vic7* genleri için spesifik primerler geliştirilmiş ve çalışmada kullanılmıştır.

Prospero v.d. (2013), Gürcistan'da bulunan *C. parasitica* etmeninin genetik yapısını ve orijinini anlamak için, 427 izolat üzerinde, mikrosatellite belirteçler kullanarak çalışma yapmışlardır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, saptanan 100 haplotip ile popülasyonda büyük bir genetik çeşitliliğin olduğu ortaya konmuştur. İki haplotipin, daha önce Avrupa'da bulunmadığını, çeşitli analizler neticesinde de, Asya veya Kuzey Amerika kaynaklı olmadığını da tespit etmişlerdir. Bir haplotipin, Orta Avrupa'da yaygın olduğunu, ve bunun Türkiye üzerinden doğal yolla Gürcistan'a geçmiş olabileceğini belirtmişlerdir. Çok sayıda haplotipin allel patternlerine baktıklarında, haplotiplerin çoğunun, Gürcistan ve Orta Avrupa gen havuzunun eşeyli üreme sonucu rekombinasyon ile oluştuğunu öne sürmüşlerdir. Gürcistan'da, *C. parasitica* Avrupa vc grupları ile uyuşan izolatların yanında, Avrupa vc grupları ile uyuşmayan yeni vc gruplar olduğu bildirilmiştir.

Peters vd., (2013), Almanya'da topladıkları 284 *C. parasitica* izolatını, genetik yönden karakterize etmişlerdir. İzolatların vc tipleri, EU-1 den EU-74'e kadar olan vc tester izolatları ile eşleştirme testi yapılmıştır. Ayrıca bu grupların bazı *vic* genleri üzerinden karakterizasyonu, PCR ile yapılmıştır. Çalışma sonucunda 15 vc grup bulunmuştur. Bunlar EU-1, EU-2, EU-5, EU-6, EU-12, EU-13, EU-14, EU-22, EU-25, EU-28, EU-33, EU-65, EU-74, EU-X, ve EU-Y vc gruplarıdır. Bu bulgular geçmiş yıllarla karşılaştırıldığında, birkaç yıl gibi kısa bir süre içerisinde, vc grupların sayısında önemli bir artışın olduğu belirtilmiştir. Bu durum, dışardan insan hareketleri vasıtasıyla ya da doğal olarak etmenin Almanya'ya bir çok kez giriş yapması veya etmenin eşeyli üremesi sonucu rekombinant bireylerin oluşması ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca çalışmada *vic2*, *vic4*, *vic6* ve *vic7* gen bölgeleri için geliştirilmiş primerler ile vc grupların moleküler karakterizasyonu başarılı bir

şekilde yapılmıştır.

Zamora vd. (2014), İspanyanın Leon bölgesinden 2 lokasyon ve Zamora bölgesinden bir lokasyondan elde edilen 544 *C. parasitica* izolatu içerisinde 6 vc grup bulunmuşlardır. EU-11, % 67 bulunma oranı ile en dominant vc grup bulunmuştur. Her üç lokasyonda da bulunan EU-1, % 27 bulunma oranı ile ikinci dominant vc grup olmuştur. EU-12, 4 izolat ve EU-66 ise, 1 izolat ile temsil edilmiştir. Hiçbir Avrupa uyum grubu ile eşleşmeyen iki vc gruptan CL4, 1 izolat, CL10, 7 izolat ile temsil edilmiştir.

Short vd. (2015), Avrupa’da Cortesi ve Milgroom (1998) tarafından tanımlanan 64 vc genotipin moleküler olarak tanısını kullanmak amacıyla, *C. parasitica*’da vejetatif uyuşmazlıktan sorumlu 6 farklı *vic* gen bölgesi için geliştirilen spesifik primerleri kullanmışlardır. Çalışmada 116 *C. parasitica* izolatu test edilmiş ve 39 vc genotipin karakterizasyonu yapılmıştır. Temsili olarak seçilen bazı vc grupların amplikonlarının, DNA sekansının gen bankasındaki veriler ile % 99-100 arasında örtüştüğü bildirilmiştir. Ancak West Salem (WI) bölgesinde toplanan ve önceki çalışmalarda eşleştirme testinde farklı vc gruplarda tanımlanan 6 izolatin, moleküler tanıma tamamının EU-52 oldukları saptanmıştır. Bu izolatların iki adet EU-52 vc tester izolatu ile eşleştirme testlerinde 1 izolat hariç, hiç birisinin tester izolatlar ile uyuşmadığı görülmüştür. Moleküler çalışmalar ile ortaya çıkarılan bu durum, *vic* genleri hakkında bilgilerin yeniden ele alınması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Aghayeva vd., 2017, Azerbaycan’da yaptıkları bir çalışmada, 199 *C. parasitica* izolatının popülasyon yapısı incelenmiştir. Vc gruplar yönünden izolatlar, 7 gruba ayrılmış ve AZ1 den AZ7 olacak şekilde adlandırılmışlardır. Bu izolatlardan 185’i (% 98) sadece AZ1 vc grubunda bulunmuştur. Bu grup, daha önce Gürcistan’da rapor edilen Geo1 haplotip grubu ile uyumlu bulunmuştur. Geri kalan izolatın 6’sı AZ3, 4’ü AZ4 olarak bulunurken, birer izolat AZ2, AZ5, AZ6 ve AZ7 olarak tanımlanmıştır. Azerbaycan popülasyonu ile Gürcistan popülasyonunun birbirine büyük bir olasılıkla benzerlik göstermesi, *C. parasitica*’nın, Gürcistan’dan geldiğini düşündürmektedir. Azerbaycan’da genotipik çeşitliliğin düşük olması, etmenin yörede daha çok eşeysiz ürememesiyle ilişkilendirilmiştir.

Mlinarec vd. (2017), tarafından Hırvatistan’da 158 *C. parasitica* izolatu, her bir *vic* geni (*vic1*, *vic2*, *vic3*, *vic4*, *vic6* ve *vic7*) alleli için Short vd. (2015) tarafından geliştirilmiş spesifik primerler ile PCR testine tabi tutulmuştur. Çalışma sonucunda

26 vc grubu bulunmuştur. Bu sonuçlar ikili eşleştirme ile yapılan kökültür testi ile karşılaştırılmış ve tüm vc grupların sonuçları örtüşmüştür. Bu çalışmada *vic4* bölgesi için kullanılan yeni bir primerin, Short vd. (2015) tarafından kullanılan *vic4* primerine göre, daha iyi sonuçlar vermiştir. Bu çalışma ile, PCR ile vc grupların daha hızlı ve güvenilir bir şekilde belirlenebileceği ortaya konulmuştur.

Perez-Sierra v.d. (2018), İngiltere’de, Devon, Berkshire, Dorset, Derbyshire ve Londra’nın güneydoğusundan 21 örnekleme alanından topladıkları 197 adet *C. parasitica* izolatu, vc grupları açısından test etmişlerdir. Testler sonucunda 11 vc grup (EU-1, EU-12, EU-2, EU-14, EU-65, UK1, UK2, UK3, UK4, UK5, UK6) bulmuşlardır. Örnekleme alanlarının 17’sinde 1, 3’ünde 2, ve 1’inde 3 vc grup saptanmıştır. Sadece bir lokasyonda bulunan EU-14, % 47’lik bulunma oranı ile en dominant vc grup, 5 lokasyonda bulunan EU-1 ise, % 15 bulunma oranı ile ikinci dominant grup olmuştur. Toplam 52 izolat, Avrupa uyum grupları ile uyumlu bulunmamıştır. Bu izolatlar, kendi aralarında 6 farklı vc grup oluşturmuş ve UK1 ile UK6 arasında isimlendirilmiştir. Daha önce belirlenen UK7 ve UK8 ile Avrupa uyum grupları ile uyuşmayan vc grup sayısı 8 olmuştur. Bölgede her iki mating tipi olsa da, bunların birbirine yakın konumda olmaması, yeni vc grupların ortaya çıkmasında, eşeyli üremenin rolünün olma ihtimalini düşük tutmaktadır. Yeni vc grupların ortaya çıkma sebebi olarak, vc grup çeşitliliğinin yüksek olduğu ABD ve Uzak Doğu ülkelerinden getirilmiş olan hastalıkla bulaşık bitki materyali gösterilmiştir.

Jezic vd. (2018), Hırvatistan’da yapılan bir çalışmada, 2004-2014 yılları arasındaki 10 yıl içerisinde, iki seçilmiş lokasyonda, *C. parasitica*’nın popülasyon yapısının nasıl değiştiği ortaya konulmuştur. Çalışma sonucunda, her iki lokasyonda etmenin genotipik çeşitliliğinin arttığı belirlenmiştir. Lokasyon Buje’de 8 olan vc grup sayısı, 21’e Hırvatska Kostajnika’da 8 olan vc grup sayısı, 24’e çıkmıştır. Her iki lokasyonda dominant olan vc gruplarda değişimler meydana gelmiştir. Bazı vc grupların bulunma oranı artarken, bazılarında azalma meydana gelmiştir. Hırvatistan’da ortaya çıkan bu vc grup çeşitliliğindeki artışın sebebi, ülkeye başka ülkelere giren yeni vc gruplar ile vic genlerinin rekombinasyonuna neden olan eşeyli üreme olarak gösterilmiştir.

Türkiye’de yapılan çalışmalar:

Çeliker ve Onoğur (2001), Ege, Marmara ve Karadeniz Bölgesinden elde ettikleri

324 *C. parasitica* izolatının 14'ünün beyaz fenotipe sahip olduklarını bildirmişlerdir. Bunlardan yedisinde, dsRNA varlığı tespit edilmiştir. Diğer 310 virü lent ırk ın, % 96'sının EU-1, % 4'ünün ise, EU-12 grubunun içinde yer aldıklarını bulmuşlardır. Yedi hipovirü lent ırk ın, virü lent ırk olan EU-1'leri kısa zamanda iyileştirdiği, genç kestane bitkileri üzerinde yapılan deneylerle gösterilmiştir. Sonuç olarak, kestane kanseri tedavisinde, hipovirü lent ırklar ın Türkiye'de kullanılabilirliği belirtilmiştir.

Gürer v.d. (2001), Marmara ve Karadeniz Bölgelerinden topladıkları 134 *C. parasitica* izolatının vc grubunun, EU-1 olduğunu tespit etmişlerdir. İzolatların 24'ünü mating tipi açısından incelediklerinde, MAT-1 (20 izolat)'in, MAT-2 (4 izolat)'ye göre, yaygın olduğunu görmüşler ve eşeyli üremenin olmadığı veya sınırlı sayıda olduğu sonucuna varmışlardır. Yüzotuzdört izolatın, 19'unun morfolojik açıdan hipovirü lent ırka ait olduklarını, 18'inin Marmara Bölgesinden, 1'inin ise, Karadeniz Bölgesinden elde edildiğini belirtmişlerdir. dsRNA varlığı, 10 izolatta teyit edilmiştir. Karadeniz Bölgesinde, hipovirü lent ırk ın az olmasının nedenini, iki bölge arasındaki doğal bariyerlerin, hipovirü lent ırk ın doğal yayılımına engel olmasına bağlayıp, bu ırk ın, bölgeye yapay olarak uygulanmasının, biyolojik mücadele açısından çok etkili olacağı, sonucuna varmışlardır.

Erincik v.d. (2008), Aydın ilinden topladıkları 97 adet *C. parasitica* izolatının vc gruplarının EU-1 ve EU-12 olduklarını tespit etmişlerdir. Vc grup çeşitliliğinin az olmasının, hipovirü lensliğin kolayca yayılabileceği anlamına geldiğini belirtmişlerdir.

Akıllı v.d. (2009)'nin çalışmasında, Karadeniz Bölgesinin 11 ilindeki 32 bölgeden toplanan 296 *C. parasitica* izolatına vc grup testleri yapılmıştır. EU-1, EU-12, EU-14, EU-2 ve EU-5 olmak üzere 5 farklı vc grup bulunmuştur. Bir ilde bulunan vc grup sayısı, birle beş arasında değişmekle beraber, sadece Kastamonu ilinde 5 vc grup olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre, EU-1, % 90,8 bulunma oranı ile bütün illerde bulunmuştur. EU-12, % 6,8 bulunma oranı ile 8 ilde, EU-14, EU-2 ve EU-5 ise, bir veya iki ilde az sayıda bulunmuştur. Onbir ilin 9'unda hipovirü lent ırklara rastlanmıştır.

Açıkgöz v.d. (2009), Aydın ilinde, kestane kanserinden en çok etkilenen ilçeler olan Nazilli, Sultanhisar, Köşk'ün 9 ilçesinden ve merkez ilçelerden topladıkları 100 *C. parasitica* izolatının mating tiplerine ve vc gruplarına bakmışlardır. MAT-1 ve

MAT-2 primerleri kullanılarak, çoklu PCR analizi ile bulunan DNA parçaları, elektroforezde gözlemlenerek, molekül uzunlukları tespit edilmiştir. % 52 oranında MAT-1, % 48 oranında ise, MAT-2 olduğunu belirtmişlerdir. Sadece EU-1 ve EU-2 bulunmuştur.

Erincik v.d. (2011)'nin, Aydın dağlarından aldıkları 213 *C. parasitica* örneğinin, EU-1 ve EU-12 gruplarından oluştuklarını tespit etmişlerdir. MAT-1 oranı, % 65, MAT-2 oranı ise, % 35 olarak bulunduğu için, bölgedeki popülasyonların eşeysiz üreme sonucu oluştuklarını rapor etmişlerdir. Aydın dağlarında, doğal olarak hipovirü lent ırkın olmamasından dolayı, kestane kanseri ile mücadelede, hipovirü lent ırkın uygulanmasının biyolojik mücadele açısından önemli olduğunu, vc grup çeşitliliğinin az olmasının da, avantaj olduğunu vurgulamışlardır.

Akıllı v.d. (2013), Marmara ve Karadeniz bölgelerinden, 12 ilden topladıkları 420 *C. parasitica* izolatının, 69'unun vc gruplarını EU-1, 2'sini EU-12, 1'ini de EU-5 olarak tespit etmişlerdir. Seçilen 52 izolatın mating tiplerine bakılmış, MAT-1/MAT-2 oranı 1,79 olarak bulunmuştur.

Daldal ve Erincik (2018)'in çalışmasında İzmir, Denizli, Manisa illerinden toplanan 268 *C. parasitica* izolatının vc grup testleri yapılmıştır. İzolatların % 59'u EU-1, % 32'si EU-12 ve % 9'u EU-2 olarak bulunmuştur. PCR ile yaptıkları mating tipi belirlemede, 55 izolattan 44'ünün MAT-1, 11'inin ise, MAT-2 olduğu görülmüş, MAT 1: MAT 2 oranının 1:1 oranından sapma göstermesinden dolayı, etmenin eşeyli üremediği düşünülmüştür.

Mangil ve Erincik (2018), Karadeniz Bölgesinde yaptıkları çalışmada, 4'ü, EU-1, EU-12, EU-17 ve EU-3 olmak üzere, toplamda 10 vc grup bulmuşlardır. MAT 1:MAT 2 oranı, 1:1 oranına yakın olduğundan etmenin bu bölgede eşeyli üreyebildiği sonucuna varmışlardır. Ayrıca, MAT 1 ve MAT 2 allelini taşıyan heterokaryon bireylere de rastlamışlardır. Bunlar homotallik olup, kendi kendini dölleyerek, eşeyli üreyebilen bireylerdir. Türkiye'de heterokaryon bireylerin varlığı, ilk kez bu çalışmada rapor edilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Mangil ve Erincik (2018)'in Doğu Karadeniz Bölgesi illerinden Trabzon, Rize ve Artvin kestane alanlarından topladığı 344 adet *C. parasitica* izolatından elde ettiği 10 farklı vc grubundan, ikişer örnek çalışmada kullanılmıştır. Bunlar, DK-7, DK-25, DK-5, DK-29, DK-10, DK-142,DK-44, DK-46, DK-166, DK-174, DK-38, DK-48, DK-47, DK-58, DK-225, DK-257, DK-153, DK-170, DK-104 ve DK-125'dir. Yine Mangil ve Erincik (2018)'in Karadeniz Bölgesinden topladığı kestane kanserli kabuk örneklerinde, eşeyli üreme yapıları olan peritesyumlardan elde ettiği tek askospor izolatları arasından farklı vc grupları temsilen seçilip, 30 tek askospor izolat çalışmanın materyali içerisinde yer almıştır. Bu izolatlar, DK-35/27, DK-35/11A, DK-35/11B, DK-35/8, DK-35/15, DK-35/11C, DK-49/21, DK-49/9, DK-49/10, DK-49/19, DK-49/29, DK-49/24, DK-145/4, DK-145/24, DK-145/3, DK-145/15, DK-145/13, DK-187/2, DK-187/10, DK-187/11, DK-187/16, DK-177/10, DK-177/15, DK-109/19, DK-109/2, DK-109/22, DK-7/25, DK-7/23, DK-72/2 ve DK-72/3'tür. Çalışmada kullanılan izolatlar ADÜ, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalında *C. parasitica* izolat koleksiyonundan elde edilmiştir.

Bu izolatların dışında, 64 adet Avrupa vejetatif uyum tester izolatları, Prof. Dr. Paola Cortesi (Università degli Studi di Milano, Milan, İtalya)'den temin edilmiş ve vc grup testlerinde, tester izolat olarak kullanılmıştır. Besi ortamı olarak, potato dextroz agar (PDA) kullanılmıştır.

İzolatların *vic1*, *vic2*, *vic3*, *vic4*, *vic6*, *vic7* genlerinin allellerini belirlemede, spesifik primerler kullanılmıştır. Buffer, dNTP ve Taq polymerase enzimini içeren master mix, ve steril su, PCR tüplerinin hazırlanmasında, primerler ve izole edilen DNA'lar ile birlikte kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. İzolatların Kültürde Yetiştirilmesi ve Misel Eldesi

Saklama koşullarından uzun süreli olarak dormant halde tutulan izolatlar, PDA'da geliştirilerek aktif hale getirilmiştir. Gençleştirilen izolatların 3 günlük kolonilerinin genç misellerini barındıran kenar kısımlarından alınan diskler; üzerine selefon film

yayılmış PDA üzerinde, 5 gün boyunca 24°C’de geliştirilmiştir. Karanlık koşullardaki bu inkubasyonun ardından, selefondiskler üzerinde gelişen kolonilerden, yaklaşık 3 cm² boyutlarındaki misel kitlesi, steril kürdan ile alınarak 1,5 ml’lik santrifüj tüplere yerleştirilip, DNA izolasyonu için -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. DNA Ekstrasyonu

DNA ekstrasyon işlemleri Marra ve Milgroom (2001)’ e göre yapılmıştır. Buna göre;

Miseller -20°C’den çıkarıldıktan sonra içerlerine 1 ml lysis buffer ilave edilip, birer dakika vorteks işleminin ardından, tüpler 15 dk, 65°C’de ısı bloğunda tutulmuştur. Tüpler vorteks ile yaklaşık 1 dk karıştırıldıktan sonra, 12200 rpm’de 5 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra tüplerde oluşan süpernatant kısımlardan pipet ile 1 ml alınarak steril yeni tüplere aktarılmıştır. Supernatantın üzerine 200 µl 7,5 M amonyum asetat (NH₄OAc) ilave edilip, 10 sn vorteks ile karıştırıldıktan sonra, 3 dk 12200 rpm de, santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, tüplerde oluşan supernatanttan, 800 µl’lik kısım yeni tüplere aktarılıp, üzerine 700 µl. isopropanol ilave edilip ve elde çalkalamanın ardından, 5 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj sonrasında, tüplerde sadece pellet kalacak şekilde, süpernatant kısım dökülmüştür. Tüpte kalan pellet, % 70’lik etanol ile art arda 2 kez yıkanmıştır. Her bir tüp ağzı açık şekilde, 10 dk steril kabin içerisinde kurumaya bırakıldıktan sonra, içerlerine 80 µl steril saf su ilave edilerek, -20°C’ye kaldırılıp, PCR’da kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.2.3. Vic Gen Bölgeleri için Kullanılacak Primerler ve PCR Koşulları

PCR tüpleri, 10 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Buffer, dNTP, Taq polimerase enzimini içeren master karışımdan 2 µl, herbir *vic* genine ait primerlerden toplamda 2 µl, steril sudan 5 µl ve DNA’dan 1 µl olacak şekilde hazırlanan tüpler, PCR’a yerleştirilmiştir. İzolatların *vic1*, *vic2*, *vic3*, *vic4*, *vic6*, *vic7* genlerinin, allel 1 ve allel 2’sini belirlemede, amplifikasyon ürünleri yönünden genlerin alellerine ait spesifik primerler kullanılmıştır (Çizelge 3.1.).

PCR koşulları, Short vd. (2015)’e göre yapılmıştır. Buna göre başlangıç denatürasyon 95°C’de 2 dk. uygulanmıştır. Ardından, 34 döngülük program, 95°C ‘de 30 sn denatürasyon, primere göre değişen sıcaklıkta 30 sn annealing, 72°C 105

sn extension aşamaları gerçekleştirilmiştir.

En son olarak 72°C’de 10 dk’lık final extension ile PCR sonlandırılmıştır. *Vic1*, *vic2*, *vic3*, *vic4* primerleri için annealing sıcaklığı 65°C, *vic6* için 64°C kullanılmıştır. *vic7* primerleri için, annealing sıcaklık, gradient PCR ile yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda, 55°C olacak şekilde ayarlama yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primer dizilimleri ve elde edilen bant büyüklükleri (Short v.d., 2015 ve Mlinarec v.d., 2017).

Gen	Primer	Primer sequence (5’ ‘den 3’’e)	Allel 1 (bp)	Allel 2 (bp)
<i>Vic1</i>	<i>Vic1a</i> -F	GCTATCCACCCTCACAGAGAA	308	1470
	<i>Vic1a</i> -1R	CGTCCTGCCTCAAGGAGATT		
	<i>Vic1a</i> -2R	CATTCGTCATCAGCACAAAC		
<i>Vic2</i>	<i>Vic2</i> -F	TTGATGGTGGAGTGTGACAGA	660	1089
	<i>Vic2</i> -1R	TCTCCCAATGACCTGAAATG		
	<i>Vic2</i> -2R	GATGTTTGGCATAACATCGGC		
<i>Vic3a</i>	<i>Vic3a</i> -1F	CAGGTTTAGCAGGTTCTTCC	538	1203
	<i>Vic3a</i> -1R	GCACGACAAATGGCACTG		
	<i>Vic3a</i> -2F	TCCATTGTCTCTATCCCATCC		
<i>Vic4</i>	<i>Vic4</i> -pF	GGTAGGATGACCTTTGCTGCT	529	741
	<i>Vic4</i> -1pR	GATACTTGCGCAAAGAAGGCG		
	<i>Vic4</i> -2pR	ACGGCGCAGAAATGAGGGGGT		
<i>Vic6</i>	<i>Vic6</i> -1F	CGCATACTGTGTTTCCCAACT	238	813
	<i>Vic6</i> -1R	AAGATCCTTGCGTACCTCCA		
	<i>Vic6</i> -2F	ACAGGATAGCAATCaCTGCC		
<i>Vic7</i>	<i>Vic6</i> -2R	ACAGGGAACTCTGGTCGTTG	728	1109
	<i>Vic7</i> -F	AGGTACACCCCCAAGATTCC		
	<i>Vic7</i> -1R	CCACGAAGTCTCTGGCGTA		
	<i>Vic7</i> -2R	CAGGCTCGATTCTCAAGGTG		

3.2.4. Jel Elektroforez

PCR sonucu elde edilen DNA parçaları, % 1’lik agaroz jel elektroforezde, 80 volt elektrik akımında, 30 dk yürütülüp, UV ışık altında görüntülenerek, bilgisayara aktarılmıştır (Şekil 3.1.). Her bir *vic* geni için, bilinen DNA büyüklükleri üzerinden değerlendirmeler yapılmıştır (Short vd., 2015).

Herbir *vic* geninin allel 1 bant uzunluğu, küçük, allel 2 bant uzunluğu ise, büyük bant olarak ayırtedilerek, küçük bantlara ‘1’, büyük bantlara ise, ‘2’ denilerek, 50 adet DNA’nın *vic* genlerinin lokasyonları belirlenmiştir.



Şekil 3.1. *Cryphonectria parasitica* izolatlarından elde edilen PCR ürünlerinin % 1 'lik agaroz jel üzerindeki elektroforez görüntüsü (üst jel: *vic1* (allel 1: 308 bp, allel 2: 1470 bp) alt jel: *vic3* (allel 1: 538 bp, allel 2: 1203 bp)).



Şekil 3.2. PCR için örneklerin hazırlanması

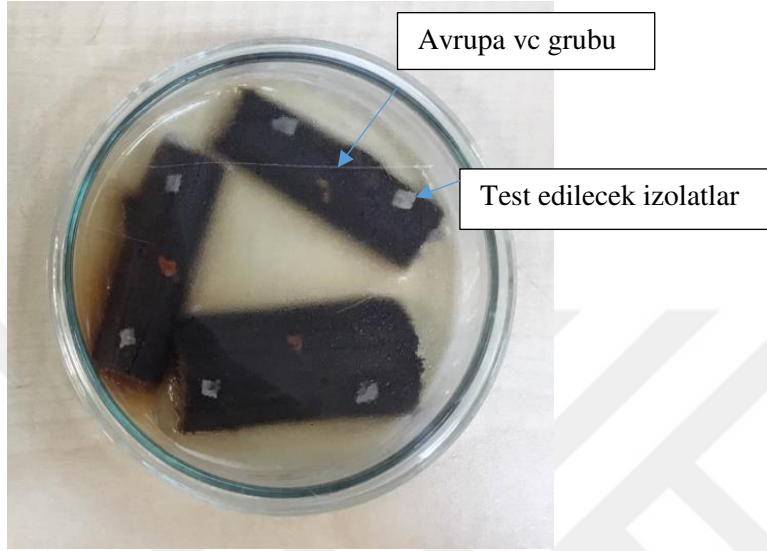


Şekil 3.3. Jel-elektroforez görüntüsünün bilgisayara aktarılması işlemi

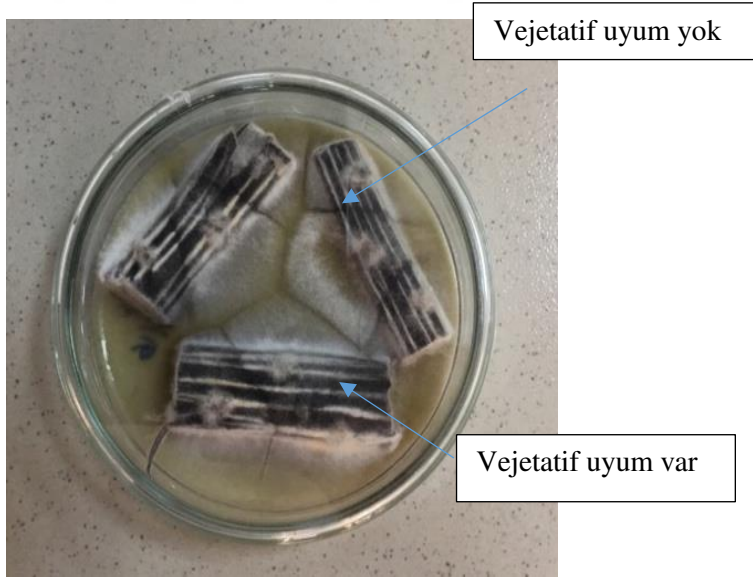
3.2.5. *Cryphonectria parasitica* İzolatlarının Klasik Eşleştirme Testi ile Vc Gruplarının Belirlenmesi

Moleküler yöntemlerle vc grupları belirlenen izolatlar bulguların teyit edilmesi amacıyla klasik eşleştirme testine tabi tutulmuşlardır. Eşleştirme testinde, PDA+otoklavlanmış kestane odun dokusundan yapılmış bir ortam kullanılmıştır (Daldal vd., 2018). Kestane ağaçlarından alınan 1,5 - 2 cm çapındaki dallar, 5'er cm uzunluğunda kesilip, iki eşit parçaya ayrılmıştır. Dal parçalarının üzeri bistüri yardımıyla 6-7 çizgi olacak şekilde boyuna çizilmiştir. Bu dallar 121 °C'de, 45 dk, iki gün, birer kez otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sterilize edilen kestane dalları, 9 cm'lik steril petrilere, üçgen oluşturacak şekilde, 3'er adet yerleştirilmiştir. Hazırlanan petrilerin tabanına PDA dökülerek besi ortamı zengileştirilmiş ve dal parçalarının petri tabanına sabitlenmesi sağlanmıştır. Hazırlanan ortamlar vc grup eşleştirme testi için 1-2 gün bekletilmiştir.

Vc grup testlerinde, petri kabı içine yerleştirilen kestane dallarının orta kısımlarına Avrupa vc grupları, her iki uç kısmına da test edilecek izolatlar yerleştirilmiştir. Bu şekilde, herbir petride 6'şar izolat test edilmiştir (Şekil 3.4.). Petriler 25 °C'de, 1 hafta inukbasyona bırakılmış ve Avrupa vc grupları ile izolatlar arasında baraj oluşup, oluşmamasına göre, vejetatif uyum değerlendirmesi yapılmıştır. Aralarında baraj oluşturan tester ile izolatın 'vejetatif olarak uyumsuz', baraj oluşturmayanlar ise 'vejetatif olarak uyumlu' olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.5.).



Şekil 3. 4. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının vc grup testleri

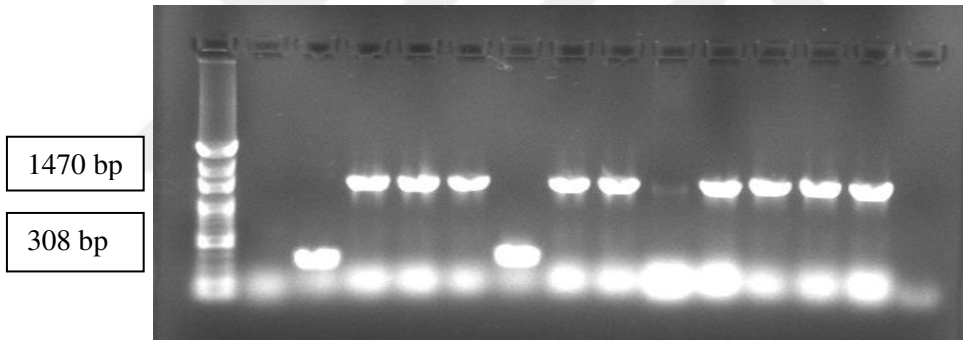


Şekil 3.5. *Cryphonectria parasitica* izolatları ile Avrupa testerları arasındaki vejetatif uyum ve uyumsuzluk

4. BULGULAR

4.1 *Vic1* Gen Bölgesi

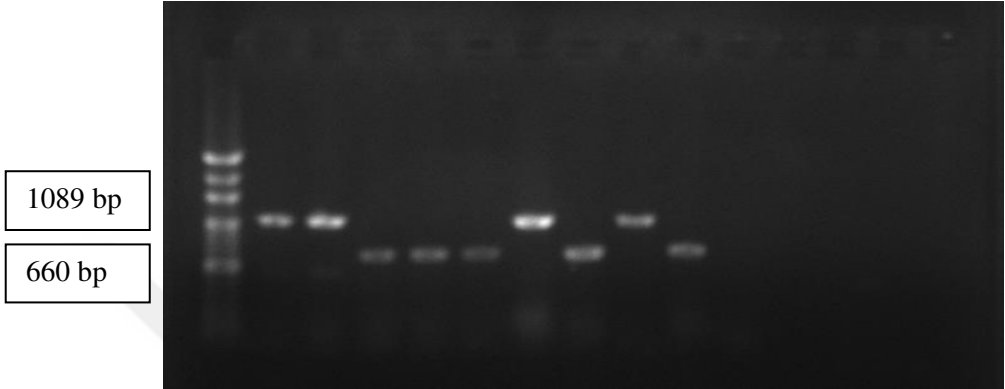
Doğu Karadeniz Bölgesi kestane ormanlık alanlarından elde edilmiş 20 *C. parasitica* izolatu üzerinde, *vic1a*-F, *vic1a*-1R ve *vic1a*-2R primerleri ile yapılan PCR testleri sonrasında, 9 izolat 308 bp'lik bir fragman oluşturmuş ve genotipi *vic1*-1, 11 izolat ise, 1470 bp lik bir fragman oluşturarak, genotipi *vic1*-2 olarak tanılanmıştır (Şekil 4.1). Toplam 30 adet tek askospor izolattan ise, 10 izolat 308 bp, 20 izolat 1470 bp'lik fragmanlar oluşturularak, sırasıyla *vic1*-1 ve *vic1*-2 genotipleri içerisinde yer almışlardır.



Şekil 4.1. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının *vic1a*-F, *vic1a*-1R ve *vic1a*-2R primerleri ile yapılan PCR testleri sonrasında elde edilen DNA bantlarının elektroforez görüntüsü.

4.2. *Vic2* Gen Bölgesi

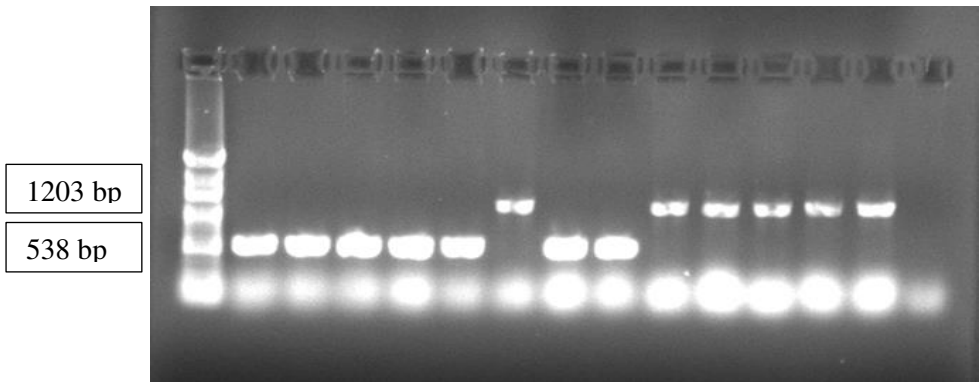
Vic2-F, *vic2*-1R ve *vic2*-2R primerleri ile yapılan PCR testleri sonrasında, 8 arazi izolatu 660 bp'lik bir fragman oluşturmuş ve genotipi *vic2*-1, 12 arazi izolatu ise, 1089 bp'lik bir fragman oluşturarak, genotipi *vic2*-2 olarak tanılanmıştır (Şekil 4.2.). Toplam 30 adet tek askospor izolattan ise, 16 izolat 660 bp, 14 izolat 1089 bp'lik fragmanlar oluşturularak, sırasıyla *vic2*-1 ve *vic2*-2 genotipleri içerisinde yer almışlardır.



Şekil 4.2. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının *vic2a*-F, *vic2a*-1R ve *vic2a*-2R primerleri ile yapılan PCR testleri sonrasında elde edilen DNA bantlarının elektroforez görüntüsü.

4.3. Vic3 Gen Bölgesi

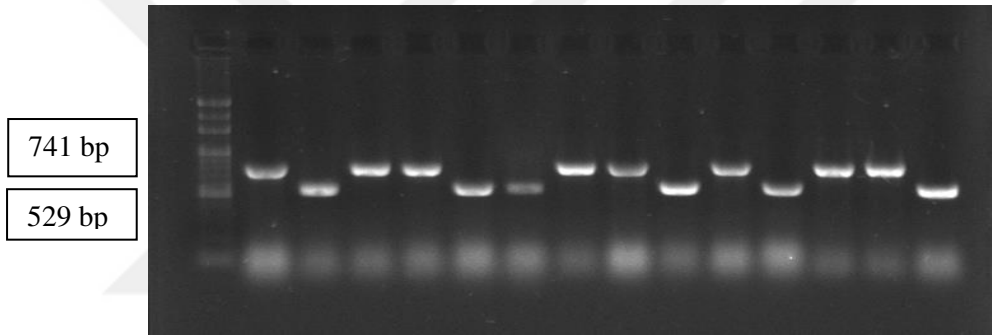
Vic3a-1F, *vic3a*-2F, *vic3a*-1R ve *vic3a*-2R primerleri ile yapılan PCR testleri sonrasında, 18 arazi izolatu 538 bp'lık bir fragman oluşturmuş ve genotipi *vic3*-1, 2 arazi izolatu ise, 1203 bp'lık bir fragman oluşturarak, genotipi *vic3*-2 olarak tanılanmıştır (Şekil 4.3.). Toplam 30 adet tek askospor izolattan ise, 23 izolat 538 bp, 7 izolat 1203 bp'lık fragmanlar oluştururarak, sırasıyla *vic3*-1 ve *vic3*-2 genotipleri içerisinde yer almışlardır.



Şekil 4.3. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının *vic3a*-1F, *vic3a*-2F, *vic3a*-1R ve *vic3a*-2R primerleri ile yapılan PCR testleri sonrasında elde edilen DNA bantlarının elektroforez görüntüsü.

4.4. *Vic4* Gen Bölgesi

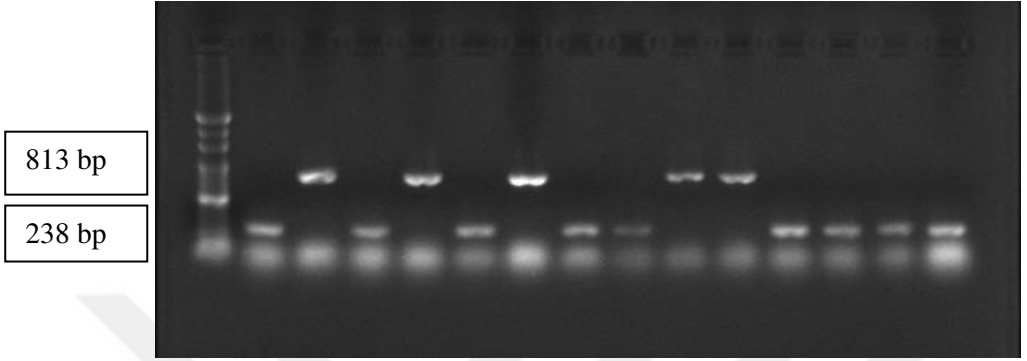
Vic4-pF, *vic4*-1pR ve *vic4*-2pR primerleri ile yapılan PCR testleri sonrasında, 4 arazi izolatu 529 bp'lik bir fragman oluşturmuş ve genotipi *vic4*-1, 16 arazi izolatu ise, 741 bp'lik bir fragman oluşturarak, genotipi *vic4*-2 olarak tanılanmıştır (Şekil 4.4.). Toplam 30 adet tek askospor izolattan ise, 8 izolat 529 bp, 22 izolat 741 bp'lik fragmanlar oluştururarak, sırasıyla *vic4*-1 ve *vic4*-2 genotipleri içerisinde yer almışlardır.



Şekil 4.4. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının *vic4*-pF, *vic4*-1pR ve *vic4*-2pR primerleri ile yapılan PCR testleri sonrasında elde edilen DNA bantlarının elektroforez görüntüsü.

4.5. *Vic6* Gen Bölgesi

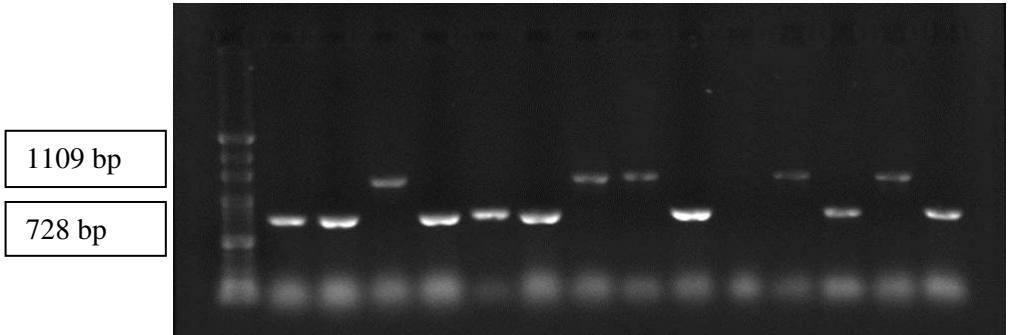
Vic6-1F, *vic6*-2F, *vic6*-1R ve *vic6*-2R primerleri ile yapılan PCR testleri sonrasında, 10 arazi izolatu 238 bp'lik bir fragman oluşturmuş ve genotipi *vic6*-1, 10 arazi izolatu ise, 813 bp'lik bir fragman oluşturarak, genotipi *vic6*-2 olarak tanılanmıştır (Şekil 4.5.). Toplam 30 adet tek askospor izolattan ise, 22 izolat 238 bp, 8 izolat 813 bp'lik fragmanlar oluştururarak, sırasıyla *vic6*-1 ve *vic6*-2 genotipleri içerisinde yer almışlardır.



Şekil 4.5. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının *vic6-1F*, *vic6-2F*, *vic6-1R* ve *vic6-2R* primerleri ile yapılan PCR testleri sonrasında elde edilen DNA bantlarının elektroforez görüntüsü.

4.6. Vic7 Gen Bölgesi

Vic7-F, *vic7-1R* ve *vic7-2R* primerleri ile yapılan PCR testleri sonrasında 10 arazi izolatu 728 bp'lik bir fragman oluşturmuş ve genotipi *vic7-1*, 10 arazi izolatu ise, 1109 bp'lik bir fragman oluşturarak, genotipi *vic7-2* olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.6). Toplam 30 adet tek askospor izolattan ise, 14 izolat 728 bp, 16 izolat 1109 bp'lik fragmanlar oluşturularak sırasıyla *vic7-1* ve *vic7-2* genotipleri içerisinde yer almışlardır.



Şekil 4.6. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının *vic7-F*, *vic7-1R* ve *vic7-2R* primerleri ile yapılan PCR testleri sonrasında elde edilen DNA bantlarının elektroforez görüntüsü.

4.7. İzolatların Allelleri ve Vic Genotipleri

PCR testlerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda çalışmamızda kullandığımız *C. parasitica* izolatlarının *vic* genotipleri belirlenmiştir. Tüm izolatlarda, PCR'ı yapılan 6 *vic* bölgesi için, allel atamaları yapılmıştır. Bu işlemlerde, Cortesi ve Milgroom (1998)'da belirtilen allel atamaları gözönünde bulundurulmuştur. Örneğin, *vic1*, *vic2*, *vic3*, *vic4*, *vic6*, ve *vic7* genleri için sırasıyla 1, 2, 1, 2, 1 ve 2 (1212-12) allelleri alan bir izolat, EU-30 olarak belirlenmiştir. Tüm izolatların *vic* genotip atamaları, Çizelge 4.1. ve 4.2'de gösterilmiştir. Buna göre, test edilen 20 adet arazi izolatı, 11 farklı *vic* gruba atanmıştır. Bu gruplar, 1212-12 *vic* genotipinde EU-30, 1112-21 genotipinde EU-8, 2212-12 genotipinde EU-3, 1112-11 genotipinde EU-12, 2112-11 genotipinde EU-17, 2112-21 genotipinde EU-22, 1212-21 genotipinde EU-25, 2212-21 genotipinde EU-7, 2211-12 genotipinde EU-21, 1221-22 genotipinde EU-55 ve 2112-22 genotipinde EU-2'dir (Çizelge 4.1.). Test edilen 30 tek askospor izolatı ise, 15 farklı *vic* gruba atanmıştır. Bu gruplar, 1112-12 genotipinde EU-29, 1112-11 genotipinde EU-12, 1212-11 genotipinde EU-11, 1112-21 genotipinde EU-8, 2112-11 genotipinde EU-17, 2112-21 genotipinde EU-22, 2112-22 genotipinde EU-2, 2212-12 genotipinde EU-3, 2212-22 genotipinde EU-1, 2211-22 genotipinde EU-5, 2211-12 genotipinde EU-21, 2221-12 genotipinde EU-51, 2222-12 genotipinde EU-35, 2121-11 genotipinde EU-36 ve 2121-12 genotipinde EU-58'dir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.1. *Cryphonectria parasitica*'nın arazi izolatlarının vic genlerine göre allel dağılımları ve vic genotipleri.

Arazi İzolatları	Vic1	Vic2	Vic3	Vic4	Vic6	Vic7	Vic Genotipleri	Vc Gruplar*
DK-7	1	2	1	2	1	2	1212-12	EU-30
DK-25	1	1	1	2	2	1	1112-21	EU-8
DK-5	2	2	1	2	1	2	2212-12	EU-3
DK-29	2	2	1	2	1	2	2212-12	EU-3
DK-10	1	1	1	2	1	1	1112-11	EU-12
DK-142	1	1	1	2	1	1	1112-11	EU-12
DK-44	2	1	1	2	1	1	2112-11	EU-17
DK-46	2	1	1	2	1	1	2112-11	EU-17
DK-166	1	2	1	2	1	2	1212-12	EU-30
DK-174	2	1	1	2	2	1	2112-21	EU-22
DK-38	1	2	1	2	2	1	1212-21	EU-25
DK-48	1	2	1	2	2	1	1212-21	EU-25
DK-47	2	2	1	2	2	1	2212-21	EU-7
DK-58	2	2	1	2	2	1	2212-21	EU-7
DK-225	2	2	1	1	1	2	2211-12	EU-21
DK-257	2	2	1	1	1	2	2211-12	EU-21
DK-153	1	2	2	1	2	2	1221-22	EU-55
DK-170	1	2	2	1	2	2	1221-22	EU-55
DK-104	2	1	1	2	2	2	2112-22	EU-2
DK-125	2	1	1	2	2	2	2112-22	EU-2

*Cortesi ve Milgroom (1998)'e göre

Çizelge 4.2. Tek askospor *Cryphonectria parasitica* izolatlarının allel dağılımları ve vic genotipleri.

Tek askospor izolatlar	Vic1	Vic2	Vic3	Vic4	Vic6	Vic7	Vic genotipler	Vc gruplar
DK-35/27	1	1	1	2	1	2	1112-12	EU-29
DK-35/11A	1	1	1	2	1	1	1112-11	EU-12
DK-35/11B	1	2	1	2	1	1	1212-11	EU-11
DK-35/8	1	1	1	2	1	1	1112-11	EU-12
DK-35/15	1	1	1	2	2	1	1112-21	EU-8
DK-35/11C	1	2	1	2	1	1	1212-11	EU-11
DK-49/21	2	1	1	2	1	1	2112-11	EU-17
DK-49/9	2	1	1	2	2	1	2112-21	EU-22
DK-49/10	2	1	1	2	1	1	2112-11	EU-17
DK-49/19	2	1	1	2	2	1	2112-21	EU-22
DK-49/29	2	1	1	2	2	2	2112-22	EU-2
DK-49/24	2	2	1	2	1	2	2212-12	EU-3
DK-145/4	2	2	1	2	2	2	2212-22	EU-1
DK-145/24	2	2	1	2	1	2	2212-12	EU-3
DK-145/3	2	2	1	1	2	2	2211-22	EU-5
DK-145/15	2	2	1	1	1	2	2211-12	EU-21
DK-145/13	2	2	1	2	2	2	2212-22	EU-1
DK-187/2	2	2	2	1	1	2	2221-12	EU-51
DK-187/10	2	2	2	2	1	2	2222-12	EU-35
DK-187/11	2	2	2	1	1	2	2221-12	EU-51
DK-187/16	2	2	2	2	1	2	2222-12	EU-35
DK-177/10	1	1	1	1	1	1	1112-11	EU-12
DK-177/15	2	1	1	2	1	1	2112-11	EU-17
DK-109/19	2	1	2	1	1	1	2121-11	EU-36
DK-109/2	2	1	2	1	1	2	2121-12	EU-58
DK-109/22	2	2	2	1	1	2	2221-12	EU-51
DK-7/25	2	2	1	2	2	2	2212-22	EU-1
DK-7/23	1	1	1	2	1	2	1112-12	EU-29
DK-72/2	1	1	1	2	1	1	1112-11	EU-12
DK-72/3	1	1	1	2	1	1	1112-11	EU-12

4.8. Vic Allelerinin Bulunma Oranı

Arazi izolatları arasında, *vic1*-1 allelinin bulunma oranı, % 45 iken, *vic1*-2 allelinin bulunma oranı, % 55'dir. *Vic2*-1'in oranı, % 40 iken, *vic2*-2'nin oranı % 60'dır. *Vic3*-1'in oranı, % 90 iken, *Vic3*-2'nin oranı, % 10'dur. *Vic4*-1'in oranı, % 20 iken, *vic4*-2'nin oranı, % 75'dir. *Vic6*-1 ve *vic7*-1'in oranı % 50 iken, *vic6*-2 ve *vic7*-2'nin oranı, % 50'dir (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. *Cryphonectria parasitica* izolatlarında vic allellerinin bulunma oranları

Vic allelleri	Arazi izolatları			Tek askospor izolatları		
	İzolat sayısı	Sayı	Bulunma oranı	İzolat sayısı	Sayı	Bulunma oranı
Vic1-1	20	9	45	30	10	33,33
Vic1-2	20	11	55	30	20	66,67
Vic2-1	20	8	40	30	16	53,33
Vic2-2	20	12	60	30	14	46,67
Vic3-1	20	18	90	30	23	76,67
Vic3-2	20	2	10	30	7	23,33
Vic4-1	20	4	20	30	8	26,67
Vic4-2	20	15	75	30	22	73,33
Vic6-1	20	10	50	30	22	73,33
Vic6-2	20	10	50	30	8	26,67
Vic7-1	20	10	50	30	14	46,67
Vic7-2	20	10	50	30	16	53,33

4.9. PCR Vic Genotiplerinin, Eşleştirme Testi ile Teyit Edilmesi

Arazi izolatlarından 15 *C. parasitica* izolatının, PCR vic genotipleri, eşleştirme testlerinin sonuçları ile örtüşmüştür. Geri kalan 5 izolattan, PCR vic genotipi, EU-21 olan iki izolat, Avrupa EU-21 testeri ile uyumlu bulunmamıştır. Aynı şekilde PCR vic genotipinde, EU-55 olan iki izolat ve EU-17 olan bir izolat, Avrupa EU-55 ve EU-17 testeri izolatları ile uyumsuz bulunmuştur.

Çizelge 4.4. *Cryphonectria parasitica*'nın arazi izolatlarının eşleştirme testinde, PCR vic genotipi testeri ile vejetatif uyum durumu

Arazi izolatları	PCR vic genotipi	Kullanılan Avrupa vc grup testeri	Eşleştirme testi
DK-7	EU-30	EU-30	Uyumlu
DK-25	EU-8	EU-8	Uyumlu
DK-5	EU-3	EU-3	Uyumlu
DK-29	EU-3	EU-3	Uyumlu
DK-10	EU-12	EU-12	Uyumlu
DK-142	EU-12	EU-12	Uyumlu
DK-44	EU-17	EU-17	Uyumlu
DK-166	EU-30	EU-30	Uyumlu
DK-174	EU-22	EU-22	Uyumlu
DK-38	EU-25	EU-25	Uyumlu
DK-48	EU-25	EU-25	Uyumlu
DK-47	EU-7	EU-7	Uyumlu

Çizelge 4.4. *Cryphonectria. Parasitica*'nın arazi izolatlarının eşleştirme testinde, PCR *vic* genotipi testeri ile vejetatif uyum durumu (devamı)

Arazi İzolatları	PCR <i>vic</i> genotipi	Kullanılan Avrupa vc grup testeri	Eşleştirme testi
DK-58	EU-7	EU-7	Uyumlu
DK-104	EU-2	EU-2	Uyumlu
DK-125	EU-2	EU-2	Uyumlu
DK-46	EU-17	EU-17	Uyumsuz
DK-225	EU-21	EU-21	Uyumsuz
DK-257	EU-21	EU-21	Uyumsuz
DK-153	EU-55	EU-55	Uyumsuz
DK-170	EU-55	EU-55	Uyumsuz

Tek askospor izolatlarından ise, 21 *C. parasitica* izolatının, PCR *vic* genotipleri, eşleştirme testlerinin sonuçları ile örtüşmüştür. Geri kalan 9 izolattan, PCR *vic* genotipi, EU-51 olan üç izolat, Avrupa EU-51 testeri ile uyumlu bulunmamıştır. Aynı şekilde PCR *vic* genotipi, EU-12, EU-11, EU-22, EU-17, EU-58 ve EU-29 olan birer izolat, Avrupa tester izolatları ile uyumsuz bulunmuştur.

Çizelge 4.5. Tek askospor *Cryphonectria parasitica* izolatlarının eşleştirme testinde PCR *vic* genotipi testeri ile vejetatif uyum durumu

Tek askospor izolatlar	PCR <i>vic</i> genotipi	Kullanılan Avrupa vc grup testeri	Eşleştirme testi
DK-35/27	EU-29	EU-29	Uyumlu
DK-35/11B	EU-11	EU-11	Uyumlu
DK-35/8	EU-12	EU-12	Uyumlu
DK-35/15	EU-8	EU-8	Uyumlu
DK-49/21	EU-17	EU-17	Uyumlu
DK-49/19	EU-22	EU-22	Uyumlu
DK-49/29	EU-2	EU-2	Uyumlu
DK-49/24	EU-3	EU-3	Uyumlu
DK-145/4	EU-1	EU-1	Uyumlu
DK-145/24	EU-3	EU-3	Uyumlu
DK-145/3	EU-5	EU-5	Uyumlu
DK-145/15	EU-21	EU-21	Uyumlu
DK-145/13	EU-1	EU-1	Uyumlu
DK-187/10	EU-35	EU-35	Uyumlu
DK-187/16	EU-35	EU-35	Uyumlu
DK-177/10	EU-12	EU-12	Uyumlu

Çizelge 4.5. Tek askospor *Cryphonectria parasitica* izolatlarının eşleştirme testinde, PCR *vic* genotipi testleri ile vejetatif uyum durumu (devamı)

Tek askospor izolatlar	PCR <i>vic</i> genotipi	Kullanılan Avrupa vc grup testleri	Eşleştirme testi
DK-177/15	EU-17	EU-17	Uyumlu
DK-109/19	EU-36	EU-36	Uyumlu
DK-7/25	EU-1	EU-1	Uyumlu
DK-72/2	EU-12	EU-12	Uyumlu
DK-72/3	EU-12	EU-12	Uyumlu
DK-35/11A	EU-12	EU-12	Uyumsuz
DK-35/11C	EU-11	EU-11	Uyumsuz
DK-49/9	EU-22	EU-22	Uyumsuz
DK-49/10	EU-17	EU-17	Uyumsuz
DK-187/2	EU-51	EU-51	Uyumsuz
DK-187/11	EU-51	EU-51	Uyumsuz
DK-109/2	EU-58	EU-58	Uyumsuz
DK-109/22	EU-51	EU-51	Uyumsuz
DK-7/23	EU-29	EU-29	Uyumsuz

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllara gelinceye kadar, *C. parasitica* izolatlarının vejetatif uyum (vc) gruplarının belirlenmesi besi ortamında gerçekleştirilen eşleştirme testi ile yapılmıştır (Anagnostakis, 1977). Bu testlerde Cortesi ve Milgroom (1998) tarafından tanımlanmış EU-1 den EU-64'e kadar isimlendirilmiş vejetatif uyum testerları belirleyici izolat olarak kullanılmıştır. Vc grubu belirlenmesi istenen izolat, tüm tester izolatları ile tek tek besi ortamında yanyana gelişmeleri sağlanarak eşleştirilmekte ve tester izolat ile arazi izolatının kolonilerinin birleşme yerindeki baraj oluşumuna göre, uyum grupları belirlenmektedir (Cortesi ve Milgroom, 1998). Son derece kullanışlı olan bu yöntem ve tester izolatlar, bir çok ülkede çok sayıda araştırmacı tarafından, vc grup çeşitliliğinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Robin vd., 2001). Ancak bu yöntemde özellikle zayıf baraj oluşumu gibi durumlarda ortaya çıkan subjektif değerlendirmeler, hatalı sonuçların elde edilmesine yol açabilmektedir (Short vd., 2015). Nitekim Almanya'da geçmişte EU-2 olarak belirlenen izolatların, son yıllarda PCR temelli yapılan çalışmalarda EU-6 ve EU-13 oldukları saptanmıştır. Ayrıca tester izolat sayısının fazla olması nedeniyle ortaya çıkan çok sayıda eşleştirme kombinasyonları, eşleştirme testinde yoğun sarf malzeme, fiziksel alan ve zaman ihtiyacına yol açabilmektedir. Son yıllarda vc grup belirleme testlerini daha güvenilir ve hızlı hale getirmek için moleküler yöntemlere başvurulmuş ve PCR'da kullanılmak üzere, spesifik primerler geliştirilmiştir (Choi vd., 2012; Peters vd., 2013; Short vd., 2015). Ülkemizin Doğu Karadeniz illerinden elde edilmiş bazı vc grupların tanısı eşleştirme testinin yukarıda sözü edilen dezavantajları nedeniyle yapılamamıştır. Bu çalışma kapsamında Doğu Karadeniz Bölgesinden elde edilmiş 20 arazi izolatı ile 30 tekaskospor izolatı, PCR testi ile vc grupları belirlenme çalışmaları yürütülmüştür. Bunun için vejetatif uyumdan sorumlu olduğu düşünülen 6 *vic* gen bölgesine yönelik geliştirilmiş spesifik primerler ile her bir izolat vc gruplar yönünden incelenmiştir. İzolaların tümünde test edilen tüm gen bölgelerinde beklenen büyüklüklerde PCR fragman ürünleri elde edilmiştir. PCR testleri eşleştirme testine göre daha hızlı tamamlanmıştır. Eşleştirme testinde 10-15 günde elde edilen sonuçlar, PCR ile 1 günde elde edilmiştir. PCR testi sonucunda arazi izolatları arasında 11 vc grup ve tek askosporlar arasında 15 farklı vc grup bulunmuştur. Bu sonuçlar, bize Mangil ve Erincik (2018)'de rapor edildiği gibi ülkemizin Doğu Karadeniz Bölgesinde vc grup çeşitliliğinin artış gösterdiğini, moleküler düzeyde ortaya koymuştur. Ülkemizde vc grupların tanılanması, PCR ile ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, 6 *vic* geninin tamamının polimorfik olduğu saptanmıştır. Bu durum vc grup çeşitliliğinin yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir. *Vic3-1* hem arazi izolatları (% 90) hem de tek askospor izolatları (% 77) arasında en dominant allel olmuştur. Bunu arazi izolatları içerisinde % 75 ve tekaskospor izolatları içerisinde % 74 bulunma oranı ile *vic4-2* takip etmiştir. Daha önce ülkemizde yapılan bir çalışmada *vic3* ve *vic4* genleri polimorfik bulunmamış ve *vic3-1* ile *vic4-2* alelleri %100 oranında bulunmuştur (Daldal vd., 2018). Diğer *vic* gen allellerinin birbirine yakın bulunma oranlarında oldukları belirlenmiştir.

Arazi izolatlarından 15 *C. parasitica* izolatının, PCR *vic* genotipleri, eşleştirme testlerinden elde edilen sonuçlar ile örtüşmüştür. Geri kalan 5 izolattan, PCR *vic* genotipi, EU-21 olan iki izolat, Avrupa EU-21 testeri ile eşleştirme testinde uyumlu bulunmamıştır. Aynı şekilde PCR *vic* genotipinde, EU-55 olan iki izolat Avrupa EU-55 ile EU-17 olan bir izolat, EU-17 tester izolatı ile eşleştirme testinde uyumsuz bulunmuştur. Tek askospor izolatlarından ise, 21 *C. parasitica* izolatının, PCR *vic* genotipleri, eşleştirme testlerinin sonuçları ile örtüşmüştür. Geri kalan 9 izolattan, PCR *vic* genotipi, EU-51 olan 3 izolat, Avrupa EU-51 testeri ile uyumlu bulunmamıştır. Aynı şekilde PCR *vic* genotipi, EU-12, EU-11, EU-22, EU-17, EU-58 ve EU-29 olan birer izolat, Avrupa tester izolatları ile eşleştirme testinde uyumsuz bulunmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda da bizim sonuçlarımızda olduğu gibi PCR testi ile eşleştirme test sonuçlarının birbiri ile örtüşmediği görülmüştür. Short vd., (2015) tarafından yapılan bir çalışmada West Salem (WI) bölgesinde toplanan ve önceki çalışmalarda eşleştirme testinde farklı vc gruplarda tanımlanan 6 izolatın, moleküler tanıma tek bir vc grup, EU-52, içerisinde oldukları saptanmıştır. Bu izolatların iki adet EU-52 vc tester izolatı ile eşleştirme testlerinde 1 izolat hariç, hiç birisinin tester izolatlar ile uyuşmadığı görülmüştür. Moleküler çalışmalar ile ortaya çıkarılan bu durum, başka *vic* genlerinin ya da mevcut *vic* genlerinden bir ya da bir kaçında üçüncü allelin varlığı ile ilişkilendirilmiştir.

Son yıllarda dünyanın birçok ülkesinde Avrupa tester izolatları (EU-1 ve EU-64) ile eşleştirme testinde uyumlu olmayan izolatların varlığı belirlenmektedir (Robin vd., 2000; Trestic vd., 2001; Liu ve Milgroom, 2007; Montenegro vd., 2008; Zamora vd., 2012; Prospero vd., 2013; Peters vd., 2013; Aghayeva vd., 2017; Perez-Sierra vd., 2018). En son olarak ülkemizde Doğu Karadeniz Bölgesine komşu olan Gürcistan'da (Prospero vd., 2013) ve diğer bir Kafkas ülkesi Azerbaycan'da (Aghayeva vd., 2017) bu türden izolatlar rapor edilmiştir. Ülkemizde de Mangil ve Erincik (2018), Karadeniz Bölgesinde Avrupa uyum grupları ile uyuşmayan 6 vc

grubun varlığını bildirmişlerdir. Bir çok araştırmacı bu grupların varlığını yeni bir *vic* geni ya da bilinen 6 *vic* geninden bir veya birkaçında üç ve üzeri allelin olması ile ilişkilendirmişlerdir. Çalışmamızda bilinen 6 *vic* bölgesinin tümünde PCR da amplifikasyon elde edilmiş ve allel atamaları yapılmıştır. Yukarıda da belirtildiği gibi birçok izolat için PCR genotipleri ve eşleştirme genotipleri birbiri ile örtüşmüş olsa da bazı izolatlarda PCR sonuçlarını eşleştirme testi doğrulamamıştır. Sınırlı sayıda izolatta ortaya çıkan bu durumun sebebinin gelecekte yapılacak çalışmalarda açıklığa kavuşturulması gerekmektedir. PCR'ın eşleştirme testine göre hızlı bir test olması sebebiyle uyuşmaz ve grupların fazla olduğu popülasyonlarda ve belirleme çalışmalarının hızlandırılması için kullanılması önerilebilir. Ancak PCR sonucunda elde edilecek bulgular eşleştirme testi ile teyit edilmelidir.

Sonuç olarak, *C. parasitica*'nın neden olduğu kestane kanseri hastalığı, kestane ağaçlarını tahrip eden dünya çapında çok önemli bir hastalıktır. Dünyada karantina listesinde yer alan bu hastalığın mücadele yöntemleri oldukça sınırlıdır. Hipovirulent ırkların kullanıldığı biyolojik mücadele ile hastalık, etkili bir şekilde kontrol altına alınabilmektedir. Biyolojik mücadelenin başarısını etkileyen en önemli faktör, *C. parasitica*'nın vejetatif uyum grup çeşitliliğidir. Coğrafi bölgelere bağlı olarak, *C. parasitica*'nın ve grup çeşitliliği değişiklik göstermektedir. Doğu Avrupa ve Güney Doğu Avrupa ülkelerinde ve grup çeşitliliği düşük olup, biyolojik mücadelenin başarı şansı yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu nedenden birçok ülkede biyolojik mücadelenin başarı şansını önceden tahmin etmek amacıyla, *C. parasitica*'nın ve grupları ve çeşitliliği üzerine çalışmalar yürütülmüştür. Ülkemizde *C. parasitica*'nın ve grup çeşitliliği, birçok bölgede düşük olarak bulunmuş ve bu da biyolojik mücadele için avantajlı bir durum olarak yorumlanmıştır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda, Doğu Karadeniz Bölgesinde, *C. parasitica* ve grup sayısının artmakta olduğu saptanmıştır. Kestane alanlarının Karadeniz kıyıları boyunca devamlılık göstermesi, çeşitliliğin, Marmara ve Ege'ye kolayca yayılmasına neden olabilir. Bu nedenle ülkemizde son yıllarda ortaya çıkan bu ve grupların izlenmesi ve doğru tanılanması önemlidir. Türkiye, hem Avrupa'dan, hem de Gürcistan'dan gelen popülasyonların bulunduğu lokasyon olması açısından ve eşeyli üreme sonucu rekombinasyonlar oluşmasından, etmenin farklı ırklarına ev sahipliği yapması muhtemeldir. Nitekim bu çalışmada Mangil ve Erincik (2018)'in Doğu Karadeniz Bölgesi orijinli 50 izolat içinde, PCR tabanlı moleküler incelemeler yapılarak, *vic* genlerine bakılmış ve 19 ve grup bulunmuştur. Bu gruplar EU-12, EU-17, EU-3, EU-22, EU-21, EU-2, EU-1, EU-51, EU-30, EU-

8, EU-25, EU-7, EU-55, EU-29, EU-11, EU-35, EU-5, EU-36 ve EU-58'dir. Moleküler yöntemlerle etmenin vc gruplarının tanısı, besi ortamında eşleştirme ile yapılan klasik tanıya göre çok daha hızlı ve pratik olmaktadır. Ancak bazı izolatların (19 izolat) PCR tanısı Avrupa testerları kullanılarak yapılan eşleştirme testi ile örtüşmemiştir. Bu çalışma, moleküler yöntemlerle, PDA üzerindeki vc grup testleri arasında bazı durumlarda uyumsuzluk olduğunu göstermiştir. İki allelli 6 *vic* lokasyonu ile kontrol edildiği düşünülen *C. parasitica*'ya ait vejetatif uyumsuzluk genlerinin, başka *vic* lokasyonlarına veya başka allellere sahip olma olasılığı yüksek olarak görülmektedir. Bu görüşlerin gelecekte yapılacak çalışmalar ile araştırılması son derece önemlidir.

KAYNAKLAR

- Açıkgöz, S. Döken, M.T. Erincik, Ö. Özdemir, Z. değirmenci, N.F. 2009. Determination of Mating Types of *Cryphonectria parasitica* isolates collected form Aydın Province/Turkey bu multiplex PCR. **Acta Horticulturae**, 844: 367-372.
- Adamcikova, K. Juhasova, G. Kobza, M. 2006. Genetic diversity of *Cryphonectria parasitica* population in the Stiavnicko-Krupinska subpopulation in Slovakia. **Plant Protection Science**, 42: 119-124.
- Adamcikova, K. Kobza, M. Juhasova, G. 2009. The development of population structure of *Cryphonectria parasitica* on European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in the Experimental Castanetarium Horne Lefantovce, observed over a 12 year study period. **Horticultural Science**, 36:55-60.
- 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: 1-7.
- Akdoğan, S., Erkan, E., 1968. Attention! Chestnut blight was seen. **Tomurcuk**, 1: 4–5 (In Turkish).
- Akıllı, S., Katırcıoğlu, Y.Z., ve Maden, S. 2009. Vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica*, causal agent of chestnut blight, in the Black Sea region of Turkey. **Forest Pathology**, 39: 390-396.
- Akıllı, S. Serçe, U. Katırcıoğlu, Y.Z. Maden, S. Rigling, D. 2013. Characterization of hypovirulent isolates of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* form the Marmara and Black Sea region of Turkey. **European Journal of Plant Pathology**, 135: 323-334.
- Anagnostakis, S.L. 1977. Vegetative incompatibility in *Endothia parasitica*. **Experimental Mycology**, 1: 306-316.
- Anagnostakis, S.L. 1978. Testing *Endothia parasitica* strains for vegetative incompatibility. **Proceedings of the American Chestnut Symposium, Morgantown**, West Virginia, January 4-5, 1978. pp..101-102.
- Anagnostakis, S.L. Hau, B. Krank, J. 1986. Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. **Plant Disease**, 70:536-538.

- Anagnostakis, S. L. 1987. Chestnut Blight: The Classical problem of an introduced pathogen. **The New York Botanical Garden**, 79(1): 23-37.
- Andes, J.O. 1961. Cultural variation in *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, 51:808.
- Anonim, 2017, FAO, (Food and Agricultural Organization of the United Nations). <http://apps.fao.org/faostat> Erişim Tarihi:01.03.2018.
- Anonim, 2019, [www.tuik.gov.tr] Erişim Tarihi: 29.05.2019.
- Anonim, 2018a, [<https://tr.wikipedia.org/wiki/Kestane>] Erişim Tarihi: 01.03.2018.
- Anonim, 2018b, [<https://www.cabi.org/isc/datasheet/21108>] Erişim Tarihi: 01.09.2018.
- Anonim, 2008, Zirai M¼cadele Teknik Talimatları Cilt V. Ankara.
- Anonim,2012,[[https://www.ogm.gov.tr/Lists/Haberler/Attachments/457/KESTAN E%20EYLEM%20PLANI.pdf](https://www.ogm.gov.tr/Lists/Haberler/Attachments/457/KESTAN_E%20EYLEM%20PLANI.pdf)] Erişim Tarihi: 15.06.2019.
- Barr, M. E. 1978. The Diaporthales in North America with emphasis on *Gnomonia* and its segregates. **Mycologia Memoirs**, 7: 1-232.
- 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 B**, 269: 2269–2276.
- Biraghi, A. 1954. Possible active resistance to *Endothia parasitica* in *Castanea sativa*. IUFRO, 11th Congress Proceedings, 643-645.
- Bissegger, M. Rigling, D. and Heiniger, U. 1997. Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European chestnut forests in the presence of natural hypovirulence. **Phytopathology** 87:50-59.
- Brangança, 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: 391-402.
- Choi, G.H.Nuss, D.L. 1992. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. **Science**, 257: 800–803.

- Choi, GH. vd. 2012. Molecular characterization of vegetative incompatibility genes that restrict hypovirus transmission in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. **The Genetics Society of America**, 190:113-127.
- Cortesi, P. Milgroom, M.G. and Bisiach, M. 1996. Distribution and diversity of vegetative compatibility types in subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in Italy. **Mycological Research**, 100:1087–1093.
- Cortesi, P. Milgroom, Michael G. 1998. Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. **Applied and Environmental Microbiology**, 4(8): 2988-2994.
- Cortesi, P. Rigling, D. Heiniger, U. 1998. Comparison of vegetative compatibility types in Italian and Swiss populations of *Cryphonectria parasitica*. **European Journal of Forest Pathology**, 28: 167-176.
- Cortesi, P. McCulloch, C.E. Song, H.Y. Lin, H.Q. Milgroom, M. G. 2001. Genetic control horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Genetics**, 159: 107-118.
- Çeliker, N.M. Onoğur, E. 2001. Evaluation of hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* for the biological control of chestnut blight in Turkey. **Forest Snow Landscape Research**, 76: 378-382
- Daldal, .M. Erincik, Ö. 2018. Geographical distribution of vegetative compatibility and mating types of *Cryphonectria parasitica* in İzmir, Manisa ve Denizli provinces in Western Turkey. **Forest Pathology**, 48: 1-13.
- Diller, D. 1965. Chestnut Blight. **U.S. Department of Agricultural Forest Pest Leaflet**, 94:1-7.
- Dutech, C., Barres, B., Bridier, J., Robin, C., Milgroom, M.G. and Ravigne, V. 2012. The chestnut blight fungus world tour: successive introduction events from diverse origins in an invasive plant fungal pathogen. **Molecular Ecology**, 21:3931–3946.
- EPPO. 2005. EPPO Standards – Diagnostic protocols for regulated pests – PM7/45 *Cryphonectria parasitica*. EPPO Bulletin, 35: 295– 298.

- Erincik, Ö. Döken, M.T. Açıkgöz, S. Ertan, E. 2008. Characterization of *Cryphonectria parasitica* isolates collected from Aydın province in Turkey. **Phytoparasitica**, 36: 249-259.
- Erincik, Ö. Özdemir, Z. Durdu, Ö.F. Döken, M.T. Açıkgöz, 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: 555-566.
- Grente, M.J. 1965. Les formes hypovirulentes d'*Endothia parasitica* et les espoirs de lutte contre le chancre du châtaignier. **Academic Journal of Agriculture**, Fr. 51, 1033–1036.
- Grente, J. 1981. Les variants hypovirulents de l'*Endothia parasitica* et la lutte biologique contre le chancre du châtaignier. Ph. D. thesis. Université de Bretagne Occidentale, Brest, France. 195 pp.
- Grente, J. Berthelay-Sauret, S. 1969a. L'hypovirulence exclusive, phénomène original en pathologie végétale. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, 268: 2347-2350.
- Grente, J. Berthelay-Sauret, S. 1969b. L'hypovirulence exclusive, est-elle contrôlée par des déterminants cytoplasmiques? **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris**, 268: 3173-3176.
- Gürer, M. Ottaviani, M.P. Cortesi, P. 2001. Genetic diversity of subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in two chestnut-growing regions in Turkey. **Forest Science and Landscape Research**, 76: 383-386.
- Heiniger, U. Rigling, D. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. **Annual Review of Phytopathology** 32: 581–599.
- Hillman, B.I. Suzuki, N. 2004. Viruses of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Advances in Virus Research**, 63: 423–472.
- Hoegger, P.J. Rigling, D. Holdenrieder, O. Heiniger, U. 2000. Genetic structure of newly established populations of *Cryphonectria parasitica*. **Mycological Research**, 104: 1108-1116.
- Jezic, M. Mlinarec, J. Vukovic, R. Katanic, Z. Kristin, L. Nuskern, L. Poljak, I. Idzotic, M. Tkalec, M. Curkovic-Perica, M. 2018. Changes in

- Cryphonectria parasitica* populations affect natural biological control of chestnut blight. **Phytopathology**, 108(7): 870-877.
- Karabulut, C. 2017, [<https://aydinticaretborsasi.org.tr/yönetim/PDF/2442019145519u.pdf>] Erişim Tarihi: 15.06.2019.
- Krstin, L. Novak-Agbaba, S. Rigling, D. Krajacic, M. Curkovic Perica, M. 2008. Chestnut blight fungus in Croatia: diversity of vegetative compatibility types, mating types and genetic variability of associated *Cryphonectria hypovirus 1*. **Plant Pathology**, 57: 1086-1096.
- Kristin, L. Novak-Agbaba, S. Rigling, D. Curkovic-Perica, M. 2011. Diversity of vegetative compatibility types and mating types of *Cryphonectria parasitica* in Slovenia an occurrence of associated *Cryphonectria hypovirus 1*. **Plant Pathology**, 60: 752-761.
- Kubisak, T.L. Milgroom, M.G. 2006. Markers linked to vegetative incompatibility (*vic*) genes and a region of high heterogeneity and reduced recombination near the mating type locus (MAT) in *Cryphonectria parasitica*. **Fungal Genetics and Biology**, 43(6): 453-463.
- Liu, Y. C. Milgroom, M. G. 1996. Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (*vic*) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. **Phytopathology**, 86: 79-86.
- Liu, Y. C. Milgroom, M.G. 2007. High diversity of vegetative compatibility types in *Cryphonectria parasitica* in Japan and China. **Mycologia**, 99: 279-284.
- MacDonald, W.L. Double, M.L. 1978. Frequency of vegetative compatibility types of *Endothia parasitica* in two areas of West Virginia. **Division of Plant Sciences, West Virginia University**, Morgantown. West Virginia, January 4-5, 1978. pp. 103-105.
- Mangil, E. Erincik, Ö. 2018. Sexual reproduction contributes to vegetative compatibility type diversity in the population of *Cryphonectria parasitica* in the East Black Sea Region of Turkey. **Australasian Plant Pathology**, 1-19.
- Marra, R. E., ve Milgroom, M. G. 2001. The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: selfing and self-incompatibility. **Heredity**, 86:134– 143.

- Merkel, H. W. 1905. A deadly fungus on the American chestnut. **New York Zoological Society 10th Annual Report**, pp. 97-103
- Metcalf, H. Collins, J. F. 1911. The Disease. The Control of Chestnut Bark Disease. Government printing office, pp. 5, Washington.
- Micalese, J.A. Stipes, R.J. 1987. A reexamination of the fungal genera *Cryphonectria* and *Endothia*. **Phytopathology**, 77: 650-654.
- Milgroom, M.G. Cortesi, P. 1999. Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 96: 10518-10523.
- Milgroom, M.G. Sotirovski, K. Spica, D. Davis, J.E. Brewer, M.T. Miley, M. Cortesi, P. 2008. Clonal population structure of the chestnut blight fungus in expanding ranges in southeastern Europe. **Molecular Ecology**, 17: 4446-4458.
- Mlinarec, J. vd. 2017. Multilocus PCR assay reveals high diversity of vegetative compatibility types in population of *Cryphonectria parasitica* in Croatia. **Plant Pathology**.
- Montenegro, D. Aguin, O. Hermida, M. Mansilla, J.P. Sainz, M.J. 2008. Diversity of vegetative compatibility types, mating types and occurrence of hypovirulence in *Cryphonectria parasitica* populations in NW Spain. **Forest Ecology and Management**, 5: 973-980.
- Nash, B.L. 1983. The potential for transmission of hypovirulence to hosts of *Endothia parasitica* in North Carolina. Ph.D. Thesis, Duke University. Durham, North Carolina, 181 p.
- Perez-Sierra, A. Ochoa, P.R. Ochoa, P.R. Gorton, C. Lewis, A. Rees, H. Van Der Linde, S. Webber, J. 2018. High vegetative compatibility diversity of *Cryphonectria parasitica* infecting sweet chestnut (*Castanea sativa*) in Britain indicates multiple pathogen introductions. **Plant Pathology**, 68: 727-737.
- Perlerou, C. Damandis, S. 2006. Identification and geographic distribution of vc types of *Cryphonectria parasitica* and occurrence of hypovirulence in Greece. **Forest Pathology**, 36: 413-421.

- Peters, F.S., Bußkamp, J., Prospero, S., Rigling, D., Metzler, B. 2013. Genetic diversification of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* and its associated hypovirus in Germany. **Fungal Biology**, 118:193–210.
- Prospero, S. Rigling, D. 2013. Chestnut blight. Infectious Forest Diseases (Gonthier, P and Nicolotti, G.). CABI Publishing, pp. 318-339, England.
- Prospero, S. Lutz, A. Tavadze, B. Supatashvili, A. Rigling, D. 2013. Discovery of a new gene pool and high genetic diversity of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in Caucasian Georgia. **Infection, Genetics and Evolution**, 20:131-139.
- Rigling, D. Prospero, S. 2018. *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control. **Molecular Plant Pathology**, 19:7-20.
- 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: 730-737.
- Robin, C. Capdevielle, X. Martin, M. Traver, C. Colinas, C. 2009. *Cryphonectria parasitica* vegetative compatibility type analysis of populations in south-western France and northern Spain. **Plant Pathology**, 58: 527-535.
- Shear, C.L., Stevens, N.E. ve Tiller, R.J., 1917. Endonezya bu othia parasitica and related species, **United States Department of Agriculture Bulletin**, 380-382.
- Short, DPG vd., 2015. Multilocus PCR Assays Elucidate Vegetative Incompatibility Gene Profiles of *Cryphonectria parasitica* in the United States. **Applied and Environmental Biology**, 81:5736-5742.
- Spica, D. Sammarco, G. Pennisi, A:M. Zappia, R. 2006. Diversity of vegetative compatibility and mating types in *Cryphonectria parasitica* populations form Calabria. **Advances in Horticultural Science**, 20: 45-49.
- Sotirovski, K. Papazova-Anakieva, I. Grünwald, N.J. Milgroom, M:G. 2004. Low diversity of vegetative compatibility types and mating type in *Cryphonectria parasitica* in the southern Balkans. **Plant Pathology**, 53: 325-333.

- Trestic, T. Uscuplic, M. Colinas, C. Rolland, G. Giraud, A. Robin, C. 2001. Vegetative compatibility type diversity of *Cryphonectria parasitica* populations in Bosnia-Herzegovina, Spain and France. **Forest Show and Landscape Research**, 76: 391-396.
- Van Alfen, N. K. Jaynes, R. A. Anagnostakis, S. L. Day, P. R. 1975. Chestnut blight: biological control by transmissible hypovirulence in *Endothia parasitica*. **Science**, 189: 890-891.
- Wang, K. Shao, J. Lu, J. 1991. On vegetative compatibility of *Cryphonectria parasitica* in Jiangsu and Anhui. **Journal of Nanjing Agricultural University**, 14: 44-48.
- Zamora, P. Martin, A.B. Rigling, D. Diez, J.J. 2012. Diversity of *Cryphonectria parasitica* in Western Spain and identification of hypovirus-infected isolates. **Forest Pathology**, 42: 412-419.
- Zamora, P. Martin, A.B. Martin, R.S. Martinez-Alvarez, P. Dies, J.J. 2014. Control of chestnut blight by the use of hypovirulent strains of the fungus *Cryphonectria parasitica* in northwestern Spain. **Biological Control**, 79: 58-66.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Esra Hatipoğlu

Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul, 16/12/1971

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : ADÜ/Ziraat Fakültesi/Bitki Koruma Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : ADÜ/Fen Bilimleri Enstitüsü/ Bitki Koruma

Yabancı Diller : İngilizce, Japonca

İLETİŞİM

E-Posta Adresi : esrah@yahoo.com