

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI  
2015-YL-050

İZMİR, MANİSA, MUĞLA ve DENİZLİ İLLERİ'NDE  
*Cryphonectria parasitica*  
POPULASYONLARININ VEJETATİF UYUM GRUPLARI  
ve MATİNG TİPLER YÖNÜNDEN  
KARAKTERİZASYONU

Müzeyyen DALDAL




Tez Danışmanı:  
Doç. Dr. Ömer ERİNCİK

AYDIN



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

Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Müzeyyen DALDAL tarafından hazırlanan İzmir, Manisa, Muğla ve Denizli İlleri'nde *Cryphonectria parasitica* Populasyonlarının Vejetatif Uyum Grupları ve Mating Tipler Yönünden Karakterizasyonu başlıklı tez, 11/08/2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ	ADÜ	
Üye : Doç. Dr. Himmet TEZCAN	UÜ	
Üye : Doç. Dr. Ömer ERİNCİK	ADÜ	

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

Prof. Dr. Aydın ÜNAY  
Enstitü Müdürü



**T.C.**  
**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.

..../..../2015  
Müzeyyen DALDAL



## ÖZET

### İZMİR, MANİSA, MUĞLA ve DENİZLİ İLLERİ'NDE *Cryphonectria parasitica* POPULASYONLARININ VEJETATİF UYUM GRUPLARI ve MATİNG TİPLER YÖNÜNDEN KARAKTERİZASYONU

Müzeyyen DALDAL

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ömer ERİNCİK

2015, 58 sayfa

Bu çalışmanın amacı; İzmir, Denizli, Muğla ve Manisa illerinde Kestane Kanseri etmeni *Cryphonectria parasitica* populasyonlarının vejetatif uyum (vc) grupları ve mating tipler yönünden karakterize edilmesidir. Bu çalışmada ilk olarak adı anılan illerin önemli kestane üreticisi 19 köyünden, kanserli ağaçlardan doku örnekleri alınarak *C. parasitica* izolatları elde edilmiştir. Elde edilen 268 adet izolatın tümünün vejetatif uyum grupları Avrupa tester izolatları ile eşleştirmek suretiyle belirlenmiştir. Farklı örnekleme lokasyonlarından temsili olarak seçilen 55 izolatında mating tipleri spesifik primerler kullanılarak multiplex-PCR ile saptanmıştır. Çalışma sonucunda İzmir ilinde *C. parasitica*'nın EU-1 (% 31,6), EU-12 (% 50,4) ve EU-2 (% 18) olmak üzere üç vc grubu bulunurken Manisa ve Denizlide EU-1 ve EU-12 vc gruplarının varlığı saptanmıştır. Üç ilde de hem MAT-1 hem de MAT-2 izolatları elde edilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar, *C. parasitica* nın vc çeşitliliğinin bölgede düşük olduğunu göstermektedir. Böyle bir populasyon yapısı, hipovirüent ırklarla sağlanan biyolojik mücadele için oldukça uygundur. Ancak her iki eşleşme tipinin bölgede varolması nedeniyle *C. parasitica* 'nın eşeyli üreyebilme olasılığı vardır. Böyle bir durum bölge için yeni vc grupların ortaya çıkarak vc çeşitliliğinin artması riskini yaratmaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Kestane kanseri, *Cryphonectria parasitica*, vejetatif uyum grupları ve mating tipler





## ABSTRACT

### CHARACTERISATION OF THE POPULATIONS OF *Cryphonectria parasitica* IN İZMİR, MANİSA, MUĞLA AND DENİZLİ PROVINCES IN TERMS OF VEGETATIVE COMPATIBILITY GROUPS AND MATING TYPES

Müzeyyen DALDAL

Ms.C. Thesis, Department of Animal Sciences

Supervisor: Assist. Doç. Dr. Ömer ERİNCİK

2015, 58 pages

The purpose of this study, characterization of the population of *Cryphonectria parasitica* in the provinces of Izmir, Muğla, Denizli and Manisa in terms of vegetative compatibility (vc) groups and mating types. In this study, firstly bark tissue samples taken from blighted trees from 19 important chestnut producer villages of these provinces in order to obtain *C. parasitica* isolates. In total, 268 isolates were paired with European tester isolates to determine their vegetative compatibility group. Selected as representative of each sampling locations, 55 isolates were subjected to mating types determination by multiplex-PCR using specific primers. According to results, three vc groups, EU-1 (% 31,6), EU-12 (% 50,4) and EU-2 (% 18), were found in İzmir Province. In Manisa and Denizli Provinces, EU-1 and EU-12 are two vc groups were detected. Both mating types, MAT-1 and MAT-2, were found in all three provinces. The results of this study indicated that the vc diversity of *C. parasitica* is low in the region. This may provide ideal conditions for hypovirulent related biological control of chestnut blight. However presence of both mating types in the region creates high possibility for occurrence of sexual reproduction. In this case, there would be high risk for increase in vc diversity emergence of the new vc groups as a results of sexual recombination of different vc alleles.

**Key words:** Chestnut blight, *Cryphonectria parasitica*, vegetative compatibility groups, mating type



## ÖNSÖZ

Kestane üretimi ülkemizin iklim ve toprak özellikleri açısından yetiştiriciliği için uygun olup, önemli bir üretim potansiyeline sahiptir. Ancak kestane alanlarında görülen Kestane Kanseri ülkemizde kestane üretimini tehdit eden önemli hastalıklardan biridir. Bu hastalığın mücadelesi oldukça sınırlı olup en etkili yol hipovirulent ırkların kullanıldığı biyolojik mücadeledir. Biyolojik mücadelenin bir bölgede başarısını etkileyen en önemli faktörlerden biri *Cryphonectria parasitica*'nın o bölgedeki ve çeşitliliğidir. Bu nedenle Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen araştırmamız Aydın çevresinde bulunan illerdeki (İzmir, Denizli, Manisa ve Muğla) ve grupları ve mating tiplerini tespit ederek biyolojik mücadelenin uygulanabilirliğine yönelik hazırlanmıştır.

Çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı danışman hocam sayın Doç. Dr Ömer ERİNCİK' e, çalışmalarımda bana yardımcı olan Zir. Yük. Müh. Ramazan ÖZBAY' a ve Zir. Müh. Engin MANGİL' e ve işverenim Arzu ALŞAHİN' e teşekkür ederim.

Ayrıca eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen annem Zübeyde DALDAL ve babam Hulusi DALDAL' a da sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



## 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 Tanıtım.....	8
2.2.Yurtdışında Yapılan Çalışmalar .....	13
2.3. Yurtiçinde Yapılan Çalışmalar .....	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM .....	19
3.1. Materyal .....	19
3.2. Yöntem .....	19
3.2.1. Örnek toplama .....	19
3.2.2.Patojenin İzolasyonu .....	21
3.2.3. İzolatların Vejetatif Uyum (VC) Gruplarının Belirlenmesi .....	23
3.2.4. Mating Tiplerin Belirlenmesi .....	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	29
4.1. Örnek Toplama Çalışmaları .....	29
4.2. İzolatların Vejetatif Uyum Grupları .....	34
4.3 İzolatların Mating Tipleri.....	42
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	47
KAYNAKLAR .....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	58



## **SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ**

TARBİYOMER	: Tarımsal Biyoteknoloji ve Gıda Güvenliği Uygulama ve Araştırma Merkezi
FAO	: Food Agriculture Organization
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
GPS	: Global Positioning System
pH	: Power of Hydrogen
M	:Molar
mg	:Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
µL	:Mikrolitre
gr	: Gram
bp	: Base pair
kB	: Kilo baz
rpm	: Rotatory per minute
UV	: Ultra Violet
%	: Yüzde





## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. a) <i>Cryphonectria parasitica</i> 'nın sarı-turuncu renkli stromaları b) <i>Cryphonectria parasitica</i> 'nın kabuk dokusu arasındaki miselyal gelişimi .....	9
Şekil 2.2. Kanserli dal üzerinde gözlenen solgunluk ve kurumalar .....	9
Şekil 3.1. Kestane kanseri örneklemelerinin yapıldığı ana lokasyonlar .....	20
Şekil 3.2. Materyal eldesinde arazi ve laboravuar çalışmaları a) Kestane kanseri örnekleme çalışmaları, b) İzolasyon petrilerindeki misel kolonisi gelişimi, c) Saflaştırılmış bir <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatu, d) İzolatların eğik agarda gelişimi .....	22
Şekil 3.3. <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının Vc gruplarının belirlenmesi testleri .....	24
Şekil 3.4. <i>Cryphonectria parasitica</i> tester ve izolatları arasında uyum ve uyumsuzluk reaksiyonları .....	24
Şekil 3.5. Steril sefyon disk üzerinde bir <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatının gelişimi .....	25
Şekil 3.6. <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının DNA ekstraksiyonu çalışmaları .....	27
Şekil 4.1. Kestane ağacının yapraklı döneminde hastalığın genel görünümü (a, b) .....	30
Şekil 4.2. Kestane kanseri hastalığının belirtileri; a) Gövde de görülen kızıl-kahverengi, hafif çökük lekeler ve çatlamalar, b) Dalda ileriki dönemlerde oluşan boyuna ve derin çatlaklar .....	30
Şekil 4.3. İzmir, Manisa ve Denizli illeri kestane alanlarından elde edilen <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının vejetatif uyum gruplarına göre sayısal dağılımı. ....	34
Şekil 4.4. Ödemiş, Bozdağ ve Kiraz kestane alanlarındaki izolatlardan elde edilen Vc grupları ve dağılımı .....	37
Şekil 4.5. İzmir-Tire kestane alanlarındaki izolatlardan elde edilen vc tipleri ve dağılımı .....	38
Şekil 4.6. Manisa-Salihli kestane alanlarındaki izolatlardan elde edilen vc tipleri ve dağılımı .....	39
Şekil 4.7. Manisa/Alaşehir kestane alanlarındaki izolatlardan elde edilen vc tipleri ve dağılımı .....	40
Şekil 4.8. Manisa/Sarıgöl kestane alanlarındaki izolatlardan elde edilen vc tipleri ve dağılımı .....	40

Şekil 4.9. Denizli-Babadağ kestane alanlarındaki izolatlardan elde edilen vc tipleri ve dağılımı.....	41
Şekil 4.10. Denizli-Buldan kestane alanlarındaki izolatlardan elde edilen vc tipleri ve dağılımı.....	42
Şekil 4.11. <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarından elde edilen DNA'ların agar jel elektroforez görüntüsü .....	43

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Kestanenin (yenebilir kısmı) besin öğeleri .....	2
Çizelge 1.2. Önemli kestane üreticisi ülkelerin 2013 yılı kestane üretim miktarları .....	2
Çizelge 1.3. Türkiye’de coğrafik bölgelere göre 2014 yılı kestane üretim miktarları .....	3
Çizelge 1.4. Ege Bölgesindeki kestane üretim durumu .....	4
Çizelge 3.1. İzolatların elde edildiği ilçeler, köyler ve elde edilen izolat sayısı ....	20
Çizelge3.2. <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının DNA ekstraksiyonunda kullanılan lysis buffer içeriği .....	26
Çizelge3.3. <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının mating tiplerinin belirlenmesinde kullanılan primerler .....	28
Çizelge 4.1 İzmir, Manisa ve Denizli illeri kestane üretim alanlarından toplanan kestane kanseri örneklerinden elde edilen <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatları ve sayıları .....	32
Çizelge 4.2. İzmir ili kestane alanlarından toplanan <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının vc gruplara göre dağılımı .....	36
Çizelge 4.3 Manisa ili kestane alanlarından toplanan <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının vc gruplara göre dağılımı .....	39
Çizelge 4.4. Denizli ili kestane alanlarından toplanan <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının vc gruplara göre dağılımı .....	41
Çizelge 4.5. İzmir, Manisa ve Denizli illerinden toplanan <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının PCR sonucu belirlenen mating tipleri .....	44
Çizelge 4.6. Sadece mating tiplerine bakılan izolatların vc tip leri.....	46



## 1. GİRİŞ

Kestane Fagaceae familyası, *Castanea* cinsine ait olup *Castanea sativa* Mill, *Castanea dentata*, *Castanea mollissima* ve *Castanea crenata* gibi çeşitli türleri bulunmaktadır (Anonim, 2015a.). Beş yüz yıl kadar canlılığını sürdürebilen kestane ağaçları, boyları 30 metreye kadar ulaşabilen görkemli ağaçlardandır. Kestane, doğada ormanlık alanlarda kendiliğinden yetişebilmesinin yanında, tarım alanlarında kültürü yapılan bir tarım bitkisi'dir. Kestanenin orijini hakkında kesin bir bilgi olmamakla birlikte kestanenin anavatanının Anadolu olduğu ve adını da bugünkü adıyla Kastamonu olan Kastanis şehrinden aldığı ileri sürülmektedir (Jaynes, 1979; Soylu, 1984).

Meyve veren bir orman ağacı olarak kestane, yaban hayatta birçok hayvan türüne besin sağlaması nedeniyle ekolojik hayatın önemli bir parçasıdır. İnsan hayatında da gerek meyvesi gerekse de kerestesi ile önemli bir yer tutmaktadır. Meyvesi doğrudan tüketilebildiği gibi reçel, un ve şekerleme yapımında kullanılmaktadır. Kerestesi mobilyacılıkta, ev yapımında, yapı işlerinde, demiryolu raylarının döşenmesinde, gemi yapımında ve elektrik direği olarak kullanılmaktadır. Yaprak ve çiçeklerinden ilaç ve kozmetik sanayinde faydalanılırken genç sürgünlerinden ise sepet ve küfe yapılmaktadır. Ayrıca içeriğinde bulunan tanin, boya maddesi olarak deri sanayinin önemli hammaddelerinden biridir (Anonim, 2015b.).

Yenebilir nitelikteki kestane başta nişasta ve çeşitli şekerler olmak üzere lifli maddeler, protein, çeşitli mineral maddeler, B1, B2 ve C vitaminlerini içermektedir. Ayrıca düşük oranda yağ ihtiva etmesine karşılık, yağ asitlerinden linoleik ve linolenik asitleri yönünden zengindir. Bu iki yağ asidi, yetişkinlerde kalp hastalıklarının önlenmesinde ve çocuklarda retinanın gelişmesinde etkili olmaktadır. Ayrıca kestane içeriğinde bulunan nişasta, sakkaroz, protein ve tanen gelişme çağındaki çocuklar için de çok yararlı bir gıdadır (Anonim, 2015b.).

Çizelge 1.1. Kestanenin (yenebilir kısmı) besin öğeleri (Anonim, 2015b.)

<b>Besin öğeleri</b>	<b>100 g kestane meyvesinde</b>
Kalori (kcal)	160
Karbonhidrat	34 g
Şeker	9,6 g
Protein	3,2 g
Yağ	1,8 g
Potasyum	500 mg
Magnezyum	35 mg
Sodyum	160

Ülkemiz iklim ve toprak özellikleri yönünden kestane yetiştiriciliği için uygun olup, önemli bir üretim potansiyeline sahiptir. FAO nun 2013 yılı verilerine göre Türkiye, kestane üretiminde Çin ve Kore'den sonra 3. sırada yer almaktadır. Dünya'da kestane üretiminin durumuna bakıldığında 1.650.000 ton' luk üretimiyle Çin 1. sırada, 79.902 tonluk üretimi ile Kore 2. sırada, 60.019 tonluk üretimi ile ise Türkiye 3. sırada yer almaktadır. Bunları takiben 4. sırada İtalya ve 5. Sırada Yunanistan gelmektedir (FAO, 2013).

Çizelge 1.2. Önemli kestane üreticisi ülkelerin 2013 yılı kestane üretim miktarları. (FAO, 2013)

<b>Ülkeler</b>	<b>Üretim/Ton</b>
Çin	1.650.000
Kore	79.902
Türkiye	60.019
İtalya	49.459
Yunanistan	29.900
Portekiz	24.700
İspanya	17.200
Dünya	2.009.487

Kestane, ülkemizde yaygın olarak Karadeniz Bölgesi, Marmara Denizi çevresi ile Batı Anadolu'dan Antalya'ya kadar olan alanlarda yetişmektedir (Soylu, 1997). Karadeniz Bölgesinde daha çok bir orman ağacı olarak kıyılar boyunca doğal olarak yayılım göstermektedir. Ege ve Marmara Bölgelerinde ise meyvesi nedeniyle bir tarım ürünü olarak kültüre alınmış formları tarım arazilerinde yetiştirilmektedir. 2014 yılı TÜİK verilerine göre ülkemizde Ege Bölgesinin kestane meyvesi üretim payı %59 olup üretim miktarı 36.803 ton dolayındadır.

Çizelge 1.3. Türkiye'de coğrafik bölgelere göre 2014 yılı kestane üretim miktarları (TÜİK, 2014)

<b>Bölgeler</b>	<b>Üretim/Ton</b>
Ege	36.803
Batı Karadeniz	19.245
Doğu Karadeniz	1.462
Doğu Marmara	3.905
Batı Marmara	2.195
Akdeniz	88
Ortadoğu Anadolu	14
<b>Türkiye</b>	<b>60.019</b>

Ege Bölgesinde 20.989 ton' luk kestane üretimi ile Aydın birinci sırada, 10.176 tonluk üretimiyle İzmir ikinci sırada, 2.493 tonluk üretimi ile ise Manisa üçüncü sırada yer almaktadır. Bu illere takiben Afyon 2 ton, Denizli 1.888 ton ve Kütahya'nın da 1.168 ton üretim yaptığı 2014 TÜİK verilerince bildirilmiştir.

Çizelge 1.4. Ege Bölgesi' ndeki kestane üretim durumu (TÜİK, 2014)

İller	Üretim/Ton	%
İzmir	10.176	17
Aydın	20.989	33
Denizli	1.888	3
Manisa	2.493	3
Afyon	2	3
Kütahya	1.168	1.6
<b>Türkiye</b>	<b>60.019</b>	

İstilacı bir orman ağacı olma özelliği nedeniyle geçmişte milyonlarca hektar yayılış alanı ile dünya üzerinde en yaygın bulunan ağaçlar içinde yer alan kestane 20. yüzyılın başlarından itibaren kestane kanseri hastalığı nedeniyle bu özelliğini yitirmeye başlamıştır. *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr adlı bir fungal etmenin neden olduğu Asya kökenli olduğu düşünülen bu hastalık; ilk kez 1904 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nin New York Eyaletinde bir hayvanat bahçesinde Amerikan kestanesi ağacı üzerinde saptanmıştır (Merkel, 1905'e atfen Anagnostakis, 2001). Hastalık kısa sürede ABD'de diğer eyaletlere sıçrayarak takip eden 40 yıl içerisinde 3-4 milyardan fazla kestane ağacının ölümüne neden olmuştur (Hepting, 1974).

Etmen Avrupa' da ilk kez Biraghi tarafından 1938 yılında İtalya'da Genova yakınlarında Avrupa kestanesi (*C. sativa*) üzerinde rapor edilmiştir (Biraghi A, 1950). Bunu takip eden yıllarda hastalık İtalya'ya komşu olan ülkelerde de görülmüştür. 1947 yılında İspanya' da, 1948 yılında İsviçre'de, 1950 yılında Slovenya' da, 1955 yılında Hırvatistan' da ve 1956 yılında Fransa' da rapor edilmiştir. Daha sonraki yıllarda hastalık Balkan ve Doğu Avrupa ülkelerine sıçrayarak yayılmaya devam etmiştir. 1961 yılında Bosna-Hersek'te, 1963 yılında Yunanistan'da, 1967 yılında Arnavutluk'ta, 1968 yılında Türkiye'de, 1969 yılında Macaristan'da, 1970 yılında Avusturya'da, 1974 yılında Makedonya'da, 1976 yılında Slovakya'da ve 1984 yılında Romanya'da bildirilmiştir (Robin ve Heiniger, 2001).



Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Organizasyonu (EPPO)' nun kayıtlarına göre günümüzde kestane kanseri Asya, Avrupa, Afrika ve Kuzey Amerika kıtasında olmak üzere birçok ülkede gözlenmiştir. Asya kıtasında Çin, Gürcistan, Hindistan, Japonya, Güney Kore, Kuzey Kore, Tayvan' da, Avrupa kıtasında Avusturya, Belçika, Bosna-Hersek, Fransa, Almanya, Yunanistan, Macaristan, İtalya, Makedonya, Polonya, Rusya (Karadeniz kıyıları), Slovakya, Slovenya, İspanya, İsviçre, Türkiye, Ukrayna ve Yugoslavya'da, Afrika kıtasında Tunus'da, Kuzey Amerika kıtasında Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri'nde varlığı tesbit edilmiştir (EPPO, 2005)

Türkiye' de ilk kez 1967' de Marmara Bölgesi' nde ortaya çıkmıştır (Akdoğan ve Erkman, 1968). Buna takiben 1967' de Bursa' da (Akdoğan ve Erkman, 1968), 1975 İstanbul, Kocaeli, Sakarya ve Bolu olmak üzere Karadeniz Bölgesi kestane alanlarında yayılarak çok sayıda ağacın ölümüne neden olmuştur (Delen, 1975). 1994 yılında Balıkesir, Zonguldak, Kastamonu, Sinop (Coşkun ve Kural, 1994), 1999 yılında Giresun, Rize (Coşkun vd., 1999), 2000 yılında Çanakkale, Manisa, İzmir ve Kütahya illeri kestaneliklerinde yayıldığı gözlenmiştir (Çeliker, 2000).

Hastalığın ülkemizde kestanenin en fazla üretim yapıldığı Aydın Dağlarına ne zaman girdiği tam olarak bilinmese de; 2001 yılında dağların kuzey tarafında İzmir'in Beydağ ilçesinde ilk kez rapor edilmiş (Çeliker ve Onoğur, 2001), 2003 yılında yapılan çalışmada ise dağların güney tarafında (Aydın) 32 kestane üreticisi köyün 22 sinin kestane kanseri ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Bazı köylerde hali hazırda yoğun kurumaların varlığı tespit edilmiştir (Erincik vd., 2003).

Bulunduğu her ülkede önemli oranda tahribatlara yol açan etmenin mücadelesinde iç ve dış karantina önlemleri ve kültürel uygulamalar sınırlı bir kontrol sağlamaktadır. Hastalığın pratiğe aktarılmış etkili bir kimyasal savaşımı bulunmamaktadır (Anonim, 2008). Avrupa ülkelerinde ise hipovirulent *C. parasitica* ırkları kullanıldığı biyolojik mücadele ile hastalık başarılı bir şekilde kontrol edilmektedir (Heiniger ve Rigling 1994). Hipovirulent ırklar sitoplazmasında bulunan dsRNA virüsleri nedeniyle ağaçlarda sadece yüzeysel kanserlere neden olmakta ve ölümcül kanserler meydana getirememektedirler (Anagnostakis ve Janes 1973). DsRNA virüsleri vejetatif yönden uyumlu bireyler arasında meydana gelen anastomosis ile bir hiften diğerine geçebilmekte, ölümcül kanser yapan virulent bireye bulaştığında onu hipovirülente dönüştürebilmektedirler. Pratikte hipovirulent ırkların doğrudan virulent

kansere uygulanması ile ölümcül kanserlerin hipovirulent kanserlere dönüştürülmesi biyolojik mücadelenin esasını oluşturmaktadır.

Biyolojik mücadelede başarıyı etkileyen en önemli faktörün *C. parasitica* popülasyonlarındaki 'vejetatif uyum tipi çeşitliliği' olduğu öne sürülmektedir (Heiniger ve Rigling 1994). Hypovirüslerin bir bireyden diğerine geçişini sağlayan anastomozis sadece birbiriyle vejetatif olarak uyumlu iki birey arasında gerçekleşmektedir (Anagnostakis, 1977). *C. parasitica* da bireyler arasında vejetatif uyumsuzluk oluşturarak farklı ve tiplerinin ortaya çıkmasına neden olan *vic* genleri bulunmaktadır (Anagnostakis, 1982; Cortesi ve Milgroom, 1998). Geçmişte *C. parasitica* nın Avrupa'da tanımlanmış 64 farklı ve grubunun olduğu bildirilirken bugün bunların dışında yeni ve grupların varlığı da tanımlanmıştır. Bir bölgede ve grup çeşitliliği yüksek ise biyolojik mücadelenin uygulanabilirliği ve başarılı olma olasılığı düşük iken ve grubu çeşitliliğinin düşük olduğu yerlerde daha kolay uygulanabildiği ve başarılı sonuçlar alındığı görülmüştür. Nitekim ve tip çeşitliliğinin düşük olduğu Avrupa ülkelerinde biyolojik mücadele başarılı bulunurken ve tip çeşitliliğinin yüksek olduğu ABD gibi ülkelerde başarılı sonuçlar alınamamıştır. Bu nedenle birçok ülkede biyolojik mücadelenin başarısını önceden tahmin etmek amacıyla *C. parasitica*'nın ve tipleri ve dağılımı üzerine çok sayıda çalışma yürütülmüştür.

Eşeyli üreme *C. parasitica*'da ve çeşitliliğinin artmasına neden olan en önemli faktörlerden biridir (Cortesi ve Milgroom, 1998; Cortesi vd., 2001). Eşeyli üreme farklı ve tiplere sahip bireyler arasında gerçekleştiğinde her iki ebeveynin gelen *vic* genlerin rekombinasyonu yeni ve tiplerin ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Kuzey Amerika'da ve Avrupa'da etmenin peritesyumlarının bulunduğu ülkelerde ve tip çeşitliliğinin yüksek olduğu bildirilmektedir (Milgroom ve Cortesi, 1999).

*C. parasitica* heterotallik bir fungus olup, heterokaryon bireyler hariç, tek bir *C. parasitica* izolatu kendi kendine eşeyli üreyememektedir (Milgroom, 1995; Marra ve Milgroom, 2001). Böyle bireylerde eşeyli üremenin olabilmesi için eşey yönünden uyumlu iki izolatu bir araya gelerek çiftleşmeleri gerekmektedir.

*C. parasitica*'da eşeyli üreme sistemi tek bir eşey geninin farklı iki alleli (MAT-1 ve MAT-2) tarafından yönetilmektedir (Marra ve Milgroom, 2001). İki *C. parasitica* izolatu arasında eşey uyumu olabilmesi için biri MAT-1 alleline sahip iken diğerinin MAT-2 allelini taşıması gerekir. Bir bölgede *C. parasitica*'nın

eşeyli üreme durumunun belirlenmesinde eşleşme tipi olarak ta adlandırılan mating tiplerinin dağılımının ortaya konması gerekir (Heiginer ve Rigling, 1994; Robin ve Heiniger, 2001; Milgroom ve Cortesi, 2004).

Bugüne kadar, kestane üretimi açısından önemli kestaneliklerin bulunduğu Aydın ilinin Köşk, Sultanhisar, Nazilli ilçelerinde, İzmir ilinin Beydağ ve Ödemiş ilçelerinde *C. parasitica* populasyonları vc tipler ve mating tipler yönünden kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Erincik, 2006; Erincik vd., 2008; Erincik vd., 2011). Ancak bunun dışında kalan Ege Bölgesinin Aydın komşu olan illerinde *C. parasitica*'nın vc tipler ve eşleşme tipleri yönünden populasyon yapısı pek bilinmemektedir. Oysa bu alanlarda bulunabilecek farklı populasyonlar yeni vc tiplerin ortaya çıkmasına ve bölgede yayılmasına neden olabilir. *C. parasitica*'nın Aydın dağlarında varolan EU-1 ve EU-12 vc tiplerinin aralarında gerçekleştireceği eşeyli üreme sonucunda oluşabilecek rekombinasyon ile en az 14 farklı vc tipi ortaya çıktığı bilinmektedir. Etmenin populasyon yapısının vc tipler ile eşleşme tipleri yönünden bilinmesi gelecekte bölgede uygulanması planlanan biyolojik mücadelenin başarısı için önem taşımaktadır. Bu nedenle; bu çalışmanın amacı İzmir, Muğla, Denizli ve Manisa' da kestane alanlarına gidilerek kestane kanseri belirtisi gösteren ağaçlardan örnekler alınarak, bu örneklerden elde edilen *C. parasitica* izolatları elde edilip, bu izolatların vc grupları ve mating tiplerinin belirlenmesidir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Genel Tanıtım

Kestane ağacının toprak üstü organları olan sürgün, dal ve gövdesinde oluşturduğu tipik kanserle tanınan hastalık enfekteli alanlarda çok belirgin olmamakla birlikte genç sürgünlerde zeytini yeşil olan kabuk rengi zamanla parlak kırmızı kahverengiye dönüşerek dikkat çekmektedir. Daha sonra bu kısımlarda çökmeler ve kabuk dokusunda kambiyuma kadar ulaşan, dala ve gövdeye paralel çatlaklar oluşmaktadır. Etmen yavaş bir gelişme gösterdiğinde hastalıklı bölgede kabuğun altında sağlıklı yeni dokuların gelişimiyle bu alanlarda şişkinlikler ve ilerleyen zamanlarda kabuğun üst yüzeyinde çatlamlar oluşmaktadır (Gravatt, 1949; EPPO, 2005). Ayrıca etmenin konukçu bitki üzerinde oluşturduğu gözle görülebilen gelişmeler ve yapılar hastalığın tanınmasında etkili olmaktadır. Bunlardan en belirgin olanı kanserli dokular üzerinde oluşan sarı-turuncu veya kırmızımsı renkte ve toplu iğne başı büyüklüğünde stromalardır (Murrill, 1906'ya atfen Rittenour, 2005) (Şekil 2.1.a). Stromalar içersinde nemli koşullarda milyonlarca konidinin bulunduğu turuncu-sarı renkte kıvrık siruslar gelişmektedir (EPPO, 2005). Gözle görülebilen bir diğer tipik belirtisi ise odun dokusu ile kabuk dokusu arasındaki miselyal gelişimlerdir (Şekil 2.1.b). (Heiniger ve Rigling, 1994).

Kanser ilerleyen aşamalarda dal ve gövdeyi tamamen sararak bu bölgeyi kurutur. Kanserli dallardaki yapraklarda solgunluk ve kahverengileşmeler gözlenerek yapraklar dal üzerinde asılı halde kalırlar (Roane vd., 1986) (Şekil 2.2). Hastalığın görüldüğü ağaçların çoğunda sağlıklı kısımlarında yeni sürgün gelişimleri dikkat çekmektedir (Heiniger ve Rigling, 1994; Anagnostakis, 1997)



Şekil 2.1.a) *Cryphonectria parasitica*'nın sarı-turuncu renkli stromaları  
b) *Cryphonectria parasitica*'nın kabuk dokusu arasındaki miselyal gelişimi



Şekil 2.2. Kanserli dal üzerinde gözlenen solgunluk ve kurumalar

Murrill'in (1906) *Diaporthe parasitica* Murrill olarak adlandırdığı kestane kanseri etmeni, 1912'de Anderson and Anderson tarafından *Endothia* cinsine transfer edilerek *Endothia parasitica* (Murr.) And. ve And. olarak adlandırılmıştır. Taksonomik olarak yer aldığı Diaporthales takımının tekrar değerlendirilmesi sonucu etmenin cinsi *Cryphonectria* olarak değiştirilmiştir (Barr, 1978' e atfen Rittenour, 2005).

Ascomycota şubesinin, Pyrenomycetes sınıfına ait, Diaporthales takımının Valsaceae familyasında yer alan kestane kanseri etmenini *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr'ın (Agrios, 1997) morfolojik özellikleri ve üreme şekilleri aşağıda verilmiştir.

*C. parasitica* laboratuvar koşullarında yapay besi ortamında geliştirildiğinde miselyumunun renginin genç dönemde beyaz, daha sonra açık-sarı ve sarı-turuncu daha ileriki dönemlerde kırmızı-turuncu ya da bordo-mor'a dönüştüğü rapor edilmiştir (Ellis ve Ellis,1985).

Etmenin doğal ortamdaki morfolojisine bakıldığında, enfekte ettiği ağaçların kabuk dokuları üzerinde sarı ile turuncu arasında değişen 0,5-4 mm çapında ve 2,5 mm yüksekliğinde stromaların yer aldığı ve bu stromalar içerisinde piknidiumların geliştiği bildirilmiştir (Anagnostakis ve Kranz,1987; Milgroom, 1995). Her bir piknidium içerisinde de konidioforlar üzerinde; oval, çubuksu bazende kıvrık şekilli, saydam ve bölmesiz konidiler oluşmaktadır (Ellis ve Ellis,1985). Olgunlaşmış bu konidiler nemli koşullarda piknidiumlardan dışarıya çıkarak yağmur damlalarıyla rüzgarında etkisiyle hastalığın kısa mesafelerde dağılmasına neden olur (Fulbright, 1999). Bunun yanında *C. parasitica* da heterothallik bir eşeyli üreme de görülmektedir. MAT-1 ve MAT-2 genlerini taşıyan konidilerle hiflerin birleşmesiyle stromalar içinde peritesyumlar oluşmakta ve her bir peritesyum içerisinde iki sıra halinde ortalama 8 adet askospor, bu askosporlar içerisinde de 32-55 X 7-8,5 µm boyutlarındaki askuslar yer almaktadır (Mara ve Milgroom, 1999; Fulbright, 1999). Peritesyum içerisinde bulunan askosporlar basıncın etkisiyle dışarı atılıp hava akımlarına karışarak hastalığın uzak mesafelere yayılmasında etkili olmaktadır. (Milgroom, 1997; Guerin vd.,1999).

Kestane ağacının dal, sürgün ve gövdesinde doğal veya mekanik yolla açılmış çatlaklar ve yaralardan giriş yaparak hastalığa neden olan etmen, toprak altı organlarında ve meyvesinde enfeksiyona neden olmadığı bildirilmiştir (Anagnostakis ve Kranz, 1987; Heinigier ve Rigling, 1994; Fulbright, 1999). Etmen kanserli bölgelerdeki kabuk dokusu içerisinde miselyum olarak yaklaşık 10 ay kadar canlılığını koruyabilmekte yada koşullara bağlı olarak bu kanserli dokular üzerindeki stromalar içerisinde piknidium veya peritesyum olarak kışlayabilmektedir (Hepting, 1974, Guerin vd., 1999). Doğal koşullarda askospor çıkışının Mart- Ekim ayları arasında gözlemlendiği ancak en fazla Mayıs ayında olduğu gözlenmiş ve hastalığın gelişimine bakıldığında kış aylarında yavaşladığı ya da durduğu gözlenirken sıcak ve kurak yaz aylarında hızlı bir şekilde gerçekleştiği bildirilmiştir (Guerin ve Robin, 2003). Hastalığa neden olan askospor ve konidiler hava akımları ve yağmurun etkisiyle doğrudan yayılabildikleri gibi bu sporlar ve miseller böcek, kuş, hayvan ve kültürel işlemler sırasında kullanılan alet- ekipmanlar ile temas ederek sağlıklı ağaçlara dolaylı olarak taşınabildikleri gözlenmiştir (Delen, 1975; Sharf ve DePalma, 1981, Fulbright, 1999).

Hastalığın ilk ortaya çıkmasından günümüze kadar mücadelesi için birçok yöntem denenmiş ancak etkili bir sonuç bulunamamıştır. Murrill 1906' da inokulum kaynaklarının yok edilebilmesi için hastalıklı dalların budanması, hasta ağaçların kesilmesi ve yakılması gibi kültürel önlemleri uygulamalarını önermiş ancak bu yöntemlerin hastalıkla mücadelede tek başına etkili olmadığı görülmüştür (Rittenour, 2005). ABD' de hastalığın yayılmasını önlemek amacıyla 1911 yılında hastalıkla ilgili karantina yasası yürürlüğe konmuşsa da yine kestane kanserinin yayılmasının önüne geçilememiştir. Avrupa'da da denemeler yapılmış ancak başarı elde edilememesi sonucu bu tür uygulamalarından vazgeçilmiştir (Pavari, 1949). Kestane kanserinin kimyasal yöntemlerle kontrolünde sistemik fungusitlerin geliştirilmesine kadar yapılan çalışmalardan olumlu sonuçlar elde edilememiştir. Delen 1907' de sistemik fungusitlerden Bavistin (Carbendazim), Benlate (Benomyl) ve Enovit Süper (Thiophanatemethyl)'i hastalıklı bölgelerde deneyerek etkili olduğunu saptamıştır. Ancak meyvelerde kalıntı miktarı, etmenin bu fungusitlere dayanıklılık kazanma olasılığı ve hipovirulent ırklara karşı etkileri belirlenmediği için uygulanması yönünde tavsiyelerde bulunulmamıştır. Delen 1980 yılında bu çalışmasını takip eden araştırması sonucu *C. parvica* 'ya karşı etkili olduğu ortaya konan fungusitlerin sürekli kullanılması sonucu in vitro

koşullarda dayanıklılığın meydana geldiğini ve bu dayanıklılığın kalıcı olduğunu ortaya koymuştur.

İtalya'da kestane alanlarında yapılan gözlemler sonucu bazı hastalıklı ağaçlarda iyileşmelerin olduğu saptanmıştır. Bunun üzerine iyileşme gözlenen ağaçlardan yüzeysel kanserler oluşturan virülensliği düşük, beyaz miselyuma sahip *C. parasitica* izolatlarının elde edilmesiyle, kanser hastalığının biyolojik mücadelesi ile ilgili ilk adımlar atılmıştır (Heiniger ve Rigling, 1994). Jean Grente etmenin dsRNA ve virüs benzeri partiküller içeren streynleri hipovirulent olarak adlandırmıştır. Hipovirulent ırktan virulent ırka anastomosis yolu ile sitoplazmik olarak aktarılan hipovirülensliğin hastalığı yavaşlatarak veya durdurarak kanserli dokularda iyileşmelerin meydana geldiği gözlenmiş böylece kestane kanseri etmeninin biyolojik kontrolünde hipovirulent ırklardan yararlanılmaya başlanmıştır (Van Alfen vd., 1975; Roanne vd., 1986; Anagnostakis, 1988; Fulbright vd., 1988; Bisiach vd., 1988; MacDonald ve Fulbright, 1991; Heiniger ve Rigling, 1994). Hipovirülensliğin yayılabilmesi için anastomosis meydana gelmelidir ancak anastomosis yalnızca aynı vejetatif uyum (v-c) grubuna ait bireyler arasında gerçekleşmektedir (Anagnostakis 1977; Milgroom, 1995). Bu nedenle hipovirülensliğin doğada yayılmasını etkileyen en önemli faktörlerden biri vejetatif uyum gruplarının çeşitliliği olup düşük vc grup sayısına ait popülasyonlarda hipovirülenslik daha hızlı yayılmakta ve hastalık etmeninin biyolojik kontrolünde etkili olmaktadır (Anagnostakis vd., 1986; Huber ve Fulbright 1994; Liu ve Milgroom 1994).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda; Ege, Marmara ve Karadeniz Bölgesi kestane üretim alanlarında vc grubu çeşitliliğinin az olduğu ve izolatların Avrupa izolatları ile uyumlu olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmalarda ülkemizin *C. parasitica* popülasyonu içinde hipovirulent ırkların da bulunduğu ortaya konmuş (Coşkun vd., 1999; Çeliker, 2000; Gürer vd., 2001; Açıkgöz ve ark., 2004; Çeliker ve Onoğur, 2004) ve 2000 yılında Çeliker tarafından ırkların *C. parasitica* ile mücadelede kullanılması üzerine çalışmalar yapılmıştır.

Birçok ülkede biyolojik mücadelenin başarısını önceden tahmin etmek amacıyla *C. parasitica*'nın vc tipleri ve dağılımı üzerine çok sayıda çalışma yürütülmüştür. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda sunulmuştur.



## 2.2.Yurtdışında Yapılan Çalışmalar

Anagnostakis (1986), Grente (1981)'e atfen İtalya ve Fransa'dan elde edilen 148 adet *C. parasitica* izolatının 22 farklı vc grubuna ve Bazzigher vd., (1981)'e atfen İsviçre'den elde edilen 124 izolatın 12 farklı vc grubuna girdiğini bildirmiştir.

Anagnostakis (1986) ABD'nin Connecticut eyaletinden 165 adet ve karşılaştırma yapmak amacıyla İtalya'dan getirdiği 197 adet *C. parasitica* izolatının vc grup çeşitliliğini ortaya koymuştur. Connecticut izolatları içerisinde toplam 67 farklı vc grubu elde etmiştir. Birçok grup tek bir izolat ile temsil edilirken sadece 3'ünde 10 dan fazla izolata rastlanmıştır. Sonuçlar her üç izolattan birinin yeni vc grup olma olasılığında olduğunu göstermiştir. İtalyan izolatları içerisinde ise 33 farklı vc grup bulunmuş ve her 6 izolattan birinin yeni vc grup olma olasılığının bulunduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre Connecticut izolatlarının İtalyan izolatlarına göre vc gruplar yönünden daha yüksek çeşitliliğe sahip olduğu belirtilmiştir.

Bissegger vd. (1997) Güney İsviçre de bulunan Lumino ve Gnosca bölgelerinden topladıkları 148 *C. parasitica* izolatının özelliklerini incelemişlerdir. Lumino Bölgesinde incelenen 86 izolat içerisinde 14, Gnosca da incelenen 62 izolat içerisinde 16 vc grup saptamışlardır. İsviçre gruplarında 1, 2, ve 3 iki bölgede de dominant olarak bulunmuştur. Gnosca da MAT-1 ve MAT2 oranı 1:1 yakın olarak bulunurken Lumina bölgesinde MAT-1 oldukça dominant olarak bulunmuştur. Ayrıca 25 izolatın hem MAT-1 hem de MAT-2 özellik gösterdiği bildirilmiştir.

Cortesi vd. (1998) yaptığı bir çalışmada 11 İtalyan altpopulasyonundan 20 vc grup tester *C. parasitica* izolatı ile, 5 İsviçre altpopulasyonundan 26 vc grup tester izolatının karşılaştırması yapılmıştır. Toplamda 31 vc grup tanılanmıştır. Toplamda 15 vc grup her iki ülkede de yaygın olarak bulunmuştur. Beş İtalyan vc grubu İsviçre'de, 11 İsviçre vc grubu İtalya'da bulunmamıştır. EU-2 nin her iki ülkede de en yaygın grup olduğu tüm İsviçre ve 7 İtalyan altpopulasyonlarında dominant olduğu belirlenmiştir. EU-1 ve EU-5 çoğunlukla Kuzey İtalya ve İsviçre'de bulunurken EU-10 ve EU-12 daha çok Güney İtalya'da yaygındır. Vc grup çeşitliliği Kuzey İtalya ve İsviçre'de, Güney İtalya'ya göre daha yüksek olarak bulunmuştur.

Milgroom ve Cortesi, 1999 yılında yaptıkları çalışmada, İtalya'nın Teona (Güney İtalya) Bölgesinden alınan 194 izolatlar arasında, 8 vc tipi bulunmuş, Bunlar

sırasıyla; %77,8' i EU-12, %18,5' i EU-10, %0,5' i EU-2, EU-11, EU-14, EU-40 ve %1'i EU-17 olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada Amerika Birleşik Devletlerinin farklı alanlarından alınan örneklerde Batı Virginia'da 59 izolat arasında, 22 Avrupa vc tipi ile 3 yeni vc tipi saptanmış ve en çok rastlananların %13,6 ile EU-10, %11,9 ile EU-28 ve %6,8 ile EU-33 olduğu bildirilmiştir. Maryland' dan alınan 57 izolat arasında 23 Avrupa vc tipi ve 3 yeni vc tip bulunmuştur. İzolatların %15'i EU-28, %12,3'ü EU-17 ve % 10,5'i EU-11 olarak bulunmuştur. New York'da ise 60 izolat arasında 20 Avrupa vc tipi ve bilinmeyen 14 vc tipi bulunmuştur. İzolatlardan % 13,3 ile EU-3 ve % 6,7 ile EU-17 dominant olarak bulunmuştur.

Radocz, 1999 yılında Macaristan'da yaptığı çalışmada, 38 *C. parasitica* izolatı arasında 13 vc grubu tespit etmiştir. Bölgede dominant olarak bulunan EU-13, EU-6 ve EU-1'in yüzdeleri sırasıyla % 28,9, % 21,1 ve % 10,5 olarak bildirilmiştir. Bunların dışında; EU-2, EU-3, EU-5, EU-9, EU-11, EU-12, EU-14, EU-16, EU-21, EU-22 vc gruplarının ülkede varolduğu saptanmıştır.

Robin vd. (2000). tarafından yürütülen bir çalışmada 1995 ten 1997 ye kadar Fransa'nın en önemli kestane üretim alanlarından *C. parasitica* izolatları toplanmış ve bunların vc grupları belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan 1113 izolat arasında 30 farklı vc grubunun varlığı ortaya konmuştur. Bu vc gruplardan 10'u hiçbir Avrupa testere ile uyumlu bulunmamıştır. Bu durum bilinen altı *vic* lokusuna ilave olarak bir *vic* geni veya allelinin olabileceği göstermiştir. Ülkede EU-2 vc grubu izolatların %58'ini oluşturarak en dominant grup olarak bulunmuştur. Bunu %14 ile EU-1, %7 ile EU-5 izlemiştir.

Hoegger vd. (2000) tarafından yürütülen bir çalışmada İsviçre'de dört farklı bölgeden toplanan 143 *C. parasitica* izolatının karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışma sonrasında hastalığın geçmişinin en fazla olduğu Claro bölgesinde 9 vc grubu bulunurken diğer yerlerde vc grup sayısı 1 ve 2 arasında değişmiştir. Sözü edilen bölgede EU-2 en fazla rastlanılan vc grup olurken (22 izolat) bunu 9 izolat ile EU-1 ve 9 izolat ile EU-5 izlemiştir. Weggis bölgesinde ise saptanan iki vc grubundan biri olan EU-1 en yaygın (22 izolat) grup olurken bunu 6 izolat ile EU-6 takip etmiştir. Her iki eşleşme tipi dört lokasyonda da görülmüş ancak MAT-1:MAT-2 oranı bölgeden bölgeye değişmiştir. Tüm izolatlar içerisinde 116'sı MAT-1, 42'si MAT-2 ve 13'ü MAT-1/MAT-2 olarak bulunmuştur.

Radocz (2001) tarafından yapılan bir çalışmada Macaristan, Romanya ve Ukrayna'dan toplanan 650 *C. parasitica* izolatının virülenslikleri, vc grupları, ve dsRNA içerikleri belirlenmiştir. Macaristan'da 18 farklı vc grubu, Romanya ve Ukrayna'da tek vc grubu elde edilmiştir. Dört vc grup EU-1, EU-6, EU-12 ve EU-13 Macaristan'da dominant olarak bulunmuş ve bunlardan EU-6 EU-12 ve EU-13'ün Macaristan'a ilk giren gruplar olabilecekleri belirtilmiştir. Romanya ve Ukrayna'dan elde edilen tüm izolatlar EU-12 olarak saptanmıştır. EU-2, EU-5, EU-6, EU-12, ve EU-13 grup izolatlarda hipovirulent izolatlarla rastlanmıştır.

Trestic vd. 2001 yılında yapıları çalışma sonucu; Fransa' da 120 *C. parasitica* izolat içerisinde EU-72 (%23), EU-1 ve EU-5 (%12), EU-12, EU-13, EU-17, EU-22, EU-29 (%10), EU-2 (%8), EU-3 (%7), EU-66 (%5) uyum grupları bulunurken 30 tanesinin uyum grubu bulunamamıştır. İspanya izolatları arasında (160 izolat) EU-2 (%71), EU-1 (%9), EU-12 (%7), EU-5 (%3) uyum grupları ve 6 bilinmeyen izolatın varlığı tespit edilmiştir. Bosna Hersekten elde edilmiş 920 izolat arasında 29 vc tipi bulunmuş, bunlardan EU-12 (%30), EU-2 (%18), EU-1 (%17), EU-27 (%0,3) daha yoğun bulunurken, EU-10, EU-15, EU-18, EU-31, EU-16, EU-23, EU-24, EU-25'e daha az rastlanmıştır.

Sotirovski vd. 2004 yılında Makedonya ve Yunanistan' da yapmış oldukları çalışma Makedonyadan 786 izolat toplanmış, 5 vc tipine rastlanmış ve en yaygın olanının %94 oranla EU-12 olduğu bulunmuştur. Diğer bulunan vc gruplar ise EU-1, EU-2, EU-10, EU-22 olmuştur. Ayrıca mating tipininde bakıldığı çalışmada 173 izolatın MAT-1, 6 izolatın MAT-2 olarak bulunduğu bildirilmiştir. Yunanistan da ise 379 izolat alınmış ve örneklerin tümü EU-12 olarak bulunmuştur.

Adamçikova vd.,(2006) Slovakya'da dört lokasyondan elde ettiği 215 adet *C. parasitica* izolatı içerisinde 4 vc grubunun varlığını saptamışlardır. Bunlardan EU-12 toplam izolatın %93 (200 izolat) 'ünü oluşturmuştur. Geri kalan vc gruplarından EU-13 12 adet, EU-8 2 adet ve EU-2 1 adet izolat ile temsil edilmiştir.

Perlerou ve Diamandis, 2006 yılında yapmış oldukları çalışmada ise; Yunanistan'da 4 uyum grubu saptanmış, bunlardan %88'i EU-12, diğerleri EU-2, EU-10, EU-1 olarak belirlenmiştir.

Spica vd. (2006) tarafından Güney İtalya'nın Calabria bölgesinden 4 farklı lokasyondan toplanan *C. parasitica* izolatlarının ve grupları belirlenmiştir. Çalışma sonucunda EU1, EU2, EU10 ve EU12 olmak üzere 4 farklı ve grubu saptanmıştır. Bunlardan EU-2 dört lokasyonda da en dominant ve grup olarak bulunmuştur. Both MAT-1 ve MAT-2 mating tiplerinin 4 altpopulasyonda da karışık olarak buldukları belirlenmiştir. İki lokasyonda MAT-1 ve MAT-2 nin oranı 1:1 olarak bulunmuş olup etmenin bu lokasyonlarda eşeyli ürediği bildirilmiştir.

Liu ve Milgroom, 2007 yılında yaptıkları çalışmada Çin'de 3 farklı lokasyondan örnekler alınmış, 1'inci lokasyonda 28 izolattan 28 ve grubu, 2'inci lokasyonda 11 izolattan 11 ve grubu, 3'üncü lokasyonda 25 izolattan 15 ve grubu bulunmuştur. Japonya dan alınan 79 izolattan 71 ve grubu ortaya çıkmış, 3 tanesi Avrupa testereleri (EU) ile uyumlu iken 68 farklı ve grubu bulunmuştur. Bu sonuçlar Asya kökenli olan bu etmenin orijini olduğu ülkelerde genetik çeşitliliğinin çok yüksek olduğunu göstermiştir.

Bragança vd. 2007 yılında Portekiz'de, Madeira ve Azores alanlarından toplanan 617 izolatla çalışılmış ve 9 ve tipi ortaya çıkmıştır. Çalışma sonucunda en yaygın ve tipleri sırasıyla; % 80,2 ile EU-11, % 7,1 ile EU-12 ve % 6,6 ile EU-66 olarak bildirilmiş ve bölgedeki mating tiplerine bakıldığında 85 izolatın MAT-1, 85 izolatında MAT-2 olduğu saptanmıştır.

Montenegro vd., (2008) Kuzey Batı İspanya'nın 5 farklı bölgesinden topladıkları 539 *C. parasitica* izolatı ve ve mating tipler yönünden incelemişlerdir. Çalışma sonucunda toplam 6 ve grup bulunmuştur. Bu durum bölgede ve çeşitliliğin oldukça düşük olduğu şeklinde değerlendirilmiştir. Her bir populasyonda ve grup sayısı 2 ile 4 arasında değişmiştir. EU-1 ve EU-66 ile dört yeni grup ( E1, E2, E3 ve E4) dominant olarak bulunmuştur. Yeni gruplardan biri olan E1 toplam 137 izolat ile iki lokasyonda dominant grup olarak saptanmıştır. İzolatların %97'si MAT-1 olarak belirlenmiştir. Sadece 3 izolat MAT-2 olarak saptanmıştır.

Krstin vd., (2008) Hırvatistan da yaptıkları bir çalışmada 10 farklı populasyondan topladıkları 338 *C. parasitica* izolatının karakterizasyonunu yapmışlardır. Çalışma sonucunda 18 ve grubu bulunmuştur. EU-1 %42,9 bulunma oranı ile en yaygın bulunan ve grup olmuş ve bunu %21 ile EU-2, %14,2 ile EU-12 izlemiştir. Bunun dışında EU-13 (%6,2), EU-17 (%3,8), EU-5(%1,8), EU-9 (%1,5), EU-3

(%0,9), EU-28 (%0,9), EU-14(%0,6), EU-20 (%0,6), EU-29(%0,6), EU-11 (1,8), EU-4(1,2) EU-7 (%0,3), EU-18(%0,3), EU-21(%0,3) ve EU-22(%0,2) grupları bulunmuştur. Bütün lokasyonlarda MAT-1 (103 izolat) ve MAT-2 (101 izolat) oranı 1:1' e çok yakın bulunmuş ve kanserlerde peritesyumun varlığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular ile etmenin eşeyli ürediği kanısına varılmıştır. Hatta EU-18, EU-21 ve EU-22 vc gruplarının oluşumunun EU-13'ün EU-1 veya EU-2 ile eşeyli üremesi sonucu ortaya çıkmış olabileceği bildirilmiştir.

Milgroom vd., (2008) bazı Avrupa ülkelerinden elde edilen *C. parasitica* izolatlarının karakterizasyonunun yapıldığı çalışmalarında Bulgaristan'dan 3 Romanya'dan 3 farklı lokasyonu değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda Bulgaristan'dan 210 izolattan 156'sının EU-12, 54'ünün EU-10 olduğu ortaya konmuştur. Romanya'dan 27 izolattan 26'sının EU-12 ve 1'inin EU-2 olduğu saptanmıştır. Bulgaristan'da sadece MAT-1 bulunurken Romanya'da iki lokasyonda hem MAT-1 ve MAT-2 izolatlarının varlığı belirlenmiştir.

Zamora vd. (2008) tarafından İspanya'nın Castilla ve Leon Bölgelerinden elde edilen 516 *C. parasitica* izolatının vc grupları belirlenmiştir. Sonuç olarak bölgede izolatlar arasında 6 vc grubunun varlığı saptanmıştır. Üç grup Avrupa testerlerinden EU-1, EU-12 ve EU-11 ile uyumlu bulunurken Avrupa testerleri ile uyuşmayan üç yeni vc grubunun (CL4, CL5 ve CL6) varlığı tespit edilmiştir. En yaygın gruplar olarak EU-11 (%50,6) ve EU-1 (%39,9) bulunmuştur.

Adamçıkova vd. (2009) Slovakya da yürüttüğü bir çalışmada 31 *C. parasitica* izolatının vc gruplarını belirlemişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre 6 farklı vc grubu (EU 2, EU 12, EU 13, EU 14, EU 17 ve EU 19) bulunmuştur. Bunlardan 35,5 bulunma oranı ile EU-19 % ve %32,2 bulunma oranı ile EU-2 dominant vc gruplar olarak bulunmuşlardır. EU-12'nin bulunma oranı %12,9 olarak bildirilmiştir.

### **2.3. Yurtiçinde Yapılan Çalışmalar**

Gürer vd. (2001) Marmara ve Karadeniz Bölgesinde kestane üretimi yapılan alanlardan topladıkları 134 izolatu vc grupları ve mating tipleri açısından değerlendirmişlerdir. Her iki bölgeden alınan örnekler EU-1 ile uyumlu bulunmuş ve Marmara Bölgesinden 15, Karadeniz Bölgesinden 9 adet rastgele seçilen izolatların mating tipleri PCR yöntemi ile MAT-1 ve MAT-2 tipinin varlığı tespit

edilmiştir. Marmara Bölgesinde 14 adet MAT-1, 1 adet MAT-2 bulunurken Karadeniz Bölgesindeki örneklerin 6 'sı MAT-1, 3'ünün ise MAT-2 olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada 18 adet Marmara Bölgesinden 1 adet Karadeniz Bölgesinden olmak üzere 19 adet hipovirulent ırka rastlanmıştır. Tüm bu bulgular sonucunda iki bölgede de vc tipinin tek olması ve hipovirulent ırkların bulunması biyolojik mücadelenin kolaylıkla uygulanabileceğini göstermiştir.

Çeliker ve Onoğur 2001 yılında Ege Bölgesi, Marmara Bölgesi ve Karadeniz Bölgesinde 324 izolat ile çalışmalarını sürdürmüş, Ege Bölgesinden aldığı 223 izolattan 2 vc tipi ortaya çıkmış ve bunlar % 94,6 oranla dominant olarak bulunan EU-1, %5,4 oranla da EU-12 ikinci sırada yer almaktadır. Marmara Bölgesinden alınan 96 izolat ve Karadeniz Bölgesinden alınan 5 izolat sonucunda tüm vc tipleri EU-1 çıkmıştır.

Erincik vd. 2008 yılında yaptıkları çalışmada *C.parasitica* 'nın Aydın ilindeki karakterini ortaya koymak amacıyla farklı ilçelerden 97 örnek toplamışlardır. Çalışmada toplanan izolatların % 69 unun EU-1, % 31'inin ise EU-12 olduğu bildirilmiştir. Bölgede EU-1'in daha çok yayıldığı EU-12'nin ise daha az yayılma gösterdiği belirtilmiştir.

Çeliker ve Onoğur, (2004) yaptıkları çalışmada Ege ve Marmara Bölgelerinden toplanan *C. parasitica* izolatlarının mating tipleri laboratuvarında eşleşme yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve bulunma oranı; MAT-1 %85, MAT-2 %15 olarak bulunmuştur.

Akıllı vd. (2009) Karadeniz Bölgesinden topladığı 296 izolat içerisinde 5 vc tipinin olduğunu ve bunların % 90,8' nin EU-1, % 6,8'i EU-12, % 0,7'si EU-14 ve EU-2, % 0,3'ü ise EU-5 olduğunu bildirmiştir. Böylece Türkiye'de ilk kez EU-2, EU-5 ve EU-14 olduğu ortaya çıkmıştır.

Erincik vd. 2011 yılında yaptıkları çalışmada Ege Bölgesi Aydın Dağlarından (Aydın ve İzmir) aldıkları 213 izolatta 2 vc tipi olduğu ortaya koymuşlardır, Aydın'da % 77 oranla EU-1, % 23 ile EU-12, İzmir' de ise % 70 oranla EU-12, % 30 ile EU-1'in bulunduğu bildirilmiştir. Mating tiplerinde araştırıldığı bu çalışmada alınan izolatların % 65' i MAT-1, % 35' i MAT-2 olarak bulunmuştur.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmalar 2013-2014 yıllarında Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Laboratuvarı ve TARBIYOMER ( Tarımsal Biyoteknoloji ve Gıda Güvenliği Uygulama ve Araştırma Merkezi)' de yürütülmüştür.

#### 3.1 Materyal

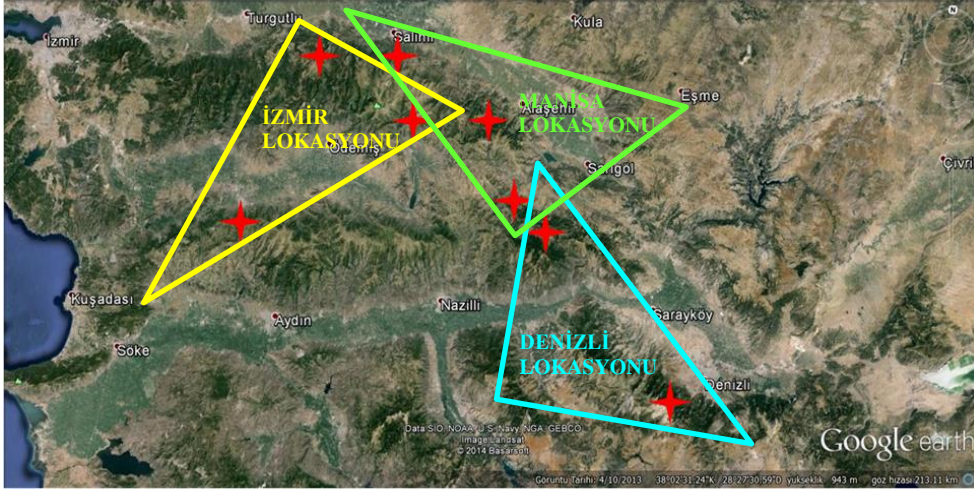
Kestane alanlarından toplanan *C. parasitica* izolatları çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Örnek Toplama

Kanserli kestane ağaçlarından örnek toplamak amacıyla Aydın'a komşu olan İzmir, Denizli, Manisa ve Muğla illerinin kestane alanlarında 2013-2014 yıllarında arazi çalışmaları yürütülmüştür. İzmir, Denizli ve Manisa illerinin kestane üreten ilçelerinin tümünde kestane kanseri hastalığına rastlanmış ve bu alanlardaki hasta ağaçların kanserli dal veya gövdelerinden kabuk örnekleri alınmıştır. Muğla ilinde ise kestane kanserine rastlanmaması nedeniyle örnekleme yapılamamıştır. Çalışmada örnekleme yapılan ana lokasyonlar Şekil 3.1' de gösterilmiştir.

Örnekleme kanserli bölgenin kenarı ile bir kısım sağlıklı dokunun da yer aldığı yaklaşık 3x4 cm boyutlarında bir kabuk parçasının kesici bir alet ile alınması ile yapılmıştır. Her bir örnek alma işleminden sonra kullanılan kesici alet sodyum hipoklorit ile silinerek yüzeysel olarak dezenfekte edilmiştir. Alınan örnekler kese kağıtlarına yerleştirilmiş ve numaralandırıldıktan sonra gün içerisinde buz kutusunda muhafaza edilmiştir. Örnekleme yapıldığı ağaçların coğrafik koordinatları GPS ile kayıt edilmiştir. Hastalığın görüldüğü bahçelerden bulunduğu durumda en az 5 örnek alınmıştır. Çalışmada toplam 277 bitki örneği toplanmıştır (Çizelge 3.1.). Çizelge 3.1. de örnekleme yapılan 19 köy ve ilçe başına toplanan örnek sayıları verilmiştir. Buna göre İzmir'in ilçeleri olan Tire'den 50, Ödemiş'den 70, Kiraz'dan 16, Manisa'nın ilçeleri olan Sarıgöl'den 40, Alaşehir'den 40, Salihli'den 12, Denizli'nin ilçeleri olan Babadağ'dan 10 ve Buldan'dan 39 adet örnek toplanmıştır.



Şekil 3.1. Kestane kanseri örneklemelerinin yapıldığı ana lokasyonlar

Çizelge 3.1. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının elde edildiği ilçeler, köyler ve elde edilen izolat sayıları

İl/İlçe	Köyler	Toplanan örnek sayısı
<b>İzmir</b>		
<b>Tire</b>	Büyükkemerdere- Cambazlı	50
<b>Ödemiş (Bozdağ)</b>	Ovacık, Hacıhasan, Yılanlı, Çayırköyü, Kemerköyü, Bayırlı	70
<b>Kiraz</b>	Dokuzlar	16
<b>Manisa</b>		
<b>Sarıgöl</b>	Çamlıbel, Karacalı, Kızılçukur	40
<b>Salihli</b>	Bahçecik, Burhanköy	12
<b>Alaşehir</b>	Bahadır, Bahçeli, Dağhacıyusuf, Osmaniye	40
<b>Denizli</b>		
<b>Babadağ</b>	Demirli	10
<b>Buldan</b>	Kurudere, Alandız, Kaşıkçı	39
<b>Toplam</b>		<b>277</b>



### 3.2.2 Patojenin İzolasyonu

Örnekleme çalışmasının yapıldığı günün sonunda, buz kutusu içerisinde laboratuvara getirilen kestane kanseri kabuk örnekleri izolasyon işlemine kadar +4°C de buzdolabında muhafaza edilmiştir. İzolasyonda standart bir fungal patojen izolasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde göre kanserli kabuk dokularından 4 mm çapında mantar delici ile alınan diskler % 2'lik sodyum hipoklorit içinde 2 dakika süre ile yüzeysel olarak dezenfekte edilmiştir. Steril damıtık suda durulanıp ardından steril filtre kağıtları arasında kurutulan örnekler petri kaplarında bulunan patates dekstroz agar (PDA) besi ortamı üzerine yerleştirilerek 24°C de 3-4 gün inkube edilmiştir. İnkübasyon sonrasında gelişen koloniler görsel olarak incelenmiş ve *Cryphonectria parasitica* olduğu düşünülen kolonilerden bir tanesi şansa bağlı olarak seçilip PDA ortamına aktarılarak izolatın saflaştırılması sağlanmıştır.

Saflaştırılan izolatların saklanması için iki yöntem kullanılmıştır. İlk yöntemde izolatlar cam tüplerde eğik PDA'da geliştirilmiş ve ardından +4 C'de buzdolabında saklanmıştır. İkinci yöntemde ise filtre kağıdı yöntemi kullanılmıştır (Fong vd., 2000). Bu yöntemde, 8 cm'lik petri kapları içerisinde bulunan PDA besi ortamı üzerine 1,5x1,5 boyutlarındaki steril filtre kağıtları yerleştirilmiş ve ortam *C. parasitica* izolatu ile inokule edildikten sonra fungusun 7 gün boyunca filtre kağıtlarında kolonize olmaları sağlanmıştır. Miselle kolonize olmuş filtre kağıtları, steril koşullarda toplanmış ve steril petri kapları içerisinde kurutulmuştur. Kurutulmuş miselli filtre kağıtları steril kağıt zarflar içerisinde konarak -20 C de uzun süreli saklamaya alınmıştır.

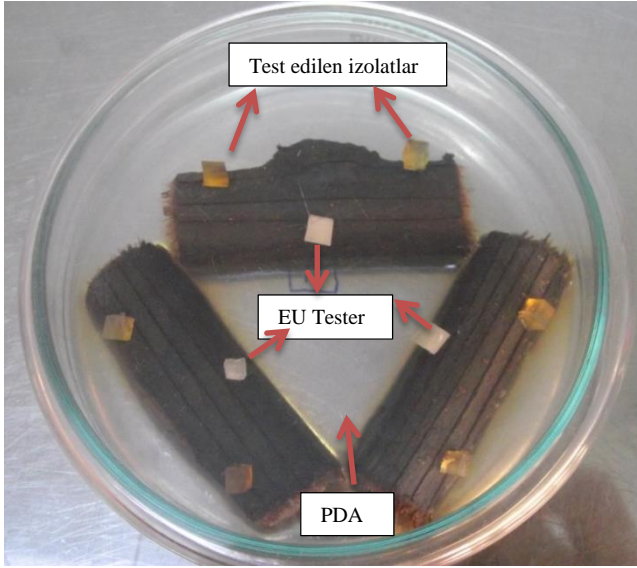


**Şekil 3.2.** Materyal eldesinde arazi ve laboravuar çalışmaları **a)** Kestane kanseri örnekleme çalışmaları, **b)** İzolasyon petrilerindeki misel kolonisi gelişimi, **c)** Saflaştırılmış bir *Cryphonectria parasitica* izolatu, **d)** İzolatların eğik agarda gelişimi

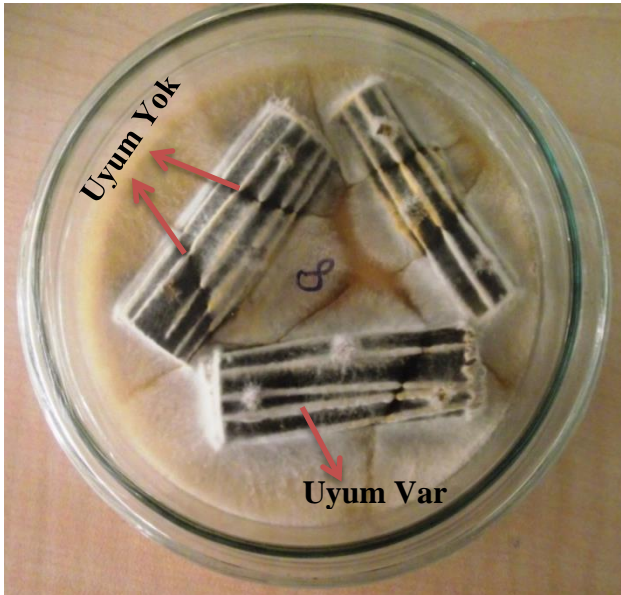
### 3.2.3. İzolatların Vejetatif Uyum (VC) Gruplarının Belirlenmesi

İzolatların vejetatif uyum grupları steril kestane odun dokusu üzerinde tarafımızdan geliştirilen bir yöntemle göre yapılmıştır. Bu yöntemle göre; kestane ağaçlarından alınan 1,5-2 cm çapındaki kestane dalları 5'er cm uzunluğunda kesildikten sonra, dallar dikine olmak üzere 2 eşit parçaya ayrılmıştır. Her bir parçanın üst kısmında kalan kabuk bisturi yardımıyla boyuna kesilerek dal başına en az 5-6 çizgi oluşturulmuştur. Daha sonra bu dallar 121°C' de 45 dk süre ile ardışık günlerde 2 kez otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sterilizasyonun ardından dallar 9 cm'lik steril petri kaplarına 3'er adet olmak üzere aralarında üçgen oluşturacak şekilde yerleştirilmiştir. En son olarak petri tabanına erimiş PDA ilave edilmiştir (**Şekil 3.3**). Petriler 1-2 gün bekletildikten sonra vc grup belirleme testlerinde kullanılmıştır.

Vc grup testlerinde, bir dal parçası üzerine, ortaya Avrupa testeri ve uçlara birer izolat olmak üzere iki izolat yerleştirilmiştir. Böylece petri başına 6 izolat test edilmiştir (**Şekil 3.3**). Petriler 25 °C de ilk 7 gün karanlıkta sonraki 7 gün aydınlıkta olmak üzere 2 hafta inkubasyona bırakılmıştır. Testerler ile izolatlar arasında barajın oluşup oluşmamasına göre uyum grubu değerlendirmesi yapılmıştır. Değerlendirmelerde, tester ve izolat tek bir koloni olarak geliyorsa "uyum var", aralarında çizgi ya da baraj meydana geliyorsa "uyum yok" olarak kabul edilmiştir (Bissegger et al 1997) (**Şekil 3.4**). İlk olarak izolatlar EU-1 ve EU-12 testerleri ile eşleştirilmiş ve gerektiğinde diğer Avrupa testerler ile eşleştirme yapılmıştır.



Şekil 3.3. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının Vc gruplarının belirlenmesi testleri

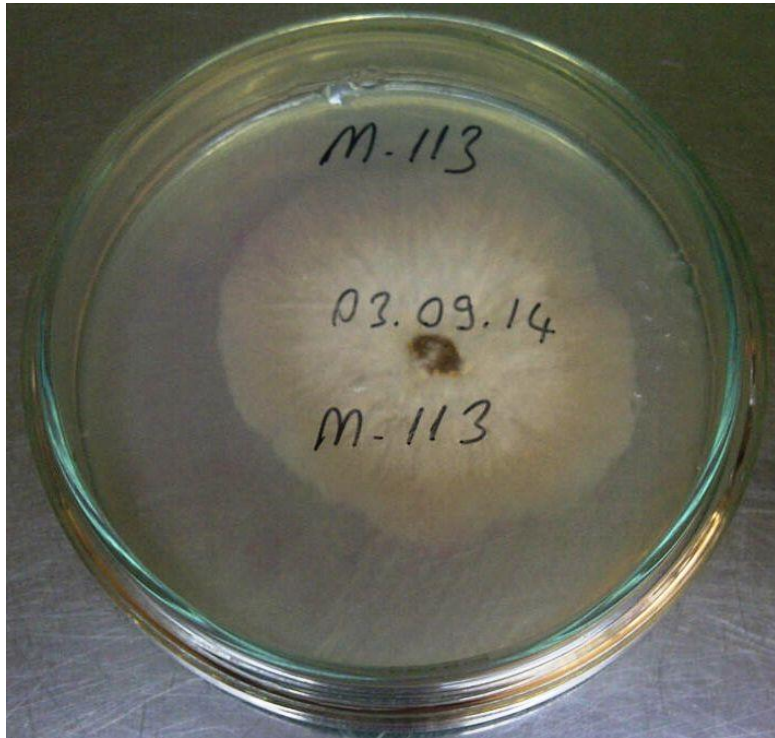


Şekil 3.4. *Cryphonectria parasitica* tester ve izolatları arasında uyum ve uyumsuzluk reaksiyonları

### 3.2.4. Mating Tiplerin Belirlenmesi

Toplam izolat sayısının %20' sini oluşturacak şekilde farklı lokasyonlardan temsili olarak seçilen izolatların mating tipleri belirlenmiştir. İzolatların mating tiplerini belirlemede amplifikasyon parça büyüklükleri yönünden yüksek oranda birbirinden farklı olan MAT-1 ve MAT-2 mating tiplerine ait spesifik primerler kullanılmıştır (Marra ve Milgroom, 2001, Mcguire vd., 2004).

Mating tip belirleme çalışmalarında kullanılan izolatlara ait miseller, PDA ortamı üzerine konulan steril selefondiskler üzerinde geliştirilerek elde edilmiştir (Anagnostakis ve Day, 1979; Allemann vd., 1999) (Şekil 3.5.). İnkübatörde 24 °C'de karanlık koşullarda 6-7 gün inkübasyonun ardından selefondisklerde gelişen kolonilerden, yaklaşık 3x3 cm boyutlarında misel kitlesi steril kürdan ile alınarak 1,5 ml sentrifüj tüplere yerleştirilmiş ve ardından DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere -20 °C'deki derin dondurucuya kaldırılmıştır.



Şekil 3.5. Steril selefondisk üzerinde bir *Cryphonectria parasitica* izolatının gelişimi

Derin dondurucan çıkarılan içerisinde misel olan tüpler, buz üzerinde 30 dk bekletildikten sonra, içerlerine 1 ml lysis buffer (**Çizelge 3.2.**) ilave edilmiş ve vorteks te 1 dk boyunca karıştırılmıştır. Her bir izolat için ayrı ayrı hazırlanmış tüpler, 65°C 15 dk boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Tekrar 1 dk vortekste karıştırmanın ardından tüpler 12200 rpm hızla santrifüj edilmişlerdir. Santrifüjün hemen ardından tüplerden 1 ml supernatant yeni tüplere alınmıştır. Üzerine 200 µl 7,5 M amonyum acetat (NH<sub>4</sub>Oac) ilave edilmiş ve vortekste 10 sn karıştırılmıştır. Tüpler, buz üzerinde 15 dakika bekletildikten sonra 3 dakika santrifüj edilmişlerdir. Daha sonra her bir tüpteki süpernatanttan 850 µl lik kısım pipetle dikkatle alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Ardından tüplere 700 µl isopropanol ilave edilmiş ve elde 20 kez çalkalandıktan sonra tüpler 5 dakika santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj sonrası süpernatantın tümü peletin düşmemesine dikkat edilerek dökülmüştür. Ardından tüp içerisinde kalan pelet %70 lik ethanol ile 2 kez yıkanmıştır. Tüpler kısa süreliğine santrifüj edilmiş ve tüpün dibinde biriken ethanol pipetle çekilerek uzaklaştırılmıştır. Tüpler ağzı açık olacak şekilde laminar flow içerisinde yaklaşık 10 dk süre ile kurumaya bırakılmıştır. En son olarak tüp içerisine 40 µl steril ultra saf su ilave edilmiş ve sonrasında PCR da kullanılmak üzere tüpler -20 de saklanmıştır.

Çizelge 3.2. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının DNA ekstraksiyonunda kullanılan lysis buffer içeriği

Bileşenler	Stock	Final	1 tüp
Saf su			~600 µl
EDTA pH 8	0.5 M	50 mM	100 µl
Tris pH 8	1 M	100 mM	100 µl
SDS	% 20	% 3.50	175 µl
Proteinase K	20 mg/ml	250 ug/ml	12.5 µl
Sodium Bisulfite		% 1	0.01 g





Şekil 3.6. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının DNA ekstraksiyonu çalışmaları

PCR da kullanılacak master karışım; 1xPCR buffer, 200  $\mu$ M dNTP, 0,2  $\mu$ M (herbir primerden), 0,75 units Taq Polymerase ve saf sudan 29  $\mu$ l olacak şekilde karıştırılarak karışım içersine 2  $\mu$ l kalıp DNA ilave edilmiştir ve thermal cyclers içersine 30 döngülük çoğaltılmaya bırakılmıştır (Mara and Milgroom, 2001). Multiplex PCR'da mating tipleri belirlemeye yönelik kullanılan primerler Çizelge 3.3. de verilmiştir.

Çizelge 3.3. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının mating tiplerinin belirlenmesinde kullanılan primerler.

Primer	Dizilim (5' → 3')
MAT-1	
M1-GS1n	GATGACAACGACGTCTGAAGAATCAGAGTG
M1-GS3-rev	CAGATGTCAACGGCCTTCAGGCCAGGA
MAT-2	
M2-GS3	TTCAACCTGTCCAAGACTGTAGCCTTCG
gs1-d-1	CTCCCGATGGATTGGGGAAGATAATGGGC

PCR sonucunda elde edilen DNA parçaları %1 lik agaroz jel elektroforezde 80 volt elektrik akımında 30 dk yürütülmüştür. Bu süre sonunda jel UV ışık altında jel görüntüleme cihazında görüntülenmiş ve elde edilen görüntü üzerinden bandların büyüklükleri üzerinden değerlendirmeler yapılmıştır. MAT-1'in tanısı 1.649 kb ve MAT-2'nin ise 594 bp band büyüklükleri esas alınarak yapılmıştır (Mara and Milgroom, 1999).



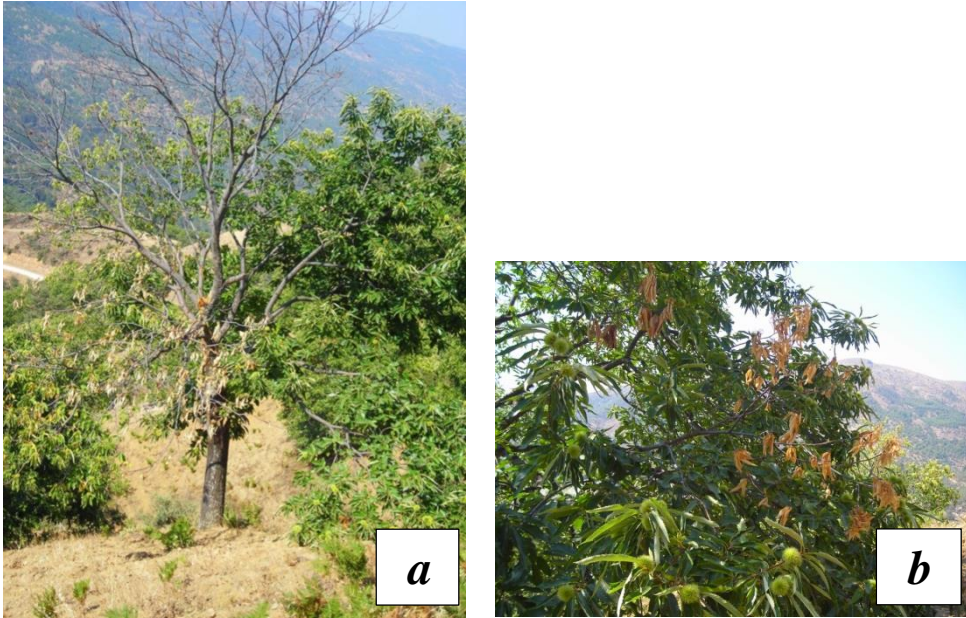
## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Örnek Toplama Çalışmaları

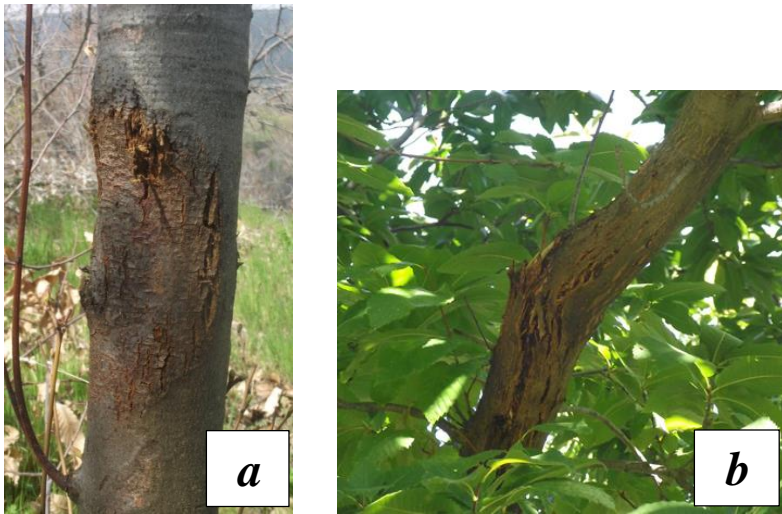
İzmir, Manisa, Denizli ve Muğla illerinin kestane üretimi açısından önemli olan ilçelerinin köylerinde yapılan *Cryphonectria parasitica* örnekleme çalışmaları sırasında Kestane Kanseri hastalığının Muğla ili hariç diğer tüm illerin kestane alanlarında var olduğu saptanmıştır. Bazı köylerde hastalığın geniş alanlara yayılarak hali hazırda çok ciddi ağaç kayıplarına yol açmış olduğu gözlemlenmiştir. Dal enfeksiyonlarında ağacın bir kısmının, gövde enfeksiyonlarında ise ağacın tümünün kanser nedeniyle ölmesi sonucu hastalığın bölgede önemli seviyede ürün kaybına neden olduğu tahmin edilmektedir.

Hastalıklı ağaçlar, genel görünüm olarak yapraklı döneminde küçük bir daldan ağacın tamamına kadar değişen solgunluk ve/veya kuruma olarak dikkati çekmiştir (Şekil 4.1). Solgunluk veya kurumanın hemen alt kısmında dalı veya gövdeyi kısmen ya da tamamen saran kanser olarak nitelendirilen kabukta boyuna yönde derin yara ve çatlaklardan oluşan belirtilere bir çok hastalıklı ağaçta rastlanmıştır (Şekil 4.2.a). Tamamen kuruyup ölen ağaç ve dallarda ana gövdeyi ve dalı bir çember şeklinde tamamen saran büyük kanserlerin varlığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.2.b). Kızıl kahverengi hafif çökük lekeler şeklinde olan genç kanserlerde ise ağaçların yapraklarında bazı hallerde herhangi bir anormallik görülmeyebilmekte ve genel görünüm olarak uzaktan bakıldığında hastalığın varlığı pek anlaşılammaktadır

Örnekleme sırasında kanserleri tanımlarken efekteli bölgedeki kabuk dokusunun doğal rengini kaybederek açık kahverengiye veya kırmızımsı kahverengiye dönüştüğü, kanserli bölgede turuncu renkte stromalar ve bu stromalardan helozon şeklinde uzayan siruslar ile kanserli kabuk dokusu kaldırıldığında alt kısmında yelpaze şeklinde tanımlanan miselyum dokusu gözlemlenen ilave belirtiler olmuştur.



Şekil 4.1. Kestane ağacının yapraklı döneminde kestane kanserli ağacın genel görünümü (a, b)



Şekil 4.2. Kestane kanseri hastalığının belirtileri; **a)** Gövde de görülen kızıl-kahverengi, hafif çökük lekeler ve çatlamlar, **b)** Dalda ileriki dönemlerde oluşan boyuna ve derin çatlaklar.

Çalışma sırasında yukarıda da bahsedildiği gibi farklı görünümde kanserlerden alınan toplam 277 kabuk örneğinden laboratuarda yapılan izolasyon işlemleri sonrasında 268 adet *C. parasitica* izolatu elde edilmiştir. Elde edilen saf *C. parasitica* izolatlarının PDA besi ortamında, genelde virulent tipte *C. parasitica* formlarına özgü olduğu bilinen, turuncu renkte koloniler oluşturmuşlardır. Hipovirulent tipte izolatlarda görülen beyaz renkte koloni oluşturan herhangi bir izolata rastlanmamıştır.

Çalışmanın yürütüldüğü il ve ilçelere göre kanser örneklemelerinden elde edilen *C. parasitica* izolatları ve sayıları Çizelge 4.1' de gösterilmiştir. Buna göre; İzmir ili, Tire ilçesinde iki farklı köyden (Büyükkemerdere, Cambazlı) 48 adet izolat, Ödemiş ilçesinde 7 köyden (Hacıhasan, Ovacık, Bayırlı, Kemerköy, Yılanlı, Bozdağ Merkez ve Çayırköy) 69 izolat, Kiraz ilçesinden bir köyden (Dokuzlar) 16 adet izolat elde edilmiştir. Manisa ili Salihli ilçesinde 2 köyden (Bahçecik ve Burhanköy) 12 adet izolat, Alaşehir ilçesinden dört köyden (Osmaniye, Bahadır, Bahçeliköy, ve Dağhacıyusuf) 39 adet izolat ve Sarıgöl ilçesinden üç köyden (Çamlıbel, Karacalı ve Kızılçukur) 37 adet izolat toplanmıştır. Denizli ilinden ise Babadağ ilçesinde bir köyden (Demirli) 10 adet ve Buldan ilçesinde üç köyden (Kurudere, Alandız ve Kaşıkçı) 47 adet izolat elde edilmiştir. Muğla ilinin Kavaklıdere İlçesi ve Menteşe Beldesi kestane alanlarında yapılan incelemelerde kestane kanseri hastalığına rastlanmamıştır ve bu nedenle bu ilden *C. parasitica* izolatu elde edilememiştir.

Çizelge 4.1 İzmir, Manisa ve Denizli illeri kestane üretim alanlarından toplanan kestane kanseri örneklerinden elde edilen *Cryphonectria parasitica* izolatları ve sayıları

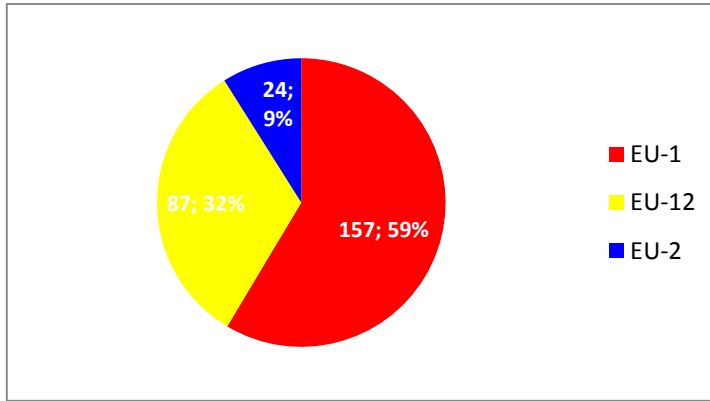
İl	İlçe	İzolatlar	İzolat Sayısı
İzmir	Tire(T), Ödemiş-Bozdağ (İ), Birgi-Kiraz(Hyd)	<p>T-837, T-838,T-840, T-844, T-845, T-846, T-847-1.Aşı, T-847-2.Aşı,T-848, T-853, T-878T-841,T-842,T-849-1.Aşı,T-849-2.Aşı,T-857,T-858,T-859,T-860,T-861,T-862,T-863,T-864,T-865,T-866,T-867,T-868,T-869,T-870,T-871,T-873,T-874,T-875,T-876,T-877, T-836, T-850, T-851,T-852,T-852,T-852,T-852,T-852,T-852,T-852,T-854,T-855,T-856</p> <p>İ-890,İ-894,İ-899,İ-900,İ-901,İ-902,İ-903,İ-904, İ-906,İ-907,İ-921,İ-922,İ-923, İ-889,İ-891,İ-892,İ-893, İ-895,İ-896,İ-897,İ-898, İ-905,İ-909,İ-910,İ-911,İ-912,İ-913,İ-914,İ-915,İ-916,İ-917,İ-918,İ-919,İ-920, İ-924,İ-925,İ-926,İ-927,İ-928,İ-929,İ-930,İ-931,İ-932,İ-933,İ-934,İ-935,İ-936,İ-937</p> <p>HYD-1,HYD-2,HYD-3,HYD-002,HYD-003, HYD-004,HYD-005, HYD-006-1,HYD-006-2, HYD-007-1,HYD-007-2, HYD-008,HYD-009,HYD-010,HYD-011, HYD-012,HYD-013,HYD-014,HYD-015, HYD-016,HYD-017,HYD-018,HYD-019,HYD-020, HYD-021,HYD-022, HYD-023,HYD-024,HYD-025,HYD-026, HYD-027,HYD-028,HYD-029,HYD-030, HYD-031, HYD-032, HYD-X-2</p>	133

Çizelge 4.1 (Devam)

İl	İlçe	İzolotlar	İzolot Sayısı
Denizli	Babadag̃(Db), Buldan(Db)	DB-879,DB-880,DB-881,DB-882,DB-883,DB-884,DB-885,DB-886,DB-887,DB-888  DB-071,DB-072,DB-073,DB-074,DB-075,DB-076,DB-077,DB-078,DB-079,DB-080,DB-081,DB-083-1,DB-083-2,DB-084,DB-085,DB-086,DB-088,DB-089,DB-090,DB-091,DB-092,DB-093,DB-094,DB-095,DB-097,DB-098,DB-099,DB-100,DB-101,DB-102,DB-103,DB-104,DB-105,DB-106,DB-107,DB-108	47
Manisa	Sarıgöl(M), Alaşehir(M), Salihli (Ms)	M-34,M-35-1,M-35-2,M-37-1,M-37-2,M-38,M-39,M-41-1,M-41-2,M-43,M-44,M-45,M-46,M-47,M-48,M-49,M-50,M-51,M-52,M-53,M-54,M-55,M-56,M-57,M-58,M-59,M-60,M-61,M-62,M-63,M-64,M-65,M-66,M-67,M-68,M-69,M-70  M-111,M-112,M-113,M-115,M-116,M-117,M-119,M-120, M-121, M-122, M-124,M-125,M-126,M-127,M-129,M,130, M-131,M-132,M-138,M-139,M-140,M-141,M-142,M-143,M-144,M-145-M-114,M-118,M-123-1,M-123-2,M-128,M-133,M-134,M-135,M-136,M-137,M-146-1,M-146-2,M-147  MS-149,MS-150,MS-151,MS-152,MS-153,MS-156,MS-157-MS-147,MS-148,MS-154-1,MS-154-2,MS-155	88
<b>TOPLAM</b>			268

## 4.2. İzolatların Vejetatif Uyum Grupları

İzmir, Manisa ve Denizli illeri kestane üretim alanlarından elde edilen 268 *C. parasitica* izolatının vejetatif uyum (vc) grupları, otoklavlanmış kestane odun dokusu üzerinde Avrupa vc tester izolatları ile eşleştirilmek suretiyle belirlenmiş ve elde edilen veriler Çizelge 4.2 4.3 ve 4.4 te gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; İzmir’de 3, Manisa ve Denizli de 2 farklı vc grubu saptanmıştır. Tüm bölge ölçeğinde izolatlar ele alındığında, izolatların 157’si (%.59) EU 1, 87’si EU 12 (%32) ve 24’ü EU 2 (%9) ile uyumlu olarak bulunmuştur (Şekil 4.3). EU-1 ülkemizde birçok bölgede kestane alanlarında en yaygın görülen vc grubu olduğu daha önce yapılan bir çok çalışmada ortaya konmuştur (Gürer 2001; Çeliker 2001, Erincik vd., 2008; Akıllı vd. 2009; Erincik vd. 2011; Akıllı vd., 2013). Özellikle Marmara ve Karadeniz Bölgelerinde EU-1 grubunun bulunma oranı bir hayli yüksek olarak rapor edilmiştir. Gürer vd. (2001)’nin Marmara Bölgesinden 89 ve Karadeniz Bölgesinden 45 adet *C. parasitica* izolatından tümünün EU-1 grubu ile uyumlu olduğunu bildirmiştir. Benzer bulgular Çeliker (2011) in Marmara Bölgesinden 82 adet, Karadeniz Bölgesinden 5 adet *C. parasitica* izolatından elde ettiği tüm izolatlar EU-1 grubu ile uyumlu bulunmuştur. Yine ülkemizde yürütülen başka bir çalışmada, Akıllı vd. (2013) Marmara Bölgesinden topladığı 198 adet izolatın hepsinin vc grubunu EU-1 olarak belirlemiştir. Akıllı vd. (2009) Karadeniz Bölgesinden elde ettikleri 296 adet izolatın %90,8 inin EU-1 olduğunu bildirmiştir.



Şekil 4.3. İzmir, Manisa ve Denizli illeri kestane alanlarından elde edilen *Cryphonectria parasitica* izolatlarının vejetatif uyum gruplarına göre sayısal dağılımı.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre; Ege Bölgesinde EU-1 en baskın grup olarak bulunsa da, bölgede EU-12 ve EU-2 nin varlığı farklı bir populasyon yapısının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Özellikle EU-12 ve EU-2 nin İzmir ilinde bazı lokasyonlarda baskın ve grubu olarak karşımıza çıktığı görülmektedir. Bölge için benzer bulgular Erincik vd.' nin 2008 ve 2011 de yayınladıkları çalışmalarında da belirtilmiştir. Erincik vd. (2008) sadece Aydın ili kestane alanlarından elde ettikleri 97 izolataın %69 'unu EU-1 %31'ini EU-12 olarak saptamışlar ve Sultanhisar ilçesinde EU-12 yi baskın ve grubu olarak bulmuşlardır. Erincik vd (2011) Aydın ve İzmir ilinin Aydın Dağları üzerinde yer alan kestane alanlarından elde ettikleri 213 *C. parasitica* izolataının %53,5'ini EU-1 %46,5 ini EU-12 olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmamıza benzer şekilde EU-12 ve grubunun bazı lokasyonlarda baskın olduğunu özellikle İzmir ilinde %70 bulunma oranına sahip olduğu bildirilmiştir.

Ege Bölgesinde EU-1 ve EU-12 nin dışında farklı bir ve grubu olarak EU-2 ilk kez bu çalışmada saptanmıştır. Sadece İzmir ilinin Tire ilçesinde bulunan bu grup bölge genelinde toplanan izolataın %9'unu oluşturmuştur. Ülkemizde EU-2 nin varlığı Akıllı vd. (2009) tarafından Karadeniz Bölgesinde Kastamonu ilinden aldığı 59 adet izolattan 1 tane ve Bartından aldığı 25 izolattan da 1 tane bularak yapmış olduğu çalışmada ilk kez ortaya konmuştur.

İzmir ilinde Ödemiş, Tire ve Kiraz ilçelerinin kestane üreticisi köylerinde yürütülen örnekleme çalışmaları sonrasında toplam 133 *C. parasitica* izolataı elde edilmiştir. Bu izolataın üzerinde yürütülen ve testleri sonrasında, patojenin Avrupa testerleri ile uyumlu üç farklı ve tipi bulunmuştur (Çizelge 4.2). Bunlardan ikisi bölgede daha önce de varlığı saptanmış EU-1 ve EU-12 ve grupları olup kalan diğeri ise yörede ilk defa saptanan EU-2 grubudur. İzmir ilinin genelinde % 50,4 bulunma oranı ile EU-12 en fazla elde edilen ve grubu olmuştur. Bir köy hariç EU-12 örnekleme yapılan tüm köylerde bulunmuştur. EU-1 ve grubu İzmir ili kestaneliklerinde yaygın olan bir diğeri ve grubu olup incelenen 10 köyün 9 undan elde edilmiştir. EU-2 ve grubu sadece Tire ilçesinde iki lokasyonda bulunmuştur.

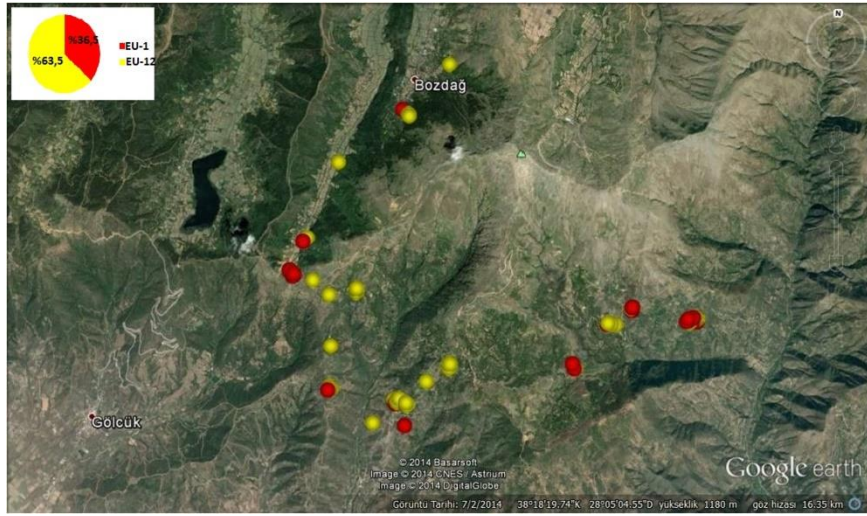
Çizelge 4.2. İzmir ili kestane alanlarından toplanan *Cryphonectria parasitica* izolatlarının ve gruplara göre dağılımı

İlçe/Belde/Köy	EU-12	EU-1	EU-2
<b>Ödemiş</b>			
Yılanlı	7 (38,9)*	8 (61,1)	-
Kemerköy	5 (100)	-	-
Hacıhasan	14 (82,4)	3 (17,6)	-
Ovacık	4 (36,4)	7 (63,6)	-
Bayırlı	10 (83,3)	2 (16,7)	-
Bozdağ	5 (83,3)	1 (16,7)	-
Çayırköyü	2 (66,7)	1 (33,3)	-
<i>Toplam</i>	<i>47 (68,1)</i>	<i>22(31,9)</i>	-
<b>Kiraz</b>			
Dokuzlar	7 (43,8)	9 (56,2)	-
<i>Toplam</i>	<i>7</i>	<i>9</i>	-
<b>Tire</b>			
Büyükkemerdere	13 (41,9)	10 (32,3)	8 (25,8)
Cambazlar	-	1 (5,9)	16 (94,1)
<i>Toplam</i>	<i>13(27,1)</i>	<i>11(22,9)</i>	<i>24(50)</i>
<b>Genel Toplam</b>	<b>67 (50,4)</b>	<b>42(31,6)</b>	<b>24 (18)</b>

\*Sütunlarda parentez içerisinde yer alan sayılar yüzde değerlerini göstermektedir.

İlçe ölçeğinde ve gruplarının dağılımına bakıldığında Ödemiş ilçesi EU-12 nin en yaygın olduğu ilçedir (Çizelge 4.2). Bu ilçede incelenen izolatların 47 (%68,1)'si EU-12 olarak saptanmıştır. Ödemiş'te incelenen 7 köyün tümünde EU-12 nin varlığı tespit edilmiş ve bu köylerden 6 sında EU-12 baskın olarak bulunmuştur. Ödemiş için benzer sonuçlar bu ilçenin Aydın Dağları üzerindeki güney kestaneliklerinde daha önce Erincik vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada da bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada EU-12 nin bulunma oranı %69,8 olarak saptanmıştır. EU-1 de ilçenin bir köy hariç incelenen tüm köylerinde rastlanmış olsa da EU-12'e göre bulunma oranı yarı yarıya düşüktür. İlçede ve grupların coğrafik dağılımlarına bakıldığında her iki ve grubunun ilçenin değişik alanlarına birbirine karışmış halde yayıldığı görülmektedir (Şekil 4.4.) . Hatta her iki ve tipinin birçok yerde birbirine çok yakın lokasyonlarda bulunduğu saptanmıştır.

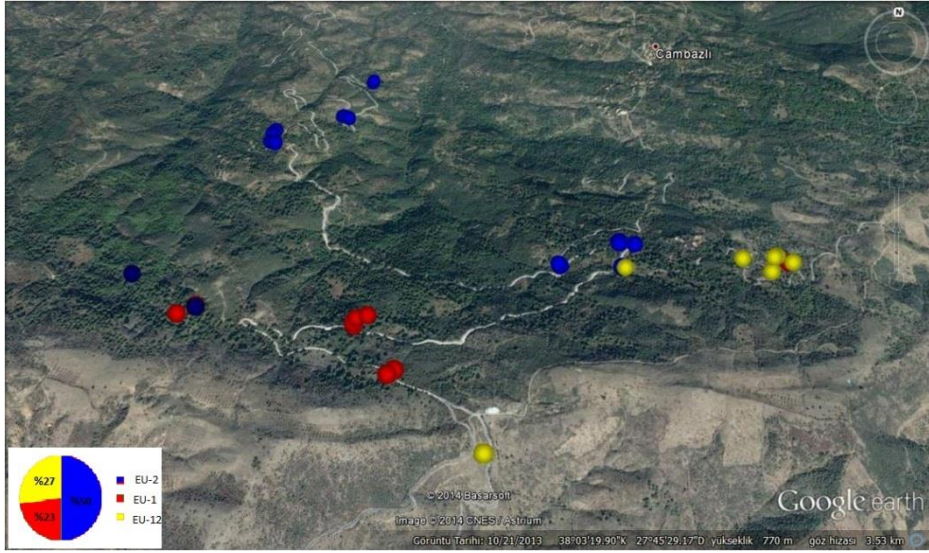




Şekil 4.4. Ödemiş, Bozdağ ve Kiraz kestane alanlarındaki *Cryphonectria parasitica* izolatlarından elde edilen vc tipler ve dağılımları

Kiraz ilçesinde örneklemelerin yapıldığı tek köy olan Dokuzlar köyünde elde edilen 16 izolattan 9'u EU-1 7'si EU-12 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Ödemişteki birçok lokasyonda olduğu gibi bu lokasyonda da iki vc grubu karışık olarak bulunmuştur (Şekil 4.4.).

Tire ilçesinde incelenen 48 izolattan 24 ü (%50) EU-2 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2). EU-2 nin bölgede bugüne kadar tek saptandığı yer olan Tire'de oldukça yüksek bir bulunma oranına sahip olduğu belirlenmiştir. Örneklem yapılan iki köyde de EU-2 nin geniş bir yayılma alanına sahip olduğu görülmektedir. Hatta Cambazlar köyü kestaneliklerinden alınan 17 örnekten 16'sının EU-2 olduğu görülmüştür. EU-1 ve EU-12 grupları ilçede bulunan diğer vc gruplarıdır. Vc gruplarının coğrafik dağılımına bakıldığında her üç vc grubunda birbirine karışmış halde bir yayılma deseni göstermediği aksine örnekleme alanının belli yerlerinde öbikleşmiş bir yayılma desenine sahip oldukları görülmektedir (Şekil 4.5.). Buda etmenin ilçede rüzgarla yayılma potansiyeline sahip askosporlarla değil daha çok yağmur damlası ile sıçrayarak kısa mesafelere bulaşmak suretiyle yayıldığıнын bir göstergesi olabilir.



Şekil 4.5. İzmir/ Tire kestane alanlarındaki *Cryphonectria parasitica* izolatlarından elde edilen ve tipler ve dağılımları

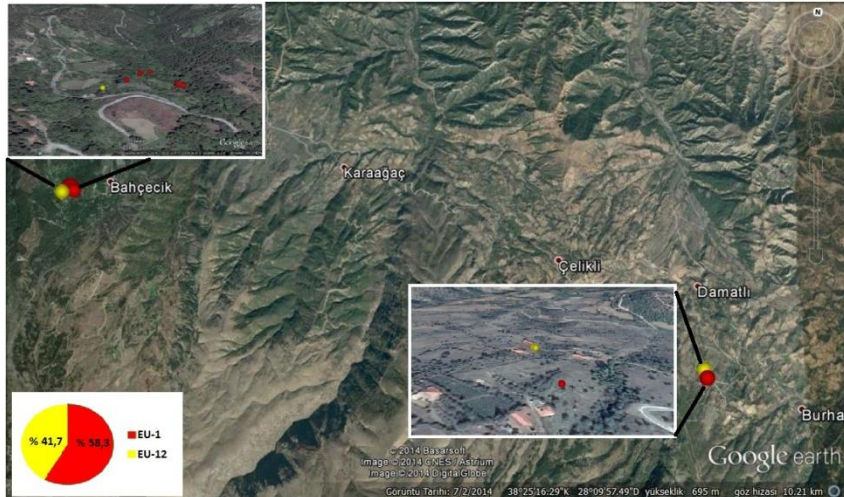
Manisa ilinin Salihli, Alaşehir ve Sarıgöl ilçelerinin kestane üreticisi olan 9 köyünde yürütülen örnekleme çalışmaları sonrasında toplam 88 adet *C. parasitica* izolatu elde edilmiştir. İzolatlar ile yürütülen ve testleri sonrasında, izolatların EU-1 veya EU-12 ve gruplarında olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.3). İl genelinde toplam 88 izolattan 69' u (%78,4) EU-1, 19' u (%21,6) EU-12 olarak belirlenmiştir. EU-1'e örnekleme yapılan köylerin hepsinde rastlanırken, EU-12 sadece dört köyde bulunmuştur.

İlçe bazında ve grup dağılımlarına bakıldığında, Salihli ilçesinde EU-1 en çok bulunan ve grup olmasına karşın EU-12 de örnekleme yapılan her iki köyde de EU-1 izolatlarına yakın mesafelerde bulunmuşlardır (Şekil 4.6.). Alaşehir ilçesinde ise Osmaniye ve Dağhacıyusuf kestaneliklerinde EU-1 ve EU-12 karışık olarak bulunmuştur (Şekil 4.7). Hatta bu köylerden Osmaniye EU-12 nin en yoğun olarak (%47,37) bulunduğu lokasyon olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Bahçeliköy ve Bahadır köylerinde sadece EU-1 grubunun varlığına rastlanmıştır. Sarıgöl ilçesinde örnekleme yapılan üç köyden elde edilen 38 izolattın hepsi EU-1 ile uyumlu bulunmuştur (Şekil 4.8).

Çizelge 4.3 Manisa ili kestane alanlarından toplanan *Cryphonectria parasitica* izolatlarının ve gruplara göre dağılımı

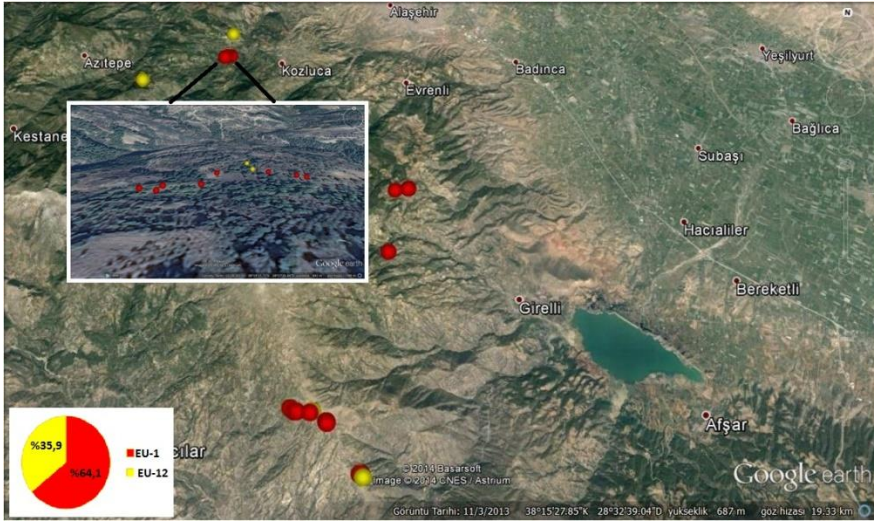
İlçe/Belde/Köy	EU-12	EU-1
<b>Salihli</b>		
Bahçecik	2(28,6)*	5(71,4)
Burhanköy	3 (60)	2(40)
<i>Toplam</i>	<i>5(41,7)</i>	<i>7(48,3)</i>
<b>Alaşehir</b>		
Osmaniye	9(47,4)	10(52,6)
Bahçeliköy	-	2(100)
Dağhacıyusuf	5(29,4)	12(70,6)
Bahadır	-	1(100)
<i>Toplam</i>	<i>14(48,3)</i>	<i>25(51,7)</i>
<b>Sarıgöl</b>		
Çamlıbel	-	3 (100)
Kızılçukur	-	28 (100)
Karacaali	-	6 (100)
<i>Toplam</i>	-	<i>37(100)</i>
<b>Genel Toplam</b>	<b>19(21,6)</b>	<b>69(78,4)</b>

\*Sütunlarda parentez içerisinde yer alan sayılar yüzde değerlerini göstermektedir.

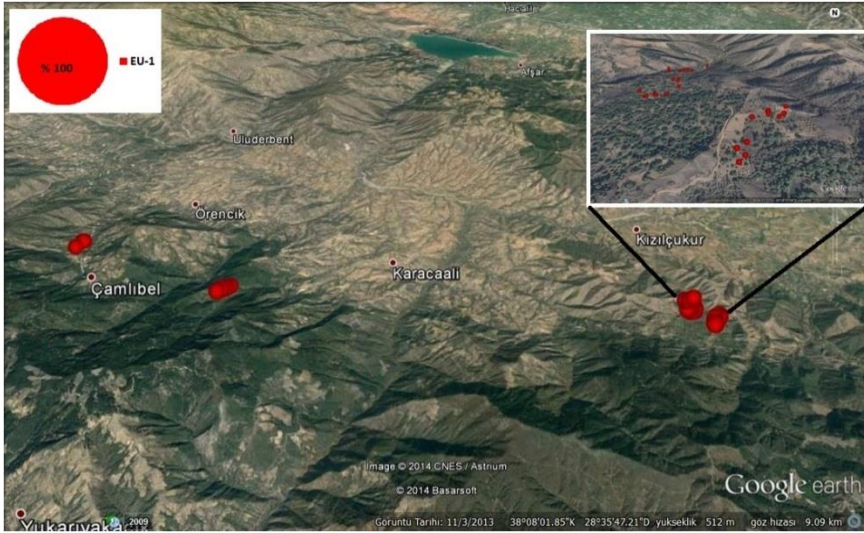


Şekil 4.6. Manisa/Salihli kestane alanlarındaki *Cryphonectria parasitica* izolatlarından elde edilen ve tipler ve dağılımları





Şekil 4.7. Manisa/Alaşehir kestane alanlarındaki *Cryphonectria parasitica* izolatlarından elde edilen ve tipleri ve dağılımı



Şekil 4.8. Manisa/Sarıgöl kestane alanlarındaki *Cryphonectria parasitica* izolatlarından elde edilen ve tipleri ve dağılımları.

Denizli ilinin Babadağ ve Buldan ilçelerinde dört farklı kestane üreticisi köyün kestaneliklerinde yapılan örneklemlerden 47 adet *C. parasitica* izolatu elde edilmiştir. Bu izolatlar üzerinde yapılan vc grup belirleme testleri sonrasında EU-1 ve EU-12 vc gruplarının varlığına rastlanmıştır (Çizelge 4.4). Ancak Buldan ilçesinden toplanan izolatlardan sadece 1'i EU-12 olarak bulunurken kalan tüm izolatlar EU-1 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10.). Babadağ lokasyonundan elde edilen 10 izolatin tamamı EU-1 grubu ile uyumlu bulunmuştur (Şekil 4.9.).

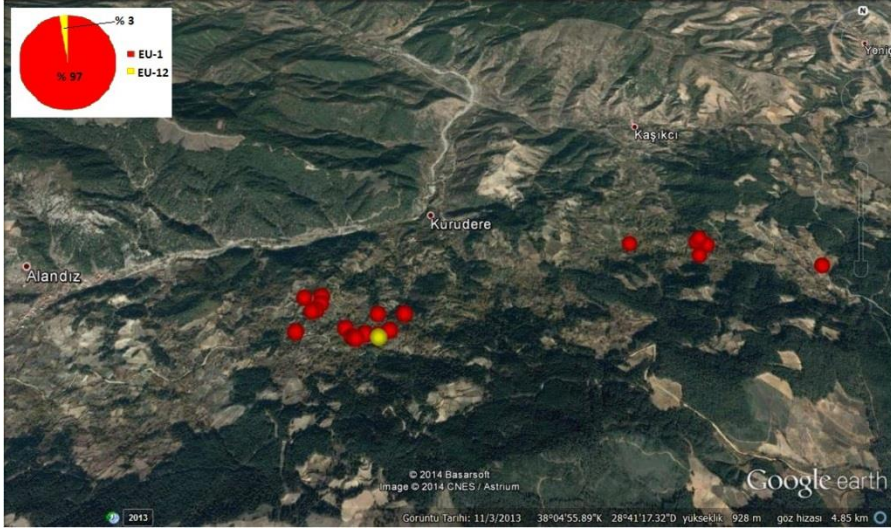
Çizelge 4.4. Denizli ili kestane alanlarından toplanan *Cryphonectria parasitica* izolatlarının vc gruplara göre dağılımı

İlçe/Belde/Köy	EU-12	EU-1
Babadağ		
Demirli	-	10 (100)
<i>Toplam</i>	-	<i>10</i>
Buldan		
Kurudere,Alandız	1 (4)	24 (96)
Kaşıkcı	-	12 (100)
<i>Toplam</i>	<i>1</i>	<i>36</i>
Genel Toplam	1 (2)	46 (98)

\*Sütunlarda parentez içerisinde yer alan sayılar yüzde değerlerini göstermektedir.



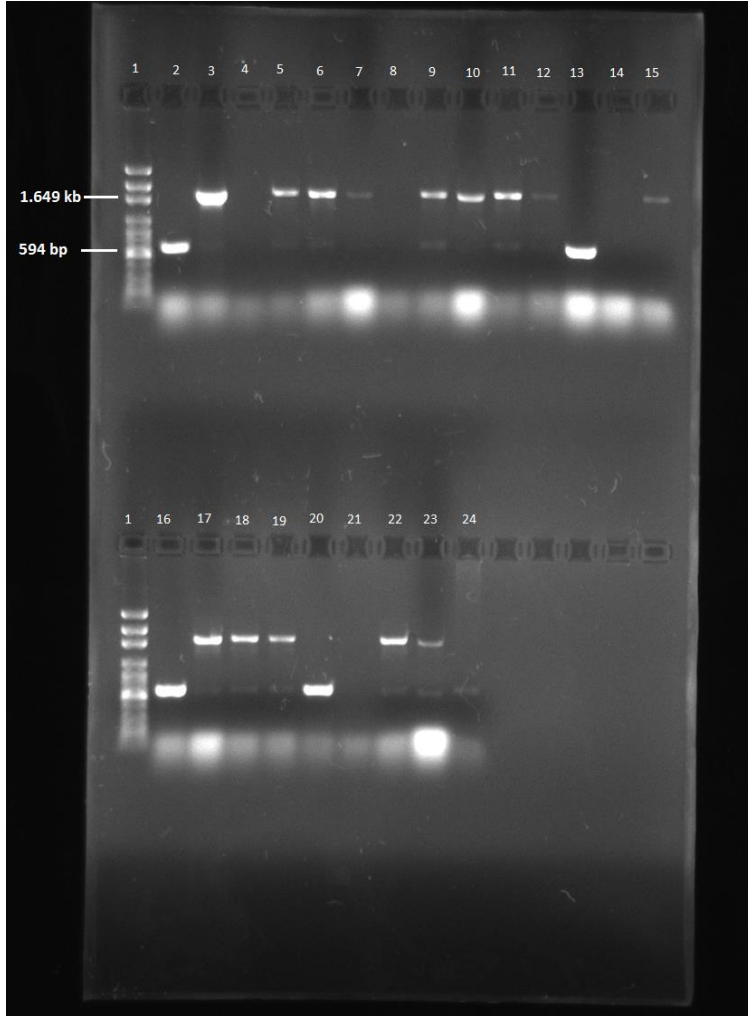
Şekil 4.9. Denizli/Babadağ kestane alanlarındaki *Cryphonectria parasitica* izolatlarından elde edilen vc tipler ve dağılımları



Şekil 4.10. Denizli/Buldan kestane alanlarındaki *Cryphonectria parasitica* izolatlarından elde edilen vc tipler ve dağılımları

### 4.3 İzolatların Mating Tipleri

Toplam 268 *C. parasitica* izolatu arasında her lokasyondan farklı vc grupları olacak şekilde seçilen 55 izolatu mating tipleri PCR ile belirlenmiş (Şekil 4.11) ve elde edilen bulgular Çizelge 4.5.' de gösterilmiştir. Buna göre; her üç ilde hem MAT-1 ve hem de MAT-2 eşleşme tiplerinin varlığı tespit edilmiştir. MAT-1:MAT-2 oranı 44:11 olarak bulunmuştur. Bu oran 1:1 oranından önemli oranda sapma gösterdiği için etmenin bölgede eşeyli üremediğinin göstergesi olarak kabul edilebilir. İzmir ilinin Ödemiş, Tire ve Kiraz ilçelerinin tümünde her iki eşleşme tipi saptanmıştır. İncelenen 30 izolattan 25'ü MAT-1 olarak bulunurken 5'i MAT-2 olarak belirlenmiştir. Manisa ilinde 19 izolatu 15'i MAT-1, 4'ü MAT-2 olarak bulunmuştur. Bu ilin Salihli ilçesinde MAT-2 eşleşme tipine rastlanmazken, Alaşehir ve Sarıgölde hem MAT-1 hem de MAT-2 tipinde izolatların varlığı belirlenmiştir. Denizli ilinde incelenen 6 izolattan 4'ü MAT-1, 2'si MAT-2 olarak bulunmuştur. Buldan' dan elde edilen izolatlar sadece MAT-1 olarak belirlenirken Babadağ' da her iki eşleşme tipinden izolatlara rastlanmıştır.



Şekil 4.11. *Cryphonectria parasitica* izolatlarından elde edilen DNA'ların agar jel elektroforez görüntüsü (1: Ladder, 2: K5-5, 3: 2310, 4: DB-76, 5: İ-907, 6: M-154-2, 7: M-70, 8: M-56, 9: M-121, 10: M-118, 11: M-39, 12: İ-905, 13: M-34, 14: M-61, 15: İ-893, 16: T-853, 17: T-842, 18: İ-922, 19: İ-936, 20: T-844, 21: M-66, 22: İ-894, 23: M-128, 24: H2O)



Çizelge 4.5. İzmir, Manisa ve Denizli illerinden toplanan *Cryphonectria parasitica* izolatlarının PCR sonucu belirlenen mating tipleri

İl/ilçe	İzolat sayısı	MAT-1	MAT-2	MAT-1:MAT-2
İzmir				
Ödemiş	15	13	2	13:2
Tire	12	9	3	9:3
Kiraz	3	3	-	
<b>Toplam</b>	<b>30</b>	<b>25</b>	<b>5</b>	<b>25:5</b>
Manisa				
Sarıgöl	7	5	2	5:2
Salihli	3	3	-	
Alaşehir	9	7	2	7:2
<b>Toplam</b>	<b>19</b>	<b>15</b>	<b>4</b>	<b>15:4</b>
Denizli				
Babadağ	3	1	2	1:2
Buldan	3	3	-	
<b>Toplam</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>4:2</b>
<b>Toplam</b>	<b>55</b>	<b>44</b>	<b>11</b>	<b>44:11</b>

Daha önce ülkemizin farklı coğrafik bölgelerinde yürütülen çalışmalarda *C. parasitica* populasyon yapısı mating tip yönünden karakterize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar etmenin her iki mating tipinin ülkemizde varlığını ortaya konmuştur. Gurer vd., (2001) Marmara Bölgesi'nden 15 ve Karadeniz Bölgesi'nden 9 adet *C. parasitica* izolatının mating tiplerini PCR yöntemi ile belirlemiş ve her iki bölgede MAT-1 ve MAT-2 izolatlarının varlığını saptamıştır. Çeliker ve Onoğur, (2004) Ege ve Marmara Bölgeleri'nden toplanan *C. parasitica* izolatlarının mating tiplerini laboratuvarında eşleşme yöntemi kullanılarak belirlemiş ve izolatların % 85'inin MAT-1'in %15'inin MAT-2 mating tipinde olduğunu bildirmiştir. Erincik vd. (2011) tarafından yürütülen bir çalışmada Aydın ve İzmir illerinin Aydın Dağlarında bulunan kestaneliklerinden topladığı 213 *C. parasitica* izolatının %65'inin MAT-1 ve %35'inin MAT-2 olduğunu belirlemişlerdir. Aynı çalışmada dağların büyük bir kısmında MAT-1 ve MAT-2'nin dağılımı öbekleşmiş bir desen gösterse de 12 lokasyonda her iki mating tipin birarada



olduğu da tespit edilmiştir. Ancak bu lokasyonlarda yapılan örneklemelerde peritesyumlar bulunmadığı gibi rekombinant olabilecek yeni vc tiplerin varlığına ve yüksek vc çeşitliliğine de rastlanmamıştır. Bu sonuçlar ile sözkonusu çalışmada Aydın Dağlarında *C. parasitica*'nın popülasyonunun klonal olduğu ve etmenin henüz eşeyli üremediği kanılarına varılmıştır. Ülkemizde Karadeniz Bölgesinde etmenin eşeyli üreme yapıları olan peritesyumlara rastlanmıştır. Nitekim son yıllarda elde edinilen bilgilere göre bu bölgede vc tip çeşitliliğinin de artış gösterdiği dikkat çekmektedir (Akıllı, 2009).

Çalışmadan elde edilen veriler değerlendirildiğinde *C. parasitica* izolatlarının vc grup ve mating tip kombinasyonları sonucu sınıflandırılması ile bölgede 4 farklı vc/mating tip genotipinin olduğu görülmektedir. Bunlar EU-1/MAT-1, EU-1/MAT-2, EU-12/MAT-1, ve EU2/MAT-1' dir (Çizelge 4.6). Bunların içerisinde en yaygın EU-1/MAT-1 genotipi (38) olup tüm örnekleme lokasyonlarında bulunmuştur. EU-12/MAT-1 genotipi (35) ikinci en yaygın genotip olup İzmir ilçelerinde ve Manisa'nın Alaşehir ilçesinde dominant olarak bulunmaktadır. Test edilen 5 adet EU-2 izolatının hepsi EU2/MAT-1 genotipi olarak belirlenmiştir.

Yukarıda sözü edilen genotiplerden bazıları aralarında eşeyli üreme gerçekleşmesi sonucu yeni vc tiplerin ortaya çıkmasına neden olabilecek özelliğe sahiptir. Örneğin; bunlardan Tire ilçesinde bulunan EU-1/MAT-2 ile EU-12/MAT-1 ya da EU-1/MAT-2 ile EU-2/MAT-1 izolatları, farklı vc gruplarından olmalarından dolayı aralarında oluşabilecek eşeyli eşleşmeler sonucu bölge için yeni vc gruplar oluşturabilecek özellik taşımaktadırlar. Bunun dışında buna benzer popülasyon özellikleri İzmir'in Ödemiş ve Manisa'nın Alaşehir ilçelerinde de bulunmaktadır. Eşeyli üreme *C. parasitica*'da vc çeşitliliğinin artmasına neden olan en önemli faktörlerden biridir (Cortesi ve Milgroom, 1998; Cortesi vd., 2001). Eşeyli üreme farklı vc gruplara sahip bireyler arasında gerçekleştiğinde her iki ebeveynden gelen *vic* genlerin rekombinasyonu yeni vc grupların ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Avrupa *C. parasitica* popülasyonunda şu ana kadar her biri iki allele sahip 6 adet *vic* geni tanımlanmış, bunlar *vic1*, *vic2*, *vic3*, *vic4*, *vic6* ve *vic7* olarak adlandırılmıştır (Cortesi ve Milgroom, 1998). Bu genlerin farklı kombinasyonları Avrupa'da 64 farklı vc grubunun oluşmasına neden olmuştur. Aydın'da yürütülen bir laboratuvar çalışmasında yörenizde yaygın olarak bulunan EU-1 ve EU-12 vc tiplerinin laboratuvar koşullarında çaprazlamasından en az 14 yeni vc tipin olduğu ortaya konmuştur (yayınlanmamış veri). Kuzey Amerika'da ve Avrupa'da

etmenin peritesyumlarının bulunduğu ülkelerde ve tip çeşitliliğinin yüksek olduğu bildirilmektedir (Milgroom ve Cortesi, 1999).

Çizelge 4.6. İzmir, Manisa ve Denizli illerinin kestane alanlarından toplanan *Cryphonectria parasitica* izolatlarının ve grup ve mating tip kombinasyonları sonucu ortaya çıkan ve/mating tip genotipleri.

İl/İlçe	EU-1/ MAT-1	EU-1/ MAT-2	EU-12/ MAT-1	EU-2/ MAT-1
İzmir				
Tire	1	3	3	5
Ödemiş	5	2	7	
Kiraz	1		2	
Manisa				
Sarıgöl	5	2		
Alaşehir	3	2	5	
Salihli	2		1	
Denizli				
Babadağ	2	1		
Buldan	2		1	
<b>Toplam</b>	<b>21 (38)*</b>	<b>10 (18)</b>	<b>19 (35)</b>	<b>5 (9)</b>

\* Sütunlarda parantez içerisinde yer alan sayılar yüzde değerlerini göstermektedir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kestane Kanseri dünyada olduğu gibi ülkemizde de kestane üretimini tehdit eden önemli hastalıklardan biridir. Bu hastalığın mücadelesi oldukça sınırlı olup en etkili yol hipovirülent ırkların kullanıldığı biyolojik mücadeledir. Biyolojik mücadelenin bir bölgede başarısını etkileyen en önemli faktörlerden biri *C. parasitica*'nın o bölgedeki ve çeşitliliğidir. Bugüne kadar Türkiye'nin en önemli kestane üreticisi ili olan Aydın'da *Cryphonectria parasitica* populasyonlarının ve gruplar yönünden kapsamlı incelemesi yapılmış ve var olan ve grupları ve coğrafik dağılımları ortaya konmuştur. Bu çalışmalardan ortaya çıkan sonuçlar, Aydın ilinde *C. parasitica*'nın ve çeşitliliğinin çok düşük olduğu ve bunda hipovirülenliğin yayılması açısından çok uygun bir koşul yarattığı ve uygulanacak biyolojik mücadelenin başarı şansını arttıracığı kanısını güçlendirmiştir. Ayrıca bundan önceki çalışmalarda, ve çeşitliliğini arttıran en önemli faktör olması nedeniyle, eşeyli üremenin *C. parasitica*'nın biyolojisindeki önemi Aydın ili alanlarında araştırılmıştır. Yine ortaya çıkan sonuçlar, *C. parasitica*'nın yörede henüz eşeyli ümediği ancak mating tiplerinin her ikisinde iç içe geçmiş durumda bir çok lokasyonda bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu durumun bölgede gelecekte oluşabilecek eşeyli üreme sonrasında ve çeşitliliğinin artması açısından riskli olduğu araştırmacılar tarafından dikkate alınmıştır.

Ege Bölgesinde Aydın dışında, diğer illerde de kestane üreticiliği yapılmakta ve bu alanlarda kestane kanserinin önemli zararlara yol açtığı bilinmektedir. Özellikle Aydın'a komşu olan iller olan İzmir, Manisa, ve Denizli'de bazı köylerin ekonomisinde kestane önemli bir yer tutmaktadır. Bu illerin *C. parasitica* populasyonları sınırlı alanlardan yapılan örneklemeler ile geçmişte zaman zaman incelenmiş olsa da *C. parasitica*'nın populasyon yapısını gereken şekilde ortaya koyacak kapsamlı bulgular elde edilmemiştir. Bu illerin kestaneliklerinin Aydın kestaneliklerine yakın olması nedeniyle bu alanlarda bulunma olasılığı bulunan farklı ve gruplarına sahip *C. parasitica* populasyonları Aydın kestanelikleri için bir tehdit faktörü olabilir.

Bu çalışmada Aydın iline komşu olan İzmir, Manisa, Denizli ve Muğla illerinde kestane kanseri hastalığının varlığı araştırılarak, etmen fungus *C. parasitica*'nın populasyon yapısını incelemek amacıyla kanserli ağaçlardan örnekler toplanmış ve

*C. parasitica* izolatları elde edilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen izolatların ve grupları ve mating tipleri belirlenerek coğrafik dağılımları ortaya konmuştur.

Vc testleri sonrasında, tüm örnekleme alanı göz önünde bulundurulduğunda üç farklı vc grubu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, bölgede *C. parasitica*'nın düşük vc çeşitliliğine sahip bir populasyon yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Bu vc gruplarından EU-1 ve EU-12 Ege Bölgesi'nde daha önce de rapor edilen gruplar olup, EU-2 ise ilk kez bu çalışmada rapor edilmiştir. EU-1 bölgede en dominant grup olsa da EU-12 de özellikle İzmir lokasyonunda dominant olup yaygın olan diğer bir vc gruptur. EU-2 nin bulunduğu tek lokasyon olan Tire'de %50 oranında bir yaygınlık göstermesi, bu vc grubunun aynı lokasyonda bulunan diğer vc grupları olan EU-1 ve EU-12'nin eşeyli üreme sonucu rekombinant olarak oluşmuş olabileceği ihtimalini zayıflatmaktadır. EU-2 nin bölgeye nereden geldiğini söylemek bu çalışma ile mümkün değildir. Akıllı vd. (2009) EU-2 nin varlığını Kastamonu ve Bartın da bildirmişler ancak bulunma oranını çok düşük olarak her iki ilde birer izolat olarak bulmuşlardır. EU-2 nin Tire'de %50 gibi bir yayılma oranına sahip olması bu populasyonun geçmişinin bu alanda daha eski olabileceğini göstermektedir.

PCR ile yapılan mating tip belirleme çalışmalarında, *C. parasitica*'nın hem MAT-1 ve MAT-2 olan izolatlarına rastlanmıştır. Çalışmada kullanılan 55 izolattan 44'ünün MAT-1, 11'inin ise MAT-2 olduğu tespit edilmiştir. MAT-1:MAT2 oranının 1:1 oranından önemli oranda sapma göstermesi nedeniyle *C. parasitica* nın bölgede eşeyli üremediği düşünülmektedir. Ayrıca vc çeşitliliğinin düşük olması da eşeyli üremenin olmadığını bir diğer göstergesi olarak kabul edilebilir. Ancak yine de bu konuda kesin kanıya varılabilmesi için ilave başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak çalışmamıza konu olan üretim alanlarında bulunan *C. parasitica* populasyonları içerisinde vc grup çeşitliliğinin düşük oluşu hipovirulent izolatların kullanılmasıyla yapılacak bir biyolojik savaşımın başarı şansının yüksek olacağını göstermektedir. Bu avantajın korunması için kestaneliklere yeni *C. parasitica* populasyonlarının girmemesi için gereken her türlü önlemler alınmalıdır. Bölgede *C. parasitica*'nın her iki mating tipinin olduğu gözönünde bulundurulmalı ve bu iki mating tipi biraraya getirecek insan faaliyetlerden sakınılmalıdır. İki mating tipin biraraya gelerek etmenin eşeyli üremesi durumunda, yeni vc tiplerin ortaya çıkabileceği ve rüzgarla yayılma özelliğine sahip eşeyli askosporlar hastalığın

yörede daha hızlı yayılmasını sağlayacağı dikkate alınmalıdır. Dışarıdan aşı materyali getirilmemeli, bitki bakım ve hasat işlemleri etmenin taşınmasına olanak sağlamayacak şekilde yapılmalıdır. Budama işlemleri sırasında kesici bir kanserden diğerine geçerken kesici aletlerin bir dezenfektan ile yüzey dezenfeksiyonu mutlaka yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Açıkgöz, S., Döken, M. T., Erincik, Ö., Degirmenci, F., 2004. Aydın yöresinde *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr' ın hipovirulent izolatlarının dsRNA analiz yöntemi ile saptanması. **Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri**. Samsun 8-10 Eylül: 255 s.
- Açıkgöz S., Döken M.T., Değirmenci N.F., Coutts R., Kozladıkıs Z., 2007. A Modified Procedure for Isolating Double-stranded RNA. **Application to Diagnosis of Amasya Cherry Disease.**, **J. Phytopathology**, 155:743-745.
- Adamčíkova K., Juhasova, G. ve Kobza M., 2006. Genetic diversity of *Cryphonectria parasitica* population in the Štiavnicko-Krupinská subpopulation in Slovakia. **Plant Protect. Sci.**, 42:119–124.
- Adamčíkova, K. Kobza, M. ve Juhasova, G., 2009. The development of population structure of *Cryphonectria parasitica* on European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in the Experimental Castanetarium Horné Lefantovce, observed over a 12-year study period. **Hort. Sci.**, 36:55-60.
- Agrios, G. N., 1997. Plant Pathology. Fourth Edition. Academic Press. San Diego. USA. 635 p.
- Akdoğan, S. ve E. Erkman, 1968. Dikkat kestane kanseri görüldü. **Tomurcuk**,1: 4-5.
- Akıllı S., Serçe Ç.U., Katırcıoğlu Y.Z., Maden S., Rigling D. 2013. Characterization of hypovirulent isolates of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* from Marmara and Black Sea Region of Turkey. **Eur. J. Plant Pathology**,135:323-334.
- Anagnostakis S.L., Jaynes R.A. 1973. Chestnut blight control: Use of hypovirulent cultures. **Plant Dis. Rep.**,57:225- 226.
- 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, Katırcıoğlu Y. K., ve Maden S., 2011. Biological control of chestnut canker, caused by *Cryphonectria parasitica*, by antagonistic organisms and hypovirulent isolates. **The Turkish Journal of Agriculture and Forestry**,35(5):515-523.

- Aksoy, H.M, Serdar, U., 2004. A research on chemical control against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica* (Murill) Barr). **The Plant Pathology Journal**,3: 44–47.
- Allemann C., Hoegger P., Heiniger U., Rigling D., 1999. Genetic variation of *Cryphonectria* hypoviruses (CHV1) in Europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. **Mol. Ecol.**, 8:843–54.
- Anagnostakis, S. L., Jaynes, R. A., 1973. Chestnut blight control: Use of hypovirulent cultures. **Plant Dis. Rep.**,57:225- 226.
- Anagnostakis, S. L., 1977. Vegetative incompatibility in *Endothia parasitica*. **Experimental Mycology**.,1: 306- 316.
- Anagnostakis S. L., Day P. R., 1979. Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, 69:1226–29.
- Anagnostakis S. L., 1982. Biological control of chestnut blight. *Science* 215:466–71
- Anagnostakis, S. L., Hau, B., ve Kranz, j., 1986. Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. **Plant Disease**,70: 536-538.
- Anagnostakis, S. L., Hau, B., & Kranz, J. (1986). Diversity of vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Connecticut and Europe. **Plant Disease**, 70:536–538.
- Anagnostakis, S. L. ve Kranz, j., 1987. Population dynamics of *Cryphonectria parasitica* in a mixed- hardwood forest in Connecticut. **Phytopathology**,77: 751-754.
- Anagnostakis, S. L., 1988. *Cryphonectria parasitica*, cause of chestnut blight. *Adv. Plant Pathology*,6:123- 136.
- Anagnostakis, S. L., 1997. Protecting chestnut trees from blight. In: Chestnut in our forest. **Connecticut, Woodlands**,62: 4-7.
- Anagnostakis, S. L., 2001. The effect of Multiple importations of pests and pathogens on a native tree. **Biological Invasions**,3: 245- 254.
- Anonim, 2008. Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Yumuşak Ve Sert Çekirdekli Meyve Hastalıkları, Cilt 4: 45- 48 s.
- Anonim, 2013 FAO, (Food and Agricultural Organization of the United Nations). [<http://apps.fao.org/faostat>],Erişim Tarihi:06.01.2015

- Anonim, 2014, TÜİK, Ankara / Erişim Tarihi:06.01.2015
- Anonim, 2015a.,[<https://tr.wikipedia.org/wiki/Kestane>], Erişim Tarihi:10.06.2015
- Anonim, 2015b., [<http://kafkas.com/kurumsal/kestane>], Erişim Tarihi:10.06.2015
- Arısan-Atac, I., Heidenreich E. ve Kubicek, C. P., 1995. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting identifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma* sp. capable of chestnut blight biocontrol. **FEMS Microbiology Letters**,126:249- 256.
- Bazzigher G., Kanzler E, KublerT. 1981. Irreversible Pathogenitiitsverminderung bei *Endothia parasitica* durch libertragbare Hypovirulenz.**Eur. J. For. Pathol. II**,19:358-69.
- Biraghi A, 1950. La distribuzione del cancro del castagno in Italia. **L’ItaliaForestale e Montana**, 5:18–21.
- Bisiach, M., Martino, A. De, Gobbi, E., Intropido M. ve Vegetti, G., 1988. Studies on chestnut blight: activitiy report. **Rivisa di Patologia Vegetale**, S. IV, 24: 3-13.
- Bissegger, M., Rigling, D., ve 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.
- Bolkan, H.A., Ogawa, J.M., Michailides, T.J. ve Kable, P.F. 1985. Physiological specialization in *Tranzschelia discolor*. **Plant Disease**,69:485-486.
- Braganca 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. **For. Path.** 37:391–402
- Cortesi, P., Rigling, D., ve Heiniger, U., 1998. Comparison of vegetative compatibility types in Italian and Swiss subpopulations of *Cryphonectria parasitica*. **European Journal Of Forest Pathology**,28(3)167-176.
- Cortesi, P., ve Milgroom, M. G., 1998. Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. **Applied and Environmental Microbiology**,64:2988–2994.
- Cortesi, P., Mc Culloch, C. E., Song, H., Lin, H. ve Milgroom, M. G., 2001. Genetic control of horizontal virüs transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Genetics**,159:107–118.



- Coşkun, H. ve Kural, İ. 1994. Kestane kanseri *Cryphonectria parasitica* (murr.) barr. Hastalığının mücadelesi üzerinde araştırmalar. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü BKA/01/F-094 Nolu Proje.
- Coşkun, H., Turchetti, T., Maresi G. ve Santagada, A., 1999. Preliminary investigations into *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr isolates from Turkey. **Phytopathol. Mediterr.**,38:101-110.
- Çeliker, N. M., 2000. Kestane kanseri (*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr.)'nın hipovirulent ırklarla savaşı üzerinde araştırmalar. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Bornova –İzmir, 116s.
- Çeliker, N. M. ve Onoğur, E., 2001. Evaluation of hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* for the biological control of chestnut blight. **Forest Snow Landscape Research**,76:378–382.
- Çeliker, N. M ve Onoğur, E., 2004. Ege ve Marmara bölgelerinde kestane kanseri etmeni (*Cryphonectria parasitica* Murr. Barr.)'nın yeni vejetatif uyum gruplarının oluşma şansı ve bunun biyolojik mücadele başarısına etkisi. **Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri**. Samsun 8-10 Eylül: 255 s.
- Çeliker, N. M. ve Onoğur E., 2007. Kestane kanserinin (*Cryphonectria parasitica* Murr. Barr.) doğal koşullarda biyolojik mücadelesi. **Türkiye 2. Bitki Koruma Kongresi 27-29 August 2007 Isparta**
- Delen, N., 1975. Distribution and biology of chestnut blight (*Endothia parasitica* (Murrill) Anderson and Anderson). **J. Turkish Phytopath**,4(3):93-113.
- Ellis, M. B. ve Ellis, J. B. 1985. Microfungi on Land Plants. Croom- Helm, London (GB).
- Eppo, 2005. *Cryphonectria parasitica* . **OEPP/EPP Bulletin**, 35:295– 298.
- Erincik B., 2006. Aydın Kestane Üretim Alanlarından Elde Edilen *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr Zolatlarının Virülensliklerin Ve Bu Yörede Yaygın Olarak Üretilen Kestane Çeşitleri ile Konukçusu Olan Bazı Orman Ağaçlarının Bu Etmene Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi Üzerine Çalışmalar. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, AYDIN.
- Erincik, Ö., Döken, M. T., Açıkgöz, S. ve Ertan E., 2003. First Report for Aydın, Turkey: *Cryphonectria parasitica* (Murrill.) Barr threatens thechestnut plantations of Aydın Province. **J. Turk. Phytopath.**, 32(1):41- 44.

- Erincik, Ö., Döken, M. T., Açıkgöz, S., ve Ertan, E. 2008. Characterization of *Cryphonectria parasitica* isolates collected from Aydın Province in Turkey. **Phytoparasitica**, 36:249–259.
- Erincik, O., Özdemir, Z., Durdu, Ö. F., Döken, M. T. ve Açıkgöz, S., 2011. Diversity and spatial distribution of vegetative compatibility types and mating types of *Cryphonectria parasitica* in the Aydın Mountains, Turkey. **Eur J Plant Pathol**,129:555–566.
- Fong Y. K., Anuar S., Lim H. P., Tham F. Y., Sanderson F. R. 2000. A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures. **Mycologist**,14(3):127–130.
- Fulbright, D. W., Paul, C. P., Garrod, S. W., 1988. Hypovirulence: a natural control of chestnut blight. Pages 121- 138 in: Biocontrol of Plant Disease. K. G. Mukerji, K. L. Garg, eds. CRC Pres, Boca Raton, FL.
- Fulbright, D. W., 1999. Chestnut blight and hypovirulence. In: Plant- Microbe Interactions, Vol. 4, G. Stacey and N. T. Keen editors. Pages 57- 79. APS Pres. St Paul, MN.
- Gravatt F., 1949. Chestnut blight in Asia and North America. **Unosylva**,3,(1)
- Grente, J., 1981. Les variants hypovirulents de l' *Endothia parasitica* et la lutte biologique contra le chancre du chataignier. Ph. D thesis. Universite de Bretagne Occidentale, Brest, France. 195 pp.
- Guerin, L., Bastien, S., Chauvin, B., 1999. The production and dispersal of ascospores of *Cryphonectria parasitica* in an orchard in south- western France. **Acta Horticulture**, 494:473- 480.
- Guerin, L. ve Robin, C., 2003. Seasonal effect on infection and development of lesions caused by *Cryphonectria parasitica* in *Castanea sativa*. **For. Path.**, 33:223- 235.
- Gürer, M., Ottaviani, M., ve Cortesi, P., 2001. Genetic diversity of subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in two chestnut- growing regions in Turkey. **For. Snow Landsc. Res.**,76,(3): 383- 386.
- Heiniger, U. ve Rigling, D., 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. **Annual Review of Phytopathology**,32:581-599.
- Hepting, G.H., 1974. Death of the American chestnut. **Journal of Forest History**,18: 60-67.

- Huber, D. H. ve Fulbright, D. W., 1994. Preliminary investigations on the effect of individual vic genes upon the transmission of dsRNA in *Cryphonectria parasitica*. In: Double M. L. and MacDonald W. L. (eds) Proceedings of the International Chestnut Conference, pp15- 19, West Virginia University Press, Morgantown.
- Hoegger, P. J., Rigling, D., Holdenrieder, O. ve Heiniger U.. 2000. Genetic structure of newly established populations of *Cryphonectria parasitica* **Mycol. Res.**,104(9):1108-1116.
- Jaynes, R.A, 1979. Chestnuts, nut tree culture in North America, R. A. Jaynes Ed. Northern Nut Growers Assoc. Inc. Hamden Connecticut, USA, (111-127).
- Krstin L., Novak-Agbaba S., Rigling D., Krajacic M., Curcovic Perica M., 2008. Chestnut blight fungus in Croatia: diversity of vegetative compatibility types, mating types and genetic variability of associated *Cryphonectria hypovirus 1*. **Plant Pathol.**,57:1086-1096.
- Liu, Y- C., ve Milgroom, M. G., 1994. Correlation between transmission of hypovirulence and the number of vegetative incompatibility (vic) loci different among isolates in a natural population of *Cryphonectria parasitica*. **Phytopathology**,84:1126- 1127.
- Liu Y.C, Milgroom M.G. 2007. High diversity of vegetative compatibility types in *Cryphonectria parasitica* in Japan and China. **Mycologia**,99:279–284.
- Mac Donald, W.L. ve Fulbright, D. W., 1991. Biological control of chestnut blight: use and limitations of transmissible hypovirulence. **Plant Disease**.,75:656-661.
- Mara, R. E. ve Milgroom, M. G., 1999. PCR amplification of the mating type idiomorphs in *Cryphonectria parasitica*. **Mol. Ecol.**,8:1947-1950.
- Marra, R. E., ve Milgroom, M. G. 2001. The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: selfing and selfincompatibility. **Heredity**,86:134–143.
- Mcguire, I. C., Marra, R. E., ve Milgroom, M. G. 2004. Mating-type heterokaryosis and selfing in *Cryphonectria parasitica*. **Fungal Genetics and Biology**, 41:521–533.
- Milgroom, M. G., 1995. Population biology of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Can. J. Bot.**,73:311- 319.

- Milgroom, M. G., 1997. Genetic variation and the application of genetic markers for studying plant pathogen populations. **Journal of Plant Pathology**,78(1):1-13.
- Milgroom M.G., Sotirovski K., Spica D., Davis J.E., Brewer M.T., Milev M., Cortesi P., 2008. Clonal population structure of the chestnut blight fungus in expanding ranges in southeastern Europe. **Molecular Ecology**,17:4446-445.
- Milgroom M. G., Cortesi P., 1999. Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA 96:10518–10523.
- Milgroom, M. G., ve Cortesi, 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annu. Rev. Phytopathol*,42:311- 338.
- Montenegro D., Aguin, O., Sainz, M.J., Hermida M., ve Mansilla J.P., 2008. Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence of hypovirulence of *Cryphonectria parasitica* in chestnut stands in NW Spain. **Forest Ecology and Management**,256:973–980.
- Pavari, A., 1949. Chestnut blight in Europe. **Unosylva**,3,(1).
- Perlerou, C., ve Diamandis, S. 2006. Identification and geographic distribution of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* and occurrence of hypovirulence in Greece. **Forest Pathology**,36:413–421.
- Radocz, L., 1999. Chestnut blight and the hypovirulence in the Carpathian basin. **Acta Horticulturae** 494. ISHS Press, Leuven-Belgium:501- 508.
- Rittenour, W. R., 2005. The biological control potential of *Cryphonectria parasitica* strains containing an infectious cDNA copy of hypovirus CHV1-Euro7. PhD Dissertation. West Virginia University. Morgantown, WV, USA.
- Roane, M., Griffin G. ve Elkins, J., 1986. Chestnut blight, other *Endothia* diseases and the genus *Endothia*. APS Press: St. Paul.
- Robin, C., Anziani, ve 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., ve Heiniger, U. 2001. Chestnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. **Forest Snow and Landscape Research**,76:361–367.

- Radocz L., 2001. Study of subpopulations of the chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*) fungus in the Carpathian basin. **For. Snow Landsc. Res.**,76,(3): 368–372.
- Sharf, S. S. ve Palma, N. K. De, 1981. Birds and mammals as vectors of the chestnut blight fungus (*Endothia parasitica*).**Canadian Journal of Zoology**,59:1647-1650.
- Soylu, A., 1984. Kestane yetistiriciligi ve özellikleri. Yalova Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü, Yayın No: 59, Yalova.
- Sotirovski, K., Papazova-Anakieva, I., Grünwald, N. J. Ve 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.
- Spica, D., Sammarco, G., Pennisi, A. M., Zappia, R., Cacciola, S. O. ve San Lio, G. M. 2006. Diversity of vegetative compatibility and mating types in *Cryphonectria parasitica* populations from Calabria. **Advances in Horticultural Science**, 20(1):45-49.
- 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 Snow 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.
- Zamora, P., Martin, A. B., Arrate, J., Rigling, D., ve Diez, J. J. 2008. Detection of the vegetative compatibility groups of *Cryphonectria parasitica* in Castilla y Leon region. Proceedings Of The Second Iberian Congress On Chestnut.**Acta Horticulturae**,784 : 159-162.
- Wilhelm, E., Wolfgang, A., Schafleitner R., ve Krebs, B., 1998. *Bacillus subtilis* an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*) as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 52: 105- 108.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Müzeyyen DALDAL  
Doğum Yeri ve Tarihi : ÖDEMİŞ – 01.02.1988

### EĞİTİM DURUMU

Ön Lisans Öğrenimi : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Gıda Teknolojisi  
Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fak. Bitki Kor.  
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enst.  
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

### İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Mavi Tarımsal Danışmanlık ve Müh. Hiz. Ltd. Şti –  
3 yıl

### İLETİŞİM

E-posta Adresi : muzeyyendaldal@hotmail.com