

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
2017-YL-011

**DOĞU KARADENİZ BÖLGESİNDE KESTANE
KANSERİ ETMENİ *Cryphonectria parasitica*'NİN
VEJETATİF UYUM TİPİ ÇEŞİTLİLİĞİNDE
EŞEYLİ ÜREMENİN ROLÜ**

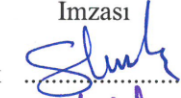
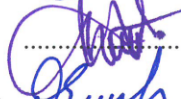

Engin MANGİL

**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 Engin MANGİL tarafından hazırlanan Doğu Karadeniz Bölgesinde Kestane Kanseri Etmeni *Cryphonectria parasitica*'nın Vejetatif Uyum Tipi Çeşitliliğinde Eşeyli Üremenin Rolü başlıklı tez 08/05/2017 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

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

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.

..../..../2017

ÖZET

DOĞU KARADENİZ BÖLGESİNDE KESTANE KANSERİ ETMENİ *Cryphonectria parasitica*'NİN VEJETATİF UYUM TİPİ ÇEŞİTLİLİĞİNDE EŞEYLİ ÜREMENİN ROLÜ

Engin MANGİL

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ömer ERİNCİK

2017, 55 sayfa

Bu çalışma, Doğu Karadeniz Bölgesinde Kestane Kanseri etmeni *Cryphonectria parasitica*'nın vejetatif uyum çeşitliliğini belirlemek ve bu çeşitliliğin oluşumunda eşeyli üremenin rolünü ortaya koymak amacıyla yürütülmüştür. 2006 yılında, Artvin, Rize ve Trabzon illerinden seçilmiş 3 farklı lokasyondaki kestane ağaçlarından kanserli doku örnekleri toplanmış ve izolasyon işlemleri sonucunda 344 *C. parasitica* izolatu elde edilmiştir. İzolatların vejetatif uyum (vc) tipleri Avrupa testereleri ile besi ortamı üzerinde eşleştirilerek belirlenmiştir. Test edilen izolatların 235'i (%68,3) EU-1, 23'ü (%6,7) EU-17, 21'i (%6) EU-12 ve 14'ü (%4) EU-3 ile uyumlu olarak bulunurken, 51 izolat hiçbir Avrupa grubu vc tipi ile uyumlu bulunmamıştır. Uyumsuz bulunan bu izolatlar kendi aralarında 6 uyum grubuna ayrılmış ve bu gruplar tarafımızdan TU-1 (6,4%), TU-2 (2,6%), TU-3 (1,2%), TU-4 (1,7%) ve TU-5 (0,9%) olarak adlandırılmıştır. Toplam 179 izolatu mating tipleri spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemi ile saptanmıştır. MAT-1 ve MAT-2 eşleşme tiplerinin bulunma oranları sırasıyla % 37,5 ve %55,3 olarak bulunmuştur. Onüç izolatta her iki MAT alleli tespit edilmiş ve bu izolatlar heterokaryon olarak tanımlanmıştır. Toplam 130 kanser örneğinde peritesyumların varlığına rastlanmış ve bu durum *C. parasitica*'nın yörede eşeyli ürediğinin en önemli göstergesi olarak kabul edilmiştir. Toplam 21 kanser örneğinden peritesyum başına en az 25 adet tek askospor elde edilmiş ve bunların vejetatif uyum tipleri belirlenmiştir. Toplam 14 kanserin peritesyumlarından elde edilen tek askosporlar arasında ebeveyn izolat ile vejetatif uyum göstermeyen izolatlar saptanmıştır. Bu çalışmadaki bulgular Doğu Karadeniz Bölgesinde *C. parasitica*'da vc tip çeşitliliğinde bir artışın olduğunu ve bu artışta eşeyli üremenin önemli bir rolünün bulunduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar sözcükler: Kestane kanseri, *Cryphonectria parasitica*, vejetatif uyum, mating tip, eşeyli üreme ve vc tipi çeşitliliği

ABSTRACT

ROLE OF SEXUAL REPRODUCTION in VEGETATIVE COMPATIBILITY TYPE DIVERSITY of *Cryphonectria parasitica*, CAUSAL AGENT OF CHESTNUT BLIGHT, in THE EASTERN BLACKSEA REGION

Engin MANGİL

Ms.C. Thesis, Department of Animal Sciences

Supervisor: Doç. Dr. Ömer ERİNCİK

2017, 55 pages

This study aimed at determining vc type diversity of *Cryphonectria parasitica* in the Eastern Black Sea Region of Turkey and understanding role of sexual reproduction in this diversity. In 2016, cankered bark samples were collected from chestnut trees from three different locations of Artvin, Trabzon and Rize provinces and a total of 344 *C. parasitica* isolates were obtained. Vc types of the isolates were identified by pairing of the isolates with the European vc testers on media. Among the isolates tested, 235 isolates were compatible with the European vc testers, EU-1 (68%), 23 were EU-17 (6,7%), 21 were EU-12 (6%) and 14 were EU-3 (4%) whereas 51 isolates were not compatible with any of the European testers. The unidentified vc types were divided into six groups that were named TU-1 (6,4%), TU-2 (2,6%), TU-3 (1,2%), TU-4 (1,7%) and TU-5 (0,9%). Mating types of 179 isolates were detected by using a PCR with spesific primers. MAT-1 and MAT-2 comprised of 37,4% and 55,3%, respectively. Thirteen isolates were heterokaryotic carrying both mating alleles. Perithecia were found in 130 bark samples, evidencing that *C. parasitica* commonly reproduce sexually in the region. Single ascospore isolates were obtained from the perithecia of 21 field cankers and at least 25 single isolates per perithecia were subjected to the vc type assay. Numerous single ascospores from 14 cankers showing vegetative incompatibility with the parent isolates were detected. The results indicated that the diversity of vc types of *C. parasitica* increases in te Eastern Black Sea Region and this increase can partially be related to the sexual reproduction.

Key words: Chestnut blight, *Cryphonectria parasitica*, vegetative compatibility, mating type, sexual reproduction, vc type diversity

ÖNSÖZ

Ülkemizde iklim özellikleri kestane yetiştiriciliği için elverişli olmasına ve yüksek bir üretim potansiyeli olmasına rağmen son yıllarda gerek üretim miktarlarında gerek ise kestane alanlarında ciddi düşüşler meydana gelmektedir. Bu olumsuzlukların başında kestane ağaçlarını kısa sürede kurutup tahriplere yol açan kestane kanseri hastalığı gelmektedir. Hastalık ile kültürel mücadele kısıtlı şartlarda yapılabildiği için en etkili yöntem etmenin hipovirulent ırklarından yararlanılarak uygulanan biyolojik mücadele yöntemidir. Fakat biyolojik mücadelenin başarısını olumsuz yönde etkileyen etkenlerin başında; etmen fungusun, uygulama yapılacak olan bölgedeki ve çeşitliliği arttıran en önemli faktörlerden biri etmenin eşeyli üremesidir. Doğu Karadeniz Bölgesinde son yıllarda yapılan çalışmalarda ve çeşitliliğinin arttığı görülmüştür. Bu artışta eşeyli üremenin etkisinin olup olmadığının araştırılması kestane kanseri hastalığının mücadelesi açısından önem taşımaktadır. Bu amaçla hazırlanan ve Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen çalışmamızda, ve çeşitliliğinin fazla olduğu bilinen Doğu Karadeniz Bölgesindeki kestane alanlarındaki hastalıklı ağaçlardan elde edilen *C. parasitica*'nın ve gruplarını ve mating tiplerini tespit ederek ortaya çıkan sonuçlar fungusun eşeyli üremesi sonucu meydana getirdiği peritesyum oluşumları yönünden incelenmiş, eşeyli üremenin ve çeşitliliğindeki rolü bildirilmiştir.

Yüksek lisansa başladığım günden, tez konumun belirlenme aşamasında ve çalışmalarımın sonuna kadar tecrübelerinden yararlandığım, bana olan manevi desteğinden ve güveninden vazgeçmeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Ömer ERİNCİK'e sabrından dolayı, Avrupa testerelerin temini aşamasında Prof. Dr. Paola Cortesi ve Dr. Cecile Robin'e, arazi çalışmalarında yardımcı olan Nuri KİLİMCİ'ye, laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan Arş. Gör. Sevdije YORGANCI, Sahra HOSSEİNALİZADEH ve Zir. Müh. Tuğba ÇÖP'e teşekkür ederim. Doğu Karadeniz kestane alanlarındaki arazi çalışmalarımda verdikleri desteklerden dolayı Artvin Orman Bölge Müdürlüğü'ne ve Trabzon Orman Bölge Müdürlüğü'ne çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	11
2.1.Genel Tanım.....	11
2.1.1. Taksonomi.....	11
2.1.2. Morfoloji	11
2.1.3. Hastalığın Yayılması.....	12
2.1.4. Hastalığın Patolojisi	12
2.1.5. Hastalığın Mücadelesi.....	13
2.2.Yurtdışında Yapılan Çalışmalar	15
2.3. Yurtiçinde Yapılan Çalışmalar.....	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM	21
3.1. Materyal	21
3.2. Yöntem	21
3.2.1. Örnek toplama	21
3.2.2. Örneklerin İncelenmesi Ve İzolasyonu	25
3.2.3. İzolatların Vejetatif Uyum Gruplarının Araştırılması	26
3.2.4. İzolatların Mating Tiplerinin Belirlenmesi	28
3.2.5. Kanserli Dokularda Peritesyum Varlığının Belirlenmesi	29
3.2.6. Tek Askospor İzolatlarının Elde Edilmesi ve Vc Tiplerinin Belirlenmesi ..	29
4. BULGULAR	32

4.1. Örnek Toplama ve İzolasyon İşlemleri	32
4.2. İzolatların Vejetatif Uyum Grupları	33
4.3 İzolatların Mating Tipleri	35
4.4. Kanserli Dokularda Peritiesyum Varlığı.....	39
4.5. Tek Askospor İzolatlarda Vejetatif Uyumu.....	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	55

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

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

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.1. Kestane kanseri hastalığının kabuk dokusu üzerinde meydana getirdiği belirtiler: *Cryphonectria parasitica*'nın turuncu, sarı renkte oluşturduğu nekrozlar (a), Kanserli bölgede oluşan çatlaklar (b), *Cryphonectria parasitica*'nın kabuk dokusunda oluşturduğu turuncu renkteki stromalar (c).....6
- Şekil 3.1. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde *Cryphonectria parasitica* örneklemelerinin yapıldığı iller22
- Şekil 3.2. Hastalıklı kestane ağaçlarından örnek alma işlemleri; kestane kanserli doku örneklerinin alınması (a), örnek alınan stromalı bir kanser (b), örnekleme sonrası yapılan kesici alet yüzey dezenfeksiyon işlemi (c)...24
- Şekil 3.3. *Cryphonectria parasitica* enfekteli kabuk dokularından alınan örneklerden PDA üzerinde miselyal koloni gelişimi (a) ve saflaştırılmış bir *Cryphonectria parasitica* izolatının PDA da görünümü (b).....25
- Şekil 3.4. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının ve grup belirleme testleri27
- Şekil 3.5. *Cryphonectria parasitica* izolatları ile Avrupa testereleri arasındaki vejetatif uyum ve uyumsuzluk27
- Şekil 3.6 *Cryphonectria parasitica*'nın kestane kabuk dokusu üzerinde oluşturduğu stromalar (a), stromadan çıkarılmış peritesyumlar (b), peritesyumların suda durulanması (c), peritesyumun patlatılmasıyla ortaya çıkan askus ve askosporlar (d)31
- Şekil 4.1. Trabzon, Rize ve Artvin illerindeki *Cryphonectria parasitica* izolatlarında tespit edilen ve gruplar ve illerdeki bulunma yüzdeleri34
- Şekil 4.2. Doğu Karadeniz Bölgesi'nden toplanan *Cryphonectria parasitica* izolatlarda mating tiplerin tüm bölge düzeyindeki bulunma yüzdeleri .35
- Şekil 4.3. Artvin, Rize ve Trabzon illerindeki *Cryphonectria parasitica*'nın mating tiplerinin bulunma yüzdeleri36
- Şekil 4.4. *Cryphonectria parasitica* izolatlarından elde edilen PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerinde üzerindeki elektroforez görüntüsü37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünya'daki 2013 yılı kestane üretim miktarları	2
Çizelge 1.2. Türkiye'de bölgelere göre 2014 yılı kestane üretim alanları ve miktarları	3
Çizelge 1.3. Dünyada önemli kestane üreticisi ülkelerin 1993 ve 2013 yıllarındaki kestane üretim miktarları	4
Çizelge 3.1. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde <i>Cryphonectria parasitica</i> örneklemelerinin yapıldığı lokasyonların bulunduğu iller, ilçeler ve köyler	22
Çizelge 3.2. <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının mating tiplerinin belirlenmesinde kullanılan primerler	28
Çizelge 4.1 Artvin, Rize ve Trabzon illerindeki kanserli kestane ağaçlarından alınan örnek ve elde edilen <i>Cryphonectria parasitica</i> izolat sayıları.	32
Çizelge 4.2. Doğu Karadeniz Bölgesi kestane alanlarından elde edilen <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının illere göre vejetatif uyum grupları dağılımı	33
Çizelge 4.3 Artvin, Rize ve Trabzon illerinden elde edilen <i>Cryphonectria parasitica</i> izolatlarının mating tiplere göre sayısal dağılımları	38
Çizelge 4.4. Artvin, Rize ve Trabzon illerinden elde edilen <i>Cryphonectria parasitica</i> ile enfekteli örneklerde peritesyum bulunma oranları	39
Çizelge 4.5. Artvin, Rize ve Trabzon illerinden toplanan kestane kanser örneklerden elde edilen tek askospor izolat sayıları ve bu izolatların vejetatif uyumu	41

1. GİRİŞ

Kayingiller (*Fagacea*) familyasından olan kestane, meyvesi yenilebilen ve gövdesi odun veya kereste olarak sanayide kullanılabilen önemli bir bitkidir. Kestane ağaçları, doğal olarak Kuzey Yarım Küre’de ılıman bölgelerde yetişmektedir. Ticari amaçla kullanılan *Castane sativa*, *C. mollissima*, *C. dentata* ve *C. crenata* türleri ile birlikte bu bölgelerde 13 türünün olduğu bilinmektedir (Soylu, 1984; Burnham vd., 1986).

Kestane ağacının, meyvesinin yanı sıra odunundan, yapraklarından, çiçeklerinden ve kabuklarından faydalanılmaktadır. Karbonhidratlarca çok zengin olan kestane, nişasta ve şeker içermektedir. Aynı zamanda vitamin ve mineral olarak da zengin ve sağlıklı bir protein kaynağıdır. Besin değeri olarak C ve A vitamini yönünden zengindir (Ülkümen, 1973). Bunun dışında özellikle bebeklerde kalp ve damar sağlığı ve uygun nörolojik gelişim için gerekli olan linoleik asit içeren, yüksek oranda esansiyel yağ asitlerine sahiptir. Yağında ise zeytinyağında bulunan palmitik asit ve oleik asit bulunmaktadır (Anonim, 2016).

Kestanenin canlı odunu sarı renkte ve öz kısmı koyu kahve renktedir. Kereste olarak insan hayatında önemli bir yeri vardır. Ağaç kabuklarından tanen elde edilebildiği gibi meyve kabuklarının ve yapraklarının da tanen içerdiği bilinmektedir. Özellikle suya dayanıklı olması nedeniyle sepet, mobilya, fiç, gemi, tekne ve demiryolları yapımında kullanılmaktadır. Ayrıca içerdiği tanen sayesinde deri sanayisinde de kullanılmaktadır (Westwood, 1993; Anonim, 2016).

Dünyada kestane yetiştiriciliği yapan başlıca ülkeler Çizelge 1.1’de gösterildiği üzere Çin, Kore, Japonya ve Akdeniz ülkeleridir. Ülkemiz kestane yetiştiriciliği yönünden bakıldığında toprak ve iklim özellikleri bakımından çok uygun olması nedeniyle önemli bir üretim potansiyeline sahiptir. Türkiye yıllık 60019 tonluk üretimiyle, 1650000 ton üreten Çin ve 79902 ton üretim yapan Kore’den sonra dünya üzerindeki üretimde 3. sırada yer almaktadır. Bu ülkeleri sırasıyla İtalya ve Yunanistan takip etmektedir (Anonim, 2013).

Çizelge 1.1. Dünya'daki 2013 yılı kestane üretim miktarları (Anonim, 2013).

Ülkeler	Üretim (ton)
Çin	1.650.000
Kore	79.902
Türkiye	60.019
İtalya	49.459
Yunanistan	29.900
Portekiz	24.700
İspanya	17.200

Ülkemizde kestane, Doğu Karadeniz'den başlayıp Marmara Bölgesi ile Ege'den Akdeniz Bölgesine kadar hemen hemen her bölgede yetişmektedir (Soylu, 1997). Karadeniz'de 700-800 m yüksekliklere kadar diğer orman ağaçları ile birlikte kıyı boyunca yayılmaktadır. Ege ve Marmara Bölgelerinde ise orman ağacı olmasının yanı sıra kültüre alınarak tarım arazilerinde yetiştirilmektedir. Ülkemizdeki kestane üretim miktarlarına bakıldığında ise Ege Bölgesi 36803 tonluk üretimiyle 1. sırada yer almaktadır. Ege Bölgesinden sonra 20707 tonluk üretimiyle Karadeniz Bölgesi gelmektedir (Anonim, 2014) (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Türkiye’de bölgelere göre 2014 yılı kestane üretim alanları ve miktarları (Anonim, 2014).

Bölgeler	Üretim Alanı (ha)	Üretim Miktar (ton)
Ege	94.017	36.803
Karadeniz	4.211	20.707
Marmara	12.851	6.150
Akdeniz	80	88
Diğer	5	14

İstilacı bir ağaç olması nedeniyle dünya üzerinde milyonlarca hektar yayılma alanına sahip olması ile bilinen kestane; 1900 yıllarının başlarından itibaren, kestane kanseri hastalığının tahribatı altında kalmış ve bu hastalık yüzünden tüm dünya üzerindeki kestane alanlarında önemli ölçüde azalmalar meydana gelmiştir (McDonaold, 1993). Dünya üzerinde ilk kez Amerika Birleşik Devletleri’nin New York eyaletindeki bir hayvanat bahçesinde Herman Merkel tarafından 1904 yılında teşhis edilmesine rağmen hastalığın Asya kökenli olduğu düşünülmektedir (Merkel, 1905’e atfen Anagnostakis, 2001). Nitekim Frank Mayer tarafından yapılan araştırmalarda kanserin varlığı 1913 yılında Çin ve 1915 yılında Japonya’da da saptanmıştır (Heiniger ve Rigling, 1994; Robin ve Heiniger, 2001). Hastalık kısa sürede ABD’nin diğer eyaletlerine, daha sonra da Avrupa ülkelerine yayılmış ve takip eden yıllar içerisinde oluşturduğu epidemiler ile milyarlarca kestane ağaçlarının ölümüne neden olmuştur (Griffin, 1986; Milgroom ve Cortesi, 2004).

Avrupa’daki yayılımına bakıldığında ise ilk kez 1938 yılında İtalya’da Genova’nın 30 km kuzeyindeki kestaneliklerde bulunan Avrupa Kestanesi (*C. sativa*) üzerinde tespit edilerek 4 yıl gibi bir sürede bu bölgedeki kestane alanlarının yarısına kadar yayıldığı bildirilmiştir (Biraghi, 1950). Hastalık Amerika’da olduğu gibi bu bölgede de hızla komşu ülkelere yayılarak batıdan doğuya doğru ilerlemiştir. İspanya’da 1947 yılında, İsviçre’de 1948 yılında, Slovenya’da 1950 yılında, Hırvatistan’da 1955 yılında ve Fransa’da 1956 yılında rapor edilmiştir. Takip eden

yıllarda hastalık diğer ülkelere de yayılarak 1968 yılında da Türkiye’de görülmüştür (Robin ve Heiniger, 2001; Akdoğan ve Erkman, 1968).

Günümüzde ise etmen, Asya’dan Afrika’ya, Kuzey Amerika’dan Asya’ya kadar birçok kestane üretimi ve kestane yetişen ülkelerde tespit edilmiş ve son yıllarda verime önemli derecede etki etmiştir (Anonim, 2005). Çizelge 1.3’de dünyada önemli kestane üreticisi ülkelerin 1993 ve 2013 yıllarındaki kestane üretim miktarları verilmiştir. Buna göre tüm ülkelerde kestane üretiminde ciddi azalmaların olduğu görülmektedir. Ülkemizde de kestane üretiminin yıllara göre azalmasındaki en önemli nedenin *Cryphonectria parasitica*’nın neden olduğu kestane kanseri hastalığı olduğu düşünülmektedir (Soylu, 2004).

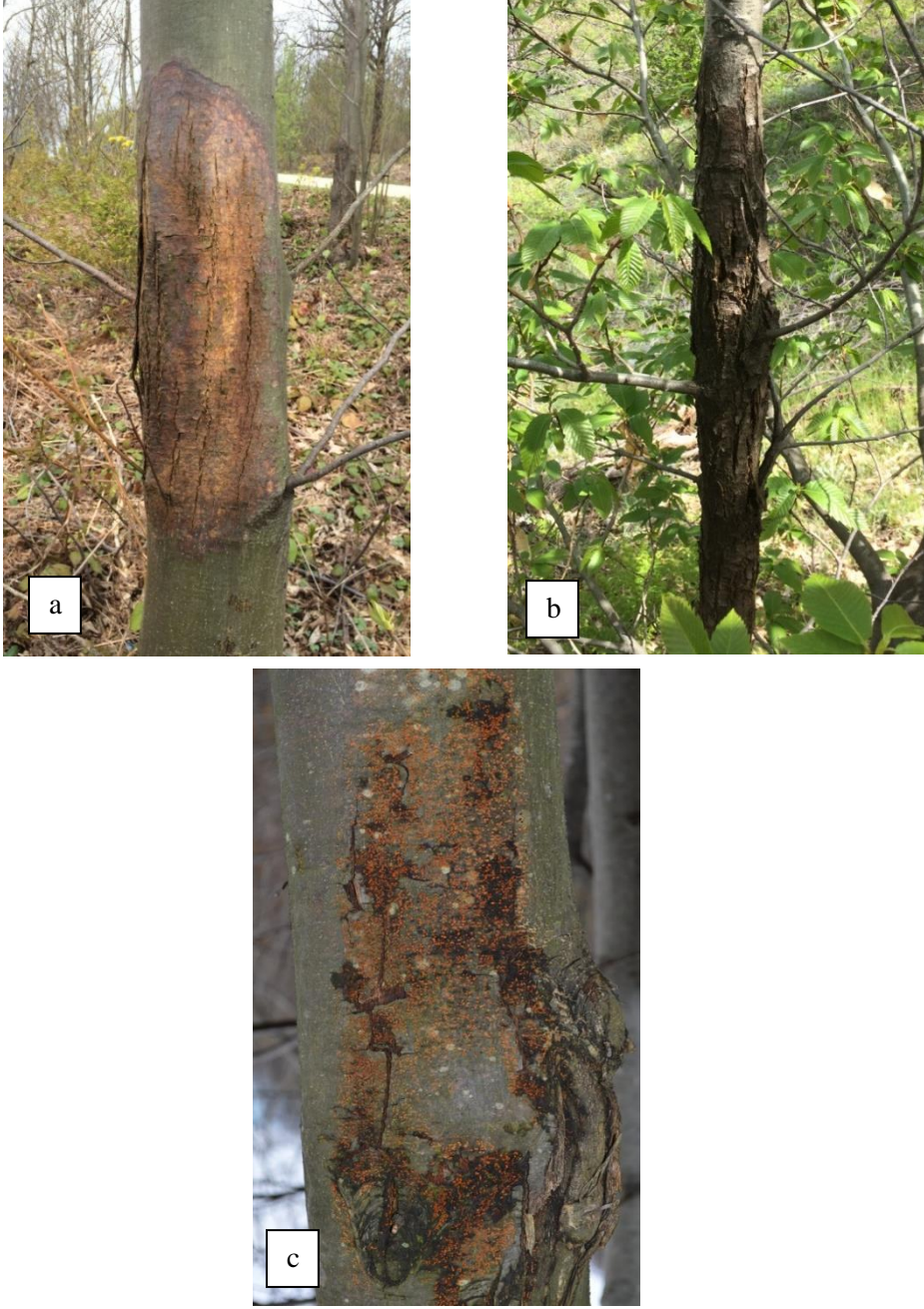
Çizelge 1.3. Dünyada önemli kestane üreticisi ülkelerin 1993 ve 2013 yıllarındaki kestane üretim miktarları (üretim/ton) (Anonim, 2013)

Ülkeler	1993	2013
İtalya	67722	49459
Kore	80994	67902
İspanya	23847	17200
Türkiye	80000	60019

Ülkemizde ilk kez Marmara Bölgesi’nde saptanan hastalık, 1967 yılında görülmüştür (Akdoğan ve Erkman, 1968). Daha sonra patojen Batı Karadeniz’e doğru yayılarak; Kocaeli, İstanbul, Sakarya ve Bolu’daki kestaneliklerde kurumalara neden olmuştur (Delen, 1975). Hastalık Karadeniz Bölgesi’ndeki kestaneliklere yayılırken 1994 yılında Balıkesir’de de rapor edilmiştir (Coşkun ve Kural, 1994). Bu yıldan itibaren Ege Bölgesinde de görülen kestane kanseri Çanakkale, Manisa, İzmir ve Kütahya illerinden (Çeliker, 2000) sonra son olarak kestane üretiminin en çok yapıldığı yer olan Aydın’da tespit edilmiştir (Erincik vd., 2003).

Etmen ağaca bulaştığından itibaren belli bir inkubasyon süresinden sonra dal, sürgün ve gövdede belirtiler görülmeye başlar. İlk belirtiler, özellikle genç sürgünlerin ve ince dalların üzerinde kabuk dokusu kendi rengini kaybederek turuncu, sarı ve kırmızimsı kahve renkte nekrozlar oluşturularak meydana gelir

(Anonim, 2005) (Şekil 1.1a). Etmenin salgıladığı toksinler yüzünden kambiyum dokularındaki hücreler ölmeye başlar (Delen, 1979; McCarrol ve Thor, 1985). Kambiyumdaki bu hücre ölümleri kısa sürede artıp etmen hızlı bir şekilde gelişirse kabuk üzerinde çökelmeler başlar. Aynı şekilde etmen daha yavaş şekilde gelişirse kabuk dokusunun altından yeni sağlıklı doku oluşarak, o bölgenin şişkin ve zamanla çatlak görünmesine neden olur (Gravat, 1949) (Şekil 1.1b). Hastalıklı kısımda etmenin kabuk üzerinde oluşturduğu, gözle görülebilen sarı-turuncu veya kırmızımsı renkte, toplu iğne başı büyüklüğündeki ve nemli havalarda içerisinde milyonlarca konidinin bulunduğu turuncu-sarı renkte, kıvrık sirusların geliştiği stromalar da hastalığı teşhisinde önemli rol almaktadır (Şekil 1.1c). Bu stromaların içerisinde etmenin eşeyli üreme yapısı olan peritesyumlar veya eşeysiz üreme yapısı olan konidiler oluşmaktadır (Murrill, 1906'ya atfen Rittenour, 2005). Hastalığın diğer tipik belirtisi ise kabuk dokusu sıyrıldığında odun dokusu ile arasında oluşan fungusun miselyal gelişimidir (Heiniger ve Rigling, 1994). Zamanla kanserli bölgenin üst tarafındaki yapraklar sarımsı kahverenge dönüşerek kurur ve ölür. Kuruyan bu yapraklar genelde dökülmeden kış boyunca ağaç üzerinde kalabilmektedir. Kanserli bölgenin alt tarafındaki yapraklar ise sağlıklı olarak görülebilmektedir ve bu kısımlardan yeni sürgünler gelişmektedir. Her ne kadar yeni sürgünler gelse de belli bir süre sonra etmen yeni sürgünlere de ulaşarak kurumalara neden olur ve ağacın tamamı ölür (Anagnostakis, 1997; Erdin ve Köse, 2003).



Şekil 1.1. Kestane kanseri hastalığının kabuk dokusu üzerinde meydana getirdiği belirtiler: *Cryphonectria parasitica*'nın turuncu, sarı renkte oluşturduğu nekrozlar (a) (Rize, 2016), Kanserli bölgede oluşan çatlaklar (b) (Trabzon, 2016), *Cryphonectria parasitica*'nın kabuk dokusunda oluşturduğu turuncu renkteki stromalar (c) (Artvin, 2016)

Kestane kanserinin görüldüğü ülkelerde hastalık, çok geniş alanlarda tahribatlara yol açmaktadır. Ağaçların kurummasına ve ölmesine neden olan bu hastalığın kimyasal yolla mücadelesi, fungusitlerin gerek kabuk içindeki fungusa yeteri kadar etki göstermemeleri ve gerekse de kestaneliklerin topoğrafik yapısı nedeniyle uygulamalarındaki zorluklar göz önünde bulundurulduğunda pek mümkün görülmemektedir (Delen, 1979; Delen, 1980). Çok tahripkar ve mücadelesi çok sınırlı bir hastalık olması nedeniyle, kestane kanseri iç ve dış karantinaya tabii bir hastalıktır (Anonim, 2005). Karantina uygulamalarının yanısıra, dayanıklı çeşitlerin yetiştirilmesi ve sanitasyon uygulamaları ile hastalık kontrol edilmeye çalışılsa da bugüne kadar yayılmasının önüne etkili bir şekilde geçilememiştir (Jaynes ve Van Alfen, 1977; Burnham, 1981).

Hastalık kontrolü için en etkili yöntem hipovirülenliğin kullanıldığı biyolojik mücadeledir. *C. parasitica*'nın hipovirüent ırkları kullanılarak yapılan biyolojik mücadele İtalya ve Fransa'da başarılı bir şekilde uygulanmış, olumlu sonuçlar alınmıştır (Heiniger ve Rigling, 1994). Hipovirüent ırklar, virüent ırkların aksine enfekte ettiği ağaçlarda kurumaya ve ölümlere neden olmamaktadır. Oluşturduğu çatlaklar daha yüzeysel olup ilerleyen zamanlarda ağaç kallus dokusu oluşturarak bu yara ve çatlakları kendisi kapatabilmektedir. Bu ırkların daha düşük şiddetle enfeksiyon göstermelerinin sebebi sitoplazmalarında bulunan dsRNA virüsleridir. Anastomosis yolu ile hipovirüent ırklarda bulunan dsRNA virüsleri diğer bireylere geçebilmektedir. İki birey arasında geçişin olabilmesi için bireylerin aynı vejetatif uyum grubu içerisinde olması gerekmektedir. Geçiş sonrası oluşan ırklar, yapılarındaki dsRNA virüsleri sayesinde daha düşük şiddetli kanserlere neden olmaktadır. Bu yöntem biyolojik mücadelenin esasını oluşturmaktadır (Anagnostakis ve Jaynes, 1973; Milgroom, 1995; Milgroom ve Cortesi, 2004). Hipovirülenliğin kendiliğinden yayılmasındaki en önemli etken doğada bulunan *C. parasitica* bireylerinin arasındaki vejetatif uyum çeşitliliğidir. Bireyler arasında vejetatif uyumsuzluk olduğu durumlarda iki birey arasında anastomosis gerçekleşmemekte ve bunun sonucu olarakta dsRNA virüsleri aktarılamamaktadır. Avrupa'da tanımlanmış birbiri ile uyuşmayan 74 farklı vejetatif uyum grubunun olduğu göz önünde bulundurulduğunda dsRNA virüslerinin yayılmasının çok da kolay olmadığı görülmektedir (Cortesi ve Milgroom, 1998; Robin vd., 2000). Nitekim, yüksek vejetatif uyum çeşitliliğinin olduğu yerlerde anastomosis oluşma olasılığı düşmekte ve bu da dsRNA'nın

doğada yayılmasını yavaşlatmaktadır (Anagnostakis vd., 1986; Huber ve Fulbright 1994; Liu ve Milgroom 1994).

C. parasitica'nın yayılması hem seksüel hem de aseksüel üreme sonucu oluşan inokulumlarla olabilmektedir (Fullbright, 1999; Milgroom, 1995). Hastalığın yayılmasında inokulumun tipine bağlı olarak başta yağmur ve rüzgar olmak üzere böcekler ve kanserli doku ile temas eden hayvan türleri dahil bir çok faktörün etkili olabildiği bildirilmektedir (Delen, 1975; Sharf ve DePalma, 1981). Aseksüel üreme sonucu oluşan konidiosporlar kanser üzerinde stroma adı verilen yapının üzerinde yapışkan bir madde ile birbirlerine tutunmuş olarak oluşurlar. Yağmurlu havalarda yağmur damlası ile ıslanan yapışkan madde içerisindeki sporlar yağmur damlasına karışır ve yağmur damlasının sıçradığı mesafeler içerisinde sporlar yayılır. Bu nedenle aseksüel üreme sporlarının taşınması ancak kısa mesafelerde olur (Milgroom, 1995). Bu tip yayılmaların olduğu alanlarda hastalıklı ağaçlar birbirine yakın ve küme halinde görünmekte ve hastalığın yıllara göre yayılma hızı yavaş olmaktadır (Campbell ve Madden, 1990). Ancak böyle durum eşeysiz sporların hastalığın epidemiyolojisinde önemini olmadığını göstermez. Nemli ve yağışlı havalarda spor çıkışları olabilir. Bu sporlar aynı bahçe içerisinde birbirine komşu olan ağaçların bulaşmasında son derece etkilidir.

Etmenin eşeyli inokulumu yine kanser üzerinde stromalar içerisinde peritesyum adı verilen yapı içerisinde oluşan askosporlardır. Askosporlar, peritesyumda basınçla dışarı atıldığı için havada serbest kalarak rüzgara karışabilir ve sonrasında rüzgarla uzak mesafeler içerisinde taşınabilirler. Böylesine bir yayılda, hastalıklı ağaçlar tesadüfi olarak dağınık şekilde bulunurlar ve hastalığın yıllara göre yayılması oldukça hızlıdır (Campbell ve Madden, 1990). Nitekim; ABD de hastalığın yılda yaklaşık 40 km hızla yayılmasından seksüel askosporların sorumlu olduğu bildirilmektedir (Fullbright, 1999). Bu haliyle askosporların hastalığın epidemiyolojisinde çok önemli olduğu düşünülebilir. Ancak *C. parasitica* eşeyli üremesini engelleyen bazı faktörler nedeniyle, bir çok coğrafyada etmenin eşeyli üremediği görülmektedir. Bunun nedenlerinden en önemlisi *C. parasitica* heterotallik bir fungus olması, heterokaryon bireyler hariç, tek bir *C. parasitica* bireyinin kendi kendine eşeyli üremesinin mümkün olmamasıdır (Milgroom, 1995; Marra ve Milgroom, 2001). Heterotallik görülen bireylerde eşeyli üremenin olabilmesi için eşey yönünden uyumlu iki bireyin bir araya gelerek eşleşmeleri 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* izolatının arasında eşey uyumu olabilmesi için biri MAT-1 alleleline sahip iken diğèrinin MAT-2 allelini taşıması gerekmektedir. Bu nedenle eşeyli üreme daha çok dünya üzerinde her iki mating tipin karışık olarak bulunduğu populasyonlarda görölmektedir. Bir popülasyonda eşeyli üremenin en iyi göstergelerinden biri MAT-1:MAT-2 oranının 1:1 civarında olmasıdır (Milgroom, 1995).

C. parasitica'nın eşeyli üreyen bir popülasyona sahip olması hastalığın mücadelesinde bazı olumsuzlukların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu hususlardan bazıları aşağıda belirtilmiştir.

1-Eşeyli üreme göröldüğü yerlerde, patojen popülasyonunun değışmesinde önemli rol oynamaktadır. *C. parasitica*'da *vc* çeşitliliğinin artmasına neden olan en önemli faktörlerden biri eşeyli üremedir (Cortesi ve Milgroom, 1998; Cortesi vd., 2001). Eşeyli üreme farklı *vc* tiplere sahip bireyler arasında gerçekleştiğinde her iki ebeveynden gelen, vejetatif uyumsuzluğa neden olan vegetative incompatibility (*vic*) genlerin rekombinasyonu yeni *vc* tiplerin ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Tanısı yapılmış 6 farklı *vic* geninin iki farklı allelinin kombinasyonu 64 farklı *vc* tipi meydana getirmektedir (Cortesi ve Milgroom., 1998). İki farklı *vc* tipi aralarında eşeyli olarak eşleştğinde taşıdıkları *vic* gen ve allel sayıları ebeveynlerden farklı yeni *vc* tiplerin sayısında belirleyici olmaktadır. Örneğın Aydın'da yürütölen bir laboratuvar çalışmasında yörede yaygın olarak bulunan EU-1 ve EU-12 *vc* tiplerinin laboratuvar koşullarında çaprazlamasından ebeveynlerden farklı en az 14 yeni *vc* tipin oluştuğı ortaya konmuştur (yayınlanmamış veri). Kuzey Amerika'da ve Avrupa'da etmenin peritesyumlarının bulunduğu ölkelerde *vc* tip çeşitliliğinin yüksek olduğı bildirilmektedir (Milgroom ve Cortesi, 1999).

2-Hipovirölent bireylerde dsRNA'nın etkilerinden biri dişi karakterdeki bireylerde kısırlık yaratması olup eşeyli üremeyi sınırlandırmasıdır. Ayrıca dişilerde eşeyli üremede askospor oluşumu sırasında virüs askosporun sitoplazmasına geçmemekte ve oluşan askosporlar virüsten ari olmaktadırlar. Her ne kadar hypovirüsler dişi bireyde kısırlık yaratsa da birçok durumda hypovirölent izolatların sınırlı sayıda da olsa askospor oluşturduğı görölmüştür (Milgroom, 1995). Bu durum etmenin virüsten ari yeni üstün saldırgan strainlerinin ortaya çıkmasına neden olabilir.

3-Yukarıda bahsedilen olumsuzluklara ek olarak *C. parasitica*'da eşeyli üreme hastalığının epidemisini hızlandırmaktadır. Eşeyli üreme sonucu oluşan askosporlar rüzgarla daha uzak mesafelere taşınabildiğinden hastalığın bölgede hızlı yayılmasına neden olabilmektedirler (Milgroom, 1995). Oysa, çoğunlukla sıçrayan yağmur damlaları ile taşınan eşeysiz konidiosporların hastalığı kısa mesafeler içerisinde yaydığı, bunda hastalığın mücadelesinde avantaj sağladığı bilinmektedir.

Ülkemizde son yıllarda özellikle Karadeniz Bölgesi'nde *C. parasitica*'nın vc tiplerinin arttığı görülmektedir (Akıllı ve ark, 2013). Bu bölgede etmenin peritesyumlarına da tarafımızdan ve diğer araştırmacılar tarafından rastlanmıştır. Ayrıca bu bölgeden alınan örneklerde vc çeşitliliğinin de yüksek olduğu görülmektedir. Ülkemizde herhangi bir bölgede meydana gelecek *C. parasitica*'daki populasyon değişimi, rüzgarla yayılma özelliği olan bir patojen olması nedeniyle diğer kestane bölgelerini de yakından ilgilendirmektedir. Orta, Batı Karadeniz ve Ege Bölgesi'nde vc çeşitliliğinin halen düşük olması bu bölgelerde hipovirüent ırkların kullanılacağı biyolojik mücadele için son derece ideal bir durumdur. Bu durumun korunması için vc tip çeşitliliğinin artmasına neden olabilecek koşulları incelenmesi, değişim gösteren populasyonların takip edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle bu çalışmanın amacını, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde genetik yönden farklı bir populasyon yapısının olduğu düşünülen *Cryphonectria parasitica*'nın vc çeşitliliğinde eşeyli üremenin rolünün araştırılması oluşturmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Genel Tanım

2.1.1. Taksonomi

Kestane kanseri hastalığına neden olan etmen ilk olarak 1906 yılında Murril'in yaptığı çalışmalar sonucunda *Dioportha parasitica* olarak adlandırılmıştır. Daha sonraki yıllarda etmen *Endothia* cinsine transfer edilerek 1912 yılında *Endothia parasitica* (Murr.) And. ve And. olarak isimlendirilmiştir (Shear vd., 1917). Barr ise 1978 yılında yaptığı çalışma sonucunda hastalık etmeni ile *Endothia*'nın farklı familyalardan olduğunu, kestane kanseri etmeninin Valsaceae familyasından; *Endothia*'nın ise Gnomoniacea familyasından olduğunu rapor ederek etmenin cinsi *Cryphonectria* olarak adlandırmıştır (Micales ve Stipes, 1987). Kestane kanseri etmeni *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr, Ascomycota şubesinin Pyrenomycetes sınıfına ait Diaporthales takımının Valsaceae familyasında yer almaktadır.

2.1.2. Morfoloji

Fungus hem eşeyli hem de eşeysiz üreyebilmektedir. Etmen, üreme yapılarını kanserli kabuk dokuları üzerinde oluşan çapları 0,5-4 mm arasında değişen ve yüksekliği ise 2,5 mm ye kadar olabilen stroma adı verilen turuncu renkli fungal dokular içerisinde meydana getirmektedir (Anagnostakis ve Kranz,1987; Milgroom, 1995). Stromaların içinde oluşan piknidiumların içerisinde üzerinde silindirik, oval bazen kıvrık şekilde saydam bölmesiz 2-3 x 1 µm büyüklüğünde konidiler oluşmaktadır (Ellis ve Ellis, 1985). Konidiler olgunlaştıktan sonra nemli koşullarda piknidiumları delerek yapışkan bir akıntı şeklinde dışarı çıkarlar. Kuru havayla temas eden yapışkan madde hızla kuruyarak sirtus adı verilen sarı renkli kıvrık yapılar oluşturur. Eşeyli üremede, stromaların içerisinde 10-20 adet peritesyum meydana gelebilir. Oluşan bu peritesyumlarda içerisinde 32-55 X 7-8,5 µm boyutlarında askuslar yer almaktadır. Her askusun içerisinde de iki sıra halinde 8 adet askospor bulunmaktadır (Mara ve Milgroom, 1999; Fulbright, 1999). Askosporlar 10 x 4 µm büyüklüğünde, iki hücreli, bölmeli ve bölme yerinde büzülme bulunmaktadır.

2.1.3. Hastalığın Yayılması

Kestane Kanseri *C. parasitica*'nın eşeyli ve eşeysiz sporları ile kanserli dokulara temas eden hareket halindeki her türlü canlı (böcekler, kuşlar, kemirgenler ve insan vb.), aşı kalemi ve fidan gibi hastalıklı bulaşık üretim materyali ile yayılmaktadır. Eşeysiz üreme sonucunda yapışkan madde içerisindeki oluşan konidiler, yağışlı havalarda sıçrayan yağmur damllarına bulaşarak rüzgarın da etkisiyle kısa mesafelere dağılarak yayılmaktadırlar (Fulbright, 1999). Eşeyli üremede ise peritesyumlarda oluşan askosporlar dışarı basınçla atılmakta ve havada serbest kalarak başta rüzgar olmak üzere hava hareketleri ile uzak mesafelere taşınabilmektedirler (Milgroom, 1997; Guerin vd., 1999).

Eşeysiz üreme sporu olan konidilerden oluşan yeni bireyler ebeveyn fungusun genetik özelliğini taşıdığı için, bu üreme şekli popülasyonun genetik çeşitliliğinde önemli bir değişiklik meydana getirmemektedir. Çeşitlilik daha çok *C. parasitica*'nın eşeyli üreme gerçekleştirdiği popülasyonlarda meydana gelmektedir. Fakat bu üreme doğada sınırlı olup her coğrafyada meydana gelmeyebilmektedir. Çünkü *C. parasitica* çoğunlukla heterotallik bir fungus olup böyle bir birey kendi kendine eşeyli üreyemez. Heterotallik bireyler MAT geninin allelleri olan MAT-1 ve MAT-2 den sadece birine sahiptir ve eşeyli üreme MAT-1 ve MAT-2 allelerine sahip olan bireyler arasında gerçekleşir. Ayrıca eşeyli üreme genetik yönden farklı iki birey arasında gerçekleşmiş olması durumunda yeni oluşan bireyler genetik yönden ebeveynlerinden farklı olurlar. Bu nedenle eşeyli üremenin olduğu popülasyonlarda genetik çeşitlilik fazladır.

2.1.4. Hastalığın Patolojisi

Etmen bir yara paraziti olduğu için kestane ağaçlarının sürgün, dal ve gövdesinde oluşan doğal açıklıklardan, yaralardan ve kabukta meydana gelen çatlaklardan giriş yaparak hastalığa neden olmaktadır. *C. parasitica* meyve hariç bütün toprak üstü organlarda enfeksiyonlara neden olmaktadır (Jaynes ve DePalma, 1984; Anagnostakis ve Kranz, 1987; Heinigier ve Rigling, 1994). Etmen enfekte olduğu yerlerde uzun süre canlılığını sürdürebilmektedir. Kabuk dokusunda oluşturduğu miseller yaklaşık 10 ay kadar, konidiler 1 yıla kadar ve eşeyli üreme sporu olan askosporlar da yaklaşık 2,5 yıl kadar yaşayabilmektedir. Kanserli bölgedeki kabuk dokusunda misel olarak kışı geçirebilen *C. parasitica*, iklim şartlarına göre bu kısımlarda oluşturduğu stromaların içerisinde piknidium veya peritesyum olarak

da kışlayabilmektedir (Hepting, 1974, Guerin vd., 1999). Askospor çıkışları, kış aylarında iklimin elverişsiz olması nedeniyle kanserli bölgedeki gelişim yavaşladığı için Mart ayından itibaren başlayarak Ekim ayına kadar devam etmekte ve Mayıs ayında ise çıkışlar en üst seviyeye ulaşmaktadır. Sıcak ve kurak hava koşullarının olduğu yaz aylarında etmenin enfekteli olduğu ağaçlarda kanser gelişiminin kış aylarına göre daha fazla gerçekleştiği bildirilmiştir (Guerin ve Robin, 2003).

2.1.5. Hastalığın Mücadelesi

Hastalık tespit edildikten sonra, kısa sürelerde tahribatlara ve kurumalara yol açtığı için ABD'deki ilk teşhisinden itibaren günümüze kadar birçok mücadele yöntemi denenmiş fakat etkili ve pratiğe dayalı bir yöntem bulunamamıştır. Sanitasyon ile mücadele, ilk olarak Murriel tarafından 1906 yılında hastalığın inokulum kaynağı olan hastalıklı dalların budanıp yok edilmesi, kanserli ağaçların kesilerek yakılması yoluyla önerilmiştir (Anagnostakis, 1988). Yapılan uygulamalara rağmen hastalık gene de yayılmaya devam ettiği, sanitasyonun tek başına etkili bir yöntem olmadığı görüldüğü için ABD'de 1911 yılında hastalıkla ilgili karantina yasası yürürlüğe girmiştir. Hastalığın yayılmasını önlemek amacıyla yürürlüğe giren yasa ile kestane alanlarında eradikasyon uygulamalarına başlanılmış ama hastalığın yayılmasına engel olunamamıştır (Anagnostakis, 1982). Avrupa'da da hastalığın görülmesinden sonra benzer uygulamalar yapılmış fakat yayılmasına engel olunamadığı için bir süre sonra bu uygulamalardan vazgeçilmiştir (Pavari, 1949, Rittenour, 2005). Eradikasyon ve sanitasyon yöntemlerinin etkili olmaması üzerine kimyasal yol ile mücadelesi üzerine bazı çalışmalar yapılmıştır. Denemeler kullanılan Bavistin (Carbendazim), Benlate (Benomyl) ve Enovit Süper (Thiophanatemethly) gibi sistemik fungusitler hastalık üzerinde etkili olmasına rağmen, meyve üzerinde bıraktığı kalıntı, virüent ırkların kazandığı dayanıklılık ve hipovirüent ırklar üzerine yapabileceği olumsuz etkiler yüzünden tavsiye edilmemiştir (Delen, 1980).

Hastalığın Avrupa'da görülmesinden yaklaşık 15 yıl sonra yapılan araştırmalarda bazı hastalıklı ağaçların kanser olmalarına rağmen ölmedikleri gözlemlenmiş ve bunun nedenini hastalık yapma özelliğinin düşük olduğu fungus ırkları olduğu ilk kez 1950 yılında rapor edilmiştir (Biraghi, 1950). Fransız mikolog Jayne Grente İtalya'daki yüzeysel kanserli ağaçlardan örnekler alarak kanserli ağaçlara uygulamış ve uygulama yaptığı ağaçlarda kanserin gelişmesinde yavaşlama ve

durma göreerek uyguladığı izolatları hipovirüent tür olarak adlandırmıştır. Uygulama yaptığı ağaçlardan tekrar izolasyon yaptığında ise hipovirüent ırkın çoğaldığını ve anastomis yoluyla virüent ırkların hipovirüent ırklara dönüştüğünü bildirmiştir (Grente, 1965). Hipovirüent ırkların yapılarındaki dsRNA virüsleri anastomosis ile virüent ırklara geçiş sağlayarak dönüştürülen ırkların daha yüzeysel kanser yaptığı ve kanserli dokularda iyileşme yaptığı gözlenmesinden sonra bu alanda çalışmalar artarak kanserin mücadelesinde biyolojik yöntemler üzerinde yoğunlaşmaya başlanmıştır (Van Alfen vd., 1975; Roanne vd., 1986; Anagnostakis, 1988; Fulbright vd., 1988; Bisiach vd., 1988; MacDonald ve Fulbright, 1991; Heiniger ve Rigling, 1994).

Hipovirüent bireylerin yapısındaki dsRNA virüsleri sadece anastomosis yolu ile diğer bireye geçerek yayılabilmektedir. İki birey arasında anastomosis oluşabilmesi için bireylerin aynı vejetatif uyum (vc) grubunda olması gerekmektedir. Bu yüzden hipovirüensliğin yayılmasındaki en önemli etkenlerin başında vejetatif uyum grupları gelmektedir. Bir bölgede vc grup çeşitliliği ne kadar az ise hipovirüensliğin yayılması daha kolay olduğu için hastalıkla savaşım da biyolojik mücadele daha etkili olmaktadır (Anagnostakis, 1986; Liu ve Milgroom, 1994).

Ülkemizde *C. parasitica* üzerine yapılan çalışmalar sonucunda, kestane üretiminde önemli bir yerde olan Ege, Marmara ve Karadeniz Bölgelerindeki kestane alanlarında görülen hastalığın vc grup çeşitliliğinin az olması ve Avrupa izolatlarıyla uyumlu olması, bu bölgelerdeki kestaneliklerde yapılacak olan biyolojik mücadelenin etkili olabileceğini göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalarda ise aynı zamanda hipovirüent ırkların da bölgelerdeki *C. parasitica* popülasyonlarında bulunduğu bildirilmiş (Coskun vd., 1999; Çeliker, 2000; Gürer vd., 2001; Açıkgoz vd., 2004; Çeliker ve Onoğur, 2004) ve kestane kanseri ile biyolojik mücadele için çalışmalar yapılmıştır (Çeliker, 2000).

Biyolojik mücadelenin uygulanması ve hipovirüensliğin yayılmasında *C. parasitica* popülasyonlarındaki vc çeşitliliğinin artmasında eşeyli üremenin önemli olması nedeniyle son yıllarda çeşitli ülkelerde yapılan birçok çalışma ile *C. parasitica*'nın yapısı ve tiplerin yanında mating tipler yönünden de çalışılmaya başlanmıştır. *C. parasitica*'nın mating tiplerin dağılımını, peritesyum oluşumları, hastalık dağılım desenleri üzerinden etmenin eşeyli üremesi konularında çok sayıda çalışma yürütülmüştür. Benzer çalışmalar ülkemizde de yapılmış olup bir

çok bölgenin ve tip ve mating tip durumları ortaya konmuştur. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda sunulmuştur.

2.2. Yurt Dışında Yapılan Çalışmalar

İtalya ve Fransa'dan elde edilen 148 *C. parasitica* izolatu kendi aralarında vejetatif uyum yönünden eşleştirildiğinde 22 farklı vejetatif uyum grubu elde edilirken (Grente, 1981'e atfen Anagnostakis vd., 1986) İsviçre'nin 25 farklı lokasyonundan toplanan 124 izolatin 12 ve grupta toplandığı ortaya konmuş ve neredeyse her 10 izolatin bir ve grubunu temsil edebileceği bildirilmiştir (Bazzigher vd., 1981'e atfen Anagnostakis vd., 1986).

Anagnostakis vd. (1986)'nin ABD'nin Connecticut eyaletinde *C. parasitica*'nın ve grup çeşitliliğini belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada toplam 165 izolatin 67 farklı ve gruba ayrıldığını bildirmişlerdir. Birçok grupta sadece 1 izolat bulunurken, 3 grupta 10'dan fazla izolat yer almıştır. Karşılaştırmak amacıyla İtalya'dan getirdikleri 197 izolatu incelediklerinde 33 farklı ve grup olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre Avrupa'daki ve çeşitliliğin Connecticut'a göre daha düşük olduğu bildirilmiştir.

Bisseger vd., (1997) İsviçre'nin güneyinde yer alan Lumino ve Gnosca bölgelerinden topladıkları 148 *C. parasitica* izolatını incelemişlerdir. Gnosca bölgesinden inceledikleri 62 izolatin 16 ve grubuna ve Lumino bölgesinden inceledikleri 86 izolatin 14 ve grubuna ayrıldığını bildirmişlerdir. Her iki bölgede de olan toplam izolatlardan içerisinden 71 tanesinde görülen 1, 2 ve 3 olarak adlandırılan gruplar baskın olarak bulunmuştur. Mating tip dağılımına bakıldığında Gnosca'da MAT-1 ve MAT-2 oranının 1:1 oranına yakın olduğunu, Lumino'da ise MAT-1 tipinin daha baskın olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Lumino bölgesinde 11 izolatin ve Gnosca bölgesinde 14 izolatin MAT-1 ve MAT-2 allellerinin her ikisini de taşıdığını bildirmişlerdir.

Cortesi vd. (1998)'nin yaptıkları çalışmada 11 İtalyan altpopulasyonundan 20 ve grup tester, 5 İsviçre altpopulasyonundan 26 ve grup tester *C. parasitica* izolatını karşılaştırmışlardır. Toplamda bulunan 31 farklı ve grubundan, 15'inin her iki ülkede de bulunduğunu, 5 İtalyan grubun İsviçre'de bulunmadığını ve 11 İsviçre grubunun da İtalya'da bulunmadığını bildirmişlerdir. Her iki ülkede de peritesyum gözlemlediklerini fakat buldukları bölgelerde ve çeşitliliğin az

olması sebebiyle buralardaki eşeyli üremenin ve çeşitliliğine etkisinin olup olmadığının bilinmediğini rapor etmişlerdir.

Milgroom ve Cortesi (1999) İtalya'nın Teona Bölgesinden 194 izolat ve Amerika Birleşik Devletleri'nin Maryland eyaletinden 57 izolat, Batı Virginia eyaletinden 59 izolat, New York eyaletinden 60 izolat olarak çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda Teona'da 8 farklı ve grup (EU12, EU-10, EU-17, EU-2, EU-14, EU-40) olduğunu, Maryland izolatlarından 23'ünün Avrupa gruplarıyla eşleşirken 3'ünün eşleşmediğini, Batı Virginia izolatlarından 22'sinin Avrupa gruplarıyla eşleşirken, 3'ünün eşleşmediği, New York izolatlarından 20'sinin Avrupa gruplarıyla eşleşirken 14'ünün eşleşmediğini bildirmişlerdir. Ayrıca İtalya'daki kanserli alanlarda fungusun eşeyli üreme yapısı olan peritesyumun %0-86 oranında bulunduğunu, Amerika'da ise %83 oranında bulunduğunu, tek mating tip görülen Zafferana'da peritesyum görülmediğini rapor ederek ve grup çeşitliliğinin bu bölgelerdeki eşeyli üremeden dolayı olabileceğini bildirmişlerdir.

Hoegger vd. (2000)'nin İsviçre'de yaptıkları bir çalışmada dört farklı bölgeden toplanan 143 *C. parasitica* izolatının karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışma sonrasında hastalığın geçmişinin en fazla olduğu Claro bölgesinde 9 ve grubu bulunurken diğer yerlerde ve grup sayısı 1 ve 2 arasında değişmiştir. Her iki eşleşme tipinin de görüldüğü dört lokasyon içerisinde ve grup sayısının 1 ve 2 olduğu güneydeki popülasyonlarda baskın olarak tek eşey tipi, 9 ve grubu bulunan Clora bölgesinde ise dominant bir eşey tipin olmadığı ve bu yüzden eşeyli üremenin bu bölgede önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Tüm izolatlar içerisinde 116'sının MAT-1 allelini, 42'sinin MAT-2 allelini ve 13'ünün hem MAT-1 hem de MAT-2 allellerini taşıdığı rapor edilmiştir.

Sotirovski vd. (2004) Makedonya ve Yunanistan'da yapmış oldukları çalışmada Makedonya'dan 786 izolat toplanmış, 5 ve tipine rastlanmıştır (EU-1, EU-2, EU-10, EU-12, EU-22). Ayrıca mating tiplerinin de incelendiği çalışmada 173 izolatın MAT-1, 6 izolatın MAT-2 olarak bulunduğu bildirilmiştir.

Perlerou ve Diamandis (2006) Yunanistan'da yapmış oldukları çalışmada elde ettikleri 627 izolatı inceleyerek, 4 farklı ve tipin (EU-12, EU-2, EU-10 ve EU-1) olduğunu tespit etmişler ve hiçbir izolatta peritesyum gözlemediklerini, bölgede tek mating tipin olabileceğini bu yüzden ve çeşitliliğinin düşük olduğunu

belirterek biyolojik mücadelenin başarılı bir şekilde uygulanabileceğini bildirmişlerdir.

Spica vd. (2006)'nin Güney İtalya'nın Calabria bölgesinden 4 farklı lokasyondan toplanan *C. parasitica* izolatlarının vc grupları belirlemek için yaptıkları çalışma sonucunda bölgede 4 farklı vc grubun (EU-1, EU-2, EU-10 ve EU-12) olduğunu tespit etmişlerdir. 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 bulunmuş olup etmenin bu lokasyonlarda eşeyli ürediği bildirilmiştir.

Bragança vd. (2007)'nin Portekiz'de yaptıkları bir çalışmada Madeira ve Azores adalarındaki alanlarından toplanan 617 izolat incelenmiş, 2 grubu Avrupa izolatıyla eşleşmeyen 9 vc grubu (EU-11, EU-12, EU-66, EU-1, EU-2, EU-28, EU-33) tespit edilmiştir. Mating tiplerine bakıldığında seçtikleri 152 izolattan 67 izolatin MAT-1, 67 izolatinde MAT-2 ve 18 izolatin hem MAT-1 hem MAT-2 olduğu saptanmıştır. Örneklerin tümünde peritesyum bulunma oranı % 31 olarak bulunmuştur.

Krstin vd., (2008)'nin Hırvatistan da yaptıkları bir çalışmada 10 farklı populasyondan topladıkları 338 *C. parasitica* izolatının karakterizasyonunu yapmışlardır. Toplam 204 izolatın eşey tipine bakılarak bütün lokasyonlarda MAT-1 (103 izolat) ve MAT-2 (101 izolat) oranı 1:1'e çok yakın bulunmuş ve kanserlerde peritesyumun varlığı gözlemlenmiştir. Elde ettikleri sonuçlar ile etmenin eşeyli ürediği kanısına varılmış ve 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.

Montenegro vd., (2008)'nin yaptıkları çalışmada İspanya'nın kuzey-batı bölgesinde yer alan A Coruna, Lugo, Ourense, Pontevedra ve Leon'dan toplam 539 izolat elde ederek vc ve eşey tiplerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda vc çeşitliliğinin oldukça düşük olduğu, 2 vc grubun (EU-1 ve EU-66) Avrupa gruplarıyla eşleştiği ve 4 vc grubun eşleşmediği toplamda 6 vc grubun bulunduğu bildirilmiştir. EU-1 grubunun baskın olarak görüldüğü Leon izolatlarının içerisinde tespit edilen hipovirulent izolatların da EU-1 olduğunu bildirerek bölgenin eşey tipine baktıklarında MAT-1 %97 oranında görülmesinin ve vc çeşitliliğinin çok az olması sayesinde biyolojik mücadelenin gelecekte başarılı olabileceğini bildirmişlerdir.

Robin vd., (2009) Fransa'nın batısında ve İspanya'nın kuzeyinde yer alan Pyrenees dağlarında yapmış oldukları çalışmada Hautes Pyrénées, Pyrénées Atlantiques Navarra, Landes ve Dordogne bölgelerinden 682 izolat toplamış, 61 vc grup tespit edilmiş ve 47 izolatın herhangi bir Avrupa vc gruplarıyla eşleşmediğini bildirmişlerdir. Toplamda 43 farklı lokasyondan toplanan izotlardan 280 tanesinin mating tiplerine bakılarak 101 izolatın MAT-1, 151 izolatın MAT-2 ve 28 izolatın da heterokaryon özellik gösterdiğini bildirerek her bölgede dominant vc gruplarında iki eşey tipinin de olduğunu rapor etmişlerdir.

Kristin vd., (2011) yılında *C. parasitica*'nın vc çeşitliliği incelemek için Slovenya'nın 11 farklı popülasyonun 256 izolat toplamışlardır. Yaptıkları çalışmada 15 vc tipi tespit ettiklerini bildirerek her iki eşey tipini ve peristesyum oluşumunu popülasyonlarda gözlemlemişlerdir. Eşey tiplerini belirlemek için seçtikleri 63 izolatın 30 tanesinin MAT-1, 31 tanesinin MAT-2 ve 2 tanesinin hem MAT-1 hem MAT-2 karakterinde olduğunu rapor etmişlerdir.

Zamora vd., (2012)'nin yaptıkları bir çalışmada Batı İspanya'da yer alan Avila, Leon Salamanca ve Zamora Bölgelerinden topladıkları 1232 adet *C. parasitica* izolatını vc ve mating tipleri yönünden incelemişlerdir. Çalışma sonucunda izolatların bir kısmının 5 Avrupa grubuyla (EU-1, EU-11, EU-12 ve EU-66) uyumlu olduğu bulunurken buna ilave olarak 6 vc grubun varlığı saptanmıştır. Ayrıca 591 izolatın eşey tiplerine bakılarak Leon bölgesinde 107 izolatın MAT-1, sadece 1 izolatın MAT-2; Avila bölgesinde 45 izolatın MAT-1; Salamanca bölgesinde 61 izolatın MAT-1, 43 izolatın MAT-2; Zamora bölgesinde 152 izolatın MAT-1, 182 izolatın MAT-2 olduğu rapor edilmiştir.

Mine vd., (2013)'nin yaptıkları bir çalışmada Arnavutluk'taki dört farklı bölgeden 1200 kestane kanserli kabuk örneği toplamışlardır. Bütün örneklerin incelenmesi sonucunda peritesyuma rastlamadıkları için bölgede tek mating tipinin olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca Tropoja ve Tirana bölgelerinde 5 farklı vc grubunun (EU-12, EU-3, EU-1, EU-10 ve EU-2) bulunduğunu, Pogradec (EU-12, EU-3, EU-1 ve EU-2) ve Librazdh (EU-12, EU-3, EU-10 ve EU-2) bölgelerinde ise 4 farklı vc grubunun bulunduğunu, tüm bölgeler içerisinde en yaygın vc tipinin %39 oranında EU-12 olduğunu rapor etmişlerdir.

Prospero vd. (2013)'nin Gürcistan'dan elde ettikleri 427 adet *C. parasitica* izolat üzerinde mikrosatelit markörlar kullanarak popülasyonun genetik yapısını

incelemişler ve sayıları bölgelere göre değişen 100 farklı haplotipin varlığını rapor etmişlerdir. Bunların dışında ve tiplerinde bu haplotipler içerisinde dağılımını da belirlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda *C. parasitica*'da genetik çeşitlilik çok yüksek bulunmuş ve daha önce Avrupa'da bulunmayan bazı haplotiplerin bölgede varlığı saptanmıştır. Genetik çeşitlilik, etmenin yörede eşeyli üremesi ile ilişkilendirilmiştir. Populasyonda üç haplotip en yaygın bulunurken bu haplotiplerden birinde izolatların %79'unun diğerinde ise %94.7'sinin Avrupa ve tester izolatları ile uyumlu olmadığı bildirilmiştir.

2.3. Yurtiçinde Yapılan Çalışmalar

Çeliker ve Onoğur (2001) Ege Bölgesi, Marmara Bölgesi ve Karadeniz Bölgesi'nden topladıkları izolatların ve tiplerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada elde ettikleri toplam 324 izolatı inceleyerek 2 farklı ve tipin (EU-1 ve EU-12) varlığını ortaya koymuşlardır.

Gürer vd. (2001) Marmara Bölgesinden 15, Karadeniz Bölgesinden 9 adet rastgele seçilen izolatların mating tipleri PCR yöntemi ile tespit edilmiştir. Marmara Bölgesinde MAT-1 ve MAT:2 oranı 14:1 olduğu, Karadeniz Bölgesinde ise 6:3 oranında olduğu bildirilmiştir. İki bölgede de tek tip ve grup (EU-1) bulunması ve MAT-1:MAT:2 oranının 1:1 olmaması fungusun bu alanlarda eşeyli üremediği şeklinde değerlendirilmiştir..

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

Akıllı vd., (2009)'nin yaptıkları çalışmada Karadeniz Bölgesinden topladıkları 294 izolatın ve çeşitliliğini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda izolatların 5 farklı ve grubunda (EU-1, EU-12, EU-14, EU-2 ve EU-5) yer aldığını bildirmişlerdir.

Açıkgöz vd., (2009)'nin Aydın ilinden topladıkları *C. parasitica* izolatlarının eşey tipini belirlemek için çalışma yapmışlardır. Toplamda 100 izolatın incelendiği, 2 ve grubun (EU-1 ve EU-12) tespit edildiği çalışmada her iki eşey tipinin de yörede var olduğunu tespit etmişler, MAT-1 için bulunma oranı %52 ve MAT-2 için ise %48 olarak bildirmişlerdir.

Erincik vd. (2011)'nin yaptıkları çalışmada Ege Bölgesi Aydın Dağlarından (Aydın ve İzmir) aldıkları 213 izolatin 2 vc tipi'nde yer aldığını (EU-1 ve EU-12) ortaya koymuşlardır. İzolatların mating tiplerinde araştırıldığı bu çalışmada alınan izolatların % 65' i MAT-1, % 35' i MAT-2 olarak bulunmuş ve bu bulgular ile bölgedeki popülasyonların eşeysiz üreme sonucu oluştuğunu bildirmişlerdir.

Akıllı vd. (2013)'nin Marmara ve Karadeniz Bölgelerinden 420 izolat toplayarak yaptıkları çalışmada, inceledikleri 72 izolattan 3 farklı vc grup (EU-1, EU-12 ve EU-5) tespit etmişlerdir. Eşey tipleri için Karadeniz Bölgesinden 52 izolatu incelediklerini ve MAT-1/MAT-2 oranının 1.79 olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

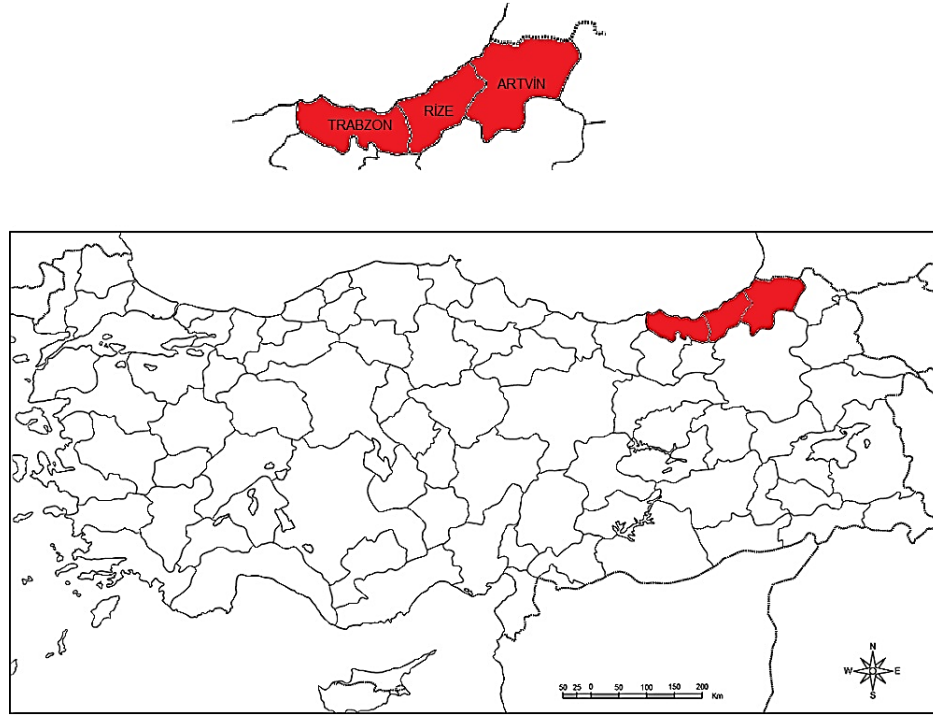
3.1. Materyal

Çalışmanın ana materyalini Doğu Karadeniz Bölgesi illerinden Artvin, Rize ve Trabzon kestane alanlarından elde edilmiş *Cryphonectria parasitica* izolatları oluşturmuştur. Bunun dışında 64 adet vc tester Prof Dr. Paola Cortesi'den (Università degli Studi di Milano, Milan, İtalya) ve 10 adet vc tester Dr. Cecile Robin' den (INRA Bordeaux, Fransa) temin edilmiş ve vejetatif uyum gruplarının belirlenmesinde tester izolatlar olarak kullanılmışlardır. *C. parasitica* izolatlarının laboratuvar koşullarında kültüre alınmasında ise Patates Dextroz Agar besi ortamı kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örnek Toplama

Örnek toplama işlemleri Artvin, Rize ve Trabzon illerinden seçilmiş üç farklı lokasyonda (Çizelge 3.1 ve Şekil 3.1) Haziran 2016'da yapılmıştır. Her lokasyondan 4-5 dekar büyüklüğünde alanlardan örnekleme yapılmıştır. Her bir lokasyonda farklı aralıklarla rastgele seçilen kanserli doku örnekleri alınmıştır. Örneklemenin yapıldığı kanserli ağaçların coğrafik koordinatları GPS ile kayıt altına alınmıştır. Çalışmada kanserli ağaçlardan alınmış toplam 388 kanserli doku örneği toplanmıştır.



Şekil 3.1. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde *Cryphonectria parasitica* örneklemelerinin yapıldığı iller

Çizelge 3.1. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde *Cryphonectria parasitica* örneklemelerinin yapıldığı lokasyonların bulunduğu iller, ilçeler ve köyler

Lokasyon Numarası	İl	İlçe	Köy
Arv1	Artvin	Borçka	Çaylı
Arv2	Artvin	Borçka	Çifteköprü
Arv3	Artvin	Arhavi	Ortacalar
Rze1	Rize	Fındıklı	Yaylacılar
Rze2	Rize	Fındıklı	Doğanay
Rze3	Rize	Güneysu	Kıbledağı
Trb1	Trabzon	Merkez	Kozluca
Trb2	Trabzon	Beşikdüzü	Ambarlı
Trb3	Trabzon	Beşikdüzü	Resüllü

Örneklemelemler kanserli bölgenin kenarı ile bir kısım sağlıklı dokunun da yer aldığı yaklaşık 6x6 cm boyutlarında bir kabuk parçasının kesici bir alet ile alınmasıyla yapılmıştır (Şekil 3.2a). Kanselerde peritesyum varlığı da incelenecek olması nedeniyle alınan örnekler arasında turuncu stroma gelişimi gösteren kanserlerinde olmasına dikkat edilmiştir (Şekil 3.2b). Alınan her bir örneğin coğrafik koordinatları GPS ile kaydedilmiştir. Her bir örnek alma işleminden sonra kullanılan kesici alet sodium hipoklorit ile silinerek yüzeysel olarak dezenfekte edilmiştir (Şekil 3.2c). Alınan örnekler kese kağıtlarına yerleştirilip ve numaralandırıldıktan sonra gün içerisinde buz kutusunda muhafaza edilmiştir. Gün sonunda da kargo aracılığı ile Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümüne gönderilmiştir.

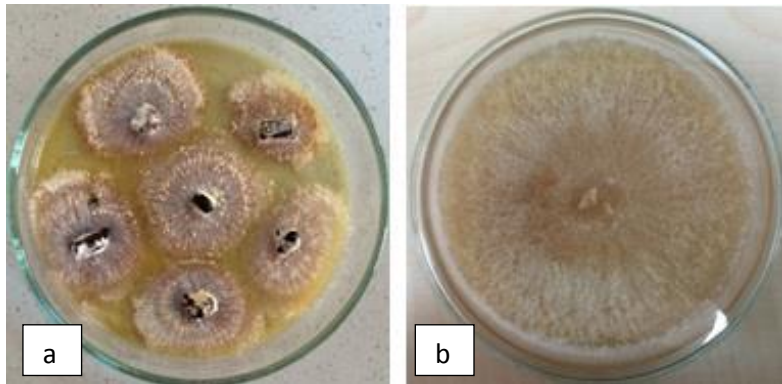


Şekil 3.2. Hastalıklı kestane ağaçlarından örnek alma işlemleri; kestane kanserli doku örneklerinin alınması (a), örnek alınan stromalı bir kanser (b), örnekleme sonrası yapılan kesici alet yüzey dezenfeksiyon işlemi (c)

3.2.2. Örneklerin İncelenmesi ve İzolasyonu

Örnekleme çalışmasının yapıldığı günün sonunda, buz kutusu içerisinde laboratuvara getirilen kestane kanseri kabuk örnekleri izolasyon işlemine kadar +4°C de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Laboratuvarında, ilk olarak örnekler peritesyum oluşumu yönünden makroskobik olarak daha sonra stromalardan alınan kesitler askospor ve askus oluşumu yönünden mikroskobik olarak incelenmiştir.

Daha sonra patojenin izolasyonu işlemlerine geçilmiştir. Bunun için 4 mm lik mantar delici ile kanserli doku parçaları kesilmiş ve sonrasında kesilen parçalar %2'lik sodyum hipoklorit içerisinde 2 dakika bekletilerek yüzeysel olarak sterilize edilmiştir. Daha sonra örnekler steril saf su içerisinde 1 dakika süre ile durulanmış, ardından steril kurutma kağıtları arasında kurutulmuştur. Kurumanın ardından örnekler 9 cm petri kaplarındaki patates dekstroza agar (PDA) besi ortamı üzerine yerleştirilerek 24°C de inkube edilmiştir (Şekil 3.3a). 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 (Şekil 3.3b). Saflaştırılan izolatlar cam tüpler içerisinde eğik agarda geliştirildikten sonra +4 C'de saklamaya alınmıştır.

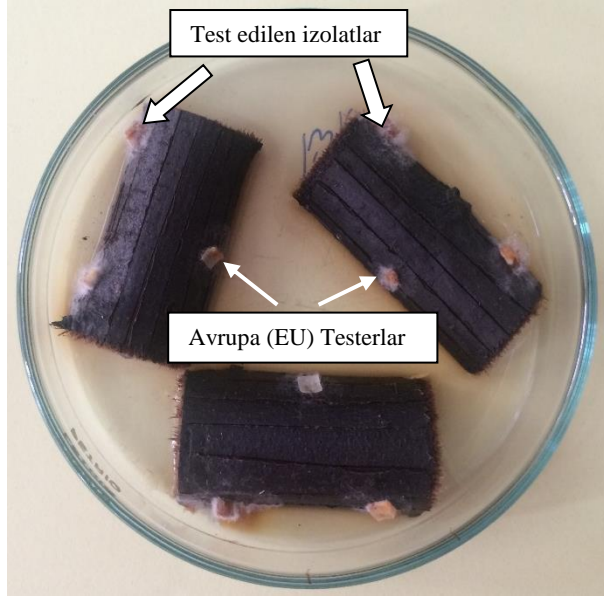


Şekil 3.3. *Cryphonectria parasitica* enfekteli kabuk dokularından alınan örneklerden PDA üzerinde miselyal koloni gelişimi (a) ve saflaştırılmış bir *Cryphonectria parasitica* izolatının PDA da görünümü (b)

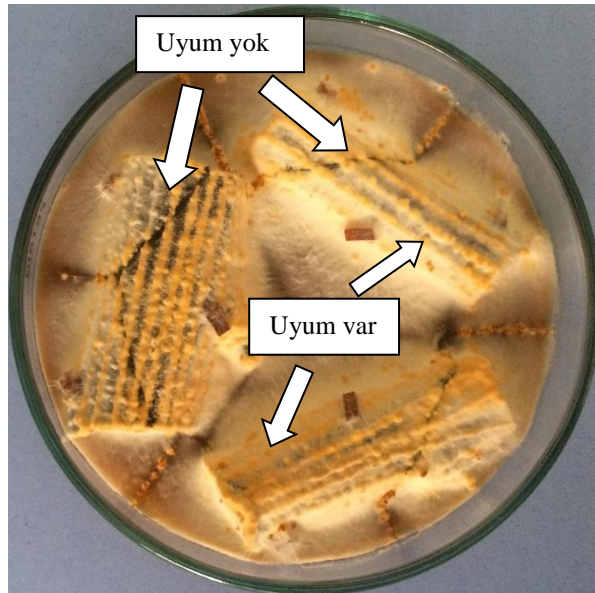
3.2.3. İzolatların Vejetatif Uyum Tiplerinin Araştırılması

İzolasyon ve saflaştırma işlemlerinden sonra elde edilen 344 *C. parasitica* izolatının vejetatif uyum tipleri, Doç. Dr. Ömer Erincik tarafından geliştirilen otoklavlanmış steril kestane odun dokusunun kullanıldığı bir yöntemle 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 6-7 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. Petriler 1-2 gün bekletildikten sonra vc tip belirleme testlerinde kullanılmıştır.

Vc tip belirleme testlerinde, bir dal parçası üzerine, ortaya Avrupa testeri ve her iki uca birer örnek izolat olmak üzere iki farklı izolat yerleştirilmiştir (Şekil 3.4.). Böylelikle; parçaların yerleştirilmiş olduğu her bir petride 6 farklı izolat test edilmiştir. Petriler 25 °C'de bir hafta karanlığı takiben 1 hafta ışık altında inkubasyona bırakılmış, gelişen kolonilerin birleşme veya aralarında bir baraj oluşturma durumuna göre vejetatif olarak uyumlu olup olmadıkları değerlendirilmiştir (Bissegger vd., 1997) (Şekil 3.5.). İzolatlar kolleksiyonumuzda bulunan EU-1 den EU-74' e kadar olan Avrupa tester izolatları ile eşleştirilmiştir. Hiçbir Avrupa testeri ile eşleşmeyen izolatlar kendi aralarında eşleştirilmesi sonrasında aralarında uyum gösterenler yeni uyum tipleri olarak tanımlanmıştır.



Şekil 3.4. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının ve grup belirleme testleri



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

3.2.4. İzolatların Mating Tiplerinin Belirlenmesi

Herbir lokasyonun yaklaşık %50'sini temsil edecek şekilde seçilen toplam 179 izolatan mating tipleri belirlenmiştir. İzolatların mating tiplerini belirlemede amplifikasyon ürünleri 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 belirlemede kullanılacak izolatlara ait miseller, PDA ortamı üzerine yerleştirilen steril selefondiskler üzerinde geliştirilerek elde edilmiştir (Anagnostakis ve Day, 1979; Allemann vd., 1999). Karanlık koşullarda 24°C'de bir haftalık inkubasyon süresinin ardından selefondiskler üzerinde gelişen kolonilerden yaklaşık 3 cm² boyutlarındaki misel kitlesi steril kürdan ile alınarak 1,5 ml'lik santrifü tüplere yerleştirilmiş ve -20°C'ye kaldırılmıştır.

Marra ve Milgroom, (2001)'e göre DNA izolasyonu yapılmış olan her bir izolatan tüpleri -20°C'den çıkarıldıktan sonra içerlerine 1 ml lysis buffer ilave edilip birer dakika vorteks işlemine alınmıştır. Bu işlemden sonra tüpler inkubasyon için 15 dk boyunca 65°C'ye bırakılmıştır. Inkubasyon sürecinden sonra bütün tüpler vorteks ile yaklaşık 1 dk karıştırılmıştır. Karıştırılan tüpler santrifüj aletine yerleştirilerek 5 dk süresince +4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra tüplerde oluşan süpernatant kısımlardan pipet ile 1ml alınarak steril yeni tüplere konulmuştur. Süpernatant konulan her bir yeni tüpe 200 µl 7,5 M amonyum asetat (NH₄OAc) ilave edilerek 10 sn vorteks ile karıştırıldıktan sonra 3 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra tüplerde oluşan 800 µl'lik süpernatant kısımlar pipetler ile alınarak yeni tüplere konulmuştur. Hazırlanan her bir yeni tüpe 700 µl isopropanol ilave edilmiştir. Tüpler, ilave edilen isopropanol ile süpernatantın karışması için 20 defa alt üst edilerek çalkalanmıştır. Ardından 5 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj sonrasında tüplerde sadece pellet kalacak şekilde süpernatant kısım dökülmüştür. Tüpte kalan pellet, %70'lik etanol ile ard arda 2 kez yıkanmıştır. Her bir tüp ağzı açık şekilde 10 dk süresinde steril kabin içerisinde kurumaya bırakıldıktan sonra içerlerine 40 µl steril saf su ilave edilerek -20°C'ye kaldırılarak PCR'da kullanılmak üzere saklanmıştır.

PCR da kullanılacak master karışım; 1xPCR buffer, 200 µM dNTP, 0,2 µM (herbir primerden), 0,75 units Taq Polymerase ve saf sudan 29 µl olacak şekilde karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım içersine 2 µl kalıp DNA ilave

edilerek, thermal cyclus içersine 30 döngülük çoğaltılmaya bırakılmıştır (Mara ve Milgroom, 2001). Multiplex PCR’da mating tipleri belirlemeye yönelik kullanılan primerler aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. *Cryphonectria parasitica* izolatlarının mating tiplerinin belirlenmesinde kullanılan primerler (Mara ve Milgroom, 2001).

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

PCR sonucunda elde edilmiş olan DNA parçaları %1 lik agaroz jel elektroforezde 80 volt elektrik akımında 30 dk yürütüldükten sonra, jel; UV ışık altında jel görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. Elde edilen görüntü ile bandların büyüklükleri üzerinden değerlendirmeler yapılmıştır. MAT-1’in tanısı 1.649 kb, MAT-2’nin tanısı ise 594 bp band büyüklükleri esas alınarak yapılmıştır (Mara ve Milgroom, 1999).

3.2.5. Kanserli Dokularda Peritesyum Varlığının Belirlenmesi

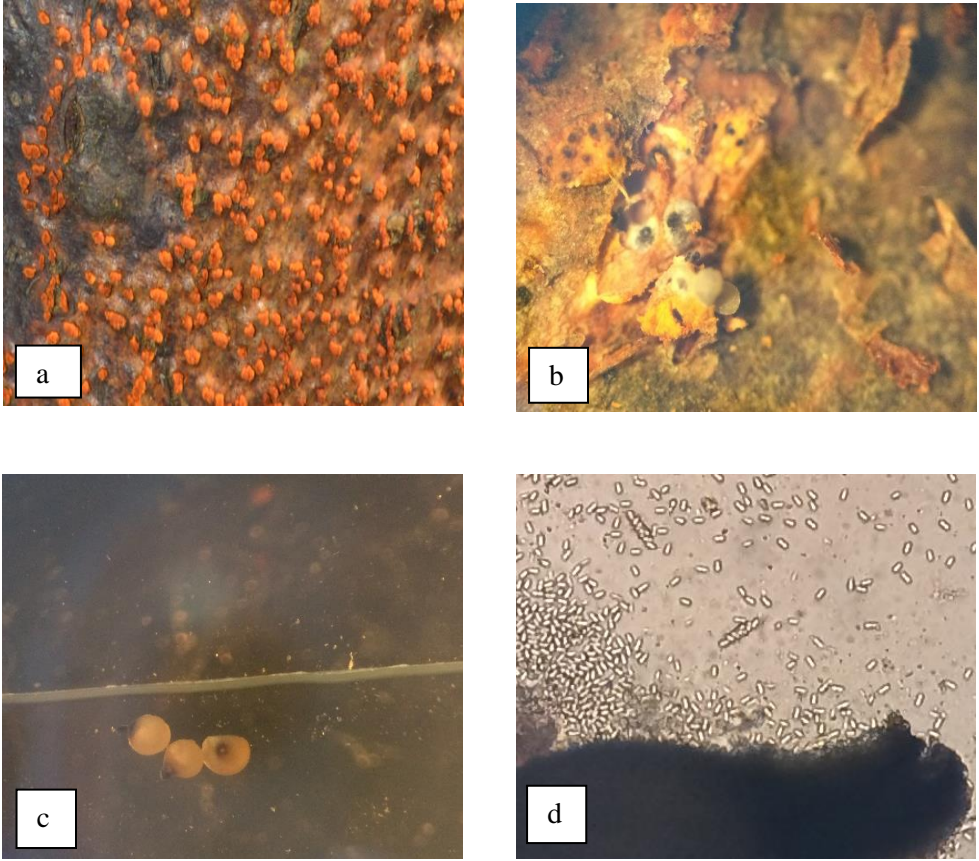
Toplam 388 izolatin stromaları peritesyum oluşumu yönünden stereo mikroskop altında mikroskopik olarak incelenmiştir. Peritesyum tanısı için stromalardan bistüri aracılığıyla kesitler alınmış ve bu kesitler içerisinde peritesyum varlığı araştırılmıştır. Peritesyum varlığı saptanan örnekler tek askospor çalışmalarında kullanmak amacıyla +4 °C de saklamaya alınmıştır.

3.2.6. Tek Askospor İzolatlarının Elde Edilmesi ve Vc Tiplerinin Belirlenmesi

Peritesyum oluşumu gözlemlenen kanser örnekleri arasından farklı lokasyonları temsil edecek toplam 27 kanserli doku seçilmiştir. Peritesyumlar, steril bistüri ve iğne yardımıyla stereo mikroskop altında stroma içerisinden çıkarılmıştır. Ardından peritesyumlar konidi ile bulaşık olma ihtimali düşünülerek konidilerden

arındırılmak amacıyla steril saf su içerisinde 5-6 kez durulanmıştır. Yıkamanın ardından peritesyumlar tekrar steril temiz saf su içerisine alınmış ve kanser başına tek bir peritesyum patlatılarak askosporların suya karışması sağlanmıştır (Şekil 3.6.). Elde edilen askospor süspansiyonu gerektiği kadar seyreltikten sonra, steril pipet ile PDA üzerine petri başına yaklaşık 50 askospor olacak şekilde aktarılmış ve steril cam baget ile homojen bir şekilde yayılmıştır. Petriler 1-2 günlük inkübasyon süresinin ardından mikroskop altında incelenmiştir. Çimlenme görülen askosporlar teker teker öze yardımıyla alınmış ve içerisinde PDA bulunan petrilere aktararak tek askospor izolatları elde edilmiştir. Kanser başına bir peritesyum, ve her bir peritesyumdan en az 25 olacak şekilde 25-53 arasında değişen tek askospor izolatlar elde edilmiştir.

Elde edilen tüm tek askospor izolatlar daha önce aynı örnekten izole edilmiş ebeveyn olarak kabul edilen orijinal izolat ile vejetatif olarak uyumlu olup olmaması yönünden yukarıda kısım 3.2.3’de sözü edilen yöntem kullanılarak ve testine tabi tutulmuşlardır. Ebeveyn izolat ile vejetatif uyum göstermeyen izolatlar, eşeyli üreme sonucu oluşmuş rekombinant izolatlar olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.6. *Cryphonectria parasitica*'nın kestane kabuk dokusu üzerinde oluşturduğu stromalar (a), stromadan çıkarılmış peritesyumlar (b), peritesyumların suda durulanması (c), peritesyumun patlatılmasıyla ortaya çıkan askus ve askosporlar (d)

4. BULGULAR

4.1. Örnek Toplama ve İzolasyon İşlemleri

Çalışma kapsamında arazi çalışmaları sonrasında toplanmış toplam 388 kanserli doku örneğinden yapılan izolasyon işlemleri sonrasında 344 *Cryphonectria parasitica* izolatu elde edilmiştir. Bu izolatların illere göre dağılımına bakıldığında; Artvin ili Arv1 lokasyonundan 41 izolat Arv2 lokasyonundan 37 izolat Arv3 lokasyonundan 41 izolat elde edilmiştir. Rize ili Rze1 lokasyonundan 38 izolat, Rze2 lokasyonundan 39 izolat ve Rze3 lokasyonundan 39 izolat elde edilmiştir. Trabzon ili Trb1 lokasyonundan 37 izolat, Trb2 lokasyonundan 32 izolat ve Trb3 lokasyonundan 40 izolat elde edilmiştir (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Artvin, Rize ve Trabzon illerindeki kanserli kestane ağaçlarından alınan örnek ve elde edilen *Cryphonectria parasitica* izolat sayıları

İl/lokasyon	Toplanan örnek sayısı	Elde edilen izolat sayısı
Artvin		
Arv1	43	41
Arv2	42	37
Arv3	43	41
Toplam	128	120
Rize		
Rze1	43	38
Rze2	44	39
Rze3	45	39
Toplam	132	116
Trabzon		
Trb1	42	37
Trb2	43	32
Trb3	43	40
Toplam	128	109
Genel Toplam	388	344

4.2. İzolatların Vejetatif Uyum Tipleri

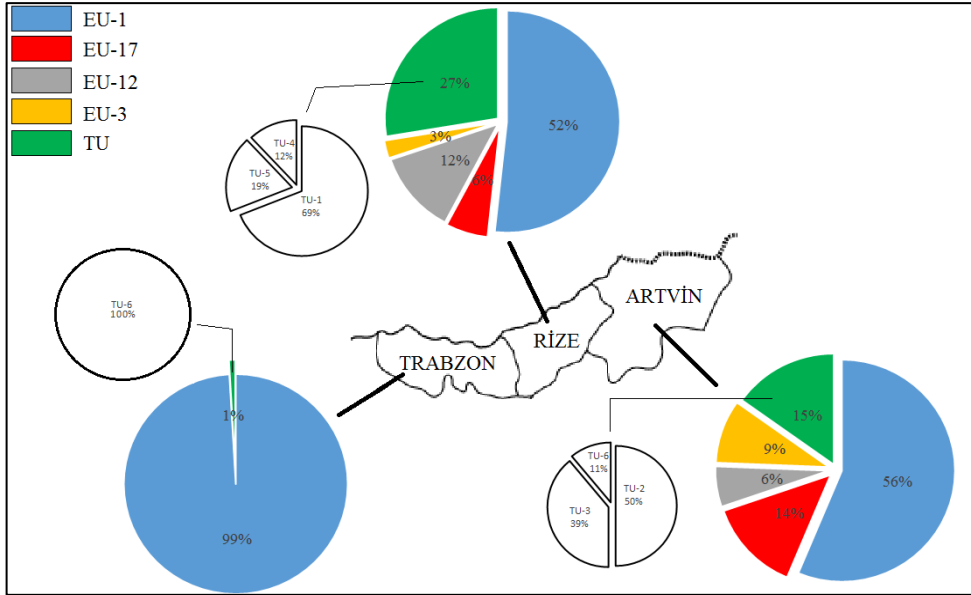
Artvin, Rize ve Trabzon illerindeki kestane alanlarından elde edilmiş olan izolatların vejetatif uyum tipleri Avrupa testereleri ile eşleştirilerek tespit edilmiştir. Toplam 344 izolatın incelendiği çalışmada 10 farklı vc tip bulunmuştur. Bu gruplardan 4 tanesi Avrupa testereleri ile uyumlu (EU-1, EU-3, EU-12, EU-17) olurken 6 tanesi Avrupa testereleri ile eşleşmemiştir. Toplam 344 izolatın 235'i (%68,3) EU-1, 23'ü (%6,7) EU-17, 21'i (%6) EU-12 ve 14'ü (%4) EU-3 ile uyumlu olarak (Çizelge 4.2.) bulunmuştur. Geri kalan 51 izolat (%13) ise Avrupa testereleri ile eşleşmeyerek aralarında 6 farklı grup oluşturmuşlardır (Çizelge 4.2.). Bu grupların isimlendirilmesinde ön ek olarak TU- kullanılmış ve bu eke 1 den 6 ya kadar numaralar verilerek yeni vc gupları isimlendirilmiştir.

Çizelge 4.2. Doğu Karadeniz Bölgesi kestane alanlarından elde edilen *Cryphonectria parasitica* izolatlarının illere göre vejetatif uyum grupları dağılımı

İl/ilçe	N	EU-1	EU-17	EU-12	EU-3	TU-1	TU-2	TU-3	TU-4	TU-5	TU-6
Artvin											
Arv1	41	27	4	1	8	-	1	-	-	-	-
Arv2	37	18	2	3	3	-	4	7	-	-	-
Arv3	41	22	10	3	-	-	4	-	-	-	2
Toplam	119	67	16	7	11	-	9	7	-	-	2
		(19,5) ^y	(4,6)	(2)	(3,2)		(2,6)	(2,0)			(0,6)
Rize											
Rze1	38	14	4	6	3	5	-	-	-	6	-
Rze2	39	16	2	8	-	13	-	-	-	-	-
Rze3	39	30	1	-	-	4	-	-	4	-	-
Toplam	116	60	7	14	3	22	-	-	4	6	-
		(17)	(2)	(4)	(0,8)	(6,4)			(1,2)	(1,7)	
Trabzon											
Trb1	37	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trb2	32	31	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Trb3	40	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam	109	108	-	-	-	-	-	-	-	-	1
		(31,4)									(0,3)

"N" sütunu lokasyon başına incelenen örnek sayısını göstermektedir.

^y:Çizelge genelinde parantez içerisindeki değerler vc gruplarının tüm örnekler içerisindeki bulunma yüzdesini ifade etmektedir.



Şekil 4.1. Trabzon, Rize ve Artvin illerindeki *Cryphonectria parasitica* izolatlarında tespit edilen vc gruplar ve illerdeki bulunma yüzdeleri

Grupların dağılımına bakıldığında EU-1 tipinin en yaygın olduğu yer 108 izolat ile Trabzon ili olmuştur. Trabzon ilinden üç farklı lokasyondan elde edilen 109 izolataın %99'u EU-1 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Sadece Trb2 lokasyonunda Avrupa testerleriyle eşleşmeyen TU-6 gurubunda yer alan yalnız bir izolat saptanmıştır (Çizelge 4.2.).

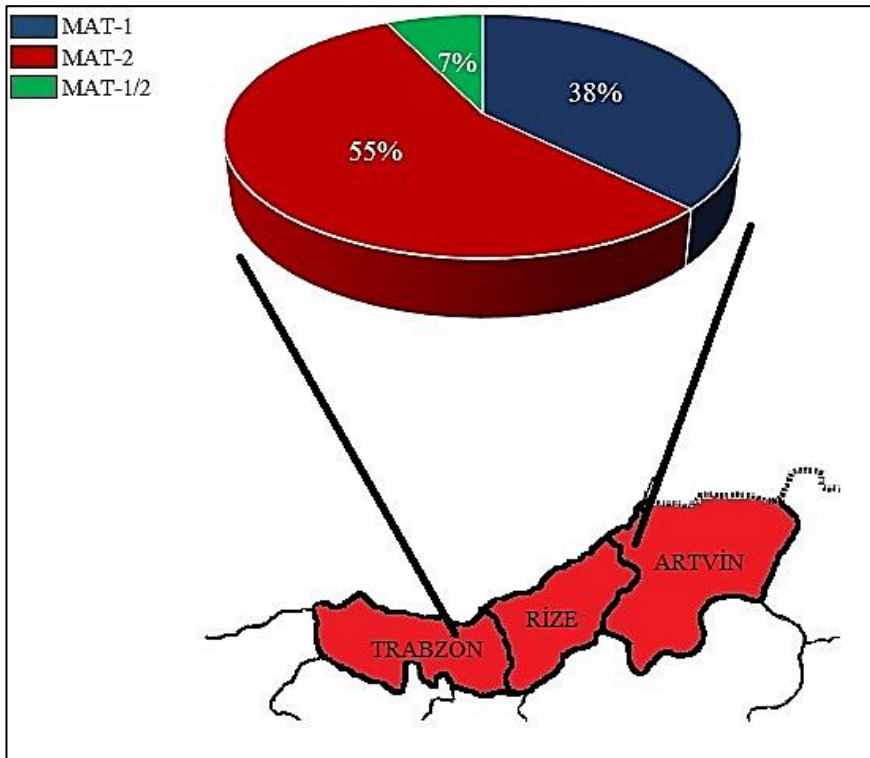
Artvin ilindeki dağılımda test edilen 119 izolattan 67'si (%56) EU-1 ile eşleşerek ilde en baskın bulunan grup olmuştur. İzolatların uyum gösterdiği diğer Avrupa vc grupları ise 16 izolat ile EU-17, 11 ile EU-3 ve 7 ile EU-12 olmuştur. (Çizelge 4.2. ve Şekil 4.1.). Bunun dışında bölgede Avrupa testerları ile eşleşmeyen 3 farklı grubun varlığı tespit edilmiştir. İldeki 3 lokasyonda da tespit edilen TU-2 grubu %2,6 ile Artvin ilinde en çok rastlanılan Avrupa testerları ile eşleşmeyen grup olarak tanılanmıştır. Diğer gruplara bakıldığında TU-3 grubu %2 oranıyla sadece Arv2 lokasyonunda, TU-6 grubu da %0,6 oranıyla sadece Arv3 lokasyonunda tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.).

Rize ilindeki dağılımda ise test edilen 116 izolat içerisinde %51,7 bulunma oranı ile en çok EU-1 grubu tespit edilmiştir. Bunun dışında EU-12, EU-17 ve EU-3 bulunma sıklığı sırasıyla %12, %6 ve %2,5 olarak bulunmuştur. (Şekil 4.1.). Bu grupların dışında Avrupa testerları ile eşleşmeyen 3 farklı vc grubu da bölgede

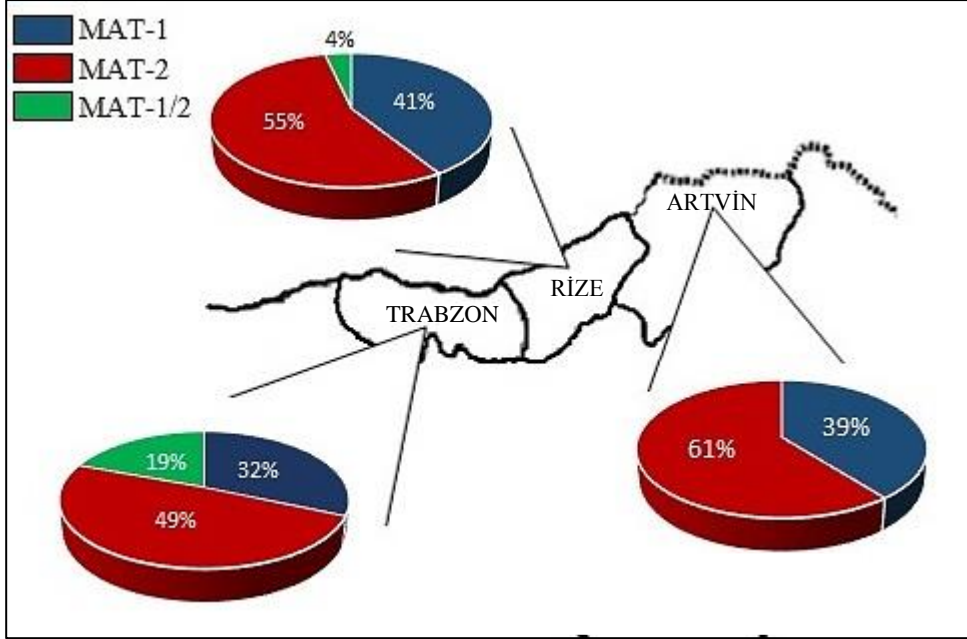
tespit edilmiştir. İlk sırada ilde örnek alınan her üç lokasyonda da bulunan TU-1 grubu 22 (%6,4) izolat ile yer almaktadır. İkinci sırada yer alan %5,2 ile TU-5 grubu sadece Rze1 lokasyonunda, üçüncü sırada yer alan %3,4 ile TU-4 grubu sadece Rze3 lokasyonunda tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.).

4.3. İzolatların Mating Tipleri

Bölgeden elde edilen 344 izolat içerisinde her lokasyonu temsil edecek şekilde seçilen 179 izolata mating tipleri PCR ile belirlenmiştir. Toplamda incelenen 179 izolata 67 (%38) tanesi MAT-1, 99 (%55) tanesi MAT-2 olarak, 13 (%7) tanesi de MAT-1/2 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2.). İllere göre bakıldığında Artvin’de %39 MAT-1, %61 MAT-2; Rize’de %41 MAT-1, %55 MAT-2, %4 MAT-1/2; Trabzon’da %32 MAT-1, %49 MAT-2, %13 MAT-1/2 şeklinde bir dağılımın olduğu görülmektedir (Şekil 4.3.).

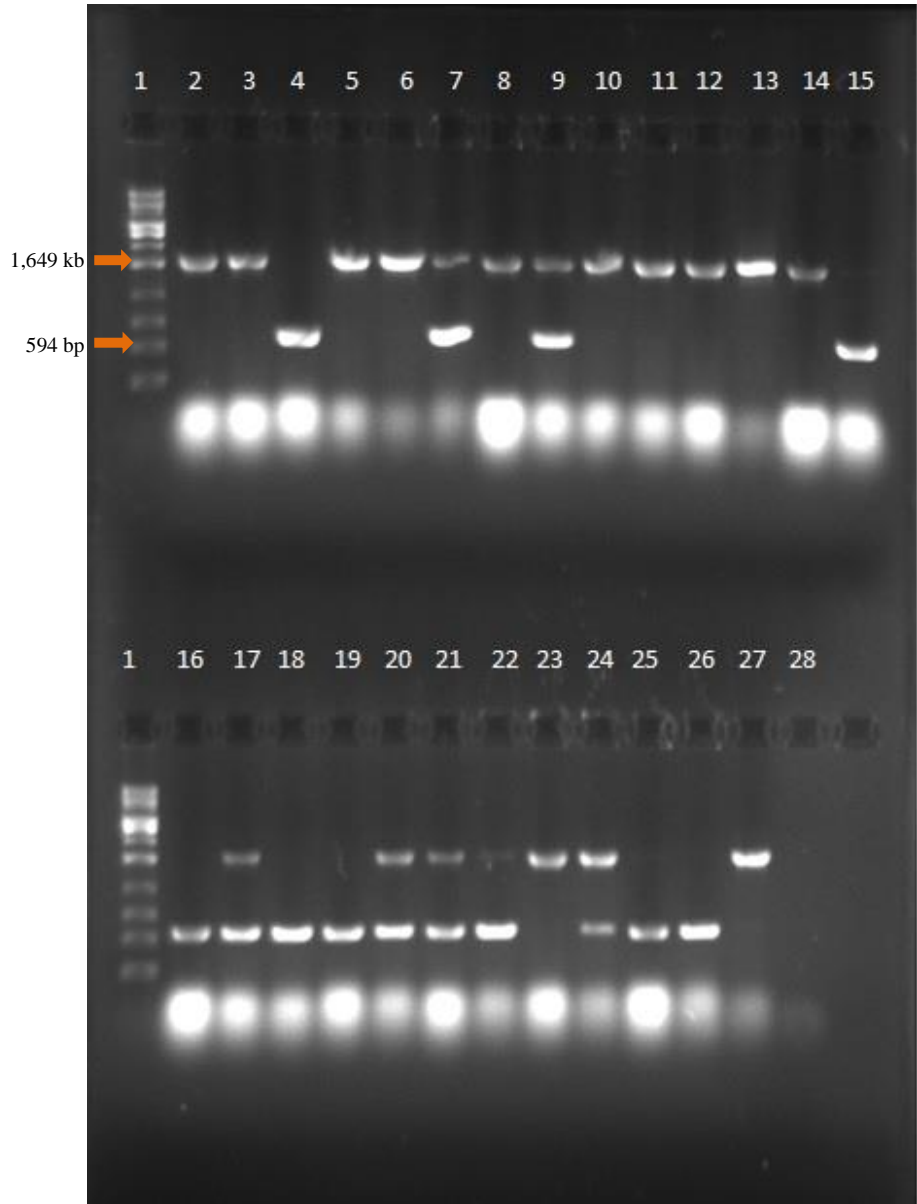


Şekil 4.2. Doğu Karadeniz Bölgesi'nden toplanan *Cryphonectria parasitica* izolatlarında mating tiplerinin tüm bölge düzeyindeki bulunma yüzdeleri



Şekil 4.3. Artvin, Rize ve Trabzon illerindeki *Cryphonectria parasitica*'nın mating tiplerinin bulunma yüzdeleri

Artvin ilinde örnekleme yapılan üç lokasyonda da iki eşey tipi olduğu görülürken Arv1 lokasyonundan 6 izolat MAT-1, 16 izolat MAT-2; Arv2 lokasyonundan 11 izolat MAT-1, 11 izolat MAT-2; Arv3 lokasyonundan 9 izolat MAT-1, 13 izolat MAT-2 olmak üzere Artvin ilinden incelenen toplam 66 izolattan 26 tanesi MAT-1, 40 tanesi MAT-2 olarak bulunmuştur. İlde incelenen Arv2 lokasyonunda MAT-1:MAT-2 oranı 11:11 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.3.).



Şekil 4.4. *Cryphonectria parasitica* izolatlarından elde edilen PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerinde üzerindeki elektroforez görüntüsü (1: Ladder, 26: MAT-2 pozitif kontrol, 27: MAT-1 pozitif kontrol, 28: Su, 1,649 kb: MAT-1 tanısı, 594 bp: MAT-2 tanısı, MAT-1: 2, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 23 nolu izolatlar, MAT-2: 4, 15, 16, 18, 19, 22, 25 nolu izolatlar; MAT-1/2: 7, 9, 17, 20, 21, 24 nolu izolatlar)

Rize ilindeki örnekler incelendiğinde üç lokasyonda da iki eşey tipi bulunduğu tespit edilmiştir. Toplamda 56 izolattın incelendiği Rize ilinde 23 izolat MAT-1, 31 izolat MAT-2, 3 izolat MAT-1/2 olarak tespit edilmiş, Rze1 ve Rze2 lokasyonlarında MAT-2, Rze3 lokasyonunda MAT-1 daha baskın bulunmuştur (Çizelge 4.3.).

Toplam 57 izolattın incelendiği Trabzon ilinde 18 izolat MAT-1, 28 izolat MAT-2 olarak tespit edilmiştir. Örnekleme yapılan bölgelere bakıldığında Trb1 lokasyonundan 19 izolattın 8'i MAT-1, 8'i MAT-2, 3'ü MAT-1/2; Trb2 lokasyonundan 20 izolattın 3'ü MAT-1, 14'ü MAT-2, 3'ü MAT-1/2; Trb3 lokasyonundan 18 izolattın 7'si MAT-1, 6'sı MAT-2, 5'i MAT-1/2 olduğu görülmektedir (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Artvin, Rize ve Trabzon illerinden elde edilen *Cryphonectria parasitica* izolatlarının mating tiplere göre sayısal dağılımları

İl/lokasyon	N	MAT-1	MAT-2	MAT-1 / 2	MAT-1:MAT-2
Artvin					
Arv1	22	6	16		6:16
Arv2	22	11	11		11:11
Arv3	22	9	13		9:13
Toplam	66	26	40		26:40
Rize					
Rze1	18	5	12	1	5:12
Rze2	22	6	15	1	6:15
Rze3	16	12	4		12:4
Toplam	56	23	31	2	23:31
Trabzon					
Trb1	19	8	8	3	8:8
Trb2	20	3	14	3	3:14
Trb3	18	7	6	5	7:6
Toplam	57	18	28	11	18:28
Genel Toplam	179	67	99	13	67:99

"N" sütunu lokasyon başına incelenen örnek sayısını göstermektedir.

4.4. Kanserli Dokularda Peritesyum Varlığı

İncelenen bölge genelinde peritesyum oluşumu yönünden mikroskopik olarak incelenen toplam 388 izolatın 130'unda peritesyumların varlığı tespit edilmiştir. Sonuçlara göre üç ilin incelenen tüm lokasyonlarında peritesyum varlığına rastlanmıştır. En fazla peritesyumlu örneğe Artvin'de rastlanmıştır. Bu ilde incelenen 128 örneğin 63'ünde (%49,2) peritesyum bulunmuştur. Rize ilinde ise incelenen 132 örnekten 32'sinde (%24,2), Trabzon ilinde 128 örnekten 35'inde (%27,3) peritesyum varlığına rastlanmıştır. Bu bulgular *C. parasitica*'nın tüm illerde eşeyli ürediğinin en önemli kanıtı olarak kabul edilebilir (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Artvin, Rize ve Trabzon illerinden elde edilen *Cryphonectria parasitica* ile enfekteli örneklerde peritesyum bulunma oranları

İl/lokasyon	N	Peritesyum bulunan örnek sayısı	Peritesyum bulunmayan örnek sayısı
Artvin			
Arv1	43	27	16
Arv2	42	14	28
Arv3	43	22	21
Toplam	128	63 (%49,2) ^y	65
Rize			
Rze1	43	18	25
Rze2	44	12	32
Rze3	45	2	43
Toplam	132	32 (%24,2)	100
Trabzon			
Trb1	42	6	36
Trb2	43	17	26
Trb3	43	12	31
Toplam	128	35 (%27,3)	93
Genel Toplam	388	130 (%33,5)	258

"N" sütunu lokasyon başına incelenen örnek sayısını göstermektedir.

^y :Çizelge genelinde parantez içerisindeki değerler peritesyum bulunma yüzdesini ifade etmektedir.

4.5. Tek Askospor İzolatlarda Vejetatif Uyumu

Peritesyum varlığı tespit edilen kanserler arasından toplam 27 örnekte tek askospor izolat eldesi çalışmaları yürütülmüş ve 21 peritesyum örneğinde başarılı bir şekilde tek askospor izolatlar elde edilmiştir. Geri kalan 6 örnekte ise peritesyum gözlemlenmesine rağmen peritesyumlarda askospor bulunamadığı için izolat elde etmek mümkün olmamıştır. Peritesyum başına 25-53 arasında değişen sayıda ve toplamda da 583 adet tek askospor izolat çalışmada kullanılmıştır. Artvin ilinde 9 peritesyumdan 8'inde ebeveyn izolattan farklı ve tipinde tek askospor izolatlar elde edilmiştir. Bu peritesyumlarda ebeveyn izolat ile vejetatif uyum göstermeyen izolat sayısı 13 ile 40 arasında değişmiştir. Rize ilinde ise 6 peritesyumun tümünde ebeveyn izolat ile uyum göstermeyen izolatlar elde edilmiştir ve her bir peritesyumdan elde edilen uyumsuz izolat sayısı 14-26 arasında değişmiştir. Trabzon ilinde ise incelenen 6 peritesyumun hiç birinden ebeveyn izolattan farklı uyum grubunda bir izolata rastlanmamıştır (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Artvin, Rize ve Trabzon illerinden toplanan kestane kanser örneklerden elde edilen tek askospor izolat sayıları ve bu izolatların vejetatif uyumu

İl/lokasyon	İzolat no	<i>N</i>	Ebeveyn ile uyumlu (EU-1) izolat sayısı	Ebeveyn ile uyumsuz izolat sayısı
Artvin				
Arv1	Arv1-7	27	9	18
	Arv1-15	24	24	-
	Arv1-35	53	13	40
Arv2	Arv2-49	35	17	18
	Arv2-72	24	8	16
	Arv2-75	34	6	28
Arv3	Arv3-109	43	8	35
	Arv3-124	40	12	28
	Arv3-127	30	17	13
Toplam	9 izolat	310	116	208
Rize				
Rze1	Rze1-135	41	15	26
	Rze1-145	27	11	16
	Rze1-177	28	6	22
Rze2	Rze2-187	29	8	21
	Rze2-190	26	9	27
	Rze2-203	25	11	14
Toplam	6 izolat	176	60	126
Trabzon				
Trb1	Trb1-301	29	29	-
	Trb1-304	29	29	-
Trb2	Trb2-332	29	29	-
	Trb2-336	29	29	-
	Trb2-345	29	29	-
Trb3	Trb3-396	29	29	-
Toplam	6 izolat	174	174	-
Genel Toplam	21 izolat	660	338	322

"*N*" sütünü, incelenen izolat sayılarını göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmanın sonuçları Karadeniz Bölgesi'nde *C. parasitica*'nın vejetatif uyum tip çeşitliliğinin artmakta olduğunu göstermiştir. Yürütülen ve testleri sunucunda bölgede dördü Avrupa uyum tiplerinden (EU-1, EU-12, EU-17 ve EU-3) olmak üzere 10 farklı ve tipinin var olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez bu denli bir ve tipi çeşitliliği bulunmuştur. Daha önce Karadeniz Bölgesinin tümünü içine alan bir çalışmada da çalışmamızda saptanan ve tiplerden farklı olarak 3 Avrupa ve tipinin (EU-14, EU-2 ve EU-5) de varlığı ortaya konmuştur (Akıllı vd., 2009). Tüm çalışmalardan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde Karadeniz Bölgesi'nde en az 13 farklı ve tipin varlığı tespit edilmiş olmaktadır

Ülkemizde daha önce yapılan çalışmalarda dominant ve tip olarak rapor edilen EU-1 (Çeliker ve Onoğur, 2001; Gürer vd., 2001; Erincik vd., 2008; Akıllı vd., 2009), bu çalışma ile de Doğu Karadeniz Bölgesi'nde baskın olarak saptanmıştır. EU-1'in ülke genelinde bu denli yaygın olması; *C. parasitica*'nın ülkemizdeki popülasyonunun, EU-12 ve tipinin yüksek oranda dominant olarak bulunduğu Türkiye'ye batıdan komşu olan Yunanistan, Bulgaristan, Makedonya, Slovakia ve Romanya gibi Akdeniz ve Doğu Avrupa ülkelerindeki popülasyonlardan farklı kılmaktadır. (Sotirovski vd., 2004; Diamandis ve Perlerou, 2006; Adamçikova, vd., 2006; Milgroom vd., 2008). EU-1 ve tipi İtalya, Fransa, İsviçre ve İspanya gibi Orta ve Batı Avrupa ülkelerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Robin ve Heiniger, 2001). Çalışmamızda, Artvin ve Rize illerinde EU-1 dışında EU-12, EU-17 ve EU-3'de bulunmuştur. Bunlardan EU-12; % 6'lık (21 izolat) bulunma oranı ile ülkemizde yaygın olarak Ege Bölgesi'nden sonra Doğu Karadeniz Bölgesi'nde de saptanmış olmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda EU-12 nin Ege Bölgesi'nde İzmir ilinde bulunma oranı %70 olarak bildirilirken (Erincik vd., 2011) Karadeniz Bölgesi'nde sadece 2 izolatın EU-12 olduğu rapor edilmiştir (Akıllı vd., 2009). EU-17 ve EU-3'nin ülkemizdeki varlığı ilk defa bu çalışma ile tespit edilmiştir. Bu iki ve tipin bölgeye yurtdışından girmiş olma ihtimali vardır. Ancak; Doğu Karadeniz Bölgesine sınırı olan Gürcistan'da bu iki ve tipin varlığı konusunda bir bilgi bulunmamaktadır. Bunun dışında bu iki ve tip *C. parasitica*'nın eşeyli üremesi sonucu *vic* genlerinin rekombinasyonu sonucu da oluşmuş olabilir. Nitekim, Cortesi ve Milgroom (1998)'a göre hem EU-17 hem de EU-3 EU-1 ile EU-12'nin çaprazlanması ile oluşacak eşeyli üremeden meydana gelebilecek 14 ve tip arasında yer almaktadır.

Çalışmada Avrupa vc testerları ile uyum sağlamayan 51 izolat kendi aralarında 6 farklı yeni uyum grubu oluşturmuşlardır. Yurt dışında yapılan çalışmalarda İspanya, Fransa ve Portekiz’de EU-1 den EU-64 de kadar adlandırılmış 64 adet Avrupa uyum grubu testerları ile uyumlu olmayan diğer vc tiplerinin varlığı bildirilmiştir (Trestic vd., 2001; Bragança vd., 2007; Liu ve Milgroom, 2007; Montenegro vd., 2008; Cortesi ve Milgroom 1998), *C. parasitica*’da vejetatif uyumsuzluğun her biri iki allele sahip en az 6 adet *vic* geni tarafından yönetildiğini bildirerek toplam 64 vc tipinin olduğunu belirtmişlerdir. Ancak gerek Çin’de gerekse de Avrupa’da yapılan çalışmalarda 64 vc tipinden daha fazla sayıda vc tipin varlığı ortaya konmuştur (Trestic vd., 2001; Bragança vd., 2007; Liu and Milgroom, 2007; Montenegro vd., 2008). Son zamanlarda ülkemizin Doğu Karadeniz Bölgesi sınırında bulunan Gürcistan’da yapılan bir çalışmada ise Avrupa uyum grupları ile eşleşmeyen vc tiplerin olduğu bildirilmiştir (Prospero vd., 2013). Çalışmamızda Avrupa uyum grupları ile eşleşmeyen vc tiplerin Gürcistan’a komşu olan Artvin ve Rize’de saptanmış olması bu vc tiplerin kaynağının Gürcistan olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmanın bir diğer aşamasında ise *C. parasitica*’nın mating tipleri araştırılarak etmenin bölgede eşeyli üreme potansiyeli araştırılmıştır. Çalışma, her iki eşey tipinin (MAT-1 ve MAT-2) bölgede var olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum bölgede *C. parasitica*’nın eşeyli üreme potansiyelinin olduğunu göstermektedir. Ancak MAT-1 ve MAT-2’nin varlığı populasyon içerisinde her zaman eşeyli üremenin var olduğunu göstermemektedir. Nitekim Aydın da yapılan bir çalışmada bir çok lokasyonda hem MAT-1 hem de MAT-2’nin varlığı tespit edilmiş ancak etmenin eşeyli ürediğini gösteren diğer bulgulara rastlanmamıştır (Erincik vd., 2011). Bu çalışmada MAT-1 ve MAT-2 oranı’nın birçok lokasyonda 1:1’e yakın olması da eşeyli üremenin bölgede oluştuğunu dolaylı olarak gösteren delillerden biri olarak kabul edilebilir. Ancak; etmenin eşeyli ürediğini doğrudan gösteren delillerden en önemlisi eşeyli üreme yapısı olan peritesyumların varlığının bulunmasıdır. Nitekim, çalışmamızda bölgeden toplanan kanserlerin neredeyse yarıya yakınında periyesyum tespit edilmiş ve bölgede *C. parasitica*’nın eşeyli ürediği kanıtlanmıştır. Bunun dışında bölgede hem MAT-1 ve hem de MAT-2 allelini taşıyan heyerokaryon bireylere de rastlanmıştır. Söz konusu heyerokaryon bireyler homotallik olup kendi kendini dölleyerek eşeyli olarak çoğalabilme özelliğine sahiptir. Yurt dışında yapılan çalışmalarda da, her iki eşey tipinin birbirine yakın oranlarda bulunduğu bölgelerde etmenin sıklıkla eşeyli ürediği

bildirilmiştir (Hoegger vd., 2000; Spica vd., 2006; Krstin, 2008). Ayrıca Avrupa'da heterokaryon bireylerin varlığı bir çok çalışmada rapor edilirken (Hoegger vd., 2000; Bisseger vd., 1997; Bragança vd., 2007; Kristin vd., 2011) ülkemizde bu durum ilk kez bu çalışmada ortaya konmuştur.

Bölgede cereyan eden eşeyli üremenin, vc çeşitliliğine etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla çalışmada toplam 27 kanser örneğinden elde edilen peritesyumlardan tek askosporlar izole edilmiş ve bu izolatlar vc tipleri yönünden değerlendirilmiştir. Çalışmada, Artvin ve Rize illerinden elde edilen tek askospor izolatlar arasında ebeveyn izolat ile uyumlu olmayan izolatların varlığı saptanmış ve böylece izolatlar arasında vc çeşitliliğinin olduğu ortaya konulmuştur. Bu bulgular, bölgede artan vc çeşitliliğinin nedenlerinden birinin eşeyli üreme olabileceğini göstermiştir. Cortesi ve Milgroom (1998), vc tip çeşitliliğinin oluşumunda iki alleli 6 adet *vic* geninin rol aldığını ve eşeyli üreme sırasında *vic* genlerinin farklı allelik kombinasyonlarının yeni vc tiplerin ortaya çıkmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Nitekim Avrupa'da vc çeşitliliğinin yüksek olduğu ülkelerde etmenin eşeyli ürettiği belirtilmiştir (Milgroom ve Cortesi 1999; Bragança vd., 2007; Krstin vd., 2008; Krstin vd., 2011). Çalışmamızda, Trabzon'dan elde edilen tek askospor izolatlar da ise vc çeşitlilik saptanmamış ve tüm izolatlar ebeveyn izolat ile vejetatif yönden uyumlu bulunmuştur. Nitekim Artvin ve Rize'den elde edilen sonuçlardan farklı olarak, Trabzon ilinde arazi çalışmalarında da dominant olarak tek bir vc tip olan EU-1 bulunmuştur. Bu sonuçlar Artvin ve Rize'de peritesyumlardan elde edilen tek askosporların *vic* genleri yönünden rekombinant olduğu ve bölgede artan vc çeşitliliğinin bir diğer kaynağının *C. parasitica* da meydana gelen eşeyli üreme olabileceğini göstermiştir.

Bölgede *C. parasitica*'da oluşan yeni vc tipler eşeyli üreme sonucu oluşabilecek rüzgarla yayılma özelliğine sahip askosporlar ile uzak mesafelere taşınabilecektir.. Günümüzde Artvin ve Rize illeri içinde sınırlı olan bu vc çeşitlilik gelecekte önce Trabzon iline oradan batıya doğru ilerleyerek diğer illere ve tüm Türkiye'ye kısa sürede yayılabilecektir. Ülkemiz genelinde artacak bu vc çeşitlilik hypovirulent ırkların kullanıldığı biyolojik mücadeleyi olumsuz yönde etkileyebilecektir. Bilindiği üzere *C. parasitica* populasyonlarındaki yüksek vc çeşitliliği biyolojik mücadelenin başarısını önemli oranda düşürmektedir (Rigling ve Heiniger, 1999; Milgroom ve Cortesi, 2004;). Nitekim ABD de biyolojik mücadelenin başarısız olması ülkede etmenin vc tip çeşitliliğinin yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir

(Anagnostakis, 2001). Bu nedenle yeni vc tiplerin oluşmasını ve bunların diğer bölgelere yayılmasını engellemek hastalıkla mücadelede gözönünde bulundurulması gereken hususlardan biridir.

C. parasitica Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Organizasyonu (EPPO)'nun listesinde A2 listesinde yer alan bir karantina patojenidir (Perlerou ve Diamandis, 2006). Ancak günümüzde Kestane Kanseri dünyada bir çok ülkeye yayılmış durumdadır. Buna rağmen etmen karantinada A2 listesinde yer almaya devam etmektedir. Fakat, karantina uygulamalarında tolerans sınırları ülkelerin kendilerine bırakılmıştır. Bir çok bölgesinde *C. parasitica* vc çeşitliliğinin düşük olduğu bilinen ülkemiz kestane kanseri ile biyolojik mücadele açısından son derece avantajlı bir ortama sahiptir. Bu avantajın korunması, hastalıkla mücadelede ön planda turulması gereken en önemli stratejilerden biri olmalıdır. Bu nedenle herhangi bir bölgede oluşmuş olan vc tiplerin diğer bölgelere yayılmasının önüne geçmek için ülkemizde karantina uygulamalarına hastalığın bulaşık olduğu yerlerde dahi hassasiyetle devam edilmelidir.

Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen veriler ülkemizde kestane kanseri hastalığının mücadelesinde kullanılacak stratejilerin belirlenmesinde son derece önem taşımaktadır. Bilindiği üzere Kestane kanseri; kestane ağaçlarını ölümüne yol açması nedeniyle ülkelerin kestane üretimini tehdit eden önemli bir hastalıktır. Hastalıkla mücadele için en etkili yöntem hipovirulent ırkların kullanıldığı biyolojik mücadele olup bu mücadelenin başarısında *C. parasitica*'nın vejetatif uyum grup çeşitliliği önemli rol almaktadır. Vc çeşitliliğinin oluşmasındaki en önemli unsurlardan biri *C. parasitica*'nın eşeyli üremesi sonucu farklı vic genlerinin rekombine olduğu yeni bireylerin meydana gelmesidir. Çalışmamızda *Cryphonectria parasitica* nın Doğu Karadeniz Bölgesinde her üç ilde de (Artvin, Rize ve Trabzon) eşeyli ürettiği tespit edilmiştir. Ayrıca Rize ve Artvin'de vc çeşitliliğin yüksek olduğu ve bu durumun etmenin eşeyli üremesi ile ilgili olduğu da ortaya konmuştur. Trabzonda tek bir vc tipin yüksek oranda dominant olması nedeniyle buradaki eşeyli üreme yeni vc gruplar yaratmamaktadır. Günümüzde vc çeşitliliğin Artvin ve Rize illeri içinde sınırlı bir alanda olduğu görülmektedir. Ancak eşeyli üreme sonucu oluşan askosporların rüzgarla yayılması özelliğinden dolayı bu yeni vc tiplerin uzak mesafelere taşınma riski bulunmaktadır. Ülkemizde gelecekte diğer bölgelerde de vc çeşitliliğin artması durumunda şüphesiz hypovirulent ırkların kullanıldığı biyolojik mücadele olumsuz olarak etkilenecektir. Bu nedenle yeni vc tiplerin oluşmasını engellemek ve Doğu

Karadeniz Bölgesinde oluşan yeni vc tiplerin diğer illere yayılmasının önüne geçmek için karantina uygulamalarının titizlik içerisinde yapılması gerekmektedir. Ayrıca *C. parastica*'nın populasyon yapısının ve vc tip çeşitliliğindeki değişimin özellikle Doğu Karadeniz illeri yanısıra Batı illerinde de takip edilmesi son derece önemlidir.

KAYNAKLAR

- Açıköz, S., Döken, M. T., Erincik, Ö., Degirmenci, N.F., 2004. Aydın yöresinde *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr' in hipovirulent izolatlarının dsRNA analiz yöntemi ile saptanması. **Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri**, Samsun 8-10 Eylül, 255 s.
- Açıköz, S., Döken M.T., Erincik, Ö. ve Değirmenci, N.F., 2009. Determination of mating types of *Cryphonectria parasitica* isolates collected from Aydın Province/Turkey by multiplex PCR. **Acta horticulturae**, 844:367-372.
- Akdoğan, S. ve Erkman, E. 1968. Dikkat kestane kanseri görüldü. **Tomurcuk**, 1:4-5.
- Akıllı, S., Katırcıoğlu, Y. Z., ve Maden, S., 2009. Vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica*, causal agent of chestnut blight, in the Black Sea region of Turkey. **Forest Pathology**, 39, 390–396.
- Akıllı, S., Serçe Ç. U., Katırcıoğlu, Y. Z., Maden, S. ve Rigling, D., 2013. Characterization of hypovirulent isolates of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* from the Marmara and Black Sea regions of Turkey. **Eur J Plant Pathol**, 135:323–334.
- Allemann C., Hoegger P., Heiniger U., Rigling D., 1999. Genetic variation of *Cryphonectria* hypoviruses (CHV1) in Europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. **Molecular Ecology**, 8:843–54
- Anagnostakis, S.L., Jaynes, R.A., 1973. Chestnut blight control: Use of hypovirulent cultures. **Plant Disease Report**, 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. 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.
- Anagnostakis, S. L. 2001. American chestnut sprout survival with biological control of the chestnut-blight fungus population. **Forest Ecology and Management**, 152: 225– 233.
- Anonim, 2005, Eppo. *Cryphonectria parasitica*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35:295– 298.
- Anonim, 2016, [<https://tr.wikipedia.org/wiki/Kestane>] Erişim Tarihi:01.01.2017
- Anonim, 2013, FAO, (Food and Agricultural Organization of the United Nations). <http://apps.fao.org/faostat> Erişim Tarihi:01.01.2017
- Anonim, 2014, TÜİK, Ankara / Erişim Tarihi:01.01.2017
- Bazzigher G., Kanzler E, KublerT. 1981. Irreversible Pathogenitiitsverminderung bei *Endothia parasitica* durch libertragbare Hypovirulenz. **European Journal of Forest Pathology**, II :358-69 19.
- 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: activity report. **Rivista di Patologia Vegetale**, 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.
- Bragança H., Simoes S., Onofre N., Tenreiro R., Rigling, D. 2007. *Cryphonectria parasitica* in Portugal: diversity of vegetative compatibility types, mating types, and occurrence of hypovirulence. **Forest Pathology**, 37:391–402.
- Burnham, C. R., 1987. Historical overview of chestnut breeding in the United States.**The Journal of the American Chestnut Foundation**, 2:6-7.

- Cample, C. L. ve Madden, L. V., 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley & Sons, New York, USA, 532pp.
- 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**, 28:167-176.
- 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. **Phytopathologia Mediterranea**, 38:101-110.
- Çeliker, N. M., 2000. Kestane kanseri (*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr.)'nın hipovirulent ırklarla savasını 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**, 8-10 Eylül 2004, 255 s, Samsun.
- Delen, N., 1975. Distribution and biology of chestnut blight (*Endothia parasitica* (Murrill) Anderson and Anderson). **J. Turkish Phytopath**, 4:93-113.
- Delen, N., 1979. Studies on the control possibilities of chestnut blight (*Endothia parasitica* (Murr.) A. and A.) in Turkey. **J. Turkish Phytopath**, 8:51- 76.
- Delen, N., 1980. Studies on the control possibilities of chestnut blight (*Endothia parasitica* (Murr.) A. and A.) in Turkey. **J. Turkish Phytopath**, 9: 27- 47.

- Ellis, M. B. ve ELLIS, J. B. 1985. *Microfungi on Land Plants*. Croom- Helm, London (GB).
- Erdin, N., ve Köse, C., 2003. *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. ve Hipovirulent Irk. **İ. Ü. Orman Fakültesi Dergisi**, 52:23-40.
- Erincik, Ö., Döken, M. T., Açıköz, S. ve Ertan E., 2003. First Report for Aydın, Turkey: *Cryphonectria parasitica* (Murrill.) Barr threatens the chestnut plantations of Aydın Province. **J. Turkish Phytopath**, Vol.32, No.1, 41-44.
- Erincik, Ö., Döken, M. T., Açıköz, S., ve Ertan, E. 2008. Characterization of *Cryphonectria parasitica* isolates collected from Aydın Province in Turkey. **Phytoparasitica**, 36:249–259.
- Erincik, Ö., Özdemir, Z., Durdu, Ö.F., Döken, M.T. ve Açıköz, 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
- Fulbright, D. W., Paul, C. P., Garrod, S. W., 1988. Hypovirulence: a natural control of chestnut blight. In: *Biocontrol of Plant Disease*. (Mukerji, K. G. and Garg, K. L., Eds.) CRC Pres, pp. 121-138, Boca Raton, FL.
- Fulbright, D. W., 1999. Chestnut blight and hypovirulence. In: *Plant- Microbe Interactions* (Stacey, G. and Keen, N.T., Eds.), APS Pres, pp. 57-79, St Paul, MN.
- Gravatt F., 1949. Chestnut blight in Asia and North America. *Unosylva*. Vol.3, No. 1.
- Grente, J., 1965. Les formes hypovirulentes d'*Endothia parasitica* et les espoires de lutte contre le chancre du chataignier. **Acad Agric**, 52:1033–1036.
- Griffin, J. G., 1986. Chestnut Blight and its Control. **Horticultural Reviews**, 8:291:335.
- 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*. **Forest Pathology**, 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.**, 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: Proceedings of the International Chestnut Conference (Double M. L. and MacDonald W. L., Eds.), West Virginia University Press, pp. 15-19, Morgantown, WV
- Hoegger, P. J., Rigling, D., Holdenrieder, O. ve Heiniger U., 2000. Genetic structure of newly established populations of *Cryphonectria parasitica*. **Mycol. Res.**, 104:1108-1116.
- Jaynes, R.A ve De Palma, N. K., 1984. Natural Infection of Nuts of *Castanea dentata* by *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, 74: 296- 299.
- Jaynes, R.A. ve Van Alfen, N., 1977. Control of the chestnut blight fungus (*Endothia parasitica*) with injected methyl 2 benzimidazolecarbamate. **Plant Dis Rep**, 61:1032-1036.
- 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 Pathology**, 57:1086-1096.
- Krstin, L., Novak-Agaba, S., Rigling, D., ve Curkovic-Percia, M., 2011. Diversity of vegetative compatibility types and mating types of *Cryphonectria parasitica* in Slovenia and occurrence of associated *Cryphonectria hypovirus 1*. **Plant Pathology**, 60:752–761.
- 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. ve Milgroom, M.G., 2007. High diversity of vegetative compatibility types in *Cryphonectria parasitica* in Japan and China. **Mycologia**, 99:279-284.

- MacDonald, W.L. ve Fulbright, D.W., 1991. Biological control of chestnut blight: use and limitations of transmissible hypovirulence. **Plant Disease**, 75:656-661.
- MacDonald, W.L. 1993. Diseases of Chestnut Preceding of The International Congress on Chestnut, October 20-23, Spoleto.
- Mara, R.E. ve Milgroom, M.G., 1999. PCR amplification of the mating type idiomorphs in *Cryphonectria parasitica*. **Molecular Ecology**, 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.
- McCarroll, D.R., ve Thor, E. 1985. Do “toxins” affect pathogenesis by *Endothia parasitica* Physiol. **Plant Pathology**, 26:357-366.
- 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.
- Micalese, J.A. ve Stipes, R.J., 1987. A reexamination of the fungal genera *Cryphonectria* and *Endothia*. **Phytopathology**, 77:650-654.
- Milgroom, M. G., 1995. Population biology of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Canadian Journal of Botany**, 73: 311- 319
- Milgroom, M. G., 1997. Genetic variation and the application of genetic markers for studying plant pathogen populations. **Journal of Plant Pathology**, 78:1-13.
- 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. Phytopathology*, 42:311-338.
- Mine, V., Myteberi, I.F., Lushaj, A.B., Keca, N., Lushaj, A.B. ve Lushaj M.B., 2013. Biocontrol of Chestnut Canker in Albania. **Online International Interdisciplinary Research Journal**, 5:26-41.
- 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**, 5:973-980.

- Pavari, A., 1949. Chestnut blight in Europe. **Unosylva**, 3:8-13.
- 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.
- Prospero, S., Lutz, A., Tavadze, B., Supatashvili, A. ve Rigling, D., 2013. Discovery of a new gene pool and a high genetic diversity of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in Caucasian Georgia. **Infection, Genetics and Evolution**, 20:131-139.
- 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, MN.
- Robin, C., Anziani, C. ve 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
- Robin, C., Capdevielle, X., Martin, M., Traverand, C. ve Colinas, C., 2009. *Cryphonectria parasitica* vegetative compatibility type analysis of populations in south-western France and northern Spain. **Plant Pathology**, 58:527-535.
- Sharf, S.S. ve DePalma, N.K., 1981. Birds and mammals as vectors of the chestnut blight fungus (*Endothia parasitica*). **Canadian Journal of Zoology**, 59: 1647- 1650.
- Shear, C.L., Stevens, N.E. ve Tiller, R.J., 1917. *Endothia parasitica* and related species, **United States Department of Agriculture Bulletin**, 380:82 pp.
- 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.

- Soylu, A., 1997. Ilıman iklim meyveleri-II. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 72, Bursa.
- Soylu, A., 1984. Kestane Yetistirciliği ve Özellikleri. Yalova Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü, No: 59, Yalova
- Soylu, A., 2004. Kestane Yetistirciliği ve Özellikleri. Hasat yayıncılık, Türkiye.
- 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**, 20:45-49.
- Trestic T., Uscuplic M., Colinas C., Rolland G., Giraud A. ve Robin C. 2001. Vegetative compatibility type diversity of *Cryphonectria parasitica* populations in Bosnia-Herzegovina, Spain and France. **Forest Snow Landscape Research**, 76:391-396
- Ülkümen, L., 1973. Bağ Bahçe Ziraatı. Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum.
- 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.
- Westwood, M. N., 1993. Temperate-Zone Pomology, Physiology and Culture. Third Edition. Timber Press, 536 pp, Inc. Portland, Oregon.
- Zamora, P., Martin, J., Rigling, D., ve Diez, J. J. 2012. Diversity of *Cryphonectria parasitica* in western Spain and identification of hypovirus-infected isolates. **Forest Pathology** 45:412-419.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Engin MANGİL

Doğum Yeri Ve Tarihi : KONAK 06.12.1990

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bitki Koruma Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Ens.

Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

A) Bildiriler

- Sözlü Bildiri, Ö. Erincik, S. Açıköz, E. Mangil, S. Hosseinalizadeh, S. Yorgancı, M.T. Döken (2016). Hipovirulent *Cryphonectria parasitica* İzolatlarında *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1)'in Dikey Taşınımı, Uluslararası Katılımlı 6. Bitki Koruma Kongresi, 5-8 Eylül Konya

B) Katıldığı Projeler

- TOVAG 114O403, Bursiyer, Aydın İlinde *Cryphonectria parasitica*'nın Hipovirulent Strainleri Kullanılarak Kestane Kanseri Hastalığı ile Biyolojik Mücadele Olanaklarının Araştırılması ve Uygulanması, 2014 – devam ediyor

İLETİŞİM

E-Posta Adresi : enginmangil@hotmail.com

Tarih :