



Tarım Bilimleri Dergisi

Tar. Bil. Der.

Dergi web sayfası:
www.agri.ankara.edu.tr/dergi

Journal of Agricultural Sciences

Journal homepage:
www.agri.ankara.edu.tr/journal

Türkiye’de Kestane Kanseri ile Biyolojik Mücadelede Ümitvar Bulgular

N. Mükerrer ÇELİKER^a, Ersin ONOĞUR^b

^a Bornova Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü, Gençlik Cad. No 6, 35040, İzmir, TÜRKİYE

^b Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 35100, Bornova, İzmir, TÜRKİYE

ESER BİLGİSİ

Araştırma Makalesi — Bitkisel Üretim

Sorumlu Yazar: N. Mükerrer ÇELİKER, e-posta: nmukerrer@hotmail.com, Tel: +90(232) 388 00 30/113

Geliş tarihi: 17 Haziran 2010, Düzeltmelerin gelişi: 15 Ağustos 2011, Kabul: 19 Ağustos 2011

ÖZET

Bu makalede, Manisa ili Hacısalar köyündeki bir kestanelikte kestane kanseri hastalığının hipovirulent streynlerle biyolojik mücadelesiyle ilgili 2002-2005 yılları verileri ile 2007-2008 yıllarında hipovirulensin doğal yayılım durumunu saptamaya yönelik araştırma sonuçları verilmiştir. İlk etaptaki çalışmada, deneme alanındaki hasta ağaçlardan sadece EU-1 uyum grubuna ve *MATI-1* eşleşme tipine ait virulent izolatlar elde edilmiştir. Ege Bölgesi kestaneliklerinde hipovirulent streyn saptanmadığı için, laboratuvar koşullarında lokal bir virulent izolat Marmara bölgesinden elde edilen hipovirulent izolat yardımıyla yeni bir lokal hipovirulent streyne dönüştürülmüş ve bu streyn HiSF₁ olarak kodlanmıştır. HiSF₁'in EU-1 uyum grubu ve *MATI-1* eşleşme tipine ait olduğu belirlenmiş ve konversiyon testlerinde virulent izolatların tamamını hipovirulent karaktere dönüştürmüştür. Sonraki bölümde, kestanelikteki genç ağaçların üzerinde mevcut kanserlerin boyutları ölçüldükten sonra, bu kanserlerin çevresine HiSF₁'in geliştiği koloni diskleri inokule edilmiş ve aylık dönemlerle kanserli dokudaki boyut değişimleri ölçülmüştür. Sonuçta, HiSF₁ ile inokule edilen kanserlerin çoğunda kallus oluşumuna bağlı küçülme saptanırken, bazılarında aktif kanserlerin yüzeysel iyileşmiş kanser tipine dönüştüğü kaydedilmiştir. Her iki iyileşme belirtisinden hipovirulent streyn tekrar izole edilmiştir. Bu çalışmanın sona ermesinden sonra, deneme sahasındaki kestanelik sürekli olarak gözlem altında tutulmuştur. 2003 yılında yapılan inokulasyondan 4 yıl sonra, 2007-2008 yıllarında, hem önceden inokule edilmiş ve hem de inokule edilmemiş ağaçlarda hipovirulensin doğal yayılımı sonucunda yeni, iyileşmiş kanserlerin varlığı saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: Kestane kanseri; *Cryphonectria parasitica*; Hipovirulent ırk; Doğal yayılım

Promising Results on Biological Control of Chestnut Blight in Turkey

ARTICLE INFO

Research Article — Crop Production

Corresponding author: N. Mükerrer ÇELİKER, e-mail: nmukerrer@hotmail.com, Tel: +90(232) 388 00 30/113

Received: 17 June 2010, Received in revised form: 15 August 2011, Accepted: 19 August 2011

ABSTRACT

In this study, results of studies about the biological control of chestnut canker with hypovirulent strains during 2002-2005 and natural dissemination of hypovirulence in the same chestnut stand during 2007-2008 in Manisa –

Hacıisalar village in Turkey were reported. During the field and laboratory studies only virulent *Cryphonectria parasitica* isolates were obtained from the infected trees belonging to EU-1 vc-group and *MATI-1* mating type. During the conversion tests, hypovirulence could be transmitted to all of these isolates by the local hypovirulent strain coded as HiSF₁, which also belonged to vc type EU-1 and *MATI-1* mating type. Following this result, HiSF₁ was inoculated onto cankered tissues of the infected trees, after measuring the length and width of the tissue and the changes in the dimensions of infected area were measured monthly. It was recorded that most of the active cankers treated with the HiSF were becoming smaller by forming callus tissue and some others were changing from active growing type to healed-superficial cankers. HiSF was re-isolated from both of those healing canker types. After completion of this study, the research area was visited at certain intervals in order to follow the canker development on the trees, and four years after inoculation, in 2007-2008, new healing cankers were recorded on inoculated as well as on non-inoculated trees, indicating that hypovirulence could spread naturally in the chestnut grove.

Keywords: Chestnut blight; *Cryphonectria parasitica*; Hypovirulent strain; Natural dissemination

© Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi

1. Giriş

Kestane (*Castanea sativa* L.), kerestesi ve meyvesi nedeniyle önemli bir ağaçtır. Kestane kanseri (*Cryphonectria parasitica* Murr. Bar.) hastalığı, dünyanın ve Türkiye’nin kestane alanlarında yaygın ve çoğu kez ağaçların tamamen kurumasına neden olan önemli bir sorundur.

Kimyasal yolla mücadelesi mümkün olmayan hastalık, iç ve dış karantina önlemleri ve kültürel uygulamalarla kontrol edilmeye çalışılmakta (Anonymous 2008), ayrıca Avrupa ülkelerinde hipovirulent *C. parasitica* ırkları yardımıyla başarılı bir şekilde biyolojik mücadelesi yapılmaktadır (Heiniger & Rigling 1994). Türkiye’de de bu hedefe varmak üzere, çeşitli araştırmacılar tarafından kestane yetiştiriciliği yapılan Ege, Marmara ve Karadeniz bölgelerinden izolat toplama, izolatların fenotipleri, uyum grupları ve eşleşme tiplerini belirleme, hipovirulenslik aktarımı gibi in vitro çalışmalar yanında (Açıkgöz et al 2007; Akıllı et al 2009; Çeliker & Onoğur 2004, 2007; Coşkun et al 1999; Gürer et al 2001; Döken et al 2007), kontrollü koşullarda kestane fidanları kullanılarak in vivo çalışmalar da yürütülmüştür (Akıllı et al. 2011; Aksoy et al. 2004).

Kestane kanseri hastalığının biyolojik mücadelesiyle ilgili olarak, tarafımızdan yapılan çalışmalarda 1996-2000 yılları arasında Ege ve Marmara bölgelerinden 324 adet virulent izolat toplanmış ve Marmara bölgesinden dsRNA taşıdığı İsviçre Federal Orman Araştırma Enstitüsü tarafından testlenip onaylanmış 7

hipovirulent streyn elde edilmiştir (Çeliker & Onoğur 1998). Kestane fidanlarına virulent ve hipovirulent ırkın birlikte yanyana inokule edilmesi halinde, bu birlikteliğin fidanlarda kanser oluşumunu yavaşlattığı ve zamanla kanserli dokunun iyileştiği gözlenmiştir (Çeliker & Onoğur 2001). Bu çalışmalardan sonra, Türkiye’de doğal koşullarda, kestanelikte, hipovirulens aktarımı yoluyla biyolojik mücadele olanaklarını araştırmak üzere, 2002 – 2005 yılları arasında Manisa ili Hacıisalar köyünde yer alan bir kestanelikte, hastalığın biyolojik mücadelesi yürütülmüştür (Çeliker & Onoğur 2009a). 2007-2008 yılları arasında, aynı kestanelikte hipovirulensin kendiliğinden, doğal yayılma durumu ile ilgili gözlemler değerlendirilmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Deneme alanı, bitkisel ve fungal materyal

Çalışma, Manisanın Hacıisalar köyünde, 3-7 yaşlı 93 ağacın bulunduğu, kestane kanseri hastalığının yanı sıra *Cytospora* kanseri (*Cytospora* sp.) ile *Armillaria* (*Armillaria mellea*) kök çürüklüğü hastalıklarının da sorun olduğu bir kestanelikte yürütülmüştür. 2002 yılı ekim ayında, 93 kestane ağacından 25 adedinin hastalık belirtileri taşıdığı belirlenmiştir. Bu ağaçlar çalışmanın bitkisel materyalini oluşturmuştur.

Fungal materyaller;

a) Vejetatif uyum gruplarını ve eşleşme tiplerini belirlemek üzere, Dr.Ursula Heiniger ve Dr. Daniel Rigling’den (Swiss Federal Institute for Forest Snow and Landscape Research) temin

edilen Avrupa Uyum Grubu izolatları, (EU-1 ve EU-12) ile Avrupa eşleşme tipi (*MATI-1/1297* ve *MATI-2/1115*) izolatları,

b) Lokal hipovirulent streyn, “HiSF₁”,

c) Biyolojik mücadele çalışması yapılmadan önce, 2002 yılında çalışma alanındaki hasta 25 ağaçtan elde edilen ve *in vitro* testlerde kullanılan 25 adet virulent *C. parasitica* izolatı,

d) Hipovirulent streynle 2003 yılında inokule edilen 18 ağaç üzerindeki 29 kanserden elde edilen 102 adet re-izolat.

2.2. Laboratuarda *in vitro* test çalışmaları

Denemenin başlangıcında, 2002 yılı ekim ayında, 93 kestane ağacından 25 adedinin hastalık belirtileri taşıdığı belirlenmiş çalışma alanındaki *C. parasitica* izolatlarının populasyon yapısını (izolatların fenotipi, vejetatif uyum grubu, eşleşme tipi) belirlemek üzere ağaçlardaki her bir kanserin 4 ayrı yönünden 4 mm çaplı mantar delici ile kabuk örnekleri alınmış, örnekler %10'lik sodyum hipoklorit içinde 4 dak. tutulduktan sonra PDA (Patates Dekstroz Agar) besi yerine alınmıştır.

Re-izolasyon işleminde ise, ağaçların hipovirulent streyn ile inokulasyonundan 1 yıl sonra başlamak üzere, iyileşme belirtisi gösteren her bir kanserin yine 4 yönünden, mevsim içinde 1-3 kez kabuk örnekleri toplanmış ve yüzey sterilizasyondan sonra örnekler PDA besi yerine alınmış, elde edilen izolatlar tüplere saflaştırılmıştır.

Fenotip gruplandırma, çalışma alanından elde edilen *C. parasitica* izolatlarının turuncu (virulent) ya da beyaz (hipovirulent) olma durumlarını belirlemek için yapılmıştır. Her bir izolatın sporları steril iğne ile alınmış ve PDA ortamının 6 noktasına inokule edilmiştir. Deneme 2 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Petri kapları önce 7 gün süreyle 25 °C sıcaklıktaki inkubatorde karanlıkta, daha sonra 7 gün süreyle oda sıcaklığında, gün ışığında tutulmuştur (Bissegger et al 1997). Bu testler inokule edilen kanserlerden elde edilen re-izolatlar için de yapılmıştır.

Vejetatif uyum testi için çalışma alanından elde edilen her bir turuncu izolat ile Avrupa Uyum Grubu (EU-1, EU-12) izolatlarının her

birine ait sporlar 0.3-0.4 cm aralıklarla ikişer ikişer PDA ortamına inokule edilmiştir. Yedi ve 12 gün sonra yapılan değerlendirmelerde, iki izolat tek bir koloni olarak geliyorsa “uyum var”, aralarında baraj meydana geliyorsa “uyum yok” olarak kabul edilmiştir (Bissegger et al 1997). Deneme 2 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

Ege bölgesinde hipovirulent ırk saptanmadığı için, lokal virulent izolatlar önceki çalışmada (Çeliker & Onoğur 1998), Marmara Bölgesinden (İzmit- Gölcük ve Karamürsel) izole edilmiş olan hipovirulent streynlerden bir tanesi ile aşağıda açıklandığı şekilde dönüştürülmüş ve böylelikle elde edilen lokal yeni hipovirulent streyn, “HiSF₁”, hem *in vitro* testlerde hem de biyolojik mücadele çalışmasında kullanılmıştır.

Konversiyon testleri, hipovirulent izolatların virulent izolatları dönüştürebilme yeteneklerini belirlemek için yapılmaktadır (Bissegger et al 1997). Bu yöntem uyarınca, 2 farklı gruba ait sporlar, vejetatif uyum grubu testinde olduğu gibi, PDA ortamı üzerinde ikişer ikişer eşleştirilmişler ve yine yukarıda belirtilen koşullarda geliştirilmişlerdir. İki izolat beyaz renkli tek bir koloni halinde geliyorsa bunlar arasında ‘uyum var’ olarak, aralarında baraj oluşuyor ve dönüşüm olmuyorsa ‘uyum yok’ olarak değerlendirmiştir (Bissegger et al 1997).

Dönüştürme yeteneği, kestane ağaçlarında hipovirulent streyn ile inokule edilmiş kanserlerden elde edilen beyaz renkli tüm re-izolatlar için de belirlenmiştir.

Eşleşme tipini belirleme testleri, deneme alanında yeni uyum gruplarının meydana gelme olasılığını ortaya koyabilmek için yürütülmüştür. Bu amaçla, dormant dönemde toplanan 1.5-2 cm çaplı kestane sürgünleri önce boyuna, sonra enine 4 cm uzunluğunda kesilmiş ve otoklavda iki kez arka arkaya 1.5 atmosfer basınç altında 30 dak. süreyle sterilize edilmiştir. Her bir sürgün parçası 60 mm çaplı steril petri kabına yerleştirildikten sonra çevresine %1,5'lik su agar ortamı dökülmüştür (Bissegger et al 1997). Testlerde, deneme alanından toplanan virulent izolatlar, lokal hipovirulent streyn HiSF₁ ve Avrupa eşleşme tipi (*MATI-1*, *MATI-2*) izolatları

kullanılmıştır. Çalışmada, her bir izolatın PDA ortamında geliştirilmiş 7 günlük kültüründen alınan 4 mm büyüklüğündeki agar diskleri kullanılmıştır. Denemeler 2 tekrarlı yürütülmüştür.

Eşleşme tipi testleri turuncu ve beyaz izolatlar için farklı biçimde yürütülmüştür. Turuncu izolatlar için eşleşme testinde, petri kapları içindeki sürgün parçasının bir köşesine eşleşme tipi bilinen izolatlardan bir tanesi, çapraz köşesine ise eşleşme tipi bilinmeyen izolatlardan bir tanesi konmuş ve petri kutuları 14 gün süreyle 25 °C'de 16 saat aydınlatılarak (2.500 lux) spor oluşumu sağlanmıştır. Bu sürenin sonunda petrilere steril saf su konarak spor süspansiyonu elde edilmiştir (Bissegger et al 1997). Bu eşleşme testinde, sürgün parçasının bir köşesine eşleşme tipi bilinen izolatlardan bir tanesi tek başına inokule edilip spor oluşumu sağlanmıştır. Bu sırada, farklı petri kaplarında PDA ortamına inokule edilen hipovirulent izolatlar 25°C de, 10.000 lux ışıkta (yüksek ışık şiddetinde spor oluşturabilmeleri nedeniyle) 14 gün süreyle tutulmuş ve bu sürenin sonunda hazırlanan spor süspansiyonu eşleşme tipi belli olan izolatın geliştiği petri kabına eklenmiştir (Bissegger et al 1997).

Yukarıdaki uygulamalardan sonra petri kapları 18°C'de 8 saat ışıkta (2.500 lux), 16 saat karanlıkta tutulmuştur. Testin 2. ve 4. ayının sonunda dal parçalarının üzerinde eşeyli üreme kriteri olan peritesyum oluşumu yönünden değerlendirilme yapılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak iki eşleşme tipine ait izolatlar birlikte; negatif kontrol olarak ise her bir eşleşme tipine ait izolat ayrı ayrı inokule edilmiştir (Bissegger et al 1997).

2.3. Kestanelikte yürütülen çalışmalar

Çalışma alanında mevcut kestane ağaçlarının tümü numaralanmış ve yerleri alanın krokisi üzerine işaretlenmiştir.

Hipovirulent streynin inokulasyon çalışması 11.6.2003 tarihinde yürütülmüştür. İnokulasyondan 1 gün önce hasta olan tüm ağaçlar üzerindeki kanserlerin sayısı ve kanser boyutları bir şerit metre yardımıyla ölçülerek kaydedilmiştir. Toplam 18 hasta ağaç üzerindeki

29 aktif kanserin her birinin çevresinde, hastalıklı ve sağlıklı kabuk dokusunu kapsayacak şekilde, 2-3 cm aralıklarla 4 mm çaplı mantar delici ile delikler açılmıştır. Bu deliklere PDA ortamında, 26°C'de karanlıkta 7 gün süreyle geliştirilen HiSF₁'in kolonilerinden alınan agar diskleri yerleştirilmiştir. Disklerin kurumaması için deliklerin üstü kağıt bantla kapatılmıştır.

Aynı yılın eylül ve ekim aylarında, deneme alanında yeni oluşan aktif kanserlere de inokulasyon yapılmıştır.

Kanser büyüklüğündeki değişimi saptamak için HiSF₁ ile inokule edilen her bir kanserin eni ve boyu 1.5-2 aylık dönemlerle ölçülmüştür.

İnokulasyondan 1 yıl sonra, inokule edilmeyen ağaçlarda iyileşen karakterde kanser belirtilerinin varlığı kontrol edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. In vitro test bulguları

Deneme alanında hastalık belirtisi taşıyan 25 kestane ağacından elde edilen 25 izolatın fenotipik özellikleri, vejetatif uyum grupları, HiSF₁ kodlu hipovirulent streynin bu izolatları dönüştürme yeteneği hakkında elde edilen bulgular Çizelge 1'de, virulent izolatların ve hipovirulent streynin ait oldukları eşleşme tipleri ise Çizelge 2'de verilmiştir. Sonuç olarak, deneme alanında sadece virulent (turuncu renkli) *C. parasitica* izolatlarının var olduğu, bu izolatların hepsinin Avrupa Uyum Grubu izolatlarından sadece EU-1 ile vejetatif uyumlu olduğu saptanmıştır. Dönüştürme testinde ise, EU-1 uyum grubuna ait olan HiSF₁ 25 virulent izolatın hepsini beyaz forma dönüştürmüş, onlara hipovirulent karakter kazandırmıştır.

Çalışmada kullanılan tüm izolatların ve HiSF₁'in *MAT 1-1* eşleşme tipine ait oldukları belirlenmiştir. Turuncu izolatların tamamı ve HiSF₁, *MAT1-1* ile eşleştirildiklerinde peritesyum oluşmazken, *MAT1-2* ile eşleştirildiklerinde peritesyum meydana gelmiştir. Bu sonuçlar, çalışma alanında yeni uyum gruplarının oluşma olasılığının bulunmadığını göstermektedir. Çünkü eşeyli üreme farklı eşey tipleri (*MAT1-1* ve *MAT1-2*) arasında gerçekleşmektedir (Marra &

Çizelge 1-Deneme alanındaki *C. parasitica* izolatlarının fenotipik özellikleri, vejetatif uyum grupları ve lokal hipovirulent streyn HiSF1'in dönüştürme yeteneği

Table 1-Cultural phenotypes and vegetative compability (v-c) groups of the *C. parasitica* isolates in the research area and conversion ability of the local hypovirulent strain, HiSF1

İzolat sayısı	Fenotip	Vejetatif uyum grubu		Dönüştürme Yeteneği
		EU-1	EU-12	HiSF ₁
25	Turuncu	+	-	+

(+): Pozitif; (-): Negatif

Çizelge 2-Deneme alanındaki *C. parasitica* izolatlarının ve lokal hipovirulent streyn HiSF1'in eşleşme tipleri

Table 2-Mating types of the *C. parasitica* isolates and local hypovirulent strain in the research area

İzolat sayısı	Eşleşme tipi	
	Mat1-1	Mat 1-2
25	-	+
HiSF ₁	-	+

(+): Pozitif; (-): Negatif

Milgroom 2001). Bir bölgede birden fazla sayıda uyum grubunun varlığı biyolojik mücadele çalışmasını oldukça güçleştiren bir özellik olarak kabul edilmektedir. (Heiniger & Rigling 1994). Buna göre, çalışma alanında biyolojik çalışmaların yürütülmesinde patojenin genetik özelliklerinden kaynaklanabilecek bir olumsuzluk ortaya çıkmayacaktır.

3.2. Kestanelikte yürütülen çalışmalarda elde edilen bulgular

3.2.1 Biyolojik mücadele bulguları

Deneme alanındaki 18 ağaç (25 ağaçtan 7'si kurumuştur) üzerindeki toplam 29 kansere 2003 yılında HiSF₁ ile yapılan inokulasyonu takiben kanser boyutlarındaki değişimler, 1.5-2 ay ara ile 2005 yılına kadar yapılan ölçümlerle belirlenmiş ve bulgular Çizelge 3'te verilmiştir. İlk yıl haziran ayı içinde inokule edilen ağaçlardan 8 tanesi (ağaç no:19, 30,33, 36, 76, 79, 91, 93) üzerindeki 10 kanser alanında büyüme olmazken, 2004 yılında, 11 ağaç (ağaç no: 18, X, 36, 53, 56, 73, 76, 79, 86, 91, 93) üzerindeki 13 kanserde iyileşme olmuştur. İnokulasyondan 3 yıl sonra, 6 ağaç (ağaç no: 18, 53, 56, 76, 79, 86) üzerindeki 7 iyileşen kanserin büyüklüğünde değişim olmamış, 7 ağaç (ağaç no: X, 18, 30, 36, 73, 91, 93) üzerindeki 10 kanser alanında büyüme olmuş, 6 ağaç (ağaç no: 9, 13, 17, 19, 33, 54) ise kurumuştur.

Sonuç olarak, 2003 yılında kanser büyüklüklerinde genel olarak artış olmazken, 2004 yılında 8 ağaç üzerindeki 10 kanser iyileşme göstermiş, 2005 yılında 6 ağaç üzerindeki toplam 7 kanserde iyileşmenin devam ettiği saptanmıştır. İnokule edilen kanserlerdeki iyileşmeler hipovirulensliğin aktarılabilmesi nedeniyle meydana gelmiştir. Bazı kanserlerde kallus dokusunun oluşumuna bağlı olarak kanser alanı gittikçe küçülmüş ve patojenin üreme organlarını taşıyan stromalar kaybolmuştur. Bu konuda çalışan diğer araştırmacılar da iyileşme sürecinde kallus dokusu oluşumunun rol oynadığını ifade etmektedirler (Calza 1993). Bazı kanserlerde ise iyileşme, Dunn et al (1992)'in da belirttiği gibi, aktif kanserlerin inokulasyondan sonra, siyahımsı-kahverengiye dönüşmesi, kabukta yüzeysel çatlamların ortaya çıkması, kanserin dokuda derinlemesine yayılmasının durması şeklinde olmuştur.

3.2.2 Hipovirulent streynin doğal koşullardaki adaptasyonu

Çalışmanın ilk yılında HiSF₁ ile inokule edilen ağaçlardan 2004 ve 2005 yıllarında toplam 13 ağaç üzerindeki 20 iyileşen kanserden rezolasyonlar yapılmış ve bu iyileşen kanserlerden beyaz (74 adet) ve turuncu (28 adet) renkli olmak üzere toplam 102 izolat elde edilmiştir.

Çizelge 3-İnokule edilmiş ağaçlar üzerindeki kanserli alanların 2003-2005 yılları arasındaki dönemde gösterdikleri değişim

Table 3-Variation of the canker size on the inoculated trees during the period 2003-2005

Tarih Ağaç no	Kanser Alanları, cm ²							
	10.06.2003 ¹	22.07.2003	02.09.2003	21.10.2003	20.05.2004	06.07.2004	21.9.2004	15.6.2005
9	82.4	82.4	82.4	Kurudu ²	Kurudu	Kurudu	Kurudu	Kurudu
	122	122	122					
13	1374	1374	1403	Kurudu	Kurudu	Kurudu	Kurudu	Kurudu
17	2872	2872	2918	Kurudu	Kurudu	Kurudu	Kurudu	Kurudu
18	-	-	265	265	306	306	103	72
			117	117	137	137	196	196
19	337	337	337	337	Kurudu	Kurudu	Kurudu	Kurudu
	2826	2826	2826	2826				
X	-	-	832	919	942	320	320	333
			577	577	577	582	340	857
			33	33.7	37.1	35	53	
30	628	628	628	628	521	521	608	981
33	239	239	239	239	Kurudu	Kurudu	Kurudu	Kurudu
	31	35	52	58				
	31	31	50	57				
36	110	110	110	110	47	47	44	188
	679	679	679	679	265	265	418	554
			53	53	111	111	117	239
53	-	-	94	94	90	74	64	30
54	594	594	602	602	622	622	898	Kurudu
56	131	131	176	176	251	256	173	173
73	763	763	763	797	797	797	797	809
76	459	459	459	459	459	459	459	163
79	276	276	276	276	276	245	220	220
86	206	206	286	286	297	220	181	169
			53	53	99	96	96	35
				40				
91	91	91	91	91	91	91	91	117
93	176	176	176	176	176	54	44	98

¹İnokulasyon öncesi kanser büyüklüğü

³ Kanser alanı elips formülüne göre hesaplanmıştır

Konversiyon testlerinde, beyaz renkli re-izolatların turuncu izolatları dönüştürme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4).

Bu sonuç, iyileşmenin hipovirulenslik nedeniyle olduğunu bir kez daha göstermekte ve inokulasyondan 2 yıl sonra da bu kanserlerden HİSF₁'in hala geri alınabilmesi, bu streynin doğaya adapte olabildiğine işaret etmektedir.

3.2.3 Hipovirulensin doğada yayılımı

Yapay inokulasyonlar sonucu kanserlerin iyileşmesini sağlayan hipovirulent streynin

araştırma alanında doğal yayılma durumunu belirlemek amacıyla, 2004 yılından başlayarak 2007-2008 dönemine kadar sürdürülen gözlemler yapılmıştır. Çalışma alanında, 2006 yılına kadar yeni, iyileşen kanser meydana gelmezken, inokulasyondan 4 ve 5 yıl sonra, 2007 ve 2008 yıllarında, önceden inokule edilmiş 6 ağaç üzerinde 6 yeni iyileşmiş kanser, inokule edilmemiş 17 ağaç üzerinde ise 22 iyileşmiş kanser olmak üzere, toplam 23 ağaç üzerinde hepsi kallus dokusuna sahip 28 yeni iyileşen kanser meydana geldiği kaydedilmiştir (Çizelge 5). Bu durum çalışmanın önemli bir sonucunu

Çizelge 4-Hipovirulent streyn ile inokule edilmiş kanserlerden elde edilen *C. parasitica* re-izolatlarının fenotipik özellikleri ve beyaz izolatların turuncu izolatları dönüştürme yetenekleri

Table 4-Cultural phenotypes of the C. parasitica re-isolates from cankers inoculated with hypovirulent strain and ability of white isolates to convert orange isolates

İzolot no	Elde edilen <i>C.parasitica</i> reizolatının fenotipik özelliği							
	Kanser;üst	Dönüşüm	Kanser; alt	Dönüşüm	Kanser; sol	Dönüşüm	Kanser;sağ	Dönüşüm
18-1	B	+	B	+	B	+	B	+
18 -2	B,T	+	B	+	B	+	B,T	+
18 -3	B,T	+	B,T	+	B,T	+	B,T	+
X-1			B,T	+	B	+	B	+
X-2	B	+	B	+	B	+	B	+
X-3	B	+	B	+	B	+	B	+
30							B,T	+
36-1			B,T	+	B,T	+	B	+
36-2	B,T	+	B	+	B	+	B,T	+
36-3	B	+	B	+	B	+	B	+
53	B	+	B	+	B	+	B	+
54	B,T	+	B,T	+	B	+	B	+
56	B	+	B	+	B	+	B	+
73	B,T	+	B	+	T	+	B,T	+
76	B	+	B,T	+	B,T	+	B,T	+
79	B	+	B	+	B	+	B,T	+
86-1	B	+	B	+	B,T	+	B,T	+
86-2	B	+	B	+	B	+	B	+
91	B,T	+	B,T	+	B,T	+	B,T	+
93	B	+	B	+	B	+	B,T	+

T:Turuncu; B:Beyaz; (+): Dönüştürme var

Çizelge 5-Doğal yayılım nedeniyle oluşan iyileşmiş kanserlerin durumu

Table 5-Presence of the healed cankers due to the natural dissemination

Yıl	İyileşmiş kanserlerin sayısı			
	İnokule edilen ağaçların üstünde		İnokule edilmemiş ağaçlar üzerinde	
	Ağaç sayısı	İyileşmiş kanser sayısı	Ağaç sayısı	İyileşmiş kanser sayısı
2007	5	5	8	11
2008	1	1	9	11
Toplam	6	6	17	22

oluşturmuş, kestaneliklere inokule edilecek olan hipovirulent streynlerin doğal olarak yayılabileceğine ve böylelikle ülkemizde de hastalığın biyolojik mücadelesinde ümit var sonuçların alınabileceğine dair kuvvetli bir kanaat oluşmasını sağlamıştır.

Deneme alanında, *C. parasitica* dışında, kestane ağaçlarının kurumasına neden olan başka etmenler de saptanmıştır. Bunlardan en önemlisi, bir yara paraziti olan ve ağaçların kabuk dokusunda gelişerek iletim demetlerinin zarar görmesine, ağaçların zaman içinde tamamen

kurumasına neden olan *Cytospora* spp.'dir. Bu etmen genç kestane ağaçlarında (Çeliker & Onoğur 2009b) ve bazı orman ağaçlarında kurumalara neden olmaktadır (Flynn 2003; Elşad 2001). Hipovirulent streyn ile inokule edilen ağaçların çoğundan *Cytospora* sp. izole edilmiştir. Kanımıza göre, iyileşmekte olan bazı kanserlerin boyutlarında büyüme olması, ya da üstünde iyileşen kanser bulunan ağaçların kuruması *Cytospora* sp. nedeniyle olmuştur. Bu durum biyolojik kontrol başarısının sayısal olarak azalmasına yol açmıştır.

Kestane kanserinin biyolojik mücadelesinin başarısında rol oynayan önemli bir faktör de sanitasyon uygulamalarıdır (Heiniger & Rigling 1994). Bu uygulamalar, özellikle doğal olarak hipovirulent ırkın bulunmadığı bir alanda, yapay inokulasyonlar yoluyla hipovirulent ırkın o alana yerleşmesini ve yayılmasını teşvik etmektedir. Ancak çalışmamızda, kuruyan dalların kesilmesi ve imhası gibi sanitasyon uygulamaları yaptırılmadığı için deneme alanındaki ağaçlarda yeni *C. parasitica* ve *Cytospora* sp. enfeksiyonları meydana gelmiştir.

4. Sonuç

Bu çalışma ile Türkiye’de hipovirulens aktarımı yoluyla kestane kanserine yakalanmış ağaçlarda iyileşme olabileceği ilk kez bu araştırmayla ortaya konulmuştur. Bu konuda daha ileri araştırmalar yürütülerek, başarı oranının geliştirilmesinde fayda bulunmaktadır.

Teşekkür

Bu projenin yürütülmesi için maddi destek sağlayan Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM)’ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Açıkgöz S, Döken T, Özdemir Z, Değirmenci F (2007). Determination of mating types of chestnut blight causal agent *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr; by multiplex PCR in Aydın province. *Türkiye 2. Bitki Koruma Kongresi* 27-29 Ağustos 2007 Isparta
- Akıllı S, Katırcıoğlu Y Z & Maden S (2009). Vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica*, causal agent of Chestnut Blight, in the Black Sea Region. Turkey. *Forest Pathology* (39):390- 396
- Akıllı S, Katırcıoğlu Y K& Maden S (2011). Biological control of chestnut canker, caused by *Cryphonectria parasitica*, by antagonistic organisms and hypovirulent isolates. *The Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 35(5):515-523
- Aksoy M, Serdar Ü & Soylu A (2005). Kestane fidanlarında kestane (*Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr karşı yapılan uygulamalar. *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi* 20(1): 24- 29
- Anonymous (2008). *Zirai Mücadele Teknik Talimatları*

- Cilt.4 T.C.Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Ankara
- Bissegger M, Rigling D & Heiniger U (1997). Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* European chestnut forest in the presence of natural hypovirulence. *Phytopathology* 87:50- 59
- Calza C A (1993). Biological control of chestnut blight: large-scale application techniques. *Proceedings of the International Congress on Chestnut*. Spoleto, Italy: 599- 602
- Coşkun H, Turchetti T, Maresi G & Santagana A (1999). Preliminary investigations into *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. isolates from Turkey. *Phytopathology Mediterranea* 38: 101- 110
- Çeliker N M & Onoğur E (1998). Determining the hypovirulence in the isolates of chestnut blight *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr.) in Turkey. ‘First record’ *The Journal of Turkish Phytopathology* 27(2-3): 145- 146
- Çeliker N M & Onoğur E (2001). Evaluation of hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* for biological control of chestnut blight in Turkey. *Forest Snow and Landscape Research* 76(3): 378- 382
- Çeliker N M & 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 1. Bitki Koruma Kongresi* 8-10 Eylül 2004 Samsun
- Çeliker N M & Onoğur E (2007). Kestane kanserinin (*Cryphonectria parasitica* Murr. Barr.) doğal koşullarda biyolojik mücadelesi. *Türkiye 2. Bitki Koruma Kongresi* 27-29 August 2007 Isparta
- Çeliker N M & Onoğur E (2009a). Actual Status of Biological control Studies on Chestnut Blight in Turkey. Actual Status of Biological control Studies on Chestnut Blight in Turkey, Proceedings of the First European Congress on Chestnut Castanea 2009 ISSN 0567-7572 ISBN 978 90 6605 414 2, *Acta Horticulturae* 866: 369- 372
- Çeliker N M & Onoğur E (2009b). Preliminary studies on the fungal disorders especially on ink disease causing decline of chestnut trees in Turkey. International Workshop on Chestnut Management in Mediterranean Countries: Problems and Prospects 23–25 October 2007 Bursa, Turkey. ISBN 978 90 6605 178 2. *Acta Horticulturae* 815: 227-232
- Döken M T, Açıkgöz S, Erincik Ö, Ertan E (2004).

- Studies in the chestnut growing areas of Aydın-Turkey to determine the incidence of *Cryphonectria parasitica* (Murill) Barr infections (Chestnut Blight) and vegetative compatibility group diversity among the isolates. *Türkiye 1. Bitki Koruma Kongresi* 8-10 Eylül Samsun
- Dunn M, McKeen C & G Boland (1992). Chestnut blight in Canada: Hypovirulence and biological control. *Proceedings of the American Chestnut Symposium*. Morgantown, West Virginia, July 10-14. 1992, pp. 147- 155
- Elşad H (2001). Azerbaycan ormanlarında meşe ağaçlarına arız olan mikromantarlar. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **25**: 407- 413
- Flynn P (2003). Cytospora canker of spruce. Department of Plant Pathology Iowa State University, Ames, Iowa. Available: <http://www.ipm.iastate.edu/ipm/hortnews>
- Gurer, M, Ottaviani MP,& Cortesi P (2001). Genetic diversity of subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in Turkey. *Forest Snow and Landscape Research* **76**: 383-386
- Heiniger U & Rigling D (1994). Biological control of chestnut blight in Europa. *Annual Review of Phytopathology* **32**: 581-599
- Marra E. R & Milgroom M G (2001). The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: selfing and self-incompatibility. *Heredity* **86**(2):134-143
- Robin C & Heiniger U (2001). Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and Landscape Research* **76**(3): 361-367