
SERİ

B

CİLT

50

SAYI

1

2000

1951-2000
50.yıl

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

ORMAN FAKÜLTESİ

D E R G İ S İ



**CRYPHONECTRIA PARASITICA (MURR.) BARR.
VE HİPOVİRULENT İRK**

**Prof.Dr. Nurgün ERDİN¹⁾
Ar.Gör. Coşkun KÖSE¹⁾**

Kısa Özet

Kestane kanseri etmeni *Cryphonectria parasitica* yüksek virulent etkiye sahip bir mantar olup, kestane ağaçlarında ve kestane baltalıklarında, ağaçların toprak üzerinde kalan tüm elemanlarının ölümlerine neden olmaktadır. Konidyumlar tüm yıl boyunca, askosporlar ise ilkbaharın başından, sonbaharın sonuna kadar salınarak, çevredeki kestane ağaçları ve genç sürgünleri tekrar tekrar enfekte etmektedir. Kestane ağaçlarının seyrek olduğu durumlarda ise mantarın askosporları meşe, kayın, hatta sumak gibi çalı türlerini bile enfekte edebilmekte, ancak diğer türler üzerinde kestane ağaçlarındaki kadar "süper patojen" etki göstermemektedir. Kestane ormanları varlığını tehdit eden, bu son derece tehlikeli mantar (*C. parasitica*) ile mücadele için yürütülen çalışmalar içerisinde Avrupa'da başlatılan ve tüm dünyada araştırmaları devam eden hipovirulens proses umut verici görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Cryphonectria parasitica*, Kestane Kanseri, Hipovirulent İrk

CRYPHONECTRIA PARASITICA (MURR.) BARR. AND HYPOVIRULENT STRAIN

Abstract

Cryphonectria parasitica is extremely virulent in the chestnut trees and chestnut coppiced stands. It infects above ground parts of trees and kills them. Conidia are produced and dispersed throughout the year, perithecia eject ascospores from early spring through late fall. Ascospores can infect oak, beech and sumac when the population of chestnut sprouts becomes too sparse, but they are not "super pathogens" on the other species.

Among the studies began in Europe and under investigation around the world, hypovirulence process seems very promising for fighting with *C. parasitica* which is very dangerous fungus and threatens chestnut forest.

Keywords: *Cryphonectria parasitica*, Chestnut Blight, Hypovirulent strain

¹⁾ İ.Ü. Orman Biyolojisi ve Odun Koruma Teknolojisi Anabilim Dalı

1. GİRİŞ

Castanea sativa Mill., 700-800 yıl yaşayan, 20-30 m boyda, düzgün gövdeli, kullanılabilir gövde uzunluğu 6-10 m, gövde orta çapı 1.5 m olan bir ağaçtır. Odununda % 7-10, kabuğunda % 8-14 oranında hidrolize olabilen tanenler bulunmaktadır. Diri odunu çok dar (1.3 mm), öz odunu geniş ve mantarlara, böceklerle karşı dayanıklıdır. Düzgün lifli odunu meşeden daha hafif ($D_{12}=0.63 \text{ g/cm}^3$) olup, işlenme, çivilenme, vidalanma, cilalanma ve yapıştırılma kabiliyeti daha iyidir. Bina konstrüksiyon elemanları, kapı, doğrama, mobilya, müzik aletleri, tormalanmış çeşitli eşyalar, fiçı, travers, kontrplak yapımında kullanılmakta, dayanıklı olduğundan gemi inşaatında ve su içi inşaatlarda tercih edilmektedir. Ayrıca, ince çaplı dal ve sürgün odunlarının, eğilme direnci ve yarıma özelliklerinin iyi olması nedeniyle bahçe mobilyaları, fiçı çemberi, küfe, sepet çubuğu yapımında kullanılmaktadır. Kerestesinden başka, çiçeklerinden önemli bir bal kaynağı olarak yararlanılmakta, meyveleri hem ekonomiye katkıda bulunmakta, hem de yaban hayatının besin kaynağını oluşturmaktadır. Ülkemizde yaklaşık 2.5 milyon kestane ağacından, yıllara göre değişiklik göstermekle beraber ortalama yılda 80 bin ton meyve elde edilmektedir.

Castanea sativa ülkemizde Kuzey Anadolu sahil bölgelerinde ve Marmara Bölgesinde meşe, kayın, gürgenle karışık büyük ve kapalı meşcereler oluşturmakta, Ege Bölgesi dağlarında silikat topraklar üzerinde görülmektedir (MAYER/AKSOY 1998). Ayrıca, kent peyzajı için üretilen kültürleri ülkemizin birçok bölgesinde geniş çapta kullanılmaktadır. Dünyada *Castanea sativa*'dan başka yaklaşık 10 kadar kestane türünün bulunduğu ve bunların Güney Avrupa, Kuzey Afrika, Kuzeydoğu Amerika, Güneybatı ile Güneydoğu Asya'da yayılış gösterdiği bilinmektedir. Günümüzde, dünyadaki yıllık kestane üretimi yaklaşık 500.000 ton olup, bu miktarın % 40'ı Çin, % 15'i Kore, yaklaşık % 30'u İtalya, Türkiye, Japonya, yaklaşık % 12'si Fransa, İspanya, Yunanistan ve yaklaşık % 4'ü Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya, Yeni Zelanda, Şili ve Arjantin tarafından üretilmektedir. Yetiştigi ülkenin ekonomisine önemli katkıları bulunan kestane ağaçları, yaklaşık 100 yıl önce Amerika Birleşik Devletleri'nde başlayan ve daha sonra Avrupa'ya yayılan, kestane kanseri hastalığı ile çok önemli ölçüde tahrip edilmiştir.

2. KESTANE KANSERİNİN YAYILDIĞI ALANLAR

Kestane kanseri ilk kez Amerika Birleşik Devletleri'nde 1904 yılında ortaya çıkmış ve giderek dünyadaki kestane yayılış alanlarında görülmeye başlamıştır. Bu tarihten önce, 1900'lü yılların başına kadar, amerikan kestane ağaçlarının (*Castanea dentata* Borkh.) ülkenin doğusunda dominant durumda olan önemli ağaç türlerinden olduğu bilinmektedir. Hızlı büyüdüğü ve çok büyük boyutlara (30 m boy, 1.5-3.0 m çap) ulaştığı için peyzaj amaçlı da kullanılmıştır. Koloni Amerika'sından, 1900'lerin başlarına kadar yüksek direnç ve dayanıklılık istenen her türlü kullanım alanında kestane odunundan yararlanılmıştır. Tomruk evlerin yapımından, özellikle çürüme riskinin yüksek olduğu temel kazıkları, tel direkleri, maden direkleri, köprü ve traverslerin üretimine kadar birçok alanda kullanılmış, meyveleri bölge ekonomisine katkıda bulunmuştur.

Geçmişte *Castanea dentata*'nın Amerika Birleşik Devletleri ekonomisine son derece önemli olan bu katkısı, kestane kanseri ajanı *Cryphonectria parasitica* (Syn. *Endothia parasitica*) mantarının ülkeye girişiyle değişmeye başlamıştır. Hastalık yapan mantar ilk kez 1904 yılında, New York hayvanat bahçesindeki kestane ağaçlarında, Herman Merkel tarafından teşhis edilmiştir. Hastalık buradan, Maine ile Kuzey Georgia arasındaki alanda ve batıda Ohio'dan Tennessee'ye kadar uzanan bölgede saf ya da karışık olan kestane alanlarına sıçramış, hızla ilerleyip ani ölümlere neden olarak A.B.D.'deki kestane meşcerelerini çok ciddi şekilde tehdit etmeye başlamıştır. Patojenin kaynağı 1909 yılında Metcalf ve Collins tarafından belirlenmiştir. Metcalf ve Collins'e göre; hastalık, 1876 yılında bir bahçıvan tarafından Japonya'dan New York'a ithal edilmeye başlayan ve 1882-1886 yıllarında da ithalâtına devam edilen çok sayıda Japon kestanesi (*Castanea crenata* Sieb. Et zucc) fidanından kaynaklanmıştır (TANG 1998).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 50 yıl içerisinde Maine'den Mississippi'ye kadar uzanan doğal kestane meşcerelerinde yaklaşık 3.6 milyon ha alanda 3.5 milyar kestane ağacı hastalıktan zarar görmüş, mücadele için kimyasal maddelerin kullanılması, ya da enfeksiyon alanlarındaki kestane ağaçlarının temizlenmesi ve yakılması gibi işlemler başarıya ulaşamamıştır. Bu hastalık etkisiyle amerikan kestane ağaçları, ormanlardaki dominant ağaç türü pozisyonundan, yaşamaya çalışan bir çalı formuna indirgenmiş, kereste üretimi yapılamaz hale gelmiş ve kestane meyvesi verimi çok fazla azalmıştır. Örneğin; Günümüzde A.B.D. yılda 9000 ton kestane meyvesi ithal eder hale gelmiştir (ANAGNOSTAKIS 2000).

Kestane kanseri 1913 yılında Çin'de, 1915 yılında Japonya'da, 1938 yılında İtalya'nın Cenova kentinde bilimsel olarak tespit edilmiştir. Bu hastalık Avrupa'da genel olarak batıdan doğuya doğru ilerleyen bir yayılış göstermiştir. İspanya, İtalya, İsviçre ve Balkan ülkelerinde görüldükten sonra, 1967 yılında Türkiye'de *Cryphonectria parasitica* varlığı ilk kez saptanmıştır. *Castanea dentata* gibi, Avrupa'da yetişen *C. sativa*'nın da hastalığa karşı son derece hassas olduğu belirlenmiştir. Ülkemizde 1968 yılından itibaren kestane kanseri konusunda araştırmalar yapılmaya başlanmış ve hastalığın Karadeniz, Marmara Bölgeleri ile Batı Anadolu ve Antalya'ya kadar uzanan Güneybatı Anadolu'da yaygın durumda olduğuna dikkatler çekilmiştir. 1993 yılında 19 Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dekanlığı'nın, Orman Bakanlığı desteği ile Sinop Bölgesinde yaptığı bir araştırmayla rakamsal veriler ortaya konmuştur. Bu çalışmaya göre, Sinop Orman Bölge Müdürlüğü sınırları içerisindeki 3498 hektar kestane ormanında, kestane hastalıkları nedeniyle 2000 m³ dikili kuru kestane ağacı bulunduğu rapor edilmiştir. 1999 yılında Coşkun ve ark. Marmara Bölgesinde mantarın vejetatif uyumlu gruplarının dominant olduğu, bu nedenle Marmara Bölgesi dışında kestane yayılışının görüldüğü diğer bölgelerde mücadeleye devam edilmesi gerektiğini tespit etmiştir.

3. KESTANE KANSERİ MANTARININ SINIFLANDIRILMASI

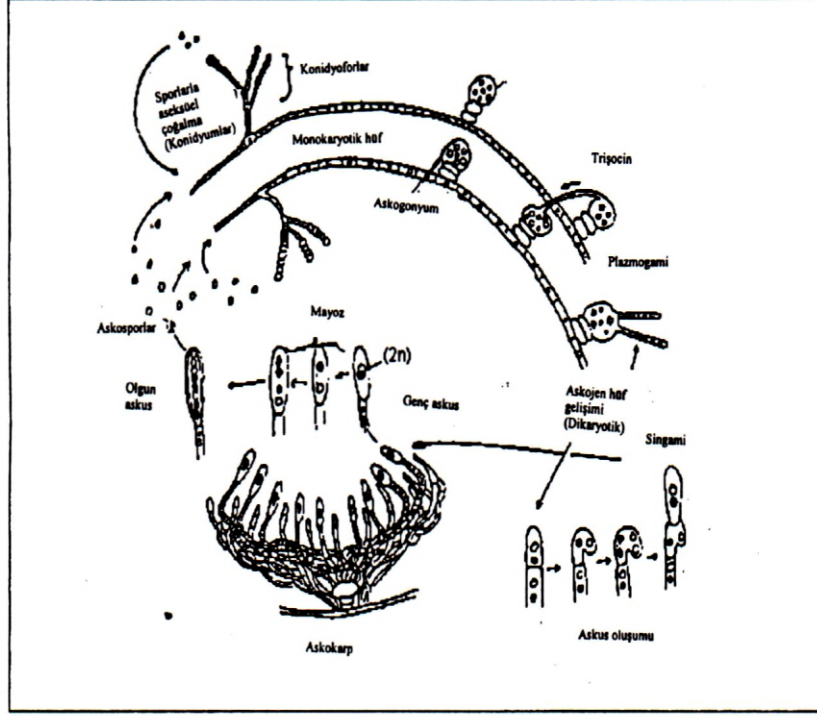
Mantarların sınıflandırılmasının iki amacı vardır. Birinci amaç, uluslararası kabul edilmiş bir sisteme göre organizmaları isimlendirmek, ikinci amaç ise, mantarların birbirleriyle ve diğer organizmalarla akrabalıklarını göstermektir. Kestane kanseri hastalığına neden olan *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr (Syn. *Endothia parasitica*) mantarı, Ascomycota bölümü, Pezizomycota alt bölümü, Sordariomycetes sınıfı, Diaporthales takımı ve Valsaceae familyasına girmekte, Peptidaz enzimleri ya da homologlarını (endothiaepsin/ endopeptidaz EapB/endopeptidaz EapC) salgılamaktadır. Aktif büyüyen kültürlerin irklarına bağlı olarak agar ortamında ya da sıvı besi ortamında yetiştirilebilmektedir. Mantarın neden olduğu hastalığa, kestane kanseri, amerikan kestane kanseri, kestane kabuk hastalığı ya da *Endothia* kanseri gibi çeşitli adlar verilmektedir.

3.1 Kestane Kanseri Mantarının Biyolojisi

C. parasitica'nın yaşam döngüsü içerisinde seksüel sporları peritesyumlarda, aseksüel sporları ise piknidyumlarda üretilmektedir (Şekil 1). Peritesyumlar stromaların alt kısmındaki bölmeli, kalın çeperli hüflerle örülmüş, dış yüzü yoğun, sert hücrelerden oluşan, uzun boyunlu, küre şeklinde bir yapı olup, içerisinde askusları taşımaktadır (Şekil 2). Askuslar içerisindeki askosporlar, peritesyumlardan havaya hızla fırlatılmakta ve rüzgârla taşınmaktadır. Rüzgârın etkisinin fazla olduğu bölgelerde hastalığın yayılmasında en önemli etken askosporlar olmaktadır.

Piknidyumlar ise, kestane ağacı kabuğu üzerinde toplu iğne başı şeklindeki stromalar üzerinde bulunan oranj renkli, etrafı sıkı hüflerle topluluğu ile sarılmış bir boşluk şeklinde olup, boşluğun iç yüzeyinde bulunan dallanmış ya da dallanmamış konidioforlar aseksüel sporları (konidyumları=piknidyosporları) taşımaktadır (Şekil 3). Konidyumlar ısladıklarında yapışkan, kuruduklarında ise sert olduklarından rüzgârla taşınmamaktadır (BUTIN 1989). Bu nedenle

piknidyumlar üzerinde biriken piknidyosporlar rüzgârla değil, yağmur suyuyla yıkanarak taşınmakta, ya da böcekler ve kuşlar tarafından yayılarak, çevredeki ağaçlara bulaştırılmaktadır. Bu faktörler dışında kemirici hayvanlar, insanlar, ormanda kullanılan çeşitli alet ve malzemeler, sporların bulaştırılmasında etkin rol oynamaktadır. Ayrıca, hastalıktan ölmüş ya da kesilmiş ağaçların da birer enfeksiyon kaynağı olduğu kesindir.

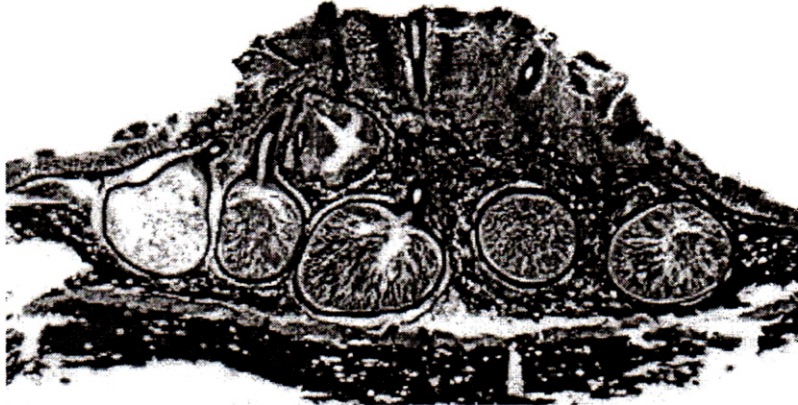


Şekil 1: *Cryphonectria parasitica*'da yaşam döngüsü.

Obligat bir yara paraziti olan bu patojen mantar, ağaca sadece kabuk ve gövde üzerindeki yaralardan girip, iç kabuk ve kambiyum içerisinde gelişerek gövdeye teğet yönde yayılmaktadır (Şekil 4). Mantarın gelişmesiyle ağaçta oluşan şişkin ya da gömülü (batık) oranj renkli kanserlerle beraber, kabuğun üzeri kabarcıklar şeklindeki piknidyumlar ve peritesyumlarla kaplanmaktadır (Şekil 5). Mantarın gelişim hızı üzerinde ağacın yaşı ve büyüklüğü de önemli bir rol oynamaktadır.



Şekil 2: *Cryphonectria parasitica*'da peritesyum ve askuslar.



Şekil 3: *Cryphonectria parasitica*'da piknidyum ve konidyumlar.



Şekil 4: Kabuktaki yara ve çatlaklardan giren mantar sporları kambiyumu bir çember gibi sararak ağacın enfeksiyon noktasının üst tarafındaki kısmını öldürmektedir.



Şekil 5: Kestane ağacı gövde ve sürgünleri üzerinde şişkin ya da gömülü oranj renkli kanserler.

Ağacın kök sistemi hariç, toprak üzerinde kalan gövde ve dalların herhangi bir bölgesindeki kabukta oluşan yaralara mantar arız olduktan sonra, inkubasyon periyodu 2-6 hafta kadar, ya da iklim koşullarına bağlı olarak, biraz daha uzun olabilmektedir. Enfeksiyon, ağacın toprak üzerindeki tüm organlarında, hatta açıkta kalan köklerinde dahi oluşabilmektedir. Sporların çimlenmesi ve miselyum gelişmesi (vejetatif gelişme) üzerinde sıcaklığın önemli rolü olduğundan, sıcak yaz günleri enfeksiyon için en uygun zaman olmaktadır. Sıcak günlerde inkubasyondan 1-5 hafta kadar sonra misel yelpazesi oluşmaya başlamaktadır. Hüfler başlangıçta

canlı doku üzerinde gelişmemekte, ancak ölü doku üzerinde geliştikten sonra, canlı dokularda (iç kabuk-kambiyum) gelişmesine devam etmektedir. Miselyum en fazla diri odunun dış kısmına kadar uzanabilmekte, düşük selüloz enzimi aktivitesi nedeniyle odun dokusunda önemli bir etki oluşturmamakta, ancak odun dokusunda mantarın salgıladığı sikrin ve diaportin toksinlerinden kaynaklandığı ifade edilen jelatinimsi bir bant meydana gelmektedir (DELEN 1979). Mantarın kambiyumu etkilemesiyle, enfeksiyon noktasının üst tarafında kalan ağaç kısımları canlılığını yitirmektedir.

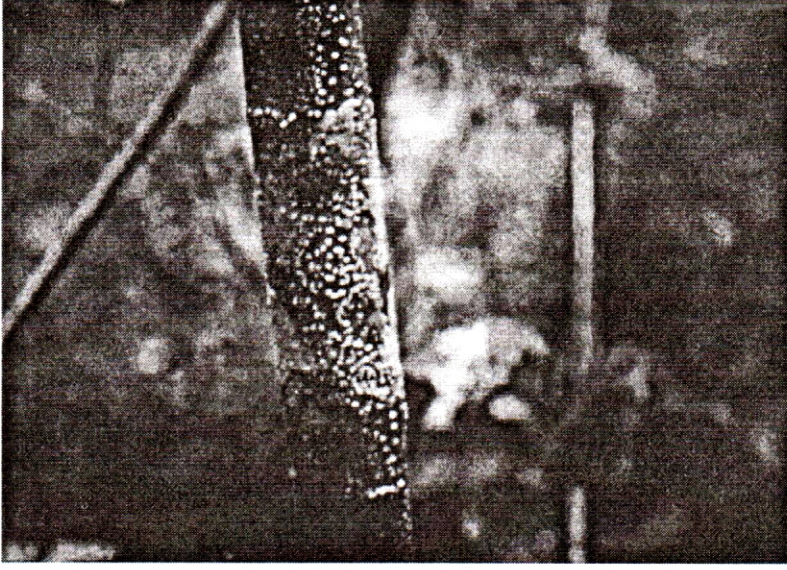
Cryphonectria parasitica mantarı, kestane ağaçlarından başka, *Quercus robur*, *Q. petraea*, *Q. ilex*, *Q. pubescens* ve *Fagus sylvatica*'da da saptanmıştır. Bu türlerde hastalığın seyri zayıf olmakla beraber, hastalık taşıyıcıları olarak önemleri daima göz önünde bulundurulmalıdır.

3.2 Kestane Kanserinin Semptomları

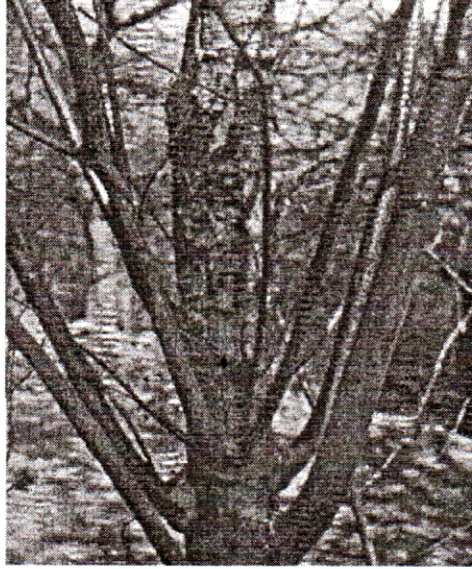
Kestane kanseri hastalığının başladığını ve ilerlediğini gösteren önemli semptomlar aşağıda özetlenmiştir.

- Kestane ağaçlarının gövdeleri ve sürgünleri üzerindeki enfeksiyon bölgesinde, yaz aylarında 2 hafta içerisinde, ilkbahar ve sonbahar aylarında 3-5 hafta içerisinde rutubetin yüksek olduğu periyotlarda şişkinlik oluşmaya başlamakta, kurak periyotlarda ise enfekte olmuş kısımlarda oranj renkte çökmeler görülmektedir. Kanserli bölgelerde piknidyumlar önceleri noktacıklar halindeyken, olgunlaştıktan sonra bir sivilce şeklini almaktadır.
- Piknidyumlar ağacı bir çember gibi sararak, enfeksiyondan yaklaşık 8 hafta kadar sonra olgunlaşan sarı renkli konidyumlar (piknidyosporlar) üretmektedir (Şekil 6). Piknidyumlara her mevsim çok miktarda rastlamak mümkünken, olgun peritesyumlara, rutubetin yüksek olduğu kış aylarında daha sık rastlanmaktadır.
- Mantar miselleri, yeni hastalanmış ağaç gövdesi ve dallarında kabuğun içerisinde gelişerek, kabuk altındaki odunsu dokuyu bir çember (halka) gibi sarmaktadır. Hastalanmış bölgenin üst tarafında kalan yapraklar ölmekte, fakat dökülmeden ağaç üzerinde kalarak, sarımsı kahverengi kuru yapraklar halinde kış boyunca ağaç üzerinde görülmekte, yaprakların ölümünü dalların ölümü izlemektedir. Kanserli kısmın altında kalan yapraklar ise sağlıklıdır. Mantar misellerinin enfeksiyon noktasından itibaren bir çember (halka) şeklinde gelişmesi, ilkbahar döneminde tomurcukların henüz açılmaya başladığı sırada tamamlanırsa, yapraklar gelişmemektedir.
- Mantar tahribatı şiddetli olmazsa, enfeksiyon yerlerinde yara dokusu gelişmesi nedeniyle şişkinlikler oluşmakta, şiddetli olursa, enfeksiyon bölgesinde kabuk ve kambiyumun ölmesi nedeniyle bir çöküntü meydana gelmektedir.
- Kanserli kısmın alt tarafında kalan gövde kısımlarında ya da ağacın dip tarafında yoğun bir şekilde sürgünler gelişmektedir (Şekil 7). Toprağın altında kalan kök sistemi, sürgünlere göre mantara karşı çok daha fazla direnç gösterdiğinden, gövde canlılığını yitirse de, uzun süre dipten yeni sürgünler yükselebilmekte, ancak bu özellik kestane ağaçlarının yok olmasını yine de engelleyememektedir. Çünkü bir süre sonra yeni sürgünler mantar tarafından öldürülmektedir.
- Ağaçta ölmüş kısımların kabuğu kaldırıldığında, kambiyumu örten ve yelpaze şeklinde gelişmiş, kirli sarımsı renkte misel demetlerinin geliştiği görülmekte ve kabuğun içi sarı bir renk almaktadır. Kabuğun üzerinde turuncu ya da kahverengi çatlaklar oluşmakta, gövde ve dallarda kabuk parça parça kurumaktadır (Şekil 8).

- Ağacın tamamı 2-10 yıl içerisinde ölmekte ve bir ağaç üzerinde çok sayıda kanser bulunabilmektedir.



Şekil 6 : Kestane ağacını bir çember gibi saran *C. parasitica*'nın, sarı/oranj konidyumlar (aseksüel sporlar üreten piknidyumları).



Şekil 7: Kestane ağacında kanserli bölgenin alt tarafında yoğun sürgün gelişmesi.



Şekil 8: Bir kestane ağacının kabuğu üzerinde *C. parasitica* tarafından oluşturulan kanser yarıkları ve kuruyan kabuk kaldırıldığında görülen yüzey.

4. KORUMA TEDBİRLERİ VE MÜCADELE

Kestane kanserini kontrol altına almak ve mücadele etmek için dünyada yapılan çalışmalar dört başlık altında toplanmaktadır.

(1) **Mudpack (çamur paketi) Metodu:** Weidlich (1978) tarafından geliştirilen Mudpack metodu, tek bir ağaçta görülen kestane kanserini kontrol altına almak için tavsiye edilmektedir. Metoda göre, pestisitlerle işlem görmemiş bir miktar toprak (içerisinde *Trichoderma spp.* gibi birçok organizma bulunan orman toprağı ya da kompostlar), suyla yoğun bir çamur haline getirilerek kanserli kısma tamamen sürülmekte ve üzeri plâstik bir torbayla kapatılıp bağlanarak, çamurun sürekli ıslak kalması sağlanmaktadır. Uygulamadan iki ay sonra plâstik kaldırıldığında kabuğun kallus dokusu oluşumuyla şişip, gelişmeye başladığı ve kestane kanseri mantarının öldüğü belirtilmektedir. Ancak, kanser bu bölgede "iyileşmekle" beraber, ağacın diğer bölgelerinde enfeksiyon devam ettiğinden, çamurla kaplama işlemlerini sürdürmek gerekmektedir (ANAGNOSTAKIS 1997). Metodun çok sayıda ağaç bulunan bölgeler için ideal olmayan, fakat tek kestane ağacında uygulanabilecek bir işlem olduğu açıkça görülmektedir. Ayrıca, bu bilgileri destekleyen sayısal veriler de bulunmamaktadır.

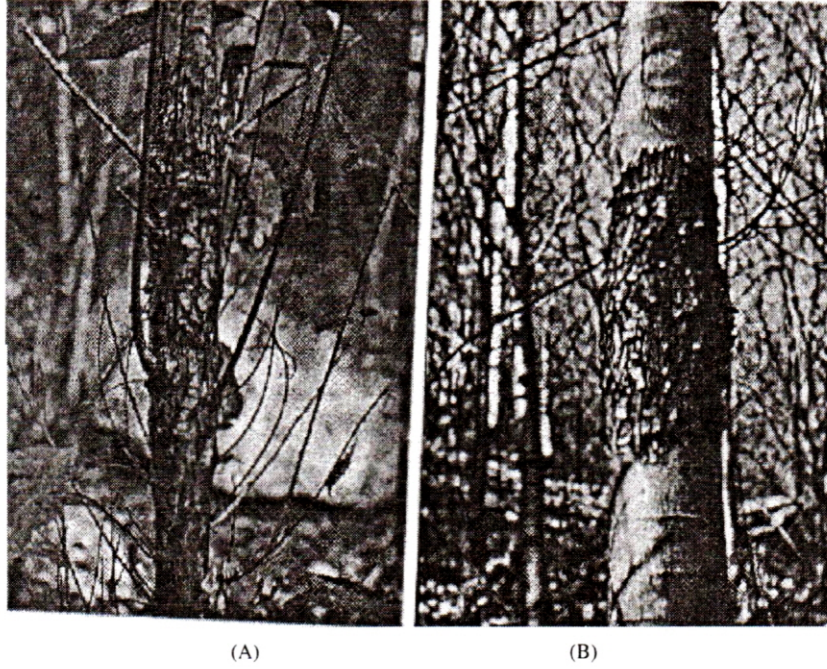
(2) Geri Çaprazlama, Döngüsel Seleksiyon ve Hibrid Çaprazlamayla Genetik İyileştirme: Amerikan X Çin (ya da Japon) kestaneleri arasında yapılan çaprazlamalarla, hastalığa dayanıklı Amerikan Kestanesi oranlarının artırılması çalışmaları sürdürülmektedir. Bu çalışmalarda, konukçunun dayanıklı genleri ancak uzun yıllar sonra patojen virulens genleriyle bir dengeye ulaşmaktadır. Konukçu-patojen ilişkisinde kestane kanseri gibi ekstrem derecede virulent patojenler gerçekten önemli bir problemdir. Çünkü beklenen eşitlik sağlanmadan önce patojen, konukçuyu öldürebilmektedir. Bununla beraber, bu tip konukçu-patojen ilişkisinde, konukçunun dayanıklılık sağlayan çok lokuslu genleri ile patojen virulensdeki çok lokuslu genlerin birbirini etkilemesi de mümkündür. Kestane kanseri ya da diğer patojenlere karşı genetik dayanıklılık olasılığını sağlamak üzere kestane ıslah programı sürdürülmektedir. Ancak, hastalığa dayanıklı fertlerin oluşturulması için uzun zamana ihtiyaç vardır (MANION 2003).

(3) Sentetik Dayanıklı Genlerin Kullanılması: Genetik Mühendisliğinde patojen mantarların etkisini önleyen peptidler ve enzimleri üretecek DNA segmentlerin kestaneler ve diğer ağaçların genomu (gameteki kromozom takımı) içerisindeki DNA segmentlere eklenmesi esasına dayanan bir iyileştirme programı üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bazı transformasyon işlemlerinin gerçekleştirildiği bu çalışmalarda, yapılan eklemelerin patojenler üzerindeki potansiyel etkileri konusundaki testler halen devam etmektedir.

(4) Hipovirulens (virulensin azaltılması) Prosesi: Hipovirulens çalışmaları, çift sarmallı RNA'nın (rübönükleik asitin) virulent mantara transferini hedeflemektedir. Bu yöntemle, Avrupa kestane ağaçlarında başarılı sonuçlar elde edildiğinden, kestane kanseri ile mücadele eden ülkeler hipovirulens çalışmalarını yoğunlaştırmışlardır.

Kestane kanseri hastalığının Avrupa'da görülmesinden sonra, birçok kestane ağacının öldüğü, bazı kestane ağaçlarında ise enfeksiyonla birlikte çok sayıda kanserler oluştuğu halde ölmedikleri tespit edilmiştir. Bu ağaçlarda dağınık gömülü kanserler yerine, yara kenarları boyunca kapanmanın açıkça görüldüğü şişmiş kanserler oluştuğu belirlenmiştir. Yara dokusu ile kapanmaya başlayan bu kanserler üzerinde çalışan birçok orman patolojisti, çalışmalarını üç varsayıma dayandırmıştır: (1) Avrupa kestaneleri *C. parasitica* mantarına karşı daha az hassastır. (2) Mantarlar mutasyona uğramıştır. (3) *C. parasitica* farklı bir mantarla birlikte bulunmaktadır. Bu varsayımlara dayanarak yürütülen araştırmaların sonunda, İtalya'da Antonia Biraghi kestane kanseri mantarının doğal popülasyonunda bir hipovirulensinin (hastalık oluşturma gücü düşük mantarın) bulunduğunu ilk kez 1950 yılında bir raporla dünyaya açıklamıştır.

Daha sonra 1965 yılında Grente, "hipovirulent" ırkların İtalya'da kestane ağaçlarını öldürmediğini ispat etmiş, kestane kanseri Fransa'da görüldüğünde, aktif bir müdahale programı başlatılarak öldürücü (virulent) ırklar, hipovirulent ırklara dönüştürülüp, İtalya'daki gibi hastalığın "biyolojik terapisinde" başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu başarıdan sonra, yeni tip iyileşen kanserler üzerinde çalışmalar yoğunlaştırılmıştır. Çalışmalar ilerlediğinde iyileşen kanserlerden, *C. parasitica*'dan farklı özelliklere sahip yeni bir mantar (hipovirulent) izole edilmiştir. *C. parasitica*'da görülen tipik oranj renge karşın, hipovirulent mantar beyaz renkli olup, daha yavaş büyümekte ve daha az spor üretmektedir. Öldürücü bir kanser üzerine beyaz mantar "püskürtüldüğü" zaman, yaranın kapanan bir kanser haline geldiği, beyaz ırkların basit bir dsRNA virüsü ile enfekte edildiği ve bu virüsün mantarı "hasta" ettiği tespit edilmiştir. Yavaş büyüyen hipovirulent mantar, ağaçta enfeksiyonun devam ettiği herhangi bir yerde, yara dokusu oluşumuna izin verdiğinden, ağacın kansere tepki göstermesi mümkün olmaktadır (Şekil 9). Bu başarıdan sonra, dünyada kestane kanseri ile mücadele için yürütülen çalışmaların çoğu hipovirulens proses üzerinde yoğunlaştırılmıştır.



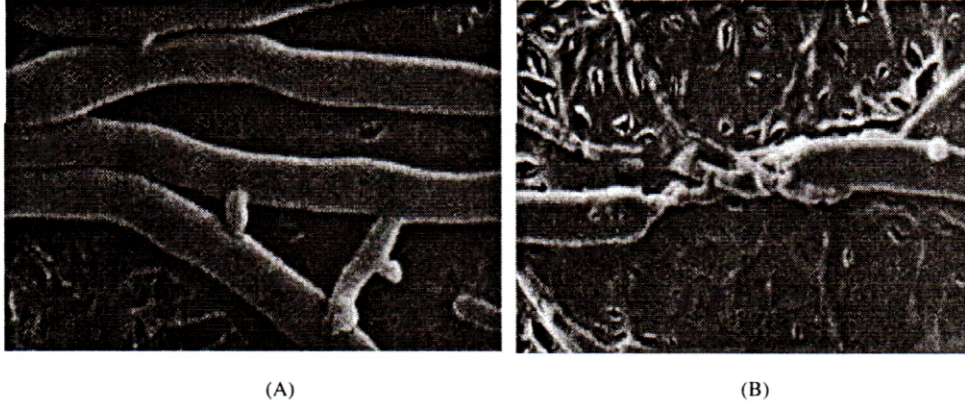
Şekil 9: (A) Kestane ağacında aktif kanser ve kabuk çatlakları ile kanserli kısmın alt tarafında gelişen sürgünler. (B) Hipovirüilent *C. parasitica* ırklarıyla doğal enfeksiyondan sonra yüzeysel, öldürücü olmayan kansere dönüşmüş gövde.

4.1 Hipovirulens Proses

Hipovirulens, *Hypovirus* cinsine ait mikrovirüslerle (mantar enfekte eden virüslerle) *C. parasitica* mantarının enfeksiyonu sonucunda bu mantarın virulensinin (hastalık oluşturma gücünün) zayıflatılmasıdır. Son 20 yıldır bilim adamları mikrovirüslerle kestane kanseri etmeni olan mantarı enfekte ederek, mantarı zayıflatmayı denemektedir. Hipovirulens adı verilen bu proste, Hypoviridae familyası, *Hypovirus* cinsi, *Cryphonectria hypovirus* 1-EP713 ile enfekte edilen mantarın hastalık oluşturma gücü zayıflatılmaktadır. Enfeksiyondan sonra hipovirulent (hastalık oluşturma gücü düşük) hale gelen ırklarla, virulent ırklar arasındaki en önemli fark, hipovirulent ırklarda, virulent ırklarda görülen turuncu ya da sarı pigmentlerin bulunmaması ve piknidyum sayısının hipovirulent ırklarda çok az olmasıdır. Ayrıca, hipovirulent mantarlar çok daha yavaş geliştiklerinden, ağaç tarafından yarayı kapatmak üzere kallus dokusu oluşturabilecek için yeterli zaman bulabilmekte ve mantarın sınırlı bir alanda, kontrol altında kalması sağlanabilmektedir. Yaranın büyüklüğüne bağlı olarak her kanser, birkaç yıl içerisinde iyileşmektedir.

Hipovirulens prosesin laboratuvar ortamında yapılan kontrollerinde, bir virulent koloni ile bir hipovirulent koloninin aynı ortamda kültürü hazırlandığında, kültürün hipovirulent hale geldiği tespit edilmiştir. Hipovirulent oluşum, oranj pigmentlerin bulunmaması ve az sayıda piknidyum görülmesinden başka, yapılarındaki çift sarmallı (ds) ribonükleik asit ile tanımlanmaktadır. dsRNA, birçok mantar virüsünün genetik materyali olup, tüm hipovirulent mantar ırklarının stoplazmalarında bulunmakla beraber, tüm virulent ırklarda bulunmamaktadır.

Mikrovirüsler tipik olarak izometrik şekilde ve 25-48 nanometre çaptadır. Hipovirüs, bir enfeksiyonda ekstraselüler yol izlememekte, bunun yerine enfeksiyon oluşumu, stoplazmanın bir hüften diğer hüfe akışına imkân veren ve komşu mantarların hüfleri arasında köprü oluşumunu içeren bir proses olan mantar anastomosisi (hüflerin birleşmesi) (Şekil 10) ile hipovirulent bir koloniden, virulent bir koloniye dsRNA'nın geçmesi şeklinde gerçekleşmektedir (ANAGNOSTAKIS/JANES 1973) (Şekil 11).



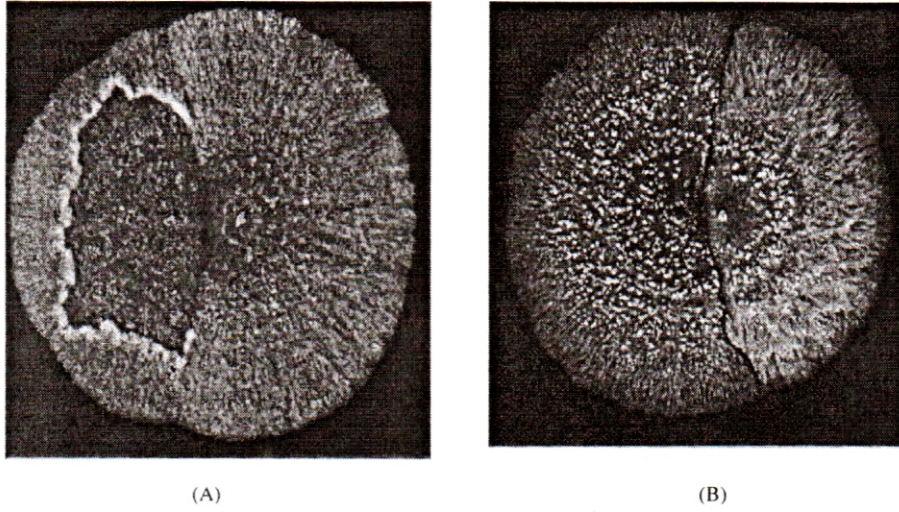
Şekil 10: (A) *C. parasitica* uyumlu ırklarında hüf anastomosisinin oluşması. Hipovürüs ve mitokondriler anastomosis yoluyla nakledilmektedir (SEM). (B) *C. parasitica* uyumsuz ırklarının baraj zonunda dejenere olmuş hüfler (SEM)

Virüsün genomu (bir gametdeki mevcut kromozom takımı) dsRNA yapısında olup, RNA yapısındaki mantarlar arasında transfer olabilmekte ve virulent ırkları, hipovirulent ırklara çevirebilmektedir. Yapılan çalışmalarda 3 tip dsRNA tespit edilmiştir. Bunlar, L-dsRNA (büyük), M-dsRNA (orta) ve S-dsRNA (küçük) olarak sınıflandırılmaktadır. dsRNA'ların boyutları, her ırkda bulunma sayısı, farklı ırklardaki ardışık benzeş, zaman ve ırka göre konsantrasyonda görülen çeşitlilik nedeniyle, bu üç komponenti karakterize etmek güçleşmektedir. Hipovirulens prosesini açıklayan bu önemli tespitten sonra, kestane kanserinin biyolojik kontrolünde ya da "biyolojik terapi"sinde faydalanmak üzere hipovirulens transmisyonu konusunda araştırmalar devam etmektedir.

4.2 Hipovirus Transmisyon Mekanizması

Kestane kanseri mantarının aseksüel olarak çoğalma sürecinde hipovirulent dsRNA, vejetatif olarak uyumlu ırklarda hüflerin kaynaşmasıyla, yani sadece anastomosis sonucu virulent bir ırka taşınabilmektedir (Şekil 11). Mantar anastomosisinin başarılı olması, sadece verici ve alıcı durumundaki her iki mantar ırkının aynı tipte, ya da çok yakın vejetatif uyumlu (VC) tipte olması halinde mümkündür. Vejetatif uyumluluğun çeşitliliği, sayısı en az 5 olarak tahmin edilen VC lokuslarda yeniden allel düzenlenmesinden sonra daha da çoğalmaktadır (ANAGNOSTAKIS 1977; CHEN ve ark. 1993). A.B.D.'de fazla miktarda VC çeşitliliği bulunması, Kuzey Amerika'daki mantar popülasyonunda hipovirus transmisyonunun engellenmesinde anahtar rol üstlenen önemli bir problem olarak kabul edilmektedir. Çift sarmallı RNA genellikle birçok organizmada bulunmamaktadır. Maalesef tüm virulent ırklarla eşleşmek için çaprazlanmış bir hipovirulent ırk geliştirme gayretleri, virulent ırkların 50'den fazla farklılık gösteren uyumsuz

grupları tarafından engellenmektedir. Uyumsuzluk faktörleri, hüf birleşmesinden başka, bunu takiben hipovirulens özellik kazandıran virüsün transferini de engellemektedir.



Şekil 11: (A) Soldaki oranj pigmentli virulent *C. parasitica* ırkı, sağdaki beyaz pigmentli hipovirulent ırkla uyumlu olduğundan, hüf anastomosisiyle dsRNA nakli gerçekleşmekte ve virulent ırkı süratle hipovirulent ırka dönüştürmektedir.
(B) Soldaki virulent ırk, sağdaki hipovirulent ırkla uyumsuz olduğundan, dönüşümün gerçekleşmemesi ve ırklar arasında gelişen çok sayıdaki piknidyumların oluşturduğu baraj.

Bir mantarın diğer bir mantarla vejetatif uyumunun (VC) olup olmadığını kontrol eden 5 gen vardır. Eğer homolog kromozom yapısında karşılıklı olarak birbirine uyan genlerden (allelere) biri farklı olursa, bir baraj zonu oluşacağından, anastomosis ve hipovirulensin transmisyonu gerçekleşmemektedir. Ancak, iki mantar vejetatif olarak uyumluysa anastomosis oluşmakta ve hipovirulens transfer edilebilmektedir (Şekil 11). Hücreler arası transmisyonun başka bir gerçekleşme şekli bugüne kadar belirlenmemiştir. Vejetatif uyumluluk için 5 allelin hepsi aynı olsa bile hipovirulens proses, salınan konidyum sayısını azalttığından ve az sayıdaki konidyumla etkili yayılım olmadığından, gen nakli yine engellenmektedir. Yani, aseksüel hipovirulens naklinde, konidyumun bir taraftan diğer tarafa çok iyi nakledilememesi problem yaratmaktadır.

Seksüel üremede ise uyumluluk, aseksüel çoğalmadaki kadar kompleks değildir. Çünkü seksüel uyumluluk sadece 1 lokus (bölge) ve 2 allel ile kontrol edildiğinden karşı tipte eşleşme olasılığı yüksektir. Hipovirulens, eşleşmeden sonra askosporlara nakledilememektedir (LINDQUESTES 1999).

Kestane kanseri hastalığının yayıldığı Avrupa'da ve ülkemizde kestane ağacı doğal yayılımının görüldüğü sahalarda vejetatif uyumlu olan mantarlar bulunduğundan transmisyon çalışmaları başarılı olabilmektedir. Ancak, A.B.D.'de transmisyonun gerçekleştirilmesi önemli bir problemdir. Çünkü, (1) A.B.D.'de kestane kanseri mantarının farklı eşleşme tiplerinin bulunması, vejetatif uyumluluk sayısını arttırmaktadır. (2) Virüsün, mantarı değiştirmesine tahammül edecek kestane ağacı bulunmasında zorluk çekilmektedir ve (3) Bu ülkede virüsün birçok farklı tipi

bulunmaktadır. Bu üç temel sorun nedeniyle A.B.D.'de transmisyon metoduyla hastalığın kontrolü fazla etkili olmamakla beraber, patojenin transmisyon kabiliyetini ve etkinliğini artırma yönünde çalışmalar devam etmektedir. Örneğin; patojen çeşidi daha az sayıda olan Michigan'da, hipovirulent ırkların transferinde daha az sorun yaşanmaktadır.

Vejetatif uyumsuzluk varsa, mantar ırkından ırkına hipovirulensin nakli, genetik bir sistemle sınırlandırılmaktadır. Heterojenik (değişik karakterlere sahip) uyumsuz bir sistemde anastomosis (kaynaşma) ve hipovirulens geçişinde mantar ırkları oluşumunu engelleyen altı lokus ve her bir lokusta iki allel bulunmaktadır. Lokuslarda farklı aleller olduğu zaman virüs transferi sınırlanmakta ve vejetatif uyumsuzluk gerçekleşmektedir. Transjenik (gen nakli yapılmış) hipovirulent mantarlar, sitoplazması içerisinde dsRNA üretme kapasitesine sahiptir. Ancak, doğal hipovirulent ırklarda farklı olarak, gen nakli yapılmış mantarın laboratuvar ve arazi koşulları altında konidyum ve askosporlara kromozomuyla entegre olmuş viral cDNA'yı (kopya DNA'yı) yaklaşık % 100 sıklıkta geçirdiği bulunmuştur. Transjenik hipovirulent ırklardan oluşan konidyum ve askosporlardan gelişmiş mantar kolonileri, entegre olmuş cDNA'dan stoplazmik viral dsRNA'yı çıkartma kabiliyetindedir.

Gen nakli yapılmış hipovirulent ırklardaki seksüel bir çaprazlamadan oluşan askosporlar, allellerde yeniden düzenlenme nedeniyle vejetatif uyumlu grupların çoğunda da tespit edilmiştir (TANK 1998). Bu özellik, doğal popülasyonlar içersine transjenik hipovirulent ırklar girdiği zaman önemli olmaktadır. Çünkü bu özellik mantar popülasyonları içerisinde viral genetik bilginin vejetatif yoldan yayılmasını oldukça kolaylaştırmaktadır. Böylece transmisyonun tüm safhalarının (mantar anastomosisi, aseksüel ve seksüel spor oluşturulması), doğal popülasyonda hipovirulens fenotipinin yayılmasını ve kalıcılığını artırdığı kabul edilmektedir.

Kuzey Amerika'da, Avrupa'ya göre neden daha fazla VC grupları olduğunu açıklayan çeşitli görüşler vardır. Örneğin; Day (1978), Fransa'da peritesyumların Kuzey Amerika'ya göre daha az yaygın olduğunu belirtmiştir. Bu durumun askosporların dağılımının Kuzey Amerika'da Fransa'ya göre daha büyük rol oynadığını, bununla ilişkili olarak Fransa ve muhtemelen Avrupa'nın diğer bölgelerine göre, Kuzey Amerika'da daha heterojen bir popülasyon oluştuğunu iddia etmiştir. Ancak, Day, aynı makalesinde İtalya'da virulent kanserlerin peritesyum da oluşturduğunu belirtmektedir. Bu durumda İtalya'da VC çeşitliliğinin Fransa'ya göre daha fazla gerçekleşeceği ve hipovirulensin daha az başarılı olacağı düşünülebilir. Diğer bir deyişle Day'in tezi, İtalya'da kestane kanseri kontrolünde hipovirulensin göreceli başarısını açıklayamamaktadır.

Day (1978), kestane kanseri hastalığının ilk belirlendiği tarih ile doğal hipovirulensin bulunduğu tarih arasında geçen sürenin Kuzey Amerika'da 72 yıl (1904-1976) olmasına karşın, Avrupa için bu sürenin 12 yıl (1938-1950) olduğunu belirtmektedir. Bu gözlem, hipovirulens başlamadan önce Kuzey Amerika ırklarının kendilerini oluşturmak ve çeşitli VC grupları içerisinde çeşitlenmek için, Avrupa mantarlarına göre daha fazla zamana sahip olduğunu ifade edebilir. Ancak bu hipotez, Kuzey Amerika ve Avrupa'dan gelen raporların, hastalık ya da hipovirulensin gerçek başlangıç tarihini yansıttığı, tahminine dayandırılmaktadır. Oysa, her iki tahmine ait kanıtlar eksiktir.

4.3 Hipovirulens Denemeleri

Hipovirus transmisyon çalışmaları; vejetatif uyumluluk testleri, spor oluşumu, çimlenme ve konidyum içerisine virüs transmisyonu oranlarının belirlenmesi, dsRNA ölçümleri, fenol oksidaz aktivitesinin belirlenmesi ve virulens denemelerini içermektedir.

Vejetatif uyumluluk: Vejetatif uyumluluğu tespit etmek için, her bölgeden toplanan izolatlar, standard test izolasyonlarıyla (Avrupa'dan temin edilen izolasyonlarla) karşılaştırılmaktadır. İzolatlar aynı petri kabında standard koşullar altında kültüre alındıktan 2

hafta sonra, iki izolasyon arasında engelleyici bir alan olmuşsa vejetatif uyumluluk bulunmadığı, bunun aksine koloni sınırları birbiri içerisine girmişse vejetatif uyumluluk (VC) olduğu kabul edilmektedir (ANAGNOSTAKIS 1977) (Şekil 11).

Spor oluşumu, çimlenme, virüs transmisyonu oranı: Spor oluşumu, çimlenme ve konidyum içerisine virüs transmisyonu oranlarının belirlenmesi için hipovirüs-mantar kombinasyonları, içerisinde 25 ml PDA (Patates, Dekstroz, Agar) bulunan 9 cm çapındaki petri kaplarında 25 °C sıcaklıkta, beyaz floresans ışıkta 12 saat ışık, 12 saat karanlık olacak şekilde 14-21 gün gelişmeye bırakılmaktadır. Bu süre sonunda 10 ml steril suyla her bir petri kabı yüzeyinden konidyumlar yıkanarak, bir hemocytometre (kan hücreleri ölçer) ile sayım yapılmaktadır. Spor oluşum zamanını belirlemek için spor sayımlarının dört farklı zamanda yapılması önerilmektedir. Çimlenme oranının belirlenmesinde konidial süspansiyonların PDA üzerine yayılarak 24 saat çimlenmesi beklendikten sonra, sporların çimlenme durumu x100 büyütmeli bir mikroskop altında incelenmektedir. Konidyum içerisinde vertikal transmisyon hakkında karar verebilmek için virüsle enfekte edilmiş izolatların her birinden konidyum örnekleri alınarak, bunlardan PDA'da çimlenme tüpü oluşan (hızlı çimlenenler) ve çimlenme tüpü oluşmayanlar transfer edilmekte ve inkübasyon için bir hafta bekletilmektedir. Her bir izolatta hipovirüsün bulunuşu, benzer şartlar altında konidyumlardan gelişen anababaya ait hipovirüssüz izolatların kültür morfolojisiyle karşılaştırılarak belirlenmektedir. Viral verimlilik ise, "konidyumların (spor) toplam sayısı x çimlenme oranı x vertikal transmisyon oranı" formülü ile hesaplanmakta ve üretilen virüs enfekte edilmiş konidyum toplam sayısı olarak belirtilmektedir.

dsRNA denemeleri: Hipovirulent ırkların dsRNA miktarlarının belirlenmesi için, bu ırkların 9 cm çapındaki petri kaplarında selofanla kaplanmış 25 ml'lik Patates Dekstros Agar (PDA) üzerinde kültürleri yapılmaktadır. 7-10 günlük kolonilerden alınan miselyum sıvı azot içerisine daldırıldıktan sonra bir havanda ezilerek ince toz haline getirilmekte ve fenol ekstraksiyon metodu kullanılarak nükleik asit ekstrakte edilmekte ve selüloz kolon metodu ile dsRNA ölçümleri yapılmaktadır (MORRIS/DODDS 1979).

Bavendam testi: dsRNA'nın bulunuşu fenol oksidaz aktivitesini etkilediğinden, ortamda fenol oksidaz salgılanıp, salgılanmadığını anlamak için Bavendam testi uygulanmaktadır. Test ortamının hazırlanmasında, % 1.5 malt ekstraktı ve % 2 agar içerisine, % 0.5 tannik asit (petri kaplarına dökülmeden önce otoklavda ayrı olarak sterilize edilmiş) ilâve edilerek karıştırıldıktan sonra, pH'sı sodyum hidroksitle 4.5 olarak ayarlanan bir besi ortamı kullanılmaktadır. Bu ortamda kültüre alınan ırkların bulunduğu petriler, 7 günlük PDA kültürlerinin gelişme zonlarından toplanan miselyum parçalarıyla aşılandıktan sonra, karanlıkta ve 25 °C sıcaklıkta 4 gün inkübasyona bırakılmaktadır. Agar besin ortamının renklenmesi, fenol oksidaz aktivitesinin bir göstergesi olmaktadır (RIGLING ve ark. 1989).

Virulens denemeleri: Virulens denemeleri (Hastalık yapma gücü tespit denemeleri) için, aynı dormant kestone gövdelerinden alınan 30 cm uzunlukta 3-4 cm çaptaki farklı gövde parçalarına hipovirulent ırklar aşılanmaktadır. Denemede 5 mm çapı olan bir mantar burgusu ile kabuk üzerinden bir parça kabuk kaldırılarak, içerisine agar besin ortamı ile birlikte kesilmiş miselyum yerleştirilmektedir. Aşılanan bölge parafilmle kaplanarak, 25 °C sıcaklıkta, % 95 bağıl nemde ve karanlık bir ortamda 5 hafta bekletildikten sonra, oluşan kanserlerin uzunluğu, genişliği ve alanı ölçülmekte ve piknidyumların bulunup, bulunmadığı gözlenmektedir (FULBRIGHT 1984).

Hipovirulens denemeleri yardımıyla, mantarın gelişmesi ve çoğalması, patojen kabiliyetini düzenleyen mekanizmalar ve mantar kültürü ile ilgili bilgilerin nasıl sağlanabileceği daha iyi anlaşılmaktadır. Fransa'da ve Türkiye'de yapılan hipovirulens çalışmalarına örnekler aşağıda kısaca özetlenmiştir.

Grentle (1982), Fransa'da ticari plantasyonlar üzerindeki kanserleri tedavi etmek için 10'dan fazla hipovirulent ırk içeren *C. parasitica* karışımının kullanımının etkili olduğunu bildirmiştir. Mantar karışımları mısır nişastası üzerinde kültürle alındıktan sonra alüminyum tüplerde paketlenerek kullanılmaktadır. Aynı tekniğin transjenik hipovirulent ırklar kullanılarak daha iyi hale getirilmesi mümkündür. Çünkü *C. parasitica*'da seksüel uyumluluk tek bir lokus eşleşmesiyle kontrol edilerek kullanılmaktadır. Transjenik hipovirulent ırk içeren bir seksüel çaprazlamayla, vejetatif uyumlu grupların geniş bir aralığında bulunan, hipovirulent ırk meydana getirilebilmektedir. Farklı eşleşme tipleri yerine (Grente tarafından kullanılan 10 mantar yerine), sadece iki transjenik hipovirulent ırkı içeren bir mantar karışımı kanser iyileştirme işleminde yeterli olabilmektedir. Bununla beraber iki eşleşme tipine ait çeşitli VC gruplarının, transjenik mantar ırkları karışımına tatbik edilmesi, enfekte olmuş ağaçların işlem hızını biraz arttırabilir. Populasyon incelemeleri; dominant VC grupları ve her bir bölgede eşleşme tiplerini açıklamakta, ayrıca her bir bölgede işlem için uygun bir mantar karışımının reçetesini kolaylaştırmaktadır.

H. Coşkun ve ark. (1999) tarafından yapılan çalışmada; Marmara, Doğu Karadeniz ve Batı Karadeniz Bölgelerinde kestane kanseri görülen 181 meşcerede incelemeler yapılmış ve 265 *C. parasitica* ırkı elde edilmiştir. Türk Hipovirulent ırkların doğada olduğunu ortaya çıkarmak için agar kültür ortamında morfolojileri karakterize edilmiştir. Türk izolatların vejetatif uyumlulukları, İtalyan ve Avrupa test örnekleriyle laboratuarda incelenmiş, Doğu Karadeniz Bölgesinde iki farklı kestane meşceresinden toplanan *C. parasitica*'nın 4 izolatında koloni morfolojisi ve dsRNA yapısı araştırılmıştır. Aşılama testleri sonucunda bu izolatların sadece orta derecede kanser geliştirdikleri görülmüş, mantar aşılması ile oluşan kanserlerin ölçüleri ırklar arasında farklılık göstermiştir. Türk virulent ırkların oluşturduğu kanserin, Türk ve İtalyan hipovirulent ırkların oluşturduğundan daha geniş olduğu belirlenmiştir. Türk virulent ırkların kolonilerinin sarımsı oranj renkte olduğu, oranj piknidyumların yara bölgesinde bulunduğu ve bu ırklar tarafından oluşturulan kanserlerde hafif çökme görüldüğü tespit edilmiştir. Marmara Bölgesinde Avrupa VC grupların dominant olduğu, bu nedenle mücadeleye gerek olmadığı, Doğu Karadeniz Bölgesinde ise 2 Avrupa VC tipi bulunduğundan bu bölgede ve kestane yayılışının görüldüğü diğer bölgelerde biyolojik kontrol için hipovirulens çalışmalarına devam edilmesi önerilmiştir.

Uzunoğulları ve ark. (2001) tarafından, Bursa, Yalova, Kocaeli ve Sakarya Bölgelerinden alınan 101 örnekten geliştirilen 475 *C. parasitica* kültürünün 85 izolatında patojenite denemeleri yapılmış, hipovirulent ırkın belirlenmesi ve hastalığın biyolojik kontrolünde kullanılma olanakları araştırılmıştır.

Çeliker ve Onoğur (2001) tarafından yapılan çalışmada Ege, Marmara ve Karadeniz Bölgelerinden toplanan 324 izolattan 2 vejetatif uyum grubu (EU1 – EU12) ve 14 hipovirulent izolat belirlenmiştir. Sadece hipovirulent ırklarla aşılamanın fidanlarda belirgin kallus dokusu oluşumu ve lezyonların küçülmesi ile birlikte kanserin iyileşmeye başladığı saptanmıştır. Virulent ve hipovirulent ırklarla aşılamanın fidanlarda ise kanser gelişmesi durmuş, daha sonra kallus dokusu oluşumuyla lezyonlar küçülmüş ve kanserlerin iyileşmeye başladığı tespit edilmiştir.

5. SONUÇ

Hastalanmış organizmalarda biyolojik kontroller için, gen naklinin kullanılması oldukça yeni bir fikir olmakla beraber, *C. parasitica*'nın gen nakli yapılmış hipovirulent ırkları, kestane kanserinin biyolojik kontrolünde önemli bir potansiyel olarak görülmektedir. Vejetatif uyumlu gruplar ve eşleşme tiplerinin bir çeşidini temsil eden transjenik hipovirulent mantar ırkları karışımlarının, arazideki kanserler üzerinde iyileştirici etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. Avrupa ve Türkiye'de bazı bölgelerde hipovirulent ırklar tespit edilmiştir. Ancak Kuzey Amerika'da transjenik mantarların kendini devam ettiren ırkları, henüz arazide elde

edilememiştir. Sürdürülen çalışmalarda normal spor oluşturma oranları gösteren ırkların büyümesi yerine, hipopatojenik ırkları geliştirme imkânları araştırılmaktadır. Mantar fizyolojisinde viral dsRNA'nın etkisinin anlaşılması, *C. parasitica*'ya karşı güçlü fungistatik maddelerin geliştirilmesine öncülük edebileceği gibi, benzer biyokimyasal işlemlerin diğer patojen mantarlara da uygulanabilmesini mümkün kılacaktır.

KAYNAKLAR

- ANAGNOSTAKIS, S. L.; JAYNES, R. A., 1973: Chestnut Blight Control: Use of Hypovirulent Cultures. *Plant Dis. Rep.*, 57: 225-226.
- ANAGNOSTAKIS, S. L., 1977: Vegetative Compatibility in *Endothia parasitica*. *Exp. Mycol.*, 1:306-317.
- ANAGNOSTAKIS, S. L., 1977: Protecting Chestnut Trees From Blight. *Plant Pathology*, Pp044 11/97. (<http://www.caes.state.ct.us/FactShecFiles/PlantPathology/Fsppo44F.htm>)
- ANAGNOSTAKIS, S. L., 2000: Revitalization of the Majestic Chestnut: Chestnut Blight Disease. American Phytopathological Society (<http://www.apsnet.org/online/Feature/chestnut/top.html>)
- BUTIN, H., 1989: *Krankheiten der Wald-und Parkbaume* George Thieme Verlag, Stuttgart-NewYork.
- CHEN, B.; CHOI, G. H.; NUSS, D.L., 1993: Mitotic Stability and Nuclear Inheritance of Integrated Viral cDNA in Engineering Hypovirulent Strains of the Chestnut Blight Fungus. *EMBO J.*, 12:2991-2998.
- COŞKUN, H.; TURCHETTI, T.; MARESI, G.; SANTAGADA, A., 1999: Preliminary Investigations into *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr Isolates From Turkey. *Phytopathol. Mediterr.*, 38:101-110.
- ÇELİKER, N. M.; ONOĞUR, E., 2000: Investigations on the Control of Chestnut Blight (*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr) by Hypovirulent Strains. Abstract. COST 64 Multidisciplinary Chestnut Research Meeting and Workshop on Tree Physiology and Diseases and Pests. 4-6 Mayıs 2002. Yunanistan.
- DELEN, N., 1979: Kestane Kanseri (*Endothia parasitica* (Murrill) Anderson and Anderson) Hastalığının Yayılışı ve Biyolojisi. T.C. Gıda-Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ziraî Mücadele ve Ziraî Karantina Genel Müdürlüğü Araştırma Eserleri Serisi No: 36, Ankara.
- ERDEM, R., 1954: Kestane Kanseri. İ.Ü.Orman Fakültesi Dergisi, Seri B, Cilt 4, Sayı 1 Sayfa 134-146, İstanbul.
- FULBRIGHT, D. W., 1984: Effect of Eliminating dsRNA in Hypovirulent *Endothia parasitica*. *Phytopathology*, 74: 722-724.
- LINDQUESTER, G. J., 1999: Virology/Immunology. Rhodes College. (<http://glindquester.biology.rhodes.edu/virolimm>)
- MANION, P. D., 2003: Forest and Shade Tree Pathology. Suny College of Environmental Science and Forestry. (<http://syllabus.syr.edu/ESF>)
- MAYER, H.; AKSOY, H., 1998: Türkiye Ormanları Walder der Türkei, T.C. Orman Bakanlığı Batı Karadeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bolu.

MORRIS, T. J.; DODDS, J. A., 1979: Isolation and Analysis of Double-stranded RNA Form Virus-infected Plant and Fungal Tissue, *Phytopathology*, 69: 854-858.

RIGLING, D.; HEINIGER, U.; HOHL, H., 1989: Reduction of Laccase Activitiy in dsRNA-containing Hypovirulent Strains of *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. *Phytopathology*, 79: 219-223.

TANG, P. L., 1998: Hypovirulence in the Chestnut Blight Fungus, *Chryphonectria parasitica*. Plant Pathology PLPA497: Independent Study in Plant Pathology. (<http://sps.nus.edu.sg/~tangpui/essays/cnut.html>.)

UZUNOĞULLARI, N.; DAMGACI, E.; NOGAY, A.; UFUK, S., 2001: Kestane Kanseri (*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr.) Hastalığının Mücadelesi Üzerine Araştırmalar. Hastalık ve Zararlılar Araştırma Sonuçları, Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yalova.