

**T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ
ORMAN MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**GÖLHİSAR-İBECİK YÖRESİ KIZILÇAM GENÇLEŞTİRME
ALANINDA *Heterobasidion annosum*'UN POPULASYON YAPISI**

Refika Ceyda BERAM

**Danışman
Prof. Dr. H. Tuğba DOĞMUŞ LEHTIJÄRVİ**

ISPARTA - 2019



© 2019 [Refika Ceyda BERAM]

TEZ ONAYI

GÖLHİSAR-İBECİK YÖRESİ KIZILÇAM GENÇLEŞTİRME ALANINDA *Heterobasidion annosum*'UN POPULASYON YAPISI

Refika Ceyda BERAM tarafından hazırlanan bu tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Orman Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman Prof. Dr. H. Tuğba DOĞMUŞ LEHTIJÄRVI
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Üye Prof. Dr. Semra KILIÇ
Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye Doç. Dr. Asko Tapio LEHTIJÄRVI
Bursa Teknik Üniversitesi

Üye Doç. Dr. Ahmet MERT
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Üye Dr. Öğr. Üyesi Özdemir ŞENTÜRK
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Yukarıdaki Jüri kararı Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun / /
tarih ve / sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Yusuf UÇAR
Enstitü Müdürü

ETİK BEYANI

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak ve bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmasında;

Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

----/----/2019

Refika Ceyda BERAM

.....

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler.....	5
1.1.1. Kızılçam hakkında genel bilgiler	5
1.1.1.1. Kızılçam yetiştirme ortamı özellikleri	6
1.1.1.2. Kızılçamın botanik özellikleri.....	7
1.1.2. <i>Heterobasidion annosum</i> hakkında genel bilgiler	8
1.1.2.1. <i>H. annosum</i> 'un tarihçesi	8
1.1.2.2. <i>H. annosum</i> 'un fungal taksonomideki yeri ve biyolojisi.....	10
1.1.2.3. <i>H. annosum</i> 'un yayılışı ve ana konukçuları.....	14
1.1.2.4. Hastalık oluşumunu etkileyen faktörler.....	17
1.1.2.5. <i>H. annosum</i> ile mücadele.....	18
1.1.2.5.1. Silvikültürel mücadele yöntemleri	18
1.1.2.5.2. Kimyasal mücadele yöntemleri.....	19
1.1.2.5.3. Biyolojik mücadele yöntemleri	20
1.1.3. Moleküler markörler hakkında genel bilgiler	21
1.1.3.1. Moleküler markörlerde bulunması gereken özellikler	22
1.1.3.2. Moleküler markör teknolojisinin kullanım alanları	23
1.1.3.3. Moleküler markör tipleri.....	23
1.1.3.3.1. Hibridizasyon tabanlı moleküler markörler	23
1.1.3.3.2. PCR tabanlı moleküler markörler	24
2. KAYNAK ÖZETLERİ	30
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	40
3.1. Araştırma Alanı.....	41
3.2. Sörvey çalışmaları.....	43
3.2.1. Hastalık ocaklarının belirlenmesi.....	43
3.2.2. Verilerin toplanması ve örnekleme	45
3.3. Laboratuvar Çalışmaları	47
3.3.1. Fungusun izolasyonu.....	48
3.3.1.1. Tek spor izolasyonları	50
3.3.2. Morfolojik teşhis çalışmaları	51
3.3.2.1. <i>Heterobasidion</i> izolatlarının IS gruplarının belirlenmesi	51
3.3.3. Moleküler teşhis çalışmaları	52
3.3.3.1. DNA ekstraksiyonu	52
3.3.3.2. Türe özgü primerler ile PCR amplifikasyonu.....	54
3.3.4. <i>H. annosum</i> 'un populasyon yapısının belirlenmesi	55
3.3.4.1. <i>H. annosum</i> izolatlarının somatik eşleştirme testleri ile genetik farklılıklarının tespiti.....	55
3.3.4.2. Somatik eşleştirme testlerinin değerlendirilmesi	55
3.3.4.3. PCR esaslı metotlar	57
3.3.4.3.1. <i>H. annosum</i> izolatlarının RAMS markörleri ile karakterizasyonu.....	57

3.3.4.3.2. <i>H. annosum</i> izolatlarının M13 markörleri ile karakterizasyonu	59
3.3.4.3.3. Jel Elektroforezi.....	59
3.3.4.4. PCR reaksiyonlarının skorlanması ve değerlendirmesi.....	60
3.3.4.4.1. Skorlama	60
3.3.4.4.2. İstatiksel Değerlendirme.....	61
3.4. Çevresel değişkenler ile hastalık ilişkisinin belirlenmesi.....	62
4. BULGULAR	64
4.1. Laboratuvar çalışmalarına ait bulgular.....	64
4.1.1. Morfolojik teşhis çalışmaları	64
4.1.2. Moleküler teşhis çalışmaları	67
4.1.3. <i>H. annosum</i> 'un populasyon yapısının belirlenmesi	68
4.1.3.1. <i>H. annosum</i> izolatlarının somatik eşleştirme testleri ile genetik farklılıklarının tespiti	68
4.1.3.2. PCR esaslı metotlar	70
4.1.3.2.1. <i>H. annosum</i> izolatlarının RAMS ve M13 Markörleri ile Karakterizasyonu ve Polimorfizmin Değerlendirilmesi.....	70
4.2. Verilerin düzenlenmesi ve genetik istatistik programlarının kullanılması	72
4.2.1. Gruplandırma ilişkilendirme analizleri	72
4.2.2. UPGMA dendogramlarının elde edilmesi ve değerlendirilmesi.....	77
4.3. Çevresel değişkenler ile hastalık ilişkisinin belirlenmesi.....	78
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	83
KAYNAKLAR.....	107
EKLER.....	129
EK A. Genet Haritaları.....	130
ÖZGEÇMİŞ.....	140

ÖZET

Doktora Tezi

GÖLHİSAR-İBECİK YÖRESİ KIZILÇAM GENÇLEŞTİRME ALANINDA *Heterobasidion annosum*'UN POPULASYON YAPISI

Refika Ceyda BERAM

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Orman Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. H. Tuğba DOĞMUŞ LEHTIJÄRVI

Basidiomycota şubesine ait olan *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., Kuzey Yarımküre'de yer alan tüm ılıman ülkelerde, özellikle ibrelili ağaçlarda kök ve alt gövde çürüklüğüne neden olan tahripkar bir hastalık etmenidir. Ormancılık sektöründe neden olduğu yüksek ekonomik kayıplar nedeniyle, dünyada orman patoloğlarının en çok çalıştığı orman fungusu olarak bilinmektedir. Bu doktora tezi kapsamında, Burdur ili Gölhisar-İbecik ilçesi Kızılçam gençleştirme alanında *H. annosum*'un populasyon yapısı araştırılmıştır. Tespit edilen hastalık ocaklarında, örneklemelerin yapıldığı kızılçam ağaçlarından toplam 182 adet izolat elde edilmiştir. Yapılan eşleştirme testleri sonucunda tüm *Heterobasidion* spp. izolatlarının, *H. annosum* s.s. test izolatları ile %96,9 oranında uyumluluk gösterdiği tespit edilmiştir. Türe özgü MJ primer çifti ile gerçekleştirilen PCR amplifikasyonları ile morfolojik teşhis çalışmaları desteklenmiştir. Genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla yapılan somatik eşleştirme testi sonuçlarına göre, *H. annosum* izolatlarının 34 farklı genete ait olduğu tespit edilmiştir. RAMS ve M13 markörleri ile gerçekleştirilen PCR tabanlı moleküler analizlerin sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde toplam moleküler varyasyonun %49'unun hastalık ocakları arasında gerçekleştiği, %51'inin populasyonlar içindeki bireysel farklılıklardan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Söz konusu primerler ile amplifikasyon sonucunda elde edilen DNA bant uzunlukları 350-1500 bp arasında değişmektedir. Allellerin genel polimorfizm oranı %53,2'dir. Elde edilen toplam allel sayısı bakımından (CCA)₅ ve (TCG)₅ RAMS primeri en fazla polimorfik bantı üretirken, en az sayıda bant M13 primeri tarafından üretilmiştir. Etmenin populasyon yapısının değerlendirilmesi aşamasında AMOVA, UPGMA, PCoA, Cluster ve TWINSpan analiz yöntemlerinden faydalanılmıştır. Ayrıca çalışmada, MAXENT yaklaşımı yardımıyla hastalığın yayılımını etkileyebilecek çevresel faktörlere ait verilerin ilişkilendirilmesi suretiyle potansiyel dağılım haritalaması gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Annosum* kök çürüklüğü, Konifer, Hastalık ocağı, Mikrosatelit, RAMS, MAXENT

2019, 140 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

POPULATION STRUCTURE of *Heterobasidion annosum* in TURKISH PINE REGENERATION AREA in GÖLHİSAR-İBECİK DISTRICT

Refika Ceyda BERAM

Isparta University of Applied Sciences
The Institute of Graduate Education
Department of Forest Engineering

Supervisor: Prof. Dr. H. Tuğba DOĞMUŞ LEHTIJÄRVI

Basidiomycetes belonging to the *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. are some of the most destructive disease agents of conifers in all temperate countries in the Northern Hemisphere causing root and butt rot. Significant economic losses by *Heterobasidion* species in forestry make them the most widely studied forest fungi in the world. In this thesis, population structure of *H. annosum* in Turkish pine regeneration area in Gölhisar-Ibecik district was investigated. A total of 182 isolates were obtained in disease centers in which the agent was observed. As a result of the pairing tests, all of the *Heterobasidion* isolates were found to be 96.9% compatible with the *H. annosum* s.s. test isolates. Morphological diagnostic studies were supported by PCR amplifications performed with species specific MJ primer pair. According to the results of somatic pairing test to determine genetic diversity, *H. annosum* isolates were found to belong to 34 different genets. When the results of PCR-based molecular analyzes performed with RAMS and M13 markers were evaluated as a whole, it was concluded that 49% of the total molecular variation occurred between the disease centers and 51% was caused by individual differences within the populations. The DNA band lengths obtained from amplification with these primers varied between 350-1500 bp. The overall polymorphism rate of alleles was 53.2%. In terms of the total number of alleles obtained, (CCA)₅ and (TCG)₅ RAMS primers produced the most polymorphic bands, while the least number of bands were produced by the M13 primer. AMOVA, UPGMA, PCoA, Cluster and TWINSpan analysis methods were used in the evaluation of the population structure of the pathogen. Also in this study, potential distribution mapping for the study area was carried out by associating the data related to environmental factors that may affect the spread of the disease with the help of MAXENT approach.

Key Words: *Annosum* root rot, Coniferous, Disease center, Microsatellite, RAMS, MAXENT.

2019, 140 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. H. Tuğba DOĞMUŞ LEHTİJÄRVI'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım sayın hocam Doç. Dr. Asko Tapio LEHTİJÄRVI'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında büyük bir özveriyle bana yardımcı olan, maddi ve manevi hiçbir desteği esirgemeyen, değerli katkıları ile tezimin son halini almasında büyük emeği bulunan çok değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi A. Gülden ADAY KAYA'ya şükranlarımı sunarım.

Tezimin başlangıcından bitimine kadar gerek tez izleme komitesinde gerekse tez jürisinde bulunarak tezimin şekillenmesinde, veri hazırlama ve veri analizi aşamalarında çok değerli katkıları olan sayın hocam Doç. Dr. Ahmet MERT'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışma konusunun belirlenmesinde ve yapılan ön çalışmalarda bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen ve bana her fırsatta yardımcı olan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Funda OSKAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez verilerimin analizi ve değerlendirilmesi aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Öğr. Gör. Serkan ÖZDEMİR'e

'4923-D2-17' numaralı ve 'Göhlhisar-ibecik Yöresi Kızılçam Gençleştirme Alanında *Heterobasidion annosum*'un Populasyon Yapısı' başlıklı proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na,

'118O973' numaralı ve 'Göhlhisar-İbecik Yöresi Kızılçam Gençleştirme Alanında *Heterobasidion Annosum*'dan Kaynaklanan Kök ve Alt Gövde Çürüklüğünün Belirlenmesi' başlıklı proje ile tezimi maddi olarak destekleyen TÜBİTAK'a

Arazi çalışmalarımda büyük bir özveriyle bana yardımcı olan Göhlhisar-İbecik Orman İşletme Şefi Orman Mühendisi Necati AKÇORA'ya ve tüm Tarım ve Orman Bakanlığı birimleri çalışanlarına,

Son olarak,

Tezimin her aşamasında yanımda olan değerli eşim Arş. Gör. Abdullah BERAM'a ve oğlum Uraz Mete BERAM'a, kıymetli ailem, annem, babam ve kız kardeşlerime sonsuz sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Refika Ceyda BERAM
ISPARTA, 2019

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Kızılçam'ın ülkemizdeki doğal yayılış alanı	6
Şekil 1.2. <i>H. annosum</i> 'un yaşam döngüsü	10
Şekil 1.3. Doğal konifer ormanlarında <i>H. annosum</i> 'un neden olduğu enfeksiyonun şematik gösterimi	12
Şekil 1.4. <i>H. abietinum</i> (a) ve <i>H. annosum</i> s.s. (b) basidiokarpları	12
Şekil 1.5. <i>Heterobasidion annosum</i> s. l. kompleksine ait türlerin coğrafi yayılış haritası.....	14
Şekil 1.6. <i>Heterobasidion annosum</i> s.s.'un coğrafi yayılış haritası.....	15
Şekil 1.7. <i>Heterobasidion annosum</i> s. l.'un ülkemizdeki yayılışı	17
Şekil 3.1. Araştırmanın aşamaları.....	40
Şekil 3.2. Araştırma alanı yer bulduru haritası.....	41
Şekil 3.3. İbecik Orman İşletme Şefliği meşcere haritası	42
Şekil 3.4. Sörvey çalışmalarının yapıldığı hastalık ocakları	43
Şekil 3.5. Hastalık ocaklarında yapılan örneklemenin şematik gösterimi	45
Şekil 3.6. Kızılçam bireylerinden izolasyon için toplanan üreme organları, enfekteli odun dokuları ve kök boğazından alınan disk örnekleri.....	47
Şekil 3.7. Moleküler biyoloji laboratuvarında kullanılan cihazlar	48
Şekil 3.8. Total genomik DNA ekstraksiyonu	53
Şekil 3.9. MiniOpticon Real-Time PCR sistemi (BioRad)	55
Şekil 3.10. PCR esaslı moleküler tekniklerin süreç akış şeması	57
Şekil 3.11. RAMS/ISSR primerleri kullanılarak yapılan PCR amplifikasyonlarının şematik gösterimi.....	58
Şekil 3.12. Minisatelit (VNTR) bölgesinin şematik gösterimi.....	59
Şekil 3.13. Jel elektroforezi sonucu görüntülenen bantların skorlanması.....	60
Şekil 4.1. <i>H. annosum</i> 'a ait karakteristik üreme organı.....	64
Şekil 4.2. <i>H. annosum</i> 'a ait konidilerin mikroskopik görüntüsü.....	65
Şekil 4.3. <i>H. annosum</i> 'a ait eşleştirme testi sonucu	65
Şekil 4.4. Türe özgü MJ primer çifti ile gerçekleştirilen PCR amplifikasyon ürünleri.....	67
Şekil 4.5. Somatik eşleştirme sonucu iki farklı genete sahip heterokaryotik kültür arasında meydana gelen zon oluşumu	68
Şekil 4.6. (CCA)5 RAMS primeri ile gerçekleştirilen PCR amplifikasyon ürünleri.....	70
Şekil 4.7. M13 primeri ile gerçekleştirilen PCR amplifikasyon ürünleri	71
Şekil 4.8. Twinspan analizine göre <i>H. annosum</i> s.s. izolatlarının gruplanması....	73
Şekil 4.9. <i>H. annosum</i> s.s. izolatlarının PCoA analizine göre gruplanması.....	75
Şekil 4.10. <i>H. annosum</i> s.s. izolatlarının genetik ayrımını gösteren UPGMA dendrogramı.....	77
Şekil 4.11. Jackknife istatistiği sonuçları.....	79
Şekil 4.12. Elde edilen modelin eğitim ve test veri seti AUC değerleri	80
Şekil 4.13. Modeli oluşturan değişkenlerin marjinal cevaplandırıcı eğrileri	80
Şekil 4.14. <i>H. annosum</i> 'a ait potansiyel dağılım haritalaması	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Hastalık ocaklarına ait koordinat ve yükselti verileri.....	44
Çizelge 3.2. İzolatların elde edildiği kızılçam bireylerinin ortalama boy-çap verileri	46
Çizelge 3.3. Örneklerden elde edilen izolatlar	49
Çizelge 3.4. Moleküler analizlerde kullanılmak üzere seçilen <i>H. annosum</i> s.s. izolatları.....	56
Çizelge 3.5. RAMS primerlerine ait PCR reaksiyonları.....	58
Çizelge 4.1. <i>Heterobasidion</i> izolatlarının IS gruplarının belirlenmesi amacıyla yapılan eşleştirme testi sonuçları.....	66
Çizelge 4.2. Eşleştirme testi sonucunda göre <i>H. annosum</i> izolatlarına ait genet sayıları.....	69
Çizelge 4.3. RAMS ve M13 primerlerine göre polimorfizm oranı	71
Çizelge 4.4. Farklı hastalık ocaklarından izole edilen <i>H. annosum</i> izolatları arasındaki genetik farklılık.....	72
Çizelge 4.5. MRPP analizi sonucunda elde edilen T ve A değerleri.....	73
Çizelge 4.6. Twinspan cluster analizine göre <i>H. annosum</i> s.s. izolatlarının grup renklenmesi.....	74
Çizelge 4.7. <i>H. annosum</i> izolatlarına ait genet sayıları ve izolatlara göre dağılımı	75
Çizelge 4.8. Çevresel değişkenler arasında uygulanan Pearson korelasyon analizi sonuçları.....	78

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFLP	Çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi
Bp	Baz çifti
DCA	Eğilimsiz uyum analizi
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksinükleozit trifosfat
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
GPS	Küresel konumlama sistemi
Ha	Hektar
H.O.	Hastalık ocağı
ISSR	Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm
I.S.	İnter steril
LUKE	Finlandiya Doğal Kaynaklar Enstitüsü
MAXENT	Maksimum entropi
MEA	Malt ekstrakt agar
mμ	milimikron
mM	Milimolar
μM	Mikromolar
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
MRPP	Çoklu permutasyon testi
OGM	Orman genel müdürlüğü
PCoA	Çok boyutlu ölçeklendirme analizi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAMS	Rastgele amplifike olan mikrosatelit markörleri
RAPD	Rastgele çoğaltılmış DNA polimorfizmi
RFLP	Sınırlı parça uzunlukları polimorfizmi
s.l.	sensu lato
s.s.	sensu stricto
SSR	Basit tekrarlı mikrosatelitler
SYM	Sayısal yükseklik modeli
TWINSPAN	İki yönlü gösterge analizi
UPGMA	Aritmetik ortalamaları kullanılan ağırlıklı olmayan çift grup yöntemi
UTM	Evrensel enlem merkatörü
V	Volt
VNTR	Değişken sayılı ardışık minisatelitler

1. GİRİŞ

Yeryüzündeki karasal ekosistemin önemli bir kısmını oluşturan orman ekosistemleri, aynı zamanda bitkisel biyokütlenin büyük bir kısmını barındırmaktadır (Houghton, 2005; FAO, 2015). Bu ekosistemler, endüstrinin odun hammaddesi ihtiyacını karşılamasının yanı sıra insanoğlunun temel ihtiyaçlarının karşılanmasında, yerel ve küresel düzeyde iklim koşullarının düzenlenmesinde, hidrolojik döngüye katkı sağlayarak su rejiminin iyileştirilmesinde, biyolojik çeşitliliğin ve yaban hayatının sürdürülmesinde ve erozyonun önlenmesinde görev alan ekolojik, ekonomik ve sosyal fonksiyonlara sahip açık sistemler olarak bilinmektedir (Kezik ve Kocaçınar, 2015).

Ormanlardan sağlanan ürün ve hizmetlere olan ihtiyaçlar, artan nüfus ve sanayileşmenin gereksinimlerinin karşılanmasına paralel olarak gün geçtikçe artmakta, böylece ormanlar üzerindeki baskı her geçen gün büyümektedir. Son yıllarda insanoğlunun karşısına çıkan iklim değişikliği, sağlıklı su kaynaklarının yetersizliği, biyoçeşitliliğin tehtidi gibi son derece önem arz eden çevre sorunları dikkate alındığında giderek azalmakta olan orman kaynakları daha da önemli hale gelmiş bulunmaktadır (Costanza ve Jorgensen, 2002).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO) tarafından yapılan açıklamaya göre dünyadaki toplam orman alanı 1990 yılında 4 milyar 128 milyon hektar (ha) iken, 2015 yılında 3 milyar 999 milyon ha olarak rapor edilmiştir (FAO, 2015). Yenilenebilen bir doğal kaynak olmasına rağmen, ormanlara yapılan aşırı ve bilinçsiz müdahaleler, tekniğe uygun olmayan ormancılık çalışmaları ve ormanların sosyal ve ekolojik işlevleri göz önüne alınmadan yapılan faydalanma işlemleri sadece ağaçları değil, orman ekosistemini oluşturan diğer canlı ve cansız tüm varlıkları olumsuz etkilemektedir. Doğal bir orman ekosisteminin bileşenleri, insan müdahaleleri sonucu değiştirildiğinde, hastalık etmenlerinin faaliyetleri tahripkar boyutlara ulaşabilmekte ve mevcut ekosistem dengesi üzerinde geri dönülmesi mümkün olmayan neticelere neden olabilmektedir. Dolayısıyla abiyotik (rüzgâr, don, kar vb.) ve biyotik (fungus, böcek, bakteri vb.) faktörler her ne kadar doğal ekosistemin bir parçası olsalar da, tüm bu sebeplerden dolayı orman ekosistemlerinin sağlığını ve geleceğini önemli derecede tehdit etmektedir (Aday ve Doğmuş Lehtijärvi, 2007).

Orman patojenlerinin sebep oldukları zararlar genellikle şiddetli, uzun vadeli ve hafifletilemez olarak görülmektedir. Hastalık etmeninin oluşmasında uygun çevre koşulları, duyarlı bir konukçu ve hastalık oluşturabilen bir patojen yeterli olmaktadır. Bu etmenlerinin faaliyetleri sonucunda orman ekosistemlerinde ağaçların ölmesi, artımın azalması, rejenerasyonun gecikmesi, tür değişimi, ticari odunun zarar görmesi gibi hem ekonomik hem de ekolojik açıdan da önem taşıyan yerel veya daha geniş çapta istenmeyen durumlar ortaya çıkabilmektedir (Doğmuş Lehtijärvi vd., 2012; Oskay vd., 2014). Bitki ve hayvan türlerinin yaşayabilme yeteneklerinden, ormanların verimine ve karbon tutumuna kadar birçok önemli konuda zarara neden orman patojenleri, dünya çapında orman ekosistemleri için önemli tehdit unsurları arasında yer almaktadır (Klopfenstein vd., 2009).

Orman patojenlerinin orman ekosistemleri üzerindeki etkilerinin iklim değişikliği gibi kaygı uyandıran çevresel sorunların süregelmesi ile zamanla artması beklenmektedir. Ormanlar üzerinde baskı oluşturduğu bilinen bu çevresel sorunlar, beraberinde hastalıkların yer veya form değiştirmesi gibi olayları getirebilmektedir (Kenis ve Branco, 2010; Williams vd., 2010; Aukema vd., 2011). Orta Avrupa için gerçekleştirilen bir iklim senaryosuna göre, 2030 yılında ortalama sıcaklıkta ve yağış miktarında meydana gelebilecek değişiklikler ile mikro klimanın, orman sınırlarını daha kuzeye taşınacağı ve bunun sonucunda ağaçlarda meydana gelen hastalık ve ölümlerin gün geçtikçe artış göstereceği belirtilmiştir (Szedlak, 1996; Asan, 1998).

Ormanların küresel ısınma gibi hayati konulardaki stratejik rolü düşünüldüğünde, ormanların korunması ve sürdürülebilir yönetimine yönelik faaliyetlerin üzerinde daha fazla durulması gerekmektedir. Ormanların sürdürülebilirliği, büyük oranda doğal kaynakların korunmasına ve doğru yöntemlerle yönetilmesine bağlıdır. Patojenlerin neden olduğu hastalıklar için uygulanan bilinçsiz mücadele yöntemleri, doğal dengenin bozulmasına yol açarak; canlı-cansız tüm çevreyi ciddi boyutta etkilemektedir. Dünya nüfusunun artışına bağlı olarak, kişi başına düşen yıllık odun hammaddesi arz açığı göz önünde bulundurulduğunda; ormanların bakımı ve gençleştirilmesi, ormanı tahrip eden abiyotik ve biyotik faktörlerle etkin şekilde mücadele edilmesi ve hızlı gelişen tür ağaçlandırmalarına ağırlık verilmesi gibi çeşitli tedbirlere ihtiyaç duyulmaktadır (OGM, 2014).

Ormanlarımızın sağladığı tüm bu hizmetler göz önünde bulundurulduğunda, birçok canlıya yaşama ortamı sağlayan, bu paha biçilemeyen tabii kaynağın korunması ve gelecek nesillere bırakılabilmesi için Sürdürülebilir Orman Yönetimi (SOY) kriter ve göstergelerine uygun olarak yönetilmesi büyük önem arz etmektedir. Bu kapsamda hem dünyada hem de bölgesel olarak üzerinde durulan SOY kriterlerinin başında orman ekosisteminin sağlığının korunması ve bu sistem içinde yer alan biyolojik çeşitliliğin sürdürülmesi gelmektedir (Adamowics, 2003).

Dünya’da ve ülkemizde zarara neden olan hastalık etmenlerinin, ormanlarda doğurabileceği tahribatı önlemek, azaltmak ve onlarla mücadele edebilmek için morfolojik ve moleküler olarak detaylı bir şekilde tanımlanması ve elde edilen veriler ışığında olası epidemiler için etkin stratejiler geliştirilerek önlemler alınması büyük önem arz etmektedir. Hastalık etmenleri için doğru ve etkin kontrol stratejileri geliştirebilmek ise ancak buna neden olan etmenin biyolojik özelliklerinin ve populasyon yapısının iyi tanımlanmış olmasıyla mümkün olmaktadır.

Bir organizmanın populasyon yapısını belirlemeye yönelik çalışmalar genel olarak iki farklı perspektiften ele alınmaktadır. Ekolojik esaslı çalışmalarda populasyonda bulunan bireyler yaş, cinsiyet, boy, ağırlık gibi parametrelere bağlı olarak incelenirken, genetik esaslı çalışmalarda özellikle populasyonlar içindeki genetik çeşitlilik miktarı, gen akışı ve mutasyonlar gibi bazı parametreler kullanılmaktadır (White ve Culver, 2011). Populasyon yapısının karakterize edilmesi, doğal populasyonların geçmişteki ve günümüzdeki yayılışlarını karşılaştırılabilir, populasyonları koruyabilmek ve evrimsel olarak istikrarlı türlerin devamlılığını sağlayabilmek için oldukça önemlidir. Bu sayede iklim değişikliği gibi değişen çevresel faktörlerin populasyonlar üzerindeki baskılayıcı etkileri ve önemi açıklanabilmektedir (Alam, 2016).

Bireyler arasında bulunan genetik çeşitliliğin temeli gen dizilimindeki farklılıklar olarak bilinmektedir. Tür içi ve türler arası genetik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler çevresel faktörlerden etkilenmekte ve oldukça uzun süre takip gerektirmektedirler. Bireylerin DNA’larının moleküler düzeyde karşılaştırılmasını sağlayan moleküler markör tekniklerinin geliştirilmesiyle farklı ekolojilerdeki genetik materyaller daha kolay karakterize

edilebilmekte, böylece bireylere ait genetik varyasyonlar daha hızlı ve güvenilir biçimde belirlenebilmektedir (Akcan vd., 2008).

İlk kez 1821 yılında Fries tarafından rapor edilen *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. (1888), geniş ölçüde Kuzey Yarımküre ormanlarında dağılım gösteren, koniferlerde kök ve alt gövdede çürüklüğe neden olan en tahripkar funguslardan birisidir. Uzun yıllar süren araştırmalar sonucunda, *H. annosum* bir kompleks olarak tanımlanmış ve *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. sensu lato (s. l.) olarak adlandırılan bu komplekse ait türler morfolojik özelliklerinin ve konukçu tercihlerinin farklılığından yola çıkarak sınıflandırılmıştır (Korhonen, 1978; Capretti vd., 1990, Niemelä ve Korhonen, 1998). Avrupa, Kuzey Amerika, Rusya, Çin ve Japonya’da yayılış gösterdiği bilinen bu kompleks, son 40 yıl içerisinde yaklaşık 1.700 bilimsel makaleye konu olmuş, orman patolojisinde geçmişten günümüze üzerinde en fazla araştırmanın yapıldığı türleri kapsamaktadır. (Garbelotto ve Gonthier, 2013).

Geniş bir konukçu dizisine sahip olan fungusun neden olduğu kök çürüklüğü, bugüne kadar 45 çam, 25 göknar ve 10 ladin türünün de içinde yer aldığı 200’den fazla odunsu bitki türünde tespit edilmiştir (Garbelotto ve Gonthier, 2013). Ormancılık açısından pratikte kullanılan uygulamalar *H. annosum*’un yayılışına uygun koşullar meydana getirmekte ve böylelikle patojen, ağaçlarda açılmış yaralardan, aralama veya tıraşlama kesimleri uygulanmış alanlarda bırakılan dip kütüklerinden kolaylıkla penetre olabilmektedir. Hastalık etmeni bir kez kolonize olmayı başardıktan sonra, kök kaynaşması yoluyla civardaki ağaçların kök sistemlerine atlamakta ve ağacın en değerli kısmı olan alt gövdede kök boğazından başlayıp 10 m’ye varabilen çürüklükler oluşturmaktadır (Korhonen, 1978).

H. annosum kompleksine ait intersteril (IS) grupların belirlenmesinde, tür içi ve türler arası genetik çeşitliliğin tespitinde genellikle klasik bir yöntem olan eşleştirme testleri kullanılmaktadır (Korhonen, 1978; Stenlid ve Karlsson, 1991; Korhonen vd., 1998a). Araştırmacılar tarafından sıkça kullanılan bu klasik yöntemin yanı sıra, türlerin pektik izoenzim profillerinin (Karlsson ve Stenlid, 1991) ve yağ asitleri-sterol profillerinin belirlenmesi (Muller vd., 1995) gibi serolojik analizler de mevcuttur. Ayrıca rastgele çoğaltılmış DNA polimorfizmi (RAPD) (Garbelotto vd., 1993; Fabritius ve Karjalainen, 1993; Porta vd., 1993), M13 minisatelit parmak izi analizi (Karlsson

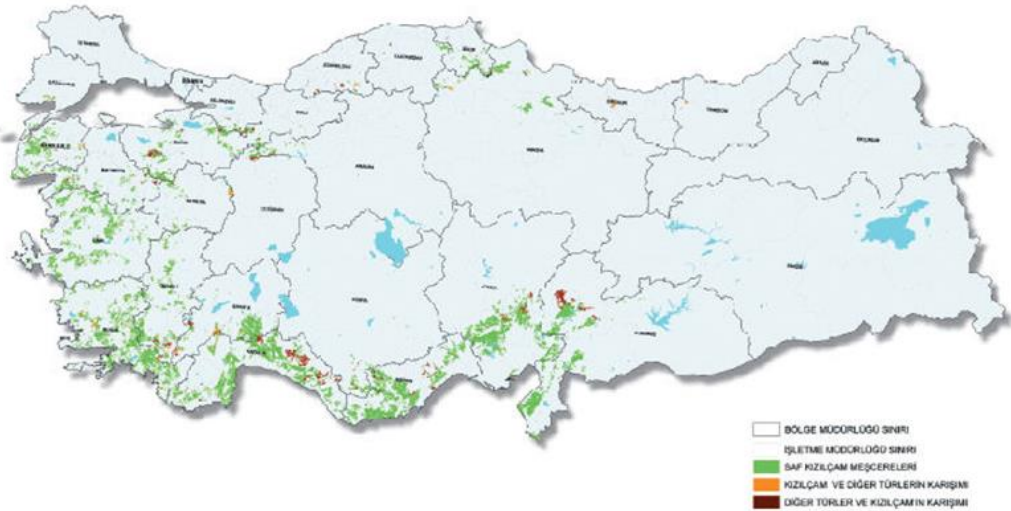
1994; Stenlid vd., 1994), rastgele amplifike olan mikrosatelit markörleri (RAMS) (Hantula vd., 1996) ve ribozomal DNA dizilemesi (Kasuga vd., 1993) gibi PCR tabanlı moleküler teknikler *Heterobasidion* cinsinin genetik çeşitliliğin belirlenmesi veya genetik haritalarının oluşturulması çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu doktora tez çalışması, Burdur ilinin Gölhisar-İbecik ilçesinde kızılçam gençleştirme sahasında yayılış gösteren *H. annosum*'un, populasyon yapısının belirlenmesi amacıyla, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü'nde yürütülmüştür. Bu amaçla, çalışma sahasında tespit edilen hastalık ocaklarındaki kızılçam bireylerinden toplanan üreme organları, enfekteli odun dokuları ve kök boğazından alınan diskler, fungal etmenin izolasyonu amacıyla uygun şartlar altında laboratuvara getirilmiştir. Elde edilen *Heterobasidion* izolatlarının morfolojik ve moleküler teşhisleri gerçekleştirildikten sonra, farklı kızılçam bireylerinden elde edilen izolatlar arasındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla somatik eşleştirme testleri uygulanmıştır. Sonrasında seçilen izolatlar ile minisatelit ve mikrosatelit markörler kullanılarak PCR tabanlı moleküler teknikler yardımıyla populasyon yapısı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, MAXENT yöntemi ile hastalığın yayılışını etkileyebilecek çevresel faktörlere ait verilerin ilişkilendirilmesi suretiyle çalışma alanı için potansiyel dağılım modellemesi yapılmıştır.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Kızılçam hakkında genel bilgiler

Ülkemiz 78 milyon ha'lık alanıyla, ılıman iklim koşullarına sahip ülkeler arasında ekolojik açıdan oldukça zengin bir çeşitliliğe sahip bulunmaktadır. Bu zengin çeşitlilik nedeniyle ulusal öneminin yanı sıra küresel düzeyde de dikkat çekmekte ve dünyada orman varlığını arttıran ender ülkeler arasında yer almaktadır. Ülkemizin toplam orman alanı, 2015 yılı sonu verilerine göre 22.34 milyon ha olup, Türkiye yüzölçümünün %28.6'sını kaplamaktadır. Genel ormanlık alanın %33'ünü geniş yapraklı ormanlar, %48'ini iğne yapraklı ormanlar, %19'unu ise karışık ormanlar oluşturmaktadır. Bu ormanlarda en geniş yayılış alanına sahip asli çam türümüz (Şekil 1.1), 5.6 milyon ha (%25) ile kızılçamdır (OGM, 2015).



Şekil 1.1. Kızılçam'ın ülkemizdeki doğal yayılış alanı (OGM, 2015)

Bitkiler aleminin tohumlu bitkiler (*Spermatophyta*) bölümü, açık tohumlular (*Gymnospermae*) alt bölümü *Coniferae* sınıfı *Pinaceae* familyasının *Pinus* cinsi içerisinde yer almakta olan kızılçam (*Pinus brutia* Ten.), Türkiye’de doğal yayılış gösteren beş çam türünden birisidir (Anşin, 1994). Dünya’daki doğal yayılışını Kuzey Yarımküre’de 15-45 doğu boylamları ile 32-45 kuzey enlem dereceleri arasında, en batı ucu Kalabriya yarımadası, en doğu noktası Irak’ın kuzeyinde “Zavita Atrush” bölgesi olmak üzere yaptığı bilinmektedir (Asmaz, 1993). Genel coğrafi yayılışı Doğu Akdeniz Havzası ve özellikle Türkiye topraklarıdır. Akdeniz, Ege ve Marmara bölgelerinde saf ormanlar kuran kızılçam, Orta ve Batı Karadeniz bölgesinin kıyı ve iç kesimlerinde münferit veya meşcereler halinde bulunmaktadır (Anşin vd., 1993; Boydak vd., 2006; İlter vd., 2011). Sadece Türk ormancılığında değil, yabancı kaynaklarda da son dönemde Türk Çamı-Türk Kızılçamı olarak kullanımı yaygınlaşmaktadır (OGM, 2013).

1.1.1.1. Kızılçam yetişme ortamı özellikleri

Türkiye’de kızılçam, Akdeniz Bölgesi’nde deniz seviyesinden başlayarak 1200 metre yükseltiye kadar saf meşcereler halinde görülmektedir. Burdur Gölhisar ormanlarında 1595-1600 m yükseltilere kadar meşçere formunda bulunmaktadır. Akdeniz Bölgesinde 1200 m’den sonra karaçam ile karışım yapmaktadır. Marmara’da 0-700 m’ler arasında saf halde veya fıstık çamı ve servi ile karışık meşcereler kurmaktadır.

Ege Bölgesi'nde 0-800 m yükseltilere kadar saf, 800-1000 metrelerde ise karaçam ile karışık halde bulunmakta, Uşak dolaylarında 1100-1150 m'ye kadar görülmektedir. Batı ve Orta Karadeniz'de serin iklim etkisinden korunmuş vadilerde ve güney bakılı yamaçlarda 600-700 m yükseltilere kadar çıktığı bilinmektedir (Genç vd., 1997; Kantarcı, 1998; Genç, 2004).

Kızılçam ormanları, ılık ve yağışlı kış mevsiminin hakim olduğu yetişme ortamlarında yayılmaktadır. Bu yetişme ortamları Akdeniz Bölgesinde güney bakılarda, Ege bölgesinde güneybatı bakılarda, Karadeniz bölgesinde derin vadilerde güney bakılarda bulunmaktadır (Kantarcı, 1984). Kızılçamın orman kurduğu alanda, ortalama sıcaklık değerleri 11-20°C, ocak ayındaki ortalama sıcaklık değerleri 1.5-12.5°C, yaz aylarındaki ortalama sıcaklık değerleri ise 20-27.5 °C aralığındadır (Kantarcı, 1998). Yıllık yağış değerleri; ortalama 420-1920 mm, yaz aylarında 20-200 mm, ocak ayında ise 80-550 mm'dir. Yıllık ortalama bağıl nem değerleri ise %63-72 arasında değişmektedir. Kızılçamın doğal olarak yayıldığı çoğu bölgede hakim rüzgar yönü batı ve güneybatı olarak bildirilmiştir (Saatçioğlu, 1969; Özdemir, 1977; Kantarcı, 1984).

1.1.1.2. Kızılçamın botanik özellikleri

Kızılçam, kıyı kesimlerde 15-20 m boy, 60 cm çap yapabilen kalın dallı bir ağaçtır. Rakım yükseldikçe, çoğunlukla düzgün olmayan gövdeler düzgünleşmeye, boylar artmaya (20-25 m), tepeler sivrileşmeye ve dallar incelmeye başlamaktadır. Genç sürgünler tüysüz, kalın ve koyu kırmızı renkte olup bu tür ismini taze sürgünlerinin kırmızı renginden almaktadır (Selik, 1963; Davis, 1965). İleri yaşlarda sivri yapıdaki tepe geniş dağınık tepeye dönüşmekte, boz renkli düzgün yüzeyli kabuk ise derin çatlaklı, esmer, kırmızımsı renkli kalın bir kabuk halini almaktadır. Düzgün dallar genellikle gövdeden dik bir açıyla çıkmakta ve uçlarında çoğunlukla kısa sürgünler bulunmaktadır (Gökmen, 1970; Anşin ve Özkan, 1993; Gökşin, 2001).

Sert ve koyu yeşil renkteki iğne yaprakların 10-18 cm aralığındadır. Yapraklar reçine kanallarının genişliği ve çevre yapısı gibi özellikler ile Halep çamı yapraklarından ayrılmaktadır (Yaltırık ve Efe, 2000). Parlak, açık kahverengi renkteki kozalaklar 6-11 cm boyutlarında ve topaç şeklindedir. Çok kısa saplı ya da sapsız olan kozalaklar sürgünlere dik oturmakta veya genellikle 2-6 adedi bir arada çevrel halde

bulunmaktadır. Apofiz yan pervazlı, göbek büyük ve Halep çamının aksine içe doğru hafif basık şekildedir (Kayacık, 1965; Anşin ve Özkan, 1993).

Kızılçam, tipik bir ılık ağacı olmakla birlikte kurak koşullara son derece dayanıklı, çok farklı toprak koşullarında başarıyla yetişen ve yetiştirilen, Türkiye'nin en önemli hızlı gelişen ağaç türüdür. Kızılçam gibi büyüme enerjileri yüksek, ağaçlandırma çalışmalarında fazla tercih edilen ve geniş yayılım alanına sahip yerli türlerimiz endüstri açısından büyük önem göstermektedir (OGM, 2013). Özellikle gelişmekte olan ülkelerde giderek genişleyen sanayi, yerleşim alanı ihtiyacı ve nüfus sayısı artışına bağlı olarak mevcut arz kaynaklarının yetersiz kalması hızlı gelişen tür ağaçlandırmalarının önemini gün geçtikçe gözler önüne sermektedir. Bu nedenden dolayı ormanlık ve orman sınırları dışındaki alanlarda hızlı gelişen ağaç türlerinin yetiştirilmesi, odun hammaddesi ihtiyacı açısından büyük bir önem taşımaktadır. Hızlı gelişen türlerin en cazip tarafı bu türlerin kısa idare süreleri içerisinde yüksek miktarlarda hacim sağlamaları, özetle hızlı büyümeleridir. Bu nedenle hızlı gelişen tür çalışmaları, ormanlarımızın zenginleşmesi ve birim alandaki hacim artımı açısından büyük önem göstermektedir (OGM, 1982).

1.1.2. *Heterobasidion annosum* hakkında genel bilgiler

1.1.2.1. *H. annosum*'un tarihçesi

H. annosum, ilk kez 1821 yılında Alman bilim adamı Elias Fries tarafından *Polyporus annosum* adı altında rapor edilmiştir. Orman patolojisinin kurucusu Robert Hartig 1874 yılında, koniferlerde görülen hastalıklarla bu patojeni ilişkilendirmeyi başarmış ve patojen H. Karsten tarafından *Fomes annosus* olarak yeniden adlandırılmıştır. 1878 yılında Hartig, etmenin kök ve alt gövde çürüklüğüne neden olduğunu, enfekte ettiği ağaçlardan diğer ağaçlara yayılışında kök kaynaşmasının etkili olduğunu belirtmiştir. Karsten, 1880 yılında fungusun Avrupa'da bulunduğunu fakat yaygın olmadığı için zararın önemli derecede olmadığını belirtmiştir. Fungusun bugünkü adı ise 1888 yılında Oscar Brefeld tarafından *H. annosum* olarak verilmiştir (Woodward vd., 1998).

İngiliz araştırmacı John Rishbeth, 1940–1950 yılları arasında yaptığı çalışmalarda, bu fungusun yayılışında kullandığı yolları araştırmıştır. Rishbeth (1950),

Heterobasidion'un primer enfeksiyonunun basidiosporların kütüğe ulaşması ile gerçekleştiğini ve Hartig'in 1878' de belirtmiş olduğu gibi fungusun enfekteli kütükten komşu ağaçlara kök kaynaşması ile vejetatif yolla geçebildiğini belirtmiştir. Hodges (1969) ve Laine (1976), etmenin kuzey yarımkürenin hemen hemen her bölgesinde varlığını tespit ederek, 150 farklı bitki türünde bulunduğunu rapor etmiştir.

Korhonen (1978), ladin ve çam ağaçlarından elde etmiş olduğu *H. annosum*'a ait isolatları, laboratuvar koşullarında eşleştirerek, aralarındaki uyumluluğu test etmiştir. Yapılan testler sonucunda, isolatların intersteril özellikte olduğu yani birbirileri ile eşleşmediği ortaya koyulmuştur. Araştırmacı, fungusun morfolojik özelliklerinin ve konukçu tercihlerinin farklılığından yola çıkarak gerçekleştirdiği bu çalışmada, çam ve ladin türlerini enfekte eden P ve S tipi iki farklı intersteril grubun bulunduğundan ilk kez söz etmiştir. Daha sonraki yıllarda Capretti vd. (1990), göknar türlerine özelleşmiş olduğu düşünülen F tipi üçüncü intersteril grubu rapor etmiştir.

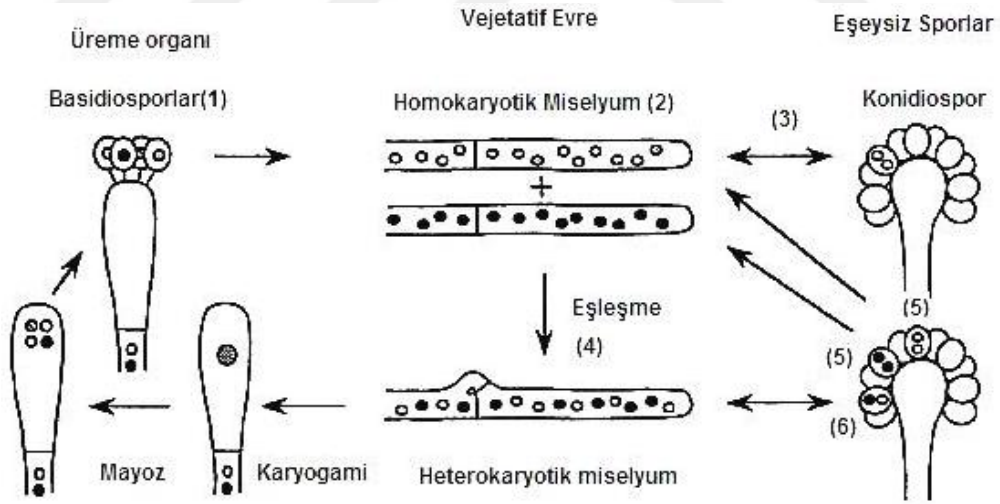
Niemelä ve Korhonen (1998), *Heterobasidion* cinsini bir kompleks olarak tanımlamış ve en doğru sınıflandırmanın bu komplekse ait intersteril grupların türler düzeyinde adlandırılmasının gerekliliğini ortaya koymuştur. Son zamanlarda verilen bilgiler ışığında Avrupa'da 3, Kuzey Amerika'da ise 2 intersteril grup resmen tanımlanmıştır (Asiegbu vd., 2005). *Heterobasidion annosum* s.l. olarak adlandırılan bu komplekse ait Avrupa'daki türler; *H. annosum* (Fr.) Bref. sensu stricto (P intersteril grubu), *H. parviporum* Niemelä & Korhonen (S intersteril grubu) ve *H. abietinum* Niemelä & Korhonen, (F intersteril grubu) olarak bildirilmiştir (Korhonen vd., 1998a). Kuzey Amerika'da bulunan türlere verilen taksonomik isimler ise *H. irregulare* Garbel. & Otrosina (P intersteril grubu) ve *H. occidentale* Otrosina & Garbel. (S intersteril grubu) 'dir (Otrosina ve Garbelotto, 2010). Bu komplekste yer alan 5 farklı türden her biri filogenetik analizler ile desteklenen markör dizilemeleri ile tanımlanmış, bunun yanında konukçu seçimlerine göre karakterize edilmiştir. Bu türlerin S, P ve F intersteril grubu olarak sınıflandırılması günümüzde kullanılmamaktadır. Bunun yerine *Heterobasidion* kompleksi olarak anılmakta ve bu komplekse ait olan türler olarak sınıflandırılmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda bu komplekste yer alan türlerin biyocoğrafik yayılışları ve evrimsel tarihi hakkında detaylı bilgiler elde edilmiş olup,

kompleks içindeki türleşmelerin, konukçu türlerin yayılışı ile 60 milyon yıl önce başladığı bildirilmiştir. Ana konukçuları çam türleri (*Pinus* spp.) olan *H. annosum* s.s. ve *H. irregulare*'nin kardeş taksonlar oldukları yani ortak bir kökenden geldikleri ve bu türlerin Avrasya'da bulunan kompleks içindeki tüm türlerin atası olduğu rapor edilmiştir (Linzer vd., 2008; Dalman vd., 2010).

1.1.2.2. *H. annosum*'un fungal taksonomideki yeri ve biyolojisi

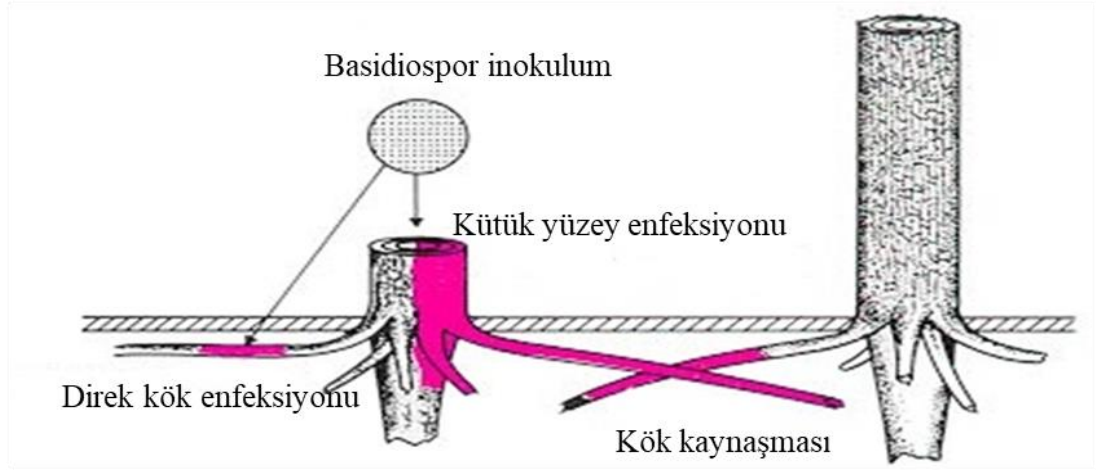
H. annosum, Basidiomycota şubesi, Agaricomycetes sınıfı, Russulales takımı, Bondarzewiaceae familyasına ait bir fungustur. Odun çürüklüğüne neden olan *H. annosum* s. l. (anamorf *Spiniger meineckellus* (A. J. Olson) Stalpers), polyporlar (Basidiomycota, Russulales, Bondarzewiaceae) içinde ender rastlanan bir özellik olan, eşeysiz sporlarının (konidilerinin) varlığı ile dikkat çekmektedir (Niemelä ve Korhonen, 1998). Nemli havalarda, çubuk şeklindeki konidioforlar üzerinde bulunan konidiler, Şekil 1. 2'de görüldüğü gibi hem homokaryotik hem de heterokaryotik miselyum tarafından oluşturulabilmektedir.



Şekil 1.2. *H. annosum*'un yaşam döngüsü. Çimlenen basidiosporlardan (1), meydana gelen homokaryotik (2) özellikte miselyum, çok çekirdekli olup, kanca oluşumuna rastlanmamaktadır (2) ve bu miselyumdan homokaryotik özellikte konidi oluşmaktadır (3). Kendiyle uyumlu bir diğer özellikte homokaryonla eşleşince, meydana gelen heterokaryotik (4) miselyum, homokaryonun tersine virulensi yüksek ve basidiokarp oluşturma özelliğindedir ve kanca oluşumları görülmektedir (4). Konidiler, homokaryotik miselyum üzerinde oluştuklarında homokaryotik (5), birbiri ile uyumlu iki homokaryonun eşleşmesinden sonra heterokaryotik miselyum üzerinde meydana geldiklerinde ise heterokaryotik karakter taşımaktadır (6). Homokaryotik

özellikteki basidiosporlar, mayoz evresinden sonra her biri farklı genotipleri temsil ederken, konidiler bir heterokaryotik ve iki homokaryotik ebeveyn olmak üzere sadece 3 genotiple temsil edilmektedirler (Doğmuş Lehtijärvi vd., (2009), Korhonen ve Stenlid (1998)'e atfen)

Fungus yaşam döngüsü boyunca hem eşeyli ve hem de eşeysiz sporları oluşturabilmektedir. Eşeysiz sporların görevi ve fungal enfeksiyondaki yeri bilinmemekle beraber, basidiosporlar yıl boyunca oluşmakta ve basidiokarplardan fırlatılan basidiosporlar, kesilmiş taze kütük yüzeylerinden ya da kök veya diğer organlarda oluşmuş yaralardan konukçuya penetre olarak (Şekil 1.3) hastalığı başlatmaktadır. Basidiosporlar, 5°C ve üzeri sıcaklıklarda ve %40 nisbi nemde aktif olarak çimlenebilmektedir. Ancak sıcaklığın düştüğü ya da 35 °C'yi aştığı dönemlerde yaşamsal faaliyetlerini minimum seviyelerde sürdürmektedirler (Asiegbu vd., 2005). Bu sporlar çoğunlukla ağaçların duyarlı olduğu yaz döneminde faaliyetlerine başlamaktadırlar (Redfern ve Stenlid, 1998). Primer enfeksiyon basidiosporların yeni kesilmiş taze kütüklerin yüzeyine ulaşması ile başlamaktadır. Fungal etmen buradan kütüğün kök sistemine geçmekte ve kök kaynaşması yolu ile çevredeki ağaçlara ulaşmakta, böylece sekonder enfeksiyon meydana gelmektedir. Sekonder enfeksiyon sayesinde hastalığın yayılışında ve artışında sporilizasyona gerek kalmamaktadır. Etmenin kök ve alt gövdede meydana getirdiği çürüklük çoğu kez ağacın ölümüne neden olmaktadır (Redfern ve Stenlid, 1998). Modern ormancılık ve ağaçlandırma uygulamaları ile birlikte, primer ve sekonder enfeksiyon yolları aracılığıyla hastalığın yayılışı gün geçtikçe daha da ciddi bir artış göstermektedir (Korhonen vd., 1998; Garbelotto ve Gonthier, 2013).



Şekil 1.3. Doğal konifer ormanlarında *H. annosum*'un neden olduğu enfeksiyonun şematik gösterimi. Basidiosporlar, kesilmiş taze kütük yüzeylerinden ya da ağaçta meydana gelen yaralardan konukçuya penetre olarak hastalığı başlatmakta ve kök kaynaşması yolu ile çevredeki sağlıklı ağaçlara yayılmaktadır (Anonim, 2019b)

Basidiosporların çoğunun, basidiokarpların etrafında görüldüğü ve hava akışına bağlı olarak uzun mesafeler kat ettiği bilinmektedir (Kallio, 1970; Swedjemark ve Stenlid, 1994a; Möykkynen vd., 1997). Bu fungus, kesilen ağaçların alanda kalan dip kütüklerinde, devrik ağaçlar üzerinde ve dikili ağaçların kök sisteminde oluşturduğu basidiokarpları ile, 40 yıla kadar canlılığını sürdürmekte (Laine, 1976; Piri, 1996) (Şekil 1.4), bu sayede bulunduğu bölgede enfeksiyon riskinin süreklilik arz etmesine neden olmaktadır (Kallio, 1970; Möykkynen vd., 1997; Doğmuş-Lehtijärvi vd., 2009).



Şekil 1.4. *H. abietinum* (a) ve *H. annosum* s.s. (b) basidiokarpları (Foto: A. Lehtijärvi, Bolu, 2014 ve R. C. Beram, Gölhisar, 2016)

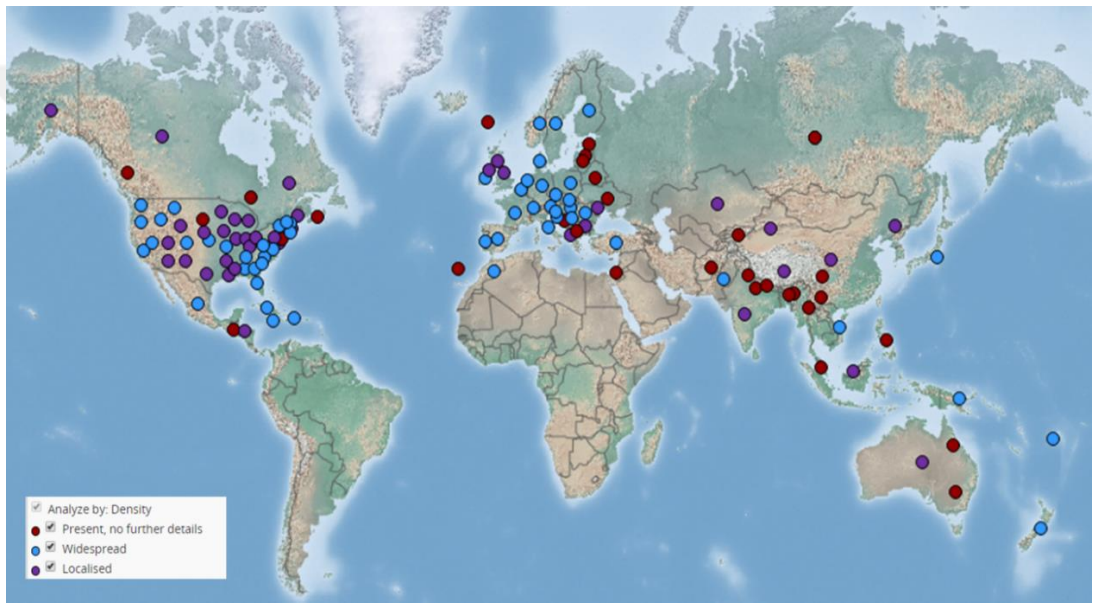
Üst kısmı kahverengi, porlu yüzeyi beyaz, toprak altında köklerde gelişen çok yıllık üreme organları, bağlı bulunduğu intersteril gruba göre morfolojik farklılıklar göstermektedir (Korhonen, 1978; Capretti ve Mugnai, 1989; Capretti vd., 1990). *H. annosum* ve *H. parviporum*'u basidiokarp morfolojilerinden ayırt etmek nispeten kolaydır. *H. annosum* geniş porlara sahip olup kahverengi sert bir üst yüzeye sahiptir, *H. parviporum* ise küçük porlu ve kahverengi yüzeyine büyüteç altında bakıldığında yumuşak, kadifemsi bir görünümündedir (Capretti vd., 1990). Genel olarak kesik kütüklerin nemli ve kuytu yerlerini tercih eden basidiokarplar sayesinde hastalık etmeninin bölgede bulunup bulunmadığı tespit edilmektedir. Bu yapılara rastlanılmadığı durumlarda ise etmenin eşeysiz sporlarından faydalanılmaktadır. Kesilen ağaçların dip kütüklerinde ya da tomruk kısımlarından alınan diskler üzerinde tespit edilen konidiler, fungusun alandaki varlığına işaret etmektedir (Greig, 1998; Doğmuş-Lehtijärvi vd., 2009).

Konidiforların nazik, kırılgan ve kuru bir yapıya sahip olmaları, konidilerin atmosfere salınımında rüzgâr, yağmur gibi vektörlere gereksinim duymaları, basidiosporların tersine onların pasif olarak taşındığına işaret etmektedir. Her ne kadar konidiler toprakta 1 yıl süreyle canlılığını sürdürebilse de (Kuhlman, 1969; Korhonen ve Stenlid, 1998), doğal koşullarda bu inokulum miktarı, basidiokarplardan çıkan spor miktarı ile karşılaştırılamayacak derecede azdır. Dolayısıyla, basidiokarpların fungusun yayılışında ve gelişiminde spor kaynağı olarak önemli görev üstlendikleri söylenebilir (Korhonen ve Stenlid, 1998). Bununla beraber, eşeyli ve eşeysiz yollardan oluşturulan sporların, hastalık etmeninin yaşam döngüsündeki rolünün araştırıldığı denemeler, her iki spor tipinin de kütükleri enfekte edebildiğini ve yakın çevredeki ağaçlarda hastalığa neden olabildiğini göstermiştir (Niemelä ve Korhonen, 1998).

Bu fungus, enfekteli odunlar ile uzun ya da kısa mesafelere rahatlıkla taşınabilmektedir. Bu tip materyaller, hastalığın bulunmadığı alanlara hastalığın taşınmasında önemli rol oynamaktadır. Daha çok saprotrof veya zayıf parazit olarak bilinen *Heterobasidion* türleri, nekrotrofik patojenler arasında da yer almaktadır. Patojenin saprotrofik fazdan nekrofit faza geçebilme kabiliyetinin, ekolojik uyumunun ve evrimsel başarısının bir sonucu olduğu düşünülmektedir (Garbelotto ve Gonthier, 2013).

1.1.2.3. *H. annosum*'un yayılışı ve ana konukçuları

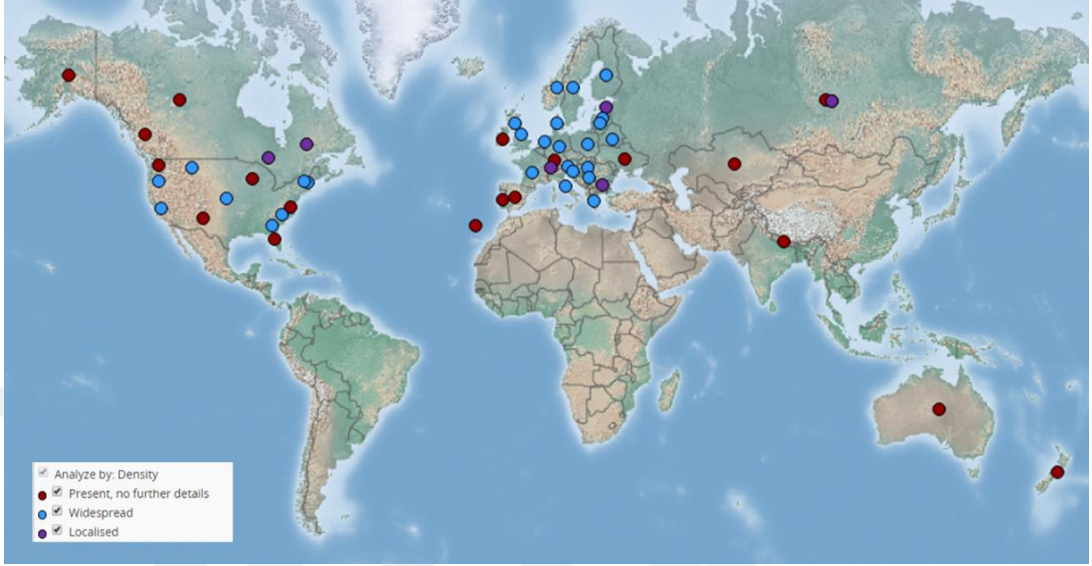
Geniş bir konukçu dizisine sahip olan fungusun neden olduğu kök çürüklüğü, 45 çam, 25 göknar ve 10 ladin türünün de içinde yer aldığı 200 den fazla odunsu bitki türünde tespit edilmiştir (Garbelotto ve Gonthier, 2013). *H. annosum* kompleksine ait türlerin, Avrupa'dan, Kuzey Amerika'ya, Çin'den Japonya'ya kadar geniş coğrafik alanlarda yayılış gösterdiği bilinmektedir (Niemelä ve Korhonen, 1998, Dai ve Korhonen, 1999; Dai vd., 2003). *H. annosum* s. l. kompleksine ait türlerin yayılışı Şekil 1.5'de gösterilmiştir.



Şekil 1.5. *H. annosum* s. l. kompleksine ait türlerin coğrafi yayılış haritası (CABI, 2019)

H. annosum s.s., Avrupa'da genel olarak kuzey bölgelerinin iç kısımları hariç çoğu yerde yayılış göstermekte ve Güney Sibirya'da Altay bölgesinin doğusuna doğru uzanmaktadır (Şekil 1.6) (Garbeletto ve Gonthier, 2013; CABI, 2019). Bu tür başta *P. sylvestris* olmak üzere çoğunlukla çamlar (*Pinus* spp.) üzerinde etkilidir (Korhonen, 1978; Garbelotto ve Gonthier, 2013). Ana konukçuları *Pinus* türleri olmakla beraber, özellikle *Picea* ve *Juniperus* gibi koniferler ve *Betula pendula* Roth, *Larix decidua* Mill, *Fagus silvatica* L. ve *Carpinus betulus* L. gibi bazı geniş yapraklı ağaç türlerini de enfekte edebilme yeteneğindedir (Lakomy, 1996; Garbelotto ve Gonthier, 2013). Dikili ağaçlar üzerinde yaygın şekilde görülmekte ve koniferlerden geniş yapraklılara kadar çok geniş bir konukçu dizisine sahip olduğu bilinmektedir (Korhonen, 1978; Piri

vd., 1990). *Pinus contorta* Douglas, *Picea sitchensis* (Bong.) Carr ve *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco etmenin neden olduğu hastalığa karşı en duyarlı türler olarak bildirilmiştir (Swedjemark ve Stenlid, 1995).



Şekil 1.6. *H. annosum* s.s.'un coğrafi yayılış haritası (CABI, 2019)

Ülkemizde bugüne kadar *H. annosum* s.l.'un çamlar üzerindeki varlığı Hatay'da *P. brutia* (Kotlaba, 1976), Ankara'da *Pinus sylvestris* L. (Selik, 1972), Antalya ve Balıkesir'de *Pinus nigra* Arn. ssp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe (Doğmuş-Lehtijärvi, yayınlanmamış) türleri üzerinde bildirilmiştir. Ancak bu kayıtlar fungusun üreme organlarının morfolojik kriterlerine bakılarak gerçekleştirilmiş olup *H. annosum* kompleksine ait IS gruplarının belirlendiği teşhis çalışmaları gerçekleştirilmemiştir. P tipi olarak bilinen *H. annosum* s.s.'un ülkemizdeki ilk tür bazındaki teşhisi Doğmuş Lehtijärvi ve arkadaşları tarafından 2007 yılında Gümüşhane ve Ordu illerinde bulunan saf göknar meşcerelerindeki *A. nordmanniana* (Steven) ssp. *nordmanniana* kütükleri üzerinde bulunan üreme organlarından elde edilen izolatlar ile yapılmıştır.

Diğer bir intersteril grup olan *H. parviporum* (S tipi) Avrupa'nın kuzey bölgelerinden güney Alplere ve batı Avrupa'dan Çin, Japonya ve güney Sibirya'ya yayılış göstermektedir. Avrasya bölgesinde geniş bir yayılışa sahiptir. Bu tür Norveç ladini (*Picea abies* (L.) Karst.) ile birlikte tanımlanmıştır. Nadiren genç çamları enfekte ettiği, Avrupa'nın ve Sibirya'nın güneyinde *P. abies* ve *Abies sibirica* Ledeb. üzerinde

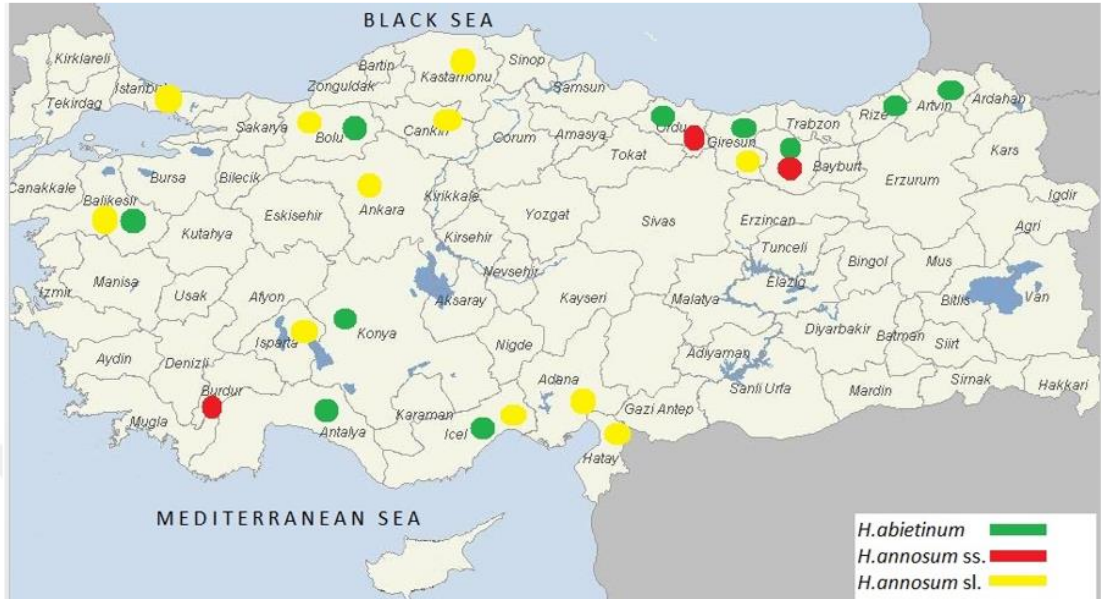
ciddi zarara neden olduğu bildirilmiştir. (Korhonen vd., 1998b; Dai vd., 2006). Bugüne kadar ülkemizde bu IS grubuna ait bir kayıt bulunmamaktadır.

Genellikle orta ve güney Avrupa’da bildirilmiş olan *H. abietinum* (F tipi)’un yayılış alanı daha dar ölçekte olup göknar (*Abies alba* Mill.) türü ile birlikte tanımlanmıştır. Güney Avrupa’da ana konukçusunun *Abies* türleri olduğu ve ayrıca Norveç ladininde de görüldüğü rapor edilmiştir (Capretti vd., 1990). Fungusun İtalyan yarımadası, Bulgaristan ve Romanya’da *A. alba* üzerinde yaygın ve oldukça tahripkar olduğu tespit edilmiştir (La Porta vd., 1998). Yunanistan’da ise, *Abies cephalonica* Loud. ve *Abies borisii-regis* Mattf. meşcerelerinde kök ve alt gövde çürüklüğüne neden olduğu bilinmektedir (Tsopelas ve Korhonen, 1996). Doğmuş-Lehtijärvi vd. (2006) ve Doğmuş-Lehtijärvi vd., (2007), yaptıkları çalışmalarda, Türkiye’nin batısından kuzeydoğusuna birçok yörede tespit etmiş oldukları *H. abietinum* türünün, Türkiye’de bulunan *H. annosum* kompleksine ait türlerden en baskın tip olduğunu bildirmişlerdir.

Kuzey Amerika’da görülen türlerin konukçularına bakıldığında, *H. irregulare* genellikle çam (*Pinus* spp.), ardıç (*Juniperus* spp.) ve tütsü sedir (*Calocedrus decurrens* (Torr.) Florin) gibi türler üzerinde bildirilmiştir. Bu tür Kuzey Amerika’nın doğu ve batı ormanlarında tespit edilmiş olmasına rağmen, buralarda yaygın olmadığı bilinmektedir (Garbelotto ve Gonthier, 2013). *H. occidentale*, daha geniş bir konukçu yelpazesine sahip olup; göknar, ladin, douglas göknarı gibi cins ve türler üzerinde tespit edilmiştir. Bu tür, Meksika’nın güneyinden Kuzey Amerika’nın batısına kadar uzanmakta ve Sibirya’nın güney kısımlarına doğru yayılış gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca *H. irregulare* ile birlikte Amerika’nın batısında bulunduğu bildirilmiştir (Garbelotto ve Gonthier, 2013).

H. annosum s.l. bugüne kadar ülkemizde (Şekil 1.7) *Abies cilicica* (Ant.& Kotschy) Carr., *Abies nordmanniana* ssp. *equi-trojani* (Syn: *A. equi-trojani*) Aschers et Sint, *Abies nordmanniana* ssp. *bornmülleriana*, *A. nordmanniana nordmanniana*, *Picea orientalis* (L.) Link, *P. brutia*, *P. sylvestris*, *P. nigra* (Lohwag, 1957; Kotlaba, 1976; Balcı, 1998; Demirel, 1999; Doğmuş-Lehtijärvi vd., 2006, 2007) türleri üzerinde tespit edilmiştir. Farklı göknar alanlarından elde edilen üreme organlarının intersteril gruplarının belirlendiği çalışmalarda; *A. nordmanniana* ssp. *bornmülleriana* ve *A. nordmanniana* ssp. *equi-trojani* üzerinde sadece *H. abietinum*, *A. nordmanniana*

ssp. *nordmanniana* üzerinde ise çoğunlukla *H. abietinum* ve çok az sayıda *H. annosum* s.s. tespit edilmiştir (Doğmuş-Lehtijärvi vd., 2006, 2007).



Şekil 1.7. *H. annosum* s. l.'un ülkemizdeki yayılışı

1.1.2.4. Hastalık oluşumunu etkileyen faktörler

Dikili ağaçta vejetatif miselyumun yayılışı ve oluşturduğu çürüklüğün şiddeti, konukçu türüne, yaşına, odununun nem miktarına, odunda bulunan endofitlere, uygulanan silvikültürel tekniklere bağlı olarak değişebilmektedir (Korhonen ve Stenlid, 1998). Konukçunun bulunduğu sahanın konumu, geçmişteki durumu, aktüel durumu, ekolojik faktörler hastalığın oluşumunda önemli faktörlerdir (Thor vd., 2005; Tokuda vd., 2011). Yapılan çalışmalarda, etmenin yayılışı ile sahanın yüksekliği, eğimi ve bakısı arasında nadir de olsa korelasyonlar görülebilmektedir. Bunun yanı sıra toprak tipi fungusun yayılışını önemli derecede etkilemektedir. Düşük organik madde içeriğine sahip kumlu topraklar ve verimli topraklar üzerinde hastalığın daha şiddetli olduğu tespit edilmiştir. İngiltere’de uzun süren çalışmalar sonunda, hastalık şiddetinin mineralli topraklarda turba topraklara nazaran daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. Genellikle eski tarımsal arazilerde ve meralarda patojenin meydana getirmiş olduğu zarar, orman topraklarına göre daha yüksek bulunmuştur (Redfern vd., 2010; Garbelotto ve Gonthier, 2013). Yüksek kalsiyum içeriği ve pH değeri, topraktaki

antagonist fungus aktivitesini azaltarak hastalık oluşumunu büyük oranda etkilemektedir (Korhonen ve Stenlid 1998; Gonthier vd., 2012).

Konukçular arasındaki farklılıklara bakıldığında, reçineli diri oduna sahip türlerde hastalık etmeni çoğunlukla kök ve gövdede yerleşmekte ve buna bağlı olarak rüzgâr devrikleri ya da ani ölümlerde artış gözlemlenmektedir. *Pinus* sp. ve *Larix* sp. türlerinde fungusun ağacın kök boğazından 1-3 m yüksekliğe ulaştığı ve buralarda çürüklüğe neden olduğu bilinmektedir. Reçinesiz diri oduna sahip ağaç türlerinde ise (*Picea* spp. ve *Abies* spp.) fungus genellikle diri odunu tercih ettiği için, hastalık diri odunun oluşmaya başladığı dönemler olan 25-40 yaşları arasında görülmektedir. Bu türlerde ağacı doğrudan ölüme sürüklemeksizin gövde içinde ilerleyerek, yayıldığı bölgenin tamamen çürümesine neden olmaktadır. Yaşlı göknar ve ladin gövdelerinde bu çürüklüğün 2-4 ya da 5-8 metre arasındaki yüksekliklere ulaştığı, hatta bazen 9-12 m' ye kadar çıktığı saptanmıştır (Asiegbu vd., 2005).

Ağaçların ilerleyen yaşlarda *H. annosum* 'a karşı hassasiyetlerinin arttığı bilinmektedir (Woodward vd., 1998). Ağaç fungal enfeksiyon sonrası reçine sekresyonu ve fenolik bileşiklerin açığa çıkması ile hastalık etmenine karşı savunma mekanizması geliştirmektedir. Bunun sonunda sağlıklı ve hastalıklı odun dokusu arasında zon tabakası meydana gelmektedir. Enfekteli ağaçlarda artım kaybı görülmekte ve bu ağaçlar abiyotik zararlara karşı daha hassas hale gelmektedir (Holdenrieder ve Grieg, 1998).

1.1.2.5. *H. annosum* ile mücadele

Hastalık etmeninin kontrol ve mücadelesine ait çalışmalar 100 yılı aşkın bir süre öncesinde başlamıştır (Woodward vd., 1998). Günümüzde bu çalışmalar silvikültürel, kimyasal ve biyolojik kontrol olmak üzere 3 ana başlık altında toplanmaktadır.

1.1.2.5.1. Silvikültürel mücadele yöntemleri

Silvikültürel mücadele çalışmalarında *Heterobasidion* spp.'nin neden olduğu zararın, etmeninin biyolojisine ve diğer organizmalar ile ilişkisine bağlı olarak doğru şekilde ve doğru zamanda yapılan ormancılık uygulamaları ile azaltılması amaçlanmaktadır

(Korhonen vd., 1998a). Ormanlarda ılık iklim koşullarının mevcut olduğu aylarda gerçekleştirilen silvikültürel müdahaleler havada bulunan basidiosporların taze kütük yüzeylerinde veya ağaçlarda meydana gelen yaralarda çimlenerek enfeksiyon oluşturmaları için ideal koşulları oluşturmaktadır. Havada hastalık etmeninin sporlarının yoğun olduğu bu dönemlerde silvikültürel müdahalelerden kaçınmak ya da mutlaka yapılması gerekiyorsa, en azından gerekli önlemleri alarak ağaçların bu etmenden korunmasını sağlamak büyük önem göstermektedir. Ayrıca hastalığın yayılış gösterdiği alanlarda yeni yapılan ağaçlandırma çalışmalarında monokültür ağaçlandırmalar yerine ibrelili ve geniş yapraklı türlerin bir arada kullanılması hastalığın kök kaynaşması yolu ile yayılışını önlemektedir (Kallio, 1970; Swedjemarm ve Stenlid, 1993; Redfern ve Stenlid, 1998).

Ağaçlandırma çalışmalarında uygulanan ilk rotasyonlarda *Heterobasidion* spp.'a karşı daha dirençli olduğu bilinen geniş yapraklı türlerin kullanılması toprak mikroflorasının zenginleşmesini ve buna bağlı olarak *Heterobasidion* etmeni ile rekabet eden diğer organizmaların toprakta artış göstermesini sağlamaktadır (Korhonen vd., 1998a; Linden ve Vollbrecht, 2002; Lygis vd, 2004a; Lygis vd, 2004b). Ağaç yaralanmalarından kaçınmak ve yapılan fertilizasyonlar hastalığın önlenmesinde önemli birer faktördür (Korhonen vd., 1998a). Kök sisteminde yerleşmiş bulunan *H. annosum*'un uzaklaştırılması ise, ancak kütüklerin köklenerek imha edilmesiyle gerçekleştirilmektedir (Woodward vd., 1998).

1.1.2.5.2. Kimyasal mücadele yöntemleri

Yapılan çalışmalar, fungal etmenin primer enfeksiyonunun basidiosporların yeni kesilmiş taze kütük yüzeyine ulaşması sonucu gerçekleştiğini, buradan da komşu ağaçlara vejetatif kök kaynaşması yoluyla yayıldığını göstermiştir (Hartig, 1878; Rishbeth, 1950, 1951, 1957). Patojenin çevredeki ağaçlara yayılışında izlemiş olduğu yol göz önünde bulundurularak, hastalığın engellenmesinde kesilmiş kütüğe yapılan uygulamalar önem kazanmıştır (Doğmuş-Lehtijärvi vd., 2010).

Literatürde *H. annosum*'un kontrolü için zaman içinde çeşitli kimyasal maddeler denenmiş olup, memeliler için en az toksik madde özelliği gösteren üre ve boraks uygulamaları önem kazanmıştır (Brandtberg vd., 1996). Yapılan silvikültürel

müdahalelerin ardından kesik kütük yüzeyine yapılan üre veya boraks uygulamaları, *H. annosum* tarafından meydana gelebilecek yeni enfeksiyonların önlenmesini sağlamaktadır (Möykkynen vd., 1998; Möykkynen vd., 2000; Möykkynen ve Miina, 2002). Ülkemizde arazi koşullarında *A. nordmanniana* ssp. *bornmülleriana* dip kütükleri üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada üre solüsyonu uygulamasının % 96.30, boraks uygulamasının %75.75 oranında *H. annosum* enfeksiyonunu engelleme başarısının olduğu bildirilmiştir (Doğmuş Lehtijärvi vd., 2012). Bu kimyasallar, etmenin kontrolü için pratikte en uygun ve en çok kullanılan kimyasallar olarak bilinmektedir (Pratt vd., 1998). Orman ekosistemlerinde fazla miktarda ve bilinçsiz uygulamaları sonucu meydana gelebilecek çevresel sorunları önlemek amacıyla kullanımları kısıtlanmaktadır (Westlund ve Nohrstedt, 2000).

1.1.2.5.3. Biyolojik mücadele yöntemleri

İnsan ve çevre sağlığına duyarlı, sürdürülebilir ormancılık için, zararlılarla entegre mücadele prensipleri ışığında biyolojik mücadele, dünyada büyük önem arz etmektedir. Zararlılar ile mücadele çalışmalarında kullanılan kimyasalların azaltılması veya mümkünse tamamen yasaklanması için en ümitvar yollardan biri, biyolojik kontrol ajanlarının hastalıklarla mücadelede etkin bir şekilde kullanılmasıdır (Beram vd., 2016). Uzun vadede tüm canlılığa fayda sağlayan bu mücadele yöntemi, hastalık etmenleriyle antagonistik organizmalar arasındaki etkileşimin bir ürünü olarak ortaya çıkmaktadır. Bu etkileşim tipleri; antibiyosis, rekabet, hiperparazitizm, hipovirulens, uyarılmış dayanıklılık, çapraz koruma şeklinde belirtilmiştir (Bora ve Özaktan, 1998).

Phlebiopsis gigantea (Fr.) Jülich (Basidiomycota, *Corticaceae*; syn. *Peniophora gigantea*, *Phanerochaete gigantea*, *Phlebia gigantea*), konifer ormanlarında devrik ağaç gövde ve kütüklerinde ya da diğer odun artıklarında sıklıkla rastlanan bir türdür (Holdenrieder ve Grieg, 1998). Kuzey Yarımküre’de yer alan tüm ılıman ülkelerde, *H. annosum*’a karşı yer ve besin çekişmesinde klasik bir antagonist olarak dünya literatürüne geçen *P. gigantea*, biyolojik mücadele etmeni olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Korhonen vd., (1994), Norveç ladini ve sarıçamda aralama kesimlerinden sonra kesik kütüklerin yüzeyine *P. gigantea*’nin spor süspansiyonunu uyguladıktan sonra yeni enfeksiyonların %93-96 oranında azaldığını rapor etmişlerdir. Saprotrofik yaşam sürecinde, koniferlerde kök ve alt gövde çürüklüğüne neden olan

H. annosum s. l. ile aynı substrat üzerinde yer ve besin çekişmesine girerek ve bu özelliği ile orman ağacı hastalıklarına karşı kullanılan en başarılı antagonist olarak dünya literatürüne geçmiş bulunmaktadır (Rishbeth, 1952; Meredith, 1959; Kallio, 1965; Greig, 1976; Rönnberg vd., 2006). Bu biyolojik kontrol etmeni Finlandiya ve İsveç'te ruhsatlı biyopestisit olarak kullanılmaya devam etmektedir (Doğmuş-Lehtijärvi vd., 2010). Lehtijärvi vd., (2011), *A. cilicica* kütükleri üzerinde *H. annosum*'a karşı biyolojik mücadele uygulamalarının karşılaştırılması amacıyla gerçekleştirdikleri bir çalışmada iklim odası koşullarında *P. gigantea* izolatlarının %85.9, *Trichoderma harzianum* Rifai izolatlarının %97.5 başarı sağladığını, arazi koşullarında ise bu biyolojik kontrol ajanlarının başarısının *P. gigantea* için %47.1–49.2, *T. harzianum* için %61.3–65.5 oranına düştüğünü bildirmişlerdir.

Bu yöntemlerin yanı sıra, son yıllarda yapılan çalışmalar *H. annosum* bulunan bir meşcerede, mikovirüs kullanımının biyolojik mücadelede etkili olabileceğine işaret etmektedir (Vainio vd., 2012; Aday Kaya vd., 2015). Avrupa ve Batı Asya' da *H. annosum* s.s. ve *H. parviporum* türlerinin, % 15 sıklıkla fungal virüslere konukçuluk ettiği tespit edilmiştir (Ihrmark vd., 2001). *Heterobasidion* cinsinden izole edilen mikovirüslerin, çoğunlukla *Partitiviridae* familyasına ait olduğu ve bu virüslerin, farklı *Heterobasidion* türleri arasında yayılma yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Ihrmark vd., 2001). Vainio vd., (2012), yapmış oldukları araştırmada, *Heterobasidion* türlerinde bulunan virüslerin çoğunlukla *Partitiviridae* familyasına ait olduğunu, ancak var olan bir başka mikrovirüsün termal özellik taşıyan *Curvularia protuberata* olduğunu ve bu virüsün *Fusarium graminearum* 4 virüsü ile genetik akrabalık gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu virüsü taşıyan fungal izolatlarla gerçekleştirdikleri çalışmalarında, fungal gelişimin bu virüs tarafından, %28 oranında azaltıldığını tespit etmişlerdir.

1.1.3. Moleküler markörler hakkında genel bilgiler

Moleküler markörler, genomda herhangi bir gen bölgesi veya gen bölgesi ile ilişkili DNA parçaları olarak ifade edilmekte olup DNA markörleri olarak da bilinmektedirler. Bu markörler sayesinde farklı genotiplere ait DNA diziliş farklılıkları ölçülmekte ve araştırılan genotiplerde istenen bir gen ya da özellik izlenebilmektedir.

Genetik polimorfizm; bir karakterin iki ya da daha fazla sayıda genotipinin (varyant) aynı popülasyonda görülmesi olayıdır. Popülasyonda bu şekilde bulunan genler veya fenotipik özellikler polimorfik olarak kabul edilmektedir. Polimorfizm, DNA dizisi, amino asit dizisi, kromozomal yapı veya fenotipik özellik varyantları gibi birkaç farklı düzeyde görülebilmektedir. Varyasyonların belirlenmesinde DNA dizi analizi en direkt yöntem olmasının yanında zaman alıcı ve oldukça masraflı bir yöntemdir. Bu nedenle, genetik polimorfizimlerin tespit edilmesine yönelik pek çok moleküler markör tipi geliştirilmiştir. Moleküler markör teknikleri genel olarak DNA molekülündeki polimorfik bölgelerin saptanması prensibine dayanmaktadır. (Botstein vd., 1980; Yorgancılar vd., 2015).

Morfolojik ve biyokimyasal markörler bazı dezavantajlarından dolayı günümüzde yerini moleküler markörlere bırakmakta ya da moleküler markörler ile birlikte kullanılmaktadır (Gözel vd., 2016). Küçük bir miktar DNA ile yapılan moleküler markör tekniği çalışmalarında gözlemlenen polimorfizm oranı, morfolojik ve biyokimyasal markör teknikleri ile gerçekleştirilen çalışmalara oranla daha yüksek miktarda tespit edilmektedir (Botstein vd., 1980; Williams vd., 1990; Stenlid vd., 1994. Eserkaya Güleç vd., 2010; Yorgancılar vd., 2015).

1.1.3.1. Moleküler markörlerde bulunması gereken özellikler

İdeal bir moleküler markör; bütün dokularda gözlemlenebilmeli, yüksek derecede polimorfik davranış göstermeli ve farklı genotipleri ayırt edebilmelidir. Kodominant (eşbaskınlık) kalıtım göstermeli ve heterozigot bireyleri homozigot dominant bireylerden ayırt edilebilmelidir. Genomda sık ve düzgün dağılımda bulunmalı ve nötr davranış sergilemelidir. Uygulama maliyeti düşük, tekrarlanabilirliği yüksek, değerlendirmesi hızlı ve kolay olmalıdır (Weising vd., 1995; Yorgancılar vd., 2015). Tüm bu özelliklere aynı anda sahip bir moleküler markör bulmanın zorluklarından dolayı, yapılacak çalışmanın amacına, konusuna ve çalışılacak organizmaya bağlı olarak en uygun markör belirlenmelidir.

1.1.3.2. Moleküler markör teknolojisinin kullanım alanları

DNA temelli moleküler markörler taksonomi, fizyoloji, embriyoloji, genetik mühendisliği vb. alanlarda kullanılan çok yönlü araçlardır. Bu markör teknolojileri; populasyon yapısı çalışmaları, fiziksel haritalama, gen keşfi ve etiketleme, filogenetik çalışmalar, evrimsel genetik ve genetik çeşitlilik çalışmaları, QTL (Quantitative Trait Loci) analizleri, gen kaynaklarının karakterizasyonu, genetik kaynağın yapısını anlama, duplike olan genotiplerin belirlenmesi, genetik kaynağın tekrar organizasyonu, ıslah programında kullanılacak ebeveynlerin belirlenmesi gibi pek çok alanda etkin şekilde kullanılmaktadır (Rafalski vd., 1996; Lowe vd., 1996; Gupta ve Rustgi, 2004; Schlotterer, 2004; Filiz ve Koç, 2011; Yorgancılar vd., 2015).

1.1.3.3. Moleküler markör tipleri

Kullanılan yöntemler bakımından moleküler markörler; hibridizasyon tabanlı markörler ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı markörler olarak iki temel gruba ayrılmaktadır. Hibridizasyon tabanlı markörlere örnek olarak RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), PCR tabanlı markörlere örnek olarak ise; SSR (Simple Sequence Repeat), VNTR (Variable Number Tandem Repeats), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) markör tipleri verilebilmektedir.

1.1.3.3.1. Hibridizasyon tabanlı moleküler markörler

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism/Sınırlı Parça Uzunlukları Polimorfizmi);

RFLP, PCR esaslı olmayan geliştirilmiş ilk ve en eski markör sistemidir. Bu teknikle restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA molekülünün farklı büyüklükteki fragmentlere ayrılması ve görüntülenmesi sağlanmaktadır. Elde edilen DNA parçası elektroforez ile ayrıldıktan sonra etidyum bromür ile boyanmakta ve nitroselüloz filtreye aktarılmaktadır (Southern blotting). Etiketlenmiş DNA problemlerinin hibridizasyonu sonrasında, radyoaktif etiketli, çift zincirli DNA molekülleri elde

edilmektedir (Southern, 1975; Beckmann ve Soller, 1983). Böylece DNA parçalarının kesim modellerindeki farklılıklardan yararlanılarak polimorfizm tespiti yapılmaktadır (Southern, 1975; Botstein vd., 1980; Miller ve Tanksley, 1990; Desplanque vd., 1999; Beckmann ve Soller, 1983). RFLP yöntemi southern blotting olarak uygulanabilmesinin yanı sıra PCR ile birlikte de kullanılabilir. Çalışılmak istenen lokus PCR ile çoğaltıldıktan sonra kesim enzimleri ile kesilmekte, elde edilen ürünler agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülerek polimorfizm tespiti yapılmaktadır. Restriksiyon enzimlerinin tanımlandığı bölgedeki nükleotid değişiklikleri, farklı uzunlukta DNA parçalarının oluşmasına neden olmaktadır (Gözel vd., 2016).

RFLP tekniğinin en önemli avantajlarından birisi farklı türler, cinsler ve hatta familyalar arasında kullanılabilir olmasıdır. Markörleri kodominant (eşbaskın) özelliktedir (Bark ve Havey, 1995). Bu özellik sayesinde heterozigot bireylerin de karakterize edilmesi mümkün olabilmektedir. Türler, cinsler hatta familyalar arasında transferi mümkündür. RFLP markörleri orta düzeyde polimorfizme sahiptir, tekrarlanabilirliği yüksektir ve güvenilirdir. RFLP yöntemi polimorfizm çalışmalarında ve türlerin belirlenmesinde sık sık başvurulmuş bir yöntemdir. PCR temelli moleküler markör tekniklerinin ortaya çıkışına kadar çok yaygın olarak kullanılan RFLP, sahip olduğu dezavantajları nedeniyle kullanımı sınırlı kalan bir teknik olmuştur. Analizlerinin fazla zaman alıcı ve masraflı olması, çoğu durumda radyoaktif etiketleme kullanılması ve yüksek kalitede DNA'ya ihtiyaç duyulması tekniğin dezavantajlarını oluşturmaktadır (Yorgancılar vd., 2015; Gözel vd., 2016).

1.1.3.3.2. PCR tabanlı moleküler markörler

PCR, küçük miktardaki spesifik bir DNA parçasının, *in vitro* koşullarda bir dizi enzimatik reaksiyon sonucu milyonlarca kez çoğaltılması esasına dayanmaktadır (Yorgancılar vd., 2015). PCR'ın keşfinden sonra özellikle PCR tabanlı markör çalışmalarında oldukça önemli bir artış gözlemlenmiştir.

Bir PCR döngüsü; DNA ipliklerinin birbirinden ayrılarak açılması (denatürasyon), primerin bağlanması (annealing) ve uzama (extention) olarak adlandırılan üç aşamadan oluşmaktadır. Günümüzde birçok alanda yaygın olarak kullanılan PCR

tekniki, organizmaların tanı ve teşhisi, moleküler klonlama, DNA baz dizilişlerinin belirlenmesi, genetik akrabalıkların belirlenmesi, genetik yapısı değiştirilen bitki veya mikroorganizmaların tespiti başta olmak üzere birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Yorgancılar vd., 2015).

DNA dizilişlerinin her genotipte farklı olması nedeniyle, aynı primerler kullanılsa bile her genotipte farklı DNA ürünleri elde edilmekte, elde edilen bu farklı DNA ürünleri birbirinden farklı genetik markörler olarak geliştirilmekte ve kullanılmaktadır. SSR, RAPD, AFLP ve ISSR moleküler çalışmalarda yaygın olarak kullanılan PCR kullanımına dayalı markör tipleridir (Yorgancılar vd., 2015).

SSR (Simple sequence repeat/Basit tekrarlı diziler veya mikrosatellitler)

SSR veya mikrosatellitler (Litt ve Luty, 1989) canlı genomu boyunca dağılmış ve ardışık olarak tekrarlanmakta olan 2-6 nükleotid gruplarından oluşmaktadır. Bu grupların genomun neresinde bulunduğu ve kaç defa tekrarlandığı türden türe değişiklik göstermektedir. Mikrosatellitleri çevreleyen DNA dizileri, genellikle aynı türün bireyleri arasında korunmuş olduklarından, farklı genotiplerde çakışan SSR'ların spesifik PCR primerleri ile çoğaltılarak seçimine izin vermektedir. Ardışık SSR tekrarlarının sayısındaki farklılık, PCR sonucu farklı uzunlukta parça çoğaltımı ile sonuçlanmaktadır. Bu tekrarlar çok yakın tür ve çeşitler arasında dahi tekrarlanan ünitelerin sayısında değişikliğe yol açan mutasyonlar nedeni ile oldukça polimorfiktir (Gupta vd., 1994).

Diğer tekniklere göre daha fazla bilgi içermesi, kodominant olması, az miktarda DNA gerektirmesi, yüksek polimorfizm göstermesi ve tekrarlanabilir olmasından dolayı oldukça kullanışlı bir yöntemdir (Röder vd., 1995; Powell vd., 1996). Yöntemin eksikliği ise genom bilgisi ve sekans analizi gerektirmesidir (Morgante ve Olivieri, 1993). Bunun yanında yeni SSR markörlerinin geliştirilmesi oldukça zor ve maliyetlidir. Sağladığı avantajlardan dolayı populasyon genetiği ve gen haritalama çalışmalarında etkin olarak kullanılmaktadır (Powell vd., 1996; Gözel vd., 2016). Son yıllarda dünya çapındaki birçok moleküler genetik laboratuvarında, farklı türler üzerinde SSR'lar başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Yorgancılar vd., 2015).

VNTR (Variable Number Tandem Repeats/Değişken Sayılı Ardışık Tekrarlar veya Minisatellitler)

Minisatellitler, mikrosatellitlere göre daha uzun (9-65 baz çifti uzunluğunda) ve değişken sayıda ardışık tekrarlayan dizilerdir. Genomda 1-20 kb arasında değişmekte ve çoklu lokus problemleriyle hibridize olmaktadır. Bir minisatellitteki tekrar sayısının bireyden bireye farklılık göstermesi DNA parmak izinin temelini teşkil etmektedir. Minisatellit bölgelerindeki yüksek mutasyon oranı polimorfizm oranlarını artırmaktadır (Jeffreys vd., 1985; Filiz ve Koç, 2011).

Minisatellitlerin temel avantajları arasında yüksek polimorfizm ve tekrarlanabilirlik bulunmaktadır. Benzer büyüklükte elde edilen DNA parçacıklarının homolog olmama ihtimali ve bantların lokuslar veya alleller açısından yorumlanamaması dezavantajları arasında sayılmaktadır (Filiz ve Koç, 2011). Polimorfik özelliklerinden dolayı mikrosatellitler ile aynı amaçlar için kullanılmaktadırlar.

RAPD (Random amplified polymorphic DNA/Rastgele çoğaltılmış DNA polimorfizmi)

Williams vd. (1990) tarafından geliştirilen RAPD tekniği, basit ve kısa oligonükleotid primerler kullanılarak genomik DNA'nın tesadüfi olarak dağılmış bölgelerinin amplifikasyonu olarak tanımlanmaktadır. Teknikte yalnızca bir tip primer kullanılmaktadır. Kullanılan bu primer, her iki DNA ipliğinde de 5'→3' yönünde çalışmakta ve primerin yapışabildiği DNA üzerinde birbirine yakın iki bölgenin amplifikasyonu yapılmaktadır. Amplifikasyon ürünleri agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezde ayrıldıktan sonra etidyum bromür veya gümüş nitrat boyaması ile görüntülenebilmektedir. Bu yöntemde çoğaltılmak istenen herhangi bir hedef DNA bölgesi bulunmadığından DNA dizisi bilinmeyen türler üzerinde çalışılabilme imkanı sunmaktadır. RFLP metodundaki zorlukları aşmak ve PCR tekniğinin getirdiği avantajlardan yararlanmak amacıyla geliştirilmiştir. (Williams vd., 1990).

RAPD markörlerin hızlı sonuç vermesi, diğer tekniklere göre maliyetinin düşük olması, az iş gücü gerektirmesi, polimorfizm oranının yüksek olması ve RFLP tekniğinin aksine az miktarda DNA'nın yeterli olması tekniğin avantajları arasında

bulunmaktadır. En büyük dezavantajı ise tekrarlanabilirliğinin ve güvenilirliğinin sınırlı olmasıdır. PCR şartlarındaki küçük bir değişiklik bile tekniğin sonuçları etkileyebilmektedir (Williams vd., 1990; Devos ve Gale, 1992). Ayrıca dominant markör olmaları nedeniyle farklı genetik haritalar arasında transferlerinde zorluklar çıkabilmektedir ve yorumlanmaları zordur (Lavi vd., 1994). Bu teknik, genetik varyasyonun araştırılmasında, bitkilerin genetik haritaların çıkarılmasında ve markör yardımıyla seleksiyonda yoğun olarak kullanılmaktadır (Dong vd., 2001; Yorgancılar vd., 2015).

AFLP (Amplified fragment length polymorphism/Çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi)

AFLP tekniği PCR ve RFLP tekniklerinin temel prensibine dayanmaktadır. Bu teknik, RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir (Vos vd., 1995). Bu teknikte, total genomik DNA, bir çift restriksiyon enzimi ile kesilmektedir. Ortaya çıkan DNA fragmentlerinin uçlarına dizisi bilinen adaptörler takılmaktadır. Adaptörlere komplementer olan primerler, restriksiyon fragmentlerini çoğaltmak için kullanılmaktadır. PCR ile çoğaltılmış olan parçalar daha sonra elektroforez ile birbirinden ayrılarak, bant şemaları değerlendirilmektedir (Zabeau ve Vos, 1993; Vos vd., 1995; Yorgancılar vd., 2015).

Tekniğin polimorfizm oranı çok yüksektir. RAPD tekniği kadar hızlı olmasa da RFLP'den çok daha hızlıdır. Masraf, işgücü gereksinimi ve güvenilirliği RAPD ve RFLP arasında yer almaktadır. Çok sayıda lokusu aynı anda ve etkili bir şekilde taraması nedeniyle parmak izi analizine çok uygundur. Genomik DNA ile ilgili ön bilgiye ihtiyaç yoktur. Ancak dominant markör olması ve farklı genetik haritalar arasında transferinin güç olması önemli dezavantajları arasında bulunmaktadır (Zabeau ve Vos, 1993; Vos vd., 1995; Yorgancılar, 2015). Özellikle çalışılan türler arasındaki yakınlığın belirlenmesi ve tür tespiti çalışmalarında tercih edilen bir yöntemdir (Gözel vd., 2016).

ISSR (Inter simple sequence repeat/Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm)

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) tekniği hayvanlarda ve bitkilerdeki genetik varyasyon analizlerinde kullanılmak üzere ilk defa Zietkiewicz vd. (1994) tarafından bildirilmiştir. Bu teknik, RAPD ve mikrosatellit (SSR) markörlerinin birçok faydalı özelliklerini birleştirmekte ve bu nedenle çok sayıda polimorfik markörün gerekli olduğu uygulamalar için oldukça güvenilir sonuçlar vermektedir. RAPD markörlerinin düşük üretkenliği, AFLP markörlerinin yüksek maliyeti ve primer sentezlenebilmesi için sekans bilgisinin gerektiği SSR markörlerinin neden olduğu birçok kısıtlamanın üstesinden gelinmesinde önemli bir teknik olarak bilinmektedir (Zietkiewicz vd., 1994).

Bir genom bölgesindeki mikrosatellit lokusları arasında kalan bölge ISSR olarak ifade edilmektedir. Ökaryotik genomlarda bol miktarda ve orantılı olarak dağılmış olan 2'li, 3'lü, 4'lü ve 5'li tekrarlanan nükleotid birimlerinin lokustan bağımsız bir şekilde genomda rastgele dağılımlarını esas alan bir tekniktir (Meyer vd. 1993; Zietkiewicz vd., 1994; Gupta vd., 1994). Genellikle 16-25 bp uzunluğundaki primerler ile genomik lokuslar farklı bant büyüklüklerinde çoğaltılmaktadır (Ng ve Tan, 2015). Bu primerler genelde 3 veya 5 uçlarının sonlarındaki mikrosatellit bölgelerine uzanan 1–4 dejenere nükleotitler içermektedir. PCR sonucu elde edilen ürünler agaroz jelde yürütülerek etidyum bromür ile boyandıktan sonra belirlenebilmektedir. Çoğaltılmış ürünler genelde 200–2000 bp arası uzunluktadır. (Zietkiewicz vd., 1994; Gupta vd., 1994).

ISSR primerlerini kullanmak düşük maliyet, zamandan tasarruf ve genetik analizlerde kolaylık sağlamaktadır. Kullanılan primerler uzun olduklarından güvenilirlikleri daha fazladır (Bornet ve Branchard, 2001). Dizi bilgisi gerekmeden primer dizaynı yapılabilmesi avantajlarından biridir (Joshi vd., 2000). RAPD tekniğine göre çok daha hassas ve tekrarlanabilirliği yüksektir. İnterspesifik ve intraspesifik DNA polimorfizmlerini belirlenmesinde kullanılırdır (Hantula, 1996). Markörler dominanttır (Wang vd., 1998) fakat kimi durumda homozigot ve heterozigotluğun tanımlanmasında kodominant markörler verebilmektedir (Yorgancılar vd., 2015).

ISSR markörleri iki tip polimorfizm göstermektedir (Hantula vd., 1996). Birincisinde varyasyon bandın bulunması veya bulunmamasına bağılı olarak belirlenmektedir. Bu

tip RAPD markörleri kullanılarak belirlenen var yok polimorfizmi ile benzerlik göstermektedir. Diğer bir polimorfizm türü ise çoğaltılan ürünlerin boyutlarının uzunluk varyasyonundan kaynaklanmaktadır (Hantula, 1997), Fakat bu durum ancak iki veya daha fazla kodominant markörün bulunması durumunda insan soyağacındaki gibi mendeliyen tarzda ayırım yapılabilir. Bu da farklı molekül ağırlıklarına sahip markörler, tek lokusun farklı alellerini temsil eder fikrini desteklemektedir (Zietkiewicz vd., 1994; Hantula ve Müller, 1997).

Bu markörlerin yüksek polimorfizm ve üretkenlik göstermesi çoğu genetik çeşitlilik çalışmasında başarılı bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır (Hantula, 1996). ISSR markörleri son yıllarda dünyada, genetik çeşitlilik, gen haritalama, taksonomi ve filogenetik çalışmalarda farklı türler üzerinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Gupta vd., 1994; Zietkiewicz vd., 1994; Reddy vd., 2002).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

“Populasyon yapısı” terimi, populasyon içindeki veya populasyonlar arasındaki genetik varyasyonun miktarını ve yayılışını ifade etmektedir (McDonald, 1997). Bir populasyonun yapısının karakterize edilmesi; var olan doğal populasyonları koruyabilmek, geçmişteki ve günümüzdeki yayılışlarını karşılaştırabilmek ve evrimsel olarak istikrarlı türlerin devamlılığını sağlayabilmek açısından önem arz etmektedir. Bu sayede iklim değişikliği gibi değişen çevresel faktörlerin populasyonlar üzerindeki baskılayıcı etkileri ve önemi açıklanabilmektedir (Alam, 2016). Populasyon yapısı çalışmaları, ekolojik yararının yanı sıra, hastalık etmenlerinin neden olabileceği zararları önlemek, azaltmak ve bu etmenlere karşı uygun ve etkili kontrol stratejileri geliştirebilmek için oldukça önemli bilgiler sağlamaktadır (Stenlid, 1985). Tüm bu nedenlerle literatürde fungal populasyonların genetik yapısına odaklanan birçok çalışma bulunmaktadır (McDonald, 1997).

Doğal seleksiyonla gerçekleşen evrimlerde, bireyler arasındaki genetik çeşitlilik, gen dizilimindeki olası farklılıklarla açıklanmaktadır. Fisher (1930), doğal seleksiyon temel teoreminde, bir organizmanın herhangi bir zamanda adaptasyon başarısındaki artış yüzdesini, populasyonda var olan genetik çeşitliliğinin uyum başarısına bağlamaktadır. Geçmişten günümüze, genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla organizmaların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve genetik farklılıklarının kullanıldığı çok sayıda çalışma yapılmıştır (Korhonen, 1978; Mugnai ve Capretti, 1989; Karlsson ve Stenlid, 1991; Stenlid vd., 1994; Korhonen vd., 1998b; Comparini vd., 2000).

H. annosum kompleksine ait türlerin genetik çeşitliliğinin tespitinde genellikle klasik bir yöntem olan eşleştirme testleri kullanılmaktadır (Korhonen, 1978; Stenlid ve Karlsson, 1991; Korhonen vd., 1998b). Eşleştirme testleri, güvenilir sonuçlar veren bir o kadar da basit bir teknik olup, halen fungusların taksonomi ve populasyon yapısı çalışmalarında, geliştirilen tekniklere rağmen, yaygın olarak kullanılmaya devam etmektedir. Prensip, türleri (IS grupları) ortaya çıkarmak için kullanılmaya başlayan yöntem, tür içi genetik çeşitliliğin yanı sıra homokaryon ve heterokaryon miselyumların tespiti için de kullanılmaktadır (Woodward vd., 1998).

Korhonen (1978), ladin ve çam türlerinden elde etmiş olduğu *H. annosum* izolatlarının IS gruplarını belirlemek amacıyla, laboratuvar koşullarında somatik eşleştirme testleri uygulamış ve izolatların aralarındaki uyumluluğu tespit etmiştir. Yapılan testler sonucunda, izolatların intersteril özellikte olduğu yani birbirileri ile eşleşmediği ortaya koyulmuştur. Araştırmacı, fungusun morfolojik özelliklerinin ve konukçu tercihlerinin farklılığından yola çıkarak gerçekleştirdiği bu çalışmada, çam ve ladin türlerini enfekte eden P ve S tipi iki farklı intersteril grubun bulunduğu ilk kez söz etmiştir. Sonraki yıllarda Capretti vd. (1990), yaptıkları eşleştirme çalışmaları sonucunda göknar türlerine özelleşmiş olduğu düşünülen F tipi üçüncü intersteril grubu rapor etmiştir.

Stenlid (1985), somatik eşleştirme testlerinin *Heterobasidion* kompleksine ait türler ile gerçekleştirilecek populasyon yapısı çalışmaları için en kolay ve en güvenilir yöntem olduğundan bahsetmiştir. Karlsson (1993), IS grupları seviyesinin altında kalan genetik çeşitliliği eşleştirme testleri ile belirlemenin oldukça zor olduğunu, populasyon yapısı çalışmalarında seçici nötr markörlere ihtiyaç duyulduğunu bildirmiştir. Ayrıca bu yöntemin çok sayıda örnekle gerçekleştirilen genetik çeşitlilik çalışmaları için pratik olmadığından bahsetmiştir. Chase ve Ullrich (1983), aynı amaçla çam plantasyonlarından elde ettikleri *Heterobasidion* türleri üzerinde gerçekleştirdikleri diğer bir çalışmada, çiftleşme alellerini genetik markör olarak kullanmış ve genetik çeşitliliği tespit etmeye çalışmışlardır. Çalışmanın sonucunda plantasyon içindeki hastalık ocaklarının oluşumunda tek bir klonun vejetatif yayılımının söz konusu olmadığını, birçok genetin neden olduğu inokulasyonlar sonucu hastalık ocaklarının meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Araştırmacılar tarafından yapılan diğer bir çalışmada Orta ve Kuzey Kaliforniya'da ölümlerin gerçekleştiği 15 farklı *Abies concolor* (Gordon & Glend.) Lindl. ex Hildebr hastalık ocağından elde edilen *H. annosum* s.s. izolatlarının populasyon yapısı somatik eşleştirme testleri ile incelenmiştir. Homokaryotik miselyumlar ile gerçekleştirilen testler sonucunda, her hastalık ocağı çeşitli fungal genotiplerin varlığı ile karakterize edilmiştir. Ayrıca ağaç çapları ve fungusun yayılma mesafesi arasında oldukça yüksek bir korelasyon saptanarak, en büyük klonların yüksek ağaç ve kütük yoğunluğunun bulunduğu alanlarda tespit edildiği bildirilmiştir. Fungusun sekonder yayılımı ile kütük yoğunluğu arasında önemli derecede bir ilişki bulunduğu tespit edilmiştir.

belirlenmiştir. Çoğu yerel genotipin farklı çiftleşme allellerine sahip olduğu ve bu nedenle inokulasyonların akraba olamayan basidiosporlardan kaynaklandığını bildirilmiştir (Garbeletto vd., 1999).

Eşleştirme testlerinin uygulandığı diğer bir çalışmada, Güney İspanya’da 1989 yılında kurulan doğal bir parkta endemik olarak görülen *Abies pinsapo* ‘Glauc’ üzerinde yayılım gösterdiği tespit edilen *Heterobasidion* türünün, *H. abietinum* olduğu somatik eşleştirme testleri sonucunda ortaya koyulmuştur. İzolatlar arasındaki farklı genotipleri belirlemek amacıyla yapılan eşleştirme testi çalışmaları sonucunda en geniş yayılım gösteren *H. abietinum*’a ait genetin 57 m ile 10 farklı ağaçta kolonize olduğu bildirilmiştir. Bu ana genetin, parkın kuruluşunun evvelinde, çok önceki enfeksiyonların neden olduğu kök kaynaşmaları ile yayıldığı sonucuna varılmıştır (Sanchez vd., 2007).

Doğmuş Lehtijärvi vd. (2007), Türkiye’nin kuzey doğusunda gerçekleştirdikleri çalışmada, *A. nordmanniana* ve *P. orientalis* kütüklerinde bulunan basidiokarplardan elde ettikleri *H. annosum* kompleksine ait izolatların IS gruplarını somatik eşleştirme testleri yardımı ile belirlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda *A. nordmanniana* kütüklerinden elde edilen izolatların %90’ının *H. abietinum* olduğu, geriye kalan izolatların ise *H. annosum* s.s.’a ait olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma, Türkiye’de *H. annosum* s.s.’un ilk kez rapor edildiği bir çalışma olmasının yanı sıra, *P. orientalis* üzerinde *H. abietinum*’un tespit edildiği ilk çalışma niteliğini taşımaktadır. Araştırmacılar, bölgede süre gelen ormancılık faaliyetlerinin fungus için uygun gelişme ortamı koşullarını sağladığı ve bu nedenle etmene ait basidiokarpların alanda yoğun olarak bulunduğu bahsetmiştir.

Araştırmacılar tarafından sıkça kullanılan klasik eşleştirme yöntemin yanı sıra, türlerin pektik izoenzim profillerinin (Karlsson ve Stenlid, 1991) ve yağ asitleri-sterol profillerinin belirlenmesi (Muller vd., 1995) gibi serolojik analizler de, farklı fungus türlerini (Backhouse vd. 1984; Morrison vd. 1984) veya IS gruplarını (Old vd., 1984; Alfhas vd., 1984) ayırt etmede kullanılmıştır. Hiittermann vd., (1979), yaptıkları çalışmada 33 *Heterobasidion* izolatına ait izoenzim profillerini incelemiş, laktat dehidrogenaz ve malat dehidrogenaz profillerinde yüksek derecede çeşitlilik olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak yapmış oldukları çalışmada türe ait IS grupları açıkça

belirlenememiştir. Stenlid (1985), malat dehidrogenaz profilinin *Picea abies*'den elde edilen S tipi *Heterobasidion* izolatlarına spesifik olduğunu bildirmiştir. Karlsson ve Stenlid (1991), IS gruplarındaki pektinolitik enzimlerin bileşimlerinin kıtalar içinde benzer olduğunu ancak kıtalar arasında farklılık gösterdiğinin bildirmiştir. Otrosina vd., (1993), yaptıkları izoenzim analizleri ile *Heterobasidion* türlerinde bulunan 8 enzim sistemi üzerinde büyük farklılıklar tespit ederek *H. annosum* kompleksine ait türlerin evrimini iklim değişikliği ve konukçu türler arasındaki ilişkiler ile değerlendirmişlerdir.

Kullanılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler yapılarından kaynaklanan dezavantajlarından dolayı, günümüzde fungusların populasyon yapısı çalışmalarında tek başlarına yeterli olmamaktadırlar. Organizmaların DNA'larının moleküler düzeyde karşılaştırılmasını sağlayan moleküler markör tekniklerinin geliştirilmesiyle farklı ekolojilerdeki genetik materyaller daha kolay karakterize edilebilmekte, böylece bireylere ait genetik varyasyonlar daha hızlı ve güvenilir biçimde belirlenebilmektedir (Akcan vd., 2008). Küçük bir miktar DNA esas alınarak yapılan çalışmalarda gözlemlenen polimorfizm oranlarının, morfolojik ve biyokimyasal markör tekniklerinde elde edilen sonuçlara oranla daha yüksek tespit edildiği bildirilmiştir (Stenlid vd., 1994).

Biyoteknoloji alanındaki metotların ilerlemesiyle, fungusların populasyon genetiği çalışmalarında kullanılmak üzere bir dizi moleküler markör geliştirilmiş olup, bu markör (RFLP) Forster ve arkadaşları tarafından ilk kez 1987 yılında denenmiştir. İlk markörlerden olan RFLP'nin fazla zaman alıcı olması, yüksek miktar ve kalitede DNA ürünü istemesi bu markörün yıllar içinde kullanımını kısıtlamıştır. Ayrıca kültüre alınamayan çeşitli fungal türler için RFLP kullanımının oldukça elverişsiz olduğu bildirilmiştir (Hantula vd., 1996).

PCR'in keşfinden sonra, özellikle populasyon yapısı çalışmaları için daha verimli ve geniş çapta uygulanabilir olan PCR tabanlı markör tekniklerinde oldukça önemli bir artış gözlemlenmiştir. DNA'nın kısa primerlerle rastgele çoğaltılmasına dayanan (Welsh ve McClelland, 1990; Williams vd., 1990) ve PCR tabanlı bir markör tekniği olan RAPD analizi, fungusların populasyon genetiği ve haritalanması çalışmalarında oldukça sık kullanılmaktadır (Garbelotto vd., 1993; Fabritius ve Karjalainen, 1993;

Laporta vd., 1993; Charlesworth vd., 1994). Bu yöntem, DNA dizisi bilinmeyen türler üzerinde çalışılabilme imkanı sunmakla birlikte, tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği sınırlı olan bir teknik olarak bildirilmiştir (Williams vd., 1990; Devos ve Gale, 1992).

Lakomy vd. (2007), yaptıkları çalışmada *Pinus sylvestris* L., *Picea abies* (L.) Karst. ve *Abies alba* Mill. kütüklerinden elde edilen *Heterobasidion* izolatlarının genetik çeşitliliğini RAPD markörleri ve somatik eşleştirme testlerini kullanarak belirlemişlerdir. Tespit ettikleri çoğu genetin bir kütük üzerinde konumlandığını, bazı durumlarda iki, üç hatta dört farklı genetin tek bir bireyde bulunduğunu rapor etmişlerdir. Nei equation yöntemi kullanarak belirledikleri genetik benzerlik oranları *H. annosum* s.s. izolatları için %0-62, *H. parviporum* izolatları için %0-38 ve *H. abietinum* izolatları için %0-55 arasında çeşitlilik göstermektedir. En eski ve en büyük genetin bir göknar kütüğünden izole edilen *H. abietinum*'a ait bir genet olduğunu ve bu genetin en az 14 yaşında olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada genetlerin büyüklüğü, yapılan aralama kesimleri, spor yayılışları, kütüklerin yaşı veya odun kolonizasyonundaki rekabet ile ilişkili olarak ele alınmıştır.

Yüksek mutasyon oranına sahip mikrosatelitler için en verimli teknik, SSR markör tekniği olarak bildirmiştir. Populasyonlardaki varyasyonların arka planlarının kolaylıkla belirlendiği bu tekniğin fungal çalışmalardaki kullanımı, türe özgü spesifik primer ihtiyacı nedeniyle günümüzde kısıtlı kalmıştır (Hantula, 1996). Garbelotto vd., (2013), İtalya'dan elde edilen 101 *H. irregulare* izolatını, Kuzey Amerika'da 5 farklı bölgeden elde edilen 34 *H. irregulare* izolatı ile SSR markörlerini kullanarak genetik olarak karşılaştırmışlardır. İtalya'da Castelfusano/Castelporziano bölgesinden elde edilen izolatların en yüksek oranda genetik çeşitliliğe sahip olduğunu ve bu bölgeden uzaklaştıkça genetik çeşitlilik oranının azaldığını ifade etmişlerdir. Analizler bölgeler arasında yüksek düzeyde gen akışının olduğunu ve tek lokasyona ait özel bir genetin bulunmadığını göstermiştir. Çalışmada çok sayıda genotipin tek bir bölgeyi istila ettiği bildirilmiştir.

Minisatelit dizilerden biri olan ve bakteriofajlardan elde edilen M13 primeri (Vassart vd., 1987) ilk olarak insan genomundaki çeşitliliği tespit etmek amacıyla kullanılmıştır. Bu dizinin varlığı zaman içerisinde funguslar da dahil olmak üzere, birçok farklı organizmada çeşitli çalışmalar ile rapor edilmiştir (Ruskov vd., 1988;

Rogstad vd., 1988; Meyer vd., 1991). Meyer ve arkadaşları 1991 ve 1992 yıllarında yaptıkları çalışmalarda, M13 markörünü ilk kez *Tricoderma* spp. ve *Leptosphaeria maculans* (Desmaz.) Ces. & De Not. izolatlarının genetik çeşitliliğinin tespiti amacıyla kullanmışlardır.

Karlsson (1994), Kuzey Avrupa'dan elde edilen 54 *Heterobasidion* kompleksine ait izolatın genetik çeşitliliğini M13 primeri ve ribozomal DNA problemlerini kullanarak tespit etmiştir. Çalışmada, M13 primeri ile *Heterobasidion* türlerine ait IS grupları UPGMA kümelenme yöntemi kullanılarak açıkça ayırt edilmiş ve aynı coğrafi kökene sahip izolatların kümelenme eğiliminde olduğu belirtilmiştir. Ortalama benzerlik indeksi kullanılarak yapılan analiz sonuçlarına göre S tipi izolatlar için ortalama benzerlik indeksi 0.80, P tipi izolatlar için 0.68, IS grupları arası benzerlik indeksi ise 0.49 olarak bildirilmiştir. Çalışmanın diğer kısmında, bir *Heterobasidion* izolatının mitokondriyal (ML 5-8) bölgesi ve ribozomal nükleer (ITS 1-4) bölgesi PCR ile çoğaltılarak prob olarak kullanılmıştır. Mitokondriyal ML 5-8 bölgesi prob olarak kullanıldığında UPGMA kümelenmesi sonucu genetik çeşitlilik tespit edilmiş olup, ribozomal nükleer ITS 1-4 bölgesi ile coğrafi alanda veya IS grupları arasında çeşitlilik tespit edilememiştir.

Stenlid vd. (1994), yaptıkları çalışmada M13 minisatelit markörünü İskandinavya, Almanya ve İtalya menşeli S, P ve F tipi 124 *Heterobasidion* izolatının genetik çeşitliliğini ve bu izolatların coğrafi farklılıklarını araştırmak amacıyla kullanmıştır. ABSI (The average band-sharing index) kullanılarak yapılan analizler sonucu M13 primerinin hem izolatlar arası spesifik farklılıkları hem de IS grupları arasındaki spesifik farklılıkları tespit etme kabiliyetinde olduğu bildirmişlerdir. Farklı coğrafi alanlardan elde edilen izolatların bölgesel farklılaşmalarının karşılaştırıldığı çalışmada, S tipi izolatlarda coğrafi mesafenin artmasıyla genetik benzerlik oranının azaldığı tespit edilmiştir. S ve P tipi izolatlara ait ABSI değerlerinin, populasyonların kendi içinde daha yüksek oranda olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca Karlsson (1994)'ün UPGMA kümelenme yöntemine göre M13 minisatelit bantlarının aynı coğrafi orijinli *H. annosum* türleri için kümelenme eğiliminde olduğunu bildirmişlerdir.

Petta vd. (2001), İtalya'nın farklı bölgelerinde *P. nigra*, *P. pinea*, *P. sylvestris*, *P. pinaster* ve *P. menziesii* türlerinden elde ettikleri 22 *H. annosum* s.s. izolatının genetik

yapısını M13 markörü kullanarak araştırmışlardır. Filogenetik dendrogram UPGMA kümelenme yöntemi kullanılarak yapılan analizlerde, P grubuna ait izolatların S ve F grubuna ait izolatlardan açık bir şekilde ayırt edildiğini bildirmişlerdir. Test edilen P grubu izolatlar kendi içinde analiz edildiğinde, aynı coğrafi kökene ait olanların farklı kümeler oluşturma eğiliminde olduğu gözlemlenmiştir. Çalışma Avrupa’da daha önce gerçekleştirilmiş olan çalışmalar ile kıyaslandığında, Stenlid ve arkadaşlarının 1994 yılında tespit ettiklerinin aksine P tipi izolatların S tipi izolatlardan daha güçlü bir farklılaşmaya sahip olduğu bildirilmiştir. Çalışmada kullanılan *H. annosum* s.s. izolatlarının yüksek genetik çeşitlilik oranı, İtalya’nın tarihte bir farklılaşma merkezi olması ve yerli konukçu ağaç türü çeşitliliğin fazla olması ile ilişkilendirilmiştir. Bu bağlamda *H. annosum*’un evrimsel tarihini, enfekte ettiği ağaç çeşitliliğine bağlı olarak değerlendirmişlerdir. Ayrıca çalışmada, ülkenin dağlık topografik yapısı nedeniyle farklı alanlardaki patojen populasyonları arasında genetik akışa izin vermemiş olabileceği bildirilmiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada, farklı Avrupa ülkelerinde *A. alba* türünden toplanan 47 *H. abietinum* izolatı, M13 markörü kullanılarak *H. annosum* s.s. ve *H. parviporum* izolatları ile genetik olarak karşılaştırılmıştır. Populasyonlar arasındaki ve içindeki genetik varyasyonlar, genetik varyasyon moleküler analizi (AMOVA) ile incelenmiştir. Neighbor-Joining methodu ile birbirinden farklı 3 *Heterobasidion* IS grubu için dendrogramlar oluşturulmuştur. Çalışmanın sonunda, Balkan Yarımadası, İtalyan Yarımadası ve Fransa Pireneler Bölgesi’nden elde edilen *H. abietinum* izolatları, coğrafi kökenlerine göre kümeler halinde ayrılmıştır. Merkezi Avrupa’dan elde edilen izolatlar arasında coğrafik bir kümelenme tespit edilememiştir. Çalışmada *H. abietinum* izolatları arasındaki genetik varyasyon, *Abies* türlerinin göç geçmişi göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir (Zamponi vd., 2007).

Cieslak vd. (2011), farklı bölgelerde bulunan farklı yaşlardaki *P. sylvestris* ağaç ve kütüklerinden elde edilen *H. annosum* s.s. izolatlarının genetik çeşitliliğini somatik eşleştirme testleri ve M13 primeri kullanarak araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda, izolatlara ait genetik benzerlik oranının %0-74 arasında belirlendiği, ağaç ve kütüklerin %17.9’unda farklı genotipler bulunduğu ve genler arasında meydana gelen en düşük benzerlik oranının %20.7 olarak hesaplandığı bildirilmiştir. Çalışmada ayrıca

izolatların sarıçamlar üzerindeki patojenisitesi belirlenmiş ve en agresif genotiplerin kütüklerden elde edilen genotipler olduğu rapor edilmiştir.

Rastgele amplifike olan mikrosatelit markörleri (RAMS), hayvanlarda ve bitkilerdeki genetik varyasyon analizinde kullanılmak üzere ilk defa Zietkiewicz vd. (1994) tarafından rapor edilmiştir. Hantula vd. (1996), yaptıkları çalışmada RAMS markörlerini *Armillaria cepistipes* f. *pseudobulbosa* Romagn. & Marxm., *Gremmeniella abietina* (Lagerb.) M. Morelet, *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt., *Stereum sanguinolentum* (Alb. & Schwein.), Fr., *H. annosum* ve *P. gigantea* gibi çeşitli fungal türler üzerinde uygulamış ve bu tekniğin, *Phycomycetes*, *Ascomycetes* ve *Basidiomycetes* üyeleri de dahil olmak üzere tüm fungus türlerinin interspesifik ve intraspesifik DNA polimorfizmlerinin belirlenmesinde güvenilir ve uygulanabilir bir teknik olduğunu bildirmişlerdir. Reddy vd. (2001), RAMS markörlerinin yüksek polimorfizm ve üretkenlik göstermesi nedeniyle birçok basidiomiset üyesinin genetik farklılığının belirlenmesinde ve genetik haritalarının oluşturulmasında yaygın olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Vainio ve Hantula (1998), 7 farklı Avrupa ülkesinden elde ettikleri *Heterobasidion* izolatlarının intersteril gruplar içinde ve arasında bulunan genetik varyasyonlarını (CGA)₅, (CT)₇ ve (CCA)₅ RAMS markörlerini kullanarak tespit etmişlerdir. Toplam 77 adet markörün analizi sonucunda, en yüksek polimorfik markör sayısı ve en düşük sabit markör sayısı P grubuna ait izolatlarda belirlenmiştir. AMOVA analizi kullanılarak gerçekleştirilen analizler sonucunda S ve P gruplarına ait izolatların kendi içlerinde düşük seviyede de olsa coğrafi farklılaşma olduğu bildirilmiştir.

Dai vd. (2003), Avrasya'da bulunan *Heterobasidion* kompleksine ait türlerin taksonomisini ve genetik çeşitliliğini araştırmışlardır. İzolatların IS gruplarını belirlemek amacıyla klasik eşleştirme testlerinin yanı sıra DNA parmak izi analizlerini uygulayarak *H. annosum* s.s., *H. abietinum* ve *H. parviporum* türlerine ait izolatları teşhis etmişlerdir. Çalışmada, izolatlara ait genetik varyasyonların tespitinde (CGA)₅, (GAG)₅ ve M13 primerleri kullanılmıştır. AMOVA analizleri sonucunda 43 ayrı izolattan toplamda 24 tekrarlanabilir markör ve 30 farklı markör kombinasyonu elde edildiği bildirilmiştir. Sonuçlar Neighbor Joining ve UPGMA dendrogramları kullanılarak yorumlanmıştır.

Damico vd. (2007), Roma çevresindeki *P. pinea* ormanlarından elde edilen Kuzey Amerika P tipi izolatları ile İtalya'da yerel tür olarak bulunan Avrupa P tipi izolatlarının populasyon yapısını klasik eşleştirme testleri ve moleküler yöntemler (mtDNA, RAMS, SCAR) kullanarak belirlemişlerdir. Çalışmanın sonunda MtDNA tekniğinin her iki bölge izolatlarının arasında ayırım yapabildiğini belirtmişlerdir. RAMS markörleri ile yapılan analizler sonucunda AMOVA ile hesaplanan varyans yüzdeleri, P grubu populasyonları arasında %12.6-58.2, populasyonların kendi içinde %41.7-79.3 arasında değişikliğe sahip, eşleştirme testleri, Kuzey Amerika ve Avrupa P tipi homokaryotik izolatlarının %98.3 oranında seksüel eşleşme gösterdiğini göstermiştir.

Doğmuş Lehtijärvi vd., 2010 yılında gerçekleştirdikleri bir proje kapsamında, Türkiye'nin dört farklı bölgesinde yayılış gösteren göknar türlerinde bulunan 268 adet basidiokarptan elde ettikleri *H. abietinum* izolatlarının genetik çeşitliliğini (CCA)₅, (GAG)₅, (CT)₅ ve (TCG)₅ RAMS markörlerini ve M13 primerini kullanarak araştırmışlardır. AMOVA analizleri ile yorumlanan çalışmada, *H. abietinum* izolatlarının farklı populasyonları arasında yüksek derecede polimorfizm tespit edilmiştir. Araştırmacılar, M13 primeri ile çoğaltılan farklı populasyonlara ait *H. abietinum* izolatları arasında meydana gelen polimorfizmin, RAMS primerleri ile çoğaltılan izolatlarda meydana gelen polimorfizmden daha düşük düzeyde olduğundan bahsetmiştir.

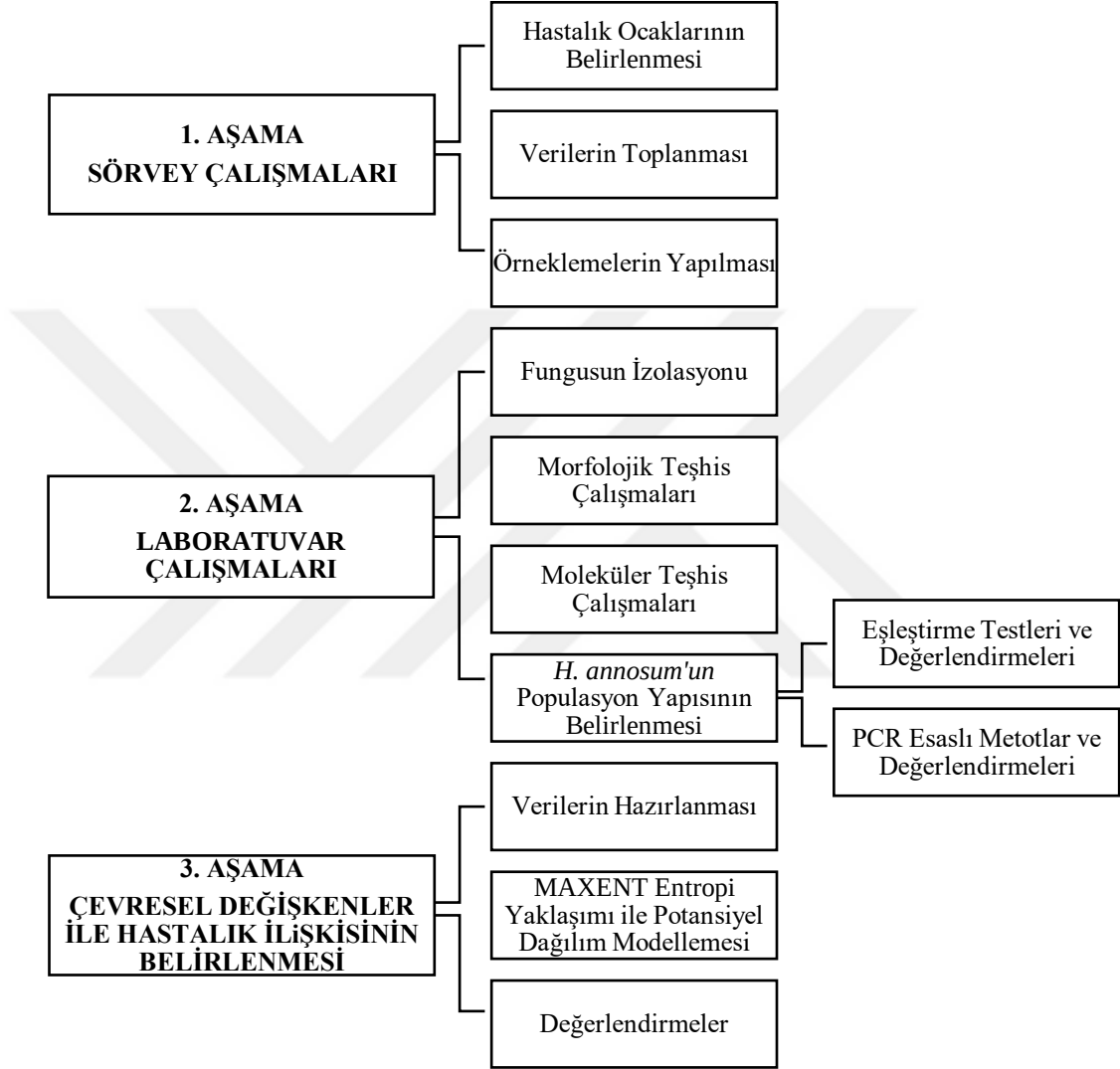
Luchi vd. (2011), yapmış oldukları çalışmada Güney Avrupa ve Akdeniz Havzası çevresindeki çeşitli bölgelerde farklı konukçulardan toplanan *H. abietinum* izolatlarının populasyon yapısını klasik eşleştirme testleri ve moleküler yöntemler (M13 primeri ve RAMS markörleri) kullanılarak belirlemişlerdir. Çalışmanın sonunda farklı bölgelerden elde edilmiş 95 *H. abietinum* izolatına ait 61 polimorfik markör analiz edilmiştir. AMOVA analizleri sonucu farklı bölgelerden elde edilen *H. abietinum* populasyonları arasında kaydadeğer oranda genetik farklılaşma bulunduğu rapor edilmiştir. Ayrıca çalışmada populasyon kümelenmelerini belirlemek amacıyla SAMOVA v. 1.0 (Moleküler Varyansın Mekansal Analizi) programı kullanılmıştır. *Heterobasidion* izolatları arasındaki farklılıkların konukçu populasyonların çeşitliliği ile ilişkili olduğu ve farklı bölgeler arasında bulunan gen akışının coğrafi engeller

nedeni ile kısıtlı olduğu rapor edilmiştir. *H. abietinum* izolatlarının populasyon yapısı, *Abies* türlerinin buzul sonrası yeniden kolonizasyonu ile ilişkilendirilerek ele alınmıştır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasına ait araştırmalar, aşağıda verilen temel aşamalar çerçevesinde (Şekil 3.1) gerçekleştirilmiştir. Bu aşamaların gerçekleştirilmesinde izlenen adımlar, kullanılan materyal ve yöntemler ilgili bölümlerde açıklanmıştır.

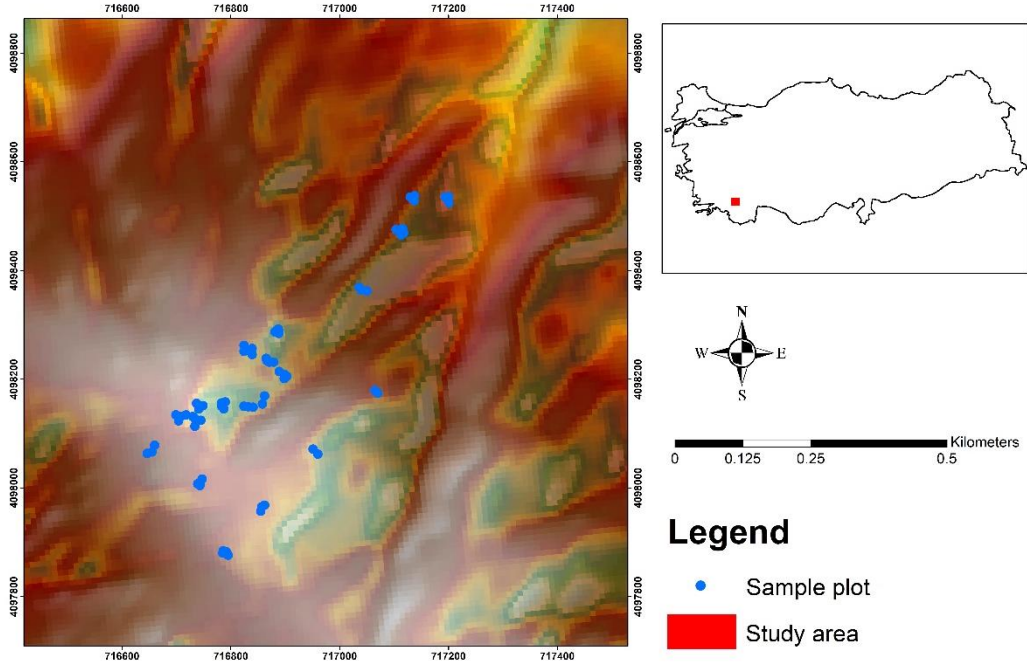


Şekil 3.1. Araştırmanın aşamaları

Araştırmanın ana materyalini doğal gençleştirme sahasında bulunan kızılçam bireyleri ve bu ağaçlarda kök çürüklüğüne neden olan fungal etmen *Heterobasidion annosum* oluşturmaktadır.

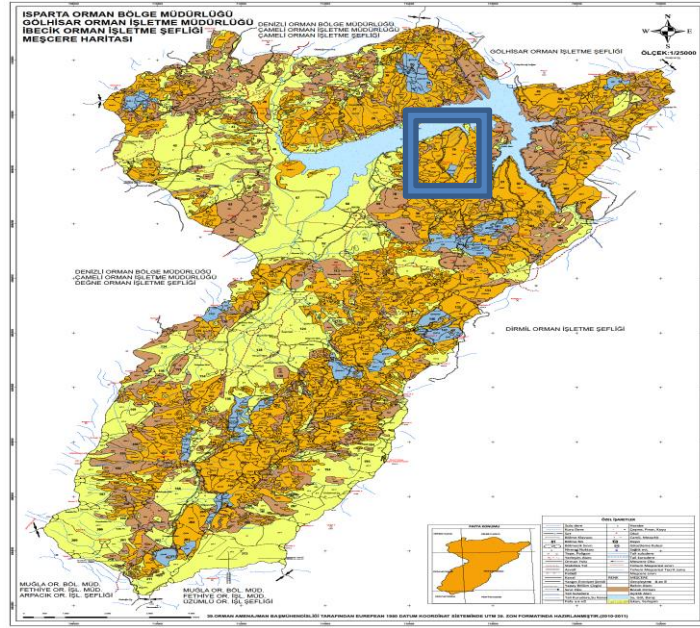
3.1. Araştırma Alanı

Sörveylerin gerçekleştirildiği, Gölhisar-İbecik kızılçam gençleştirme sahası, Burdur ili Gölhisar ilçesi mülki sınırları içerisinde yer almaktadır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Araştırma alanı yer bulduru haritası

İdari olarak Isparta Orman Bölge Müdürlüğü, Gölhisar Orman İşletme Müdürlüğü, İbecik Orman İşletme Şefliği sınırları içinde kalan bu alan, meşcere haritasına göre 76 numaralı bölmede henüz kapallık teşekkül etmemiş meşcere tipi (Çza) (Şekil 3.3) olarak sınıflandırılmıştır.



Şekil 3.3. İbécik Orman İşletme Şefliği meşçere haritası

Genel olarak haritada yer alan ormanlar, Akdeniz Bölgesinde bulunmakta olup rakım 1000–2200 m arasında değişmektedir. Bu ormanlar Greenwich'e göre; 29°19'33"-29°29'58" Doğu boylamları ile Ekvatora göre 36°51'14"-37°03'00" kuzey enlemleri arasında kalmaktadır. European Datum 1950 koordinat sisteminde UTM 35. zon formatında 707261-722338 m doğu boylamları, 4103288-4082381 m kuzey enlemleri arasında bulunmaktadır. Üstlendiği fonksiyonlar (ekonomik, ekolojik, sosyal) dikkate alınarak sekiz işletme sınıfı halinde ayrılan bu alanlar karaçam, kızılçam, sedir, ardıç ve meşe meşçerelerinin saf ve birbiriyle yaptığı karışık meşçerelerden oluşmaktadır. Ekonomik fonksiyonlara göre kızılçam, karaçam ve meşe işletme sınıflarına ayrılmış olan bu bölgede hastalık etmeninin bulunduğu ağaç türü olan kızılçam işletme sınıfında işletme amacı, piyasanın istediği en yüksek miktar ve kalitede endüstriyel odun üretimini gerçekleştirmektir. Mevcut doğal kızılçam meşçerelerinin saf, kısmen de karaçamla karışık olarak bulunduğu meşçereler bu işletme sınıfına ayrılmış olup 999.9 ha ormanlık, 110.9 ha ormansız olmak üzere toplam 1110.8 ha alana sahiptir. Hastalık etmeninin bulunduğu doğal gençleştirme sahası yaklaşık 60 ha.'lık bir alanı kaplamaktadır. Alanda 1998, 1999, 2000 ve 2001 yıllarında parça parça büyük alan traşlama yöntemi ile doğal gençleştirme çalışmaları gerçekleştirilerek, yörede bulunan kızılçamlardan toplanan tohumlar alana atılmıştır. Hastalığın yayılış gösterdiği bu sahada azımsanamayacak ölçüde sedir gençliği bulunmaktadır.

3.2. Sörvey çalışmaları

Sörvey çalışmaları 2016 yılının Haziran-Ağustos aylarında yürütülmüştür. Araştırma alanında *H. annosum* etmeninin bulunduğu kızılçamlar ve çalışmaların yürütüleceği hastalık ocakları tespit edilerek, bu ocaklardaki yetişme ortamı özelliklerine, konukçu özelliklerine ve hastalık etmenine ilişkin veriler toplanmıştır.

3.2.1. Hastalık ocaklarının belirlenmesi

Tüm sörvey alanı taranarak, etmenin varlığına dair kızılçamlarda görülen beyaz çürüklük belirti (üreme organları, enfekteli odun dokuları vb.) ve işaretleri yardımıyla 20 adet hastalık ocağı tespit edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Sörvey çalışmalarının yapıldığı hastalık ocakları.

Tespit edilen hastalık ocakları sınırlandırıldıktan sonra, koordinatları Küresel konumlama sistemi (GPS, Global position system) ile belirlenerek kaydedilmiştir. Hastalık ocaklarına ait koordinat ve yükselti bilgileri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Hastalık ocaklarına ait koordinat ve yükselti verileri

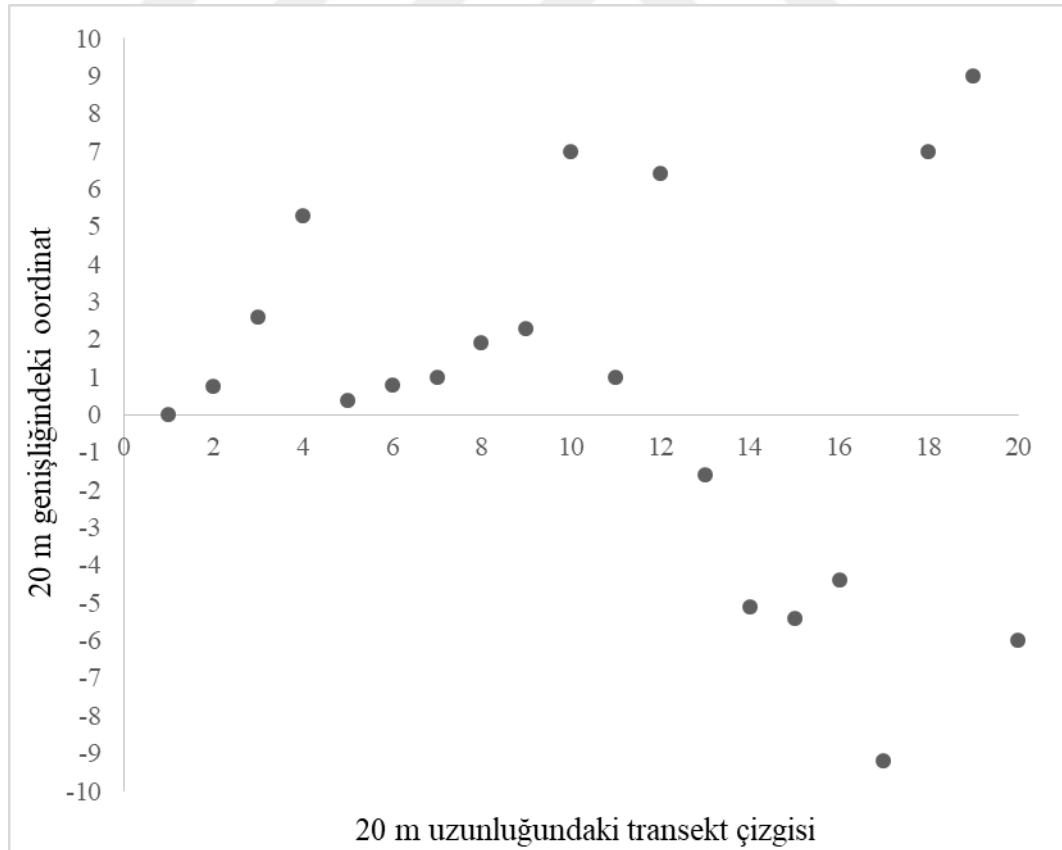
Hastalık Ocağı No	Koordinat	Yükselti (m)
1	37° 0'11.46"K 29°26'8.97"D	979
2	37° 0'13.47"K 29°26'5.27"D	1249
3	37° 0'15.09"K 29°26'8.64"D	1251
4	37° 0'16.11"K 29°26'8.89"D	1244
5	37° 0'16.09"K 29°26'10.69"D	1231
6	37° 0'15.36"K 29°26'7.44"D	1248
7	37° 0'19.33"K 29°26'12.53"D	1209
8	37° 0'18.70"K 29°26'14.24"D	1213
9	37° 0'17.86"K 29°26'15.04"D	1218
10	37° 0'16.39"K 29°26'13.79"D	1212
11	37° 0'15.92"K 29°26'12.55"D	1217
12	37° 0'13.18"K 29°26'17.55"D	1227
13	37° 0'9.75"K 29°26'13.58"D	1249
14	37° 0'16.60"K 29°26'22.29"D	1197
15	37° 0'20.40"K 29°26'15.03"D	713
16	37° 0'22.71"K 29°26'21.26"D	1188
17	37° 0'26.06"K 29°26'24.15"D	1166
18	37° 0'28.16"K 29°26'25.34"D	946
19	37° 0'28.11"K 29°26'27.91"D	1154
20	37° 0'7.21"K 29°26'10.72"D	1255

3.2.2. Verilerin toplanması ve örnekleme

Hastalık ocaklarından verilerin toplanması işlemi, Korpilahti ve Kuuluvainen (2002), Syrjänen, vd., (1994) ve Tuomisto vd., (1995)'e atfen, orman ekosistemlerinde yapı, biyolojik çeşitlilik ve çevresel heterojenlik çalışmalarında yaygın olarak kullanılan çizgi transekt metodu ile gerçekleştirilmiştir (Ranta ve Saloniemi, 2005; Oskay, 2013).

Seçilen hastalık ocaklarındaki ölçümler ve örneklemeler, 20 m uzunluğunda ve 20 m genişliğindeki transekt çizgi üzerinde yapılmıştır. Eşyükselti eğrilerine paralel olarak, 20 m uzunluğundaki şerit metre hastalık ocaklarındaki bireyleri içine alacak şekilde bir başlangıç noktası belirlenerek alana sabitlenmiştir.

Sonrasında, hastalık ocağı (400 m^2 (20 m x 20 m)) içerisinde yer alan her bir kızılçam bireyinin şerit metre üzerindeki değeri (X eksen) ve şerit metreye olan uzaklığı (Y eksen) m olarak ölçülmüş (Şekil 3.5) ve kaydedilmiştir.



Şekil 3.5. Hastalık ocaklarında yapılan örneklemin şematik gösterimi

Hastalık ocaklarında bulunan tüm bireylerin konumları belirlendikten sonra her birey için çap (cm), boy (m) ölçüm işlemleri gerçekleştirilmiş, konukçu özellikleri ve hastalık etmenine ait özellikler arazi karnesine not edilmiştir.

Örneklemelemlerin yapıldığı 209 ağaçtan toplam 182 izolat elde edilmiş olup izolatların elde edildiği kızılçam bireylerinin ortalama çapı 7.3 cm, ortalama boyu 3.07 m olarak (Çizelge 3.2) ölçülmüştür.

Çizelge 3.2. İzolatların elde edildiği kızılçam bireylerinin ortalama boy-çap verileri

Hastalık Ocağı No	Ort. boy (m)	Ort. çap (cm)
1	3.07	7.74
2	2.56	4.44
3	2.47	6.42
4	2.63	6.55
5	3.06	5.84
6	3.14	8.29
7	2.63	6.21
8	2.44	5.79
9	2.72	12.25
10	2.37	6.58
11	2.08	5.21
12	2.03	5.20
13	1.63	5.37
14	3.40	6.37
15	5.42	11.96
16	3.36	7.71
17	4.32	9.87
18	3.66	7.25
19	3.19	7.17
20	3.96	9.04

Hastalık ocaklarında bulunan kızılçam bireylerinden izolasyon için toplanan üreme organları, enfekteli odun dokuları ve kök boğazından alınan disk örnekleri (Şekil 3.6), örneğin alındığı hastalık ocağının numarası, örnek numarası ve örnekleme tarihinin

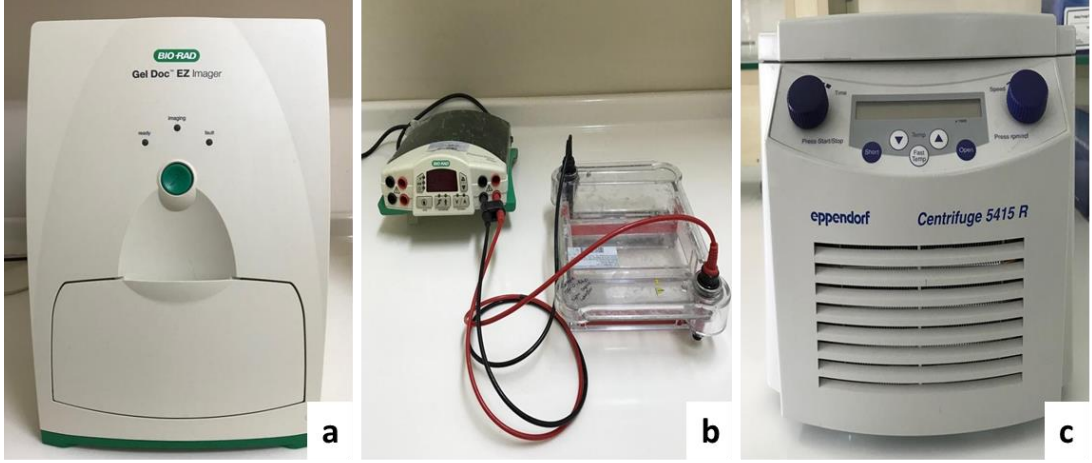
yazıldığı etiketlerle birlikte kese kağıtları içerisinde uygun koşullarda saklanarak laboratuvara getirilmiştir. Örnekler incelemeye alınana kadar soğuk hava deposunda ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.6. Kızılcıam bireylerinden izolasyon için toplanan üreme organları, enfekteli odun dokuları ve kök boğazından alınan disk örnekleri.

3.3. Laboratuvar Çalışmaları

Bu araştırmanın laboratuvar çalışmaları, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Orman Fakültesi Dendroklirik ve Moleküler biyoloji laboratuvarlarında yürütülmüştür. Dendroklirik laboratuvarında, ağaç dokularında fungal konidi oluşumlarını gözlemek için gerekli stereo mikroskop, spor yapılarını gözlemek için gerekli ışık mikroskobu, besi ortamlarının hazırlanmasında kullanılan sterilizasyon aletleri (etüv ve otoklav) ve aseptik koşullarda çalışma imkanı sağlayan steril kabin bulunmaktadır. Laboratuvarda, fungusların istenilen sıcaklıklarda geliştirilmesi ve saklanması için inkubatörler ve buzdolapları da mevcuttur. DNA izolasyonu, PCR ve jel görüntüleme işlemleri Moleküler biyoloji laboratuvarında bulunan, çekir ocak, Real Time PCR-Thermal Cycler (BioRad), jel görüntüleme cihazı, jel elektroforezi, santrifüj, sıcak su banyosu gibi mevcut alet ve ekipmanlarla (Şekil 3.7) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.7. Moleküler biyoloji laboratuvarında kullanılan cihazlar: a) jel görüntüleme cihazı, b) jel elektroforezi ve c) santrifüj

Laboratuvar çalışmaları; fungusun izolasyonu, morfolojik ve moleküler teşhis çalışmaları ve *H. annosum*'un populasyon yapısının belirlenmesi şeklindeki ana başlıklardan oluşmakta, bu çalışmalara ait bulgular, araştırma bulguları bölümünde ilk sırada yer almaktadır (bk. Bölüm 4.1).

3.3.1. Fungusun izolasyonu

İzolasyon, fungusun tanısı için gerekli bir aşama olup, izolasyonlar sonucunda elde edilen izolatlar (funguslara ait saf koloniler), morfolojik ve moleküler teşhis çalışmalarında kullanılmaktadır.

Fungal izolasyonlarda besi ortamı olarak %2'lik Malt Ekstrakt Agar (MEA) (Merck) kullanılmıştır. Hazırlanan besi ortamları otoklavda 121 °C'de 20 dakika steril edildikten sonra, antibakteriyel madde olarak streptomisin eklenerek 9 mm çapındaki petri kaplarına dökülmüştür. Oda sıcaklığında kese kağıdı içinde saklanan basidiokarplardan alınan porlu parçalar, içinde MEA bulunan petri kaplarına çizgiler şeklinde sürülerek sporların besi ortamı üzerinde yayılması sağlanmıştır. Bu işlem, örneklemelerin hemen sonrasındaki birkaç gün içerisinde gerçekleştirilmiştir. Petri kaplarında çimlenmekte olan sporlar, 24 saat sonra ışık mikroskobu altında gözlemlenerek her basidiokarp örneğinden 5-8 adet homokaryotik kültür elde edilmiştir (Korhonen ve Hintikka, 1980; Korhonen vd., 1992).

Kızılçam bireylerine ait enfekteli odun dokularından alınan parçalar, yüzeysel olarak sterilize edildikten sonra MEA bulunan petri kaplarında 23 °C’de 1 hafta inkube edilmiştir. Yapılan günlük kontroller ile gelişen karakteristik *Heterobasidion* konidileri mikroskop altında teşhis edilerek saflaştırılmıştır. Bu izolatlar sonrasında homokaryotik kültürler elde etmek amacıyla tek spor izolasyon yöntemine tabi tutulmuştur.

İzolasyonlar sonucu, 37 tanesi üreme organlarından olmak üzere, toplam 182 *Heterobasidion* izolatı (Çizelge 3.3) elde edilmiştir.

Çizelge 3.3. Örneklerden elde edilen izolatlar

no	Örnek alan no	İzolat no	No	Örnek alan no	İzolat no	no	Örnek alan no	İzolat no
1	1	GHa-O1Cz1	62	6	GHa-O6Cz4	123	12	GHa-O12Cz4
2	1	GHa-O1Cz2	63	6	GHa-O6Cz5	124	12	GHa-O12Cz5
3	1	GHa-O1Cz3	64	6	GHa-O6Cz6	125	12	GHa-O12Cz6
4	1	GHa-O1Cz4	65	6	GHa-O6Cz7	126	12	GHa-O12Cz7
5	1	GHa-O1Cz5	66	6	GHa-O6Cz8	127	13	GHa-O13Cz1
6	1	GHa-O1Cz6	67	6	GHa-O6Cz9	128	13	GHa-O13Cz2
7	1	GHa-O1Cz7	68	6	GHa-O6Cz10	129	13	GHa-O13Cz3
8	1	GHa-O1Cz8	69	7	GHa-O7Cz1	130	13	GHa-O13Cz4
9	1	GHa-O1Cz9	70	7	GHa-O7Cz2	131	13	GHa-O13Cz5
10	1	GHa-O1Cz10	71	7	GHa-O7Cz3	132	13	GHa-O13Cz6
11	1	GHa-O1Cz11	72	7	GHa-O7Cz4	133	14	GHa-O14Cz1
12	1	GHa-O1Cz12	73	7	GHa-O7Cz5	134	14	GHa-O14Cz2
13	1	GHa-O1Cz13	74	7	GHa-O7Cz6	135	14	GHa-O14Cz3
14	1	GHa-O1Cz14	75	7	GHa-O7Cz7	136	14	GHa-O14Cz4
15	1	GHa-O1Cz15	76	7	GHa-O7Cz8	137	14	GHa-O14Cz5
16	2	GHa-O2Cz1	77	7	GHa-O7Cz9	138	15	GHa-O15Cz6
17	2	GHa-O2Cz2	78	7	GHa-O7Cz10	139	15	GHa-O15Cz7
18	2	GHa-O2Cz3	79	7	GHa-O7Cz11	140	15	GHa-O15Cz8
19	2	GHa-O2Cz4	80	8	GHa-O8Cz1	141	15	GHa-O15Cz9
20	2	GHa-O2Cz5	81	8	GHa-O8Cz2	142	15	GHa-O15Cz10
21	2	GHa-O2Cz6	82	8	GHa-O8Cz3	143	15	GHa-O15Cz11
22	2	GHa-O2Cz7	83	8	GHa-O8Cz4	144	16	GHa-O16Cz1
23	2	GHa-O2Cz8	84	8	GHa-O8Cz5	145	16	GHa-O16Cz2
24	3	GHa-O3Cz1	85	8	GHa-O8Cz6	146	16	GHa-O16Cz3
25	3	GHa-O3Cz2	86	8	GHa-O8Cz7	147	16	GHa-O16Cz4
26	3	GHa-O3Cz3	87	8	GHa-O8Cz8	148	16	GHa-O16Cz5
27	3	GHa-O3Cz4	88	8	GHa-O8Cz9	149	16	GHa-O16Cz6
28	3	GHa-O3Cz5	89	8	GHa-O8Cz10	150	16	GHa-O16Cz7
29	3	GHa-O3Cz6	90	9	GHa-O9Cz1	151	17	GHa-O17Cz1
30	3	GHa-O3Cz7	91	9	GHa-O9Cz2	152	17	GHa-O17Cz2
31	3	GHa-O3Cz8	92	9	GHa-O9Cz3	153	17	GHa-O17Cz3
32	3	GHa-O3Cz9	93	9	GHa-O9Cz14	154	17	GHa-O17Cz4

33	3	GHa-O3Cz10	94	9	GHa-O9Cz5	155	17	GHa-O17Cz5
34	3	GHa-O3Cz11	95	9	GHa-O9Cz6	156	17	GHa-O17Cz6
35	3	GHa-O3Cz12	96	9	GHa-O9Cz7	157	17	GHa-O17Cz7
36	3	GHa-O3Cz13	97	9	GHa-O9Cz8	158	18	GHa-O18Cz1
37	4	GHa-O4Cz1	98	9	GHa-O9Cz9	159	18	GHa-O18Cz2
38	4	GHa-O4Cz2	99	9	GHa-O9Cz10	160	18	GHa-O18Cz3
39	4	GHa-O4Cz3	100	9	GHa-O9Cz11	161	18	GHa-O18Cz4
40	4	GHa-O4Cz4	101	9	GHa-O9Cz12	162	18	GHa-O18Cz5
41	4	GHa-O4Cz5	102	10	GHa-O10Cz1	163	18	GHa-O18Cz6
42	4	GHa-O4Cz6	103	10	GHa-O10Cz2	164	18	GHa-O18Cz7
43	4	GHa-O4Cz7	104	10	GHa-O10Cz3	165	19	GHa-O19Cz1
44	4	GHa-O4Cz8	105	10	GHa-O10Cz4	166	19	GHa-O19Cz2
45	4	GHa-O4Cz9	106	10	GHa-O10Cz5	167	19	GHa-O19Cz3
46	4	GHa-O4Cz10	107	10	GHa-O10Cz6	168	19	GHa-O19Cz4
47	4	GHa-O4Cz11	108	10	GHa-O10Cz7	169	19	GHa-O19Cz5
48	5	GHa-O5Cz1	109	10	GHa-O10Cz8	170	19	GHa-O19Cz6
49	5	GHa-O5Cz2	110	11	GHa-O11Cz1	171	19	GHa-O19Cz7
50	5	GHa-O5Cz3	111	11	GHa-O11Cz2	172	19	GHa-O19Cz8
51	5	GHa-O5Cz4	112	11	GHa-O11Cz3	173	20	GHa-O20Cz1
52	5	GHa-O5Cz5	113	11	GHa-O11Cz4	174	20	GHa-O20Cz2
53	5	GHa-O5Cz6	114	11	GHa-O11Cz5	175	20	GHa-O20Cz3
54	5	GHa-O5Cz7	115	11	GHa-O11Cz6	176	20	GHa-O20Cz4
55	5	GHa-O5Cz8	116	11	GHa-O11Cz7	177	20	GHa-O20Cz5
56	5	GHa-O5Cz9	117	11	GHa-O11Cz8	178	20	GHa-O20Cz6
57	5	GHa-O5Cz10	118	11	GHa-O11Cz9	179	20	GHa-O20Cz7
58	5	GHa-O5Cz11	119	11	GHa-O11Cz10	180	20	GHa-O20Cz8
59	6	GHa-O6Cz1	120	12	GHa-O12Cz1	181	20	GHa-O20Cz9
60	6	GHa-O6Cz2	121	12	GHa-O12Cz2	182	20	GHa-O20Cz10
61	6	GHa-O6Cz3	122	12	GHa-O12Cz3			

3.3.1.1. Tek spor izolasyonları

Öncelikle laboratuvara getirilen her bir basidiokarptan direk olarak homokaryon izolatlar elde edilmeye çalışılmıştır. Basidiokarptan direk olarak homokaryon elde edilemediği veya kızılcım bireylerinde basidiokarpın bulunmadığı durumlarda, elde edilen izolatlardan homokaryotik kültürler elde etmek amacıyla tek spor izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

Standart cam deney tüpleri (160 x10 mm) içerisine 5 ml distile su ilave edilerek, 121 °C’ de 15 dk. süre ile sterilize edilmiştir. Tek spor izolasyonunda kullanılacak stok solüsyon eldesi için, heterokaryotik izolatlardan kesilen agarlı parçalar bu deney tüplerine aktarılmış ve ardından vorteksle karıştırılmıştır. Vortekslenen bu stok solüsyon 1/10³ oranında seyreltilerek, MEA (%2) içeren petri kaplarına 1 ml

kalınlığında yayılarak 25 °C’ de 24 saat boyunca inkube edilmiştir. İnkubasyon süresi sona erdiğinde çimlenen sporlar ışık mikroskobu altında işaretlenerek cam pipet yardımıyla toplanıp, MEA (%2) içeren petri kaplarına aktarılmıştır. Tüm izolatlar, 25°C’ de 4 gün boyunca inkube edildikten sonra kanca oluşumu gözlenmeyen izolatlar eğik agarlı tüplere aktarılmıştır. Bu işlem her bir izolattan en az 5-8 adet tek spor olacak şekilde tekrarlanmıştır. Elde edilen izolatlar sonraki aşamalarda kullanılmak üzere 4 °C’de muhafaza edilmiştir (Korhonen, 1978; Stenlid ve Karlsson, 1991; Korhonen vd., 1998b).

3.3.2. Morfolojik teşhis çalışmaları

Hastalık ocaklarından toplanan karakteristik üreme organları, fungal izolatlar, konidi ve sporlar stereomikroskop ve ışık mikroskobu altında incelenerek fungusun cins düzeyinde teşhis işlemleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen izolatların IS grupları yapılan eşleştirme testleri ile belirlenmiştir.

3.3.2.1. *Heterobasidion* izolatlarının IS gruplarının belirlenmesi

İzolatların IS gruplarının belirlenmesinde kullanılan test izolatları Kari Korhonen’in (LUKE-Finlandiya Doğal Kaynaklar Enstitüsü) kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Eşleştirme testlerinin yapılışı sırasında izlenen adımlar:

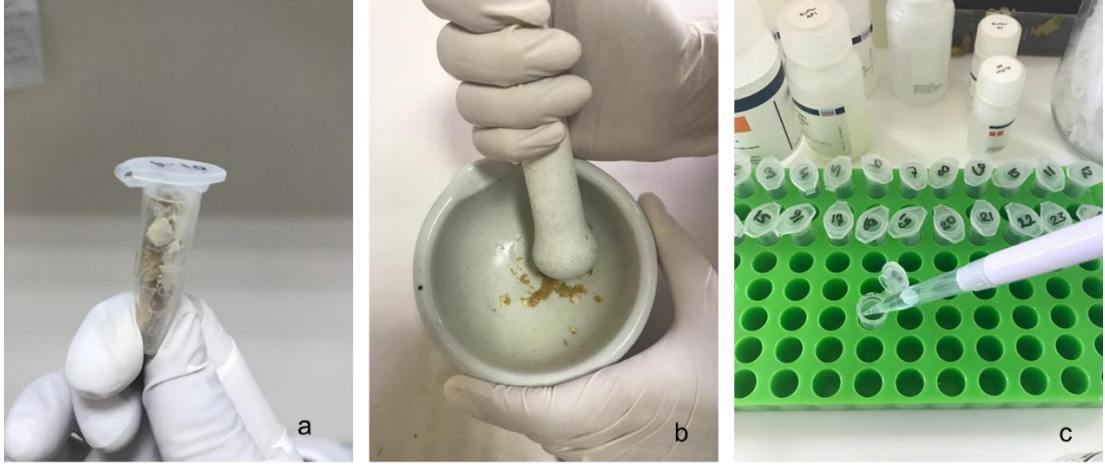
- İntersteril grubu bilinmeyen homokaryotik *H. annosum* izolatlarının tespiti için öncelikle her IS grubunu temsilen ikişer tane uygun test izolatu seçilmiştir. Seçilen bu izolatlar güçlü, normal gelişme gösteren, karakteristik miselyumlara sahip ve dejenerasyon eğiliminde olmayan izolatlardır.
- MEA (%2) besi ortamında geliştirilen bilinmeyen izolatların ve test izolatlarının yeni gelişme uçlarından steril 5 mm’lik mantar delici yardımı ile alınan diskler, MEA (%2) içeren petri kaplarına 2 cm aralıklı olacak şekilde aşılacaktır.
- Kontrol için birer petri kabına test izolatu ve bilinmeyen izolat tek başına aşılacaktır.

- Petriler düzenli aralıklar ile incelenerek 20-24 °C’de 3-6 haftaya kadar inkubasyona bırakılmıştır.
- İnkubasyonun sonunda, bilinmeyen izolatlar ile test izolatları arasında meydana gelen zon, miselyum morfolojisindeki değişiklikler ve kanca oluşumları incelenerek IS grupları belirlenmiştir
- Zon oluşumu ve miselyum morfolojisi 1-2 hafta sonrasında tekrar kontrol edilmiştir (Korhonen, 1978; Stenlid ve Karlsson, 1991; Korhonen vd., 1998b; Woodward vd., 1998).

3.3.3. Moleküler teşhis çalışmaları

3.3.3.1. DNA ekstraksiyonu

Elde edilen izolatlar DNA ekstraksiyonuna hazırlamak amacıyla üzerinde selofan membran bulunan MEA (%2) besi ortamında 24 °C’ de ortalama 10 gün boyunca inkube edilmiştir. Bu sürenin sonunda besi ortamında gelişen miseller, selofan membran üzerinden dikkatli bir şekilde kazınarak, eppendorf tüpler içerisinde aktarılmış ve DNA izolasyonu yapılınca kadar -20 °C’ de muhafaza edilmiştir. Dondurularak kurutulan miseller, steril porselen havan içerisinde, sıvı azot ile iyice ezilerek toz haline getirildikten sonra steril eppendorf tüpler içersine alınmıştır. Total genomik DNA, DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak, kit içerisinde bulunan protokole göre ekstrakte (Şekil 3.8) edilmiştir. İzole edilen DNA’lar kalitelerinin belirlenmesi amacıyla %1’lik agaroz jelde elektroforezde 100 V’da 1 saat boyunca yürütülmüştür. Yeterli miktar ve kaliteye sahip DNA’lar PCR amplifikasyonlarında kullanılmak üzere -20 °C ‘de saklanmıştır.



Şekil 3.8. Total genomik DNA ekstraksiyonu: a) dondurularak kurutulan miseller b) sıvı azot ile ezilerek toz haline getirilen miseller c) Total genomik DNA ekstraksiyonu

Total genomik DNA ekstraksiyonu sırasında izlenen adımlar (DNeasy® Plant Mini Kit Protokol):

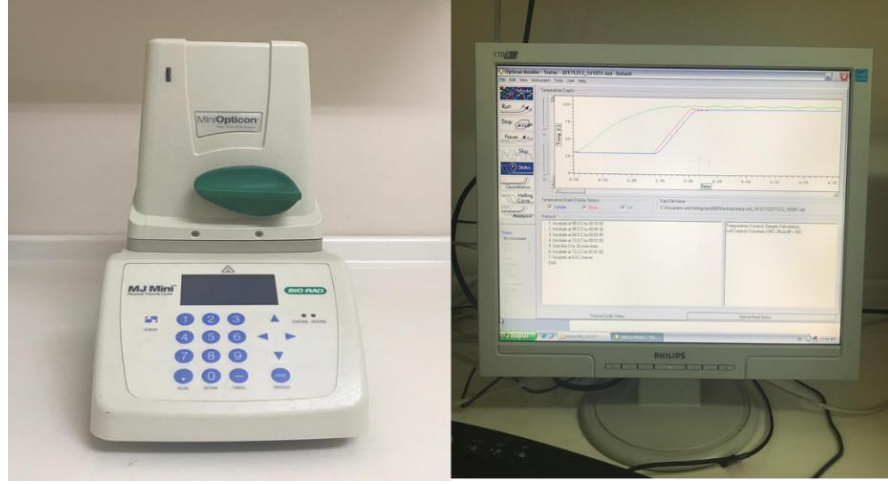
- Sıvı azot ile ezilerek toz haline getirilmiş misellerin üzerine 400 µl AP1 çözeltisi ve 4 µl RNase eklenmiş, vortex yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra 65 °C’de sıcak su banyosunda 10 dk bekletilmiştir.
- 130 µl P3 çözeltisinden eklenerek vortex yardımıyla karıştırılmış ve 5 dk buzda bekletilmiştir.
- 5 dk 14000 rpm’de santrifüj edilmiş, dibe çöken tortulara değmeden üstte kalan sıvı pipet yardımıyla kit içereğindeki lila tüplere aktarılmıştır.
- Lila tüpler 2 dk 14000 rpm’de santrifüj edildikten sonra, dibe çöken sıvı kısım pipet yardımıyla standart ependorf tüplere aktarılmıştır. Bu işlem sırasında aktarılan sıvının miktarı ölçülmüştür.
- Ölçülen sıvının 1.5 katı AW1 çözeltisi eklenerek pipet yardımıyla çekip bırakarak ependorf tüpler içerisinde karışım sağlanmıştır.
- Elde edilen karışımdan 650 µl alınarak kit içinde bulunan beyaz tüplere aktarılmış ve 6400 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiş, altta kalan sıvı dökülmüştür. Standart ependorf tüplerde kalan karışım için aynı işlem bir kez daha uygulanmıştır.
- Beyaz tüplerdeki süzme görevini üstlenen kısım dikkatlice çıkarılarak kit içeriği koleksiyon tüplere aktarılmış ve üzerine 500 µl AW2 çözeltisi eklenerek 1 dk 6.6 rpm’de santrifüj edilerek altta biriken sıvı dökülmüştür.

- Tekrar 500 µl AW2 çözeltisi eklenerek bu kez 14000 rpm’de 2 dk santrifüj edilmiştir.
- Beyaz tüplerdeki süzme görevini üstlenen kısım bu kez, standart ependorf tüplere aktarılmış ve 100 µl AE çözeltisi eklenerek 5 dk oda sıcaklığında beklendikten sonra 6.6 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Beyaz tüplerdeki süzme görevini üstlenen kısım atılarak standart ependorf tüplerde toplanan sıvı -20 °C’de muhafazaya alınmıştır.

3.3.3.2. Türe özgü primerler ile PCR amplifikasyonu

İzole edilen genomik DNA numunelerinin konsantrasyon ve saflığı NanoDrop spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Uygun konsantrasyonu sağlanan DNA numuneleri, *H. annosum*’a özgü MJ-F ve MJ-R primer çifti ile tanılanmıştır (Hantula ve Vainio, 2003). MJ primer çiftinin PCR amplifikasyonunda *H. annosum* için yaklaşık olarak 100 bp’lik fragment verdiği bilinmektedir. Hantula ve Vainio (2003), yaptıkları çalışmada bu primer çiftinin türe özgü olduğunu tespit etmişlerdir. 5’ ucuyla başlayan bu primer dizileri GGTCCTGTCTGGCTTTGC (MJ-F) ve CTGAAGCACACCTTGCCA (MJ-R)’dir.

PCR amplifikasyonları için MiniOpticon Real-Time PCR sistemi (BioRad Laboratories, Inc., USA) (Şekil 3.9), ‘hot start’ PCR protokolü kullanılmıştır. Başlangıç denatürasyonunda 95 °C’ de 10 dk; 40 döngü (denatürasyon, 95 °C 30 s; annealing, 67 °C 35 s; extension, 72 °C 1 dk); final extension 72 °C 7 dk aşamalarından oluşmaktadır. PCR bileşenleri 0,2 mM deoksiniükleotit, 0,5 mM primer, 0,5 ml Taq DNA polimeraz, 1,5 mM MgCl₂, 2,5 ml 10x PCR buffer, 3 ml DNA olmak üzere, PCR reaksiyon hacmi 25 ml’dir.



Şekil 3.9. MiniOpticon Real-Time PCR sistemi (BioRad)

Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiş ve çoğaltılması hedeflenen bölgede oluşan bantlar belirlenmiştir.

3.3.4. *H. annosum*'un populasyon yapısının belirlenmesi

3.3.4.1. *H. annosum* izolatlarının somatik eşleştirme testleri ile genetik farklılıklarının tespiti

Heterokaryotik *H. annosum* s.s. kültürleri, her izolat birbiri ile bir kez karşılaştırılacak şekilde, tüm olası kombinasyonlarda MEA (%2) içeren petri kaplarında somatik eşleştirme testlerine tabi tutulmuştur. İzolatların gelişme uçlarından 5 mm'lik steril mantar delici yardımı ile alınan diskler, MEA (%2) besi ortamı içeren petrilere aralarında 2 cm olacak şekilde karşılıklı aşılanmıştır. Yaklaşık 6 hafta 21 °C'de inkubasyona bırakılan bu petri kapları düzenli aralıklarla incelenmiş ve inkubasyon sonunda, izolatlar arasında meydana gelen ayırım zonları (Şekil 3.9) incelenerek veriler elde edilmiştir (Korhonen vd., 1998b; Dai vd., 2003).

3.3.4.2. Somatik eşleştirme testlerinin değerlendirilmesi

H. annosum s.s. kültürleri ile gerçekleştirilen eşleştirme testleri, ayırım zonunun varlığı (1) ve yokluğu (0) şeklinde belirlenerek, benzerlik matrisi oluşturulmuştur. Oluşturulan benzerlik matrisi, GenAlEx 6.5 (Peakall ve Smouse 2006, 2012) AMOVA

testi kullanılarak analiz edilmiştir. İzolatların elde edildiği ağaçlar ArcCIS programında haritalanmış ve genetik haritalar üzerinde gösterilmiştir.

Fungal populasyonlar arasındaki genetik çeşitliliği moleküler yöntemler ile belirlemek amacıyla, elde edilen somatik eşleştirme verileri ve izolatların elde edildiği ağaçların konumlarını gösteren hastalık ocağı haritaları baz alınarak 182 izolat arasından 70 adet izolat (Çizelge 3.4) seçilmiştir.

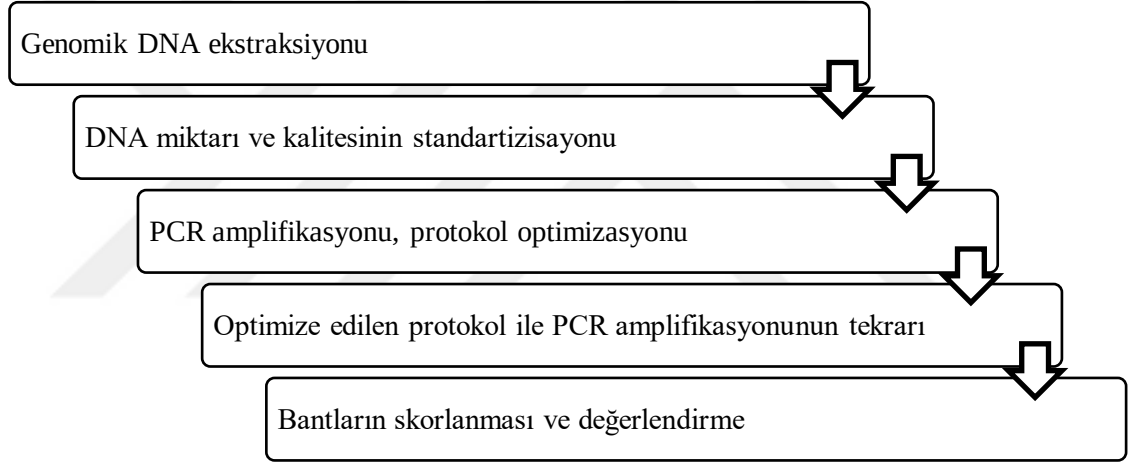
Çizelge 3.4. Moleküler analizlerde kullanılmak üzere seçilen *H. annosum* s.s. izolatları

Populasyon kodu	Örnek alan no	İzolat no	Populasyon kodu	Örnek alan no	İzolat no
H1	1	GHa-O1Cz4	H36	10	GHa-O10Cz4
H2	1	GHa-O1Cz5	H37	10	GHa-O10Cz7
H3	1	GHa-O1Cz9	H38	11	GHa-O11Cz1
H4	1	GHa-O1Cz12	H39	11	GHa-O11Cz5
H5	1	GHa-O1Cz14	H40	11	GHa-O11Cz10
H6	2	GHa-O2Cz3	H41	12	GHa-O12Cz1
H7	2	GHa-O2Cz5	H42	12	GHa-O12Cz7
H8	2	GHa-O2Cz8	H43	13	GHa-O13Cz2
H9	3	GHa-O3Cz2	H44	13	GHa-O13Cz3
H10	3	GHa-O3Cz4	H45	13	GHa-O13Cz5
H11	3	GHa-O3Cz7	H46	14	GHa-O14Cz2
H12	3	GHa-O3Cz8	H47	14	GHa-O14Cz5
H13	4	GHa-O4Cz2	H48	15	GHa-O15Cz2
H14	4	GHa-O4Cz8	H49	15	GHa-O15Cz3
H15	4	GHa-O4Cz11	H50	15	GHa-O15Cz4
H16	5	GHa-O5Cz1	H51	15	GHa-O15Cz5
H17	5	GHa-O5Cz6	H52	16	GHa-O16Cz2
H18	5	GHa-O5Cz8	H53	16	GHa-O16Cz4
H19	5	GHa-O5Cz10	H54	16	GHa-O16Cz6
H20	6	GHa-O6Cz3	H55	17	GHa-O17Cz1
H21	6	GHa-O6Cz5	H56	17	GHa-O17Cz3
H22	6	GHa-O6Cz8	H57	17	GHa-O17Cz6
H23	6	GHa-O6Cz10	H58	17	GHa-O17Cz7
H24	7	GHa-O7Cz2	H59	18	GHa-O18Cz1
H25	7	GHa-O7Cz4	H60	18	GHa-O18Cz2
H26	7	GHa-O7Cz5	H61	18	GHa-O18Cz4
H27	7	GHa-O7Cz8	H62	18	GHa-O18Cz5
H28	8	GHa-O8Cz2	H63	19	GHa-O19Cz1

H29	8	GHa-O8Cz6	H64	19	GHa-O19Cz2
H30	8	GHa-O8Cz7	H65	19	GHa-O19Cz5
H31	8	GHa-O8Cz10	H66	19	GHa-O19Cz7
H32	9	GHa-O9Cz5	H67	20	GHa-O20Cz1
H33	9	GHa-O9Cz9	H68	20	GHa-O20Cz2
H34	9	GHa-O9Cz11	H69	20	GHa-O20Cz3
H35	9	GHa-O9Cz12	H70	20	GHa-O20Cz10

3.3.4.3. PCR esaslı metotlar

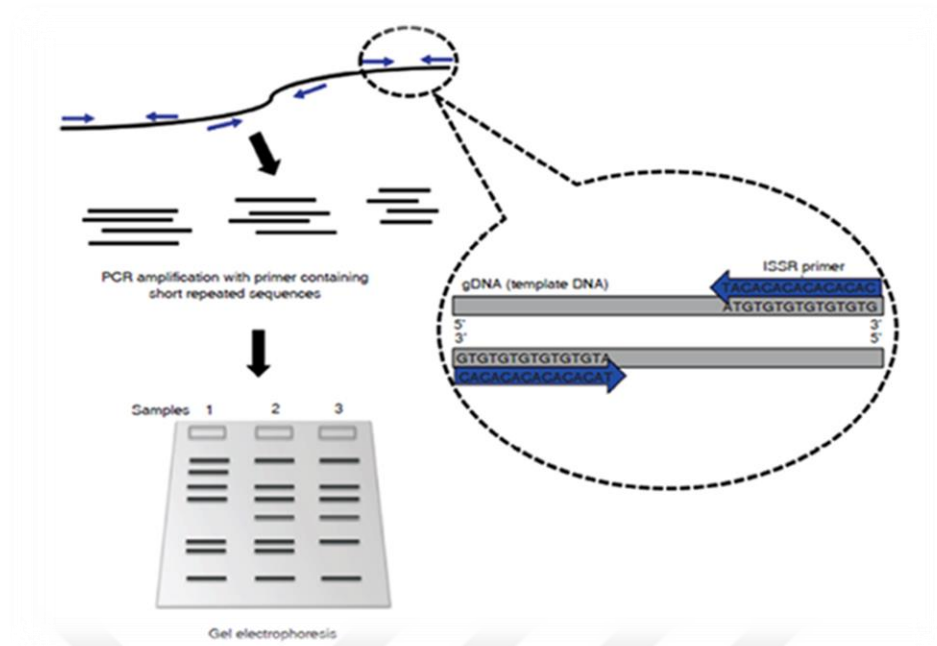
Fungal popülasyonda genetik varyasyonu moleküler teknikler ile belirlemek amacıyla, RAMS ve M13 primerleri kullanılmıştır. PCR esaslı moleküler tekniklerin süreç akış şeması Şekil 3.10’da görüldüğü gibidir.



Şekil 3.10. PCR esaslı moleküler tekniklerin süreç akış şeması

3.3.4.3.1. *H. annosum* izolatlarının RAMS markörleri ile karakterizasyonu

Rastgele Çoğaltılmış Mikrosatelit Markörleri (RAMS/ISSR) birçok basidiomiset türünün genetik farklılığının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Reddy vd., 2001). Reaksiyonlar, Hantula vd., (1996) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyonlarının şematik gösterimi Şekil 3.11’de verilmiştir.



Şekil 3.11. RAMS/ISSR primerleri kullanılarak yapılan PCR amplifikasyonlarının şematik gösterimi (Ng ve Tan; 2015'e atfen)

PCR amplifikasyonları için tekrarlı dizilere sahip $(CCA)_5$, $(TCG)_5$, $(GAG)_5$ ve $(CT)_7$ olmak üzere 4 adet RAMS primeri kullanılmıştır. CCA primeri için Thermal Cycler'in bir döngüsü, 95°C' de 10 dk, 95°C' de 30 sn, 64°C' de 45 sn ve 72°C' de 2 dk olmak üzere toplam 37 döngüden oluşmaktadır. Aşağıda bulunan Çizelge 3.5.'de primerlere ait PCR reaksiyonları bulunmaktadır.

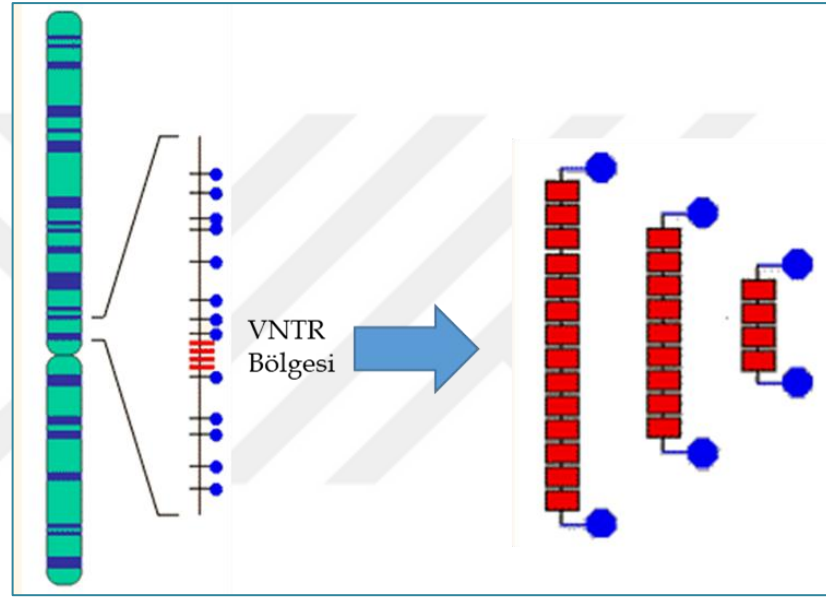
Çizelge 3.5. RAMS primerlerine ait PCR reaksiyonları

Döngüler	Primer ve reaksiyonlar			
	$(CCA)_5$	$(TCG)_5$	$(GAG)_5$	$(CT)_7$
Hot Start, Denatürasyon	95 °C 'de 10 dk	95 °C 'de 10 dk	95 °C 'de 10 dk	95 °C 'de 10 dk
Denatürasyon	95 °C 'de 30sn	95 °C 'de 30sn	95 °C 'de 30sn	95 °C 'de 30sn
Annealing	64 °C' de 45sn	61 °C' de 45sn	61 °C' de 45sn	50 °C' de 45sn
Extension	72°C 2 dk	72°C 2 dk	72°C 2 dk	72°C 2 dk
Döngü sayısı	37 kez 2	37 kez 2	37 kez 2	37 kez 2
Son uzama aşaması	72 °C 7 dk	72 °C 7 dk	72 °C 7 dk	72 °C 7 dk

PCR sonucu elde edilen ürünler, jel elektroforezinde analiz edilinceye kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.4.3.2. *H. annosum* izolatlarının M13 markörü ile karakterizasyonu

Minisatelit dizilerden (Şekil 3.12) biri olan ve bakteriofajlardan elde edilen M13 primeri (Vassart vd., 1987) ilk olarak insan genomundaki çeşitliliği tespit etmek amacıyla kullanılmıştır. Bu dizinin varlığı funguslar da dahil birçok farklı organizmada çeşitli çalışmalar ile rapor edilmiştir (Ruskov vd., 1988; Rogstad vd., 1988; Meyer vd., 1991; Karlsson, 1994; Stenlid vd., 1994).



Şekil 3.12. Minisatelit (VNTR) bölgesinin şematik gösterimi (Anonim, 2019a)

Çalışmamızda izole edilen genomik DNA'lar M13 primeri DNA-GAGGGTGGCGTTCT (Wieland Meyer, pers. comm.) kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Toplam 50 µl reaksiyon hacminde; Tris-HCl 10 mM, pH 8; dNTPs 0,2 mM; MgSO₄ 2 mM; Taq polymerase 1,25 U; primer (M13) 2 µM; yaklaşık 10 ng hedef DNA yer almıştır. PCR amplifikasyonu thermocycler (BioRad) cihazında, başlangıç denatürasyonundan (95°C'de 10 dk.) sonra 95 °C'de 2 dakika olacak şekilde 37 döngüden ve son sentez döngüsünden (72°C'de 10 dk.) oluşmaktadır.

3.3.4.3.3. Jel Elektroforezi

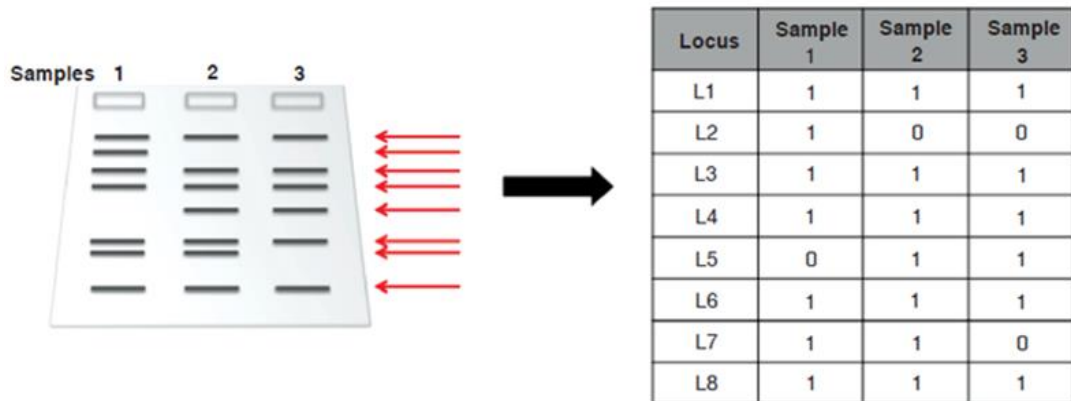
Çoğaltılmış DNA fragmentleri, %1 lik SYNERGEL™ (Diversified Biotech) 1xTAE tamponu içinde yürütülerek görüntülenmiştir. Elektroforezde kullanılan synergel

hazırlamak için erlenmayer içine 2 gr %1'lik synerjel koyulmuş ve jelin çözülmesi için üzerine %96'lık ethanol püskürtülmüştür. Daha sonra karışımın üzerine 100 ml 1x TAE buffer ve 1,5 gr agaroz jel koyularak iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan jel karışımı, 4°C'de yarım saat bekletildikten sonra mikrodalga fırın içerisinde 100 °C sıcaklıkta yaklaşık 5dk kaynatılıp soğumaya bırakılmıştır. Soğuduktan sonra 2 µl ethidyum bromit eklenmiştir. Jel kalıbı, jel yapma ünitesi içerisine yerleştirildikten sonra, uygun boyuttaki taraklar yerleştirilmiş ve buraya dökülen synerjelin donması için 45 dk beklenmiştir. Ardından jel yüzeyini kaplayacak miktarda 1x TAE buffer eklenmiştir. Jel donduktan sonra taraklar jelden çıkartılarak, jel üzerinde açılan kuyucuklara, markör boyası ile karıştırılan ürünler pipetlenmiş ve ürünler oda sıcaklığında ilk 30 dakika 60 voltta, daha sonra 90 voltta olmak üzere ortalama 3 saat süre boyunca 100 bp'lik DNA ladder (Invitrogen™) ile birlikte koşturulmuştur. Birinci ve üçüncü saatin sonunda jel, ultraviyole ışık altında görüntülenerek, bantların fotoğrafları çekilmiştir.

3.3.4.4. PCR reaksiyonlarının skorlanması ve değerlendirilmesi

3.3.4.4.1. Skorlama

Elektroforez işlemi gerçekleştirildikten sonra UV ışığı altında görüntülenerek fotoğraflanan bantlarda bireyler arasındaki genetik ilişki, markörlerinin varlığı (1) ve yokluğu (0) şeklinde belirlenmiş (Şekil 3.13) ve benzerlik matrisi oluşturulmuştur. Jel görüntülemeleri sonucunda fotoğraflarda sadece net olarak ayırt edilebilen bantlar değerlendirilmeye alınmıştır.



Şekil 3.13. Jel elektroforezi sonucu görüntülenen bantların skorlanması (Ng ve Tan; 2015'e atfen)

3.3.4.4.2. İstatiksel Değerlendirme

Oluşturulan matriks öncelikle GenAlex 6.5 Versiyonu programında (Peakall ve Smouse, 2006; 2012) AMOVA analizine tabi tutulmuştur.

Gruplandırma ilişkilendirme analizleri

Değerlendirme aşamasında markör veri matrisinden faydalanılarak gruplandırma-ilişkilendirme analizleri yapılmıştır. Bu aşamada kümeleme (Cluster) analizi (Pritchard ve Anderson, 1971) ve İki Yönlü Gösterge (TWINSPAN) Analizi (Gauch ve Whittaker, 1981) yöntemlerinden faydalanılmıştır. Bu iki analiz sonucunda elde edilen dendrogramlar üzerinde grup ayrımları yapılmış ve en uygun grup sayısının belirlenmesinde Çoklu Permutasyon Testi (MRPP/ Multi-Response Permutation Procedure) uygulanmıştır (Clarke, 1993). En uygun grup sayısının belirlenmesinin ardından eğilimsiz uyum analizi (DCA) (Hill, 1979) yöntemi ile, gruplarla yüksek korelasyon gösteren çevresel değişkenler (eğim, yükselti, her bir ağaca ait enlem boylam değerleri) ve 0-1 markör veri matrisi kullanılarak ağaçların mesafe değerleri ile oordinasyon eksenleri üzerindeki konumları belirlenmiştir. Daha sonra seçilen ayrım grupları elde edilen oordinasyon grafiği üzerine aplike edilerek, grupların konumları eksenler üzerinde gösterilmiştir.

Tüm bu analizler için SPSS 17.0, PCORD-6, ve PAST paket programlarından faydalanılmıştır.

Filogenetik ağaç oluşturulması

Populasyonların veya türlerin evrimsel akrabalığını gösteren soy ağaçlarına filogenetik ağaç adı verilmektedir. Bir grubun evrimsel tarihinin grafik şeklinde aktarımı için filogenetik ağaçlar kullanılmaktadır. Filogenetik ağaçlar, benzer nükleotit dizilimine sahip bireylerin farklı nükleotit dizilimine sahip bireylere göre, daha yakın zaman ait ortak bir ataya sahip oldukları prensibine dayanmaktadır. Filogenetik ağaçtaki yatay çizgiler nükleotit farklılıklarının yüzdesini gösterirken dikey çizgiler ağacın görsel hale getirilmesi için kullanılmaktadır (Freeman ve Herron, 2007).

Filogenetik ağaç oluşturmak için mesafe temelli ve karakter temelli yöntemler olmak üzere iki çeşit yöntem kullanılmaktadır. Kullanılan mesafe temelli yöntemlerde, temel alınan dizinin türler arasındaki hizalanmasıyla görülen benzersizliklerden yararlanılmaktadır. Dizi hizalanması sonucu hesaplanan evrimsel mesafeler her bir takson çifti arasındaki mesafelerin bir matrisinin oluşturulmasında kullanılmaktadır. Matristeki bu çiftli mesafe skorlarına dayanarak tüm taksonlar için filogenetik bir ağaç oluşturulabilmektedir (Hedrick, 2005).

Bu çalışmada filogenetik ağaç oluşturmak için mesafe temelli yöntemlerden biri olan Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) analizleri uygulanmıştır. Bu yöntem prensipte, genetik mesafelerle birbirinden ayrılan işlevsel taksonomik birimlerin mesafe matrisini kullanarak kümelemesi temeline dayanan bir metottur (Allendorf ve Luikart, 2007). Yöntemde tüm populasyonlar arasında zamana göre evrimsel değişim oranı sabit kabul edilmekte ve türler, ırklar ya da diğer biyolojik gruplardan elde edilen allel frekansları, nükleotit değişimleri gibi moleküler veriler kullanılarak 2'şerli gruplar arasındaki genetik mesafeler matrix tablosu şeklinde hazırlanmaktadır (Hedrick, 2005).

3.4. Çevresel değişkenler ile hastalık ilişkisinin belirlenmesi

Çevresel değişkenler ile hastalık etmeni arasındaki ilişkinin belirlenebilmesi için hastalıklı ağaçlara ait veriler ile hastalığın yayılışını etkileyebilecek çevresel faktörler ilişkilendirilerek çalışma alanı için potansiyel dağılım modellemesi gerçekleştirilmiştir. Modelleme işlemi için MAXENT 3.3.3k yazılımı kullanılmıştır.

MAXENT yöntemi genel olarak türün çalışma sahası içerisindeki var olduğu noktalardan toplanan verilerle, sahada benzer özellik gösteren diğer noktaları birlikte değerlendirilerek bir uygunluk modeli ortaya koymaktadır (Baldwin, 2009). Sadece var verisine dayalı diğer modelleme yöntemleriyle kıyaslandığında bu yöntemin daha az veriyle daha gerçekçi dağılım ve uygunluk modelleri oluşturmaya imkan verdiği bilinmektedir (Hernandez vd., 2006).

Modelleme işlemi gerçekleştirilirken bağımlı değişken olarak hastalıklı ağaçlara ait var verileri kullanılırken, çevresel değişkenler noktasında türlerin yayılışında etkili olabileceği düşünülen çevresel faktörler kullanılmıştır. Bu faktörlerin sürekli ya da kategorik veri olduğu belirtildikten sonra, değerlendirmeler için sonuç eğrileri ve jackknife istatistikleri seçenekleri işaretlemiştir.

Modelleme aşamasında kullanılacak değişkenleri seçmek için R-Studio programı yardımıyla değişkenlerin birbirleri ile olan korelasyonları incelenmiştir. Birbirleri ile yüksek korelasyona sahip değişkenlerin birlikte modellenmeye dahil edilmesi çoklu bağlantı problemine neden olabileceğinden 0.75 üzerinde Pearson değerine sahip değişkenler arasında bir eleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

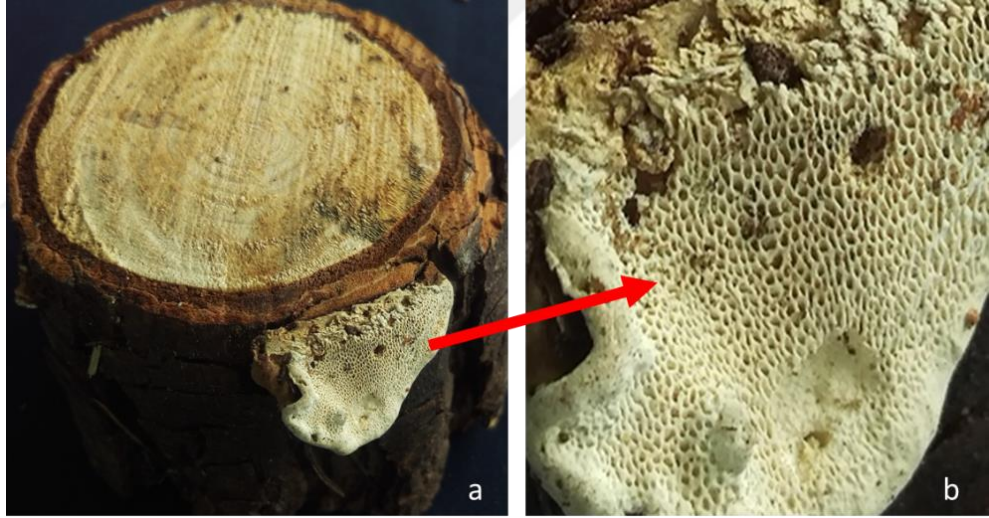
Çalışmada hastalık ile ilişkili olarak ortaya çıkan modellerin başarısı, ROC (Recieve Operating Characteristics) analizi ve Jackknife istatistiği yardımıyla sorgulanmıştır (Araújo vd., 2005; Phillips vd., 2006; Mert vd., 2013). MAXENT yöntemi kullanılarak elde edilen modeli inşaa eden değişkenler kullanılarak hastalıklı ağaçlara ait potansiyel dağılım haritası oluşturulmuştur (Hernandez vd., 2006; Özkan ve Mert; 2010).

4. BULGULAR

4.1. Laboratuvar çalışmalarına ait bulgular

4.1.1. Morfolojik teşhis alışmaları

Tez alışması kapsamında, gençleştirme sahasında 20 adet hastalık ocağı tespit edilmiştir. Tespit edilen hastalık ocaklarında örneklemelerin yapıldığı 209 kızılçam bireyinden toplam 182 adet izolat elde edilmiştir. Hastalık ocaklarından toplanan karakteristik üreme organları (şekil 4.1) incelendiğinde genellikle hassas yapıda, düzensiz şekillerde ve oldukça değişken ebatlarda oldukları görülmektedir. st yüzeyleri kahverengi, pürüzsüz ve sert bir tabakadan oluşmaktadır. Krem renkteki porlu yüzeyleri küçük ve yuvarlak gözeneklerden meydana gelmektedir.



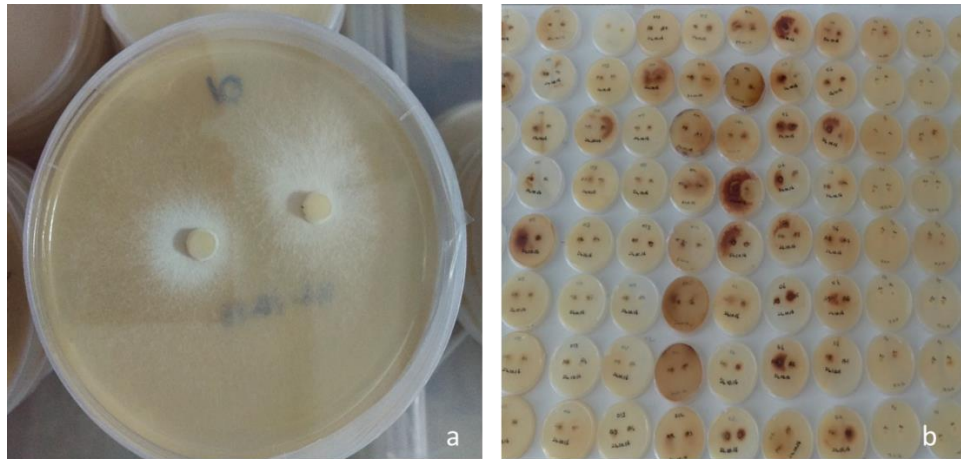
şekil 4.1. *H. annosum*'a ait karakteristik üreme organı: a) morfolojik görüntüsü, b) krem renkli porlu yüzeyi

Etmene ait konidi ve sporlar (şekil 4.2) stereomikroskop ve ışık mikroskobu altında incelenerek öncelikle fungusun tür düzeyinde morfolojik tanı işlemleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.2. *H. annosum*'a ait a) ağaçta meydana gelen konidler b) konidioforun mikroskopik görüntüsü (Foto: Nikica Ogris, 2004)

İzolatların IS gruplarının belirlenmesi amacıyla yapılan eşleştirme sonuçlarına bakıldığında, Gölhisar İbecik kızılçam ormanlarından elde edilen *Heterobasidion* spp. izolatlarının, *H. annosum* s.s. test izolatları ile % 96,9 oranında uyumluluk gösterdiği (Çizelge 4.1) tespit edilmiştir. *H. annosum* s.s.'a ait homokaryon test izolatları ve bilinmeyen izolatlar arasında eşleştirme testleri sonucunda belirgin bir zon oluşumuna rastlanmamıştır (Şekil 4.3). İki üç hafta sonunda, eşleşme gösteren her iki partnerde kanca oluşumları gözlemlenmiş ve homokaryotik misellerin tek tip bir heterokaryotik koloniye dönüştüğü tespit edilmiştir. Başlangıçta beyaz renkte olan koloniler sonrasında koyulaşarak morfolojik olarak değişiklik göstermiştir.



Şekil 4.3. Eşleştirme testi sonucu a) *H. annosum* s.s.'a ait homokaryon test izolatı ve bilinmeyen izolatın petri kabındaki görüntüsü b) morfolojik olarak değişiklik gösteren kolonilerin petri kabındaki görüntüsü

Çizelge 4.1. *Heterobasidion* izolatlarının IS gruplarının belirlenmesi amacıyla yapılan eşleştirme testi sonuçları

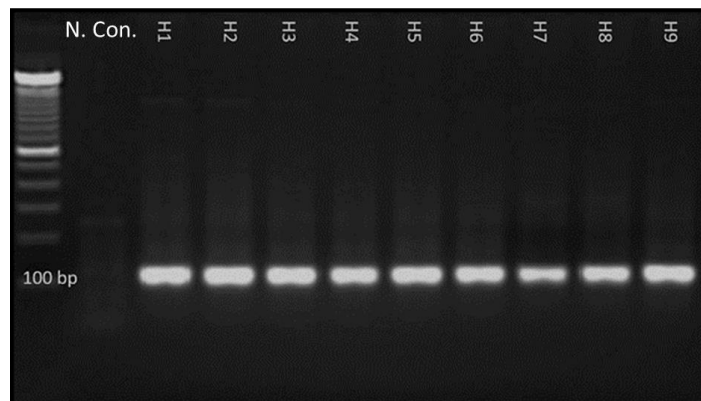
No	İzolat no	<i>H. annosum</i> s.s.	<i>H. abietinum</i>	<i>H. parviporum</i>
		Tester 1-2	Tester 3-4	Tester 5-6
1	GHa-O1Cz1	++	--	--
2	GHa-O1Cz2	++	--	--
3	GHa-O1Cz12	++	--	--
4	GHa-O1Cz13	++	--	--
5	GHa-O1Cz14	++	--	--
6	GHa-O3Cz8	++	--	--
7	GHa-O4Cz2	++	--	--
8	GHa-O4Cz11	++	--	--
9	GHa-O5Cz8	++	--	--
10	GHa-O5Cz9	++	+*	+*
11	GHa-O6Cz10	++	--	--
12	GHa-O7Cz1	++	--	--
13	GHa-O7Cz7	*+	--	--
14	GHa-O7Cz8	++	* ₋	* ₋
15	GHa-O8Cz2	++	--	--
16	GHa-O8Cz6	++	--	--
17	GHa-O9Cz6	++	--	--
18	GHa-O9Cz10	++	--	--
19	GHa-O9Cz11	+*	--	--
20	GHa-O10Cz4	++	* ₋	* ₋
21	GHa-O11Cz5	++	--	--
22	GHa-O12Cz7	++	--	--
23	GHa-O12Cz5	++	--	--
24	GHa-O13Cz2	+*	--	--
25	GHa-O13Cz3	++	--	--
26	GHa-O13Cz5	++	--	--
27	GHa-O14Cz2	++	--	--
28	GHa-O15Cz2	++	--	--
29	GHa-O15Cz4	++	--	--
30	GHa-O16Cz6	++	--	--
31	GHa-O17Cz5	++	--	--
32	GHa-O17Cz6	++	--	--
33	GHa-O17Cz7	++	--	--

34	GHa-O18Cz1	++	--	--
35	GHa-O18Cz4	++	--	--
36	GHa-O19Cz1	++	--	--
37	GHa-O20Cz2	++	--	--
Eşleştirme sayısı		74	74	74
Eşleşme oranı (%)		96,9	1,35	1,35
Test izolatları: <i>H. abietinum</i> F03164/1 (Trentino, Italy), F03191/1 (Trentino, Italy); <i>H. parviporum</i> 98036/3/1 (Finland), 02042/1 (Xinjang, China); <i>H. annosum</i> s.s. 93128/6 (Denmark), 03007/4 (Finland). +, kanca oluşumu vardır; - kanca oluşumu yoktur.				

Kızılçamdan elde edilen izolatların, diğer IS grubuna ait test izolatları ile uyumlu olmadığı tespit edilmiştir. İzolatlar arasında yoğun miselyum oluşumundan meydana gelen belirgin zon oluşumları gözlenmiştir. Misellerde gözle görülür morfolojik değişiklikler tespit edilememiştir. Sonuç olarak, çalışmada kullanılan izolatların, *H. annosum* s.s. IS grubuna ait olduğu yapılan eşleştirme testleri ile kesinleştirilmiştir.

4.1.2. Moleküler teşhis çalışmaları

IS gruplarının belirlenmesi amacıyla, türe özgü primerler ile gerçekleştirilen PCR amplifikasyonu sonuçlarına bakıldığında, elde edilen tüm izolatların *H. annosum* s.s. olduğu ve bu sonuçların morfolojik teşhis çalışmaları ile uyumluluk gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek, görüntülenmiş ve çoğaltılması hedeflenen bölgede oluşan bantlar (Şekil 4.4) belirlenmiştir. MJ primer çifti PCR amplifikasyonunda *H. annosum* s.s. için yaklaşık olarak 100 bp'lik fragment vermektedir.

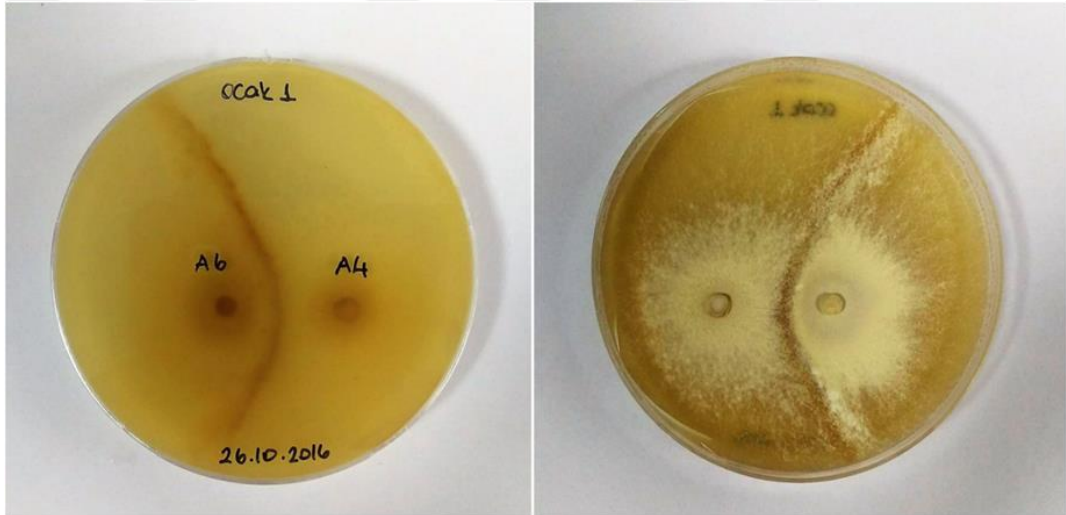


Şekil 4.4. Türe özgü MJ primer çifti ile gerçekleştirilen PCR amplifikasyon ürünleri

4.1.3. *H. annosum*'un populasyon yapısının belirlenmesi

4.1.3.1. *H. annosum* izolatlarının somatik eşleştirme testleri ile genetik farklılıklarının tespiti

Çalışmada *H. annosum* izolatlarının genetik farklılıklarının morfolojik olarak tespiti amacıyla somatik eşleştirme testleri uygulanmıştır. İnkubasyon süresinin sonunda, somatik eşleştirme testlerine tabi tutulan *H. annosum* s.s. kültürleri arasında meydana gelen ayırım zonları (Şekil 4.5) incelenerek morfolojik olarak genetik farklılık verileri elde edilmiştir.



Şekil 4.5. Somatik eşleştirme sonucu iki farklı genete sahip heterokaryotik kültür arasında meydana gelen zon oluşumu

Ayırım zonunun varlığı (1) ve yokluğu (0) baz alınarak oluşturulan benzerlik matrisi Arlequin programı, AMOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. İzolatların elde edildiği ağaçlar ArcCIS programında haritalanmış ve genotipler bu haritalar üzerinde gösterilmiştir (EK-1). Eşleştirme sonuçlarına göre, 20 hastalık ocağından izole edilen 182 *H. annosum* s.s. izolatının 1 ile 3 arasında, toplamda 34 adet farklı genete ait olduğu (Çizelge 4.2) tespit edilmiştir. Sonuçlarda 4-7-9-14-16-19-20 no'lu hastalık ocaklarında tek bir genetin yayılış gösterdiği görülmektedir. En büyük genotip, 126,5 m² alanda yayılan ve 12 ağacın tümünü enfekte eden tek bir genettir. En fazla genotip sayısı 3 no'lu hastalık ocağında bulunmaktadır. Bu ocakta görülen en küçük genotip 1 m² ile tek bir ağacı temsil etmektedir.

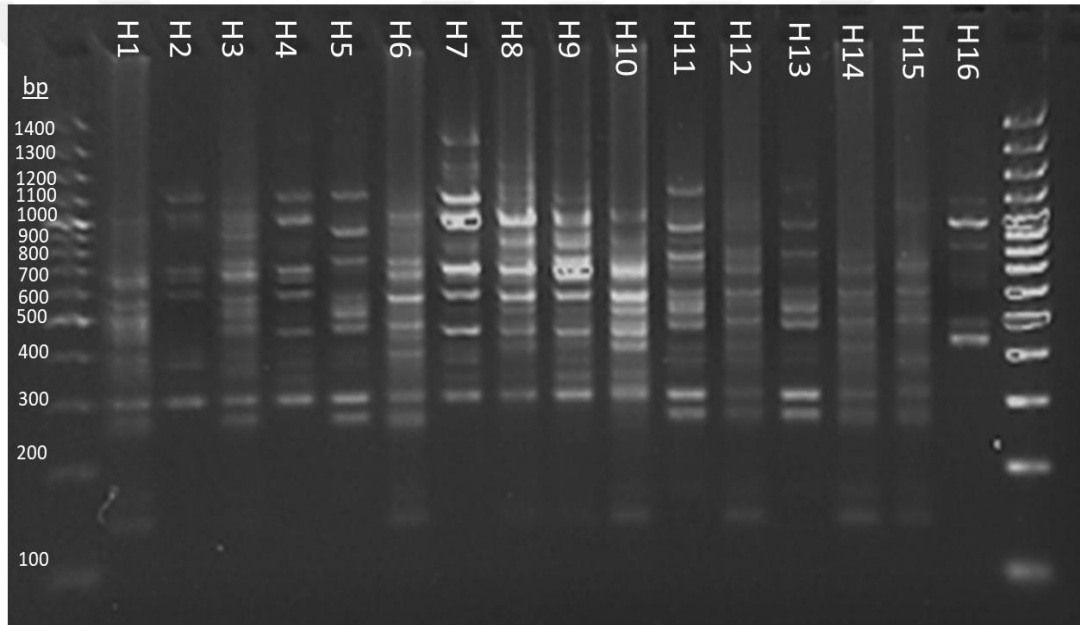
Çizelge 4.2. Eşleştirme testi sonucunda göre *H. annosum* izolatlarına ait genet sayıları

Hastalık ocağı kodu	Örneklenen ağaç sayısı	Elde edilen izolat sayısı	Genet	
			Sayısı	Büyüklüğü (m ²)
O1	15	15	2	5/64
O2	8	8	2	2/12
O3	13	13	3	1/7,5/58
O4	11	11	1	112
O5	11	11	2	6,5/22,5
O6	10	10	2	24/39,5
O7	11	11	1	90,5
O8	10	10	2	2/13
O9	12	12	1	126,5
O10	8	8	2	61,5/1
O11	10	10	2	3/8,5
O12	7	7	2	7,5/8
O13	6	6	2	3,5/36,5
O14	5	5	1	6,5
O15	6	6	2	2,5/5
O16	7	7	1	24
O17	7	7	2	1/21
O18	7	7	2	1/34
O19	8	8	1	38
O20	10	10	1	50,5
Toplam	182	182	34	429

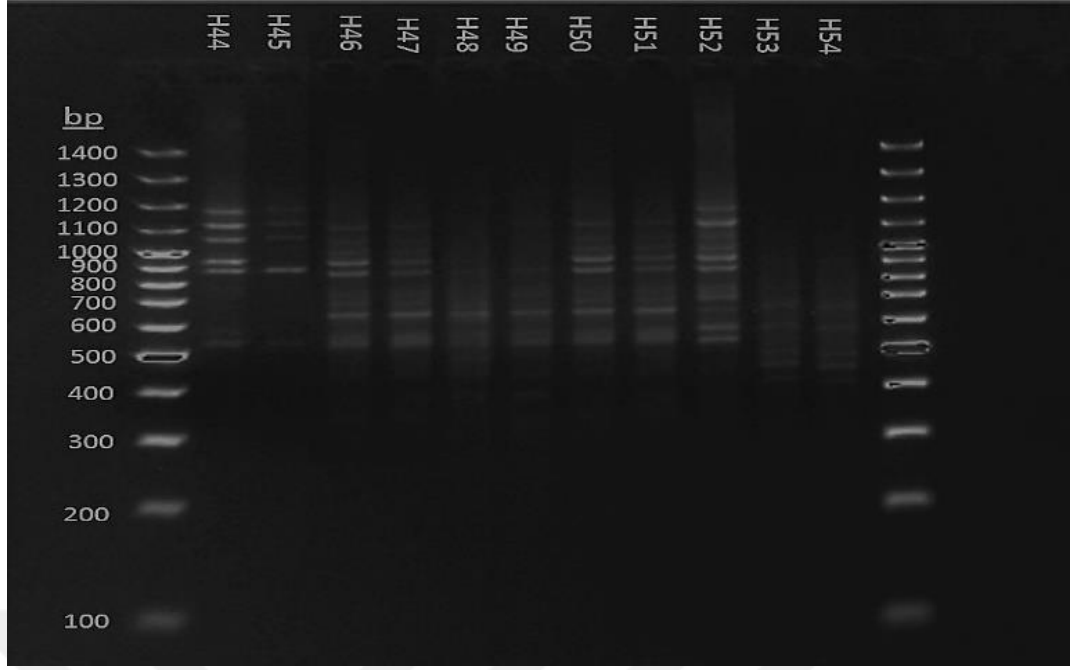
4.1.3.2. PCR esashı metotlar

4.1.3.2.1. *H. annosum* izolatlarının RAMS ve M13 markörleri ile karakterizasyonu ve polimorfizmin değerdendirilmesi

Eşleştirme testi sonuçlarına göre genetik farklılık gösterdiği düşünölen 70 adet izolat RAMS ve M13 markörleri ile analiz edilmiştir. Metot kısmında detaylı şekilde anlatılan pre-amplifikasyon, selektif amplifikasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Çalışmada, RAMS (Şekil 4.6) ve M13 primerleri (Şekil 4.7) kullanılarak amplifikasyon sonuçları elde edilmiştir.



Şekil 4.6. (CCA)₅ RAMS primeri ile gerçekleştirilen PCR amplifikasyon ürünleri



Şekil 4.7. M13 primeri ile gerçekleştirilen PCR amplifikasyon ürünleri

Söz konusu primerler ile amplifikasyon sonucunda elde edilen DNA bant uzunlukları 350-1500 bp arasında değişmektedir. Primerler ile gerçekleştirilen DNA amplifikasyonu sonucunda toplamda 906 DNA bandı elde edilmiş, bunların 24 adetinin polimorfik olduğu, dolayısıyla populasyonlar arasında % 2,64 polimorfizm (Çizelge 4.3) bulunduğu hesaplanmıştır. Allellerin genel polimorfizm oranı %53,2’dir. Elde edilen toplam allel sayısı bakımından (CCA)₅ ve (TCG)₅ en fazla polimorfik bandı (17 adet) üretirken, en az sayıda bant (8 adet) M13 primeri (Çizelge 4.3) tarafından üretilmiştir. (GAG)₅ primeri polimorfik bant üretmemiştir.

Çizelge 4.3. RAMS ve M13 primerlerine göre polimorfizm oranı

Primerler	Toplam bant sayısı (adet)	Polimorfik band sayısı (adet)	Polimorfizm oranı (%)
(CCA) ₅	27	17	62,9
(TCG) ₅	27	17	62,9
(CT) ₅	26	15	57,6
M13	27	8	29,6
Toplam	107	57	53,2

RAMS ve M13 markörlerinin AMOVA analizi sonuçları değerlendirildiğinde, toplam moleküler varyasyonun %49’u hastalık ocakları arasında ve % 51’i ise populasyonlar içindeki bireysel farklılıktan kaynaklandığını (Çizelge 4.4) göstermektedir.

Çizelge 4.4. Farklı hastalık ocaklarından izole edilen *H. annosum* izolatları arasındaki genetik farklılık

Varyasyon kaynağı	df	SS	MS	Est.	
				Var.	%
Popul. İçinde	19	145.614	7.664	1.716	51
Popul. Arasında	50	83.70	1.674	1.674	49
Toplam	69	229.314		3.390	100

4.2. Verilerin düzenlenmesi ve genetik istatistik programlarının kullanılması

4.2.1. Gruplandırma ilişkilendirme analizleri

Bantların varlığı (1) ve yokluğu (0) kaydedilerek veri dosyası hazırlanmıştır. PCR başarısızlığı veya herhangi bir deneme hatası nedeniyle olmadığı düşünülen bantlar kayıp veri olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System, NTSYS-pc version 2.1, Exeter Software (Setauket, N.Y., USA) paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Öncelikle bireyler arasındaki benzerlik indeksleri hesaplanmıştır. Benzerlik indeksinden yararlanılarak ve R- Studio programı kullanılarak Jaccard yöntemi ile UPGMA dendrogram oluşturulmuştur.

Ayrıca markör varlığı matrisine göre gruplandırma ilişkilendirme analizi yapılmıştır. Bu analizde

- Cluster (Kümeleme) yöntemi “Euclidean-wards indisine göre uygulanan kümeleme yöntemi”
- Twinspan (İki yönlü gösterge analizi) 3’lü ve 4’lü ayırım denenmiştir.

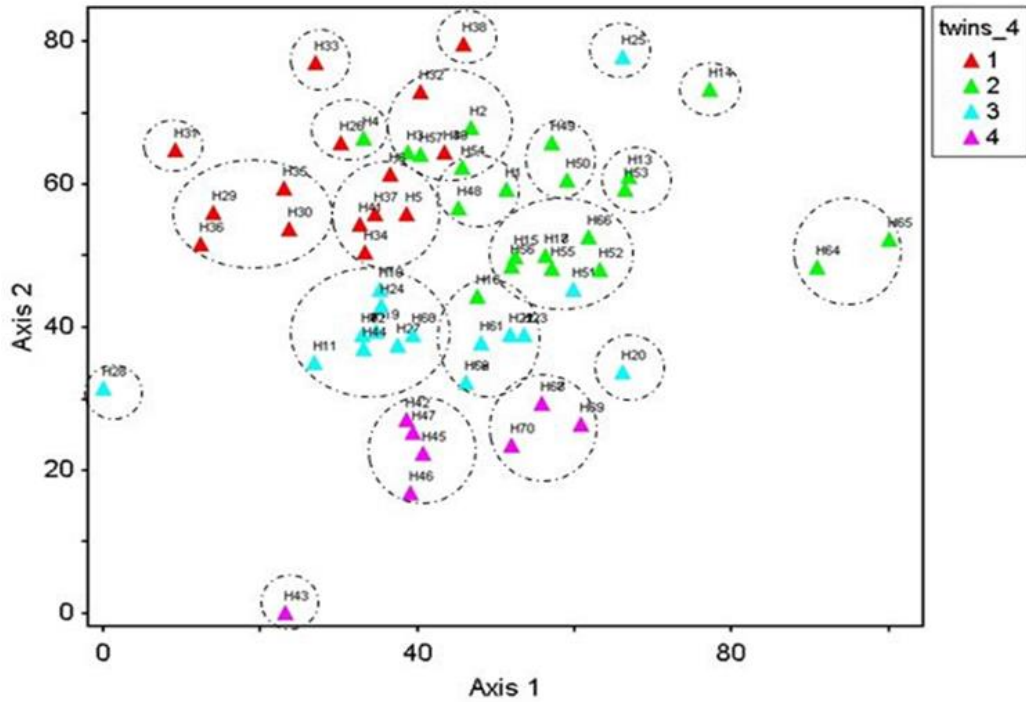
Hangi yöntemin daha iyi ayırım yaptığını incelemek için MRPP (Çoklu permutasyon testi) analizi uygulanmış, T (Gruplar arası mesafe) ve A (Grup içi homojenlik) değerlerinin yüksek çıktığı analiz olan iki yönlü gösterge analizi 4’lü ayırım (Çizelge 4.5) seçilmiştir. Bu analizlerin tümü PC-ORD (Program ülkesi) programında yapılmıştır. İki yönlü gösterge analizi 4’lü ayırım seçildikten sonra “Eğilimsiz Uyum Analizi (DCA)” yöntemi ile 0-1 markör matrisi ve çevresel değişkenler (eğim, yükselti, her bir ağaca ait enlem boylam değerleri) kullanılarak ağaçların mesafe

değerleri ile oordinasyon eksenleri üzerindeki konumları belirlenmiştir (PC-ORD). Daha sonra seçilen iki yönlü gösterge analizi 4'lü ayırım grupları elde edilen oordinasyon grafiği üzerine aplike edilerek, grupların konumları eksenler üzerinde gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. MRPP analizi sonucunda elde edilen T ve A değerleri

Kümeleme analizi	T	A
Cluster 3'lü	-17,444	0,084921
Cluster 4'lü	-23,6454	0,16512
Twinspan 3'lü	-18,4423	0,089792
Twinspan 4'lü	-25,8892	0,223006

İki yönlü gösterge analizine göre *H. annosum* s.s. izolatları, konumlarına ve ortak markörlerin varlığına göre 21 gruba (Şekil 4.8) ayrılmıştır. Bu gruplarda aynı genete sahip izolatların aynı hastalık ocağında yer almasının yanı sıra, aynı genete ait izolatların farklı hastalık ocaklarında da tespit edildiği (Çizelge 4.6) görülmektedir.



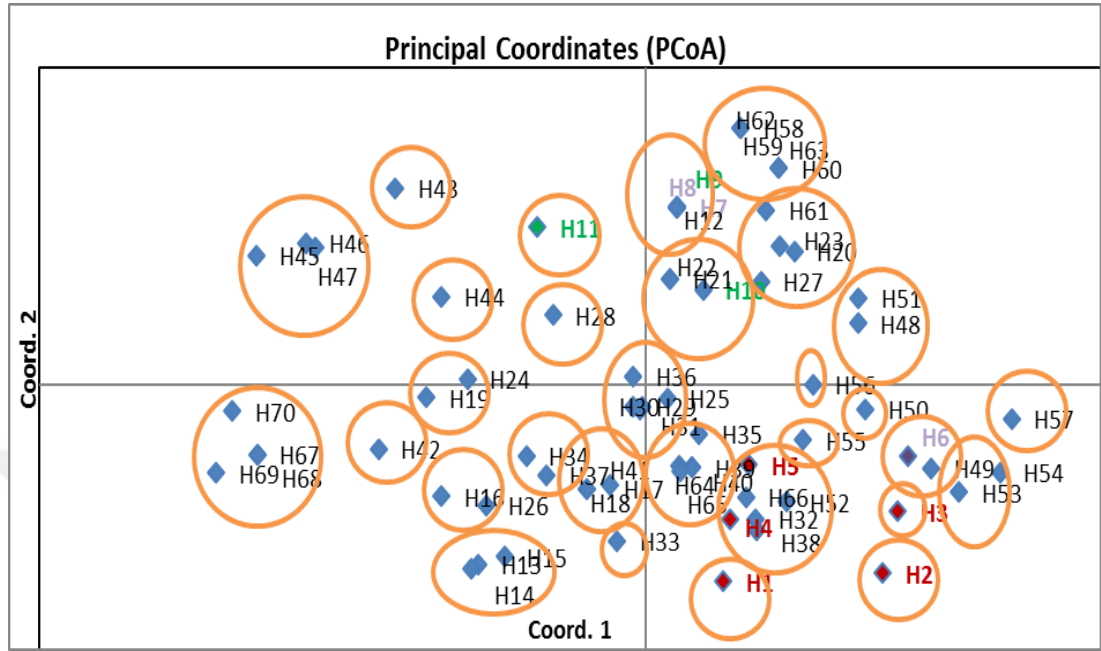
Şekil 4.8. Twinspan analizine göre *H. annosum* s.s. izolatlarının gruplanması

Çizelge 4.6. Twinspan analizine göre *H. annosum* s.s. izolatlarının grup renklenmesi

Grup No	İzolat no	Twinspan 4'lü ayrım	Grup No	İzolat no	Twinspan 4'lü ayrım renklenme
1	H31	Kırmızı	12	H15 H56 H17 H18 H55 H51 H52 H66	Yeşil Yeşil Yeşil Yeşil Yeşil Mavi Yeşil Yeşil
2	H33	Kırmızı	13	H64 H65	Yeşil
3	H38	Kırmızı	14	H25	Mavi
4	H29 H30 H35 H36	Kırmızı	15	H14	Yeşil
5	H4 H26	Yeşil Kırmızı	16	H20	Mavi
6	H32 H2 H3 H57 H39 H54	Kırmızı Yeşil Yeşil Yeşil Kırmızı Yeşil	17	H16 H61 H67 H68 H21 H22 H23	Yeşil Mavi Mavi Mavi Mavi Mavi Mavi
7	H1 H48	Yeşil	18	H11 H44 H27 H60 H63 H24 H19 H12	Mavi
8	H28	Mavi	19	H4 H45 H46 H47	Mor
9	H5 H6 H34 H37 H41	Kırmızı	20	H67 H68 H69 H70	Mor
10	H49 H50	Yeşil	21	H43	Mor
11	H13 H53	Yeşil			

PCoA (Çok Boyutlu Ölçeklendirme) analizine göre, tüm hastalık ocaklarından elde edilen *H. annosum* s.s. izolatlarının 30 farklı genete ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9). İzolatların genetlere göre dağılımları analiz edildiğinde (Çizelge 4.7), her bir genetik en az 1 en fazla 5 farklı hastalık ocağı içinde bulunmaktadır. Yine Çizelge 4.7'ye

bakıldığında Genet 8 ve Genet 10'nun sadece tek bir hastalık ocağında bulunduğu görülmektedir.



Şekil 4.9. *H. annosum* s.s izolatlarının PCoA analizine göre gruplanması

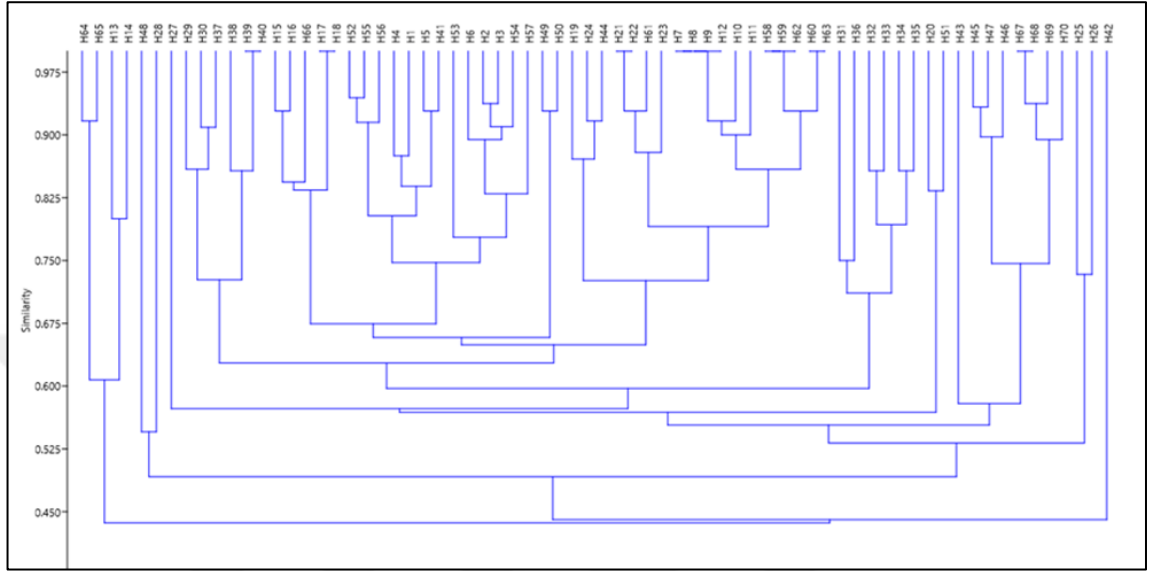
Çizelge 4.7. *H. annosum* izolatlarına ait genetik sayıları ve izolatlara göre dağılımı

Genetik kodu	Populasyon kodu	Genetik başına düşen izolat sayısı
Genetik 1	Pop 13	1
Genetik 2	Pop13	1
	Pop14	2
Genetik 3	Pop13	1
Genetik 4	Pop13	1
Genetik 5	Pop8	1
Genetik 6	Pop5	1
	Pop7	1
Genetik 7	Pop12	1
Genetik 8	Pop20	4
Genetik 9	Pop5	1
	Pop7	1
Genetik 10	Pop4	3
Genetik 11	Pop9	1
	Pop10	1
Genetik 12	Pop5	2

	Pop12	1
Genet 13	Pop9	1
Genet 14	Pop8	3
	Pop7	1
	Pop10	1
Genet 15	Pop9	1
	Pop11	2
	Pop19	2
Genet 16	Pop1	1
Genet 17	Pop1	2
	Pop9	1
	Pop11	1
	Pop16	1
	Pop19	1
Genet 18	Pop17	1
Genet 19	Pop17	1
Genet 20	Pop15	1
Genet 21	Pop2	1
	Pop15	1
Genet 22	Pop1	1
Genet 23	Pop1	1
Genet 24	Pop16	2
Genet 25	Pop17	1
Genet 26	Pop15	2
Genet 27	Pop6	2
	Pop7	1
	Pop18	1
Genet 28	Pop 17	1
	Pop18	3
	Pop19	1
Genet 29	Pop2	2
	Pop3	2
Genet 30	Pop3	1
	Pop6	2
Toplam	20	70

4.2.2. UPGMA dendrogramlarının elde edilmesi ve değerlendirilmesi

Skorlanan bantlardan genetik benzerlik ve uzaklık matrisi oluşturularak kümeleme analizi ile genetik ilişki dendrogramı (Şekil 4.10) elde edilmiştir.



Şekil 4. 10. *H. annosum* s.s. izolatlarının genetik ayrımını gösteren UPGMA dendrogramı

Jaccard benzerlik katsayısı ile oluşturulan dendrograma göre *H. annosum* izolatlarının genotiplerinin kendi aralarındaki benzerlik oranı 0.45 ile 0.925 arasında değişmektedir. Dendrograma göre *H. annosum* izolatlarında genel olarak iki ana kol bulunmaktadır. Bunlardan ilki H64-65 ve H13-14 genotiplerinin bulunduğu koldur. İkinci kol ise iki ana dala ayrılmaktadır. Bu gruplardan birinde H42 nolu izolat yer alırken, diğer grupta farklı hastalık ocaklarından elde edilen izolatlar bulunmaktadır. RAMS ve M13 analizi sonucunda elde edilen dendrograma göre, her bir hastalık ocağında yer alan izolatların belli sınırlar içinde bir genetik varyasyonu barındırdığı görülmüştür. Mesafe olarak birbirine yakın hastalık ocaklarında bulunan izolatların birbirleri ile gruplar oluşturduğu ve birkaç genetin bulunduğu hastalık ocağından hiç ayrılmadığı gözlemlenmiştir. Bununla beraber 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 21, 22, 30, 32, 58, 59, 60, 64, 65, 67, 68, 69 ve 70 nolu izolatların benzerlik katsayıları 0.90'nın üzerinde bulunmuş ve bu izolatların bir ana kolun alt dalları olduğu tespit edilmiştir. Mevcut genotipler ağırlıklı olarak 0.90 civarında Jaccard benzerlik katsayısına sahip çıkarken

bazı genotiplerde bu oranın 0.50'in altına düşmüş olması, tür içi varyasyondan belli ölçülerde yararlanılabileceğini göstermesi açısından önemlidir.

4.3. Çevresel değişkenler ile hastalık ilişkisinin belirlenmesi

Çalışmada hastalıklı olarak tespit edilen ağaçların çevresel değişkenler ile ilişkilendirilmesi noktasında öncelikle kullanılacak değişkenler belirlenmiştir. İlk olarak alana ait eşyükselti eğrisi kullanılarak Arc Map 10.2 programında sayısal yükseklik modeli (SYM) oluşturulmuştur. Bu işlemin ardından oluşturulan SYM, raster formatına dönüştürülerek yükselti altlığı oluşturulmuştur. Yükselti altlığı kullanılarak sırasıyla bakı, gölgelenme, arazi yüzey formu (ayf), pürüzlülük, eğim ve topoğrafik pozisyon indeksi (tpi) değişkenleri elde edilmiştir.

Elde edilen değişkenler arasında çoklu bağlantı probleminin olup olmadığını belirlemek amacıyla Pearson korelasyon analizi (Çizelge 4.8) uygulanmıştır.

Çizelge 4.8. Çevresel değişkenler arasında uygulanan Pearson korelasyon analizi sonuçları

	bakı	tpi	eğim	pürüzlülük	ayf	gölgelenme	yükselti
Bakı	1						
Tpi	0.197	1					
Eğim	-0.109	-0.127	1				
Pürüzlülük	-0.118	-0.155	0.967**	1			
Ayf	0.007	0.738**	-0.055	-0.043	1		
Gölgelenme	0.495**	0.219	-0.520**	-0.455**	-0.029	1	
Yükselti	0.502**	0.282*	-0.426**	-0.458**	0.101	0.457**	1

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Pearson korelasyon analizi sonucunda sadece pürüzlülük ve eğim değişkenleri arasında yüksek korelasyon (>0.75) gözlemlenmiştir. Bu noktada çalışma alanı için eğim değişkeninin daha açıklayıcı olabileceği düşünülerek pürüzlülük değişkeni modellemeye dahil edilmemiştir.

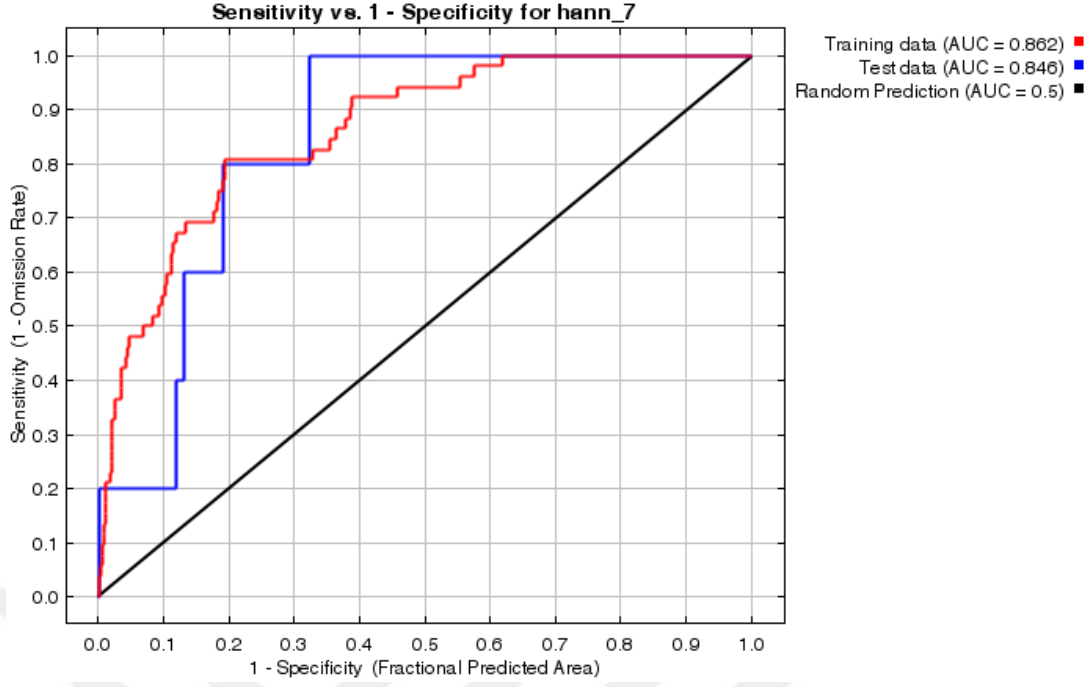
Değişkenler elde edildikten sonra seçilen değişkenler ArcMap 10.2 programı üzerinde “asci” formatında düzenlenmiştir ve MAXENT programı ile modelleme aşamasına geçilmiştir. Analiz esnasında elde edilen modelleri etkileyen değişkenlerin değerlendirilmesinde Jackknife istatistiklerinden ve marjinal cevaplandırıcı eğri yöntemlerinden faydalanılmıştır. Her modelleme aşamasında 10 katlı çapraz geçerlilik testi 10 tekerrürlü olarak yapılmış ve her tekerrüre ait olarak yapılan ROC analizleri neticesinde elde edilen AUC değerleri kaydedilmiştir.

Analiz sonucunda elde edilen modele katkı yapan değişkenler sırasıyla yükselti, bakı, eğim, arazi yüzey formu olarak tespit edilmiştir. Değişkenlere ait jackknife istatistiği sonuçları Şekil 4.11’ de yer almaktadır.



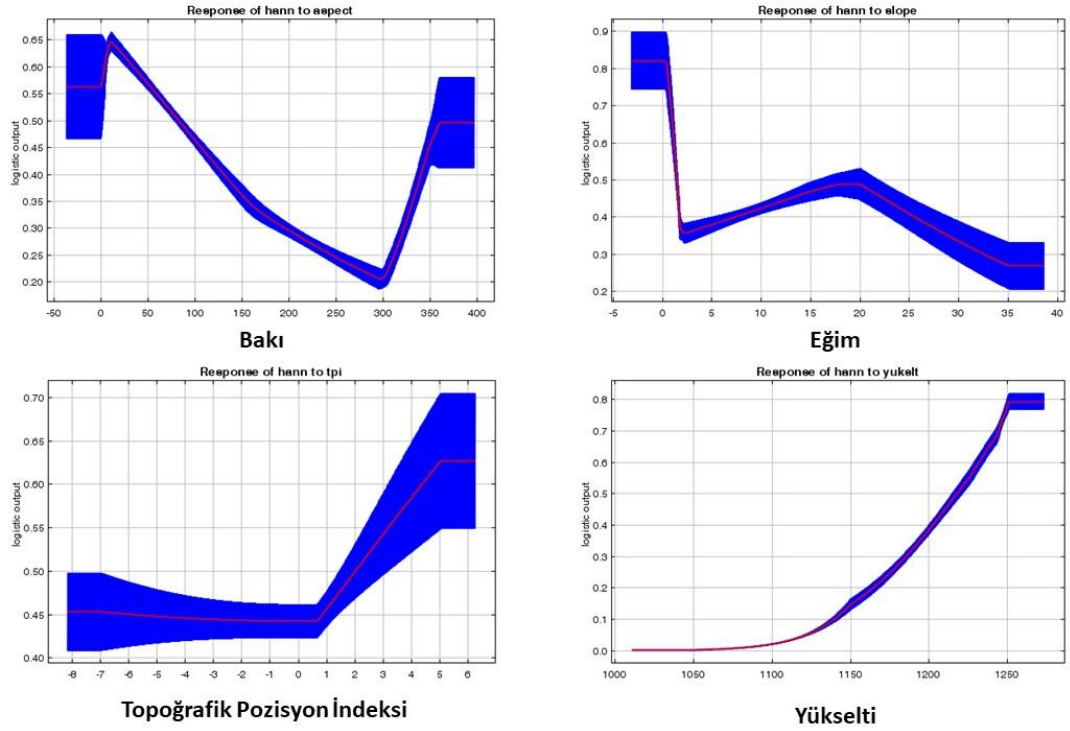
Şekil 4.11. Jackknife istatistiği sonuçları

Maxent kullanılarak elde edilen modele ait eğitim veri seti AUC değeri 0.86, test veri seti AUC değeri 0.85 olarak (Şekil 4.12) elde edilmiştir. ROC analizi neticesinde elde edilen ROC eğrisinin anlamlılığı AUC değeri ile değerlendirilmektedir. ROC grafiğinde eğrinin altından kalan alanın 1 sayısına yakınlığı başarılı modeli temsil etmektedir (Araújo vd., 2005).



Şekil 4.12. Elde edilen modelin eğitim ve test veri seti AUC değerleri

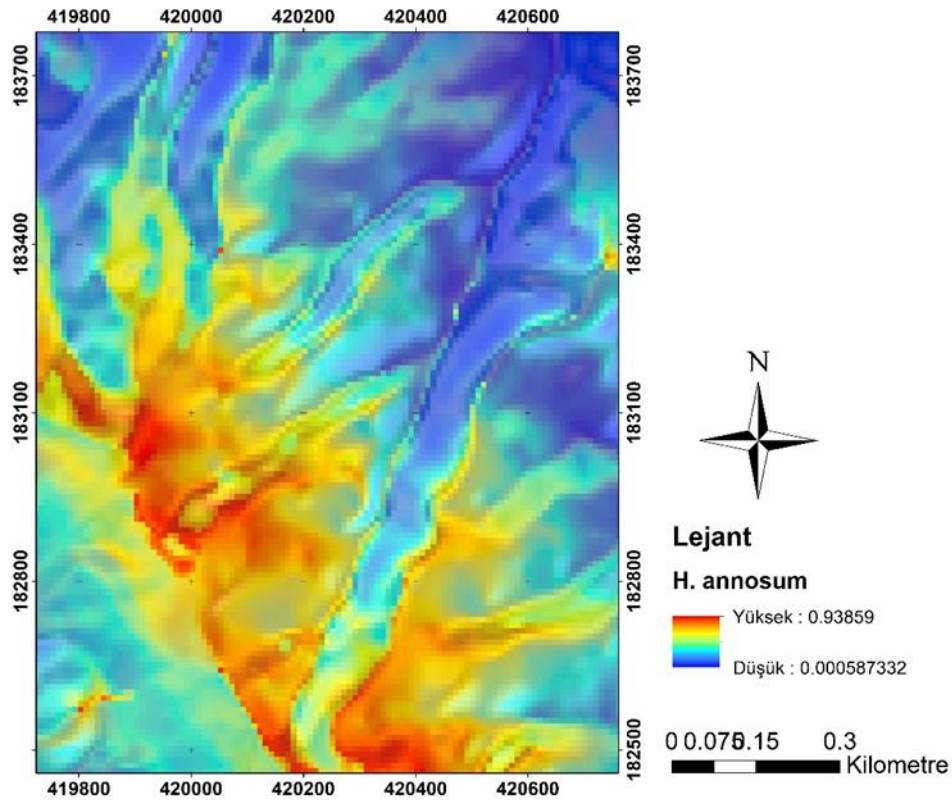
Modele katkıda bulunan değişkenler ile hastalık tespit edilen ağaçlar arasındaki ilişki durumu için marjinal cevaplandırıcı eğrilerden faydalanılmıştır (Süel, 2014). Modele ait marjinal cevaplandırıcı eğriler Şekil 4.13’de verilmiştir.



Şekil 4.13. Modeli oluşturan değişkenlerin marjinal cevaplandırıcı eğrileri

Marjinal cevaplandırıcı eğrilere bakıldığında modeli oluşturan değişkenlerden bakı ile nispeten (0° - 300°) pozitif bir ilişkinin olduğu görülmektedir. Bakı değerinin 300° ile 360° arasında olduğu alanlarda - ki bu alanları kuzeyli bakıları temsil etmektedir – pozitif bir ilişkinin olduğu tespit edilmiştir. Kuzey bakıda (360°) hastalık olasılığı en üst seviyededir. Kuzey doğuya doğru hastalık etmeni bulunma olasılığı az da olsa bulunmakta ve buradan sonra git gide azalış göstermektedir. Diğer bakılarla negatif bir ilişki söz konusudur. Güneye doğru gittikçe negatif ilişki şiddeti artmaktadır. Eğim değişkeni ile ağırlıklı olarak pozitif bir ilişkinin olduğu gözlemlenmiştir. Düz ve düze yakın bölgelerde hastalık etmeninin bulunma olasılığı azalmaktadır. Eğimin hafif derecede arttığı (orta eğimli) tepe oluşumuna sahip yerlerde ise hastalık etmeni artış göstermektedir. Topoğrafik pozisyon indeksi değişkeni ile pozitif yönlü bir ilişki görülmüşken değerler arasındaki varyasyonun düşük olduğu görülmüştür. Ancak Topoğrafik pozisyon indeksi değerinin 1 ile 5 arasında olduğu alanlarda hastalık etmeni açısından pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Arazi gözlemlerimizle uyumlu olarak hastalık etmeninin alt ve orta yamaçları tercih ettiği görülmektedir. Modele en fazla katkı sağlayan yükselti değişkeni ile pozitif bir ilişki tespit edilmiştir. Alan içerisinde yükseltinin arttığı kesimlerde, yağışa ve bölgede yer alan göle bağlı olarak nemliliğin fazla olduğunun bilinmesi sebebiyle yükselti açısından beklenen bir sonuç olmuştur.

MAXENT yöntemi kullanılarak elde edilen modeli inşaa eden değişkenler kullanılarak hastalıklı ağaçlara ait potansiyel dağılım haritası (Şekil 4.14) oluşturulmuştur



Şekil 4.14. *H. annosum*'a ait potansiyel dağılım haritalaması

Hastalık etmeninin bulunduğu ağaçlara ait oluşturulan haritada, hastalıklı ağaçların dağılımında etkili olan alanlar bakı, eğim, topoğrafik pozisyon indeksi ve yükselti değişkenleri kullanılarak temsil edilmiştir. Söz konusu değişkenlere bağlı olarak hastalıklı ağaçların potansiyel dağılım noktaları haritada kırmızı renk ile temsil edilirken potansiyel dağılım durumu uygunluk derecesine göre kırmızıdan maviye doğru değişiklik göstermektedir. Hastalık etmeninin yayılma potansiyelinin yüksek olduğu yerler kırmızı renk ile temsil edilmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma, Burdur ilinin Gölhisar-İbecik ilçesinde kızılçam gençleştirme sahasında yayılış gösteren *H. annosum* s.s. etmeninin izolasyonu, morfolojik ve moleküler teşhisi, populasyon yapısı ve bu hastalık etmeninin çevresel değişkenler ile ilişkisi hakkında bulgular içermektedir.

Tez çalışması kapsamında, gençleştirme sahasında 20 adet hastalık ocağı tespit edilmiştir. Tespit edilen hastalık ocaklarında örneklemelerin yapıldığı 209 kızılçam bireyinden toplam 182 adet izolat elde edilmiştir. Yapılan morfolojik ve moleküler teşhis çalışmaları sonucunda, elde edilen tüm izolatların *H. annosum* s.s. türüne ait olduğu belirlenmiştir.

Etmenin populasyon yapısının belirlenmesi amacıyla yapılan somatik eşleştirme testlerinin sonuçlarına göre, 20 hastalık ocağından izole edilen *H. annosum* izolatlarının 34 farklı genete ait olduğu tespit edilmiştir. RAMS ve M13 markörleri ile gerçekleştirilmiş olan PCR tabanlı moleküler analizlerin sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde bu izolatların 30 farklı genete ait olduğu belirlenmiştir. Toplam moleküler varyasyonun %49'unun hastalık ocakları arasında gerçekleştiği, %51'inin populasyonlar içindeki bireysel farklılıklardan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca çalışmada, MAXENT yaklaşımı yardımıyla hastalık ocakları ile çevresel faktörler kullanılarak potansiyel dağılım modellemesi gerçekleştirilmiştir.

Ülkemizde *H. annosum* s.l.'nin varlığı ilk kez Pilat (1932) tarafından Türkiye'nin makro funguslarının araştırıldığı sörvey çalışmalarında Ilgaz dağlarında bulunan *A. nordmanniana* ssp. *bornmülleriana* üzerinde bildirilmiştir. Lohwag (1957), etmenin Türkiye'deki iğne yapraklı ağaçlarda yaygın olarak bulunduğunu tespit etmiştir. *H. annosum* s.l.'un bugüne kadar ülkemizdeki çamlar üzerindeki varlığı ise Hatay'da *P. brutia* (Kotlaba, 1976), Ankara'da *P. sylvestris* (Selik, 1972), Antalya ve Balıkesir'de *P. nigra* (Lehtijärvi vd., 2006, 2007) türleri üzerinde rapor edilmiştir. Ancak bu kayıtların çoğu fungusun üreme organlarının morfolojik karakteristikleri yardımıyla gerçekleştirilmiş olup, *H. annosum* kompleksine ait IS gruplarının belirlendiği teşhis çalışmaları gerçekleştirilmemiştir. P tipi olarak bilinen *H. annosum* s.s.'un ülkemizdeki ilk tür bazındaki teşhisi Doğanış Lehtijärvi ve arkadaşları tarafından 2007

yılında Gümüşhane ve Ordu illerinde bulunan saf göknar meşcerelerindeki *A. nordmanniana* ssp. *nordmanniana* kütükleri üzerinde bulunan üreme organlarından elde edilen izolatlar ile yapılmıştır. Bu türe ait diğer bir kayıt ise Doğmuş Lehtijärvi ve arkadaşları tarafından 2016 yılında, Gölhisar Burdur'da bulunan dikili *P. brutia* ağaçlarının kök boğazlarındaki üreme organlarından elde edilen izolatlar ile yapılmıştır (Doğmuş Lehtijärvi vd., 2016). Korhonen, (1978), *H. annosum* s.s.'un başta *P. sylvestris* olmak üzere çoğunlukla çamlar (*Pinus* spp.) üzerinde etkili olduğunu rapor etmiştir. Bu doktora tez çalışmasında Gölhisar-İbecik yöresi *P. brutia* gençleştirme sahasında bulunan *H. annosum* s.s. etmeninin neden olduğu tüm hastalık ocakları geniş kapsamda araştırılmış ve daha önce araştırmacılar tarafından tespit edilmemiş alanlarda etmenin varlığı morfolojik ve moleküler teşhis yöntemleri kullanılarak rapor edilmiştir.

Yapılan sörvey çalışmalarında tespit edilen hastalık ocaklarının belirlenmesinde ölmüş veya ölmek üzere olan dikili kızılçam gençliklerinde ve kesilmiş kızılçam kütüklerinde bulunan beyaz çürüklük belirtileri (basidiokarplar, enfekteli odun dokuları, kök boğazından alınan enfekteli disk örnekleri) ve bu gençliklerde hastalığın neden olduğu beyaz çürüklük belirtileri (reçine akıntısı, taç yapısı vb.) kullanılmıştır. Dikili ağaçlarda *Heterobasidion* türlerinin neden olduğu kök çürüklüğü çok karakteristik olmamakla beraber çoğu durumda diğer kök patojenlerinden ayırt edilememektedir. Canlı çam ağaçlarında etmenin neden olduğu enfeksiyon, ibrelerin normalden kısa olması, dökülmesi ve açık tepe tacı gibi bazı belirtiler yardımı ile tespit edilmektedir (Kurkela, 2002). Hastalık ocaklarında bulunan çam kütükleri incelendiğinde kök çürüklüğü belirtilerinin tüm çam kütüklerinde oldukça belirgin olduğu gözlemlenmektedir (Laine, 1976; Greig, 1995).

Çalışma alanında hastalık ocaklarının belirlenmesi sırasında öncelikle kök çürüklüğü belirtileri gözlemlenen ağaçlar belirlenmiş ve sonrasında dikili ağaçların kök sistemlerinde ve kesilmiş kütükler üzerinde bulunan basidiokarpların varlığı araştırılmıştır. Bu fungus, kesilen ağaçların alanda kalan dip kütüklerinde, devrik ağaçlar üzerinde ve dikili ağaçların kök sisteminde oluşturduğu basidiokarpları ile, 40 yıla kadar canlılığını sürdürmekte (Laine, 1976; Piri, 1996), bu sayede bulunduğu bölgede enfeksiyon riskinin süreklilik arz etmesine neden olmaktadır (Kallio, 1970; Möykkynen vd., 1997; Doğmuş-Lehtijärvi vd., 2009). Genel olarak kesik kütüklerin

nemli ve kuytu yerlerini tercih eden basidiokarplar sayesinde hastalık etmeninin bölgede bulunup bulunmadığı tespit edilmektedir. Ilık ve kuru Akdeniz iklimi koşulları basidiokarpların ölmüş dikili ağaçların köklerinde ve kesik kütüklerin dip kısımlarında, devrilmiş ağaçların kök sistemlerinde gelişmesi için uygundur (Woodward vd., 1998). Ağaçlarda basidiokarplara rastlanılmayan durumlarda ise etmenin eşeysiz sporlarından faydalanılmaktadır. Kesilen ağaçların dip kütüklerinde ya da kök boğazından alınan diskler üzerinde tespit edilen konidiler, fungusun alandaki varlığına işaret etmektedir (Greig, 1998; Doğmuş-Lehtijärvi vd., 2009).

Çalışmamızda dikili kızılçam bireylerinin kök boğazından alınan disk örnekleri incelendiğinde, etmenin neden olduğu çürüklüğün ağaçta çoğunlukla kök veya alt gövdede yerleşmiş olarak bulunduğu saptanmıştır. Literatürde *Pinus* ve *Larix* gibi reçineli diri oduna sahip türlerde hastalık etmeninin neden olduğu çürüklüğün ağacın kök boğazından 1-3 m yüksekliğe kadar ulaşabildiği bildirilmiştir (Asiegbu vd., 2005). Kök boğazından alınan disk örnekleri üzerinde yapılan incelemeler sonucunda etmenin odun üzerinde açık koyu kahverengi renk değişimlerine neden olduğu gözlemlenmiştir. Beyaz çürüklüğe neden olan bu fungusun, odunda neden olduğu renk değişiminin ağaç türüne bağlı olarak değişiklik gösterdiği, genellikle çürüklüğün başlangıçta soluk sarıdan açık kahveye dönen bir renk oluşturduğu ve ilerleyen aşamalarda odunda belirgin siyah lekeler neden olduğu bilinmektedir (Asiegbu vd., 2005). Şeflikte görev yapan orman mühendisinden ve işletme personellerinden edinilen bilgilere göre, etmen giderek genişleyen hastalık ocakları meydana getirmektedir. Bu patojenin neden olduğu çürüklük, ağaçların hassasiyetini arttırmakta ve zayıf düşen ağaçlarda ani ölümler gerçekleşmektedir. Literatürde etmenin neden olduğu enfeksiyon sonucunda çam ağaçlarının rüzgara karşı daha hassas hale geldiği rapor edilmiştir (Rönnberg vd., 2006). Çalışma alanında patojenin neden olduğu çürüklüğün bu denli hızlı yayılması ve giderek genişleyen hastalık ocakları oluşması etmenin oldukça yüksek bir virülense sahip olduğunu göstermektedir. *H. annosum* s.l. hem sağlıklı hem de zayıf düşmüş ağaçlarda hastalık oluşturma yeteneğine sahiptir (Redfern ve Stenlid, 1998). Enfeksiyon riskinin fazla olduğu bölgelerde bulunan yetişkin ağaçlarda ani ölümler gerçekleşmesinin yanı sıra, hastalıklı köklere sahip bazı ağaçların onlarca yıl gözle görülür bir semptom göstermeden hayatta kalabildiği bilinmektedir (Greig, 1998). Etmen nedeniyle meydana gelen kök ve alt gövdedeki

çürüklüğün çoğu kez ağacın ölümüyle sonuçlandığı bildirilmiştir (Redfern ve Stenlid, 1998).

Çalışmamızda hastalık ocaklarından elde edilen etmene ait karakteristik üreme organları incelendiğinde genellikle hassas yapıda, düzensiz şekillerde ve oldukça değişken ebatlarda oldukları görülmektedir. Üst yüzeyleri kahverengi, pürüzsüz ve sert bir tabakadan oluşmakta, porlu yüzeyleri kremi renkte olup, küçük ve yuvarlak gözeneklerden meydana gelmektedir. *H. annosum*'a ait intersteril grupların basidiokarp morfolojilerinin karakteristik farklılıklara sahip olduğu bilinmektedir. P ve S grubuna ait basidiokarplar gözle veya küçük bir büyüteç yardımı ile %95 oranında teşhis edilebilmektedir. F grubuna ait basidiokarplar ise bu iki gruba ait karakteristik basidiokarp özelliklerinin arasında kalmakta ve teşhisleri kısmen daha zor olmaktadır. Basidiokarplarda bulunan porların büyüklüğü ve üst kısımdaki kahverengi saçakların uzunluğu morfolojik teşhis karakteristikleri arasında yer almakta fakat teşhis için her zaman yeterli olmamaktadır (Korhonen, 1978; Mugnai ve Capretti, 1989).

MEA (%2) içeren petri kaplarında gelişen S grubuna ait heterokaryotik miselyumların genellikle koloninin üst yüzeyini kaplayan kahverengi derimsi sertleşmiş yapılar meydana getirdiği, P grubuna ait miselyumlarda bu renklenmenin gözlenmediği rapor edilmiştir. S grubuna ait izolatlarda bu renklenmenin tipik olarak inokulumun bulunduğu yerden başladığı bilinmektedir (Korhonen vd., 1978). Çalışmamızda da tespit etmiş olduğumuz gibi P grubuna ait heterokaryon miselyumlar genellikle bu kahverengileşmeyi göstermemektedir. Renkleri daha sarıdır ve renk değişimleri genellikle petrinin kenarlarından başlamaktadır. Saf kültürlerde gözlemlenen çeşitlilik oldukça fazla olmakla beraber, ortamın yoğunluğuna bağlı olarak da değişebilmektedir (Woodward vd., 1998). Farklı gruplara ait konidiofor büyüklükleri arasında çok küçük farklılıklar bulunmaktadır ve bunlar grupların teşhisi için yeterli sonuç sağlamamaktadır. Miselyumlara ait karakteristik mikroskobik farklılıklar rapor edilmemiştir (Korhonen 1978; Capretti ve Mugnai, 1989). Ayrıca *H. annosum* kompleksine ait izolatların 20-22 °C sıcaklıkta günlük gelişme oranı 6,5-9 mm arasında değişmektedir (Korhonen, 1978; Woodward vd., 1998).

Bu çalışmada kullanılan eşleştirme testleri, moleküler yöntemler ile desteklenerek *H. annosum* s. l. izolatlarının IS gruplarının belirlenmesinde birçok araştırmacı tarafından

sıkça kullanılmaktadır (Korhonen vd., 1978;1989; Capretti vd., 1990; Piri vd., 1990; Swedjemark ve Stenlid, 1995; Garbeletto vd., 1999; Sanchez vd., 2007). Eşleştirme testlerinin sonuçlarına bakıldığında çalışma alanından elde edilen *Heterobasidion* izolatlarının, *H. annosum* s.s. test izolatları ile % 96,9 oranında uyumluluk gösterdiği görülmektedir. *H. annosum* s.s.'a ait homokaryon test izolatları ve bilinmeyen izolatlar arasında eşleştirme testleri sonucunda belirgin bir zon oluşumuna rastlanmamış, koloni morfolojisinde farklılıklar meydana gelmiştir. Ayrıca kanca oluşumları, 2-3 hafta sonunda eşleşen her iki partner izolatta görülmüş olup homokaryotik miseller tek tip bir heterokaryotik koloniye dönüşmüşlerdir. Woodward vd., (1998), aynı IS gruba ait homokaryon izolatlar arasında eşleşme sonrasında belirgin bir zon oluşumu bulunmadığını ve bu izolatlara ait misel morfolojilerinde farklılıklar gözlemlendiğini bildirmiştir. Her iki izolatın da homokaryotik özellikte olma durumunda, hem test izolatında hem de bilinmeyen izolatta kanca oluşumu gözlemlendiği ve her iki izolatın da üniform şekilde heterokaryotik koloni oluşturduğu rapor edilmiştir.

Çalışmamızda kızılçamlardan elde edilen izolatların, *H. annosum* s.s. test izolatu dışında hiçbir IS grubuna ait test izolatu ile uyumlu olmadığı tespit edilmiştir. İzolatlar arasında yoğun miselyum oluşumundan meydana gelen belirgin zon oluşumları gözlenmiş, misellerde gözle görülür morfolojik değişiklikler tespit edilememiştir. Korhonen vd., (1992, 1997), genellikle P tipi izolatların S ve F tipi izolatlardan kolayca ayırt edilebildiğini ancak S ve F tipi izolatlar arasında yüksek derecede uyumluluk bulunması nedeniyle heterokaryotik izolatların tespitinde problemler meydana geldiğini rapor etmiştir. Capretti vd., (1990), grup içindeki uyumlu eşleşmelerde kanca oluşumlarının 2-3 hafta içinde gözlemlendiğini fakat gruplar arası uyumlu eşleşmelerde bu oluşumların 1-2 hafta içinde gözlemlenebildiğini belirtmiştir. Gruplar arası uyumlu eşleşmeler sonucu test izolatlarında meydana gelen morfolojik değişikliklerin genellikle yavaş ilerlediğini ve uyumlu homokaryonlar arasında zon oluşumunun sıkça gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Elde edilen *H. annosum* izolatlarının moleküler teşhis çalışmaları için uygun konsantrasyon sağlanan DNA numuneleri, MJ-F ve MJ-R primer çifti ile tanılanmıştır. PCR amplifikasyonlarında yaklaşık olarak 100 bp'lik fragmentler gözlemlenmiştir. Literatürde *H. annosum* s.s.'a özgü bu primer çiftinin PCR amplifikasyonlarında *H. annosum* s.s. için yaklaşık olarak 100 bp'lik fragment verdiği rapor edilmiştir (Hantula

ve Vainio, 2003). Böylelikle bu çalışmada kızılçamlardan elde edilen tüm izolatların *H. annosum* s.s. olduğu gerçekleştirilen morfolojik ve moleküler teşhis çalışmaları ile kesinleştirilmiştir.

Tez çalışmasının önemli bir kısmını oluşturan etmenin populasyon yapısının belirlenmesi kapsamında, kızılçam bireylerinde yayılış gösteren *H. annosum* s.s. izolatlarının genetik çeşitliliği ilk olarak somatik eşleştirme testleri ile ortaya koyulmuştur. Prensipte, türleri (intersteril grupları) ortaya çıkarmak için kullanılmaya başlayan bu metot, homokaryon ve heterokaryon miselyumların tespitinde ve IS grupları içinde veya arasında bulunan farklı genotiplerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Gelişen moleküler tekniklere rağmen fungusların taksonomi ve populasyon yapısı çalışmalarında temel teknik olarak kullanılmaya devam eden metot, basit olmasının yanı sıra oldukça güçlü sonuçlar veren bir teknik olarak bilinmektedir (Stenlid ve Karlsson, 1991; Korhonen vd., 1998b; Woodward vd., 1998).

Çalışmamızda her bir hastalık ocağından elde edilen *H. annosum* s.s. izolatları kendi içlerinde somatik eşleştirme testlerine tabi tutulmuş ve bu testin sonuçlarına göre 20 hastalık ocağından izole edilen 182 *H. annosum* s.s. izolatının toplamda 1 ile 3 arasında, toplamda 34 adet farklı genete ait olduğu tespit edilmiştir. Gençleştirme sahasında bulunan 7 hastalık ocağında tek bir klonun yayılış gösterdiği, bunun yanı sıra diğer hastalık ocaklarında 1'den fazla genetin bulunduğu yapılan morfolojik çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir. Chase ve Ullrich (1983), çam plantasyonlarından elde ettikleri *Heterobasidion* izolatları ile gerçekleştirdikleri çalışmada, plantasyon içindeki hastalık ocaklarının oluşumunda tek bir klonun vejetatif yayılımının söz konusu olmadığını, birkaç genetin neden olduğu inokulasyonlar sonucu hastalık ocaklarının oluştuğunu bildirmişlerdir. Garbeletto vd., (1999), *H. annosum* s.s. izolatları ile yaptıkları çalışmada gerçekleştirilen eşleştirme testleri sonucunda, her hastalık ocağının çeşitli fungal genotiplerin varlığı ile karakterize edildiğini rapor etmişlerdir. Lakomy vd., (2007, 2011), yaptıkları çalışmada farklı hastalık ocaklarında bulunan ağaçların tek bir genotip tarafından işgal edilebileceğini, aynı zamanda tek bir ağacın çeşitli genotipler tarafından enfeksiyona uğrayabileceğini tespit etmişlerdir.

Somatik eşleştirme testleri sonucunda, gençleştirme sahasında tespit edilen en büyük genotip, 9 numaralı hastalık ocağında 126,5 m² alanda yayılım gösteren ve 12 ağacın tümünü enfekte eden tek bir genettir. Burada dikkat çeken nokta ise bu genotipin yayılım gösterdiği 9 numaralı hastalık ocağında bulunan kızılçam bireylerinin ortalama çap değerinin, diğer hastalık ocaklarında bulunan bireylerinkinden oldukça yüksek olması ve bu alanda tıraşlama kesimleri sonrasında kalan kütük sayısının en yüksek miktarda bulunmasıdır. Literatürde ağaç çapları ve fungusun yayılma mesafesi arasında oldukça yüksek bir korelasyon olduğu, en büyük klonların yüksek ağaç ve kütük yoğunluğunun bulunduğu alanlarda tespit edildiği bildirilmektedir (Garbeletto vd., 1999). Fungusun sekonder yayılımı kütüklerin yoğun olarak bulunduğu alanlarda daha anlamlı sonuçlar vermektedir. Sanchez vd., (2007), doğal bir parktan elde ettikleri *H. abietinum* izolatlarının genetik çeşitliliğini belirlemek için gerçekleştirdikleri somatik eşleştirme testlerinde, alanda en geniş yayılım gösteren genotipin 57 m ile 10 farklı ağaçta kolonize olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda bu ana genotipin, parkın kuruluşundan daha önce, eski inokulumların neden olduğu kök kaynaşmaları yolu ile yayıldığı sonucuna varılmıştır.

Tüm bu literatür çalışmaları göz önünde bulundurularak gerçekleştirmiş olduğumuz somatik eşleştirme testleri sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde, bazı hastalık ocaklarında bulunan *H. annosum* s.s. izolatlarına ait genotiplerin büyüklükleri ve alanda tespit edilen hastalıklı kütükler itibarıyla, fungusun bu ocaklarda vejetatif yayılımının daha fazla söz konusu olduğu kanısına varılmaktadır. Bununla birlikte vejetatif yayılımın yanı sıra tek bir genotipin sadece bir kızılçam bireyinde sınırlı kaldığı enfeksiyonlar da tespit edilmiştir. Bazı ocaklardan elde edilen izolatların farklı genotiplere sahip olmasının nedeni, tıraşlama veya aralama çalışmaları sırasında gerçekleşen akraba olmayan basidiospor enfeksiyonları olarak düşünülmektedir.

Çalışmada kızılçam bireylerinde yayılım gösteren *H. annosum* s.s. etmeninin populasyon yapısını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen somatik eşleştirme testleri PCR tabanlı moleküler teknikler ile desteklenmiştir. Araştırmacılar, moleküler yöntemlerin her zaman klasik yöntemlerle beraber kullanılmasının karşılaşılabilecek hataların en aza indirgenmesi açısından son derece önemli olduğunu belirtmektedir (Johannesson ve Stenlid, 1999; Jasalavich vd., 2000; Vainio ve Hantula 2000). Çalışmada elde edilen somatik eşleştirme verileri ve izolatların elde edildiği ağaçların

konumlarını gösteren hastalık ocağı haritaları baz alınarak genetik farklılık gösterdiği düşünülen 70 adet izolat, 4 adet RAMS markörü ve M13 primeri kullanılarak analiz edilmiştir. Söz konusu primerler ile amplifikasyon sonucunda elde edilen DNA bant uzunlukları 350-1500 bp arasında değişmektedir. Dört primerde DNA amplifikasyonu sonucunda toplamda 906 DNA bandı elde edilmiş, bunların 24 adetinin polimorfik olduğu, dolayısıyla populasyonlar arasında %2.64 polimorfizm bulunduğu hesaplanmıştır. Allellerin genel polimorfizm oranı %53,2'dir. Elde edilen toplam allel sayısı bakımından (CCA)₅ ve (TCG)₅ en fazla polimorfik bandı (17 adet) üretirken, en az sayıda bant (8 adet) M13 primeri tarafından üretilmiştir. Doğmuş Lehtijärvi ve arkadaşları 2010 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada M13 primeri ile çoğaltılan farklı populasyonlara ait *H. abietinum* izolatları arasında meydana gelen polimorfizmin, RAMS primerleri ile çoğaltılan izolatlarda meydana gelen polimorfizmden daha düşük düzeyde olduğundan bahsetmiştir. RAMS markörleri arasındaki değişkenlik kaynağı tam olarak bilinmemekle beraber; priming bölgesindeki mutasyonların, çoğaltılmış fragmentlerdeki ekleme silme olaylarının veya mikrosatelit tekrarlarının sayısındaki değişkenliklerin polimorfizmlerin boyutunu etkilediği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda (CGA)₅ RAMS primerinin tek bir amplifikasyonda 6-7 türe özgü RAMS markörü verdiği (Hamelin vd., 1993), oldukça güçlü bant gruplarının yanı sıra daha düşük kuvvette bant grupları da oluşturduğu bildirilmiştir (Hantula vd., 1996).

M13 minisatelit markörleri (Karlsson 1994; Stenlid vd., 1994) ve rastgele amplifike olan mikrosatelit markörleri (RAMS) (Hantula vd., 1996) ile gerçekleştirilen PCR tabanlı moleküler teknikler *Heterobasidion* cinsinin genetik çeşitliliğin belirlenmesi veya genetik haritalarının oluşturulması çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. RAMS reaksiyonlarında PCR'da çoğaltılabilecek kadar yakın yerleştirilmiş iki mikrosatelit ve bunların arasında kalan alan çoğaltılmakta ve alleller insan soyağacında olduğu gibi mendel tarzında ayrılabilir. Mikrosatelitler arasında kalan bölgede meydana gelen evrim oranı çoğu organizmaya ait DNA tipinde oldukça fazla gözlemlendiğinden RAPD gibi diğer markör tekniklerine oranla daha fazla polimorfizm tespit edilmesini sağlamaktadır (Zietkiewicz vd., 1994). Gözlemlenen açık ve kapalı tip polimorfizmler RAPD markörlerinde olduğu gibi her bantın çeşitli formlarının tanımlanmasını sağlamaktadır (Hantula vd., 1996). RAMS markörleri ile gerçekleştirilen amplifikasyonlar sonucu meydana gelen bant desenleri yüksek oranda tekrar edilebilir olup, primer konsantrasyonundaki veya DNA

miktarındaki ufak değişikliklerden etkilenmemektedir. Bu nedenle RAMS markörleri genetik çalışmalar için oldukça elverişli markörlerdir. RAMS reaksiyonlarında DNA miktarının genellikle reaksiyonları etkilememesi nedeniyle çok sayıda örnek ile yapılan populasyon yapısı çalışmalarında kolaylık sağladığı bilinmektedir. Yüksek konsantrasyonda DNA eklendiğinde polimeraz inhibe edici safsızlıkların seviyesi nedeniyle reaksiyonda çoğaltılan ürün miktarı az miktarda düşebilmektedir (Hantula vd., 1996).

RAMS ve M13 markörlerinin AMOVA analizi sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde, hastalık ocakları arasındaki moleküler varyasyon oranının %49, populasyonların içindeki bireysel farklılık oranının ise %51 olduğu tespit edilmiştir. Lakomy vd., (2007), yaptıkları çalışmada sarıçamlardan elde edilen *H. annosum* s.s. izolatları arasında görülen en yüksek genetik benzerlik oranının %40-60 arasında bulunduğunu bildirerek izolatların yüksek derecede genetik çeşitlilik gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca bu benzerlik genotiplerin sadece %5'ini ilgilendirmekte olup, çalışmadaki genotiplerin %24'ü birbirleri ile hiç ilişkili bulunmamıştır. Cieslak vd., (2011), sarıçamlardan elde ettikleri *H. annosum* s.s. izolatlarına ait genetik benzerlik oranının %0-74 arasında tespit edildiğini, ağaç ve kütüklerin %17.9'unda farklı genotipler bulunduğu, genler arasında meydana gelen en düşük benzerlik oranının ise %20.7 olarak hesaplandığını bildirmiştir. Yapılan literatür çalışmaları incelendiğinde çalışmamızdaki genetik çeşitlilik oranının oldukça yüksek olduğu söylenebilir.

Twin 4'lü cluster analizine göre *H. annosum* s.s izolatları, 21 grupta toplanmış ve oluşan gruplar UPGMA analizi sonuçlarına paralel olarak kümelenmiştir. PCo analizine göre, tüm hastalık ocaklarından elde edilen *H. annosum* izolatlarının 30 farklı genete ait olduğu belirlenmiştir. İzolatların genotiplere göre dağılımına bakıldığında, her bir genotip en az 1 en fazla 5 farklı hastalık ocağını içinde barındırmaktadır. Toplamda sadece 2 genotip tek bir hastalık ocağında tespit edilmiştir. Cieslak vd., (2011), yaptıkları çalışmada *H. annosum* s.s. etmenine ait 14 genotipin 87 ağacı kolonize ettiğini, genotiplerin %8,8'inde genetik ilişki tespit edilemediğini bildirmiştir. Piri vd. (1990), son kesim kütüklerinde tespit edilen *Heterobasidion* genotiplerinin neredeyse %60'ının sadece 1 ağacı enfekte ettiğini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra literatürde 10 veya daha fazla ağacı enfekte etmiş büyük genotipler de rapor edilmiştir (Stenlid 1985; Piri ve Korhonen, 2001). Stenlid vd., (1998), genotip büyüklüğünün geniş alanda yayılımı

gösterebileceğini hatta 1 genotipin 15 ağacı bile kolonize edebileceğini bildirmiştir. Swedjemark ve Stenlid (1993), 1 ya da daha fazla genetin ağaçta kolonizasyonu bulunsan bile sadece 1 genetin o ağaçta dominant olarak enfeksiyona neden olabileceğini rapor etmiş ve Woodward (2005) bu hipotezi kısmen de olsa desteklemiştir.

Araştırma alanımız olan doğal gençleştirme sahasında bulunan ve hastalık etmeni nedeni ile zarara uğrayan kızılçamlar 1998, 1999, 2000 ve 2001 yıllarında parça parça büyük alan tıraşlama yöntemi ile doğal gençleştirme çalışmaları sonrasında yörede bulunan kızılçamlardan toplanan tohumlardan meydana gelen bir gençleştirme ormanını oluşturmaktadır. İşletme ormanlarında uygulanan silvikültürel müdahaleler, bu hastalığın yayılışını ve neden olduğu zararın yoğunluğunu arttırmaktadır (Korhonen vd., 1998a; Redfern ve Stenlid, 1998). Kızılçam gençliklerinde ve kütüklerde bol miktarda etmene ait üreme organı bulunmuş olması, etmenin sahada yakın geçmiş dönemde gerçekleştirilen tıraşlama kesim faaliyetlerinden uzun süre yararlanmış olabileceğini göstermektedir. Sahada daha önceden yayılış gösterdiği düşünülen fungal populasyonun hızlı artışı bu üreme organları ile ilişkilendirilebilir (Redfern ve Stenlid 1998).

Bazı hastalık ocaklarında genetik çeşitliliğin yüksek olması ve genotiplerin küçük olması, büyük olasılıkla bu alanlardaki bazı enfeksiyonların tıraşlama kesimlerinden sonra taze kütüklerin yüzeyine yerleşen farklı genotiplere ait basidiosporlar aracılığıyla gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir. Rishbeth (1950), *Heterobasidion*'un primer enfeksiyonunun, etmene ait basidiosporların taze kesilmiş kütük yüzeyine ulaşması ile gerçekleştiğini belirtmiştir. Rönnberg (2006), İsveç'in güneyinde bulunan sarıçamların yapılan aralama kesimleri sonrasında ciddi bir *H. annosum* saldırısına maruz kaldığını ve primer enfeksiyonun kesimlerin yapıldığı duyarlı dönemde gerçekleştiğini rapor etmiştir. Lakomy vd., (2007), yaptıkları çalışmada *H. annosum* s.s. izolatları arasında gözlemlenen polimorfizmin ve etmenin küçük genotipler halinde yayılış göstermesinin nedenlerini benzer şekilde ifade ederek, rutin aralama kesimlerinden sonra ortaya çıkan taze kütüklerde *Heterobasidion* kolonizasyonunun başarılı olduğunu bildirmişlerdir. Garbeletto (1999), *H. annosum* ss'a ait çoğu yerel genotipin farklı çiftleşme allelleriyle sahip olduğu, buna bağlı olarak inokulasyonların akraba olmayan basidiokaplardan kaynaklanmış olabileceğini rapor etmişlerdir.

Damico vd., (2007), *H. annosum* s.s. izolatlarında tespit ettikleri yüksek orandaki genetik çeşitliliği basidiospor kaynaklı enfeksiyonlar ile ilişkilendirmişlerdir.

Enfekteli kütükler veya ağaçlar ormanda daima spor üretiminin sürdürülebilir kaynağını oluşturmaktadır. Ağaçlarda yeni genlerin meydana gelişi; yeni spor enfeksiyonları, aralama kesimleri veya üreme organları ile ilişkilendirilmektedir (Woodward vd., 1998). Çalışmamızda patojene ait genlerde tespit etmiş olduğumuz çeşitlilik oranı silvikültürel müdahaleler sonrasında çevrede meydana gelen yüksek orandaki basidiospor basıncı ile açıklanabilir. Bu durum aynı zamanda aralama veya tıraşlama kesimleri sırasında ve sonrasında gerçekleştirilen bazı ihmallerden ve eksikliklerden kaynaklanmaktadır. Alanda tıraşlama kesimlerinin ardından kalan taze kütük yüzeyleri ve kesilen ağaçların alandan uzaklaştırılması sırasında sağlıklı ağaçlarda meydana gelen yaralar havada bulunan sporların enfeksiyon oluşturmaları için oldukça ideal şartları oluşturmaktadır (Kallio, 1970; Swedjemark ve Stenlid, 1993; Redfern ve Stenlid, 1998). Ayrıca fungusa ait sporların ılık iklim koşullarında havada bol miktarda bulunduğu (Redfern ve Stenlid, 1998) göz önüne alındığında, ülkemizde gerçekleştirilen silvikültürel müdahalelerin genellikle enfeksiyon için elverişli olan ılık havalarda yapıyor olması ve bu müdahalelerden sonra kesilmiş taze kütüklerin yüzeyinde herhangi bir kontrol önlemi alınmaması etmenin basidiospor kaynaklı yayılışında önemli bir faktör olarak düşünülmektedir. Ayrıca etmene ait sporların ağaç kabukları altında uzun süre çimlenmeden canlılığını koruyabildiği ve buradan silvikültürel müdahaleler sırasında kesim aletleri vasıtası ile disklere ve diğer kütüklere taşınabildiği bilinmektedir (Korhonen ve Stenlid, 1998).

Genetlerin büyüklüğü; aralama kesimleri, basidiosporların yayılışı, ağaç yaşı gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Yeni kesilmiş bir kütük yüzeyinde genetik olarak farklılık gösteren onlarca ya da yüzlerce bireye rastlamak mümkündür. Ayrıca genetlerin çok genç veya çok yaşlı olması vejetatif yolla daha fazla yayılamayacaklarının da bir göstergesidir. Küçük genetler, tek bir kütükte yüksek genet rekabeti olduğuna işaret etmektedir (Korhonen ve Kauppila, 1998; Vainio 2008).

Çamlarda, etmene ait genetlerin bireysel olarak tek bir hastalık ocağında aktif olarak bulunarak burada çeşitli düzeylerde tahribata neden olabildiği bilinmektedir (Chase ve Ullrich, 1983, Garbeletto, 1996; Harrington vd., 1998). Aynı zamanda konifer

ormanlarında *H. annosum*'un çok sayıda genotipinin bulunabileceği rapor edilmiştir (Garbeletto 1996; Harrington vd., 1998). Lakomy vd., (2007), çam ve ladin türlerinde rutin aralama kesimleri sonrasında ortamda kalan taze kütüklerde *Heterobasidion* kolonizasyonunun çok yüksek ve başarılı olduğunu bildirerek, bu kolonizasyonları yüksek derecede genetik çeşitlilik içeren küçük genotipler ile karakterize etmişlerdir.

Çalışmamızda birbirleri ile aynı genete sahip izolatların aynı hastalık ocağında yer almasının yanı sıra, farklı hastalık ocaklarında da bulunduğu tespit edilmiştir. Bu durum basidiokarplardan fırlatılan basidiosporların farklı hastalık ocaklarına çeşitli yollar ile ulaşması ve buralarda enfeksiyon oluşturması ile mümkündür. Basidiosporlar coğrafik lokasyona ve rüzgar yönüne bağlı olarak bir yerden bir yere rüzgar aracılığı ile ulaşabilmektedir. Gençleştirme alanında bol miktarda basidiokarp bulunmuş olması bu durumu desteklemektedir. Çok yıllık basidiokarplardan fırlatılan basidiosporlar yıl boyunca oluşmakta ve kesilmiş taze kütük yüzeylerinden ya da kök veya diğer organlarda görülen yaralardan konukçuya penetre olmaktadır (Redfern ve Stenlid, 1998). *H. annosum*' un uzun veya kısa mesafede yayılışının çoğunlukla basidiosporlar aracılığıyla gerçekleştiği bilinmektedir. Basidiosporlar genellikle basidiokarpların etrafında birikmekte ve hava akışına bağlı olarak onlarca hatta yüzlerce kilometre uzaklara taşınabilmektedir (Kallio, 1970; Stenlid, 1994b; Möykkynen vd., 1997). Rishbeth (1959), etmene ait sporların 320 km., Kallio (1970), 500 km uzaklığa yayılış gösterebileceğini bildirmiştir. Möykkynen vd., (1997) yaptıkları çalışmada bir grup hastalıklı ağacın yer aldığı enfeksiyon ocağında, inokulum miktarına ve rüzgar yönüne bağlı olarak 100-1000 m çapındaki bir daireyi içine alan ağaçlarda enfeksiyon riski bulunduğunu bildirmişlerdir. Cieslak vd., (2011), aralarında 55 km mesafe bulunan iki genetin %74 oranında benzerlik gösterdiğini bildirerek bu durumu basidiosporların olumsuz çevre koşullarına olan dayanıklılığına ve yüzlerce km mesafeyi uçarak katedebilme özelliğine bağlamışlardır. Fungusun uzun veya kısa mesafede farklı alanlara taşınmasında enfekteli odunlar da önemli rol oynamaktadır.

Bazı hastalık ocaklarında genetik çeşitliliğin çok yüksek olmayışı, hatta bazı ocaklarda sadece tek bir genetin bulunuyor olması ve bu genotiplerin büyüklükleri, patojenin uzun süredir bu enfeksiyon ocaklarında mevcut olduğunu göstermektedir. Etmenin kızılçam bireylerine alanda bulunan eski kütüklerin kökleri yardımıyla yayılmış olduğu

söylenbilir. Patojene ait genotiplerin aynı alanda birden fazla ağacı istila etmiş olması buradaki enfeksiyonların kök kaynaşması yolu ile gerçekleşmiş olabileceğini kanıtlamaktadır. Ayrıca etmenin kızılçam bireylerini istila ettiği yerlerde önceden kalan kütüklerin annosum kök çürüklüğü etmeninden ciddi ve benzer şekilde etkilenmiş oldukları gözlemlenmiştir. Hastalığın alanda bulunan bu kütüklerin kökleri ile vejetatif olarak diğer sağlıklı ağaçların köklerine yayılmış olabileceği söylenbilir. Hastalık etmeni ağaca bir kez kolonize olduktan sonra, buradan kök sistemine geçmekte ve kök kaynaşması olarak bilinen sekonder enfeksiyon yolu ile çevredeki sağlıklı ağaç dokularına yayılabilmektedir (Hartig 1878; Stenlid ve Redfern 1998). Bu ocaklardaki ağaçların kök boğazından alınan diskler incelendiğinde hastalığın kök kaynaklı enfeksiyonlar sonucu yayıldığı fikri morfolojik olarak da desteklenmektedir. Etmen, enfeksiyona neden olduğu hastalıklı kökten kök boğazına ilerleyen bir renk değişikliği oluşturmaktadır. Dolayısıyla, çalışmamızda da gözlemlediğimiz üzere hastalık etmeninden kaynaklanan bir kök enfeksiyonunun varlığı halinde, kesik disk yüzeyinde oluşacak kolonilerin diri odunu takiben öz oduna doğru ilerlemesi beklenmelidir (Greig, 1998).

H. annosum misellerinin ağaç köklerindeki yaşam süresi tam olarak bilinmemektedir. Ancak çalışmamızda hastalık ocaklarında tespit etmiş olduğumuz ve hastalık etmeninden yüksek oranda etkilendiğini düşündüğümüz kesilmiş kütüklerin yaşlarının yüksek olması itibarıyla bu kütüklerin köklerinde etmenin uzun yıllardır var olabileceği düşünülmektedir. Etmen bu köklerde uzun yıllar varlığını devam ettirmiş ve uygun konukçuyu ve çevre koşullarını sağladığı takdirde kök kaynaşması yolu ile vejetatif olarak yayılışını sağlamış olabilir. Etmene ait miselyumlar canlı ağaçlarda nektrotrof, ölü ağaçlarda ise saprotrof olarak bulunabilmektedir. Patojenin saprotrofik fazdan nektrotrofit faza geçebilme kabiliyetinin, ekolojik uyumunun ve evrimsel başarısının bir sonucu olduğu düşünülmektedir (Garbelotto ve Gonthier, 2013). Miselyumun yayılışı konukçu türüne, odunun nem miktarına, ağaçta bulunan endofitlere ve diğer birçok faktöre göre değişiklik göstermektedir (WOODWARD vd., 1998).

Etmenin yayılışının ölmüş veya ölmek üzere olan kütüklerin köklerinde canlı ağaç köklerindeki nazaran daha fazla olduğu bilinmektedir. *H. annosum* s.s.'a ait miselyumun ölü odunda gelişme oranının yıllık 50 cm'e ulaştığı bilinmektedir. Bu

oran canlı ağaçlarda en fazla yıllık 10 cm'e ulaşmaktadır (Rishbeth, 1951, 1957; Slaughter ve Parmeter, 1995; Bendz-Hellgren vd., 1999; Stenlid ve Redfern, 1998). Yapılan çalışmalarda odunda miselyum yayılışının Güney ülkerinde kuzey ülkelerine nazaran daha hızlı olduğu rapor edilmiştir (Woodward vd., 1998). Ayrıca etmenin İngiliz çam plantasyonlarında yaklaşık yılda 1 m civarında artış gösterdiği rapor edilmiştir (Rishbeth, 1951). Etmene ait miselyumların vejetatif yol ile sağlıklı ve zarar görmemiş kökleri enfekte edebilmesi için sağlıklı ağacın savunma mekanizmasına karşı daha kuvvetli bir güç uygulaması ve canlı ağaçların köklerinde bulunan fenol bileşenlerini ayrıştırabilmesi gereklidir. Bu işlem daha yüksek bir enerji gerektirdiği için patojenini canlı köklerdeki yayılışını yavaşlatmaktadır (Schönhar, 1995; Cieslak vd., 2011). Araştırmacılara göre patojen canlı ağacın savunma mekanizmasını kırarken agresivitesinde azalma gözlemlenirken, ölü ağaçlardaki miselyumların agresivitesinde ise artış gözlemlenebilmektedir (Cieslak vd., 2011). Çalışmamızda sahada bulunan bazı hastalık ocaklarına gençleştirme çalışmaları sonrasında gelen ve sağlıklı olduğu düşünülen kızılçam gençliğinin bu şekilde enfekte olduğu düşünülebilir. Cieslak vd., (2011) kütüklerden elde edilen genotiplerin canlı ağaçlardan elde edilen genotiplere oranla daha hızlı yayılış gösterdiğini bildirmiş ve bu durumun konukçu geçişi ile ilgili olabileceğini savunmuştur. Ayrıca yaptıkları çalışmada farklı genotiplere ait izolatların canlı odundaki kolonizasyonunda ve agresivitesinde farklılıklar bulunduğu hipotezini desteklemişlerdir.

Vejetatif yol ile kök sistemleri arasında yayılan etmen giderek genişleyen hastalık ocakları oluşturmaktadır. Bu genişleme ağaçların yaşına bağlı olarak bir süre sonra azalmakta veya durmaktadır. Çam plantasyonlarında hastalık tipik olarak ağaçlar 15-20 yaşlarına eriştiği dönemlerde başlamakta ve hastalık ocaklarının genişlemesi nedeni bilinmeyen şekilde 40-50 yaşlarında sona ermektedir (Slaughter ve Parmeter, 1995). Tek bir genotipin uygun substrat koşullarında ne kadar hayatta kalabildiği bilinmemektedir. Bugüne kadar tek bir genotip tarafından işgal edilen en büyük alanın 50 m çapında olduğu ve fungusun ortalama radyal gelişimi yıllık 0.3 m olarak düşünüldüğünde bu genotipin 100 yaşından daha büyük olamayacağı tespit edilmiştir (Stenlid ve Redfern, 1998). Damico vd., (2007), yaptıkları çalışmada çam ormanlarındaki en büyük hastalık ocağının 40-50 m çapında olduğunu ve bu ocakların ortalama genişleme oranının 0.3 m olduğunu varsayarak (Stenlid ve Redfern, 1998) böyle bir hastalık ocağının yaklaşık 60 yaşında olabileceğini bildirmişlerdir. Lakomy

vd. 2007 yılında yaptıkları çalışmada genetlerin çok genç olduğunu ve en eski genetin göknar kütüklerinde yayılış gösteren bir genet olduğunu ve bu genetin 20 yaşından büyük olamayacağını bildirmişlerdir. Yapmış olduğumuz çalışmada yayılış gösteren tek bir genetin 126,5 m² alanda 12 ağacı kolonize ettiği göz önünde bulundurulduğunda ve bu ocağın çapının 12-13 m olduğu ve yıllık ortalama genişleme oranının 0.3 m olduğu varsayılarak böyle bir genetin 25 yaşından büyük olamayacağı söylenebilir. Buna göre çalışmamızda tespit olduğumuz en büyük genet en fazla 20-25 yaşlarındadır. Alanda bulunan kızılçam ağaçları aralama ve tıraşlama kesimleri sonrası gençleştirme alanında yetişen ilk jenerasyon olması nedeniyle etmene ait genetlerin genç olduğu düşünülmektedir. Etmen, yaşlı kütüklerde uzun süre hayatta kalabilmektedir. Kesimlerin gerçekleştirilmesinden 62 yıl sonra etmenin bir kütükte tespit edildiği bildirilmiştir (Greig ve Pratt, 1976; Piri, 1996).

Kütüklerin bol miktarda bulunduğu hastalık ocakları ve bu ocaklarda bulunan genet büyüklükleri istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermektedir. Garbeletto (1999), fungusun sekonder yayılışının kütüklerin yoğun olarak bulunduğu bölgelerde daha fazla gözlemlendiğini bildirmiştir. Çalışmamızda ağaçların çapı ve genet büyüklükleri arasında bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir. En büyük genet, en yüksek ortalama ağaç çapının bulunduğu hastalık ocağında tespit edilmiştir. Lakomy vd., (2007) ağaçların yaşı ve aralarındaki mesafenin genet büyüklüklerini etkilediğini bildirmiştir.

Özetle, bazı genetler arasındaki benzerlik oranının düşük çıkması *H. annosum*'un yayılışında basidiosporların ne denli önemli olduğunu göstermektedir. Gençleştirme sahasında gerçekleştirilen tıraşlama ve aralama kesimlerinden sonra alanda bulunan taze kütük yüzeylerinin bu basidiosporlar aracılığı ile enfeksiyona uğramış olabileceği düşünülebilir. Diğer yandan patojene ait genetlerin aynı alanda birden fazla ağacı istila etmiş olması buradaki enfeksiyonların kök kaynaşması yolu ile gerçekleşmiş olabileceğini kanıtlamaktadır. Etmenin kızılçam bireylerini istila ettiği yerlerde önceden kalmış eski kütüklerin annosum kök çürüklüğünden ciddi ve benzer şekilde etkilenmiş oldukları gözlemlenmiştir. Hastalığın alanda bulunan bu kütüklerin kökleri ile vejetatif olarak diğer sağlıklı ağaçların köklerine yayılmış olabileceği söylenebilir. Etmenin yayılışının ölmüş veya ölmek üzere olan kütüklerin köklerinde canlı ağaç köklerindeki nazaran daha fazla olduğu bilinmektedir (Woodward vd., 1998). Basidiosporlar aracılığı ile gerçekleştirilen kütük enfeksiyonları popülasyondaki

genetik çeşitlilik oranını arttırmakta ve böylelikle türün kolonizasyon yeteneğini arttırarak patojende yüksek derecede agresiviteye neden olmaktadır. Buna bağlı olarak kök kaynaşması yolu ile hastalığın meydana getirdiği zararda yüksek oranda bir artış gözlenmektedir (Cieslak vd., 2011). Literatürde *H. annosum*'un konukçu ağaç türü çeşitliliğinin fazla olması bu patojenin genetik çeşitliliğini arttırmada önemli bir faktör olarak düşünülmektedir. Bu bağlamda patojenin enfekte ettiği ağaç türü çeşitliliğinden yola çıkılarak populasyon içinde meydana gelen genetik farklılıklar açıklanabilmekte ve patojenin evrimsel tarihi hakkında yorumlar yapılabilmektedir (Petta vd., 2001).

H. annosum s.s.'un ağaçta kambiyum katmanı (kabuk altı) ve diri odunda daha efektif şekilde kolonize olduğu, ayrıca ağacın kök sisteminde ve hemen üst kısmındaki kök boğazında neden olduğu enfeksiyon ile diğer IS grup üyelerine nazaran ağacı daha hızlı öldürdüğü bilinmektedir. Bu tipin neden olduğu enfeksiyon sonrasında ağaçlar kümeler halinde ölmekte ve bu enfeksiyon zamanla orijinal enfeksiyon bölgesinden dışarıya doğru yüzük şeklinde yayılmaktadır. Diğer IS gruplara ait türler ise genellikle öz odunu etkilemekte ve çoğu zaman ağacın dışından bakıldığında hastalık belirtisi gözlemlenmemektedir (Petta vd., 2001).

Ormanlarda daha çok ılık iklim koşullarının mevcut olduğu aylarda gerçekleştirilen silvikültürel müdahaleler, etmene ait çok yıllık üreme organlarında oluşan basidiosporların taze kütük yüzeylerinde veya ağaçlarda meydana gelen yaralarda çimlenerek enfeksiyon oluşturmaları için ideal koşulları oluşturmaktadır (Kallio, 1970; Swedjemark ve Stenlid, 1993; Redfern ve Stenlid, 1998). Yapılan çalışmalarda etmene ait miselyumların 0-2°C sıcaklık üzerinde çimlenmeye başladığı, 22-28°C arasında optimum gelişme gösterdiği, 32-37°C üzerinde çimlenmesinin durduğu ve 38-45°C üzerinde canlılığını yitirmeye başladığı bildirilmiştir. Fungusun yayılışında ve gelişiminde önemli görev üstlenen konidiofor ve basidiosporlar da miselyumlar ile oldukça benzer sıcaklık isteklerine sahip olup, 5°C sıcaklık ve üzerinde %40 nisbi nemde aktif olarak çimlenebildikleri, 45°C sıcaklık ve üzerinde % 90 nisbi nemde ise tamamen canlılığını yitirdiği rapor edilmiştir (Korhonen ve Stenlid, 1998). Buradan yola çıkarak çalışmamızın gerçekleştirildiği bölgede yazları sıcak ve kurak, kışları ılık ve yağışlı özelliğe sahip olan Akdeniz ikliminin hakim olduğu göz önünde bulundurulduğunda alanın sahip olduğu iklim koşullarının genel olarak enfeksiyon için oldukça elverişli olduğu düşünülmektedir. Alana ait iklim verileri fungusa ait

basidiosporların çimlenmesi ve gelişimi için uygun koşulların bulunduğu işaret etmektedir. Çalışma sahasının bulunduğu bölgeye ait iklim verileri incelendiğinde yıllık ortalama sıcaklığın 12°C olduğu, en sıcak 3 ayın ortalama sıcaklığının 21.3°C olduğu, en nemli 3 ayın ortalama sıcaklığının ise 30°C olduğu görülmektedir. Yaz ayları gün ortası en yüksek sıcaklık ortalaması 30.4°C, yaz ayları gün ortası en yüksek sıcaklık 31.2°C'dir. Yağışlar etmenin gelişme mevsimi boyunca eşit dağılım göstermektedir. Etmene ait etmene ait miselyumların 0-2°C sıcaklık üzerinde çimlenmeye başladığı ve 22-28°C arasında optimum gelişme gösterdiği göz önünde bulundurulduğunda gençleştirme sahasının bulunduğu alanın yılın büyük bir bölümünde enfeksiyon için uygun nem ve sıcaklık koşullarına sahip olduğu görülmektedir. İklim verilerinde Aralık ayının minimum sıcaklık değeri -1°C, maksimum sıcaklık değeri 8.9°C, Şubat ayının minimum sıcaklık değeri -1, maksimum sıcaklık değeri ise 9.3°C olarak bildirilmiştir. Buna göre, çalışmamızın gerçekleştirildiği bölgede Aralık, Ocak ve Şubat ayları dışındaki tüm yıl, havada bulunan basidiosporların taze kütüklerin yüzeyinde çimlenerek miselyum ve konidiospor oluşturmaları için uygun koşullara sahiptir.

Bölgeler bazında, sporların yoğun olarak havada bulunduğu dönemlerin tespiti, hastalığın kontrolünde oldukça önemlidir. *H. annosum*' un tespit edildiği veya yayılış riskinin öngörüldüğü alanlarda ılık iklim koşullarının hüküm sürdüğü dönemlerde silvikültürel müdahalelerden kaçınmak önemli bir kontrol stratejisi olarak görülmektedir. Hastalık etmeninin biyolojik isteklerinden yola çıkarak, ülkemiz iklim koşullarında bu etmenin kışın çok soğuk ve yazın çok sıcak günleri hariç, her dönemde etkin olacağı söylenebilir. Özellikle yağmuru izleyen ılık hava koşullarında spor üretiminin son derece yüksek olduğu bildirilmiştir (Yde- Andersen, 1962). Dolayısıyla, çalışma sahasında ve bu sahanın çevresinde yapılacak olacak silvikültürel müdahalelerin zor koşullarda da olsa Aralık başı-Şubat sonu zaman aralığı diliminde gerçekleştirilmesi, etmenin yayılışında en önemli faktör olan basidiospor kaynaklı enfeksiyonları önlemek amacıyla önerilebilir. Etmene ait sporların nemli ve ılık mevsimlerde havada daha yoğun olarak bulunduğu düşünüldüğünde yağmurun ve nemin fazla olduğu ilkbahar ve sonbahar ayları silvikültürel müdahaleler için mecbur kalınmadıkça önerilmemektedir. Yaz aylarında yapılması gereken müdahaleler için gün ortası sıcaklığın maksimum olduğu kuru saatler seçilebilir. Hastalıklı kütükler kökleri ile birlikte alandan uzaklaştırılmalı ve imha edilmelidir.

H. annosum s.s. etmeninin konukçusu olan kızılçam ormanlarının ılık ve yağışlı kış mevsiminin hakim olduğu yetişme ortamlarında yayılış gösterdiği (Kantarıcı, 1984) göz önünde bulundurulduğunda, bölgede var olan fungal etmene yapılacak olan tek başına silvikültürel müdahaleler daha çok hastalığın leyhine işleyebilir. Bu durumda kritik periyotlarda kesim yapmak gerektiğinde, en azından riskli bölgelerde en uygun strateji, kesim işlemlerinin ardından yeni enfeksiyon oluşumlarını önlemek amacıyla taze kütük yüzeylerine uygulanan kontrol önlemleridir. Hastalığın yayılışı taze kütük yüzeylerine uygulanan biyolojik veya kimyasal tedavi yöntemleri ile kontrol edilebilir. Bu yöntemler çeşitli Avrupa ülkelerinde düzenli olarak kullanılmakta ve ekonomik olarak daha faydalı bulunmaktadır (Thor, 2001; Vasiliauskas, 2001). Literatürde taze kütük yüzeylerinde *Phlebiopsis gigantea* (Fr.) Jul. biyolojik mücadele ajanı ve üre solüsyonu gibi kimyasalların kullanımı oldukça önem göstermektedir (Cieslak vd., 2011). İskandinav ülkeleri için yapılan çalışmalarda enfeksiyon riskinin bahar ve yaz aylarında en yüksek olduğu, bu kritik aylarda herhangi bir kesim planlanmıyorsa enfeksiyonu önlemek için kesimin hemen sonrasında kütük yüzeylerinin *P. gigantea* veya üre solüsyonu ile muamele edilmesi önerilmektedir (Kallio, 1970; Brandtberg vd., 1996). Bazı araştırmalar kesilen kütük tedavisi masraflarından kaçınmanın gelecekte çamlara uygulanmak zorunda kalınacak büyük tedavi maliyetlerinden daha fazla zarara neden olacağını bildirmektedir (Rykowski ve Sierota, 1984). Bundan yola çıkılarak, bir meşcerede, ağaçların % 10-20 veya üzerinde bir oranda hastalık etmeni tarafından enfekte edilme riski varsa, kütükler üzerinde gerçekleştirilecek kontrol önlemlerinin, hastalık etmeninin neden olacağı ekonomik kayıpları azaltmada etkili olacağı düşünülmektedir (Möykkynen vd., 1998; 2000). Araştırmacılar, bu risk yüzdesinin, Finlandiya'nın güneyinde (Korhonen vd., 1994) ve İsveç'in güney ve orta kesimlerinde (Brandtberg vd., 1996) çok yüksek olduğunu bu nedenle, buralarda kütük uygulamasının gerekli görüldüğünü bildirmişlerdir. Kontrol yöntemleri uygulamaları sonucu hastalık etmeninden kurtarılabilecek kereste miktarında oldukça önemli artışlar gözlemlenmektedir (Möykkynen vd., 2000).

Çalışmanın gerçekleştirildiği gençleştirme sahasında kızılçamların meşe ve sedir türleri ile karışık yayılış gösterdiği alanlarda hastalık ocakları tespit edilmemiştir. Ayrıca gençleştirme sahasının hemen alt kısmında Yapraklı Baraj gölü bulunmaktadır. Bilindiği üzere barajlar iklimi etkilemekte hatta sonradan yapılan barajlar bölge

iklimine ait nem oranını bile değiştirmektedir. Bu sebeplerle ağaçlar rüzgara karşı daha hassas bir hale gelmekte, ağaç hastalıklarında oldukça fazla oranda bir atış gözlenmektedir. Sörvey çalışmalarımızdan, yerel ormancılardan ve orman mühendislerinden elde edilen bilgiler ışığında, alanın çevresinde mevcut doğal kızılçam meşcerelerinin saf, kısmen de karaçamla karışık olarak bulunduğu meşcerelerde hastalık etmeni ile ilgili çok büyük bir tahribatın bulunmadığı tespit edilmiştir. Alanlar arasındaki farklılıklar coğrafik ve ekolojik özellikleri ile ilişkilendirilebileceği gibi, meşcere tipinin hastalık etmeninin alandaki yayılışı üzerinde önemli etkisi olduğu bilinmektedir. Çoğu literatür çalışmasında, karışık meşcerelerde *H. annosum* yoğunluğunun daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Korhonen vd., 1998a; Linden ve Vollbrecht, 2002). Linden ve Vollbrecht (2002), ladin ve sarıçamın birlikte bulunduğu, karışım oranının en az %50 olduğu meşcerelerde *H. annosum* zararının çok daha az olduğunu bildirmişlerdir. Etmenin kök kontağı yolu ile yayılıyor olması özellikle monokültürlerin bu etmene karşı daha hassas olduğunun bir göstergesidir. Mücadele için hastalık etmeninin kök sistemindeki vejetatif yayılımı kolonizasyonun başlangıcında sınırlandırılmalıdır. Hastalık ocaklarının bulunduğu bölgelerde etmene karşı dayanıklı olduğu bilinen iğne yapraklı veya geniş yapraklı türlerin gençleştirme çalışmalarının yapılması hastalığın yayılışının sınırlandırılmasında büyük önem göstermektedir (Woodward vd.,1998). Bu durumda, toprak altında kök kaynaşması yolu ile yayılış gösteren patojenin hassas diğer bir yeni bireye ulaşması için daha fazla yol kat etme zorunluluğu ortaya çıkmaktadır (Rishbeth, 1951). Karışık meşcerelerde hastalık etmenine ait sporlar, hassas konukçu türün varlığı oranında taze kütük yüzeyine bulaşarak yayılma şansı bulabilmektedir (Linden ve Vollbrecht, 2002). Bununla birlikte yüksek oranda yapraklı türlerin bulunduğu bölgelerde hastalık etmenin zararı yok denecek kadar az tespit edilmiştir (Woodward vd.,1998). Ayrıca, karışık meşcerelerdeki bitki çeşitliliği, ekosistemde yer alan her türlü mikroorganizma çeşitliliğini beraberinde getirerek, *H. annosum* 'un yayılışını baskılayabilecek antagonistlerin bulunması şansını arttırmaktadır (Johansson ve Marklund, 1980; Holmer ve Stenlid, 1993). Bu tip karışık meşcerelerde biyotik ve abiyotik zararlılara karşı güçlü meşcere yapısının oluşması en büyük avantajlardan birisidir.

Çalışmanın gerçekleştirildiği doğal gençleştirme alanında sedir ve meşe karışımları bulunmasına rağmen bu karışımların oranları silvikültürel müdahalelerin yapıldığı

yerlerde oldukça azdır. Bu nedenle karışım oranının az olduğu bölgelerde hastalık etmeni kızılçamlar arasında kolayca yayılış göstermiş ve büyük hastalık ocakları oluşmuştur. Silvikültürel müdahaleler sırasında karışık meşcerelerdeki bazı türlerin karışım oranları dikkatsizce azaltılmakta, hatta belirli türler tamamen yok edilmektedir. Böylece karışım şekli ve oranı doğadaki orijinal halinden oldukça farklılaşmakta, birçok hastalığa davetiye çıkarmaktadır. Bazı alanlarda gereken doğal gençleştirme yöntemi doğru bir şekilde uygulanmadığı için karışık meşcerelerin pek çoğunda karışım oranları, işletme amaçlarına uygunluktan uzaklaştırılmış veya serpili halde değişik türler içeren saf meşcerelere dönüştürülmüştür (Ata, 1995). Bu duruma kızılçam-karaçam karışık meşcerelerinin doğal gençleştirilmesinde oldukça sık rastlanmaktadır (Genç, 2006).

Dikili ağaçta vejetatif miselyumun yayılışı ve oluşturduğu çürüklüğün şiddeti, konukçu türüne, yaşına, odununun nem miktarına, odunda bulunan endofitlere, uygulanan silvikültürel tekniklere bağlı olarak değişebilmektedir (Korhonen ve Stenlid, 1998). Edafik koşullar, özellikle Ph, toprak yapısı, sıcaklık, nem etmenin yayılış hızını belirlenmesinde önemlidir. Rönberg (2006), enfeksiyonun yayılma sürecinin kuru, kumlu, ve yüksek ph'a sahip topraklarda daha hızlı gerçekleştiğini bildirmiştir (Rishbeth 1950, 1951, 1957). Yüksek kalsiyum içeriği ve Ph değeri, topraktaki antagonist fungus aktivitesini azaltarak hastalık oluşumunu büyük oranda etkilemektedir (Korhonen ve Stenlid 1998; Gonthier vd., 2012). Bunun yanı sıra toprak tipi fungusun yayılışını önemli derecede etkilemektedir. Düşük organik madde içeriğine sahip kumlu topraklar ve verimli topraklar üzerinde hastalığın daha şiddetli olduğu tespit edilmiştir. Genellikle eski tarımsal arazilerde ve meralarda patojenin meydana getirmiş olduğu zararın orman topraklarına göre daha yüksek bulunduğu bilinmektedir (Redfern vd., 2010; Garbelotto ve Gonthier, 2013).

Reçineli diri oduna sahip konukçularda hastalık etmeni çoğunlukla kök ve gövdede yerleşmekte ve buna bağlı olarak rüzgâr devrikleri ya da ani ölümlerde artış gözlemlenmektedir. *Pinus* ve *Larix* türlerinde fungusun ağacın kök boğazından 1-3 m yüksekliğe ulaştığı ve buralarda çürüklüğe neden olduğu bilinmektedir. Reçinesiz diri oduna sahip ağaç türlerinde ise (*Picea* spp. ve *Abies* spp.) fungus genellikle diri odunu tercih ettiği için, hastalık diri odunun oluşmaya başladığı dönemler olan 25-40 yaşları arasında görülmektedir. Bu türlerde ağacı doğrudan ölüme sürüklemeksizin gövde içinde ilerleyerek, yayıldığı bölgenin tamamen çürümesine neden olmaktadır. Yaşlı

gökmar ve ladin gövdelerinde bu çürüklüğün 2-4 ya da 5-8 metre arasındaki yüksekliklere ulaştığı, hatta bazen 9-12 m' ye kadar çıktığı saptanmıştır (Asiegbu vd., 2005).

Ağaçların ilerleyen yaşlarda *H. annosum*'a karşı hassasiyetlerinin arttığı (Woodward vd., 1998) ve buna bağlı olarak meşcere yaşı ile enfeksiyon yoğunluğunun paralel olarak artış gösterdiği bilinmektedir. Holmsgaard vd. (1968), yaptıkları çalışmada 30 yaşındaki bir meşcerede, etmene ait hastalık yoğunluğunu %10 oranında tespit etmişken, bundan 20-50 yıl sonra bu yoğunluğun %30-50 oranlarına ulaştığını tespit etmişlerdir. Vollbrecht ve Bilde Jorgensen (1995), geliştirdikleri modelde 50 yıl içerisinde, başlangıçta %5 olan enfeksiyon yoğunluğunun, %60'a çıkabileceğini tahmin etmişlerdir.

Çalışmanın son aşamasında, *H. annosum*'un tahribat oluşturmaya neden olan bazı ekolojik faktörlerin rolü belirlenmeye çalışılmıştır. Bitki popülasyonlarında görülen fungal hastalıkların yayılışının, değişen çevresel faktörlerin ve konukçu popülasyonlarının karakteristiklerinden etkilendiğini bilinmektedir (Ranta ve Saloniemi, 2005). Çalışmada, çevresel değişkenler ile hastalık etmeni arasındaki ilişkinin belirlenebilmesi için, hastalıklı ağaçlara ait veriler ile hastalığın yayılışını etkileyebilecek çevresel faktörler ilişkilendirilerek çalışma alanı için potansiyel dağılım modellemesi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucu modeli oluşturan değişkenler sırasıyla bakı, arazi yüzey formu, eğim ve yükselti olarak belirlenmiştir. Modelleme esnasında elde edilen modelleri etkileyen değişkenlerin değerlendirilmesinde Jackknife istatistiklerinden ve marjinal cevaplandırıcı tahmin yöntemlerinden faydalanılmıştır. Jackknife istatistiklerine göre modelin açıklama payı %86 olarak tespit edilmiştir ve modele en fazla katkıyı yapan değişken yükselti olarak belirlenmiştir. Marjinal cevaplandırıcı eğrilere bakıldığında modeli oluşturan değişkenlerden bakı ile nispeten (0°-300°) pozitif bir ilişkinin olduğu görülmektedir. Nemli Kuzeyli bakılar ve hastalık etmeni arasında pozitif bir ilişkinin olduğu tespit edilmiştir. Eğim değişkeni ile ağırlık olarak negatif bir ilişkinin olduğu gözlemlenmiştir. Düz ve düze yakın bölgelerde hastalık etmeninin bulunma olasılığı azalmaktadır. Eğimin hafif derecede arttığı (orta eğimli) tepe oluşumuna sahip yerlerde ise hastalık etmeni artış göstermektedir. Topoğrafik pozisyon indeksi değerinin 1 ile 5 arasında olduğu alanlarda hastalık etmeni açısından pozitif bir ilişki

bulunmaktadır. Arazi gözlemlerimizle uyumlu olarak hastalık etmeninin alt ve orta yamaçları tercih ettiği görülmektedir. Modele en yüksek katkıyı yapan yükselti değişkeni ile pozitif bir ilişki tespit edilmiştir. Alan içerisinde yükseltinin arttığı kesimlerde, yağışa ve bölgede yer alan göle bağlı olarak nemliliğin fazla olduğunun bilinmesi sebebiyle yükselti açısından beklenen bir sonuç olmuştur.

Modelleme sonuçları ele alındığında, modele ait eğitim veri seti AUC değerinin 0.86, test veri seti AUC değerinin ise 0.85 olduğu ve bu verilerin birbirini doğruladığı tespit edilmiştir. Modelleme sonuçları MAXENT yönteminin en az var verisi ile, en iyi sonuç veren yöntem olduğunu bir kez daha göstermiştir. Oluşturulan potansiyel dağılım haritalamasına bakıldığında, gençleştirme alanı ve çevresinin *Annosum* kök çürüklüğü hastalığına karşı tehdit altında bulunduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalarda, etmenin yayılışı ile sahanın yüksekliği, eğimi ve bakışı arasında korelasyonlar bulunduğu bildirilmiştir (Redfern vd., 2010; Garbelotto ve Gonthier, 2013).. Konukçunun bulunduğu sahanın konumu, geçmişteki durumu, aktüel durumu, ekolojik faktörler hastalığın oluşumunda önemli faktörlerdir (Thor vd., 2005; Tokuda vd., 2011).

Ayrıca izolatların elde edildiği kütük veya ağaçların tarihinin ve ormandaki kökeninin, çürüklük şiddetine önemli etkisi olduğu düşünülmektedir. Etmenin yakın zamanda yapılması planlanan silvikültürel müdahaleler sonrası çevredeki saf meşcereler oluşturan kızılçam ormanlarına yayılabileceği söylenebilir. Ağaçların ilerleyen yaşlarda *H. annosum*’a karşı hassasiyetlerinin arttığı bilinmektedir (Woodward vd., 1998). Enfekteli ağaçlarda artım kaybı görülmekte ve bu ağaçlar abiyotik zararlara karşı daha hassas hale gelmektedir (Holdenrieder ve Grieg, 1998). Kesilmiş kütükler üzerinde herhangi bir kontrol işlemi uygulanmayacağı ve önlemler alınmayacağı için havadaki basidiosporların bu kütükler üzerinde yeni enfeksiyonlar oluşturma olasılığı oldukça yüksektir. Böylelikle etmen saf meşcerelerden oluşan kızılçam ormanlarında basidiosporları sayesinde daha geniş alanda yayılım gösterebilecek ve buralardan kök kaynaşması yolu ile diğer tüm sağlıklı ağaçlara atlayabilecektir.

Kuraklıktan kaynaklanan su stresinin, bu etmenin neden olduğu hastalık şiddetini arttırdığı bildirilmiştir (Lindberg ve Johanson, 1992; Stenlid ve Redfern, 1998). Bu durum, özellikle içinde bulunduğumuz Akdeniz iklim kuşağında, iklim değişiklikleri

sonucu meydana gelen (Kellomaki, vd., 2000) kuraklık açısından değerlendirildiğinde, ülkemizde en geniş yayılış alanına sahip asli türümüz olan kızılçamların zamanla bu kuraklık stresinden yoğun şekilde etkilenecek *H. annosum* enfeksiyonlarına karşı da daha duyarlı hale gelmesi beklenmektedir. Örneğin, araştırmacılar Yunanistan ve İtalya'da *H. abietinum*' un *A. alba* üzerinde ciddi derecede hastalık oluşturmasını, patojen nedeniyle zayıf düşen ağaçların yaz kuraklığına karşı daha hassas hale gelmesi ile ilişkili bulmuşlardır (Korhonen vd., 1998a). Aynı durum bizim ülkemiz koşulları için de söz konusu olarak görülmektedir.

Modern ormancılık ve ağaçlandırma uygulamaları ile birlikte, hastalığın yayılışı gün geçtikçe daha da ciddi bir artış göstermektedir (Korhonen vd., 1998a; Garbelotto ve Gonthier, 2013). Yerel orman mühendisinden edinilen bilgilere göre hastalığın tespitinden sonra, 2017 yılında gençleştirme alanında sıklık bakımı yapılmış ve buna bağlı olarak lokal kurumalarda hızla artış gözlemlenmiştir. Dikili ağaçlarda var olan enfeksiyon yoğunluğunun gerçekleştirilen ve gerçekleştirilecek olan ormancılık faaliyetlerine paralel olarak daha da artış göstereceği ve çevrede bulunan diğer ağaçlara hava enfeksiyonları ile yayılış gösterebileceği söylenebilir. Rishbeth (1957), *H. annosum* s. 1' dan kaynaklanan hastalık şiddetinin, hızlı gelişen ağaçlarda, yavaş gelişenlere kıyasla daha fazla olduğunu belirtmiştir. Dolayısıyla inokulum kaynağının bol olduğu yerlerde gerçekleştirilen aralama kesimlerinin, hastalığın alanda varlığını sürdürmesine olanak sağlayarak, özellikle hızlı gelişen ağaçlarda enfeksiyon riskinin artmasına neden olacağı öngörülebilir.

Enfekteli ağaçlarda artım kaybı görülmekte ve bu ağaçlar abiyotik zararlara karşı daha hassas hale gelmektedir (Holdenrieder ve Grieg, 1998). Ekonomik fonksiyonlara göre kızılçam, karaçam ve meşe işletme sınıflarına ayrılmış olan bu bölgede hastalık etmeninin bulunduğu ağaç türü olan kızılçam işletme sınıfında işletme amacı, piyasanın istediği en yüksek miktar ve kalitede endüstriyel odun üretimini gerçekleştirmektir. Saf meşcerelerin karışık meşcereye dönüştürülmesi için ise bazı araştırmaların yapılarak, karışık meşcere olabilirliğinin ortaya koyulması, ideal kuruluşun belirlenip bunun gerçekleştirilmesi gerekmektedir (Oliveira, 1996). Buna karşın, özellikle tek türe dayalı endüstrinin ihtiyaçlarına dönük orman işletmeciliği yapan kuruluşlarda, saf meşcereler tercih edilmektedir.

Bugüne kadar yapılan araştırmalar, ülkemiz koşullarında *H. annosum* s.l' dan kaynaklanan zararın ne denli ciddi olabileceğini açıkça göstermektedir. Etmenin neden olduğu zararın boyutu hakkında daha gerçekçi bir tablo çizebilmek için, diğerk ülkelerde olduğu gibi patojenin neden olduğu kayıpların ekonomik boyutu detaylı bir şekilde analiz edilmeli ve elde edilen veriler ışığında etmen daha büyük epidemilere yol açmadan, kontrol yöntemlerinden en uygun olan ya da olanların uygulamaya aktarılması gerekmektedir. Bu aşamada konunun uzmanlarının yanı sıra Tarım ve Orman Bakanlığı yetkililerine büyük işler düşmektedir. Bundan sonra meydana gelebilecek enfeksiyonların durdurulması veya azaltılması için gerekli çalışmalar yapılması ve silvikültürel bir takım temel önlemlerin alınmaması durumunda, bu etmenin gençleştirme sahasında ve çevresinde geri dönüşü mümkün olmayan daha büyük tahribatlara yol açabileceği düşünülmektedir. Ayrıca ekosistemlerin sağlıklı bir şekilde sürdürebilirliği için, biyoçeşitliliğin bileşenlerinden biri olan genetik çeşitliliğin tüm zararlı organizmalar için belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle, ormancılık alanında DNA markörleri ile gerçekleştirilen moleküler çalışmaların yoğunlaştırılması, populasyon yapısı çalışma ve tekniklerin ilerletilmesi, elde edilen sonuçların ekolojik parametrelerle birlikte yorumlanması çalışmalarına ağırlık verilmesi yerinde olacaktır. Bunun sonucunda, orman zararlıları ile mücadele kapsamında ulaşılması hedeflenen amaçlara daha kolay ve güvenilir bir şekilde ulaşılacaktır.

KAYNAKLAR

- Adamowicz, W. (2003). Economic indicators of sustainable forest management: Theory versus practice. *Journal of Forest Economics*, 9:27–40.
- Aday, A. G. & Doğmuş Lehtijärvi, H. T. (2007). *Gökmar Türlerinde Heterobasidion abietinum Niemelä Korhonen'un Belirlenmesi*. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, sayfa: 42, Isparta.
- Akcan, S., Kafkas, S., Sütyemez, M., Akça, Y., Eti, S., & Türemiş, N. (2008). *Karadeniz Cevizlerinde Apomiksis Olasılığının Diş Çiçeklerin İzolasyonu ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması*. Alatarım, 1.
- Allendorf, F. & W., Luikart G. (2007). *Conservation and the genetics of populations*. Wiley-Blackwell Publishing, US.
- Alfenas, A. C., R. Jeng, & M. Hubbes. (1984). Isoenzyme and protein patterns of isolates of *Cryphonectria cubetlsis* differing in virulence. *Can. J. Bot.* 62: 1756-1762.
- Anonim, (2019a). <http://www.biology.arizona.edu>
- Anonim, (2019b). <https://dnr.wi.gov/topic/ForestHealth/AnnosumRootRot.html>
- Anonim, (2019c). https://www.researchgate.net/figure/Microscopic-photo-of-a-conidiophore-with-conidia-of-Heterobasidion-sp-Pho-to-by-Nikica_fig3_259501805/actions#reference
- Anşin, R. (1994). *Tohumlu Bitkiler Gymnospermae (Açık Tohumlular)*, KTÜ Yayınları, Genel Yayın No:122, Fakülte Yayın No: 15, Trabzon, sayfa: 262.
- Anşin, R., & Özkan, Z. C. (1993). *Tohumlu Bitkiler (Spermatophyta) Odunsu Taksonlar*. Karadeniz Teknik Üniversitesi Orman Fakültesi Yayın, (19), 512.
- Araújo, M. B., Pearson R. G., Thuiller W. & Erhard M. (2005). Validation of species–climate impact models under climate change. *Global Change Biology* (11), 1504-1513.
- Asan, Ü., Yeşil, A., & Destan, S. (1998). Multi Benefical Forest Use and Functional Planning. *Bulgarian Forest Science*, 121-130.
- Asiegbu O. F., Adomas, A., & Stenlid, J. (2005). Conifer Root and Butt Rot Caused by *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. s. l. *Molecular Plant Pathology*, 4, 395-409.
- Asmaz, H. (1993). *Akdeniz peyzajında kızılçamın önemi*. Uluslararası Kızılçam Sempozyumu, 18-23.
- Ata, C. (1995). *Silvikültür Tekniğı Ders Kitabı*. Z.K.Ü. Orman Fakültesi, Yayın No 4/3, Bartın.

- Atalay, I., (1987). *Sedir Ormanlarının Yayılış, Gösterdiği Alanlar ve Yakın Çevresinin Genel Ekolojik Özellikleri ile Sedir Tohum Transfer Rejyonlaması (Cedrus libani A. Rich) Forests and Regioning of Seed Transfer of Cedar in Turkey*, Orman Genel Müdürlüğü Yayını, 663, Ankara (in Turkish with English Summary).
- Aukema, J. E., Leung, B., Kovacs, K., Chivers, C., Britton, K. O., Englin, J., & McCullough, D. G. (2011). *Economic impacts of non-native forest insects in the continental United States. PLoS one*, 6(9), e24587.
- Ayberk, S. (1992). *Tarımsal Ormancılığın Tanımı, Önemi, Uygulama ve Araştırmalardan Örnekler*. Kavak ve Hızlı Gelişen Yabancı Tür Orman Ağaçları Araştırma Enstitüsü, 1992/1 No: 18, İzmit.
- Backhouse, D., & Willetts, H. J. (1984). A histochemical study of sclerotia of *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 30(2), 171-178.
- Balcı, Y. (1998). *Kazdağı Göknarı (Abies equi-trojani Aschers et Sint.)'nda Görülen Hastalıklar*. Kasnak Meşesi ve Türkiye Florası Sempozyumu, 21- 23 Eylül, 600-609.
- Baldwin, R.A. (2009). Use of Maximum Entropy Modeling in Wildlife Research. *Entropy*, 11(4), 854-866.
- Bark, O. H., & Havey, M.J., (1995). Similarities and relationship among population of the bulb onion as estimated by RFLPs. *Theor. Appl. Genetics* 90:407-414.
- Bazzigher, G. (1986). Infection studies with *Heterobasidion annosum* on Young Trees of *Picea abies*. *European Journal of Forest Research*, 16 (2), 125- 128.
- Beckmann, J. S., & Soller, M. (1983). Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theoretical and Applied Genetics*, 67(1), 35-43.
- Bega, R.V. (1962). Tree Killing by *Fomes annosus* in a Genetic Arboratum. *Plant Disease Reporter*, 46:107-110.
- Bendz-Hellgren, M., Brandtberg, P. O., Johansson, M., Swedjemark, G., & Stenlid, J. (1999). Growth rate of *Heterobasidion annosum* in *Picea abies* established on forest land and arable land. *Scandinavian journal of forest research*, 14(5), 402-407.
- Bendz-Hellgren, M., Lipponen, K., Solheim, H., & Thomsen, I. M., (1998). *Impact, Control and Management of Heterobasidion annosum Root and Butt Rot in Europe and North America*. In S. Woodward, J. Stenlid, R. Karjalainen, & A. Hüttermann (Eds.), *Heterobasidion annosum* Biology, Ecology, Impact And Control (pages 333-345). Wallingford: CAB International.

- Beram, R. C., Beram, A., & Lehtijarvi, H. T. D. (2016). Fungal Endofitler ve Etkileşimleri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(2), 161-166.
- Brandtberg, P. O., Johansson, M., Seeger, P. (1996). Effects of season and urea treatment on infection of stumps of *Picea Abies* By *Heterobasidion annosum* in stands on former arable land. *Scandinavian Journal of Forest Research* 11: 261-268.
- Bora, T., & Özaktan, H., (1998). *Bitki hastalıklarıyla biyolojik savaş*. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 205
- Bornet, B. & Branchard, M., (2001). Nonanchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol Biol Reporter* 19: 209–215.
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M. & Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in manusing restriction fragment length polymorphisms, *Am. J. Of Human Genetic*, 32; 314-331.
- Boydak, M., Dirik, H., & Çalikoğlu, M. (2006). *Biology and Silviculture of Turkish Red Pine (Pinus brutia Ten.)*.
- Boydak, M., & Çalikoğlu, M., (2008). *Toros Sediri'nin (Cedrus libani A. Rich.) Biyolojisi ve Silvikültürü*. Ormancılığı Geliştirme ve Orman Yangınları ile Mücadele Hizmetlerini Destekleme Vakfı Yayını, Lazer Ofset Matbaası, sayfa 284, Ankara.
- Butin, H., (1995). *Tree Diseases and Disorders; Causes, Biology and Control in Forest and Amenity Trees*. Oxford University Press, 150.
- CABI, (2019). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/27044#toDistributionMaps>
- Capretti, P., Goggioli, V., & Mugnai, L., (1994). *Intersterility Groups of Heterobasidion annosum in Italy: Distribution, Hosts and Pathogenicity Tests*. Proceedings of the Eighth IUFRO Conference on Root and Butt Rots. Sweden/Finland, August 1993. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 218-226.
- Capretti P., & Mugnai L., (1989). Saprophytic Growth of *Heterobasidion annosum* on Silver-Fir Logs Interred in Different Types of Forest Soils. *European Journal of Forest Pathology*, 19, 257- 262.
- Capretti, P., Korhonen, K., Mugnai, L., & Romagnoli, C., (1990). An Intersterility Group of *Heterobasidion annosum*, Specialized to *Abies alba*. *European Journal of Forest Pathology*, 20 (4), 231-240.
- Chase, T. E., & Ullrich, R. C. (1983). Sexuality, distribution, and dispersal of *Heterobasidion annosum* in pine plantations of Vermont. *Mycologia*, 75(5), 825-831.

- Cieślak, R., Łakomy, P., & Molińska-Glura, M. (2011). Description Of *Heterobasidion annosum* Sensu Stricto Population Occurring in Scots Pine Stands in Człopa and Podanin Forest Districts. I. Mycelium Development in Alive Wood. *Acta Sci. Pol. Silv. Colendar. Rat. Ind. Lignar*, 10(3), 15-25.
- Clarke, K.R. (1993). Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18, 117-143.
- Comparini, C., Cecere, L., Capretti, P., & Scala, A. (2000). Multiple forms of pectin-degrading enzymes produced by intersterile groups P, S and F of *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *Phytopathologia mediterranea*, 39(3), 376-388.
- Costanza, R., & Jorgensen, S. E. (Eds.). (2002). Understanding and solving environmental problems in the 21st century: toward a new, integrated hard problem science. *Elsevier*.
- D'Amico, L., Motta, E., Annesi, T., Scire', M., Luchi, N., Hantula, J., ... & Capretti, P. (2007). The North American P group of *Heterobasidion annosum* s.l. is widely distributed in *Pinus pinea* forests of the western coast of central Italy. *Forest Pathology*, 37(5), 303-320.
- Dai, Y. C., Korhonen, K. (1999). *Heterobasidion annosum* group of S identified in North-eastern China. *European Journal of Forest Pathology*, 29 (4), 273- 279.
- Dai, Y. C., Nainio E. J., Hantula, J., Niemela, T., & Korhonen, K. (2003). Investigations on *Heterobasidion annosum* s. l. in Central and Eastern Asia with the Aid 45 of Mating Tests and DNA Fingerprinting. *Forest Pathology*, 33 (5), 269-286.
- Dai, Y. C., Yuan, H. S., & Wei, Y. L. (2006). New Records of *Heterobasidion parviporum* in China. *Forest Pathology*, 36 (4), 287-293.
- Dalman, K., Olson, Å., & Stenlid, J. (2010). Evolutionary history of the conifer root rot fungus *Heterobasidion annosum* sensu lato. *Molecular Ecology*, 19(22), 4979-4993.
- Davis, P.H. (1965). *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, 1-10, Edinburg.
- Demirel, K. (1999). Contributions to Turkish Mycoflora from Ardanuç District of Artvin Province. *Turkish Journal of Botany*, 23 (6), 405-409.
- Desplanque, B., Boudry, P., Broomberg, K., Saumitou-Laprade, P., Cuguen, J., & Van Dijk, H. (1999). Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L. (*Chenopodiaceae*), assessed by RFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(8), 1194-1201.
- Devos, K. M., & Gale, M. (1992). The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 84(5-6), 567-572.

- Dong, K., Dean, R.A., Fortnum, B.A. & Lewis, S.A. (2001). Development of PCR primers to identify species of root-knot nematodes: *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* and *M. javanica*. *Nematropica*, 31: 271-280.
- Doğmuş Lehtijärvi, H.T., Lehtijärvi, A., Korhonen, K., (2006). *Heterobasidion abietinum* on *Abies* Species in Western Turkey. *European Journal of Forest Pathology*, 36, 280-286.
- Doğmuş Lehtijärvi, H.T., Lehtijärvi, A., Hatat- Karaca, G., & Aday, A.G. (2007). *Heterobasidion annosum* s. l.' un Uludağ Gökmarında Oluşturduğu Alt Gövde Çürüklüğünün Arazi ve Laboratuvar Metotları ile Tespiti. *S.D.Ü. Orman Fakültesi Dergisi, Seri A, Sayı 1*, 58-67.
- Doğmuş Lehtijärvi, H.T., Lehtijärvi, A., Aday, A.G., Oskay, G. & Karaca, G. (2009). *Bazı Biyolojik ve Kimyasal uygulamalarının Heterobasidion abietinum'un gelişimi üzerine etkisi*. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 15-18 Temmuz 2009, s. 339,(Özet).
- Doğmuş Lehtijärvi, H. T., Lehtijärvi, A., Aday, A. G., & Oskay, F. (2010). *Annosum Kök Çürüklüğüne Karşı Uygulanan Biyolojik Kontrol Ajanı: Phlebiopsis gigantea*. III. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi, 20-22 Mayıs 2010, Cilt: IV Sayfa: 1403-1410.
- Doğmuş Lehtijärvi, H. T., Lehtijärvi, A., Oskay, F., & Aday, A.G. (2010). *Efficacy of Urea, Borax and Trichoderma Treatments Against Heterobasidion Spore Infections of Stumps of Abies nordmanniana ssp. bornmülleriana*. Proceedings 13th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union (MPU), pages: 573-574. 20-25 June 2010, Rome- Italy.
- Doğmuş Lehtijärvi, H. T., Aday, A. G., Oskay, F., & Lehtijärvi, A. (2012). Arazi koşullarında bazı kimyasal ve biyolojik ajanların *Heterobasidion annosum* s. l.'un mücadelesinde kullanım olanakları. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 12(2), 313-320.
- Doğmuş Lehtijärvi, H. T., Erdoğan, R. C., Lehtijärvi, A., Woodward, S., & Aday Kaya, A. G. (2016). Pathogenicity of *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. sensu stricto on coniferous tree species in Turkey. *Forest Pathology*, 46(1), 22-28.
- Fabritius, A. L., & Karjalainen, R. (1993). Variation in *Heterobasidion annosum* detected by random amplified polymorphic DNAs. *European Journal of Forest Pathology*, 23(4), 193-200.
- FAO (2015). Global Forest Resources Assessment 2015. FAO Forestry, UN Food and Agriculture Organization, Rome (2015).
- Filiz, E., & Koç, İ. (2011). Bitki biyoteknolojisinde moleküler markörler. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2011(2).

- Fisher, R. A. (1958). The genetical theory of natural selection. Rev. Ed. Newyork: Dover.
- Freeman, S., & Herron, J. (2007) *Evolutionary Analysis*, 4. Ed.; Pearson Education.
- Garbelotto, M., Cobb, F. W., Bruns, T. D., Otrosina, W. J., Popenuck, T., & Slaughter, G. (1999). Genetic structure of *Heterobasidion annosum* in white fir mortality centers in California. *Phytopathology*, 89(7), 546-554.
- Garbelotto, M., & Gonthier, P. (2013). Biology, Epidemiology, and Control of *Heterobasidion* Species Worldwide Annully Reviwe *Phytopathology*, 51: 39-59.
- Garbelotto, M., Slaughter, G., Popenuck, T., Cobb F.W., & Bruns, T.D. (1997). Secondary Spread of *Heterobasidion annosum* in White Fir Root-Disease Centers. *Canadian Journal of Forest Research*, 27 (5), 766-773.
- Garbelotto, M., Bruns, T. D., Cobb, F. W., & Otrosina, W. J. (1993). Differentiation of intersterility groups and geographic provenances among isolates of *Heterobasidion annosum* detected by random amplified polymorphic DNA assays. *Canadian Journal of Botany*, 71(4), 565-569.
- Gauch, H. G., & Whittaker, R. H. (1981). Hierarchical classification of community data. *Journal of Ecology*, 69: 537-557.
- Genç, M., Güner, Ş. T., & Fakir, H. (1997). Afyon-Çal Dağı Kızılçam Meşcereleri. *Orman Mühendisliği Dergisi*, 34(6), 7-14.
- Genç, M. (2004). *Silvikültürün Temel Esasları*. Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, 269-280. Isparta.
- Genç, M. (2006). *Silvikültürel Uygulamalar*. Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, (46), 357. Isparta.
- Genç, M. (2009). *Asli Ağaç Türlerimizin Silvikültürü Ders Notları*. Erişim Tarihi: 15.09.2014. <http://ormanweb.sdu.edu.tr/dersler/mgenc/asli/asli7.pdf>
- Gonthier P, Brun F, Lione G, & Nicolotti G. (2012). Modelling the incidence of *Heterobasidion annosum* butt rots and related economic losses in alpine mixed naturally regenerated forests of northern Italy. *Forest Pathology*. 42:57–68.
- Gökmen, H. (1970). *Açık Tohumlular (Gymnospermae)*. Alkan Matbaası, Ankara.
- Gökşin, A. (2001). *Kızılçamın Botanik Özellikleri, Kızılçam El Kitabı*, Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, Muhtelif Yayınlar Serisi 52.
- Gözel, U., Çiğdem, Y., & Gözel, Ç. (2016). Nematod taksonomisinde kullanılan moleküler markörler. *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 6(2), 179-189.

- Greig, B. J. W. (1976). Biological control of *Fomes annosus* by *Peniophora gigantea*. *European Journal of Forest Pathology*, 6: 65-71.
- Greig, B. J. W., & Pratt, J. E. (1976). Some observations on the longevity of *Fomes annosus* in conifer stumps. *European journal of forest pathology*, 6(4), 250-253.
- Greig, B. J. W. (1995). Butt-rot of Scots pine in Thetford Forest caused by *Heterobasidion annosum*: a local phenomenon. *European journal of forest pathology*, 25(2), 95-99.
- Greig, B. J. W. (1998). *Field Recognition and Diagnosis of Heterobasidion annosum*. In: Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., Hüttermann, A. (Eds), *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control*, CAB International, Wallingford, UK, pages: 35-41.
- Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero-Severson, J. ve Owen, J.L. (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genetics*, 89: 998-1006.
- Gupta, P.K. & Rustgi, S., (2004). Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Funct Integr Genomics*, 4, 139-162.
- Güleç, T. E., Yıldırım, A., & Sönmezoğlu, Ö. A. (2010). Bitkilerde Markör Destekli Seleksiyon. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (2), 67-79.
- Hantula, J., Dusabenyagasani, M., & Hamelin, R. C. (1996). Random amplified microsatellites (RAMS)—a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *European Journal of Forest Pathology*, 26(3), 159-166.
- Hantula, J., & Müller, M. M. (1997). Variation within *Gremmeniella abietina* in Finland and other countries as determined by Random Amplified Microsatellites (RAMS). *Mycological Research*, 101(2), 169-175.
- Hantula, J., & Vainio, E. (2003). Specific primers for the differentiation of *Heterobasidion annosum* (s. str.) and *H. parviporum* infected stumps in northern Europe. *Sylva Fennica*, 37, 181– 187.
- Harrington TC, Stenlid J, Korhonen K. 1998. Evolution in the genus *Heterobasidion*. In: Delatour C, Guillaumin JJ, Lung-Escarmant B, Marcais B, eds. Root and butt rots of forest trees. 9th International Conference on Root and Butt Rot. Paris, France: INRA. INRA Editions vol 89: 63–74.
- Hartig, R. (1878). Die Zerzetzungserscheinungen des Holzes der Nadelholzbäume und der Eiche in forstlicher botanischer und chemischer Richtung. *Springer-Verlag*, Berlin, 151p.
- Hedrick, P.W. (2005). *Genetics of Population*. Jones & Bartlett Publishers London UK.

- Hernandez, P.A., Graham, C.H., Master, L.L., & Albert, D.L. (2006). The Effect of Sample Size and Species Characteristics on Performance of Different Species Distribution Modeling Methods. *Ecography*, 29(5), 773-785.
- Hill, M. O. (1979). *DCA - A FORTRAN program for detrended correspondence analysis an reciprocal averaging*. Cornell University, Ithaca, New York.
- Hodges, C. S. (1969). Modes of Infection and Spread of *Fomes annosus*. *Annual Review of Phytopathology*, 7, 247- 266.
- Holdenrieder, O., & Grieg, B.J.W., (1998). *Biological Methods of Control*. In *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact And Control*, ed. Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R. and Huttermann, A., 235-258. CAB International Wallingford.
- Holmer, L., & Stenlid, J. (1993). The importance of inoculum size for the competitive ability of wood decomposing fungi. *FEMS Microbiology ecology*, 12(3), 169-176.
- Holmsgaard, E., Neckelmann, J., Olsen, H.C. & Paludan, F. (1968). *On the dependence of butt rot on soil conditions and silvicultural methods of spruce planting in Jutland heath areas*. Det Forstlige Forsøgsvæsen in Danmark 30: 187–407. (In Danish with English summary).
- Houghton, R. A. (2005). Tropical deforestation as a source of greenhouse gas emissions. *Tropical deforestation and climate change*, 13.
- Hüttermann, A., C. Volger, R. Schorn, G. Ahnert, & H. G. Ganser. (1979). Studies on isoenzyme polymorphism in *Fomes antzozus*. *European Journal of Forest Pathology*. 9: 265-274.
- Ihrmark, K. (2001). *Double-stranded RNA Elements in the Root Rot Fungus Heterobasidion annosum*. Swedish University of Agricultural Sciences, Doctoral Thesis, Uppsala.
- Işık, F., (2001). *Sedirin Doğal Yayılışı*, 43-52 In: Sedir, El Kitabı Dizisi: 6 (ed. Ü. Eler). Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, No: 66, Ankara, sayfa 336.
- İlter, E., Saraçbaşı, A., & Balkız, Ö. D. (2011). *Determination of technological properties of some red pine (Pinus brutia Ten.) origins*. Teknik Bülten-İç Anadolu Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, (291).
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., & Thein, S.L. (1985). Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. *Nature*, 314, 67-73.
- Johansson, M., & Marklund, E. (1980). Antagonists of *Fomes annosus* in the rhizosphere of grey alder (*Alnus incana*) and Norway spruce (*Picea abies*). *European Journal of Forest Pathology*, 10(7), 385-395.

- Johannesson, H., & Stenlid, J. (2004). Molecular Markers Reveal Genetic Isolation and Phylogeography of S And F Intersterility Groups of The Wood-Decay Fungus *Heterobasidion annosum*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, 94-101.
- Johannesson, H., & Stenlid, J. (1999). Molecular identification of wood-inhabiting fungi in an unmanaged *Picea abies* forest in Sweden. *Forest Ecology and Management*, 115(2-3), 203-211.
- Joshi, S.P., Gupta, V.S., Aggarwal, R.K., Ranjekar, P.K., & Brar, D.S. (2000). Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 1311-1320.
- Kallio, T. (1965). Studies on The Biology of Distribution and Possibilities to Control *Fomes annosus* in Southern Finland. *Acta Forestalia Fennica*, 78: 1-21.
- Kallio, T. (1970). Aerial Distribution of The Root-Rot Fungus *Fomes annosus* (Fr.) Cooke in Finland., 107, 1-20.
- Kantarcı, M. D. (1984). Türkiye'nin Batı Akdeniz Bölümündeki kızılçam ağaçlandırmalarında ekolojik değerlendirmeler. *İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi A*, 34(2).
- Kantarcı, M.D. (1990). *Türkiye’de Sedir Ormanlarının Yayılış Alanlarında Ekolojik İlişkiler (Ecological Relationships in The Natural Distribution of Cedar Forests in Turkey)*. In: Proceedings of the International Cedar Symposium, October 22-27, 1990, Antalya, Ormancılık Araş. Ens. Muhtelif Yayınlar, 59, 12-25, Ankara. (in Turkish with English summary and abstract).
- Kantarcı, M.D. (1998). *Hızlı Gelişen Türlerle Yapılan Ağaçlandırma Çalışmalarının Değerlendirilmesi ve Yapılacak Çalışmalar*. Kızılçamın Hızlı Olan Bir Tür Olarak Yetiştirilmesinin Ekolojik Esasları, Orman Bakanlığı Yayın Dairesi Başkanlığı, Yayın No:083, Ankara.
- Karlsson, J. O., & Stenlid, J. (1991). Pectic isozyme profiles of intersterility groups in *Heterobasidion annosum*. *Mycological research*, 95(5), 531-536.
- Karlsson, J. O. (1994). Genetic variation in *Heterobasidion annosum* detected with M13 fingerprinting and ribosomal DNA probes. *Experimental Mycology*, 18(1), 48-56.
- Kasuga, T., Woods, C., Woodward, S., & Mitchelson, K. (1993). *Heterobasidion annosum* 5.8s ribosomal DNA and internal transcribed spacer sequence: rapid identification of European intersterility groups by ribosomal DNA restriction polymorphism. *Current Genetics*, 24(5), 433-436.
- Kaya, A. A., Doğmuş-Lehtijärvi, H., & Lehtijärvi, A. (2015). Mikovirüslerin orman patojenlerine karşı kullanım olanakları. *İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 65(1), 60-71.

- Kayacık, H. (1965). *Orman ve Park Ağaçlarının Özel Sistematiği*. 1. Cilt. Gymnospermae (Açık Tohumlular).
- Kellomäki, S., Karjalainen, T., Mohren, F., & Lapveteläinen, T. (2000). *Expert assessments of the likely impacts of climate change on forests and forestry in Europe*. In EFI proceedings (Vol. 34, pp. 1-120). European Forest Institute (EFI).
- Kenis, M., & Branco, M. (2010). Chapter 5: Impact of alien terrestrial arthropods in Europe. Alien terrestrial arthropods of Europe. *BioRisk*, 4(1), 51-71.
- Kezik, U., & Kocacınar, F. (2015). *Eco-Physiological Functioning of Oak Coppice In Southeast Terrestrial Ecosystems In Turkey*. In Proc. of Ecology and Evolutionary Biology Symposium, Turkey, Ankara.
- Klopfenstein, N. B., Lundquist, J. E., Hanna, J. W., Kim, M. S., & McDonald, G. I. (2009). 1911541. First Report of *Armillaria sinapina*, a Cause of *Armillaria* Root Disease, Associated with a Variety of Forest Tree Hosts on Sites with Diverse Climates in Alaska. *Plant disease*, 93(1), 111.
- Korhonen, K. (1978). Intersterility Groups of *Heterobasidion annosum*. *Communicationes of Instituti Forestalis Fenniae*, 94 (6), 25-25.
- Korhonen, K., Bobko, I., Hanso, S., Piri, T., & Vasiliasauskas, A. (1992). Intersterility groups of *Heterobasidion annosum* in some spruce and pine stands in Byelorussia, Lithuania and Estonia. *European Journal of Forest Pathology*, 22(6-7), 384-391.
- Korhonen, K., Lipponen, K., Bendz, M., Johansson, M., Ryen, I., Venn, K., Seiskari, P., & Niemi, M. (1994). *Control of Heterobasidion annosum by Stump Treatment with 'ROTSTOP', a New Commercial Formulation of Phlebiopsis gigantea*. In: Johansson, M. and Stenlid, J. (Eds), Proceeding of the Eight IUFRO Conference on Root and Butt Rots. Sweden /Finland August 1993. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, pages: 675-685.
- Korhonen, K., & Piri, T. (1994). *The Main Hosts and Distribution of the S and P groups of Heterobasidion annosum in Finland*. In: Johansson, M. and Stenlid, J. (Eds), Proceeding of the Eight IUFRO Conference on Root and Butt Rots. Sweden /Finland August 1993. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, pages: 260-267.
- Korhonen, K., & Stenlid J. (1998a). *Biology of Heterobasidion annosum*. In: Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., Hüttermann, A. (Eds), *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control*, CAB Internatinal, Wallingford, UK, pages: 43-70.
- Korhonen, K., Capretti, P., Karjalainen, R., & Stenlid, J. (1998b). *Distribution of Heterobasidion annosum Intersterility Groups in Europe*. In: *Heterobasidion annosum. Biology, Ecology, Impact and Control*. Ed by Woodward, S., Stenlid,

- J., Huttermann, A., Karjalainen, R. Oxon, New York: CAB International, 93-104.
- Korpilahti, E. & Kuuluvainen, T. (eds.) (2002). *Disturbance dynamics in boreal forests: defining the ecological basis of restoration and management of biodiversity*. Silva Fennica 36: 1-447.
- Kotlaba, F. (1976). Contribution to The Knowledge of The Turkish Macromycetes. *Ceska' Mykol.* 30, 156-169.
- Kuhlmann, E. G. (1969). Survival of *Fomes annosus* Spores in Soil. *Phytopathology*, 59: 198-201.
- Kuhlmann, E. G. (1970). Seedling Inoculations with *Fomes Annosus* Show Variation in Virulence and in Host Susceptibility. *Phytopathology*, 60, 1743-1746.
- Kurkela, T. (2002). Crown condition as an indicator of the incidence of root rot caused by *Heterobasidion annosum* in Scots pine stands. *Silva Fennica*, 36: 451–457.
- Laine, L. (1976). The occurrence of *Heterobasidion annosum* (Fr.) Cke in woody plants in Finland. *Communicationes Instituti Forestalis Fenniae*, 90 (3), 1-52.
- Łakomy, P. (1996). F Group of *Heterobasidion annosum* Found in Poland. *European Journal of Forest Pathology*, 26 (4), 217-222.
- Łakomy, P., Broda, Z., & Werner, A. (2007). Genetic diversity of *Heterobasidion* spp. in Scots pine, Norway spruce and European silver fir stands. *Acta Mycologica*, 42(2), 203-210.
- Łakomy, P. & Cieślak, R. (2008). Early Infection of *Fagus sylvatica* by *Heterobasidion annosum* s. s. *Forest Pathology*, 38: 314–319.
- Łakomy, P., Kwaśna, H., & Dalke-Świdorska, M. (2011). The virulence of *Heterobasidion parviporum* population from Norway spruce stand in Suwałki Forest District. *Infection*, 13(2), 0.
- La Porta, N., Apostolov, K., & Korhonen, K. (1998). Intersterility Groups of *Heterobasidion annosum* and Their Host Specificity in Bulgaria. *European Journal of Forest Pathology*, 28 (1): 1-9.
- Lavi, U., Cregan, P., Scchap, T. & Millel, J., (1994). *Amplification and breeding of perennial fruit crops*. In: Janick, J. (ed) Plant Breeding Reviews. John Wiley Sons, Inc: NY Vol: 397-401.
- Lehtijärvi, A., Doğmuş Lehtijärvi, H. T., & Aday, A. G. (2007). *Heterobasidion annosum – complex in Turkey*. In: Proc. Int. Conf. Foliage, Shoot and Stem Diseases of Forest Trees, 21–26 May 2007. Ed. by Szabo', I. Sopron: Hungary, Acta Silv. Lign. Hung. Special Edition, 215–218.

- Lehtijärvi, A., Doğmuş Lehtijärvi, H.T., Aday, A.G., & Oskay, F. (2009a). *Abies cilicica* Ant. & Kotschy Meşcerelerinde *Heterobasidion abietinum* Niemelä & Korhonen'un Kimyasal ve Biyolojik Kontrolü. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi, Sayfa: 338, 15-18 Temmuz 2009, Van.
- Lehtijärvi, A., Doğmuş Lehtijärvi, H. T., & Aday, A. G. (2009b). Turkish *Heterobasidion abietinum* is pathogenic to inoculated *Abies nordmanniana* ssp. *nordmanniana* and ssp. *bornmülleriana*. *Forest Pathology*, 39, 200–209.
- Lehtijärvi, A., Aday, A. G., & Doğmuş Lehtijärvi, H. T. (2011a). *Cedrus libani*: The Most Susceptible Turkish Conifer Species to Local *Heterobasidion* Isolates in Spring Inoculations. *Forest Pathology*, 41, 1–6.
- Lehtijärvi, A., Doğmuş Lehtijärvi, H. T., Aday, A. G., & Oskay, F. (2011b). The efficacy of selected biological and chemical control agents against *Heterobasidion abietinum* on *Abies cilicica*. *Forest Pathology*, 41(6), 470-476.
- Lindberg, M., & Johansson, M. (1992). Resistance of *Picea abies* seedlings to infection by *Heterobasidion annosum* in relation to drought stress. *European journal of forest pathology*, 22(2), 115-124.
- Linden, M., & Vollbrecht, G. (2002) Sensitivity of *Picea abies* to butt rot in pure stands and in mixed stands with *Pinus sylvestris* in southern Sweden. *Silva Fennica* 36: 767–778.
- Linzer, R. E., Otrosina, W. J., Gonthier, P., Bruhn, J., Laflamme, G., Bussieres, G., & Garbelotto, M. (2008). Inferences on the phylogeography of the fungal pathogen *Heterobasidion annosum*, including evidence of interspecific horizontal genetic transfer and of human-mediated, long-range dispersal. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46(3), 844-862.
- Litt, M. & Luty, J. A., (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle action gene. *American Journal of Human Genetics*, 44; 397-401.
- Lygis, V., Vasiliauskas, R., & Stenlid, J. (2004a) Planting *Betula pendula* on pine sites infested by *Heterobasidion annosum*: disease transfer, silvicultural evaluation, and community of wood-inhabiting fungi. *Canadian Journal of Forest Research* 34: 120–130.
- Lygis, V., Vasiliauskas, R., Stenlid, J., & Vasiliauskas, A. (2004b) Silvicultural and pathological evaluation of Scots pine afforestations mixed with deciduous trees to reduce the infections by *Heterobasidion annosum* s.s. *Forest Ecology and Management* 201: 275–285.
- Lohwag, K. (1957). Ein Beitrag zur Pilzflora der Trkei. *Istanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, Ser. A 7, 118–128.
- Lowe, A.J., Hinotte, O. & Guarino, L. (1996). Standardization of Molecular Genetic Techniques for The Characterization of Germplasm Collections: The Caase of

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resources Newsletter*, 107,50-54.

Luchi, N., Paffetti, D., Korhonen, K., Hantula, J., & Capretti, P. (2011). Genetic variation of *Heterobasidion abietinum* in Southern Europe and the Mediterranean Basin. *Forest Pathology*, 41(4), 270-280.

McDonald, B. A. (1997). The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology*, 87(4), 448-453.

Meredith, D.S. (1959). The Infection of Pine Stumps by *Fomes annosus* and Other Fungi. *Annals of Botany*, N. S. 23: 455-476.

Mert, A., Şentürk, Ö., Güney, C. O., Akdemir, D. & Özkan, K. (2013). *Mapping of some distal variables available for mapping habitat suitabilities of the species: A case study of Buldan district*. GeoMed 2013 The 3rd International Geography Symposium, 10-13 June 2013, Kemer, Antalya. pp 210.

Meyer, W., Koch, A., Niemann, C., Beyermann, B., Epplen, J. T., & Börner, T. (1991). Differentiation of species and strains among filamentous fungi by DNA fingerprinting. *Current genetics*, 19(3), 239-242.

Meyer W., Michell T.G., Freedman E.Z. & Vilgalys R. (1993) Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in polymerase chain reaction to distinguish strain of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Biol* 31: 2274–2280.

Meyer, W., Lieckfeldt, E., Kayser, T., Nürnberg, P., Epplen, J. T., & Börner, T. (1992). Fingerprinting fungal genomes with phage M13 DNA and oligonucleotide probes specific for simple repetitive DNA sequences. *Adv. Mol. Gen.*, 5, 241-253.

Miller, J. C., & Tanksley, S. D. (1990). RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and applied genetics*, 80(4), 437-448.

Morrison, D. J., Thomson A. J., Chu D., Peet F. G., Sahota T. S., & Rink U. (1984). *Characterization of Armillaria intersterility groups by isozyme patterns*. In Proceedings of the sixth international conference on root and butt rots of forest trees. Edited by G. A. Kile. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Melbourne. 2- 11.

Möykkynen, T., (1997). Liberation of *Heterobasidion annosum* conidia by airflow. *European Journal of Forest Pathology* 27: 283- 289.

Möykkynen, T., Von, Weissenberg, K., & Pappinen, A. (1997). Estimation of Dispersal Gradients of S- and P-type Basidiospores of *Heterobasidion annosum*. *European Journal of Forest Pathology*, 27, 291-300.

- Möykkynen, T., Miina, J., Pukkala, T., & Von Weissenberg, K., (1998). Modelling The Spread of Butt Rot in a *Picea abies* Stand in Finland to Evaluate The Profitability of Stump Protection Against *Heterobasidion annosum*. *Forest Ecology and Management*, 106: 247- 257.
- Möykkynen, T., Miina, J., & Pukkala, T. (2000). Optimizing The Management of a *Picea abies* Stand Under Risk of Butt Rot. *European Journal of Forest Pathology*, 30: 65- 76.
- Möykkynen, T., & Miina, J. (2002). Optimizing the management of a butt-rotted *Picea abies* stand infected by *Heterobasidion annosum* from the previous rotation. *Scandinavian journal of forest research*, 17(1), 47-52.
- Mugnai, L., & Capretti, P. (1989). Gruppi intersterilli di *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.: alcune differenze morfologiche dei carpofori. *Micologia Italiana*, 18(3), 87-94.
- Müller, M. M., Kantola, R., Korhonen, K., & Uotila, J. (1995). Combined fatty acid and sterol profiles of *Heterobasidion annosum* intersterility groups S, P and F. *Mycological Research*, 99(9), 1025-1033.
- Niemelä, T., & Korhonen, K., (1998). *Taxonomy of The Genus Heterobasidion annosum*. In: *Heterobasidion annosum. Biology, Ecology, Impact and Control*. Ed by Woodward, S., Stenlid, J., Huttermann, A., Karjalainen, R. Oxon, New York: CAB International, 27-33.
- Ng, W. L., & Tan, S. G. (2015). Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right. *ASM Science Journal*, 9(1), 30-39.
- Lam, H. M., Coschigano, K. T., Oliveira, I. C., Melo-Oliveira, R., & Coruzzi, G. M. (1996). The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 569-593.
- Olson, A., Lind, M., & Stenlid J. (2005). In Vitro Test of Virulence in The Progeny of a *Heterobasidion* Interspecific Cross. *Forest Pathology*, 35 (5), 321- 331.
- OGM, (1982). Yıllık Bülten, No: 18-1, İzmit. Erişim Tarihi: 15.09.2014. <http://web.ogm.gov.tr/birimler/arastirma/kavakcilik/>
- OGM, (2013). Orman Atlası, Ankara. Erişim Tarihi: 15.09.2014. http://web.ogm.gov.tr/Resimler/sanalkutuphane/orman_atlasi.pdf
- OGM, (2014). Türkiye'nin Orman Varlığı, Ankara. Erişim Tarihi: 15.09.2014. <http://www.ogm.gov.tr/ekutuphane/Yayinlar/T%C3%BCrkiye%20Orman%20Varl%C4%B1%C4%9F%C4%B1.pdf>
- Old, K. M., G. F. Moran, & Bell, J. C. (1984). Isozyme variability among isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Australia and Papua New Guinea. *Canadian Journal of Botany*, 62: 2016-2022.

- Olson, A., Lind, M., & Stenlid J. (2005). In Vitro Test of Virulence in The Progeny of a *Heterobasidion* Interspecific Cross. *Forest Pathology*, 35 (5), 321- 331.
- Oskay, F. (2014). *Dedegöl Dağı (Isparta) karaçam gençliklerinde zarara neden olan kar fungusları* (Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Oskay, F., Lehtijärvi, A., Doğmuş-Lehtijärvi, H. T., & Aday Kaya, A. G. (2014). *Değişen dünya'da orman patojenleri; yabancı istilacı türler ve ülkemiz ormancılığı üzerindeki tehditler*. Türkiye II. Orman Entomolojisi ve Patolojisi Sempozyumu, Antalya, 475-479.
- Otrosina, W.J., & Garbelotto, M., (2010). *Heterobasidion occidentale* sp. nov. and *Heterobasidion irregulare* nom. nov. : A Dispositions of North American *Heterobasidion* biological species. *Fungal Biology*, 16-25.
- Özdemir, T. (1977). Antalya Bölgesinde Kızılçam Ormanlarının Tabii Gençleştirme Olanakları Üzerinde Araştırmalar. *İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi* Seri A-27 (2), 312-363.
- Özkan, K. & Mert, A. (2010). *Isparta Yukarı Gökdere yöresinde kasknak meşe'sinin senaryolarına göre 2050 ve 2080 yıllarında muhtemel potansiyel yayılış alanlarının coğrafi modellenmesi*. Çölleşme ile Mücadele Sempozyumu, 17- 18 Haziran 2010, Çorum.
- Peakall & Smouse P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update, *Bioinformatics*, 28 (19, (2537).
- Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295.
- Petta, M., Capretti, P., Tegli, S., & Maresi, G. (2001). Variations among Italian isolates of the *Heterobasidion annosum* P Group detected using the M13 minisatellite. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(1), 55-60.
- Phillips, S. J., Anderson, R. P., & Schapire, R. E. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190 (3), 231- 259.
- Pilat A. (1932). Contribution à l'étude des Hyménomycètes de L'Asie Mineure. *Bulletin trimestriel de la Société mycologique de France*. 48: 162-189.
- Piri, T. (1996). The spreading of the S type of *Heterobasidion annosum* from Norway spruce stumps to the subsequent tree stand. *European journal of forest pathology*, 26(4), 193-204.
- Piri, T., Korhonen, K., & Sairanen, A., (1990). Occurrence of *Heterobasidion annosum* in Pure and Mixed Spruce Stands in Southern Finland. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 5, 113-125.

- Prieto-Recio, C., Martín-García, J., & Diez, J. J., (2014). Pathogenicity of Spanish Isolates of *Heterobasidion annosum* s. s. in *Pinus pinaster* Seedlings. *Forest Pathology*, 44: 163–165. doi: 10.1111/efp.12091.
- Porta, N. L., Capretti, P., Kammiovirta, K., Korhonen, K., & Karjalainen, R. (1994). *Genetic variation in F-group isolates of Heterobasidion annosum occurring in Italy*. In 8. International Conference on Root and Butt Rots, Uppsala (Sweden), 9-16 Aug 1993. Sveriges Lantbruksuniv.
- Pratt, J.E., Johansson, M. and Hüttermann, A. (1998). *Chemical control of Heterobasidion annosum*. In: Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., Hüttermann, A. (Eds.), *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 259–282.
- Powell, W., G.C. Machray & J. Provan, (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Science*, 1: 215-222.
- Pritchard, N. M., Anderson, A. J. B. (1971). Observation on The Use of Cluster Analysis in Botany with An Ecological Example, *The Journal of Ecology*, 59, (3): 727-747.
- Puddu, A., Luisi, N., Capretti, P., & Santini, A. (2003). Environmental factors related to damage by *Heterobasidion abietinum* in *Abies alba* forests in Southern Italy. *Forest ecology and management*, 180(1-3), 37-44.
- Rafalski, A., Morgante, M., Powell, W., Vogel, J.M. and Tingey, S.V., (1996). *Generating and Using DNA Markers in Plants*. In: Birren B., Lai E. (Eds.): *Analysis of Non-Mammalian Genomes - A Practical Guide*. Academic Pres., New York.
- Ranta, H., & Saloniemi, I. (2005). Distribution of fungal foliage and shoot pathogens in a natural Scots pine population in relation to environmental variables. *Canadian journal of forest research*, 35(3), 503-510.
- Redfern D. B, Pratt JE, Hendry SJ, & Low JD. (2010). Development of a policy and strategy for controlling infection by *Heterobasidion annosum* in British forests: a review of supporting research. *Forestry* 83:207–18.
- Redfern, D. B., Gregory, S.C., & Mac Askill, G.A., (1997). Inoculum Concentration and the Colonization of *Picea sitchensis* Stumps by Basidiospores of *Heterobasidion annosum*. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 12, 41-49.
- Redfern D.B. & Stenlid, J. (1998). *Spore dispersal and infection*. In: Woodward S, Stenlid J, Karjalainen R, Hüttermann A (eds) *Heterobasidion annosum, biology, ecology, impact and control*. CAB International, Wallingford, pp 105–124.

- Reddy, M.P., Sarla, N. & Siddiq, A., (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding *Euphytica* 128: 9–17.
- Rishbeth, J. (1950). Observations on The Biology of *Fomes annosus*, with Particular Reference to East Anglian Pine Plantations. I. The Outbreaks of Disease and Ecological Status of The Fungus. *Annals of Botany*, 14: 365–383.
- Rishbeth, J., 1951. Observations on the biology of *Fomes annosus* with particular reference to East Anglian pine plantations. II. Spore production, stump infection, and saprophytic activity in stumps. *Annals of botany* 15, 1–21.
- Rishbeth, J., 1957. Some further observations on *Fomes annosus* Fr. *Forestry* 30: 69–89.
- Rogstad, S. H., Patton, J. C., & Schaal, B. A. (1988). M13 repeat probe detects DNA minisatellite-like sequences in gymnosperms and angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(23), 9176-9178.
- Röder, M.S., Plaschke, P., König, S.U., Börner, A., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D. and Ganal, M.W., (1995). Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular Genetics* 246: 327-333.
- Rönnberg, J., Sidorov, E., & Petrylaite, E., (2006a). Efficacy of Different Concentrations of Rotstop and Rotstop S and Imperfect Coverage of Rotstop S Against *Heterobasidion* spp. Spore Infections on Norway Spruce Stumps. *Forest Pathology*, 36: 422-433
- Rönnberg, J., Petrylaite, E., Nilsson, G., & Pratt, J. (2006b). Two studies to assess the risk to *Pinus sylvestris* from *Heterobasidion* spp. in southern Sweden. *Scandinavian journal of forest research*, 21(5), 405-413.
- Rykowski, K., & Sierota, Z. (1984). Aspekt ekonomiczny wystepowania huby korzeni w drzewostanach sosnowych na gruntach porolnych. *Sylvan*.
- Saatcioglu, F. (1969). *Silvikultur I (Silvikulturun Biyolojik Esaslari ve Prensipleri)*. İstanbul Universitesi, Orman Fakultesi Yayinlari. 1U Yayin No. 1429, OF.
- Sánchez, M. E., Luchi, N., Jiménez, J. J., De Vita, P., Sánchez, J. E., Trapero, A., & Capretti, P. (2007). An isolated population of *Heterobasidion abietinum* on *Abies pinsapo* in Spain. *Forest Pathology*, 37(5), 348-356.
- Schlotterer, C. (2004). The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5, 63-69.
- Schönhar, S. (1995). Untersuchungen über die Infektion der Fichte (*Picea abies* Karst.) durch *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *Allgemeine Forst-und Jagdzeitung*, 166, 14-17.

- Scire`, M.; D_Amico, L.; Motta, E., & Annesi, T. (2008). North American P type of *Heterobasidion annosum* Shows Pathogenicity Towards *Pinus halepensis* in Italy. *Forest Pathology*, 38, 299–301.
- Selik, M. (1963). *Kızılçamın Botanik Özellikleri Üzerinde Araştırmalar ve Bunların Halepçanı Vasıfları ile Mukayesesi*. Orman Genel Müdürlüğü Yayınları, (353), 88.
- Selik, M. (1972). Türkiye de yerli ve yabancı türlerle yapılan ağaçlandırmalarda görülen hastalıklar. *Orman Fakültesi Dergisi*, İstanbul, 22(2), 73-79.
- Selik, M. (1986). *Ormancılık Fitopatolojisi*. Düzce Üniversitesi Orman Fakültesi Yayınları, 3400: 224.
- Slaughter, G. W., & Parmeter Jr, J. R. (1995). Enlargement of tree-mortality centers surrounding pine stumps infected by *Heterobasidion annosum* in northeastern California. *Canadian journal of forest research*, 25(2), 244-252.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *The Journal of Molecular Biology*, 98(3), 503-517.
- Stenlid, J. (1985). Population structure of *Heterobasidion annosum* as determined by somatic incompatibility, sexual incompatibility, and isoenzyme patterns. *Canadian journal of botany*, 63(12), 2268-2273.
- Stenlid, J., (1994). *Homokaryotic Heterobasidion annosum mycelia in stumps of Norway spruce*. In: Johansson, M. and Stenlid, J. (Eds), *Proceeding of the Eight IUFRO Conference on Root and Butt Rots*. Sweden /Finland August 1993. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, pp. 249-253.
- Stenlid, J., (1994b). *Regional differentiation in Heterobasidion annosum*. In: Johansson, M. and Stenlid, J. (Eds), *Proceeding of the Eight IUFRO Conference on Root and Butt Rots*. Sweden /Finland August 1993. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, pp. 243-248.
- Stenlid, J., Karlsson, J. O., & Högborg, N. (1994). Intraspecific genetic variation in *Heterobasidion annosum* revealed by amplification of minisatellite DNA. *Mycological Research*, 98(1), 57-63.
- Stenlid, J., & Wästerlund, I. (1986). Estimating The Frequency of Stem Rot in *Picea abies* Using an Increment Borer. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 1, 303-308.
- Stenlid, J., & Swedjemark, G. (1988). Differential Growth of S and P-Isolates of *Heterobasidion annosum* in *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. *Transactions of British Mycological Society*, 90 (2) (209–213).
- Stenlid, J., & Karlsson, J. O. (1991). Partial intersterility in *Heterobasidion annosum*. *Mycological Research*, 95(10), 1153-1159.

- Süel, H. (2014). Isparta-Sütçüler yöresinde av türlerinin habitat uygunluk modellemesi. Yayınlanmamış Doktora Tezi. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi., Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Swedjemark, G. & Stenlid, J. (1993). Population dynamics of the root rot fungus *Heterobasidion annosum* following thinning of *Picea abies*. *Oikos* 66: 247-254.
- Swedjemark, G., & Stenlid, J. (1994). *Variation Among Norway Spruce Clones and Heterobasidion annosum Isolates In Greenhouse Inoculation*. In: Johansson, M. and Stenlid, J.(eds), Proceedings of The Eighth IUFRO Conference on Root and Butt Rots. Sweden/Finland. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala Sweden, 10-16.
- Swedjemark, G., & Stenlid, J. (1995). Susceptibility of Conifer and Broadleaf Seedlings to Swedish S and P Strains of *Heterobasidion annosum*. *Plant Pathology*, 44 (1), 73-79.
- Swedjemark, G., & Stenlid, J. (1996). Variation in Spread of *Heterobasidion annosum* in Clones of *Picea abies* Grown at Different Vegetation Phases. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 11, 137-144.
- Swedjemark, G., & Stenlid, J. (1997). Between-Tree and Between-Isolate Variation for Growth of S-Group *Heterobasidion annosum* in Sapwood of *Picea abies* Cuttings. *Canadian Journal of Forest Research*, 27 (5), 711-715.
- Swedjemark, G., Johannesson, H., & Stenlid, J. (1999). Intraspecific Variation in *Heterobasidion annosum* for Growth In Sapwood of *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. *European Journal of Forest Pathology*, 29 (4), 249-258.
- Swedjemark, G., Stenlid, J., & Karlsson, B. (2001). Variation in growth of *Heterobasidion annosum* Among Clones of *Picea abies* Incubated for Different Periods of Time. *Forest Pathology*, 31 (3), 163-175.
- Swedjemark, G., & Karlsson, B. (2004). Genotypic Variation in Susceptibility Following Artificial *Heterobasidion annosum* Inoculation of *Picea abies* Clones in a 17- year-old Field Test. *Scandinavian Journal of Forest Research* (19 (2), 103-111.
- Swedjemark, G., & Karlsson, B. (2006). Mycelial Growth and Exclusion of *Heterobasidion parviporum* Inoculated in Branches of 15-year-old *Picea abies* Clones. *Forest Pathology*, 36 (3) (209-241.
- Syrjänen, K., Kalliola, R., Puolasmaa, A., & Mattson, J. (1994). Landscape structure and forest dynamics in subcontinental Russian European taiga. *Ann. Zool. Fenn.*, 31, 19–34.
- Szedlak, T. (1996). *Inf/uence Of Environmental Factors On Forest Management And Planning Practice*. P. 12.

- Şimsek, Y., & Tulumcu, M. (1982). 'Studies on Tree Growth and Wood Quality of *P. radiata* D. Don Provenances in Marmara and Black Sea Region'. Poplar Research Institute, *Annual Bulletin*:18, 1-82, Izmit, Turkey.
- Thor, M. (2001). *Stump treatment against root rot European survey*. Forestry Research Institute of Sweden, Resultat,15.
- Thor, M. (2005). *Heterobasidion* root rot in Norway spruce. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 20:154–164.
- Thor, M, Stahl G, & Stenlid J. (2005). Modelling root rot incidence in Sweden using tree, site and stand variables. *Scandinavian Journal of Forest Research* 20:165–76 140.
- Tokuda S, Ota Y, Hattori T, Shoda-Kagaya E, & Sotome K. (2011). The distribution of closely related large genets of *Heterobasidion parviporum* in a Todo fir (*Abies sachalinensis*) stand in Hokkaido, Japan. *Forest Pathology*. 41:482–92.
- Tsopelas, P. & Korhonen, K. (1996). Hosts and Distribution of The Intersterility Groups of *Heterobasidion annosum* in The Highlands of Greece. *European Journal of Forest Pathology*, 26 (1): 4-11.
- Tuomisto, H., Ruokolainen, K., Kalliola, R., Linna, A., Danjoy, W., & Rodriguez, Z. (1995). Dissecting amazonian biodiversity. *Science*, 269(5220), 63-66.
- UNCCD. (1995). *The United Nations convention to combat desertification in those countries experiencing serious drought and/or desertification, particularly in Africa*, Text with Annexes, United Nations Environment Programme (UNEP), Geneva.
- Wang, G., Mahalingan, R. & Knap, H.T. (1998). (C-A) and (GA) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 1086–1096.
- Weising K, Nybom H, Wolff K & Mayer W. 1995. *DNA fingerprinting in plants and fungi*. CRC Press, Boca Raton.
- Welsh, J., & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*, 18(24), 7213-7218.
- Werner, A., & Lacombe, P. (2002). Intraspecific Variation in *Heterobasidion annosum* for Mortality Rate on *Pinus sylvestris* and *Picea abies* Seedlings Grown in Pure Culture. *Mycologia*, 94(5), 856-61.
- Westlund, A., & Nohrstedt, H. Ö. (2000). Effects of stump-treatment substances for root-rot control on ground vegetation and soil properties in a *Picea abies* forest in Sweden. *Scandinavian journal of forest research*, 15(5), 550-560.
- White, W. B. & Culver, D. C. (Eds.). (2011). *Encyclopedia of caves*. Academic Press.

- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V., (1990). DNA Polimorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucl. Acids Res.*, 18, 6531-6535.
- Williams, A. P., Allen, C. D., Millar, C. I., Swetnam, T. W., Michaelsen, J., Still, C. J., & Leavitt, S. W. (2010). Forest responses to increasing aridity and warmth in the southwestern United States. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50), 21289-21294.
- Wisz, M. S., Hijmans, R. J., Li, J., Peterson, A. T., Graham, C. H. & Guisan, A. (2008). Effects of sample size on the performance of species distribution models. *Diversity and Distributions* (14), 763-773.
- Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., & Huttermann, A. (1998). *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control*. Wallingford, New York: CAB International.
- Vainio, E. J., & Hantula, J. (1999). Variation of RAMS markers within the intersterility groups of *Heterobasidion annosum* in Europe. *European Journal of Forest Pathology*, 29(3), 231-246.
- Vainio, E. J., Hyder, R., Aday, G., Hansen, E., Piri, T., Doğmuş-Lehtijärvi, T., Lehtijärvi, A., Korhonen, K., & Hantula, J. (2012). Population Structure of A Novel Putative Mycovirus Infecting The Conifer Root-Rot Fungus *Heterobasidion annosum* sensu lato. *Virology* 422(2) :366-76.
- Vainio, E. J., Korhonen, K., & Hantula, J. (1998). Genetic variation in *Phlebiopsis gigantea* as detected with random amplified microsatellite (RAMS) markers. *Mycological Research*, 102(2), 187-192.
- Vasiliauskas, A. (2001). Root rot caused by *Heterobasidion annosum* in *Pinus sylvestris* plantations on former agricultural land: distribution of the disease, control measures and evaluation of their effectiveness. *Miskinkyste*, 2 (50), 42-59.
- Vassart, G., Georges, M., Monsieur, R., Brocas, H., Lequarre, A. S., & Christophe, D. (1987). A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science*, 235(4789), 683-684.
- Vollbrecht, G., & Jørgensen, B. B. (1995). Modelling the incidence of butt rot in plantations of *Picea abies* in Denmark. *Canadian journal of forest research*, 25(12), 1887-1896.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijmans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Peleman, J., Kuper, M. & Zabeau, M., (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Research*, 23; 4407-4414.
- Yaltırık, F., & Efe, A. (2000). Dendroloji (*Gymnospermae-Angiospermae*). *İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayın*, (431).

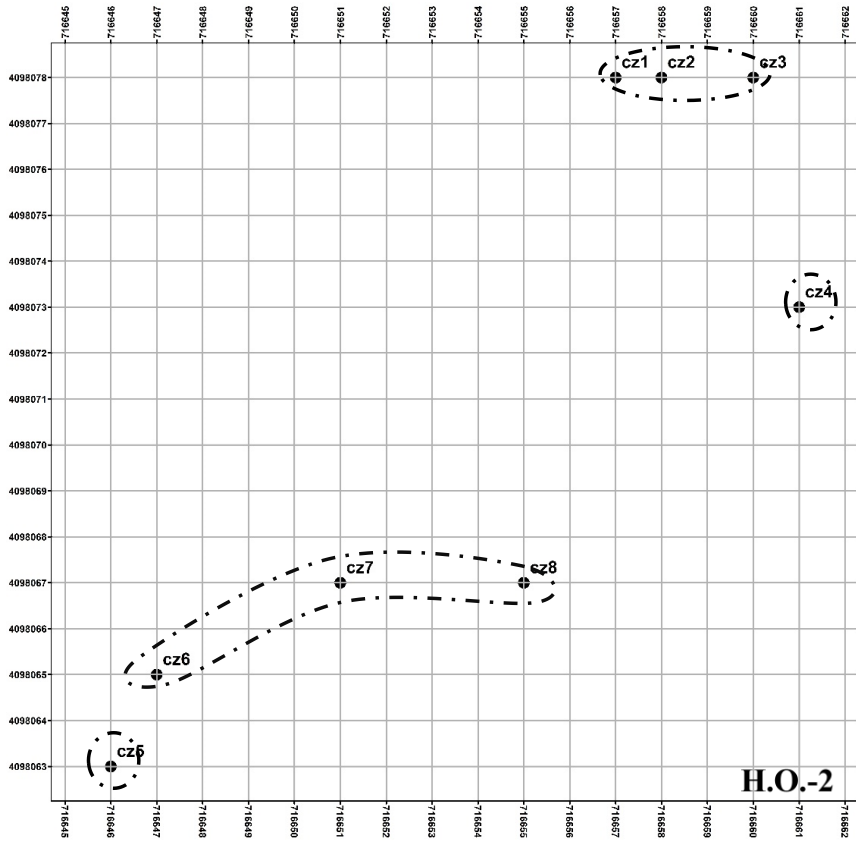
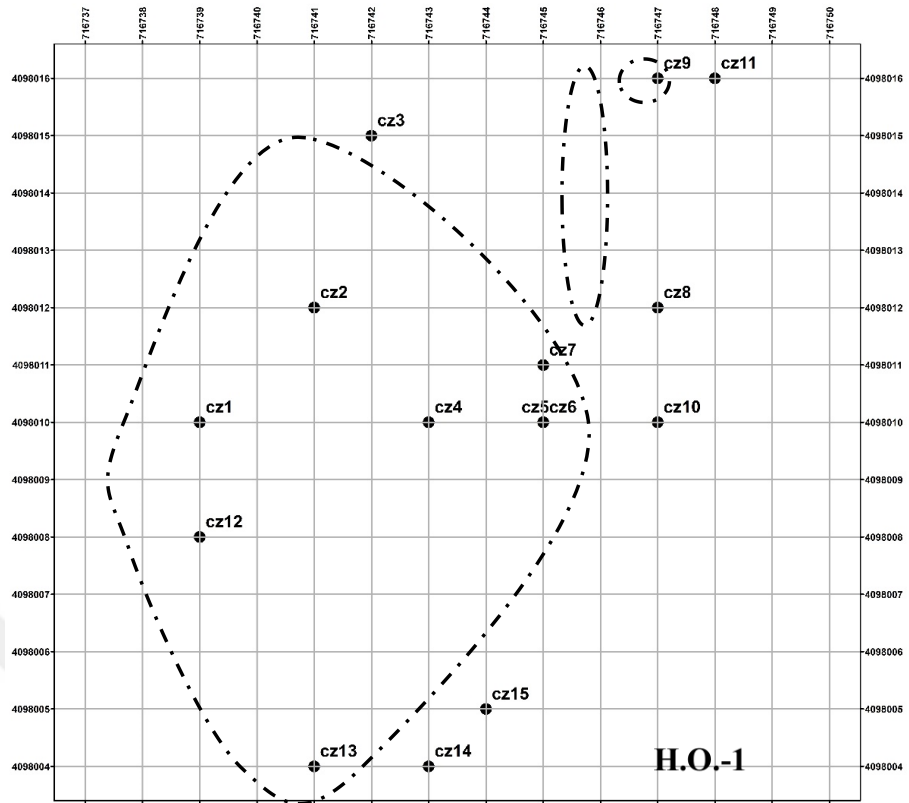
- Yde-Andersen, A. (1962). Seasonal incidence of stump infection in Norway spruce by air-borne *Fomes annosus* spores. *Forestry Science*, 8,98–103.
- Yorgancılar, M., Yakışır, E., & Erkoyuncu, M. T. (2015). Moleküler markörlerin bitki ıslahında kullanımı. *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi*, 4(2), 1-12.
- Zabeau, M. & Vos, P. (1993). *Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting*. European Patent Application, 92402629 (7), Office européen des brevets, Paris.
- Zamponi, L., Paffetti, D., Tegli, S., Łakomy, P., & Capretti, P. (2007). Genetic variation in *Heterobasidion abietinum* populations detected with the M13 minisatellite marker. *Forest Pathology*, 37(5), 321-328.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, J.A. & Labuda, D., (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.0

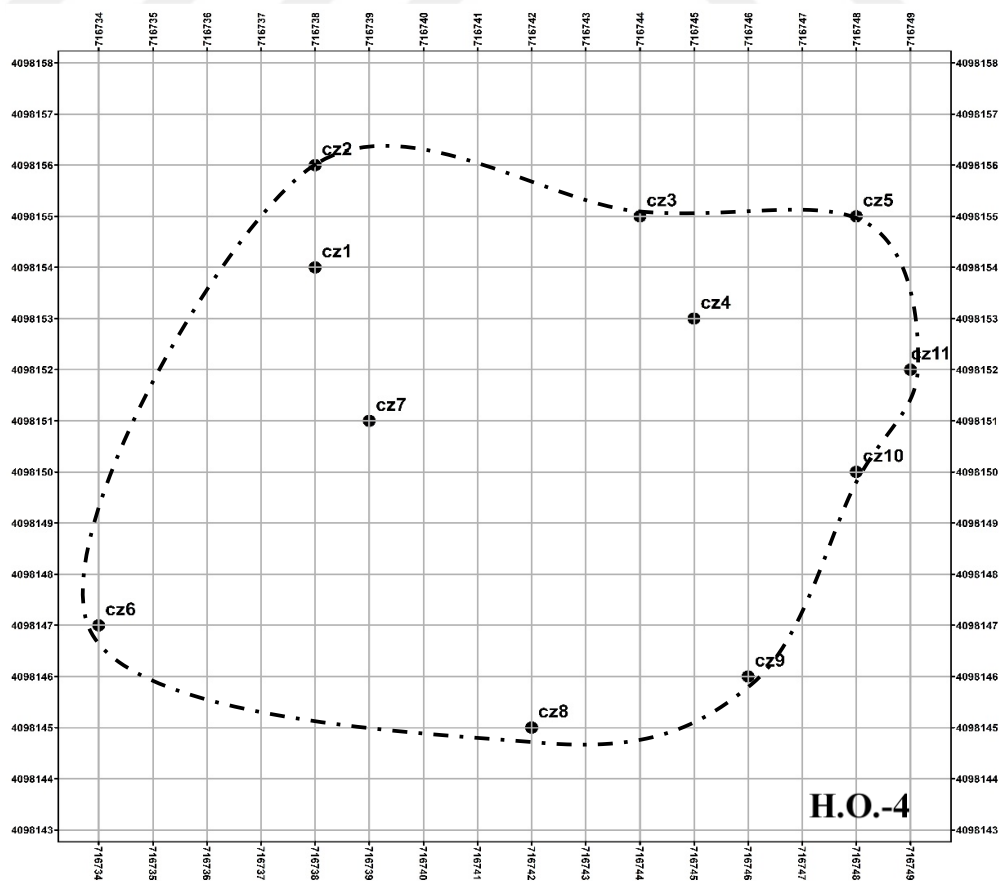
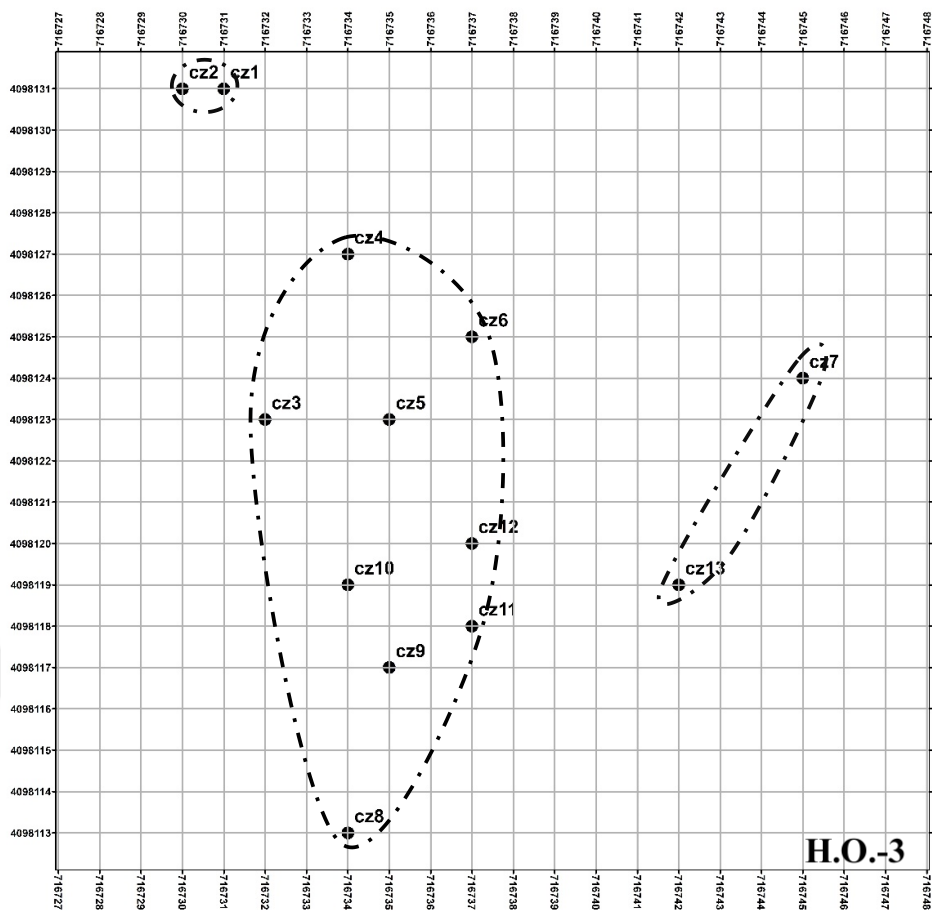
EKLER

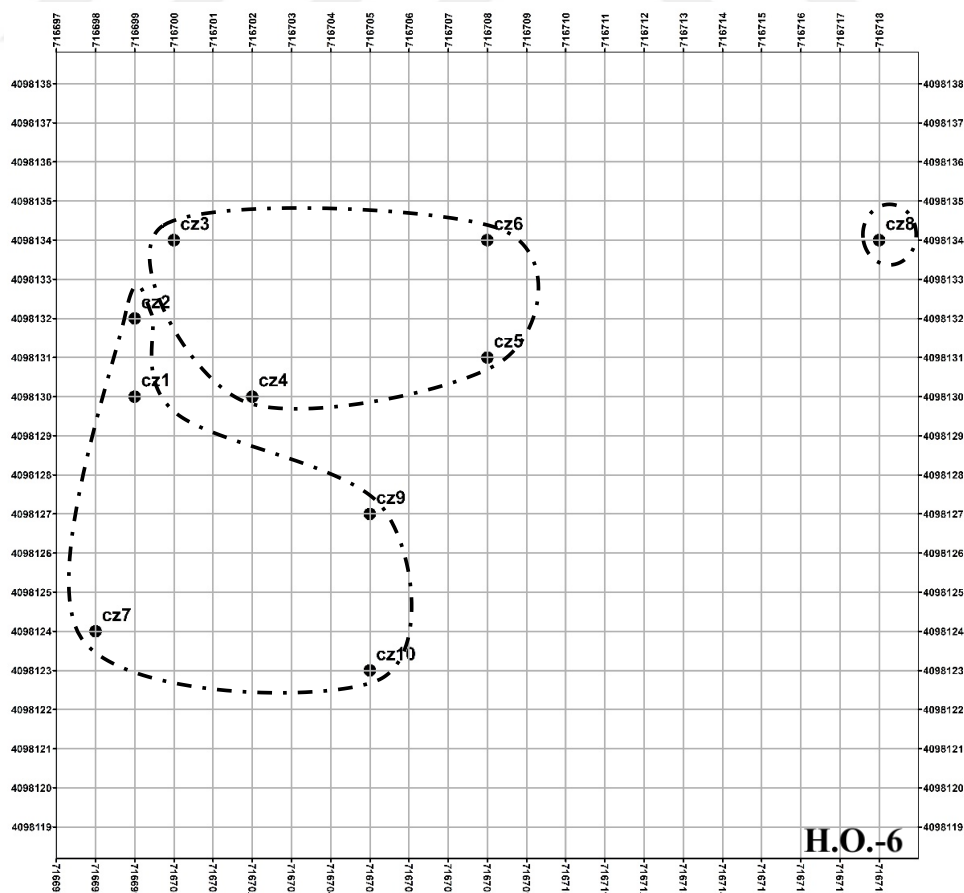
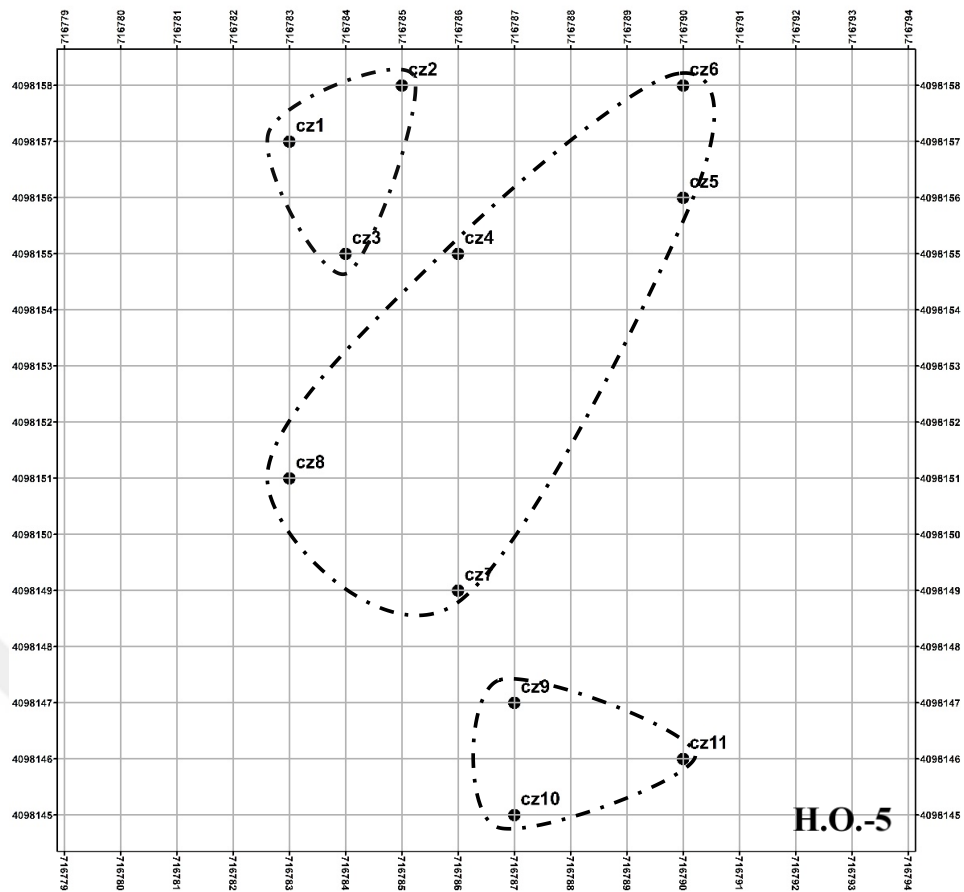
EK A. Genet Haritaları

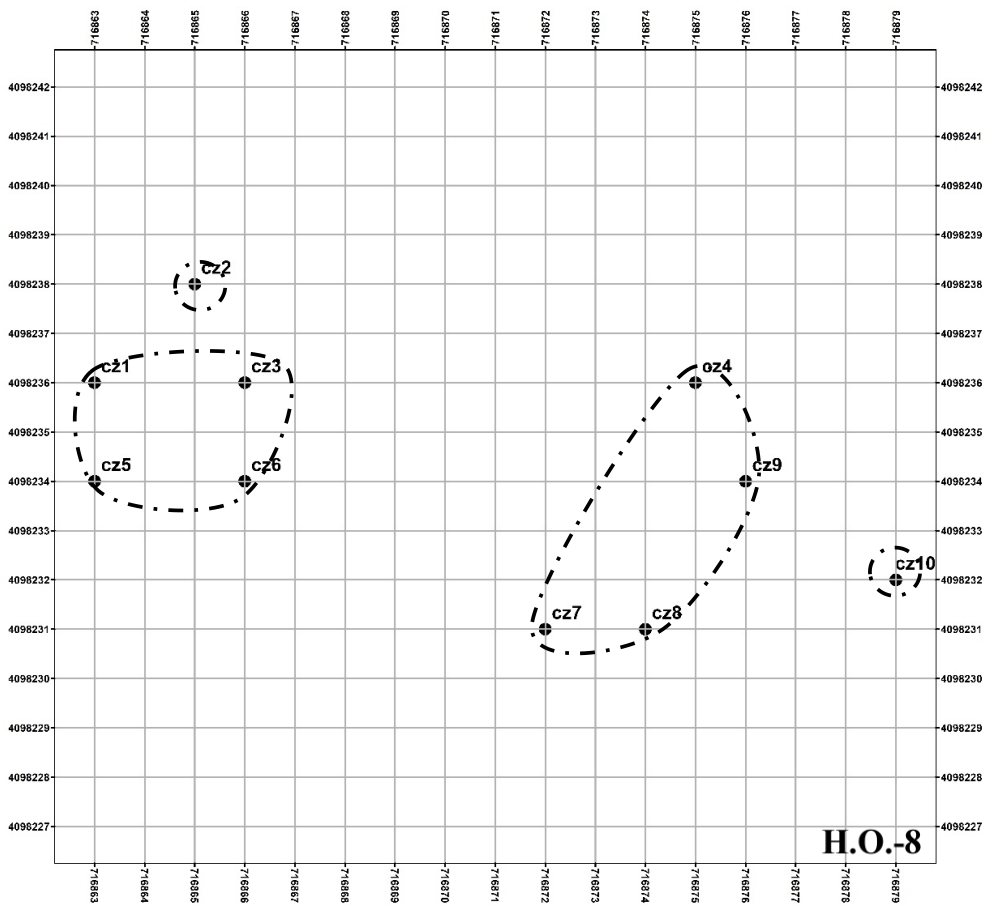
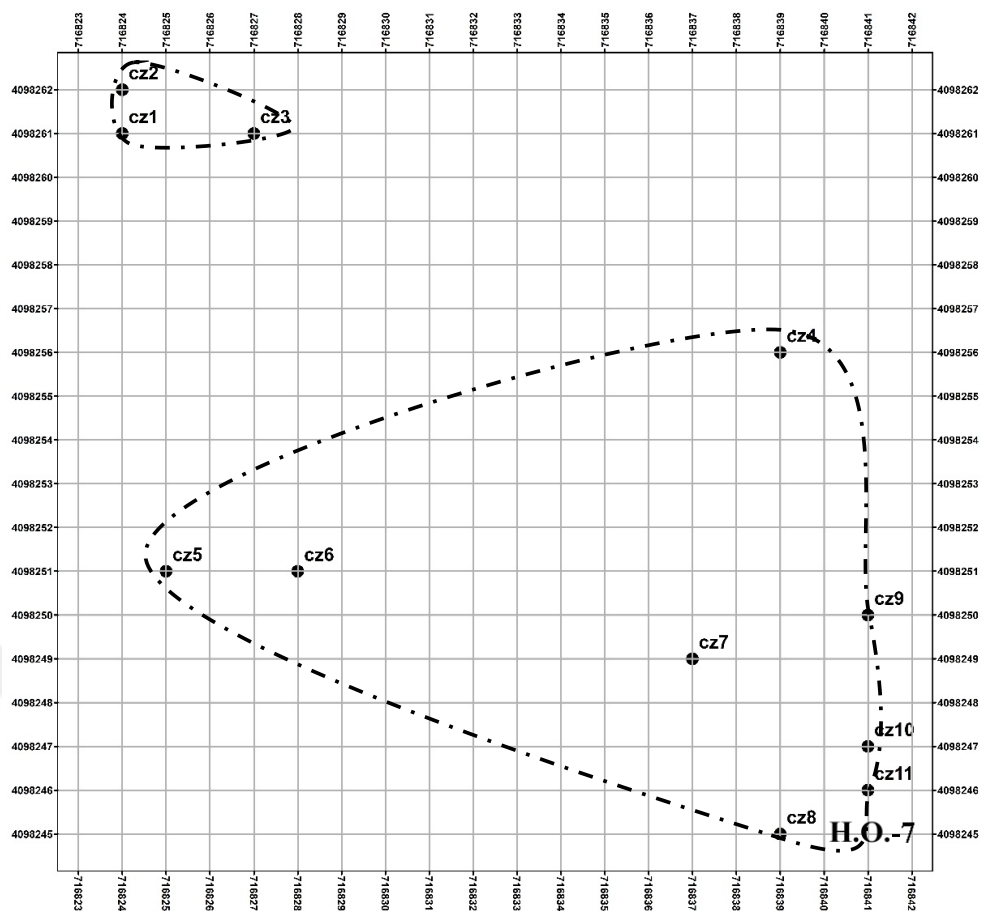


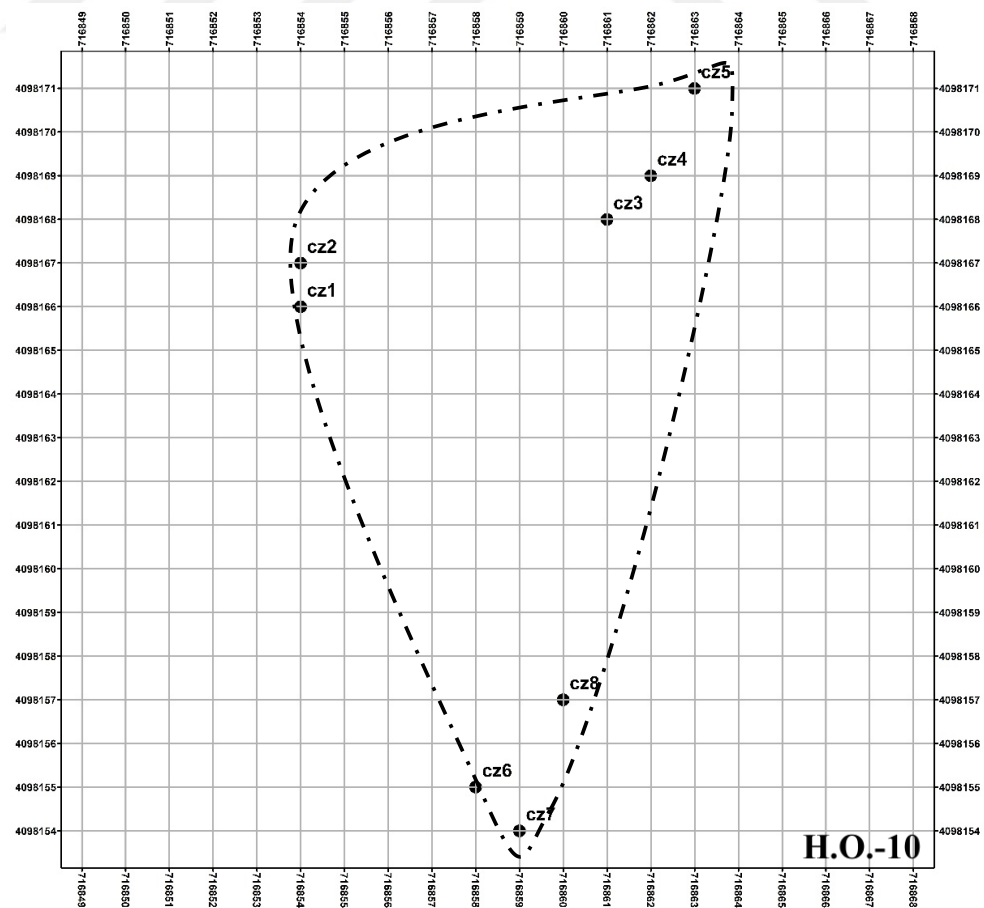
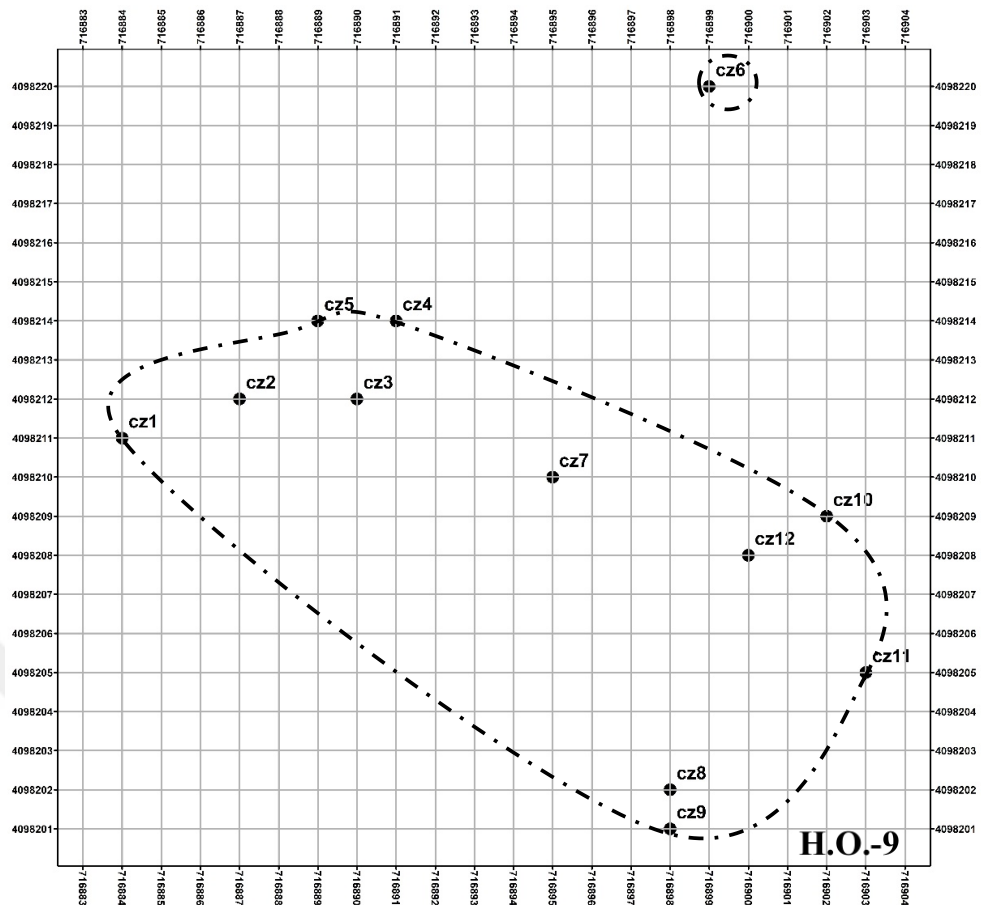
EK A. Genet Haritaları

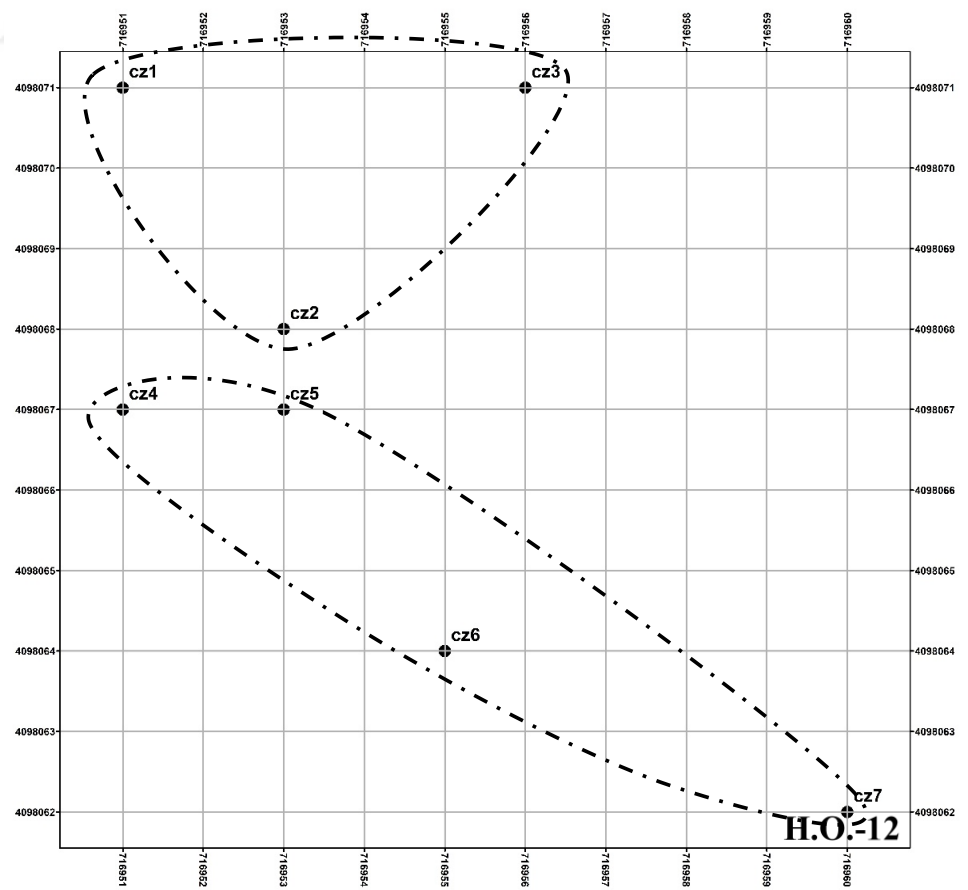
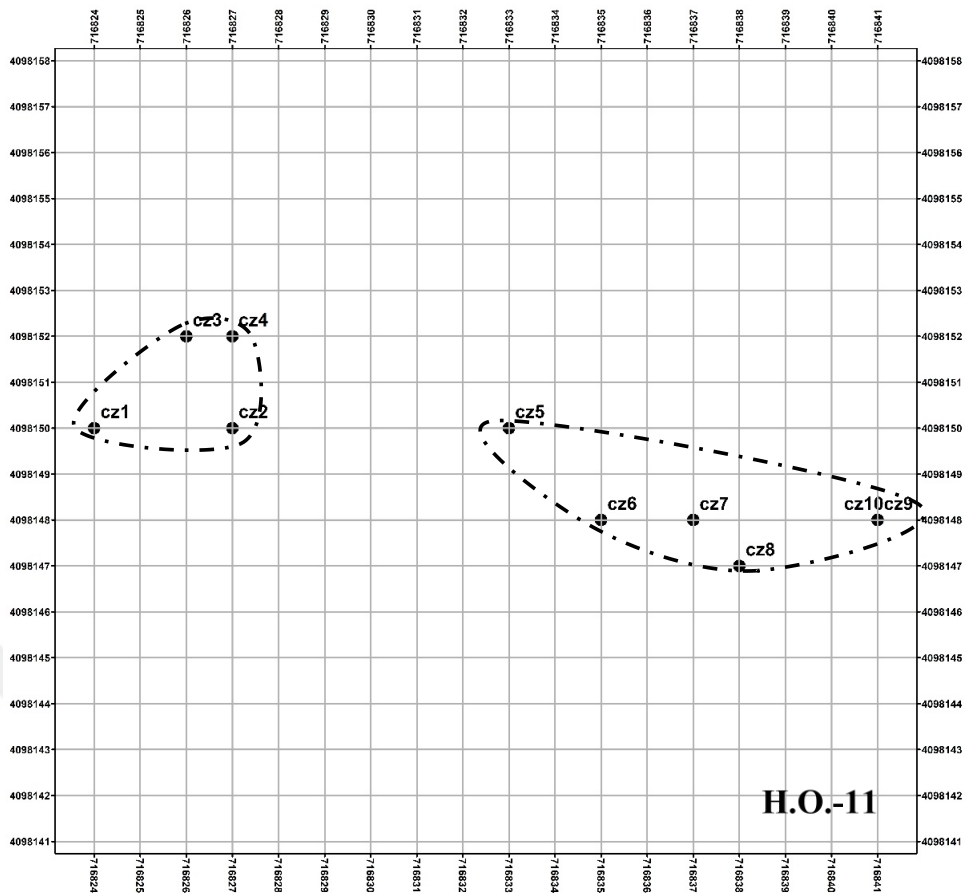


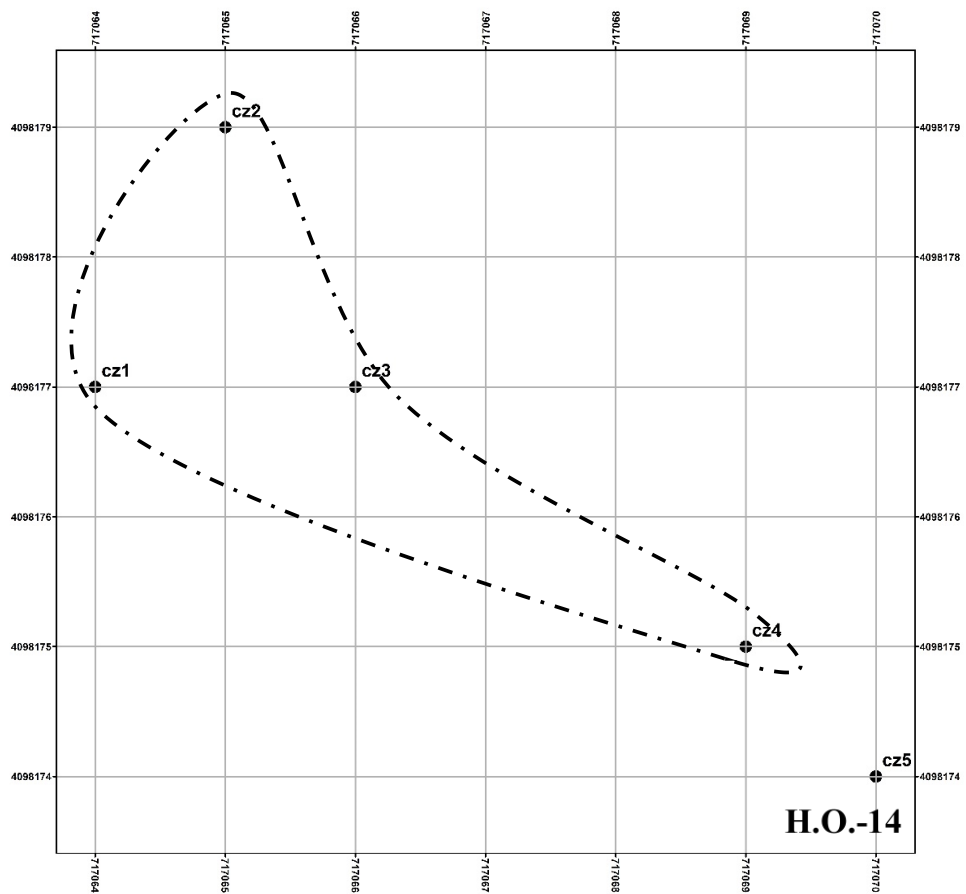
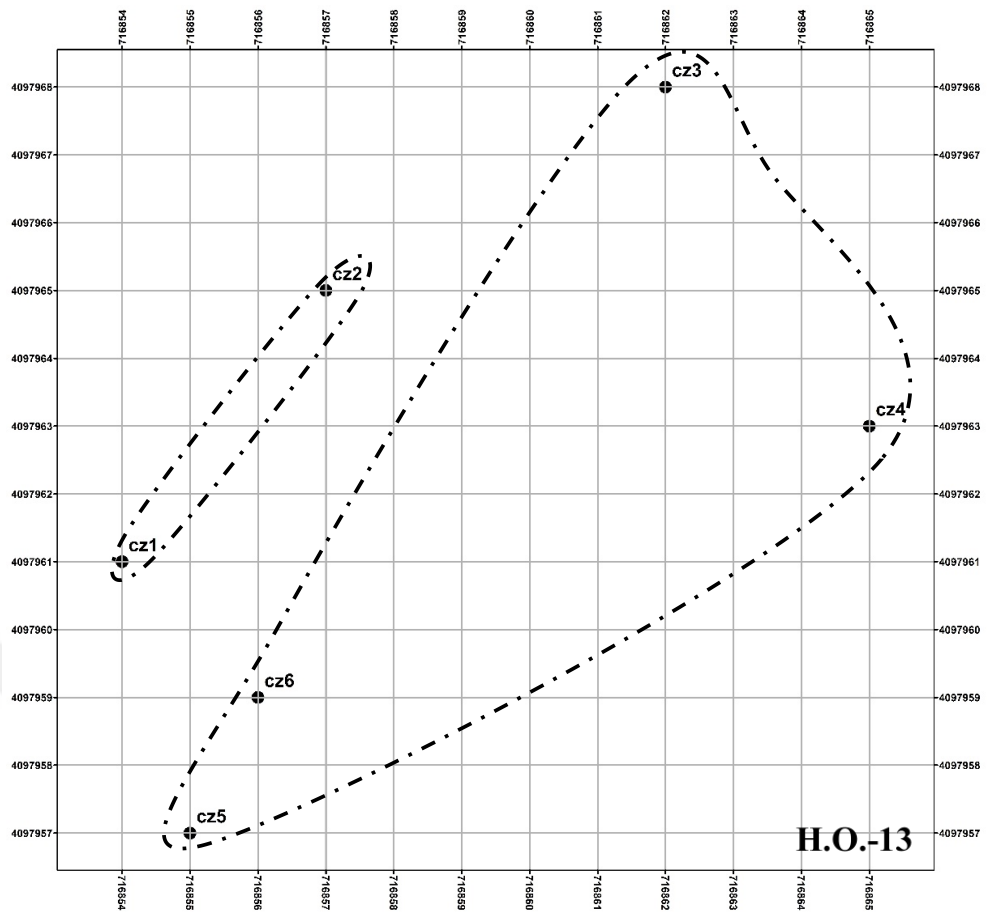


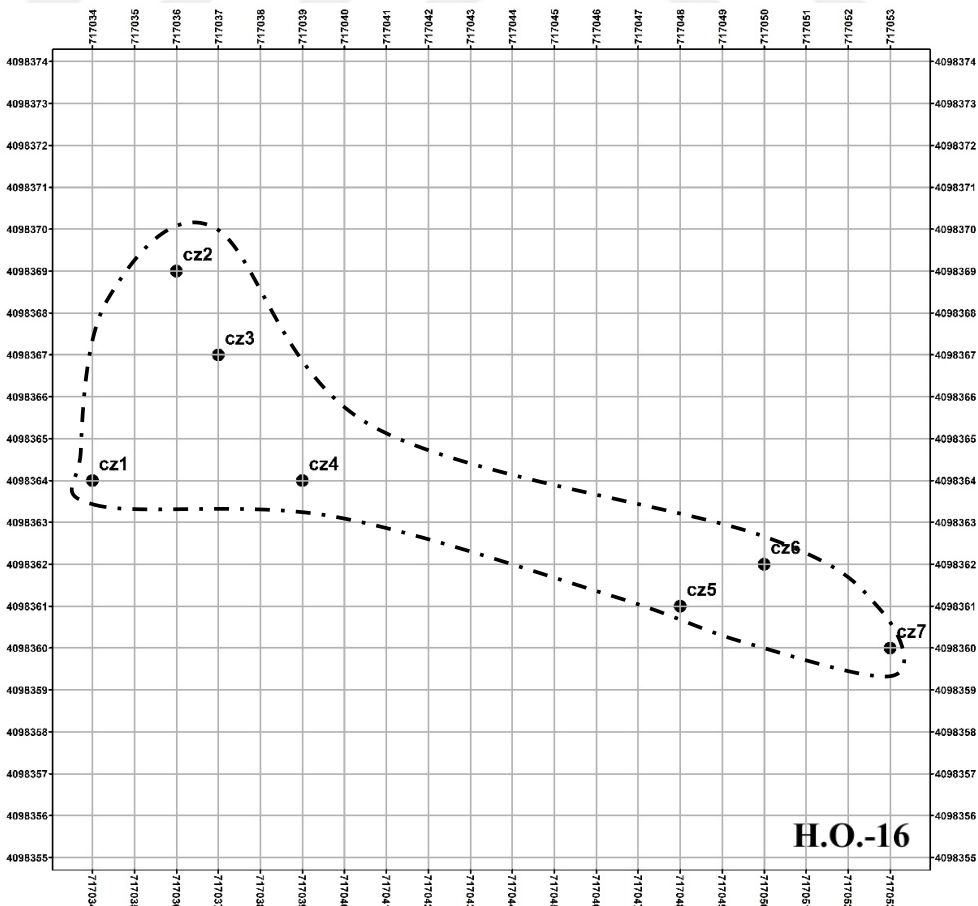
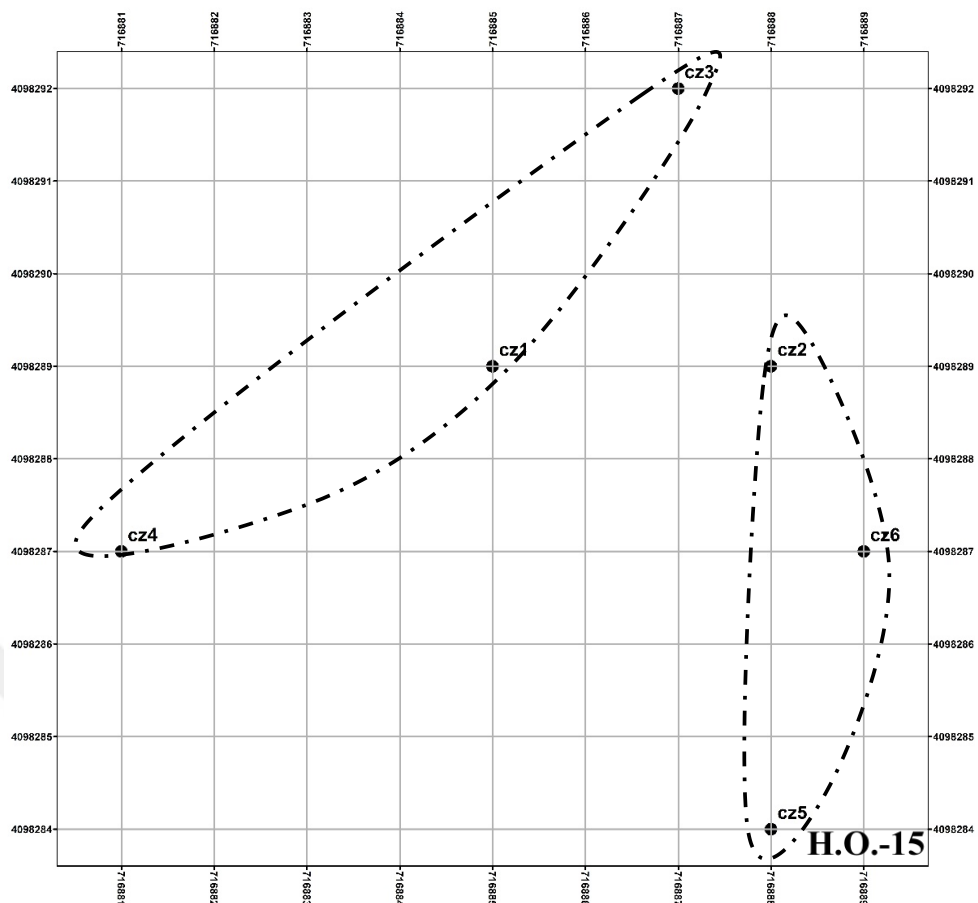


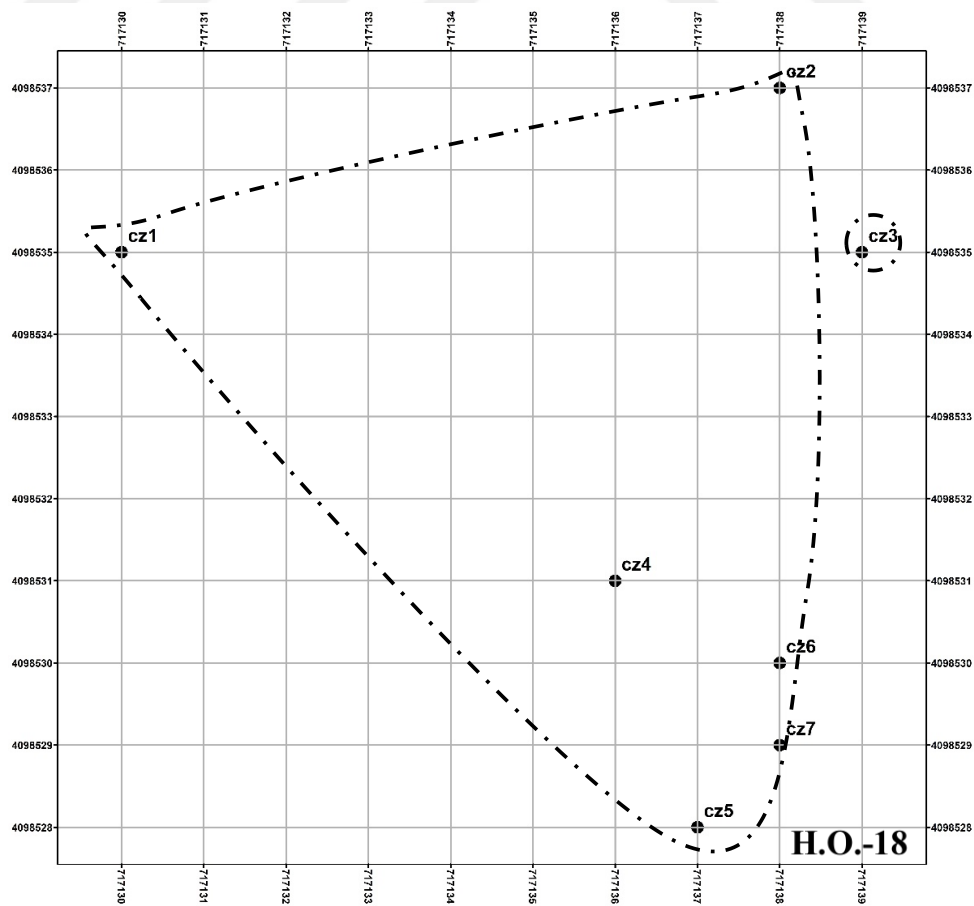
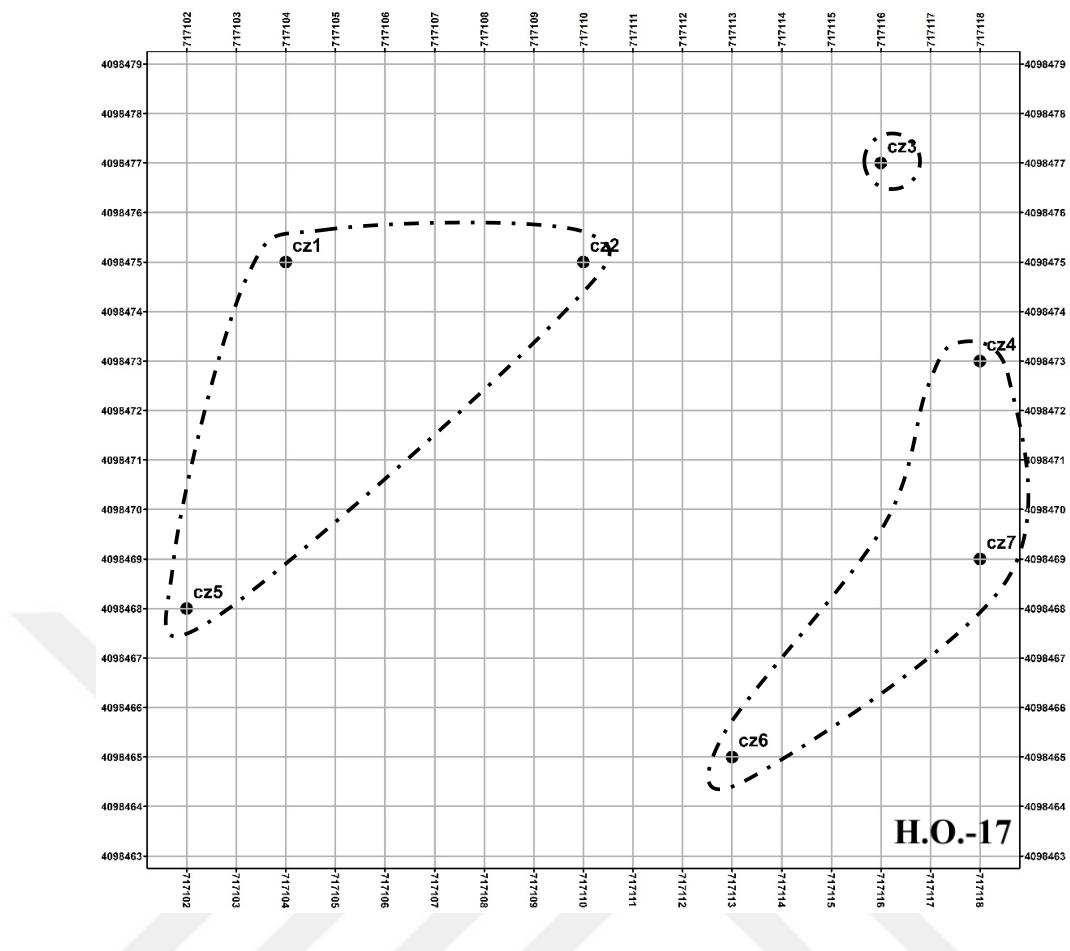


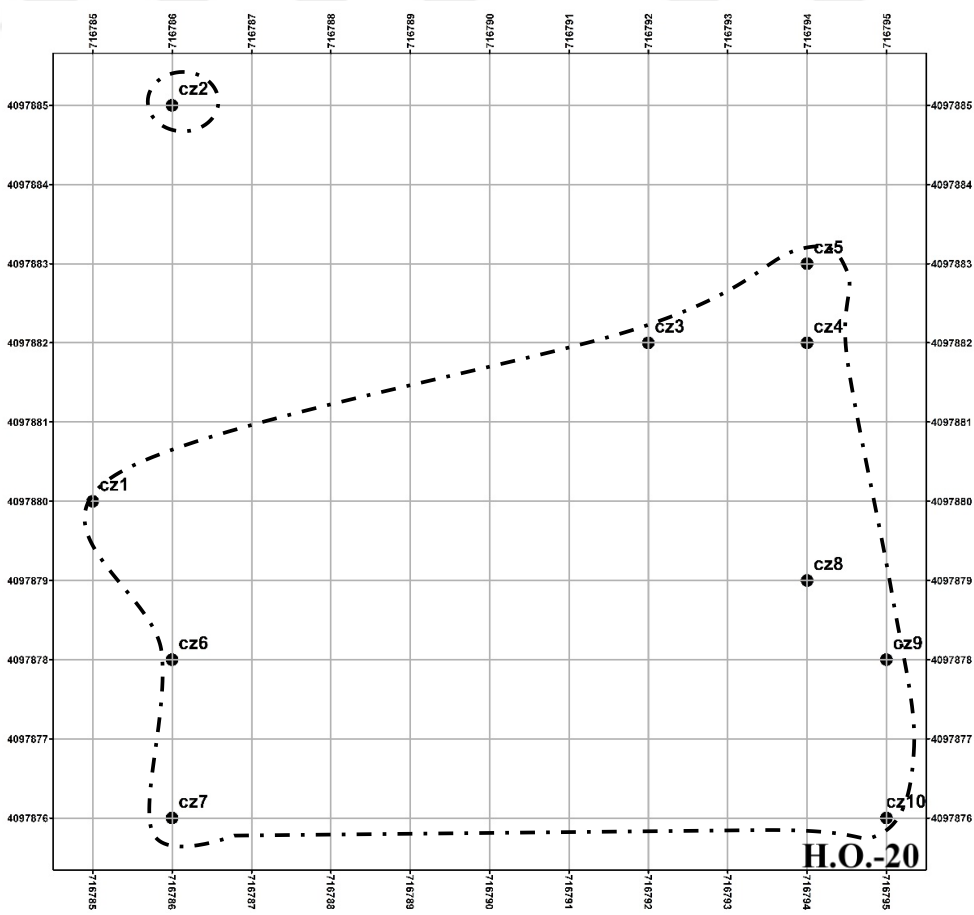
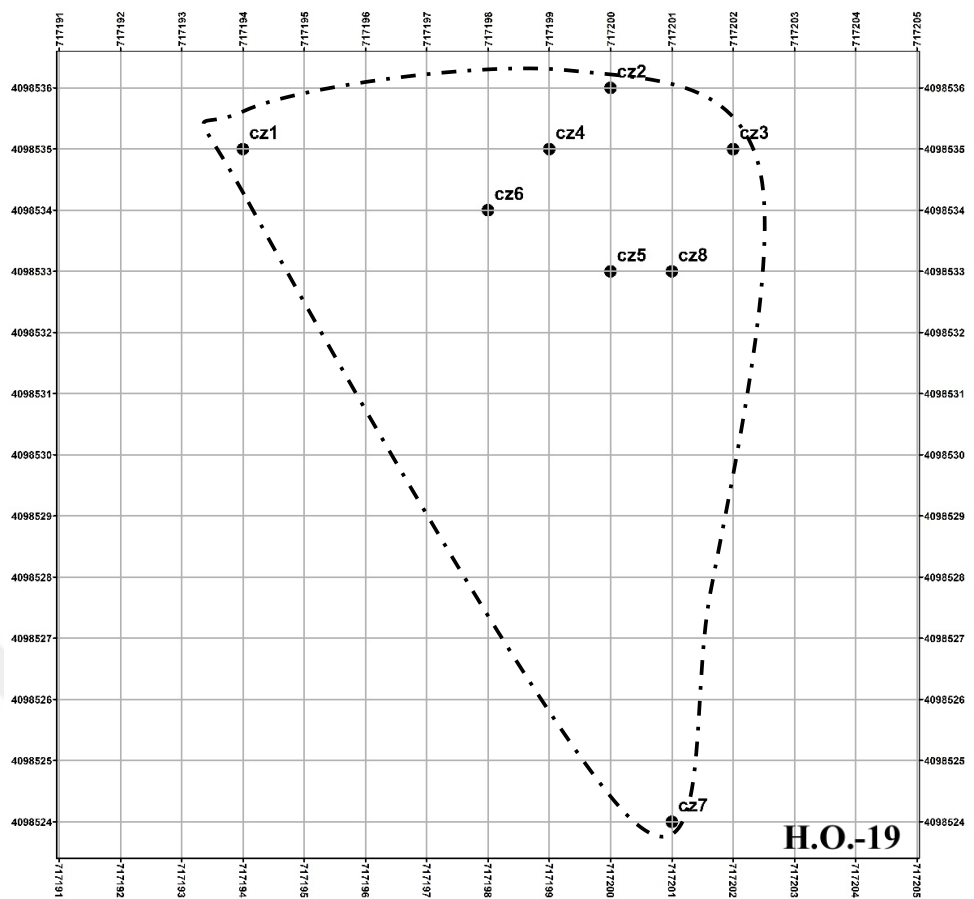












ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Refika Ceyda BERAM

Doğum Yeri ve Yılı : Muğla, 1989

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : ceydaberam@gmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Fethiye YDA Süper Lisesi, 2007

Lisans : SDÜ, Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji, 2013

Lisans : ISUBÜ, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği, 2019

Yüksek Lisans : SDÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Mühendisliği ABD, 2014

Doktora : ISUBÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Orman Müh. ABD, Halen

Mesleki Deneyim

SDÜ, Yenişehirbademli MYO Ücr. Öğr. Gör. 2015-2018

Yayınlar

SCI, SSCI ve AHCI tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makale

1. Doğmuş-Lehtijärvi, H. T., **Erdoğan, R. C.**, Lehtijärvi, A., Woodward, S., Aday Kaya, A. G., 2016. Pathogenicity of *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. sensu stricto on coniferous tree species in Turkey. Forest Pathology, 46(1), 22-28.

Hakemli dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makale

1. **Beram, R. C.**, Oskay, F., Aday Kaya, A. G., Altunışık A., Lehtijärvi, A., Doğmuş-Lehtijärvi, H. T., 2017. Çam Çıralı Kanseri Hastalığı. Orman ve Av, 95(3), 26-27.
2. **Beram, R. C.**, Oskay, F., Aday Kaya, A., Lehtijärvi, A., Doğmuş Lehtijärvi, H. T., 2017. Dünya Çam Ormanlarını Tehdit Eden Yabancı İstilacı Tür; *Fusarium*

circinatum. Bilge International Journal of Science and Technology Research, 1(1), 39-45.

3. **Beram, R. C.**, Beram, A., Lehtijärvi, H. T. D., 2016. Fungal Endofitler ve Etkileşimleri. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 7(2), 161-166.

Uluslararası sempozyumlarda sunularak yayımlanan bildiriler

1. **Beram, R. C.**, Doğmuş-Lehtijärvi, H. T., Aday Kaya, A. G., Lehtijärvi, A., Woodward, S., 2015. Pathogenicity of *Heterobasidion annosum* s. str on pine species. Root and Butt Rot Diseases in Turkey. 14th International Conference of IUFRO, Working Party 7.02.01. “Root and Butt Rot of Forest Trees”.
2. Aday Kaya, A. G., Lehtijärvi, A., Doğmuş-Lehtijärvi, H. T., Oskay, F., Tunalı, Z., Yeltekin, Ş., Şaşmaz, Y., **Beram, R. C.**, Woodward, S., 2015. Wood decay fungi in living *Abies bornmülleriana*. Root and Butt Rot Diseases in Turkey. 14th International Conference of IUFRO, Working Party 7.02.01. “Root and Butt Rot of Forest Trees”. 12th -18th October 2015. Antalya, Fethiye, Bodrum-TURKEY.
3. Aday Kaya, A. G., Lehtijärvi, A., Doğmuş-Lehtijärvi, H. T., Oskay, F., Tunalı, Z., Yeltekin, Ş., Şaşmaz, Y., **Beram, R. C.**, Woodward, S., 2015. Wood decay fungi in living *Pinus nigra* subsp. *pallasiana*. Root and Butt Rot Diseases in Turkey. 14th International Conference of IUFRO, Working Party 7.02.01. “Root and Butt Rot of Forest Trees”. 12th -18th October 2015. Antalya, Fethiye, Bodrum-TURKEY.
4. Lehtijärvi, A., Doğmuş-Lehtijärvi, H. T., Aday Kaya, A. G., **Erdoğan, R. C.**, 2013. Fungal Endophytes of *Cedrus libani* Needles in Yenişarbademli District. IUFRO 2013 WP 7.02.02 Foliage Shoot and Stems Diseases: Biosecurity in Natural Forests and Plantations, Genomics and Biotechnology for Biosecurity and Forestry, 124, 20-25 May, Cerno Hora, Czech Republic.
5. **Beram, R. C.**, Aday Kaya, A. G., Lehtijärvi, A., Doğmuş-Lehtijärvi, H. T., Oskay, F., Woodward, S., 2017. “*Heterobasidion* and *Armillaria* Root and Stem Rot Diseases in Turkish Forests”. IUFRO 125th Anniversary Congress, Freiburg, Germany, 18-22 September 2017.
6. **Beram, R. C.**, Oskay, F., Lehtijärvi A., Doğmuş-Lehtijärvi, H. T., Aday Kaya, A. G., 2017. “Can Alien Invasive Pathogen *Fusarium circinatum* Threaten Turkish Pine Forests?”. ISFOR-2017. International Symposium on New Horizons in Forestry, Isparta, Turkey. 18-20 October 2017.
7. Oskay, F., **Beram R. C.**, Lehtijärvi, A., Özden, S., Doğmuş Lehtijärvi , H. T., Woodward, S., 2017. “Forest pathogens under plant quarantine regulations in Turkey”. International Symposium on New Horizons in Forestry, Isparta Turkey, 18-20 October 2017.

8. Rönnerberg, J.; Blomquist, M., **Erdogan, C.**, Ghasemkhani, M., Cleary, M. *Picea abies* stump size and efficacy from treatment with *Phlebiopsis gigantea* and urea against *Heterobasidion* in Sweden.

Uluslararası Kitap Bölüm Yazarlığı

1. Roques, A., Cleary, M., Matsiakh, I., Eschen, R. (2017). Field guide for the identification of damage on woody sentinel plants. Field guide for the identification of damage on woody sentinel plants. Chapter: 10 (Page no: 150) Damage to roots and collars of broadleaf woody plants. Author(s): Glavendekić, M. Matsiakh, I. Lakatos, F. Csóka, G. Moreira, A. C. Doğmus-Lehtijärvi, H. T. Lehtijärvi, A. T. **Beram, R. C.** Kaya, A. G. A. Cleary, M.
2. Roques, A., Cleary, M., Matsiakh, I., Eschen, R. (2017). Field guide for the identification of damage on woody sentinel plants. Field guide for the identification of damage on woody sentinel plants. Chapter: 11 (Page no: 167) Damage to foliage of coniferous woody plants. Author(s): Matsiakh, I. Avtziş, D. N. Adamson, K. Augustin, S. **Beram, R. C.** Cech, T. Drenkhan, R. Kirichenko, N. Maresi, G. Morales-Rodríguez, C. Poljaković-Pajnik, L. Roques, A. Talgø, V. Vettraino, A. M. Witzell, J.
3. Roques, A., Cleary, M., Matsiakh, I., Eschen, R. (2017). Field guide for the identification of damage on woody sentinel plants. Field guide for the identification of damage on woody sentinel plants. Chapter: 15 (Page no: 263) Damage to roots and collars of coniferous woody plants. Author(s): Glavendekić, M. Matsiakh, I. Lakatos, F. Csóka, G. Moreira, A. C. Doğmus-Lehtijärvi, H. T. Lehtijärvi, A. T. **Beram, R. C.** Kaya, A. G. A. Cleary, M.

Ulusal Kuruluşlarca Desteklenen Projelerde Görev Alma

1. Gölhisar-İbecik Yöresi Kızılcım Gençleştirme Alanında *Heterobasidion annosum*'dan Kaynaklanan Kök ve Alt Gövde Çürüklüğünün Belirlenmesi'. TÜBİTAK-1002, Proje No: 1180973. (Bursiyer)
2. Gölhisar-İbecik Yöresi Kızılcım Gençleştirme Alanında *Heterobasidion annosum*'un Populasyon Yapısı. SDÜ BAP Koordinasyon Birimi Projesi, Proje No: 4923-D2-17. (Yardımcı araştırmacı)
3. Bazı Konifer Ağaç Türlerinde *Heterobasidion annosum* (fr.) Bref. sensu stricto'un Patojenisitesinin Belirlenmesi. SDÜ BAP Koordinasyon Birimi Projesi, Proje No: 3928-YL1-14. (Yardımcı araştırmacı)
4. Dikili Ağaçlarda Kök ve Gövde Çürüklüğü Etmenleri; Ekolojik İstekleri, Klasik ve DNA Esaslı Teşhisleri. TÜBİTAK-TOVAG 1130508. (Bursiyer)
5. Sessiz Doğa-4. Tubitak-4004 Doğa Eğitimi ve Bilim Okulları Projesi-2017. 117B139 Nolu proje. (Eğitmen)

Uluslararası Sempozyum Düzenleme Kurulunda Görev Alma

1. 14th International Conference of IUFRO, Working Party 7.02.01. “Root and Butt Rot of Forest Trees in Turkey”. 12-18 Ekim, 2015.
2. IUFRO 7.03.04 Diseases and Insects in Forest Nurseries Working Party Meeting in Kuşadası, Turkey. 21-26 Ekim, 2018.
3. International Conferences on Sciences and Technology (ICONST 2019) 26-30 August 2019 in Prizren-KOSOVO.

