CEVİZ ÇEŞİTLERİNİN ANTRAKNOZ (*Ophiognomonia leptostyla* (Fr.) Sogonov) HASTALIĞINA REAKSİYONLARININ BELİRLENMESİ

Amanmohammad KOMAKI

Doktora Tezi
Bitki Koruma Anabilim Dalı
Fitopatoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Hidayet BOSTAN
2019
Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

CEVİZ ÇEŞİTLERİNİN ANTRAKNOZ (*Ophiognomonia leptostyla* (Fr.) Sogonov) HASTALIĞINA REAKSİYONLARININ BELİRLENMESİ

Amanmohammad KOMAKI

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
Fitopatoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2019

Her hakkı saklıdır

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ ONAY FORMU

Ceviz Çeşitlerinin Antraknoz (*Ophiognomonia leptostyla* (Fr.) Sogonov) Hastalığına Reaksiyonlarının Belirlenmesi

Prof. Dr. Hidayet BOSTAN danışmanlığında, Amanmohammad KOMAKI tarafından hazırlanan bu çalışma, 27/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı Fitopatoloji Bilim Dalı'nda doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hidayet BOSTAN	İmza	:
Üye : Prof. Dr. Şaban KORDALI	İmza	:
Üye : Prof. Dr. Rafet ASLANTAŞ	İmza	:
Üye : Prof. Dr. Yusuf YANAR	İmza	:
Üye : Doç. Dr. Sekan ÖRTÜCÜ	İmza	:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 05.09./2019 tarih ve ..35.../..36..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2015/165

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

CEVİZ ÇEŞİTLERİNİN ANTRAKNOZ (*Ophiognomonia leptostyla* (Fr.) Sogonov) HASTALIĞINA REAKSİYONLARININ BELİRLENMESİ

Amanmohammad KOMAKI

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı
Fitipatoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hidayet BOSTAN

Yukarı Fırat havzası ve Çoruh Vadisi ceviz popülasyonundan antraknoza özgü simptom gösteren ceviz (*Juglans regia*) ağaçlarından toplam 115 *Ophiognomonia leptostyla* (Fr.) Sogonov izolatı izole edilmiştir. PDA, OMA, WLEA, WFSEA ve WA ortamlarında izolatların gelişim hızları, koloni tipleri, eşeyli ve eşeysiz formları elde edilerek morfolojik özellikleri belirlenmiş, 2 ITS ve 2 EF1-pirimer çifti ile PCR yapılmış, 7 PCR ürününün sekans dizilimi belirlenerek flogenetik diyagramı çıkarılarak tanılama doğrulanmıştır. Türkiye'de son yıllarda yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan Chandler, Bilecik, Maraş-18, Şen-1, Sütyemez ve anaç çeşitlerinde R genler NBS1/NBS5a6; S1INV/S2INV; H1145/H1146; S1/AS3; P-Loop/GLPL; RN1F/RN1R, LM637/LM638, NLRR inv1/inv2 ve Pto kin1/kin2 pirimer çiftleri ile belirlenmiş; NBS1/NBS5a6 pirimer çiftinin amplifiye ettiği bölgenin sekans dizilimi çıkarılmış, R gen içerdikleri belirlenen Chandler, Bilecik, Maraş-18 ve Şen-1 çeşitlerin arazi şartlarında *Ophiognomonia leptostyla*'ya karşı dayanıklılıkları ve aktivatör uygulamalarının (Borik asit, Nitrik Oksit, Salisilik asit ve Absisik asit) dayanıklılık üzerine etkileri araştırılmıştır. Bütün çeşitlerin R gen içerdiği, hastalığa karşı en dayanıklı çeşidin Chandler olduğu ve bu çeşidi Bilecik, Maraş-18 ve Şen-1'in izlediği belirlenmiştir. Diğer taraftan hastalığa karşı dayanıklılıkta Borik asit, Nitrik Oksit, Salisilik asit ve Absisik asit uygulamalarının istatiki olarak pozitif kontrol grubuna göre yaprakların üzerinde bulunan leke sayısı ve leke çaplarının daha az geliştiği ve nispi olarak etkili olduğu tespit edilmiştir.

2019, 117 sayfa

Anahtar kelimeler: *Juglans regia*, *Ophiognomonia leptostyla*, PCR, dayanıklılık, R gen, aktivatör

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION OF WALNUT VARIETIES REACTION AGAINST ANTHRACNOSE (*Ophiognomonia leptostyla* (Fr.) Sogonov) DISEASE

Amanmohammad KOMAKI

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection
Department of Phytopathology

Supervisor: Prof. Dr. Hidayet BOSTAN

A total of 115 *Ophiognomonia leptostyla* (Fr.) Sogonov isolates were collected from walnut population (*Juglans regia* L.) in Çoruh valley and upper Frat region showing symptoms peculiar to anthracnose. The growth rates, colony type, morphological characters, sexual and asexual forms of the fungi were determined. In order to confirm the identification of fungi, PCR was performed by using ITS (ITS1 and ITS4) and EF1-α (EF1-α and TEF) primer pairs, seven PCR products were sequenced and analyzed of the phylogenetic relationship. Nova days Chandler, Bilecik, Maraş-18, Şen-1, Sütyemez and rootstock cultivars are grown widely in Turkey, which their resistance genes were determined and amplified by NBS1/NBS5a6; S1INV/S2INV; H1145/H1146; S1/AS3; P-Loop/GLPL; RN1F/RN1R, LM637/LM638, NLRR inv1/inv2, and Pto kin1/kin2 primer pairs and PCR product of NBS1/NBS5a6 region was sequenced. The cultivars (Chandler, Bilecik, Maraş-18 and Şen-1) which were determined to have resistance genes, their resistance, and the effects of activators (boric acid, nitric oxide, salicylic acid, and abscisic acid) were tested against the *Ophiognomonia leptostyla* virulence. It was determined that all tested walnut varieties contained R gene, the Chandler was the most resistant to pathogen and it is followed by Bilecik, Maraş-18, and Şen-1, respectively. Also, the boric acid, nitric oxide, salicylic acid, and abscisic acid activators were found to be statically effective in disease resistance by showing the less amount of leaf spot and their spot diameter in activators against the positive control group.

2019, 117 pages

Keywords: *Juglans regia*, *Ophiognomonia leptostyla*, PCR, resistance, R genes, activators

TEŞEKKÜR

Tez yöneticiliğimi üstlenip, tez çalışmalarım süresince ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Hidayet BOSTAN başta olmak üzere, laboratuvar çalışmalarım süresince ilgi ve desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Şaban KORDALI'ya (Muğla Sıtkı Koçma Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü), değerli bilgilerini bize sunan Prof. Dr. Rafet ASLANTAŞ'a (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü), çalışmam süresince doğrudan veya dolaylı olarak yardım eden Arş. Gör. Arash HOSSEIN POUR'a, Türkiye'de burslu öğrenci olarak doktora yapma şansı veren Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar (YTB) kurumu ile hayatımın her döneminde bana destek olan aileme teşekkür ederim.

Amanmohammad KOMAKI

Ağustos, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ x
ÇİZELGELER DİZİNİ xiii
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ 12
3. MATERYAL ve YÖNTEM 21
3.1. Hastalıklı Örneklerin Toplaması 21
3.2. Fungus İzolatlarının İzolasyonu 21
3.3. Fungus İzolatlarının Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi 21
3.4. *Ophiognomonia leptostyla* İzolatların Farklı Ortamlarda Geliştirilmesi 22
3.5. Fungal İzolatların Gelişme Hızlarının Belirlenmesi 23
3.6. Fungal İzolatların Uzun Süreli Muhafazası 23
3.7. Eşeysiz Formunun Elde Edilmesi 24
3.8. Fungusun Eşeyli Formunun (Peritesyum) Elde Edilmesi 24
3.9. Fungal İzolatlarının Homotal ve Heterotal Olup Olmadığının İncelenmesi 24
3.10. DNA Ekstraksiyonu, PCR ve Sekans Analizi 25
3.10.1. Ekstraksiyonda kullanilan solüsyonlar ve hazirlanişlari 25
3.10.2. Fungus izolatlarından ve ceviz çeşitlerinden DNA ekstrasyonu 29
3.10.3. PCR ve elektroforez çalışmalarında kullanılan reaktifler ve hazırlanışları 30
3.10.4. PCR çalışmaları 32
3.10.5. Fungus izolatlarinin PCR ile tanilanmasi 33
3.10.6. Ceviz çeşitlerinde R genlerin PCR ile belirlenmesi 34
3.10.7. Elektroforez 35
3.10.8. Sekans diziliminin bilirlenmesi ve filogenetik analizileri 35
3.11. Patojensite Çalışmaları 35

3.11.1. Ceviz fidanlarının temini ve bakımı 35
3.11.2. İnokulasyonların yapılması 36
3.11.3. Aktivatörlerin hazırlanşı 37
3.11.4. Aktivatör uygulamaları 38
3.11.5. Ceviz çeşitlerin antraknoza dayanıklık durumlarının değerlendirilmesi 39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 41
4.1. Hastalıklı Örneklerin Toplanması 41
4.2. Antraknoz Hastalığının Ağaç, Yaprak, Sürgün ve Meyvelerdeki Simptomları 44
4.2.1. Sürgün ve dallarda antraknoz hastalığının simptomları 46
4.3. Ceviz Yapraklarından Fungal İzolatlarının İzolasyonu 48
4.4. Fungus İzolatlarının Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi 49
4.4.1. Ceviz antraknoz eşeyli formu olan *Ophiognomonia leptostyla*'nın morfolojik özellikleri 49
4.4.2. Antraknozun eşeysiz formu Olan *Marssoniella juglandis* morfolojik özellikleri 49
4.5. *Ophiognomonia leptostyla* İzolatların Farklı Ortamlarda Gelişimlerinin Belirlenmesi 55
4.5.1. *Ophiognomonia leptostyla* izolatlarının PDA ortamında gelişimleri 55
4.5.2. *Ophiognomonia leptostyla* izolatlarinin OMA ortamindaki gelişimleri 57
4.5.3. *Ophiognomonia leptostyla* izolatlarının WLEA ortamındakı gelışımleri 58
4.5.4. *Ophiognomonia leptostyla* izolatlarinin WFSEA ortamindaki gelişimleri 60
4.5.5. *Ophiognomonia leptostyla* İzolatlarının WA Ortamındaki Gelişimleri 62
4.6. *Ophiognomonia leptostyla* İzolatlarının Gelişme Hızları 63
4.7. *Ophiognomonia leptostyla*'nın Eşeysiz Formunun (Marssoniella juglandis) Elde Edilmesi 65
4.8. *Ophiognomonia leptostyla*'nın Eşeyli Formunun (Peritesyum) Elde Edilmesi 65
4.9. *Ophiognomonia leptostyla* İzolatlarında DNA ve PCR Çalışmaları 66
4.9.1. Fungus izolatlarinin DNA'larının elektroforezleri 66
4.9.2. Fungus izolatlarının PCR ile tanılanması 67
4.9.3. Ceviz çeşitlerinin DNA ekstraksyonu, PCR ve sekans analizleri 75

4.9.3.a. Ceviz çeşitlerden R genlerin PCR ile belirlenmesi 75
4.10. Patojensite Çalışmaları 86
4.10.1. Ceviz çeşitlerinin hastalığa dayanıklık durumlarının değerlendirilmesi 86
4.10.1.a. Ceviz çeşitlerinde antraknoz lekelerinin sayıları ve çapları 88
4.10.1.b. Enfekteli yaprak sayısı ve leke çaplarına göre izolatlar arasındaki farklılıklar 90
4.10.2. Aktivatörlerin dayanıklılık üzerine etkileri 96
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 100
KAYNAKLAR 106
ÖZGEÇMİŞ 118

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
µg	Mikro Gram
µL	Mikrolitre
µM	Mikro Molar
cm	Santimetre
cm^2	Santimetrekare
cm^3	Santimetreküp
g	Gram
ha	hektar
kg	Kilogram
KJ	Kilo Jul
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
^oC	Sanigrat derece
sp.	Tür
spp.	türler
v	Hacim
w	Ağırlık

Kısaltmalar

18srDNA	Small-Subunit Ribosomal DNA
A	Aktivatör
ABA	Absisik Asit
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphisms
B	Bilecik

BA	Borik Asit
bp	Base Pair
Ç	Çeşit
C	Chandler
CMA	Corn Meal Agar
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
Da	Dalton
Df	Serbestlik Derecesi
EDTA	Etilenediaminetetra-asetat disodyum
FAO	Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örğütü)
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats
ITS	Internal transcribed spacer
LRR	Luecine Rich Repeat
M	Maraş-18
MA	Malt Agar
NA	Nutrient Agar
NBS	Nucleotide Binding Site
NK	Negatif Kontrol
NO	Nitrit oxit
OA	Oleik Asit
Öd	Önemli değil
ÖD	Özgün Değer
OMA	Oat Meal Agar
ÖZ	Ölçüm Zamanları
PDA	Patates Dekstroz Agar
PK	Pozitif Kontrol
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids
R gen	Resistance Genes
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms
Ş	Şen-1
SA	Salisil Asit

SAMPL	Selective Amplification of Microsatellite Poliymorphic Loci
SAR	Systemic Acquired Resistance
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
STK	Serine/Threonine Kinases
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
WLEA	Walnut Leaf Extract Agar
WLEOMA	Walnut Leaf Extract Oat Meal Agar
WNCEA	Walnut Nut Coat Extract Agar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Patojensite testi yapılmadan önce ceviz çeşitlerin dizilimi. 36
Şekil 3.2. Kontrol grubunda ceviz fidanlarının dizilimi 38
Şekil 3.3. Nitrik Oksit (NO) testi yapılan ceviz fidanlarının dizilimi..... 38
Şekil 3.4. Borik Asit (BO) testi yapılan ceviz fidanlarının dizilimi 39
Şekil 3.5. Salisilik Asit (SA) testi yapılan ceviz fidanlarının dizilimi..... 39
Şekil 3.6. Absisik Asit (ABA) testi yapılan ceviz fidanlarının dizilimi 39
Şekil 3.7. Aktivatör uygulamalarında ceviz fidanlarının dizilimi 39
Şekil 4.1. Hastalığın ağaçlardaki genel görüntüsü..... 45
Şekil 4.2. Hastalığın Haziran ayının başlarında yaprakdaki simptomu 46
Şekil 4.3. Hastalığın Ağustos ayında yaprakdaki simptomu 46
Şekil 4.4. Sürgün ve dallarda hastalığın aservulus oluşumu..... 47
Şekil 4.5. Sürgün ve yapraklarda hastalığın simptomları 47
Şekil 4.6. Hastalığının (Temmuz- Ağustos-Eylül) sürgünlerdeki simptomları 48
Şekil 4.7. Meyveler üzerindeki simptomları..... 48
Şekil 4.8. *O. leptostyla*'nın yaprakların üzerinde oluşan aservuluslarının görüntüsü..... 50
Şekil 4.9. *O. leptostyla*'nın yaprak üzerindeki konidiyoforları 50
Şekil 4.10. *O. leptostyla* makrokonidilerinin görüntüsü..... 51
Şekil 4.11. *O. leptostyla*'nın OMA besiyerinde oluşturduğu aservuluslar 52
Şekil 4.12. *O. leptostyla* konidilerinin boy ve enlerinin korelasyon diyagramı 54
Şekil 4.13. PDA ortamında gelişen *O. leptostyla* kolonilerin petri kaplarının üst ve altan görüntüsü ile koloniler arasında gelişen protoperitesiyumların görüntüsü 56
Şekil 4.14. *O. leptostyla* izolatların PDA ortamında 2, 9, 16 ve 23. gün içinde gelişimleri..... 57
Şekil 4.15. *O. leptostyla* izolatlarının OMA ortamında 2, 9, 16 ve 23 gün içinde gelişimleri..... 58
Şekil 4.16. *O. leptostyla* kolonisinin WLEA ortamındaki gelişimileri..... 59

Şekil 4.17. *O. leptostyla* izolatlarının WELA ortamındaki 2, 9, 16 ve 23. gün gelişim durumları 60
Şekil 4.18. *O. leptostyla*'nın WFSEA ortamındaki gelişimleri 61
Şekil 4.19. *O. leptostyla* izolatlarının WFSEA ortamında 2, 9, 16 ve 23. gün gelişimleri 61
Şekil 4.20. *O. leptostyla* izolatlarının WA ortamında 2, 9, 16 ve 23. gün gelişimleri 62
Sekil 4.21. OMA ortamında *O. leptostyla*'nın aservulus ve konidiosporları 65
Şekil 4.22. *O leptostyla* izolatlarından elde edilen DNA'ların %1 agaroz jeldeki görüntüleri 67
Şekil 4.23. ITS5 (F)-ITS4 (R) primer çiftlerinin amplifiye ettiği PCR ürünlerinin sekans verilerinin flogenetik diyagramı 69
Şekil 4.24. ITS1 (F) ve ITS4 (R) pirimer çifti ile elde edilen PCR ürününün filogenetik analizi 70
Şekil 4.25. EF1 728 (F)- EF1 1567 (R) primer çiftinin amplifiye ettiği bölgenin filogenetik analizi 72
Şekil 4.26. TEF1 983 (F)- EF1 1567 (R) pirimer çiftinin amplifiye ettiği bölgenin filogenetik analizi 74
Şekil 4.27. Ceviz çeşitlerinde elde edilen DNA'nın jel görüntüsü 75
Şekil 4.28. NBS1/NBS5a6 ile elde edilen PCR ürününün jel görüntüsü 77
Şekil 4.29. NBS1/NBS5a6 ile amplifye edilen NBS bölgelerinin filogenetik analizleri 78
Şekil 4.30. Çeşitlerden S1INV/S2INV primer çiftleri ile elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüsü 79
Şekil 4.31. H1145/H1146 pirimer çiftlerinden elde edilen PCR ürününün jel görüntüsü 80
Şekil 4.32. Çeşitlerden S1/AS3 primer çiftinden elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüsü 81
Şekil 4.33. S1/AS3 primer çiftlerinin amplifiye ettği bölgenin filogenetik diyagramı 81
Şekil 4.34. RN1F/RN1R pirimer çifti ile elde edilen PCR ürününlerinin jel görüntüsü 83

Şekil 4.35. RN1F/RN1R pirimer çifti ile elde edilen fragmentlerin filogenetik diyagramları 83
Şekil 4.36. LM637/LM638 pirimer çifti ile elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüsü 84
Şekil 4.37. Pto kin1/kin2 ile elde edilen PCR ürününün jel görüntüsü 85
Şekil 4.38. Ceviz çeşitlerinden Pto kin1/kin2 primerleri ile elde edilen fragmentlerin filogenetik diygramı 85
Şekil 4.39. Şen-1 üzerinde antrakonz hastalığının enfeksiyon görüntüsü 87
Şekil 4.40. Çeşitlerde yaprak döküm ortalamaları 89
Şekil 4.41. Enfekte olan yaprak sayılarının ortalaması 89
Şekil 4.42. Enfekte olan yapraklardaki leke çaplarının ortalamaları 90
Şekil 4.43. İzolatların çeşitlerde neden oldukları enfekte yaprak sayılar 91
Şekil 4.44. İzolatların çeşitlerde neden oldukları enfekte yaprak sayıları 92
Şekil 4.45. Çeşitlerde leke çapı ortalamalarına göre izolatların etkileri 92
Şekil 4.46. Çeşitlerde izolatların neden oldukları lekelerin çap ortalamaları 93
Şekil 4.47. Uygulamalara göre enfekte olan yaprak sayılarının ortalamaları 96
Şekil 4.48. Uygulamalara göre enfekte olan yaprak üzerindeki lekelerin çap ortalamaları 97
Şekil 4.49. Çeşitlerde aktivatörlere göre lekelerin çap ortalamaları 97
Şekil 4.50. Aktivatörlere göre çeşitlerde lekelerin çap ortalamaları 98
Şekil 4.51. Çeşitlerde aktivatörlere göre enfekteli yaprak sayıları 98
Şekil 4.52. Çeşitlerde aktivatörlere göre enfekte olan yaprak sayıları 99

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Ekstraksiyon ve PCR aşamasında kullanılan cihaz ve sarf malzemeler 28
Çizelge 3.2. Sarf kullanılan sarf ve kimyasallar ve markaları 28
Çizelge 3.3. Her bir örnek için PCR'da kullanılan reaktifler ve miktarları 32
Çizelge 3.4. Fungal izolatların tanısında kullanılan primerler çiftleri 33
Çizelge 3.5. Fungal izolatların belirlenmesinde kullanılan Thermocycler döngüsü 33
Çizelge 3.6. R genlerin belirlenmesinde kullanılan primer çiftleri 34
Çizelge 3.7. Uygulanmış olan aktivatorlerin marka, stok ve doz bilgileri 38
Çizelge 4.1. Simptomlu örneklerin alındığı yerler ve tarihleri 41
Çizelge 4.2. *O. leptostyla* izolatlarının farklı ortamlarda 23. gündeki gelişimleri 64
Çizelge 4.3. *O. leptostyla* izolatlarından farklı primler çiftlerinden beklenen PCR ürünleri 68
Çizelge 4.4. Ceviz çeşitlerinde primer çiftinden elde edilen PCR sonuçları 76
Çizelge 4.5. Patojensite çalışmalarında varyans analizi sonuçları 87
Çizelge 4.6. İzolatların virülanslıkları 91
Çizelge 4.7. Enfekteli yaprak sayıları 94
Çizelge 4.8. Enfekte olan yapraklarda lekelerin çap ortalamaları 95

1. GİRİŞ

Ceviz (*Juglans regia* L.) Magnoliopsida sınıfı, Juglandales (Fagales) takımı, Juglandaceae familyası içerisinde yer alan *Juglans* cinsine mensup sert kabuklu meyveleri olan, odun dokuya sahip bir türdür (Martinez-Garcia *et al*. 2016).

Juglans cinsi içerisindeki 22 ceviz türünden dünya genelinde ticari olarak meyvesi için yetiştirilen ceviz türü "Adi ceviz, İran cevizi, İngiliz cevizi, Karpat cevizi yada Anadolu cevizi" olarak adlandırılan *Juglans regia*'dır (Sinonimleri: *Juglans duclouxiana, J. fallax, J. kamaonia, J. regia* subsp. *kamaonia, J. regia* var *orientis, J. orientis, J. regia* var *sinensis* ve *J. sinensis*) (Mc Granahan and Leslie 1990; Martinez *et al*. 2010; Şen 2011).

Orta Asya dağlarında doğal olarak yetişen bir tür olan ceviz buradan Çin, Hindistan, Pakistan, Afganistan, İran, Kırgızistan, Özbekistan, Kazakistan, Türkmenistan, Tacikistan, Gürcistan, Ermenistan, Azerbeycan, Irak ve Türkiye'ye; Avrupa'da Yunanistan, Bulgaristan, eski Yugoslavya, Romanya, Fransa, İtalya, İspanya, Almanya ve İngiltere'ye; Avrupa kıtasından da göçmenler aracılığıyla Amerika kıtasına yayılmıştır (Aradhya *et al*. 2007; Wang *et al*. 2008; Karimi *et al*. 2010; Pollegioni *et al*. 2017).

Bazı bilim adamlarına göre cevizin Anavatanının Anadolu (Ferhatoglu 2001); bazılarına göre Çin (Wang *et al*. 2008); bazı bilim adamlarına göre ise İran olduğu ve buradan diğer ülkelere yayıldığı rapor edilmiştir (Rezae *et al*. 2008). Bununla birlikte bazı ceviz türlerinin Asya (Türkiye, İran, Kırgızistan, Hindistan, Çin, Japonya), Avrupa (Polonya'nın Karpat Dağları) ve Amerika Kıtasının bazı kısımlarında (Kuzey, Orta ve Güney Amerika'nın bazı kısımlarında) doğal olarak yetiştiğinin belirlendiği kaydedilmiştir (Khadivi-Khub *et al.* 2015; Pollegioni *et al.* 2015; Wang *et al*. 2015).

Düzgün yüzeyli kalın gövde ve dallara sahip olan ceviz ağaçları 25 metre boya ve 2 metre gövde çapına ulaşabilmektedir (Anmin *et al*. 1999). Bu özelliğinden dolayı bazı ceviz türleri odun dokusu için ticari olarak sınırlı lokasyonlarda yetiştirilmekte olup bu amaç

için yetiştirilen en yaygın tür Amerika'daki siyah (*J. nigra*) cevizdir (Barkley and Brusven 2007).

Ceviz ağacının Akdeniz iklimi ve nemli ortamlarda daha iyi geliştiği ancak ağaçların 38 ^{o}C'nin üzerinde sıcaklığa maruz kalması durumunda yapraklarında güneş yanıklığı, genç sürgünlerde kurumaların meydana geldiği, -11 ^{o}C'nin altında ise meristem hücrelerinin zarar gördüğü belirtilmiştir (Charrier *et al*. 2011). Bununla birlikte çeşitlere göre soğuğa hassasiyetin değiştiği ve bazı çeşitlerin -32 ^{o}C'ye kadar düşük sıcaklığa dayanabildikleri tespit edilmiştir (Poirier *et al*. 2006; Charrier *et al*. 2011; Charrier *et al*. 2013).

Sert odun dokuya sahip, sert kabuklu meyveleri olan *Juglans regia* diploid kromozomlu (32 kromozomlu) (Anmin *et al*. 1999; Vahdati *et al*. 2014); kendine döllenebilen tür olmakla birlikte yabancı ağaçlardan gelen polenlerle de döllenebilmekte (Krueger 2000; Polito *et al*. 2005); bu özelliği de yeni genotiplerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır (Fornari *et al.* 1999; Wang *et al.* 2008).

Ceviz türlerinin hepsinde meyveler yenilebilir olmasına karşın, ticari olarak *J. regia*'nın tercih edilmesinin nedeni meyvesinin büyük ve kabuklarının ince olmasıdır. Yağlı ve lezzetli bir kuru yemiş olan cevizin yenen kısmı ise tohumun kotilendon kısmı olup tohumda endosperm bulunmamaktadır (Muradoğlu *et al*. 2010; Şen 2011; Uzunova *et al*. 2015).

Ceviz içerdiği yüksek oranda yağa ilaveten insan sağlığı açısından son derece önemli olan omega-3, omega-6, oleic acid (OA), polyunsaturated fatty acids (PUFA) ve vitamin E içeriği bakımından da zengindir (Venkatachalam and Sathe 2006). Nitekim 100 g cevizin 654 kcal (2,738 KJ) enerji, 13,71 g karbonhidrat (0,06 g nişasta, 2,61 g şeker, 6,7 g diyet lifi); 65,21 g yağ (6,125 g doymuş, 8,933 g tekli doymamış, 47,174 g çoklu doymamış yağ); 15,23 g protein; çok sayıda vitamin (1 µg vitamin A, 12 µg beta karoten, 9 µg lutein zeaxanthin, 0,341 mg thiamine (B1), 0,15 mg riboflavin (B2), 1,125 mg niacin (B3), 0,570 mg panthothenic acid (B5), 0,537 mg vitamin B6, 98 µg folate (B9), 1,3 mg vitamin C, 0,7 mg vitamin E); mineral (98 mg kalsiyum, 2,91 mg demir, 158 mg magnezyum,

3,414 mg manganez, 346 mg fosfor, 441 mg potasyum, 2 mg sodyum, 3,09 mg çinko, 1,6 mg bakır) ve suya ilaveten çok sayıda aromatik bileşik ihtiva ettiği belirlenmiştir (Greve *et al*. 1992; Ozkan and Koyuncu 2005; Şen 2011).

Bu özelliğinden dolayı ceviz dünya genelinde tarımsal faaliyetler içerisinde ticari değeri yüksek bir kültür bitkisi olarak yer almaktadır. Nitekim Dünyada toplam ceviz dikim alanının 2012 yılı verilerine göre yaklaşık 846 059 hektar, toplam üretimin 2,5 milyon ton olması bu kültür bitkisinin önemini ortaya koymaktadır.

Dikim alanı açısından dünyada Çin (440 321 ha) birinci, Amerika (117 359 ha) ikinci, Meksika (75 349 ha) üçüncü, İran (69 833 ha) dördüncü, Türkiye (69 395 ha) beşinci sırada yer alırken, bu ülkeleri Hindistan (31500 ha), Şili (24 404 ha), Fransa (19 712 ha), Moldova (14 273 ha) ve Ukrayna (13 200 ha) takip etmektedir. Üretim açısından mukayese edildiğinde Çin (1 602 373 ton), Amerika (518 002 ton), İran (445 829 ton), Türkiye (180 807 ton), Meksika (125 758 ton), Ukrayna (102 740 ton), Şili (58 909 ton), Hindistan (43 000 ton), Fransa (34 767 ton) ve Romanya'nın (31 514 ton) ilk on içerisinde yer aldığı görülmektedir (FAO 2017).

Birim alandan elde edilen verim açısından ülkeler mukayese edildiğinde Avusturya (24,13 ton/ha) ilk sırada yer alırken, bu ülkeyi Romanya (19,72 ton/ha), Slovenya (18,84 ton/ha), Çek Cumhuriyeti (10,98 ton/ha), Özbekistan (8,8 ton/ha), Pakistan (8,13 ton/ha), Ukrayna (7,78 ton/ha), İran (6,38 ton/ha), Filistin (6,36 ton/ha), Kazakistan (5,32 ton/ha) ve Türkiye'nin (2,6 ton/ha) izlediği görülmektedir (FAO 2017).

Dünya genelinde ortalama verim 2000 yılında 2,118 kg/ha iken, 2012 yılında 3,4356 kg/ha, 2014 yılında ise 3,481 kg/ha olarak gerçekleşmiştir (FAO 2017).

Türkiye'de ceviz üretim alanı 2000 yılında 59 000 hektardan 2014 yılında 69 365 hektara; üretim miktarı 116 000 ton'dan 195 000 tona yükselmiştir. Ağaç sayısı 2000 yıllında 5 040 000 iken, 2016 yılında 15 044 000 yükselmiş, meyve verecek yaştaki ağaç sayısı ise 8 171 000 adettir (TÜİK 2017).

Türkiye'de 2013 yılı verilerine göre bölgelere göre ceviz ağacı sayısının dağılımı incelendiğinde ilk sırada Ege (1 998 676) yer alırken, bu bölgeyi Karadeniz (1 836 156), Akdeniz (1 347 312), Orta Anadolu (1 290 428) ve Marmara Bölgesi (1 216 300) izlemektedir. Ağaç sayısı bakımından iller karşılaştırıldığında Hakkâri (263 250), Bitlis (229 365), Van (206 863), Malatya (205 995), Bingöl (163 359), Erzurum (139 404), Elazığ (124 335), Erzincan (100 022), Tunceli (81 955) ve Muş (15 266) ilk on içerisinde yer alan illerdir (TÜİK 2014).

Dünyada olduğu gibi ülkemiz tarımında da önemli bir yer tutan cevizde verim ve kalite artışı üzerinde, çeşit-anaç seçimi, iklim ve coğrafi özellikler, iklim özelliğine uygun çeşit seçimi, uygulanan tarım sistemi yanında bu kültür bitkisindeki zararlı ve hastalıklarda belirleyici faktörlerdendir. Nitekim ceviz bitkisinde 2 virüs (Cherry leaf roll virus (CLRV); Walnut ring spot virus (CLRV), 4 bakteri hastalığı (*Xanthomonas arboricola* pv *juglandis, Agrobacterium tumefaciens, Erwinia rubrifaciens, Brenneria nigrifluens* (Yun and Harrington 2011; APS 2017) ve 9 önemli fungal hastalık rapor edilmiştir (APS 2017). Rapor edilmiş olan bu hastalık etmenleri içerisinde en tahripkârlardan birisi ise etmeni bir fungus olan Antraknoz (*Ophiognomonia leptostyla*) hastalığıdır (Black and Neely 1978a,b; Belisario *et al*. 2001).

Dünyada ceviz yetiştiriciliğinin yapıldığı her yerde yaygın olan antraknoz (Eşeyli: *Ophiognomonia leptostyla* (Fr.) Sogonov; eşeysiz: *Marssoniella juglandis* (Lib.) Höhn.); Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Sordariomycetidae, Diaporthales takımı, Gnomoniaceae familyası; *Ophiognomonia* cinsi içerisinde yer alan bir askomysetes türü olup, özellikle Akdeniz iklimine sahip ülkelerde daha tahripkâr olan fakültatif patojendir (Sogonov *et al*. 2008; Belisario *et al*. 2008).

Hem eşeyli hemde eşeysiz formu olan fungus kışı kahverengi-siyah renkli peritesyumlar halinde (Eşeyli formu: *O. leptostyla*) yere dökülen yapraklardaki stroma dokusunun içerisinde geçirmektedir (Belisario *et al*. 2001; Belisario *et al*. 2008).

Her peritesyum içerisinde küçük kesecikler halinde askuslar, her askus içinde de düz ve bazen de hilal şeklinde 8 adet şeffaf askosporlar bulunmaktadır. Askosporlar iki hücreli olup aralarında septa mevcuttur (Sogonov *et al*. 2008). Fungusun peritesyumları ışıksız ortamda teşekkül etmekte, olgunlaşmaları için uzun süre soğuk ortama ihtiyaç duymakta, en uygun olgunlaşma 7-10 ^{o}C'de gerçekleşmekte, 20 ^{o}C'de ise tam olgunlaşmamış peritesiyumlar elde edilmektedir (Matteoni and Neely 1979; Belisario *et al*. 2008).

İlkbaharın nemli ortamında peritesyumlardan dışarıya fırlatılan askosporlar rüzgâr vasıtasıyla yayılmak suretiyle ceviz yapraklarıyla temas edip pirimer enfeksiyonu başlatmaktadırlar (Black and Neely 1978a,b; Belisario *et al*. 2001; Belisario *et al*. 2008).

Askosporların yayılışı Nisan ayının sonundan Haziran ayının ilk günlerine kadar devam etmekte ve nemli havadan bir saat sonra başlayıp 4-6 saat içinde en yüksek düzeye ulaşmaktadır. Dağılma için en uygun sıcaklık değeri 10°C civarı olup yağmur sporların serbest kalmasında, rüzgâr ise yayılmasında en önemli rolü oynamaktadır. Yaz döneminde yağış fazla ve sık olursa, fungusun eşeysiz konidiospor oluşumu hızlanmakta, bu döngünün bir kaç yıl aralıksız tekrar etmesi durumunda enfeksiyon şiddeti artmakta, ağaçların kuruma ve ölme süreci hızlanmaktadır (Black and Neely 1978a,b; Cline and Neely 1983).

Fungusun eşeysiz formu olan *Marssoniella juglandis*'in aservullusları genelde yaprakların alt kısmında epidermisin altında sarı-kahverengi veya koyu-kahverengi renkte pseudoparankima dokusu üzerinde gelişmektedir.

Pseudoparankima dokusu üzerinden ip şeklinde dik, renksiz, düzensiz dallanmalar gösteren koniodiforlar, konidoforlar üzerinden de hilal şeklinde, 2 hücreli, renksiz 14-24 x 2-3 µm boyutlarında konidiosporlar teşekkül etmekterdir (Sogonova *et al*. 2008).

Askosporların başlattığı pirimer enfeksiyon sonucu Mayıs ayının başından itibaren yapraklarda siyah lekeler, lekeler üzerinde de aservulluslar gelişmektedir. Aservulluslar içerisinde çok sayıda fungusun eşeysiz üreme formu olan konidiler teşekkül etmekte ve

Haziran'dan sonbahara kadar sekonder efeksiyon konidiosporlar ile gerçekleştirmektedir (Black and Neely 1978a,b).

Yağmur damlaları hem sporların serbest kalmasında hemde enfeksiyonun gerçekleşmesinde önem taşımaktadır. Yaprakların yüzeyi 6 saatten fazla nemli kalırsa enfeksyonun gerçekleşmesi için optimum şartlar sağlanmış olmaktadır. Şayet nem oranı düşükse sporlar yaprakların üzerinde en fazla iki hafta canlı kalabilmektedir. Enfeksiyon ve hastalık gelişimi için en uygun sıcaklık 21°C, bağıl nem ise %96-100'dür. Simptomlar ise inokulasyondan 14-21 gün sonra görünür hale gelmektedir (Black and Neely 1978).

Antraknoz bitkinin tomurcuk, yaprak, meyve kabuğu, çiçek sapı ve genç dallarında enkfeksiyona neden olmaktadır (Berry 1970). Yapraklar üzerinde yaklaşık 5 mm çapında küçük koyu kahverengimsi-siyah lekeler meydana gelmekte ve lekeler iç içe yuvarlak bir şekilde gelişmektedir. Nemli ve yağmurlu havalarda simptomlar hızla gelişmekte, lekelerin sayısı artmakta, ebatları genişlemekte, takiben birbiriyle birleşerek yaprak yüzeyinde daha büyük lekelere dönüşmekte ve yapraklar olgunlaşmadan dökülmektedir. Hastalıkla mücadele yapılmadığı durumlarda ise ağaçlar yıldan yıla zayıflayıp kurumaktadır. Fungusun yaprak sapı ve meyvelerdeki simptomları da yapraklardakine benzer gelişim göstermektedir. Fungus sürgünlerde ise yamuk, yuvarlak, açık renkli veya gri-kahverengi renkte içe çökmüş ölü dokulara neden olmaktadır (Black and Neely 1978; Belisario *et al*. 2001).

Antraknoz hastalığı ile etkili bir mücadelede pirimer inokulum kaynağının azaltılması açısından enfekteli dalların budanması, yere dökülen yaprakların ve meyvelerin toplanıp yakılması, bahçe tesis edilirken dikim sıklığının hava sirkilasyonunu sağlayacak şekilde olmasıdır (Berry 1960; Berry 1977); aşırı azotlu gübre verilmemeli, ağaçların susuz bırakılmaması (Neely 1981); enfeksiyon seyrine göre doğru zamanda ve gerekli sayıda ilaçlı mücadele yapılması önerilmektedir (Belisario *et al*. 2008). Her ne kadar zararlı ve hastalıkların kontrolünde kimyasal mücadelenin uygulaması kolay ve etkisi hızlı olsa da uzun vadede hastalık etmenlerinin ilaçlara karşı dayanıklılık kazanması, biyolojik denge üzerindeki olumsuz etkileri, su ve toprak kirliliğine neden olması gibi dezavantajlarından

dolayı mecbur kalınmadıkça uygulanmaması gerektiği bilinen bir gerçektir. Diğer taraftan ceviz ağaçlarının 25 metreye kadar boya ulaşması ağacın üst kısımlarının etkili şekilde ilaçlanmasını zorlaştırmakta, üst dallardaki enfekteli yapraklar ilerleyen süreçte hastalık için inokulum kaynağı olarak rol oynamaktadır.

Bu nedenle dayanıklı çeşitlerin belirlenmesi hastalık etmenleri ile mücadelede kullanım açısından önemli olduğu kadar ıslah çalışmaları, mülkiyet haklarının korunması çeşitlerin orijinlerinin bilinmesi açısından da önem taşımaktadır (Nicese *et al*. 1998). Zira meyve ağaçları gibi çok yıllık bitki türlerinde çeşitlerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine dayalı olarak karakterizasyonları hem zaman gerektirici hem de çevresel faktörlerden etkilendiği için yanıltıcı olabilmektedir (Nicese *et al*. 1998). Dayanıklı çeşitlerin belirlenip kullanılmasında, öncelikle çeşitlerin dayanıklılık gen yada genlerini taşıyıp taşımadıklarının, taşıyan çeşitlerin hassasiyet ve dayanıklılık durumlarının tespit edilmesi, ticari değeri yüksek dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar için temel veri oluşturmaktadır.

Geçmiş yıllarda teknoloji ve gen bankasındaki verilerin yetersizliğinden dolayı gerek patojenlerin farklı ırklarının belirlenmesine gerekse bitki çeşit ve varyetelerinin genetik düzeyde dayanıklılık genleri taşıyıp taşımadıklarının hassas bir şekilde tespitinde sorunlar yaşanırken, günümüzde nispeten temel genetik verilerdeki artış ve teknolojideki gelişmeyle birlikte bu tip sorunlar kısmen de olsa aşılmaktadır.

Bununla birlikte hem bitkilerin tür ve çeşit, hem de patojenlerin tür ve ırk bazında yeteri kadar kısmi ve ful genom haritalarının çıkarılamamış olması; genlerin yerleri, fonksiyonları, birbiriyle olan ilişkileri ile konukçu-patojen arasındaki interaksiyonların tam olarak çözümlenememesi, patojen yada patojenlere karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinin önündeki engellerin başında gelmektedir.

Patojene karşı dayanıklılıkta, hücresel düzeyde hücre duvarının kalınlaşması ve stomaların kapanması yada antimikrobiyal madde üretilmesi şeklinde ortaya çıkmaktadır. Enfeksiyona karşı ilk reaksiyon enfeksiyondan 30-120 saniye içerisinde plazma

memranında iyon değişimi, iyonların (H^+, K^+, Cl_2, ve Ca^{2+}) hızlı bir şekilde membran üzerinde birikmesiyle gerçekleşmektedir (Garcia-Brugger *et al*. 2006). Bunu da plazma membranında reaktif oksijen (reactive oxygen species: ROS), nitrojen oxite (NOI), salisilik asit (SA), jasmonic acid (JA), ethilen sentezi, PRR fosforulasyonu, G-protein moleküllerinin değişimi, oksidasyon artışı ve protein kinase gibi reaksiyon olarak sentezlenen bileşiklerin hücreden hücreye plasmodesmata veya fleom yoluyla akışı takip etmektedir (Dangl and Jones 2001; Jelenska *et al*. 2007; Du *et al*. 2009; Qi *et al*. 2010; Nomura *et al*. 2012).

Moleküler düzeyde ise dayanıklılık ilk aşamada patojenlerin hücre membranı üzerindeki reseptörler tarafından (pattern recognition receptors: PRRs) tanınması, ikinci aşamada ise hücre içerisinde yer alan moleküllerin direkt yada dolaylı olarak cevap niteliğinde sentezlenip patojenin virülanslığının azaltılması yada yok edilmesi şeklinde ortaya çıkmakta (Dangl *et al*. 2013); ve reaksiyon farklı patojenlere karşı farklı moleküler effektörlerin (virulence effector) ortaya çıkması ile vuku bulmaktadır (Jones and Dangl 2006). Aktivatörler ise hücre içerisinde R genlerden kodlanmakta ve bunlar nucleotide binding (NB) ve leucine rich repeat (LRR) bölgelerini tetikleyip R genler ve dayanıklılık genelerin çalışmasına neden olmaktadır (Dangl and Jones 2001).

Bu amaçla bitkilerin genetik olarak dayanıklılığını sağlayan gen yada genleri içerip içermediğinin yanı sıra, dayanıklılık genlerinin önceden uyarılmasının hastalıkların kontrolünde ve gelişiminin yavaşlatılmasında kullanılabileceği yönündeki çalışmaların önemini artırmıştır. Zira R genlerinin uyarılması bitkilerin savunma sistemlerini uyarmaktadır (Seehalak *et al*. 2011). Bu açıdan, dayanıklılık genlerinin aktivasyonu hastalık kontrolü için alternatif yöntemlerden birisi olabileceği kaydedilmiştir (Kar *et al*. 2013).

Patojen yada patojenlerin PRRs, PAMPs yada MAMPs ile tanımlanması, PAMP-triggered immunity (PTI) sistemin çalışmasına bunun sonucunda da enfeksyonun gerçekleştiği dokularda hücre ölümlerinin (Hypersensitive Reaksiyon: HR) yada effektör genlerinin kapatılması şeklinde ortaya çıkmaktadır (Jones and Dangl 2006).

Patojen yada ırklarına karşı elde edilen dayanıklılığın stabilitesi ve etkinliği ise patojene yada patojenin ürünlerine karşı, R gen ürünlerinin etkinliği ile dayanıklılığın kırılmasını sağlayan avirülans gen yada genlerin değişimiyle gerçekleşmektedir. Sistemik dayanıklılık (Systemic Acquired Resistance: SAR) mekanizması ise enfeksiyonun gerçekleştiği yere enfekte olmayan uzak bir noktadan patojenlerin saldırılarından korunma reaksiyonudur (Durrant and Dong 2004). Bu tip dayanıklılık uzun zaman sonra kazanılan ve organizmanın her hücresini koruma yetisinde olan dayanıklılık tipidir ve bunun için proteinlerin kodlanmasını düzenleyen genlere ihtiyaç vardır (Park *et al*. 2007; Fu *et al*. 2012). Bu nedenle son yıllarda üzerinde durulan bir diğer alan hastalıklara karşı dayanıklılık yada hassasiyette bitkilerin taşıdıkları yada taşımadıkları genlerin ve bu gen bölgelerinin saptanıp fonksiyonlarının ortaya konulmasına yöneliktir.

Dayanıklı gen analokları (RGAs: Resistance Gene Analogs) arasındaki benzerlikler onların kolay bir şekilde farklı bitki türlerinde belirlenebilmesinin yolunu açmıştır (Lu *et al*. 2011; Fahrentrapp *et al*. 2012). Bu amaçla RAPD DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNAs) (Williams *et al*. 1990, 1993; Woeste *et al*. 1996; Nicese *et al*. 1998; Woeste *et al*. 2002); RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Aly *et al*. 1992; Fjellstrom and Parfitt 1994); ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) (Potter *et al*. 2002; Woeste *et al*. 2002; Karimi *et al*. 2010); AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) (Vos *et al*. 1995; Powell *et al*. 1996; Kafkas *et al*. 2005; Bayazit *et al*. 2007); SAMPL (Selective Amplification of Microsatellite Poliymorphic Loci) (Witsenboer *et al*. 1998); PCR ve hibridizasyon (Scarano *et al*. 2002); SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (Ciarmiello *et al*. 2011); SSR (Simple Sequence Repeats) (Staub *et al*. 1996; Gupta and Varshney 2000; Dangl *et al*. 2005; Foroni *et al*. 2005; Victory *et al*. 2006; Wang *et al*. 2008; Pollegioni *et al*. 2009; Karimi *et al*. 2010); tekniklerinden biri veya birkaçı birlikte hem bitki tür ve çeşitleri hemde patojen ve ırklarının tespitinde kullanılmaktadır.

Cevizin kendine döllenebilmesi olması yanında yabancı döllenmeye açık olması, polen uyuşmazlığının olmaması, doğal şartlarda tohumla çoğalması, farklı iklim özelliklerine sahip geniş bir coğrafyaya yayılmış olması fenotipik ve genotipik olarak geniş bir gen

havuzunun oluşmasına katkı sağlayarak farklı araştırma merkezlerinde verimli ve kaliteli çeşitlerin elde edilmesine yönelik kaynak oluşumunu sağlamaktadır (Tulecke and McGranahan 1994; Fornari *et al.* 1999; Krueger 2000; Polito *et al*. 2005; Karimi *et al.* 2010).

Bununla birlikte cevizlerde *Juglans nigra* ve *J. regia* türleri arasında antraknoz hastalığına karşı dayanıklı tür bulunmadığı, yalnızca hassasiyet farklılıklarının olduğu (Funk *et al*. 1981; Woeste and Beineke 2001; Anselmi *et al*. 2006); hassasiyetteki farklılıkların ise bitki yapraklarının olgunlaşma ve gelişme döneminin pirimer enfeksiyon ile eş zamanlı gerçekleşmemesinden, patojen ve konukçunun iklim faktörleri ya da çeşit özelliklerinden kaynaklanan biyolojik uyumsuzluklarından ileri gelebileceği, bununda hastalık şiddetini azaltan pasif dayanıklılık olarak kabul edilmesi gerektiği belirtilmiştir (Burdon 1987; Razdan and Gupta 2009).

Ceviz antraknozunun farklı ırklarının olup olmadığı ile ilgili yapılmış çalışmalarda net bir veri şu ana kadar ortaya konulamamıştır. Nitekim fungusun popülasyon içinde genetik farklılıklarının olup olmadığı PCR-RFLP ile 176 izolat kullanılarak 18srDNA'ya göre hiç bir farklılık belirlenememiştir (Belisario and Hubbs 1997). Buna karşın fungusun farklı izolatlarının virülanslıklarının, laboratuvar ortamında koloni gelişim hızlarının farklılıklar göstermesi, düşük rakımlı sıcak ve nemli bölgelerden toplanan izolatların virülanslıklarının daha yüksek olduğunun saptanmış olması gerçeğine dayalı olarak bu fungusun farklı ırklarının olma ihtimali üzerinde durulmuştur (Dastjerdi and Hasani 2010).

Bu tez çalışmasında:

Çoruh Vadisi Ceviz popülasyonunda antraknoz (*Ophiognomonia leptostyla*) hastalığı etmeni fungusun yaygınlık durumunun ortaya konulması;

Fungusun simptomatolojik ve klasik tanı yöntemlerine (Sogonov *et al*. 2008) ilaveten PCR ile tanılanması;

PCR ürünlerinin sekans analizi ile nükleotit dizilimlerinin belirlenmesi;

Farklı lokasyonlardan toplanan fungus izolatlarının besi ortamlarında morfolojik özelliklerine göre kendi aralarında mukayesesi;

Ticari değeri yüksek bazı ceviz çeşitlerinin hastalıklara karşı dayanıklılık geni (R-Gen) içerip içermediklerinin PCR ile tespiti ve amplifiye edilen bölgenin nükleotit dizilimlerinin belirlenmesi;

Salisilik asit, Nitrit oksit, borik asit ve absisik asit gibi aktivatörlerin antrkanoz hastalığın şiddeti üzerine etkilerinin olup olmadığının patojensite testleri ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Diğer bitki türlerinde olduğu gibi cevizde de antraknoza karşı dayanıklılık çalışmaları başlangıçta gözlemlere dayalı olarak gerçekleştirilmiştir.

Revin (1981), Ukrayna'nın farklı lokasyonlarından seçilmiş 112 yerel çeşitten 19'unun yüksek düzeyde antraknoz hastalığına karşı dayanıklık gösterdiğini kaydetmiştir.

Black and Neely (1978), sera şartlarında siyah ceviz fidanlarının yapraklarına *Marssonia juglandis* konidilerini süspansiyon haline uyguladığında enfeksiyonun 27°C de başladığını, 32°C de gerçekleşmediğini, 10-15°C'de yavaş geliştiğini, enfeksiyon için en uygun sıcaklığın 21°C, nispi nemin %98±2 olduğunu, hastalığa karşı tam dayanıklı çeşitlerin bulunmadığını, ancak bazı çeşitlerin daha az etkilenmesinin geç yaprak açmasından kaynaklanabileceğini kaydetmişlerdir (Balaz *et al*. 1993). Nitekim, erken yaprak ve çiçek açan çeşitlerin özellikle ilkbaharın yağmurlu geçtiği yıllarda hastalıktan daha fazla etkilendiklerini belirtmişlerdir (Mulerean and Schroth 1982; Olson *et al*. 1997).

Balaz *et al*. (1993), 37 farklı ceviz genotipinin antraknoza karşı dayanıklık durumlarını arazi şartlarında araştırdıklarında tam olarak dayanıklık genotip bulunmamasına ragmen, bazı çeşitlerin geç yaprak oluşturduğu için diğerlerine göre nispeten hastalıktan daha az etkilendiğini gözlemlemişlerdir.

Belisario *et al*. (1997), İtalya'dan topladıkları 176 *O. leptostyla* izolatları arasında farklılık olup olmadığını belirlemek için ITS primerlerinin amplifiye ettiği bölgeyi RFLPs tekniği ile analiz ettiklerinde, izolatlar arasında farklılık olmadığını belirlemişlerdir.

Belisario and Hubbs (1997), İtalya'da antroknoz hastalığı etmeni fungusunun farklı ırklarının olup olmadığını belirlemek amacıyla farklı lokasyonlardan topladıkları 176 izolatın 18srDNA'sını (small-subunit ribosomal DNA) ITS (Internal transcribed spacer)

primerlerini (ITS1 ve ITS4) kullanarak PCR ile amplifiye ettiklerinde bütün izolatlardan 600 bp uzunluğunda fragmentler elde ettiklerini ve fragmentleri 11 farklı enzim kullanarak (*Alu* I, *Bgl* II, *Cla* I, *EcoR* I, *Hpa* II, *Msp* I, *Nar* I, *Pst* I, *Rsa* I, *Sca* II ve *Sma* I) RFLP ile analizine tabi tuttuklarında izolatlar arasında herhangi bir farklılığın belirlenemediğini rapor etmişlerdir.

Pastore *et al*. (1997), İtalya'nın iki farklı iklim özelliğine sahip lokasyonda yetişen *J. nigra* ve *J. hindsii* ceviz türlerinin antraknoza karşı hassasiyet ve dayanıklılık durumlarını patojenite testleriyle araştırdıklarında *J. nigra* ve *J. hindsii* aşırı derecede hassas buna karşın *J. cinerea* ve *J. sieboldiana* türlerinin ise yüksek derecede dayanıklılık gösterdiğini belirlemişlerdir.

Pastore *et al*. (1997), 7'si ABD, 8'i Fransa, 7'si İspanya, 7'si İtalya, 1'i Portekiz ve 2'si Yunanistan'a ait olmak üzere toplam 32 ceviz çeşidinin *O. leptostyla*'ya karşı dayanıklılık durumlarını test ettiklerinde hiç bir çeşidin *O. leptostyla* dayanıklı olmadığını sadece çeşitler arasında hassasiyet farklılarının bulunduğunu kaydetmişlerdir.

Nicese *et al*. (1998), Randomly Amplified Polymorfizm DNA (RAPD) markırlarının ceviz çeşitlerinin ayrımında ve karakterizasyonunda kullanılıp kullanılamayacağını belirlemek amacıyla on dokuz (19) ceviz çeşidi kullanmışlar ve herbir çeşit için ebeveylerle ortak özellikleri belirleyip RAPD markırlarının çeşitler arasındaki benzerlik ve farklılıkların tespitinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Belisario *et al*. (2001), İtalya'da *J. regia* cv lara çeşidinden 8 yaşındaki ağaçlar üzerinde antraknoz hastalığının epidemisini araştırmak amacıyla ilaçlamanın yapılmadığı 24 ağaç seçip her 15 günde bir 3, 5 ve 7 metre yüksekliğinden Haziran-Eylül arasında 12 yaprak örneği alıp yapraklar üzerindeki lekelerin alanı (mm^2) ve sayısı ile her lekedeki aservulusları saymışlardır. Araştırmanın sonucunda, yaprakların tamamında lekelerin belirlendiği, leke sayısının yaz dönemi boyunca arttığı, leke sayısının yaprakların alındığı pozisyonla ilişkisi olmadığı, Ağustos ayında aservullus sayısının arttığı ve Eylül ayına

kadar bu artışın devam ettiği, Haziran'da 1-2 mm olan leke çapının Ekim ayı başında 20 mm'ye ulaştığı, leke sayısının da 1-2'den 60 ulaştığını belirlemişlerdir.

Potter *et al*. (2002), ISSR tekniğinin ceviz çeşitlerinin ayrımında kullanılabilirliğindeki etkinliği belirlemek için 4 çeşidi 47 ISSR pirimeriyle taradığı çalışmada bu tekniğin ceviz çeşitlerinin ayrımında kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Saremi *et al*. (2002), Doğal şartlarda bahçe içerisinde antraknoz hastalığına hassas çeşitlerin olması enfeksiyonun yayılmasını hızlandırdığını, dayanıklı çeşitlerin tespitindeki en önemli parametrelerden birisinin ise ağaç yapraklarının dökülme oranı olduğunu belirterek enfeksyon seviyesinin %90 olmasına rağmen yaprak dökülmesinin %10 düzeyinde kaldığı çeşitlerin antraknoza dayanıklı çeşit olarak tanımlanabileceğini rapor etmişlerdir.

Kafkas *et al*. (2005), Türkiye'de ticari olarak üretim potansiyeli taşıyan 21 ceviz çeşidinin ayrımında AFLP ve SAMPL tekniklerini 8 pirimer kombinasyonu kullanarak (6 pirimer AFLP, 2 pirimer SAMPL) araştırmışlar ve SAMPL tekniğinin çok yakın akraba çeşitlerin ayrımında AFLP'den daha hassas olduğunu tespit etmişlerdir.

Anselmi *et al*. (2006), İtalya'da 8 ceviz çeşidinin antraknoz hastalığına karşı dayanıklılık durumlarını araştırdıklarında hastalığa karşı dayanıklı çeşit olmadığı sadece hassasiyet farkı bulunduğu, hassasiyet durumuna göre Ponte Biforco ve Carda çeşitlerinin araştırmada kullanılan çeşitler arasında en toleranslı; Borgo, Alla, Collina çeşitlerinin orta; Rifiglio, Poneta, Poppi, Arcidosso, Scopetone ve Arboreto ISSA çeşitlerinin ise düşük seviyede toleransa sahip olduklarını belirlemişlerdir.

Aslantaş (2006), meyve özelliği, verim, soğuğa ve antraknoza dayanıklılık gibi kriterler açısında Kuzey Doğu Anadolu bölgesinde 39 000 ceviz ağacını gözlemlediğinde CVWS 13, 46, 138, 150 ve 193 genotiplerininin bu özellikler açısından ıslah çalışmalarında kullanılabileceğini kaydetmiştir.

Bayazit *et al*. (2007), Türkiye'nin Akdeniz Bölgesine adapte olmuş 22 ceviz çeşidinin düşük sıcaklığa daynaklılıkta genetik ilişkisini beş AFLP pirimer kombinasyonu ile araştırdığında genetik bazda çeşitler arsındaki genetik varyasyonun dar olduğunu belirlemişlerdir.

Annunziati *et al*. (2007), İtalya'da *J. regia, J. nigra, J. major* türleri ile bu çeşitlerin hibritleri olan NG23 (*J. nigra* N23 x *J. regia*) ve MJ209'un (*J. major* x *J. regia*) çalışmada 15 yaşındaki ceviz ağaçlarından 15'er yaprak toplayarak nekrozlu lekelerin sayısı ve alanlarını baz alarak antraknoza karşı dayanıklılıklarını test etmişlerdir. Araştırma sonucunda *J. nirga*'nın dayanıklı, hibridlerin orta derecede dayanıklı, NG23 hibridi antraknoz hastalığına karşı *J. nigra*'ya benzer bir şekilde dayanıklılık gösterdiği ve NG23 hibridinin *J. nigra*, MJ209'un ise *J. regia*'ya yakın hassasiyete sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Belisario *et al*. (2008), İtalya'da ceviz yetiştiriciliği yapılan 13 farklı lokasyondan 191 antraknoz (*Ophiognomonia leptostyla*) izolatı toplayıp bu izolatların bölgelerin yükseklik, sıcaklık ve yağış durumuna göre gruplandırıp *in vitro* şartlarda fungusun gelişimi ile sporlanması üzerine farklı sıcaklık değerlerinin (10, 15, 20, 25 ve 30ºC) etkilerini araştırdıklarında yüksek rakımlı ve erken ilkbaharın serin geçtiği yerlerden toplanan izolatların diğerlerine oranla daha yavaş geliştiği; dört guruba ayrılan bütün izolatların en fazla 22ºC'de karanlıkta, inkubasyondan 21 gün sonra aservulus oluşturmaya başladıkları ve 2 ay içerisinde gelişimlerini tamamladıklarını gözlemlemişlerdir. Diğer taraftan 20 ve 25ºC'de konidi oluşurken 10, 15 ve 30ºC'de oluşmadığı; askus ve askospor oluşumunun 10ºC'de karanlıkta ve yaklaşık 3 ay içerisinde oluştuğunu gözlemlemişlerdir.

Salehi and Jamshidi (2009), İran'ın 3 farklı bölgeden (Miyaneh, Marand ve Karaj) topladıkarı izolatları 8 farklı besiyerinde (BAB: Blood Agar Base, OMA: Oat Meal Agar, MA: Malt Agar, NA: Nutrient Agar, PDA: Potato Dextrose Agar, CMA: Cornmeal Agar, WLEA: Walnut Leaf Extract Agar ve WLEOMA: Walnut Leaf Extract Oat Meal Agar), 21ºC sıcaklıkta, %50 bağıl nemde, 12 saat ışık ve 12 saat karanlık ortamda geliştirip

kolonilerin gelişimlerini 2, 3, 6, 9, 14 ve 21'nci günde kaydetmişlerdir. Bu sürelerde kolonilerin arasında morfolojik, renk ve gelişme açısından karşılaştırdıklarında izolatlardan birisinin ceviz yaprağı besiyerinde olgunlaşmamış peritesler oluşturduğu, iki izolatın PDA, WA, CMA ve OMA üzerinde bile aservul üretmediği, bütün izolatların WLEA ve WLEOMA üzerinde aservulus ve olğunlaşmamış peritesyumlar oluşturduğu, bütün izolatların OMA üzerinde en yüksek gelişim hızı gösterdikleri ve en fazla misel yoğunluğuna ise PDA üzerinde ulaştıklarını belirlemişlerdir.

Salehi *et al*. (2009), antraknoz etmeni fungusun genetik varyasyonlarını araştırmak için 60 izolattın 18s-SrDNA ve ITS bölgesini PCR ile amplifiye edip RFLP ile analiz ettiklerinde izolatlar arasında farklılık olmadığını kaydetmişlerdir.

Wang *et al.* (2008), Çin'in Orta ve Güney-Batısından 5'i *Juglans regia* ve 4'ü *Juglans sigillata* Dode olmak üzere dokuz çeşit arasındaki genetik ilişkileri ortaya koymak amacıyla SSR markırları kullanarak yaptıkları araştırmada çeşitler arasında hetorejenliğin orta düzeyde olduğunu (%18,6) ve bu bölgenin gen kaynaklarının korunmasında kullanılabiceğini belirtmişlerdir.

Arnaudov and Gandev (2009), Chandler (A) çeşidin dayanıklı, 5 çeşidin (Fernor: F, Tiszacsecsi: H, Fernette: F, Silistrenski: B ve Milotai: H) biraz hassas, 4 çeşidin (Kuklenski: B, Hartley: A, Sorento: I ve Lara: F) hassas, 3 çeşidin (Sheinovo: B, Izvor: B, ve Silvenski: B) çok hassas ve 2 çeşidin ise (Alososzentivani: I ve Seer: A) aşırı hassas olduğunu; enfeksiyon şiddetinin ise %4,9 (Chandler) ile %62,4 (Alsoszentivani) arasında değiştiğini belirlemişlerdir.

Dastjerdi *et al*. (2010), sera şartlarında 11 farklı ceviz çeşidinin (Farnquette, Hartley, K72, Lara, RDM, Pedro, Serr, Vina, Z60, Z63 ve Z67) antraknoza karşı dayanıklılık durumlarını belirlemek için fungus sporlarını süspansiyon halinde (10^5 spor/mL yapraklara uyguladıklarında konidilerin yaprakların üst kısmında daha fazla çimlendikleri, ilk simptomların Z60 ve Hartley çeşitlerinde enfeksyondan 4 gün sonra oluşmaya başladığı, eşeysiz üreme yapılarının efeksiyondan 27 gün sonra K72 çeşidinde

oluştuğu, çeşitler arasında lekelerin sayısı ve boyutları arasında önemli farklılıkların gözlendiği, en şiddetli enfeksyonun Z60, K72 ve Hartley çeşitlerinde, en düşük ise Vina, Ronde de Montignac çeşitlerinde gerçekleştiğini kaydetmişlerdir.

Karimi *et al.* (2010), İran'da SSR tekniği ile *Juglans regia*'nın doğal popülasyonundaki genetik yapı ve çeşitliliğini araştırdıkları çalışmalarında 11 mikro klimadan sekiz popülasyondan toplam 105 *J. regia* örneği alıp popülasyon içerisindeki genetik varyasyonu incelendiklerinde popülasyon içersindeki genetik farklılığın %12 oranında olduğunu belirlemişlerdir.

Minaji *et al*. (2010), antraknoz etmeni fungusun genetik olarak farklılıklar taşıyıp taşımadıklarını belirlemk amacıyla İran'nın Kuzeydoğusundan topladıkları 26 izolatı ITS1-ITS4 (ITS) ve NS1R-LR13R (IGS) primer çiftlerini kullanarak PCR ile amplifiye ettiklerinde sırasıyla 600 ve 2300-2320 bp uzunluğunda bantlar elde ettiklerini *Ecor*I, *Hind*III, *Tag*I, *Hinf*I ve *BamH*I enzimleri ile kesime tabi tuttuklarında ITS ürününde *Ecor*I, *Tag*I ve *BamH*I, IGS bölgesinde ise *Hinf*I ve *BamH*I enzimlerinin kesim yapmadığını belirlemişlerdir. Diğer taraftan bant sayısı ve konumuna göre 4 farklı grup oluştuğu, ITS ürününde *Hinf* I'ün 335+265 bp'lik iki fragment verdiği, *Hind* III'ün bazı izolatlarda kesim yapmadığı, bazılarında ise 350+250 bp ve 300+250+50 bp'lik fragmentler verdiğini, IGS ürünlerinde ise *Ecor*I'in 400+500+1400, *Tag*I'in 100+1000+1200, *Hind* III'ün ise 150+400+800+950 bp'lik fragmentler verdiklerini tespit etmişlerdir.

Salehi and Jamshidi (2009), Franquet, Hartley, K73, Lara, Pedro, Round, Serr, Vina, Z63, Z60 ve Z67 çeşitlerinin antraknozun 3 farklı izolatına karşı dayanıklılık durumlarını araştırmak amacıyla izolatların konidilerini 10^5 oranında seyreltip fidanların yaprakları üzerine düzenli bir şekilde spreyle püskürtüp 48 saat 21±2°C sıcaklıkta, sera ortamında ve poşet altında muhafaza edip iki ay boyunca yapraklarda oluşan leke sayısı ve çapını ölçtüklerinde inokulasyondan iki hafta sonra yapraklarda mikroskopik simptomların görünmeye başladığı ve tohumdan gelişen fidanlarda hastalık şiddetinin daha yüksek seyrettiğini tespit edilmiştir.

Saremi and Amiri (2010), İran'da 15 farklı ceviz varyetesinin antraknoza karşı dayanıklılık durumunu sera şartlarında araştırdıklarında sadece bir varyetenin (Alamoty) dayanıklılık gösterdiğini, bu çeşidin yapraklarında hiç bir lekenin oluşmadığını fakat bu varyetenin de ticari üretim potansiyeline sahip olmadığını, cevizlerde antraknoza karşı dayanıklılık da hassasiyet üzerinde iklim şartlarının da etkili olabileceğini belirterek, aservulus üretiminin sıcaklığın artmasıyla artış gösterdiği; enfeksyon şiddetinin ise tohumdan elde edilen çeşitlerde anaçlardan elde edilenlere göre daha yüksek düzeyde seyrettiğini rapor etmişlerdir.

Ciarmiello *et al.* (2011), *J. regia*'nın sipesifik karakterizasyonu için farklı coğrafik bölgelerden topladıkları 18 ceviz çeşidini ITS1 ve ITS2 pirimerlerini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. rRNA'sının 5.8S bölgesi için ITS1'in 257 ve 263, ITS2'nin 217 ile 219 baz fragment verdiği; GC içeriğinin ITS1 için %55–56.7, ITS2 için %57.1–58.9 oranında olduğunu, ITS1-5.8S-ITS2 sekans diziliminde 244 tek nükleotit polimorfizmi ve ITS1'in 5' ucunda 1 baz silinmesinin vuku bulduğunu (1 short insertion–deletion), ITS1 ve ITS2 bölgelerinin ceviz çeşitlerinin ayrımında ve filogenetik analizler için kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Mianji *et al*. (2011), İran'daki *O. leptostyla* fungusununun genetik farklılarını araştırmak için 600 bp'lik fragment veren ITS (ITS1-ITS4 primerleri) ve 2300-2320 bp'lik fragment veren IGS (NS1R-LR13R primerleri) primerlerinden elde edilen PCR ürünlerinin 5 restriksiyon enzimi kullanılarak gerçekleştirilen (*Eco*RI, *Hind*III, *Taq*I, *Hinf*I, *Bam*HI) RFLP analizi sonucunda ITS primerlerinin bütün izolatlarda amplifiye ettiği bantların sadece *Hind*III ve *Hinf*I enzimleri tarafından kesilerek *Hinf*I'in 265bp ve 235bp'lik bantları oluşturduğunu; IGS pirimerlerinin amplifiye ettiği bölgenin ise *Eco*RI, *Hind*III ve *Taq*I ile kesildiğini *Eco*RI (400bp, 500bp, 1400bp), *Hind*III (150bp, 400bp, 800bp, 950bp) ve *Taq*I (100bp, 1000bp, 1200bp) ve 4 izolat hariç hepsinin ayni bantları oluşturduklarını, 4 izolatın ise diğerlerinden farklı olarak 970 bp'lık bantlar verdiğini tespit etmişlerdir.

Jamshidi *et al*. (2010), İran'nın kuzey bölgelerinden topladıkları 16 *Ophiognomonia leptostyla* izolatını ITS1 ve ITS4 primerleri kullanarak PCR ile amplifiye edip PCR bölgelerinin sekanslarını mukayese ettiklerinde bütün izolatların aynı sadece yabani cevizlerden toplanan üç izolatın kendi içinde bir alt gurupta yer aldığını tespit etmişledir.

Pollegioni *et al*. (2012), 41 siyah ceviz (*J. nigra*) ve 31 İran cevizinin (*J. regia*) ayrımında 4 NBS-primerlerinin amplifiye ettiği fragmentleri *MesI* ve *Rsa*I enzimleri ile kesip fragment sayısı ve büyüklüklerine göre çeşitleri kategorize etmişlerdir.

Pollegioni *et al*. (2012) İtalya'da şansa bağlı olarak morfolojik özelliklerine göre seçtikleri 41 *J. nigra* ve 31 *J. regia* çeşidinin antraknoza karşı dayanıklılık durumlarını belirlemek için 7-10 Ağustos arasında 3, 5 ve 7 m yükseklikten topladıkları yapraklardaki leke sayısı ve boyutlarını inekulasyondan 21 gün sonra analiz ettiklerinde 40 *J. nigra* genotipinin dayanıklı, 1 *J. nigra* ve 31 *J. regia* genotipinin ise hassas olduğunu tespit etmişlerdir.

An and Yang (2014), *Juglans regia*'nın farklı genotiplerinin R gen ve R gen anaologlarının (RGAs: Resistance gene analogs) *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı dayanıklılığı üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla dejenere pirimerler kullanarak yaptıkları araştırmada NBS (nucleotide binding site) ve Serine/threonine kinase geninin yalnızca *Colletotrichum gloeosporioides*'e karşı dayanıklık olan Qing Lin çeşitinde, LRR (leucine-rich repeat) geni hem Qing Lin hemde hassas olan Yuna Lin çeşidinde belirlendiği, dayanıklı F1 hibridlerinde jrRGAPGs gen bölgesi bulunurken, hassas olanlarda jrRGANLs ve jrRGAPTs'in daha yüksek oranda bulunduğu, jrRGAPGs bölgesinin farklı çeşitlerde yüksek seviyede benzerlik gösterdiği ve elde edilen bilgilerin ceviz varyetelerinin antraknoz hastalığına karşı dayanıklık genlerinin tespitinde ve ıslah çalışmalarında kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

An and Yang (2014), dayanıklı gen bölgelerini araştırarken 8 çift primer kullanmışlar ve 3 çift primer seçilmiş olan ceviz genotiplerde çalışmış. Çalışan çift primerlerde, P-loop/GLPL çift primeri NBS bölgesinden 520 bp büyüklükte tek bant, NLRR inv1/inv2

çif primeri LRR bölgesinden 500 ve 2000 bp büyüklükte iki bant ve Pto kin1/kin2 primeri ise STK bölğesinde tek bant yaklaşık 750 bp büyüklüğünde band oluşturmuştur. An and Yang (2014) araştırmasında S1/AS3, RN1 F/RN1 R, S1 INV/S2 INV, LM637/LM638, H1145/H1146 primerler çalışmamıştır.

Arnaudov *et al*. (2014); Bulgaristan'da 5 çeşit Bulgaristan (B), 3 çeşit Fransa (F), 2 çeşit Macaristan (H) ve 3 çeşit ABD olmak üzere seçtikleri 5-8 yaş arasındaki 13 ceviz çeşidine ait fidanların *O. leptostyla*'ya karşı dayanıklılık ve hassasiyet durumlarını araştırmışlardır. Araştırma sonucunda en yüksek yaprak enfeksiyonunu Hartley (%13,9), Milotai (%9), Tiszacsecsi (%9) ve Lara (%8,8) çeşidinde, en düşük oranın ise Fernette (%8), Fernor (%7) ve Chandler (%5,2) çeşitlerinde belirlemişlerdir.

Wang *et al*. (2014), Tibet'de deniz seviyesinden 3000 metre yüksekliğe kadar farklı coğrafi ve iklim koşullarında tohumdan çoğaltılan 86 ceviz (*J. regia*) genotipinin flogenetik analizini morfoloji özellikleri, 12 simple sequence repeat (SSR) loci ve 10 quantitative trait loci (QTLs) kullanarak araştırmışlardır. Araştırma sonucunda 12 SSR pirimer çiftinin 4-19 per locus dan 119 allel amplifiye ettiğini, (range from 4-18 per locus: per locus başına 9,92 allel) ve coğrafik orijinlerine bağlı olarak filogenetik analiz sonuçlarının genotipler arasındaki genetik çeşitliliğin nispeten orta derecede olduğunu ve bu coğrayanın gen kaynaklarının muhafazasında önemli rol oynayabileceğini belirtmişlerdir.

Najafi *et al*. (2015), antraknoz hastalık etmeni *O. leptostyla*'ya karşı Z53, Z60, Z63, Serr, Lara, Farnquette, Pedro, RDM ve B21 çeşitlerinin dayanıklılık ve hassasiyet durumlarını araştırdığında hiç bir genotipin antraknoza karşı dayanıklılık sergilemediklerini tespit etmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Hastalıklı Örneklerin Toplaması

Yukarı Fırat Havzası ve Çoruh Vadisindeki ceviz popülasyonunda antraknoza (*Ophiognomonia leptostyla*) özgü simptom gösteren 188 yaprak örneği Erzurum (Tortum (40), Uzundere, Oltu (24), Olur (19), İspir (6), Pazaryolu (72)), Erzincan (Merkez İlçe (13), Üzümlü (3), Şenkaya (2), Narman (5) illerindeki ceviz ağaçlarından 2014-2016 yıllarında (Haziran-Eylül ayları arasında) toplanmıştır.

Hastalığa özgü simptom gösteren yaprak örnekleri her 1-3 km'de bir durularak şansa bağlı olarak alınmış, kâğıt poşetlere konularak buz kutusu içerisinde laboratuvara getirilerek izolasyon aşamasına kadar, 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2. Fungus İzolatlarının İzolasyonu

Saf kültür elde etmek için Su Agar (WA), Yulaf Glokoz Agar (OMA) ve Patates Dekstroz Agar (PDA) kullanılmıştır. İzolasyon için yaklaşık 0.5 cm^2 ebatlarında hastalıklı ve sağlıklı doku içerecek şeklinde kesilen yaprak parçaları %70 etanolde, 30-60 saniye bekletilmek suretiyle yüzeysel olarak sterilize edilip 3 kere steril saf suda yıkanmıştır. Takiben %1'lik çamaşır suyu solüsyonunda 1 dakika tutulup tekrar 3 kez steril saf sudan geçirildikten sonra steril kurutma kağıtları arasında kurulandıktan sonra 50 mg streptomycin sülfat içeren %1.5'lik su agarına (WA: Water Agar) alınıp, 25°C'de karanlık ortamda 48-72 saat karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır (Salehi 2006; Belisario *et al*. 2008; Jamshidi *et al*. 2010).

3.3. Fungus İzolatlarının Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Önce izolatların bitki yapraklarında daha sonra ise besiyerinde oluşturdukları fungal dokuların (miseller, aservulus, protoperites, konidi, askus, askospor, aservullar ve

mikrokonidilerin) morfolojik özellikleri hazırlanan preparatlar (lam üzerinde saf su, metil mavısı, asit) binoküler mikroskop altında (40X, 400X, 1000X büyütmede, Olmpyus BH2) incelenmesi ile tanılanmış ve fungal oluşumlar fotoğraflanmıştır. Aservuluslar, konidioforlar, konidiler, peritesler, askus ve askusporlardan boyu ve eni kalibre edilmiş mikroskop (Olympus, BH2) ile her birisinden en az 30 tane farklı ölçüm yapılarak ortalaması ile en büyük ve en küçüğü kayıt edilmiştir (Belisario *et al*. 2008; Jamshidi *et al*. 2010).

3.4. *Ophiognomonia leptostyla* İzolatların Farklı Ortamlarda Geliştirilmesi

Eşeyli aşamasında perites ve eşeysiz aşamasında aservül üreten, besiyeri ortamında yavaş gelişen etmeni *Ophiognomonia leptostyla* etmeninin morfolojik özellikleri ve gelişme hızlarına farklı besiyer ortamlarında gelişim özelliklerinin belirlenmesi amacıyla 9 cm büyüklüğünde petri kaplarına dökülen 25 mL Corn Meal Agar (CMA, Sigma), Potato Dextrose Agar (PDA, Biolab), Malt Agar (MA, Sigma), Nutrient Agar (NA, Sigma), Walnut Leaf Extract Agar (WLEA, hazırlandı), Walnut Leaf Extract Oat Meal Agar (WLEOMA, hazırlandı) ve Walnut Nut Coat Extract Agar (WNCEA, hazırlandı) besi ortamları kullanılarak 25°C sıcaklıkta ve karanlık ortamda inkübe edilmiş ve tek spordan saflaştırılmış toplam 58 izolattan (W1, W2, W3, W4, W7,W9, W10, W12, W13, W14, W15, W16, W18, W33, W45, W49, W56, W65, W66, W69, W71, W75, W86, W88, W93, W95, W101, W105, W109, W110, W111, W112, W113, W115, W116, W118, W119, W120, W124, W125, W128, W129, W131, W132, W133, W134, W135, W136, W137, W140, W142, W148, W156, W165, W166, W170, W174, W175) 4 tekerrülü, 2., 9., 16. ve 23. günlerinde gelişme çapları ölçülerek kayıt edilmiştir. Daha sonra IBM SPSS 23 programı ile istatistik analizi yapılmıştır.

Besiyerlerin hazırlanması için CMA (Sigma), PDA (Biolab), MA (Sigma), NA (Sigma) ortamları tavsiye edilen kılavuza; WLEA, WLEOMA, WNCEA ortamları ise labratuvar ortamında hazırlanmıştır. Bunun için WLEA (5 g kuru ceviz yaprağı 150 mL saf suda kaynattıktan sonra steril saf kağıt ile filtere yapıp daha sonra 2 g Agar (Sigma) ile karıştırıp saf su ile 150 mL hacma yetiştirilmiştir (Salehi and Jamshidi 2009). WLEOMA

ortamının hazırlanması için 5 g kuru ceviz yaprağı 150 mL saf suda kaynatıp steril kağıt ile filtere edilip 5.5 g yulaf unu ve 2 g Agar (Sigma) ile karıştırılıp 150 mL hacma tamamlanmıştır (Salehi and Jamshidi 2009). WNCEA ortamı ise 5 g kuru ceviz meyvesinin kabuğu 150 mL saf suda kaynatılır filtere edildikten sonra 2 g Agar ile karıştırarak 150 mL hacma tamamlanmıştır.

Besiyerlerin hazırlandıktan sonra, 15 dakika, 121°C ve 3 atomosfer basınçta otoklavlanıp sıcaklığı 45 ^{o}C'ye düştükten sonra laminar kabinde 9 cm çaplı steril petrilere dökülmüştür.

Takiben hazırlanmış olan ortamlara laminar kabinde PDA ortamında gelişen kolonilerden kork borer ile kesilen (5 mm çapa sahip) koloniler besiyerlerine transfer edilip petriler parafilm ile sarılıp, numaralandırdıktan sonra 25°C'de ve karanlıp ortamda 30 gün inkübe edilmiştir (Salehi 2006; Belisario *et al*. 2008; Jamshidi *et al*. 2010).

3.5. Fungal İzolatların Gelişme Hızlarının Belirlenmesi

Saflaştırılmış izolatlar 9 cm çaplı petri kaplarında PDA besiyerinde geliştirilmiş ve kork borer ile 5 mm çapında kesit alınarak yeni besiyerlerine (PDA) aktarılmış ve 25°C sıcaklıkta karanlık ortamda izolatların gelişme hızını ölçmek için tutulmuşlardır (Matteoni and Neely 1979). Bu çalışma her izolat için üç tekerrürlü olarak yapılmıştır. Her 24 saatte kolonilarin çapları ölçülerek 21 günden sonra sonuçların ortalamaları alınarak değerlendirilmiş ve kolonilerde aservulus ve askomata oluşup oluşmadığı kaydedilmiştir (Jamshidi *et al*. 2010).

3.6. Fungal İzolatların Uzun Süreli Muhafazası

OMA besiyerinde, 25°C'de ve karanlık ortamda 21 gün inkübe edilerek geliştirilen aservuluslar ve miseller laminar kabin içerisinde alınıp steril kağıt parçaları (5-10 cm^{2}) ile kurutulduktan sonra küçük parçacıklara ayrılıp 1.5 mL'lik eppendorf tüplerine aktarılıp, -20°C'de muhafaza edilmiştir (Jamshidi *et al*. 2010).

3.7. Eşeysiz Formunun Elde Edilmesi

Eşeysiz spor üretmesi için yaz döneminde araziden toplanmış yapraklardaki aservuluslardan binokular mikroskop altında izole edilen konidiosporlar steril saf suda bulunan eppendorf tüplerine transfer edilerek karıştırılmış ve 24-48 saat 25ºC sıcaklıkta ve karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Takiben hazırlanmış olan %2'lik su agarı (WA) 9 cm çapındaki petrilere dökülüp, petrilerin tabanlarına daireler çizilmiş ve her dairenin içerisine hazırlanmış konidiospor solüsyonlarından 1 mL alınıp 24-48 saat boyunca 25ºC sıcaklık ve karanlık ortamında inkübe edilmiştir (Jamshidi *et al*. 2010).

Su agarında (Water Agar, Sigma) gelişen her koloniden binoküler mikroskop (Olympus, BH2) altında 60X böyütmede tek spor alınıp, PDA ortamına aktarılıp 25ºC sıcaklıkta ve karanlık ortamda 21 gün inkübe edilmiştir. Takiben PDA ortamında gelişen kolonilerden miseler alınıp OMA ortamına aktarılarak 21 gün, 25ºC'de, karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda OMA ortamına oluşan aservuluslar ve onlardan gelişen konidiforlar ve konidiosporlar mikroskop (Olympus, BH2) altında 400X ve 1000X büyütmede incelenmiştir (Ho and Ko 1997; Belisario *et al*. 2008).

3.8. Fungusun Eşeyli Formunun (Peritesyum) Elde Edilmesi

Fungal izolatların eşeyli formu olan peritesyumların elde edilmesi için PDA besi ortamı üzerinde gelişen kolonilerden alınan miseller hazırlanan PDA besiyerine (tüp ve petrilere) aktarılarak 3 ay boyunca karanlık ortamda ve 10ºC'de inkübe edilmiş ve bu sürenin sonunda 100 farklı fertil peritesyum üzerinden eşeyli sporların oluşup oluşmadığı incelenmiştir (Salhei and Jamshidi 2010; Matteoni and Neely 1979).

3.9. Fungal İzolatlarının Homotal ve Heterotal Olup Olmadığının İncelenmesi

İzolatların homotal (Peritesyumların içinde askus ve askusporların oluşması fungal izolatın homotal olduğu) veya heterotal (Peritesyumun oluşmaması veya peritesyum oluşup askus ve askuspor teşekkül etmemesi fungal izolatın heterotal olduğu) olup

olmadığının belirlenmesi için PDA ve OMA ortamında protoperites oluşturmayan 10 izolat (W12, W16, W71, W75, W95, W103, W109, W113, W142, W175) ve yaprakların üzerindeki aservullardan alınan (W4, W18, W59, W93, W109, W111, W129, W132, W137, W140, W165) toplam 21 izolat %0.02 Tween 20 (v/v) içeren siteril saf su ile 10^4 olacak şekilde seyreltilip 25 mL WA ve PDA içeren petrilerle (9 cm) tek spor olarak alınmıştır. Takiben her bir petride 20 adet olmak üzere markır kalem ile yuvarlak daireler çizilip, hazırlanmış olan spor solüsyonlarından her dairenin ortasına 1 mL olacak şekilde bırakıldıktan sonra petriler 25°C'de, karanlık ortamda, 48 saat bekletilmiş ve oluşan her bir koloniden stereo mikroskop altında iğne ile tek hif alınarak yeni PDA ortamlarına aktarılmış ve kolonilerinin 25°C'de, karanlıkta 2 hafta boyunca gelişmeleri sağlanmıştır (Jamshidi *et al*. 2010).

Peritesyum oluşturmamış olan fungus izolatlarının anastomosis (eşleşme: mating type) oluştrup oluşturmayacaklarını belirlemek amacıyla 21 farklı saf izolat PDA besiyerinde 3 cm mesaflerde petri kablarında karşı karşıya bırakılarak 25°C sıcaklıkta ve sürekli karanlık ortamda 3 ay boyunca 4°C sıcaklıkta ve karanlık ortamda bekletilmiş ve sürenin sonunda anastomosis oluşturup oluşturmadıkları incelenmiştir.

3.10. DNA Ekstraksiyonu, PCR ve Sekans Analizi

3.10.1. Ekstraksiyonda kullanilan solüsyonlar ve hazirlanişlari

50 mL'lik CTAB (45 ^{o}C) Ekstraksiyon Bufferının Hazırlanması

1 g CTAB (%2)
0.420 g $Na_2S_2O_3$ (direkt eklenmeli)
14 mL 5 M NaCl
5 mL 1 M Tris HCl pH: 8.0
2 mL 0.5 M EDTA pH: 8.0
%2 PVP

%2 mercaptoethanol eklenip son hacim siteril su ile 50 mL'ye tamamlanmış ve kullanılmadan önce vortexlenmiştir (Doyle and Doyle 1987).

Ekstraksiyonda Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı

CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)
%2 (w/v) CTAB
1.4 M NaCl
20 mM EDTA
100 mM Tris- HCl (pH 8.0)
%0.2 (v/v) ß -Mercapta ethanol

1 M Tris-HCl (pH 7,5)

12,11 g Tris (MW: 121.14 g/mol) alınıp 80 mL saf suda çözündürülüp, HCl ile pH:8.0'a ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

0,5 M EDTA (500 mL stok, pH 8,0)

93 g EDTA (Etilenediaminetetra-asetat disodyum·$2H_2O$, MW: 292.24 g/mol) 400 mL saf suda çözündürülüp NaOH ile pH:8.0'a ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır.

5 M NaCl

292 g NaCl (MW: 58.44 g/mol) 1 litre saf suda çözündürülerek hazırlanmıştır.

1 x TE (Tris-EDTA) Tamponu

Her 500 mL TE için 5 mL 1 M Tris-HCl (pH=7.5) ile 1 mL 0,5 M EDTA (pH=8,0) alınıp toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır.

3 M Sodyum Asetat (pH=5)

408 g sodyum asetat trihidrat ($NaC_2H_3O_2$ $3H_2O$, MW: 136.08 g/mol) 800 mL saf suda çözündürülmüş ve 3 M asetik asit ile pH 5.0'a ayarlanıp toplam hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlanıp filtre edilerek sterilize edilmiştir.

10 M Amonyum Asetat (CH_3COONH)

192,70 g amoniyum asetat (MW: 74.0587 g/mol) 250 mL saf suda çözündürülüp takiben filtreden geçirilerek sterilize edilip kullanılmıştır.

Kloroform: İzoamil Alkol (24:1)

24 mL kloroform üzerine 1 mL izoamyl alkol ilave edilerek hazırlanmıştır.

Na_2 S_2 O_3

0.84 g $Na_2S_2O_3$ (MW: 158.097 g/mol) tartılıp 100 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

%2 mercaptoethanol

Ekstraksyon tamponu içerisine kullanılmadan önce %2 oranında ilave edilmiştir.

Çizelge 3.1. Ekstraksiyon ve PCR aşamasında kullanılan cihaz ve sarf malzemeler

Cihazlar	**Markaları**
Adjustable Pipette 1-10, 10-100, 100-1000 µL	Ependorff
Buz Makinası	Beko
Dijital Hassas Terazi	Denver instruments
Labcycle Gradient PCR	SensQuest Lab Cycler
Manyetik Karıştırıcı Dijtal Isıtıcı	Heidolph MR 3001
Otoklav	Nüve
pH Metre	Ohaus Starter 3100
UV Jel Görüntüleme Sistemi	BioRad
Santrifüj	Sigma
Sıcak Su Banyosu	Polyscience
Elektroforez Tankı	Max Fill
Güç Kaynağı	Consort E861
Su Terazisi	Iso Lab Germany
Farklı Boyutlarda Beher	Iso Lab Germany
Ölçü Silindirleri	Iso Lab Germany
Mikrodalga Fırın	Vestel

Çizelge 3.2. Sarf kullanılan sarf ve kimyasallar ve markaları

Malzemeler	**Markaları**
Agorose (Molecular Biology)	SIGMA
Chloroform (Molecular Biology)	MERCK
Conical Santrifüj Tube (50 mL polyproplen)	IsoLab
Disposable Latex Gloves	MedPoint
DNase I (RNase free) (Molecular Biology)	PROMEGA
Santrifüj Tube 2 mL	IsoLab
Etanol (%99.9 Absolute)	MERCK
Iso Amyl Alcohol (Molecular Biology)	SIGMA
Iso Proponol (Molecular Biology)	SIGMA
PCR Microtubes	Eppendorf
Pipet Ucu	Eppendorf
Phenol (Katı, Molecular Biology)	MERCK
dNTP’s Set (Promega Corporation, USA)	PROMEGA
Taq Polimeraz	SIGMA-ALDRICH
6xDYE	Thermo Fisher Scientific
Ethidium Bromide	SIGMA
10 µL’lik Pipet ve Pipet Uçları	EPPENDORF
50xTAE	ThermoFisher Scientific
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	SIGMA

3.10.2. Fungus izolatlarından ve ceviz çeşitlerinden DNA ekstrasyonu

DNA ekstraksiyonunda 10 fungal izolat (W4, W12, W33, W95, W105, W111, W124, W148, W165 ve W175 izolatları) kullanılmıştır. PDA besiyerinde geliştirilen kolonilerden miseller spatul ile toplanıp besiyerinden ayrılıp parafilme sarılmış ve aluminium folya arasına alınarak, 300 mg olacak şekilde tartılıp DNA ekstraksiyonunda kullanılıncaya kadar -20 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

Sütyemez, Chandler, Bilecik, Şen-1, Maraş-18 ceviz çeşitlerinin ve anaç genotipi dayanıklılık ile ilgili R genleri içerip içermediğinin belirlenmesi amacıyla DNA ekstraksiyonu bu çeşitlerden alınan taze yapraklardan gerçekleştirilmiştir. Patojensite çalışmalarında Chandler, Bilecik, Şen-1 ve Maraş-18 çeşitleri ile deneme yapılırken moleküler çalışmalarda kontrol grupları olarak Sütyemez ve anaç genotipi de kullanılmıştır.

DNA ekstraksiyonu CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) metoduna göre gerçekleştirilmiştir (Doyle and Doyle 1990). Buna göre:

Fungus miselleri ve ceviz çeşitlerinden alınan yaprak örnekleri steril havan içerisinde üzerine sıvı azot ilave edilerek, havan eli ile iyice ezilip pudra haline getirildikten sonra etiketlenip 300 mg olacak şekilde 2 mL'lik eppendorf tüplerine aktarılıp, üzerlerine 1 mL ekstrasyon solüsyonu ilave edilerek karıştırılmıştır.

Karışım 1 saat 65°C su banyosunda her 15 dakikadan yavaş bir şekilde aşağı yukarı çevrilmek suretiyle karıştırlmak suretiyle su banyosunda, takiben de 10 dakika oda sıcaklığında tutulmuşlardır.

Sonra 4°C'de, 14000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenip supernatandan 700-800 µL alınıp üzerine eşit miktarda chloroform: isoamylalchol (24:1 v/v) ilave edilerek karıştırılmış ve tekrar 4 ^{o}C'de, 14000 rpm'de 15 dakika santrifuj edilmiştir.

Bu aşamadan sonra supernatanttan 500 µL alınıp üzerine 2.5 µL RNase ve 5 µL Proteinase K ilave edilerek yavaşca karışması sağlanıp, 37ºC'de, su banyosunda 60 dakika bekletilip üzerine 100 µL amonium acetat (10 M), 100 µL sodium acetat (3 M) ve 500 µL isopropanol (-20 ºC) ilave edilerek yavaşca karıştırılıp tekrar santrifüjlenmiştir.

Supernatant dökülüp pelet üzerine 200 µL soğuk etanol (%96) ilave edilip santrifüjlendikten sonra etanol dökülüp peletler vaccumlu santrifüjde (Eppendorf) 30°C'de kurutulup üzerine 100 µL 1xTE buffer ilave edilip, 1 gece 4ºC'de bekletildikten sonra yavaşça karıştırılarak çözündürülüp PCR için kullanılıncaya kadar -20°C muhafaza edilmiştir. PCR için kullanılmadan önce DNA'nın kalitesi %1'lik agaroz jelde, 60 dakika 100 V ve 100 mA'de yürütülerek ve ayrıca NanoDrop (Thermo Scientific, NanoDrop 1000) cihazinda 260/280 ve 260/230 nm dalga boyunda kontrol edilmiştir.

3.10.3. PCR ve elektroforez çalışmalarında kullanılan reaktifler ve hazırlanışları

10 x PCR Buffer (Sigma-Aldrich, USA)
25 mM $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich, USA)
Taq Polymerase (**5 units/ µl,** Sigma-Aldrich, USA)

Primerler (Direkt PCR): Fungus teşhisi için ITS5 (F)-ITS4 (R); ITS1 (F)-ITS4 (R); EF1 728 (F)-EF1 1567 (R); TEF1 983 (F)-EF1 1567 (R); Ceviz dayanıklılığın araştırması için NBS1 (F)-NBS5a-NBS6 (R); S1 INV (F)-S2 INV (R); H1145 (F)-H1146 (R); S1 (F)-AS3 (R); P-Loop (F)-GLPL (R); RN1 (F)-RN1 (R); LM637 (F)-LM638 (R); NLRR inv1 (F)-NLRR inv2 (R); Pto kin 1 (F)-Pto kin 2 (R))

d_2H_2O (Sigma)
dNTPs (Promega**)**

1 mL 5 mM dNTP hazırlamak için her biri 100 mM'lık konsantrasyona sahip olan dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'nin her birinden 20 µL alınıp son hacim d_2H_2O ile 1 mL'ye tamamlanıp -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Primerler

Liyofilize haldeki pirimerler 10 mM olacak şekilde d_2H_2O ile seyreltilip PCR'da kullanılmıştır.

1 Litre 50xTAE Buffer (Stok)

242 g Tris
100 mL 0.5 M EDTA pH:8.0
57,1 mL Acetic acid ilave edilip hacmi saf su ile 1 lt ye tamamlanmak suretiyle hazırlanmıştır.

100 mL 0.5 M $Na_2EDTA.2H_2O$ (pH:8.0)

18.6 g $Na_2EDTA.2H_2O$ 70 mL H_2O içerisine bırakılarak üzerine 10 M NaOH ilave edilip çözünmesi sağlanmış ve pH:8.0 ayarlanıp son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

1 x TAE buffer (Elektroforez Bufferı)

1 lt için 20 mL 50xTAE buffer alınıp üzerine 980 mL saf su ilave edilerek hazırlanıp kullanılmıştır.

%1.5'lik Jel

2.25 g agar üzerine 150 mL 1xTAE buffer ilave edilip mikro dalga fırında jel haline getirilip üzerine 50 µl ethidium bromide (%0.05) ilave edilip takiben jel yatağına dökülmüştür.

Low mass ladder (Invitrogen)

4 birim markır üzerine 1 birim 6xDYE ilave edilerek kullanılmıştır.

50 mL 6 x DYE

20 g sucrose tartılıp 30 mL suda çözündürülüp üzerine % 0.01 g bromophenol blue ilave edilip son hacim suyla 50 mL'ye tamamlanmıştır.

20 mL Ethidium Bromide (10 mg/mL)

0.2 g Ethidium Bromide tartılıp 20 mL d_2H_2O içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır.

3.10.4. PCR çalışmaları

PCR'da kullanılan reaktifler ve miktarları

Çizelge 3.3. Her bir örnek için PCR'da kullanılan reaktifler ve miktarları

Reagent	**Miktar (1X)**
d_2H_2O	6,5 µL
10xBuffer	2 µL
$MgCl_2$, 25mM	2 µL
dNTP, 2.5 mM	1 µL
Primer P1 (F)	2 µL
Primer P2 (R)	2 µL
Taq Polimeraz	0,5 µL
DNA	4 µL
Total	20 µL

3.10.5. Fungus izolatlarinin PCR ile tanilanmasi

Ophiognomonia leptostyla izolatlarının (W4, W12, W33, W95, W105, W111, W124, W148, W165 ve W175) PCR'ında kullanılan pirimer çiftleri, pirimer çiftinden beklenen fragment uzunlukları ile thermocycler döngüleri Çizelge 3.5 ve 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.4. Fungal izolatların tanısında kullanılan primerler çiftleri

P.N.	Primer	Primer Dizilimi 5′--3′	Beklenen Amplfikasyon Ürünü (bp)	Primer Sıcaklığı	Kaynaklar
1	ITS5 (F)	5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'	1700 bp	56ºC	White *et al.* 1990
	ITS4 (R)	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'			
2	ITS1 (F)	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCGG-3'	1735 bp	56ºC	White *et al.* 1990
	ITS4 (R)	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'			
3	EF1 728 (F)	5'-CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG-3'	943 bp	56ºC	Rehner 2001
	EF1 1567 (R)	5'-AC HGT RCC RAT ACC ACC RAT CTT-3'			
4	TEF1 983 (F)	5'-GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT-3'	500 bp	56ºC	Rehner 2001
	EF1 1567 (R)	5'-AC HGT RCC RAT ACC ACC RAT CTT-3'			

Çizelge 3.5. Fungal izolatların belirlenmesinde kullanılan Thermocycler döngüsü

PCR Sıcaklıkları	**Sıcaklık Değerleri ve süresi**	**Döngü Sayısı**
Başlangıç için denaturasyon sıcaklığı	94°C 4 dakika	40 döngü
Ara denaturasyon sıcaklığı	94°C 1 dakika	
Amplifikasyon sıcaklığı	56°C 1 dakika	
Tamamlayıcı sıcaklık	72°C 1 dakika	
Final sıcaklık	72°C 10 dakika	
Muhafaza sıcaklığı	+4°C	

3.10.6. Ceviz çeşitlerinde R genlerin PCR ile belirlenmesi

Juglans regia çeşitlerinin (Bilecik, Chandler, Maraş-18, Şen-1, Sütyemez ve Anaç) R gen içerip içermediklerinin PCR ile belirlenmesinde kullanılan pirimer çiftleri, pirimer çiftinden beklenen fragment uzunlukları ve thermocycler döngüleri Çizelge 3.6'dA verilmiştir.

Çizelge 3.6. R genlerin belirlenmesinde kullanılan primer çiftleri

P. N.	**Primer**	**Primer Dizilimi 5′--3′**	**Beklenen Fragment Uzunluğu**	**Bölgeler**	**Primer Sıcaklığı**	**Kaynaklar**
5	NBS1-F	5'-GCIARWGTWGTYTTICCYRAICC-3'	177-270 bp	NBS	56ºC	Pollegioni *et al*. 2012
	NBS5a-R	5'-YYTKRTHGTMITKGATGAYGTITGG-3'				
	NBS6-R	5'-YYTKRTHGTMITKGATGATATITGG 3'				
6	S1 INV-F	5'-GCAACAGAAGGGTTGGGGTGG-3'	100-900 bp	NBS	60ºC	Chen *et al*. 2009
	S2 INV-R	5'-CANCANAANGGNTGNGGNGG-3'				
7	H1145- F	5'-GGNGGNRTNGGNAANCANAC-3'	180-800 bp	NBS	56ºC	Que *et al*. 2009
	H1146- R	5'-NAR NGY NAR NGG NAR NCC-3'				
8	S1- F	5'-GGTGGGGTTGGGAAGACAACG-3'	389 bp	NBS	55ºC	Wang *et l*. 2000
	AS3- R	5'-IAGIGCIAGIGGIAGICC-3'				
9	P-Loop-F	5'-GGIGGIGTIGGIAAIACIAC-3'	500 bp	NBS	56ºC	Hunger *et al*. 2003
	GLPL -R	5'-IAGIGCIAGIGGIAGICC-3'				
10	RN1 F	5'-ATGGGNGGNATYGGNAARAC-3'	85-500 bp	NBS	56ºC	Gao *et al*. 2006
	RN1 R	5'-ATDGCNARDGGSAGNCC-3'				
11	LM637-F	5'-ARNGCTARNGGNARNCC-3'	500, 1000 bp	NBS	56ºC	Wang *et al*. 2005
	LM638-R	5'-GGNGGNGTNGGNAANACNAC-3'				
12	NLRR inv1-F	5'-TGCTACGTTCTCCGGG-3'	500, 2000 bp	LRR	56ºC	Rajesh 2001
	NLRR inv2-R	5'-TGAGGCCGTGAAAAATAT-3'				
13	Pto kin 1-F	5'-GCATTGGAACAAGGTGAA-3'	750 bp	STK	60ºC	Chen *et al*. 1998
	Pto kin 2-R	5'-AGGGGGACCACCACGTAG-3'				

(*I Inosine, R A/G, W A/C, Y C/T, N A/G/C/T, S G/C, D A/G/T, K G/T*)

NBS= Nucleotide Binding Site; LRR= Luecine Rich Repeat; STK= serine/threonine kinases

3.10.7. Elektroforez

PCR ürünleri (9 µL PCR ürünü + 1 µL 6xDYE) 5 µL standart (Invitrogen Ladder Marker; 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp) ile birlikte %1,5'lik agaroz jelde (150 mL 1xTAE buffer + 2.25 g agaroz + %0.05 ethidium bromide) 120 V ve 120 mA'de 90 dakika yürütülüp UV transliminatörde görüntülenmiştir.

3.10.8. Sekans diziliminin bilirlenmesi ve filogenetik analizileri

Ophiognomonia leptostyla izolatlarının (W4, W12, W95, W105, W111, W148, W165) ITS5 (F)-ITS4 (R), ITS1 (F)-ITS4 (R), EF1 728 (F)-EF1 1567 (R), TEF1 983 (F)-EF1 1567 (R) pirimer ürünleri ile ceviz çeşitlerinden (Bilecik, Chandler, Maraş-18, Sütyemez, Şen-1, Anaç) NBS1 (F)-NBS5a-NBS6 (R) pirimer çiftlerinden elde edilen fragmentler sekans analizene gönderilmiştir. Elde edilen sekans verileri NCBI veri tabanında kayıtlı olan verilerle BLASTn programı ile mukayese edildikten sonra MEGA 7.0 programında sekans dizilimleri annealing yapılarak Maximum Likelihood (ML) metodu ile filogenetik diyagramları çıkarılmıştır. Agaroz jelde ceviz çeşitlerinden elde edilen PCR bantlarının sayısı ve moleküler ağırlıkları QLIQS (Core Laboratory Image Quantification Software), diyagramları ise NTSYS programı (Excel programı) ile ML metodyla çıkarılmıştır.

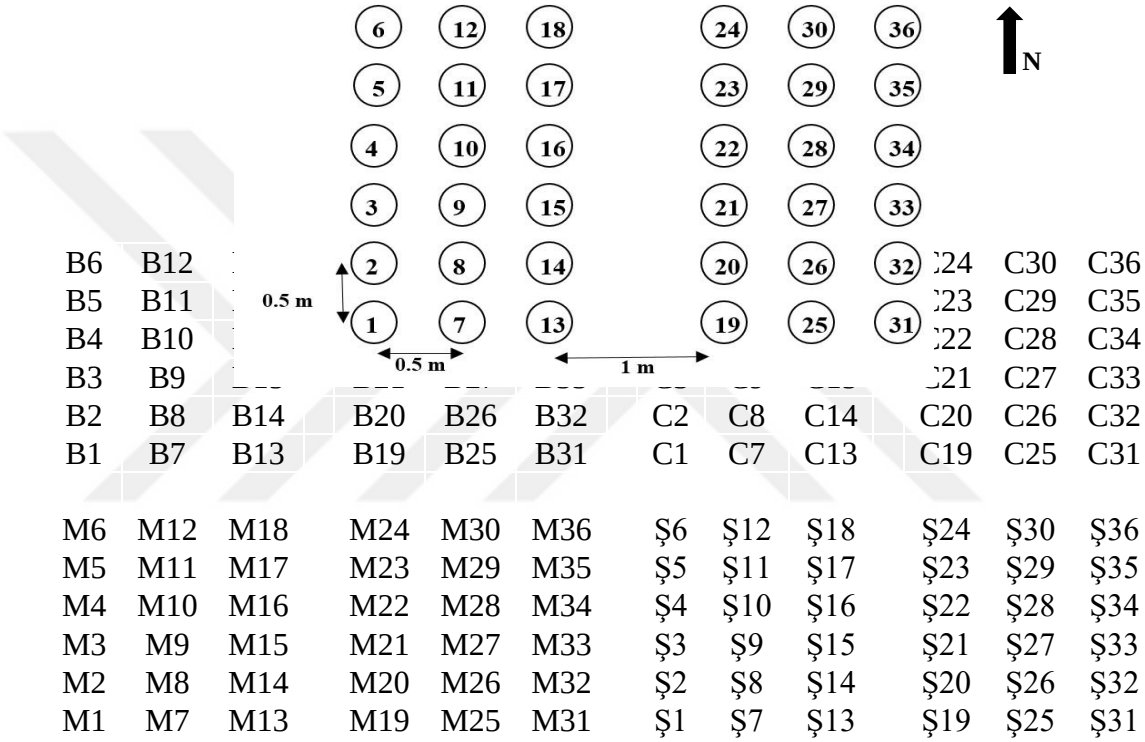
3.11. Patojensite Çalışmaları

3.11.1. Ceviz fidanlarının temini ve bakımı

Patojensite çalışmaları 2016-2017 yıllarında Haziran-Ekim ayları arasında iki yıl süresince tekrarlanıp gerçekleştirilmiştir.

Bu amaç için her çeşitten 36 olmak üzere her bir yıl için 144, toplamda 288 adet 1 yaşında aşılı Bilecik, Chandler, Maraş-18, Sen-1 çeşitleri kullanılmıştır (Ceviz Fidanların Temini: Aksu Tarım Firmasından, Kahramanmaraş, Türkiye; www.aksutarim.com.tr).

Fidanlar içerisinde torf:toprak:kum karışımı (1:1:1) bulunan 39×54 cm ebatlarındaki poşetlere dikilerek açık alanda (Atatürk Üniversitesi-Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü bahçesinde) 1870 m rakımda (39º 53' 59" N; 41º 14' 16") 5 günde bir 5 litre su verilmek suretiyle (Yağışlı günlerde 2 lt, kurak zamanlarda ise 5 lt) gelişmeye bırakılmışlardır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Patojensite testi yapılmadan önce ceviz çeşitlerin dizilimi (**B**=Bilecik (1-36) **C**= Chandler (1-36) **M**=Maraş-18 (1-36) **Ş**=Şen-1 (1-36)).

3.11.2. İnokulasyonların yapılması

Patojensite ve virülanslık testi için farklı lokasyonlardan toplanan ve besi ortamlarında en hızlı gelişen iki izolat (W105 ve W148) kullanılmıştır (Black and Neely 1978a).

Bunun için OMA besiyeri ortamında gelişen izolatların konidileri ile her mililitrede 10^5 spor olacak şekilde %0.02 Tween 20 (v/v) ve saf su ile 1 saat karıştırılarak çözündürülüp mangan ile homojenize edilmek suretiyle hazırlanan ve spor konsantrasyonu

hemositometer ile ölçülen süspansiyonlar fidanlara yaprak gelişimleri tamamlandıktan sonra sis şeklinde sprey şişesi ile sabah açık havada yapraklar üzerine uygulanmıştır (Berry 1970; Kenneth and Kessler 1984).

Sonuçlar üçüncü günden itibaren gözlenip her 5 günde bir kaydedilmiştir. Hastalık şiddetinde yaprakların eni, boyu, sayısı, enfekte olan yaprakların sayısı, yapraklarda lekelerin ortaya çıkış zamanı, lekelerin çapı ve aservulus oluşup oluşmamasına bakılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar enfekte olan yaprak sayısı ve leke çaplarına göre analiz edilmiştir (An and Yang 2014).

3.11.3. Aktivatörlerin hazırlanşı

Aktivatör olarak kullanılan sodium nitroprusside [NO:Nitric oxide: $Na_2Fe(CN)_5NO$), MW: 297.95 Da], Borik asit (BA: H_3BO_3, MW: 61.83 Da), Absisik asit (ABA, MW: 264.32 Da) ve Salisilik asit (SA; MW:138.12 Da) solüsyonlarının kullanılmadan 1 gün önce hazırlanıp inokulasyondan bir gün sonra 20 µM olacak şekilde kullanılmıştır.

Bu aktvatörlerden NO, ABA ve SA etanolde, BA ise suda çözülmüş ve hazırlandıktan sonra kullanılıncaya kadar +4ºC'de buzdolabında ve karanlık ortamda (Aluminium folyaya sarılı şekilde) muhafaza edilmiştir.

Ölçümler her 7 günde bir yaprak sayısı, yaprak eni ve boyu, enfekte olan yaprak sayısı ve lekelerin çapı baz alınarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar IBM SPSS 23 programına göre analiz edilmiştir (An and Yang 2014).

3.11.4. Aktivatör uygulamaları

Aktivatörlerin dayanıklılık üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla negatif kontrollerle birlikte 2 izolat, 4 çeşit (Bilecik, Chandler, Maraş-18, Şen-1), her çeşitten 3 fidan ile içerisine Tween 20, %0.02 (v/v) ilave edilerek hazırlanmış olan (20 µM/mL) 4 aktivatör (Çizelge 3.7) inokulasyondan 1 gün sonra sprey şişesi ile sis şeklinde uygulanmıştır (An and Yang 2014).

Her aktivatör için 24 fidan (6 grup x 24= 144 fidan) olmak üzere toplam 144 fidan kullanılmıştır (Şekil 3. 2, 3, 4, 5, 6 ve 7).

Denemeler 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve negatif kontrol olarak kullanılan fidanların üzerine saf su ve Tween 20 %0,02 karışımı püskürtülmüştür.

Çizelge 3.7. Uygulanmış olan aktivatorlerin marka, stok ve doz bilgileri

Aktivator	Marka	Hazrlanışı	Molekülar ağırlığı	Stock	Son kullanma konsantrasyonu
Sodium Nitroprusside	Merk	Etenol-su	297.95 Da	50 mM	20 µM
Absisik asit	Sigma	Etenol	264.32 Da	50 mM	20 µM
Salicylic asit	Sigma	Etenol-su	138.12 Da	50 mM	20 µM
Borik asit	Sigma	Su	61.83 Da	50 mM	20 µM

ŞEN-1	**Ş23**	**Ş36**	**Ş4**		**Ş24**	**Ş32**	**Ş8**
MARAŞ-18	**M26**	**M29**	**M18**		**M22**	**M15**	**M27**
CHANDLER	**C34**	**C13**	**C35**		**C7**	**C3**	**C1**
BİLECİK	**B5**	**B11**	**B20**		**B17**	**B9**	**B30**

Şekil 3.2. Kontrol grubunda ceviz fidanlarının dizilimi

ŞEN-1	**Ş28**	**Ş19**	**Ş1**		**Ş2**	**Ş22**	**Ş30**
MARAŞ-18	**M32**	**M3**	**M9**		**M34**	**M7**	**M13**
CHANDLER	**C14**	**C36**	**C20**		**C26**	**C18**	**C28**
BİLECİK	**B27**	**B25**	**B23**		**B18**	**B26**	**B21**

Şekil 3.3. Nitrik Oksit (NO) testi yapılan ceviz fidanlarının dizilimi

ŞEN-1	**Ş7**	**Ş35**	**Ş12**		**Ş14**	**Ş33**	**Ş34**
MARAŞ-18	**M1**	**M2**	**M12**		**M20**	**M35**	**M25**
CHANDLER	**C19**	**C31**	**C23**		**C12**	**C5**	**C10**
BİLECİK	**B31**	**B3**	**B35**		**B4**	**B32**	**B12**

Şekil 3.4. Borik Asit (BO) testi yapılan ceviz fidanlarının dizilimi

ŞEN-1	**Ş25**	**Ş18**	**Ş16**		**Ş31**	**Ş17**	**Ş20**
MARAŞ-18	**M23**	**M36**	**M4**		**M24**	**M32**	**M8**
CHANDLER	**C32**	**C11**	**C25**		**C2**	**C8**	**C30**
BİLECİK	**B1**	**B33**	**B10**		**B13**	**B15**	**B36**

Şekil 3.5. Salisilik Asit (SA) testi yapılan ceviz fidanlarının dizilimi

ŞEN-1	**Ş27**	**Ş8**	**Ş21**		**Ş26**	**Ş6**	**Ş9**
MARAŞ-18	**M6**	**M8**	**M5**		**M16**	**M26**	**M21**
CHANDLER	**C27**	**C29**	**C6**		**C24**	**C21**	**C9**
BİLECİK	**B7**	**B34**	**B24**		**B19**	**B28**	**B2**

Şekil 3.6. Absisik Asit (ABA) testi yapılan ceviz fidanlarının dizilimi

ŞEN-1	**Ş11**	**Ş3**	**Ş10**		**Ş15**	**Ş13**	**Ş29**
MARAŞ-18	**M14**	**M19**	**M10**		**M30**	**M24**	**M36**
CHANDLER	**C16**	**C33**	**C15**		**C22**	**C4**	**C17**
BİLECİK	**B22**	**B14**	**B6**		**B8**	**B29**	**B16**

Şekil 3.7. Aktivatör uygulamalarında ceviz fidanlarının dizilimi

3.11.5. Ceviz çeşitlerin antraknoza dayanıklık durumlarının değerlendirilmesi

Çeşitlerin antraknoza karşı dayanıklılık durumları An and Yang (2014), tarafından tarif edildiği şekilde değerlendirilmiştir. Buna göre fungus konidilerini içeren süspansiyonlar

olacak şekilde hazırlanıp her yaprağa 5 mL olacak şekilde sis şeklinde sprey halinde uygulandıktan 7, 14, ve 21 gün sonra ölçümler yapılmıştır.

$$\text{Dayanıklık Oranı} = \frac{\text{Test Grubu} - \text{Pozitif Kontrol}}{\text{Pozitif Kontrol}} \text{x } 100$$

Bitki Hastalık İndeksı (Plant disease indexi:DI)
Nispi Dayanıklılık İndeksı (Relative resistance index:RRI)

Formüle göre:

RRI>0.8 yüksekse yüksek oranda dayanıklı (Highly resistant: HR)
0.6<RRI<0.79 ise dayanıklı (Resistant: R)
0.4<RRI< 0.59 ise orta düzeyde dayanıklı (Moderately Resistant: MR)
0.2<RRI<0.39 ise orta düzeyda hassas (Moderately Susceptible: MS)
0.1<RRI<0.19 ise hassas (Susceptible: S)
RRI<0.1 ise aşırı hassas (Highly Susceptible: HS) olarak değerlendirilecektir.

Farklı denemelerden elde edilen veriler, ilk olarak Excel 2013 programına aktarıldıktan sonra SPSS 23 programında analiz edilmiştir. Fungal izolatların besiyerlerinde gelişme hızı, patojenitesi ve ceviz çeşitlerinin dayanıklılık durumları Duncan çoklu karşılaştırma testine göre değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Hastalıklı Örneklerin Toplanması

Antraknoza özgü simptom gösteren ceviz ağaçlarından yaprak örnekleri 2014-2016 yıllarında Haziran-Eylül ayları arasında toplanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Simptomlu örneklerin alındığı yerler ve tarihleri

İzolat	Toplanmış olan mekanı	Tarih	*O. leptostyla* ile enfekte olan ceviz yaprakları	PDA ortamında fungus izolatların gelişmesi	OMA ortamında fungus izolatların gelişmesi
W1	Erzurum-Tortum-Narman	19/06/2014	*	*	*
W3	Erzincan-Çatal Armut Köyü	05/08/2014	*	*	*
W4	Erzincan-Çatal Armut Köyü	05/08/2014	*	*	*
W5	Erzincan-Çatal Armut Köyü	05/08/2014			
W6	Erzincan Bahçe Bitk. Araş. merkezi	05/08/2014	*	*	*
W7	Erzincan Bahçe Bitk. Araş. merkezi	05/08/2014	*	*	*
W8	Erzincan Bahçe Bitk. Araş. merkezi	05/08/2014	*		
W9	Erzincan Bahçe Bitk. Araş. merkezi	05/08/2014	*	*	*
W10	Erzincan Bahçe Bitk. Araş. merkezi	05/08/2014	*	*	*
W11	Erzincan Bahçe Bitk. Araş. merkezi	05/08/2014	*	*	*
W12	Erzincan Bahçe Bitk. Araş. merkezi	05/08/2014	*	*	*
W13	Erzincan Bahçe Bitk. Araş. merkezi	05/08/2014	*	*	*
W14	Erzincan Bahçe Bitk. Araş. merkezi	05/08/2014	*	*	*
W15	Erzincan Bahçe Bitk. Araş. merkezi	05/08/2014	*	*	*
W16	Erzincan Bahçe Bitk. Araş. merkezi	05/08/2014	*	*	*
W17	Erzincan Bahçe Bitk. Araş. merkezi	05/08/2014	*	*	*
W18	Erzincan Bahçe Bitk. Araş. merkezi	05/08/2014	*	*	*
W19	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W20	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W21	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W22	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W23	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W24	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W25	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W26	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W27	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W28	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W29	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W30	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014	*	*	*
W31	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W32	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014	*	*	*
W33	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014	*	*	*
W34	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W35	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W36	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W37	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W38	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W39	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W40	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W41	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			

Çizelge 4.1. (Devam)

W42	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W43	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W44	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	04/09/2014			
W45	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014	*	*	*
W46	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014			
W47	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014			
W48	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014			
W49	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014	*	*	*
W50	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014	*	*	*
W51	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014	*	*	*
W52	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014			
W53	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014	*	*	*
W54	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014	*	*	*
W55	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014	*	*	*
W56	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014	*	*	*
W57	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014			
W58	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014	*	*	*
W59	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014			
W60	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014	*	*	*
W61	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014			
W62	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014			
W63	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014			
W64	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014			
W65	Pazaryolu- Yeşil vadi Aktaş	04/09/2014	*	*	*
W66	Pazaryolu	12/09/2014	*	*	*
W67	Pazaryolu	12/09/2014			
W68	Pazaryolu	12/09/2014			
W69	Pazaryolu	12/09/2014	*	*	*
W70	Pazaryolu	12/09/2014	*	*	*
W71	Pazaryolu	12/09/2014	*	*	*
W72	Pazaryolu	12/09/2014	*	*	*
W73	Pazaryolu	12/09/2014	*	.*	*
W74	Pazaryolu	12/09/2014			
W75	Pazaryolu	12/09/2014	*	.*	*
W76	Pazaryolu	12/09/2014			
W77	Pazaryolu	12/09/2014	*	*	*
W78	Pazaryolu	12/09/2014			
W79	Pazaryolu	12/09/2014	*	*	*
W80	Pazaryolu	12/09/2014	*	*	*
W81	Pazaryolu	12/09/2014			
W82	Pazaryolu	12/09/2014			
W83	Erzurum-İspir-Yoncalık Köy	12/09/2014			
W84	Pazaryolu	12/09/2014			
W85	Pazaryolu	12/09/2014			
W86	Pazaryolu	12/09/2014	*	*	*
W87	Pazaryolu	12/09/2014			
W88	Pazaryolu	12/09/2014	*	*	*
W89	Pazaryolu	12/09/2014			
W90	Pazaryolu	12/09/2014			
W91	Pazaryolu	12/09/2014	*	*	*
W92	Pazaryolu-Maden Köy	12/09/2014	*	*	*
W93	Pazaryolu-Maden Köy	12/09/2014	*	*	*
W94	İspir	12/09/2014			
W95	Pazaryolu	12/09/2014	*	*	*
W96	Pazaryolu-İspir	12/09/2014			
W97	Maden Köprü	12/09/2014			
W98	Maden Köprü	12/09/2014	*	*	*
W99	Maden Köprü	12/09/2014			
W100	Maden Köprü	12/09/2014	*	*	*
W101	Maden Köprü	12/09/2014	*	*	*
W102	Ispır	12/09/2014			

Çizelge 4.1. (Devam)

W103	Ispır	12/09/2014			
W104	Ispır	12/09/2014			
W105	Ispır	12/09/2014	*	*	*
W106	Pazaryolu-Ispır	12/09/2014			
W107	Pazaryolu-Ispır	12/09/2014			
W108	Pazaryolu-Ispır	12/09/2014	*	*	*
W109	Pazaryolu-Ispır	12/09/2014	*	*	*
W110	Pazaryolu-Burçalık köyü	12/09/2014	*	*	*
W111	Pazaryolu-Burçalık köyü	12/09/2014	*	*	*
W112	Pazaryolu-Burçalık köyü	12/09/2014	*	*	*
W113	Pazaryolu-Burçalık köyü	12/09/2014	*	*	*
W114	Pazaryolu-Burçalık köyü	12/09/2014	*	*	*
W115	Pazaryoul- Maden Köprüsü	12/09/2014	*	*	*
W116	Pazaryolu-Burçalık köyü	12/09/2014	*	*	*
W117	Pazaryoul- Maden Köprüsü	12/09/2014	*	*	*
W118	Pazaryoul- Maden Köprüsü	12/09/2014	*	*	*
W119	Şenkaya	19/09/2014	*	*	*
W120	Oltu	19/09/2014	*	*	*
W121	Oltu	19/09/2014			
W122	Oltu-Tortum	19/09/2014	*	*	*
W123	Oltu-Tortum	19/09/2014	*	*	*
W124	Oltu-Yusuf eli	19/09/2014	*	*	*
W125	Oltu-Yusuf eli	19/09/2014	*	*	*
W126	Oltu-Yusuf eli	19/09/2014	*	*	*
W127	Oltu	19/09/2014	*	*	*
W128	Olur-Oltu	19/09/2014	*	*	*
W129	Oltu-Şenkaya yolu	19/09/2014	*	*	*
W130	Oltu	19/09/2014	*	*	*
W131	Oltu	19/09/2014	*	*	*
W132	Olur	19/09/2014	*	*	*
W133	Oltu-Tortum	19/09/2014	*	*	*
W134	Oltu-Tortum	19/09/2014	*	*	*
W135	Oltu	19/09/2014	*	*	*
W136	Oltu-Tortum	19/09/2014	*	*	*
W137	Oltu-Tortum	19/09/2014	*	*	*
W138	Oltu-Olur	19/09/2014	*	*	*
W139	Oltu-Olur	19/09/2014			
W140	Olur	19/09/2014	*	*	*
W141	Olur	19/09/2014	*	*	*
W142	Olur	19/09/2014	*	*	*
W143	Oltu	19/09/2014	*	*	*
W144	Olur	19/09/2014	*	*	*
W145	Oltu	19/09/2014			
W146	Olur	19/09/2014	*	*	*
W147	Olur	19/09/2014	*	*	*
W148	Olur	19/09/2014	*	*	*
W149	Olur	19/09/2014	*	*	*
W150	Olur	19/09/2014	*	*	*
W151	Şenkaya	19/09/2014			
W152	Olur	19/09/2014	*	*	*
W153	Oltu-Olur	19/09/2014	*	*	*
W154	Oltu	19/09/2014			
W155	Tortum	19/09/2014			
W156	Narman	19/09/2014	*	*	*
W157	Narman	19/09/2014	*	*	*
W158	Narman	19/09/2014	*	*	*
W159	Olur-Oltu	19/09/2014	*	*	*
W160	Oltu	19/09/2014	*	*	*
W161	Tortum	19/09/2014			
W162	Tortum	19/09/2014	*	*	*
W163	Tortum	19/09/2014	*	*	*

Çizelge 4.1. (Devam)

W164	Tortum	19/09/2014			
W165	Tortum	19/09/2014	*	*	*
W166	Olur	19/09/2014	*	*	*
W167	Narman	19/09/2014			
W168	Narman	19/09/2014			
W170	Olur-Oltu	19/09/2014	*	*	*
W171	Olur-Oltu	19/09/2014	*	*	*
W172	Olurdere	19/09/2014	*	*	*
W173	Oltu	19/09/2014			
W174	Oltu	19/09/2014	*	*	*
W175	Tortum	19/09/2014	*	*	*
W176	Herbaryum	2011	*	*	*
W177	Herbaryum	2014			
W178	Herbaryum	2014			
W179	Pazaryolu	12/09/2014	*	*	*
W180	Pazaryolu	12/09/2014			
W181	Pazaryolu	12/09/2014	*	*	*
W182	Pazaryolu	12/09/2014	*	*	*
W183	Tortum	15/08/2015	*	*	*
W184	Tortum	15/08/2015	*	*	*
W185	Tortum	15/08/2015	*	*	*
W186	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	15/08/2015	*	*	*
W187	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	15/08/2015	*	*	*
W188	Tortum-Pazaryolu- Yedi Göller	15/08/2015	*	*	*

4.2. Antraknoz Hastalığının Ağaç, Yaprak, Sürgün ve Meyvelerdeki Simptomları

Sürvey kapsamındaki alanlarda düzenli kapama bahçelere rastlanılmamıştır. Farklı meyve türlerinin birlikte bulunduğu karma bahçelerde dikimin düzenli olmadığı, ağaçların farklı yaşlarda olduğu, doğal olarak tohumdan geliştiği için çeşit standardı olmadığı, ağaçların gübrelenip budanmadığı, antraknoz hastalığına karşı herhangi bir mücadele yapılmadığı için de her ağaçta bu hastalığa özgü simptomların yaygın olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1).

Ağaçların yaprak, yaprak sapı, meyve ve sürgünlerinde farklı büyüklüklerde yuvarlak, kahverengimsi ve siyah nekrotik lekeler oluştuğu, mevsim sonuna doğru yaprak alanlarının %20-50 oranında lekelerle kaplandığı, bazı ağaçların tamamen yapraklarını döktüğü, ciddi derecede meyvelerde olgunlaşmadan dökülmelerin meydana geldiği, ağaçların çoğunda kurumuş dalların olduğu, özellikle yamaçlarda yetişen ve düzenli su verilmeyen ağaçlarda meyvelerin çoğunun içlerinin boş olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Hastalığın ağaçlardaki genel görüntüsü (Orj.)

Yapraklarda başlangıçta (Haziran ayının başında) yuvarlak-köşeli, kahverengi lekelerin seyrek olarak geliştiği, Agustos ayında lekerin genişleyerek yaprağın büyük bir kısmını kapladığı, lekelerin yaprakların sap kısmı boyunca yayıldığı, Agustos- Eylül ayında ise ciddi derecede yaprak ve meyvelerde dökülmelere neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2,3).



Şekil 4.2. Hastalığın Haziran ayının başlarında yaprakdaki simptomu (Orj.)



Şekil 4.3. Hastalığın Ağustos ayında yaprakdaki simptomu (Orj.)

4.2.1. Sürgün ve dallarda antraknoz hastalığının simptomları

Enfekteli ağaçların genç sürgün ve dallarında ilk olarak Temmuz ayında küçük, yuvarlak nekrotik lekeler ve çöküntüler görünmeye başlamış; Ağustos ayında lekeler genişlemiş, sürgünlerin kabuklarında çatlamalar ile sürgün üzerindeki meyve ve yapraklarda dökülmeler meydana gelmiştir (Şekil 4.4,5,6).



Şekil 4.4. Sürgün ve dallarda hastalığın aservulus oluşumu (Orj.)



Şekil 4.5. Sürgün ve yapraklarda hastalığın simptomları (Orj.)



Şekil 4.6. Hastalığının (Temmuz- Ağustos-Eylül) sürgünlerdeki simptomları (Orj.)

Meyvelerin üzerinde küçük, yuvarlak, düzensiz kahverengi lekeler Ağustos ayında görülmeye başlanmış, Eylül ayında ise lekelerin genişleyip meyve kabuğu üzerinde yayılarak kabukta çatlamalara neden olduğu (Şekil 4.7), çok sayıda meyvenin olgunlaşmadan döküldüğü ve meyvenin iç kısmının tamamen siyahlaşıp çürüdüğü gözlenmiştir.



Şekil 4.7. Meyveler üzerindeki simptomları (Orj.)

4.3. Ceviz Yapraklarından Fungal İzolatlarının İzolasyonu

Antraknoz hastalığına özgü simptomlu yapraklardan 115 fungal izolat (*O. leptostyla*) besiyeri ortamında geliştirilmiştir.

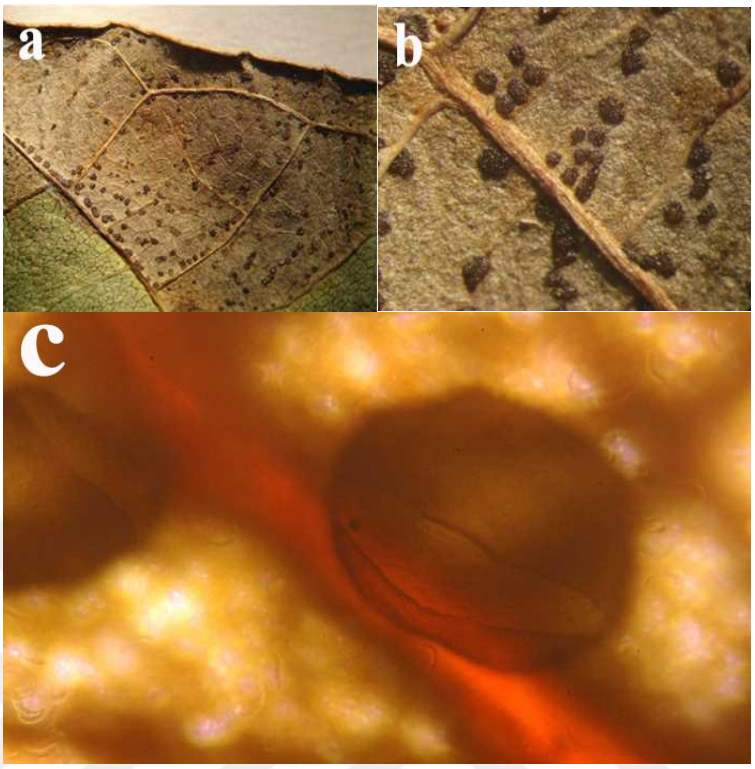
4.4. Fungus İzolatlarının Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

4.4.1. Ceviz antraknoz eşeyli formu olan *Ophiognomonia leptostyla*'nın morfolojik özellikleri

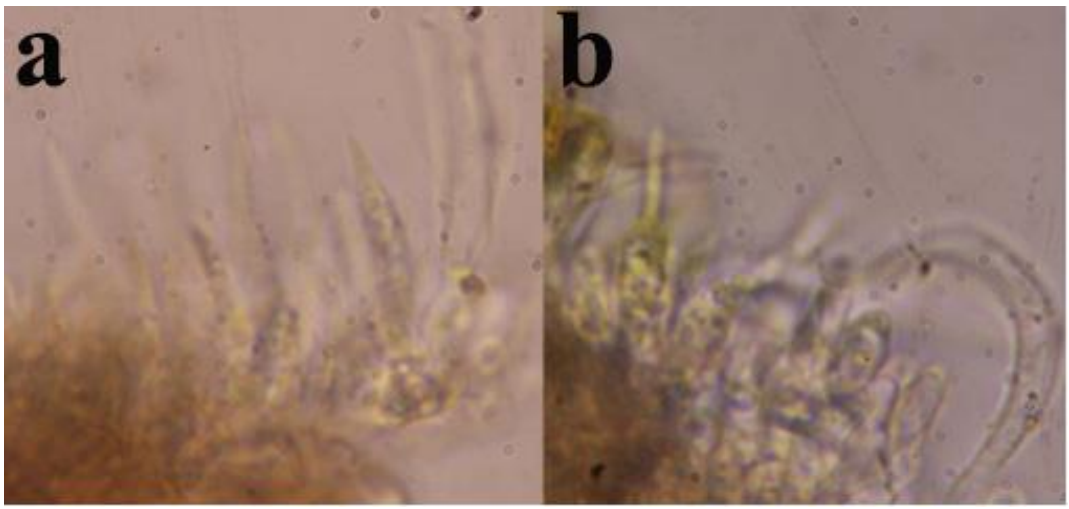
Fungusun eşeyli formu olan *O. leptostyla* ve ilkbaharda peritesyumlar içerisinde gelişen askuslar içinden çıkan ve pirimer enfeksiyonu başlatan askosporlar sonbaharda dökülmüş ve kışı geçirmiş olan yapraklardan izole edilip önce PDA ortamında 25°C'de karanlık ortamda 21 gün, daha sonra 10°C'de, karanlık ortamda, 90 gün inkübe edilmiştir. Yapılan ölçümlerde peritesyumların yaklaşık 247–295 (–309) µm boya ve 175-252 (-302) ene; peritesyumler içerisinde gelişen askusların ise yaklaşık (28–) 29–30 (–33) x (12–) 15–16 (–17) µm boyutlarında**,** elips ve yamuk (fusiform) şekilde, sivri saplara sahip olduğu belirlenmiştir. Askuslar içerisindeki yamuk ve her iki ucuda yuvarlak olan iki hücereli ve septayla bölünmüş olan askosporların düzensiz bir şekilde tek sıralı veya paralel bir şekilde dizildikleri ve (13) 14–15 (19) x 2 µm boyutunda olduğu tespit edilmiştir.

4.4.2. Antraknozun eşeysiz formu Olan *Marssoniella juglandis* morfolojik özellikleri

Fungusun eşeysiz formu olan ve askosporların başlattığı pirimer enfeksiyondan sonra bitki yapraklarında genellikle de yaprakların alt kısımlarında gelişen aservuluslar kurumuş nokta şeklindeki küçük kahverengimsi siyah renkli lekeli dokulardan izole edilmiştir (Şekil 4.8). Aservulusların düzensiz yuvarlak veya kare şeklinde 130-240 x 120-210 µm ebatlarında olduğu, konidiyosporların aservulusların içinde hilal şeklinde eğimli yada düz şekilde bulunduğu ve üstünde 2 hücreli, şefaf ve uç kısımları ince konodiosporların geliştiği belirlenmiştir (Şekil 4.8,9).



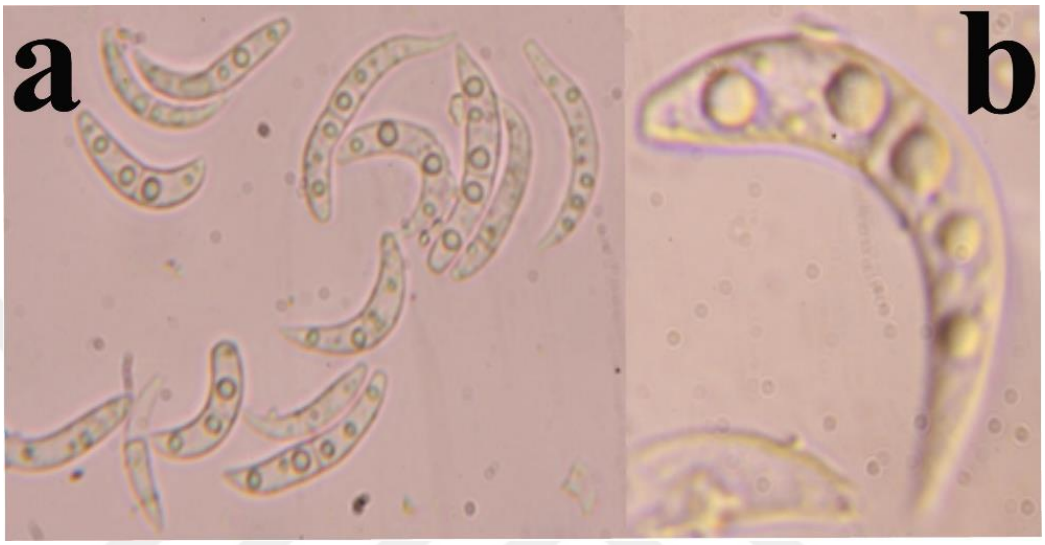
Şekil 4.8. *O. leptostyla*'nın yaprakların üzerinde oluşan aservuluslarının görüntüsü: **a**, **b**; yırtılmış olan epidermi (**c**) (Orj.)



Şekil 4.9. *O. leptostyla*'nın yaprak üzerindeki konidiyoforları (**a**, **b**) (Orj.)

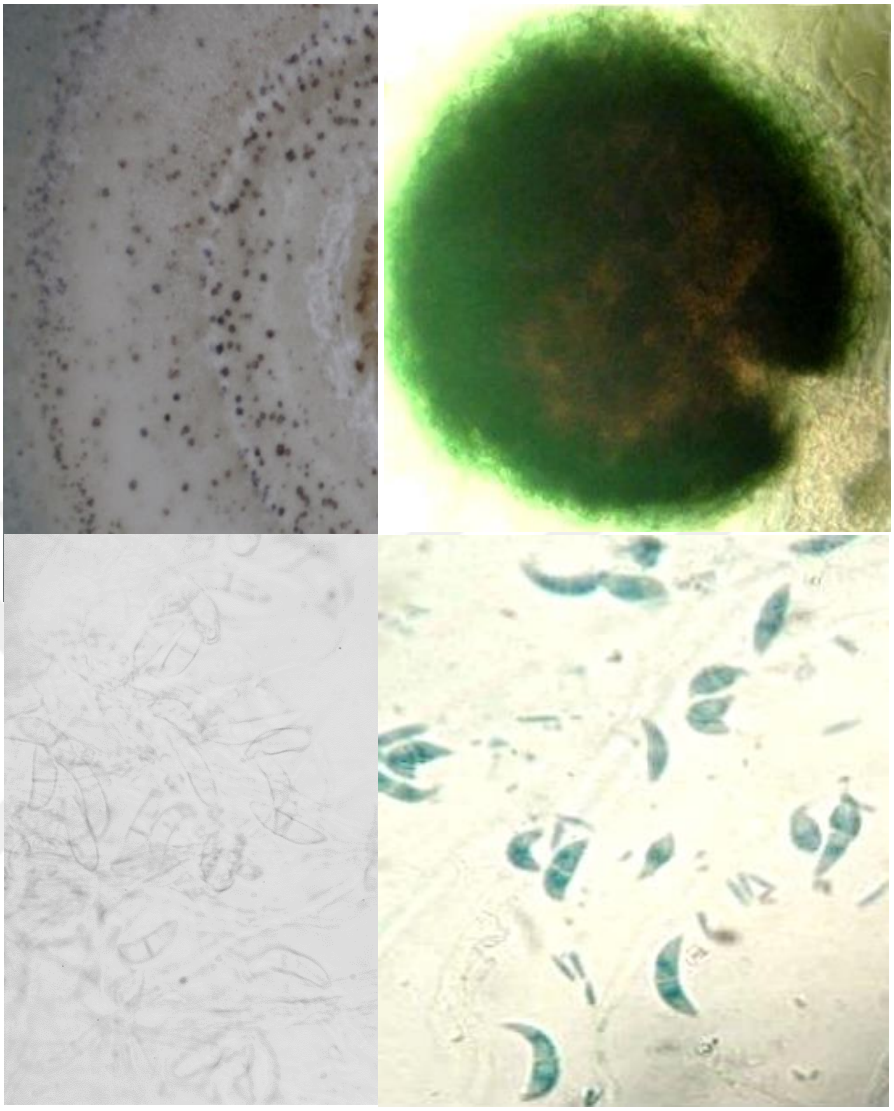
Yaz ortalarında yaprak dokularından elde edilen ve fungusun eşeysiz formu olan düz yada ay şeklinde (lunate) görünüme sahip makrokonidilerin 15-29 x 2.5-5 µm boyutlarında olduğu, septanın bulunduğu yerin belirgin şekilde daraldığı, septanın alt kısmındaki

hücrenin üst kısımdaki hücre ile aynı büyüklük ve uzunlukta olduğu, alt kısımdaki hücrenin uç kısmının yuvarlak, üst kısımdaki hücre ucunun oval olduğu görüntülenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. *O. leptostyla* makrokonidilerinin görüntüsü (**a**, **b**) (Orj.)

Aservuluslardan izole edilen konidiosporlar OMA besiyerine aktarılıp, 25°C sıcaklıkta, sürekli karanlık ortamda 21 gün bekletildikten sonra elde edilen mikrokonidilerin ise yamuk şeklinde, her iki ucunun yuvarlak ve septasız, yaklaşık 9–12 x 2–3 µm ebatlarında olduğu ölçülmüştür (Şekil 4.11).



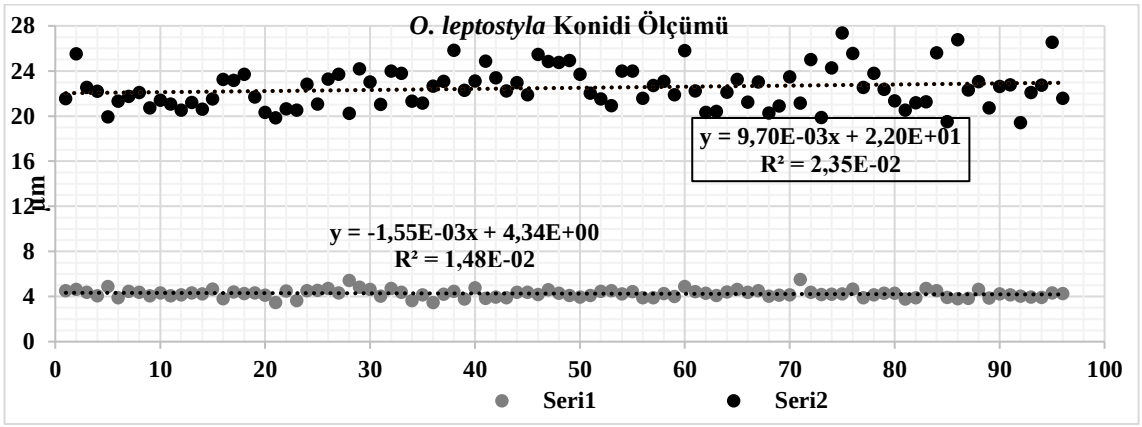
Şekil 4.11. *O. leptostyla*'nın OMA besiyerinde oluşturduğu aservuluslar (Orj.)

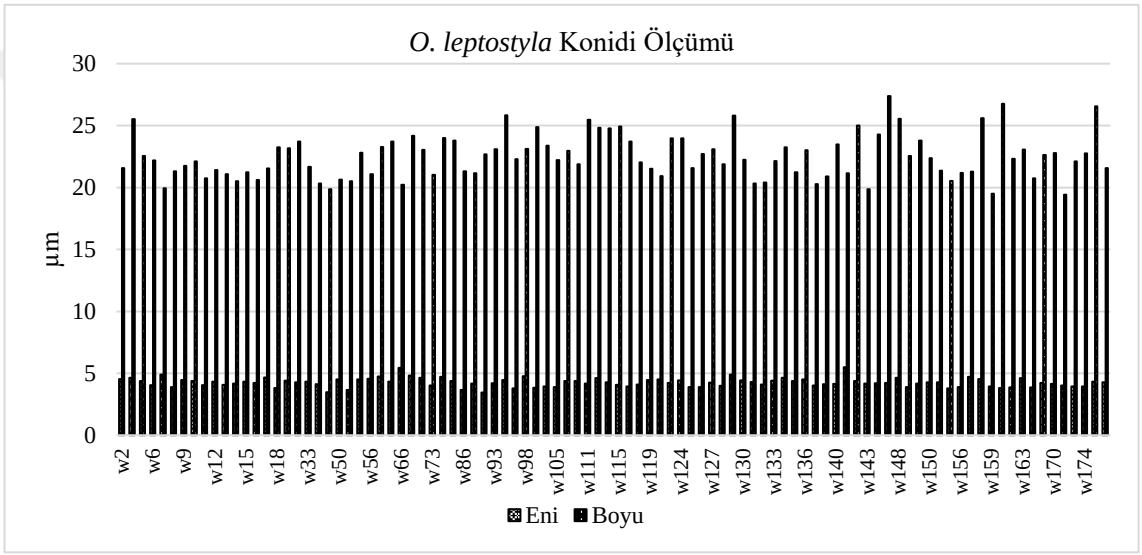
Fungusun eşeysiz formu olan aservulusların üzerinde geliştiği bitki yaprağının alt kısmındaki epidermis dokusu altında oluşan pseudoparankima dokuları üzerinde açık yada koyu kahverengi aservulusların geliştiği, aservuluslar üzerinde ip şeklinde, şeffaf, dik, düzensiz dallanan konidiyoforların üzerinden annelidik olarak konidioforların gelişim gösterdiği ve bunların üzerinden de konidilerin oluştuğu görülmüştür (Şekil 4.9,10).

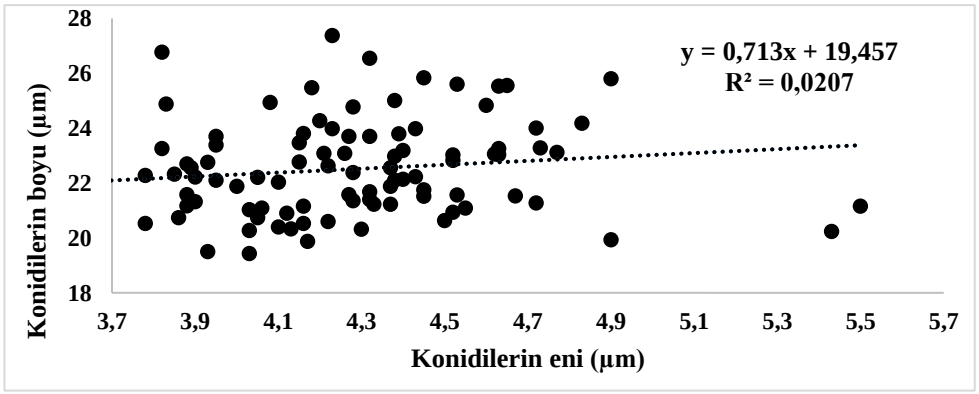
Farklı lokasyonlardan toplanmış izolatlar arasındaki benzerlik ve farklılıkların belirlenmesi için toplam 48 yaprak örneği ve her örnekten de 30 konidiospor

ölçüldüğünde ortalama konidispor boylarının 19,5-27,37, enlerinin ortalamasının ise 3,46-5,5 µm arasında değiştiği belirlenmiştir.

En uzun konidiospor sırası ile W147 (27,37 µm), W160 (26,77 µm), W175 (26,55 µm), W129 (25,8 µm), W95 (25,83 µm), W158 (25,6 µm) ve W148 (25,55 µm); en kısa ise W171 (19,43 µm), W159 (19,5 µm), W143 (19,87 µm) ve W49 (19,85 µm) izolatlarından elde edilirken; en geniş ene sahip konidiler W141 (5,5 µm), W129 (4,9 µm), W69 (4,83 µm) ve W98'den (4,77 µm) elde edilirken; en dar konidiler ise W92 (3,46 µm), W49 (3,48 µm), W86 (3,65 µm) ve W153 (3,78 µm) izolatlarından elde edilmiştir (Şekil 4.13). İzolatların konidi uzunlukları arasındanki korelasyonda y=9,70E-03x+2,20E+01 (R^2=2,35E-02) bulunurken, enlerinin arasındaki korelasyon y=-1,55E-03x+4,34E+00 (R^2=1,48E-02) olarak bulunmuştur (Şekil 4.12).







Şekil 4.12. *O. leptostyla* konidilerinin boy ve enlerinin korelasyon diyagramı

4.5. *Ophiognomonia leptostyla* İzolatların Farklı Ortamlarda Gelişimlerinin Belirlenmesi

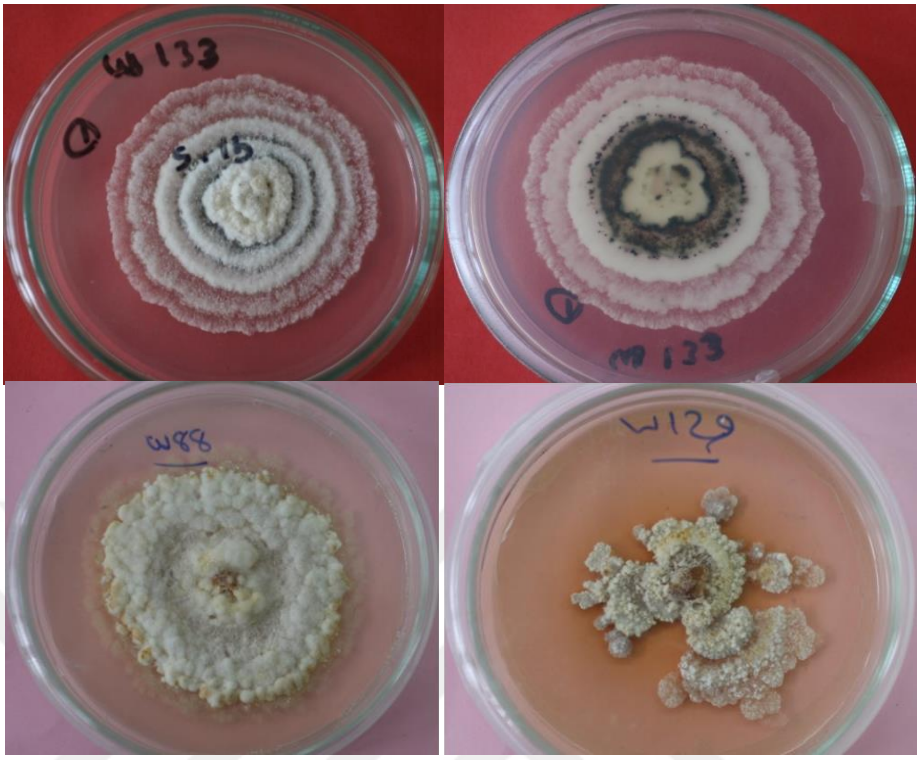
Fungus izolatlarının farklı besi ortamlarında gelişimlerinin mukayese edilmesi amacıyla PDA, OMA, WLEA, WFSEA ve WA ortamları kullanılmıştır. Bunun için besiyerleri 9 cm çapında petrilere 25 mL dökülmüş ve akabinde fungusun aservulusundan izole edilen makrokonidileri PDA besiyerine inokule edilerek 25°C'de karanlık ortamada inkubasyona bırakılarak gelişmiş olan koloniden kesitler hazırlanıp farklı ortamlara aktarılarak 2, 9, 16 ve 23 gün sonra ölçümlüp mukayese edilmiştir.

4.5.1. *Ophiognomonia leptostyla* izolatlarının PDA ortamında gelişimleri

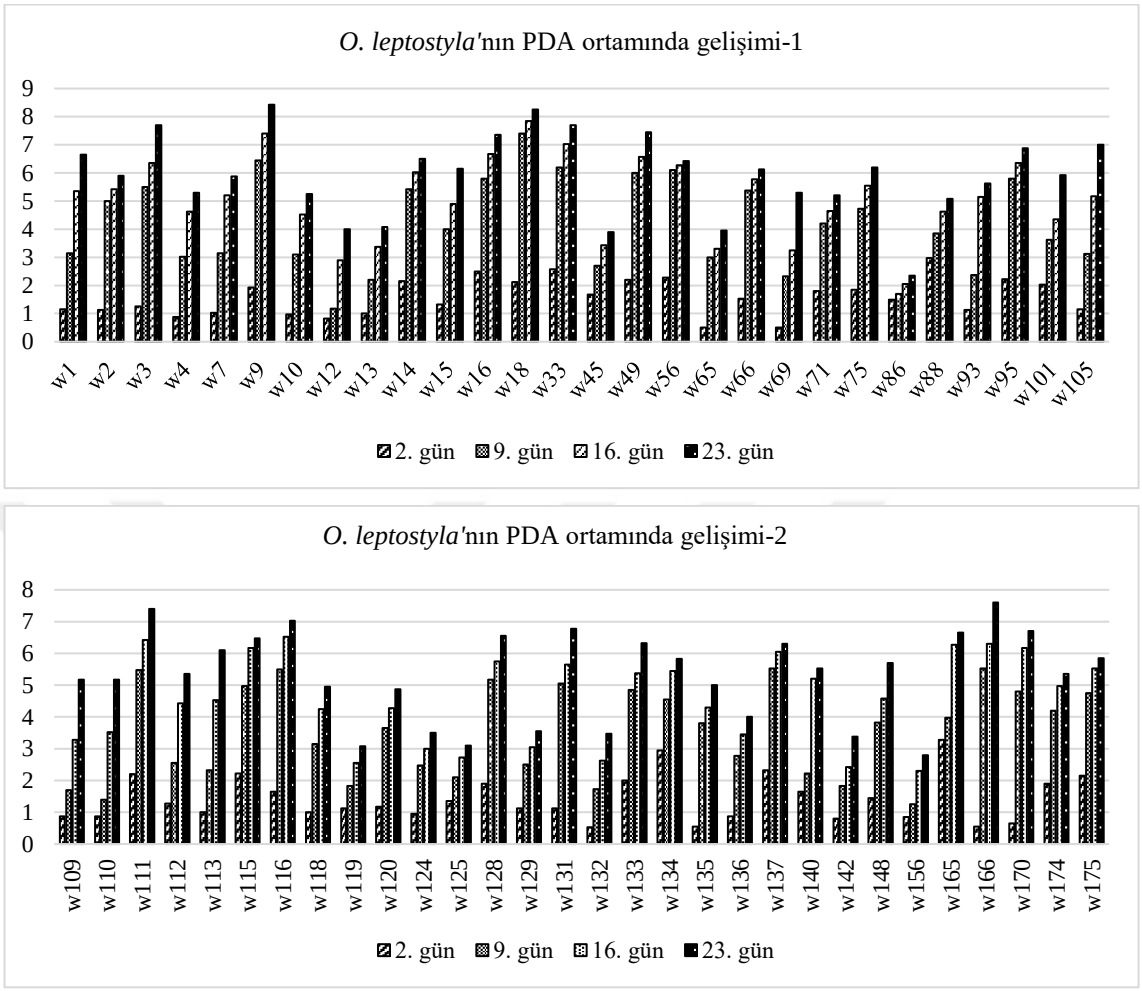
Antraknoz hastalığına (*O. leptostyla*) özgü simptom gösteren yapraklardan izole edilip PDA ortamında geliştirilen kolonilerin 23 gün sonra 5,62 cm çapa ulaştıkları ve izolatlar arasında da gelişim farklılıklarının olduğu görülmüştür.

İzolatlardan farklı renklerde **(**beyaz, krem, açık sarı, kahve ve koyu kahve renkili) iç içe geçmiş halkasal, kenarları düz yada dalgalı, besi yerine batmış yada yüzeysel kolonilerin geliştiği (Şekil 4.13); hiflerin 4-9 µm arasında değişen ene sahip olduğu, az sayıda bazı izolattan PDA üzerinde 10-14 gün sonra siyah renkli protoperiteslerin oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.13). İzolatların 23. gün sonraki gelişimleri mukayese edildiğinde W9 (8,42 cm), W18 (8,25 cm), W110 (7,40 cm), ve W166 (7,60 cm) izolatları en hızlı W75 (2,35 cm), W119 (3,07 cm), W124 (3,50 cm), W125 (3,10 cm), W129 (3,55 cm), W132 (3,47 cm), W142 (3,37 cm) ve W156 (2,80 cm) en yavaş gelişen izolatlar olmuştur (Şekil 4.14; Çizelge 4.2).

İzolatlar PDA ortamında düşük sıcaklıkta (4°C) 45 gün bekletildiğinde ise agar içerisinde yoğun, kahve ve siyah renkli stroma dokusu oluşmuş ve stroma dokuları içerisinde de tek hücreli mikrokonidilerin (enfeksiyon yeteneği olmayan ancak fungusun eşyli üremesinde rol oynayan spermatia) teşekkül ettiği gözlenmiştir. Mikrokonidiler ceviz yapraklarına inokule edildiğinde ise herhangi bir enfeksiyonun gelişmediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.13. PDA ortamında gelişen *O. leptostyla* kolonilerin petri kaplarının üst ve altan görüntüsü ile koloniler arasında gelişen protoperitesiyumların görüntüsü (Orj.)

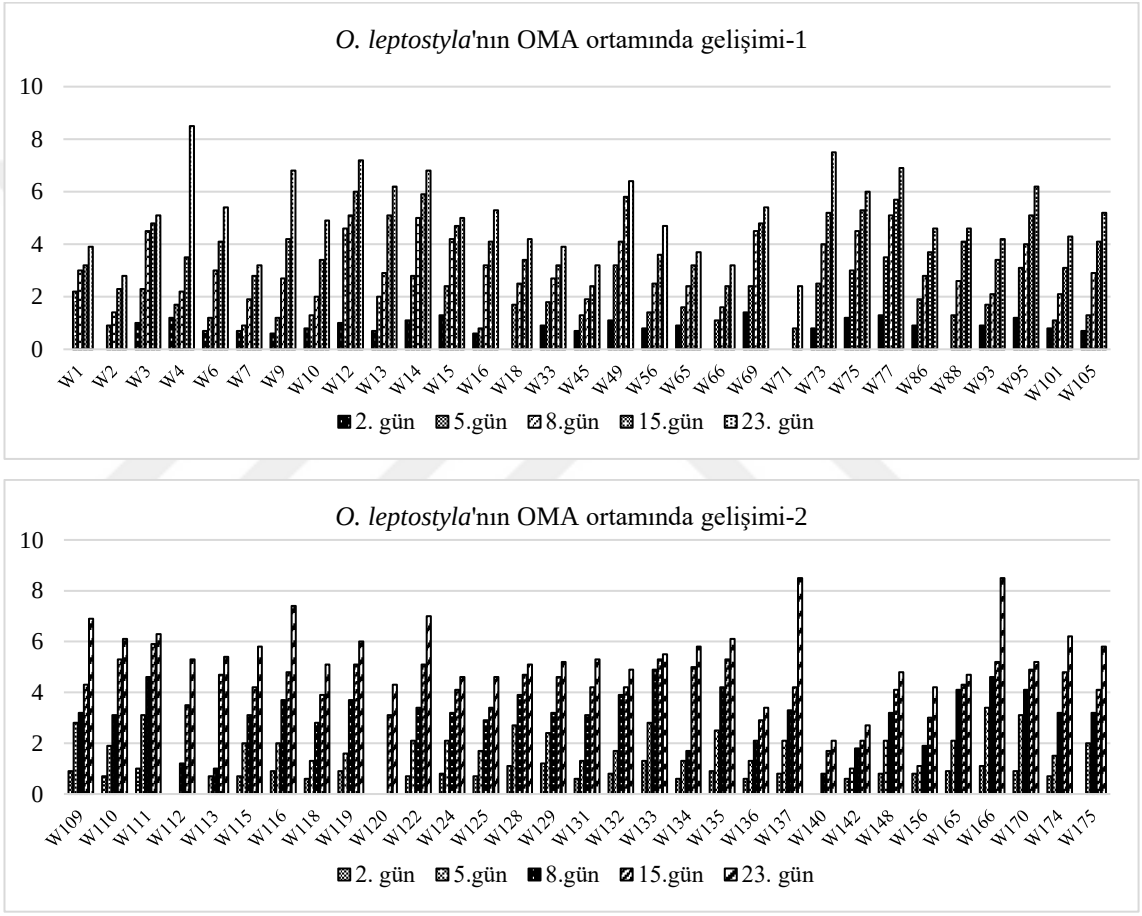


Şekil 4.14. *O. leptostyla* izolatların PDA ortamında 2, 9, 16 ve 23. gün içinde gelişimleri

4.5.2. *Ophiognomonia leptostyla* izolatlarinin OMA ortamindaki gelişimleri

O. leptostyla izolatları OMA ortamında, 25ºC ve karanlık ortamda 23 gün inkubasyona bırakılıp koloni çapları ölçüldüğünde kolonilerin ortalama 5,06 cm çapa ulaştığı misellerin besiyerine batık beyaz, sarı ve açık kahve renkli iç içe geçmiş halkasal koloniler oluşturduğu, kolonilerin alt kısımlarında 18-21 gün sonra 200-980 x 170-810 µm boyutlarında kahve ve siyah renkte aservulusların oluşmaya başladığı gözlenmiştir (Şekil 4.11). Aservuluslardan da sarı renkli 8-11 x 2-3 µm boyutlarında mikrokonidi ve renksiz, eğimli ve iki hücreli (uc kısımındaki hücrenin daha büyük) 19-23 x 3-7 µm makrokonilerin geliştiği belirlenmiştir (Şekil 4.14,15; Çizelge 4.2).

Yapılan ölçümlerde OMA ortamında izolatların oluşturduğu koloni gelişim hızlarının da farklılık gösterdiği, 23. gün sonunda 58 izolattan en hızlı W4 (8,33 cm), W115 (7,16 cm); W136 (8,40 cm); ve W165 (8,40 cm) gelişim gösterirken; W137 (1,76 cm); W140 (2,36 cm); W135 (3,23 cm); W9 (3,06 cm); W45 (2,90 cm) ve W71 (2,63 cm) ise en yavaş gelişim göstermiştir (Şekil 4.15; Çizelge 4.2).



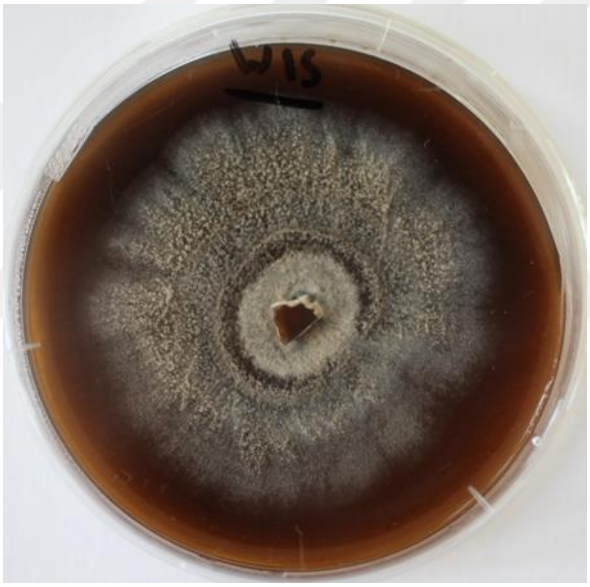
Şekil 4.15. *O. leptostyla* izolatlarının OMA ortamında 2, 9, 16 ve 23 gün içinde gelişimleri

4.5.3. *Ophiognomonia leptostyla* izolatlarının WLEA ortamındakı gelişımlerı

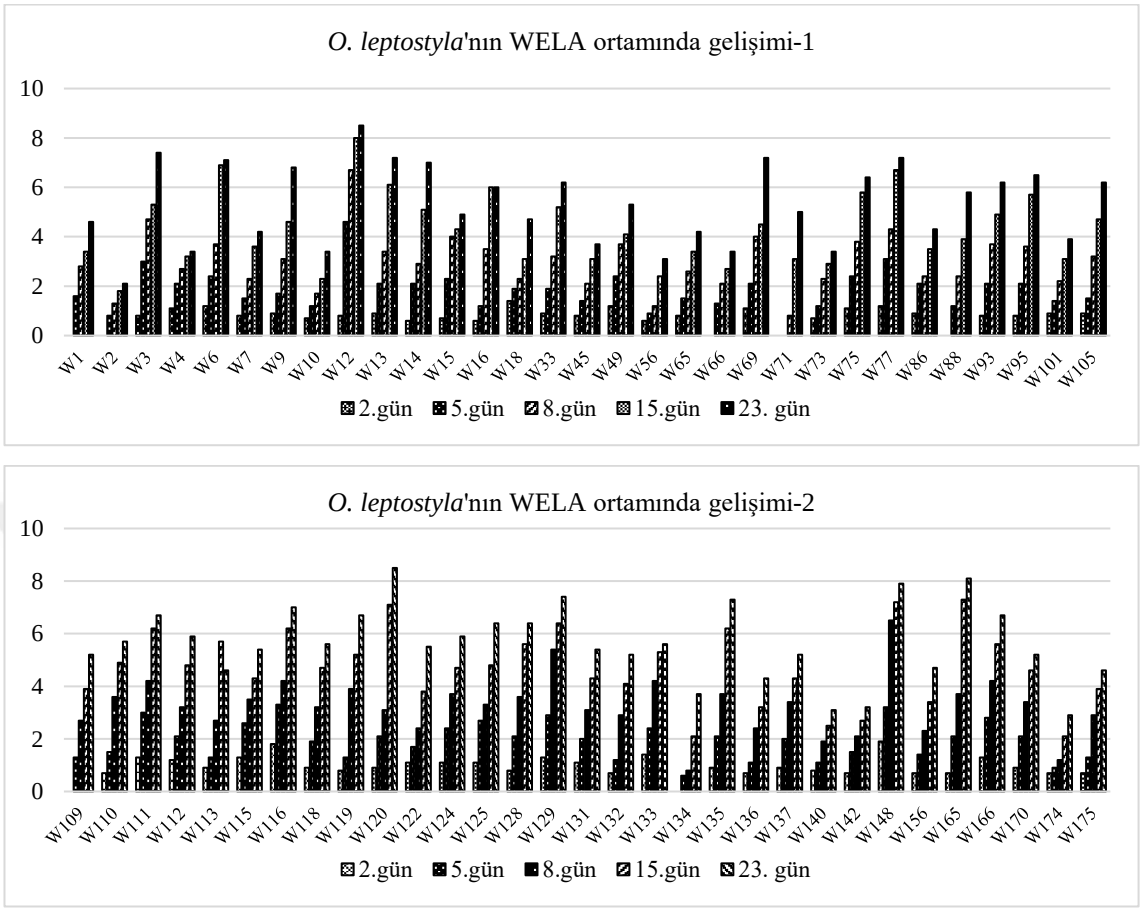
O. leptostyla izolatlarının WLEA ortamında, 25ºC ve karanlık ortamda 23 gün inkubasyona bırakılıp koloni çapları ölçüldüğünde kolonilerin ortalama 5,31 cm çapa ulaştığı miselleri besiyerine batık gri, kirli sarı veya açık kahve renkli geliştiği; aservullus

ve protoperiteslerin oluşmadığı, çok zayıf bir şekilde gelişen misellerin pamuksu doku oluşturdukarı görülmüştür (Şekil 4.16).

Yapılan ölçümlerde WLEA ortamında izolatların oluşturduğu koloni gelişim hızlarının da farklılık gösterdiği, 23. gün sonunda 58 izolattan en hızlı W12 (8, 33 cm), W13 (7,06 cm), W119 (8,20 cm), W156 (7,63 cm) izolatları gelişim gösterirken; W2 (1,9), W4 (3,30 cm), W10 (3,23 cm), W45 (3,43 cm), W56 (2,90 cm) ve W140 (3,17 cm) izolatları ise en yavaş gelişim gösteren izolatlar olmuştur (Şekil 4.17; Çizelge 4.2).



Şekil 4.16. *O. leptostyla* kolonisinin WLEA ortamındaki gelişimileri (Orj.)



Şekil 4.17. *O. leptostyla* izolatlarının WELA ortamındaki 2, 9, 16 ve 23. gün gelişim durumları

4.5.4. *Ophiognomonia leptostyla* izolatlarinin WFSEA ortamindaki gelişimleri

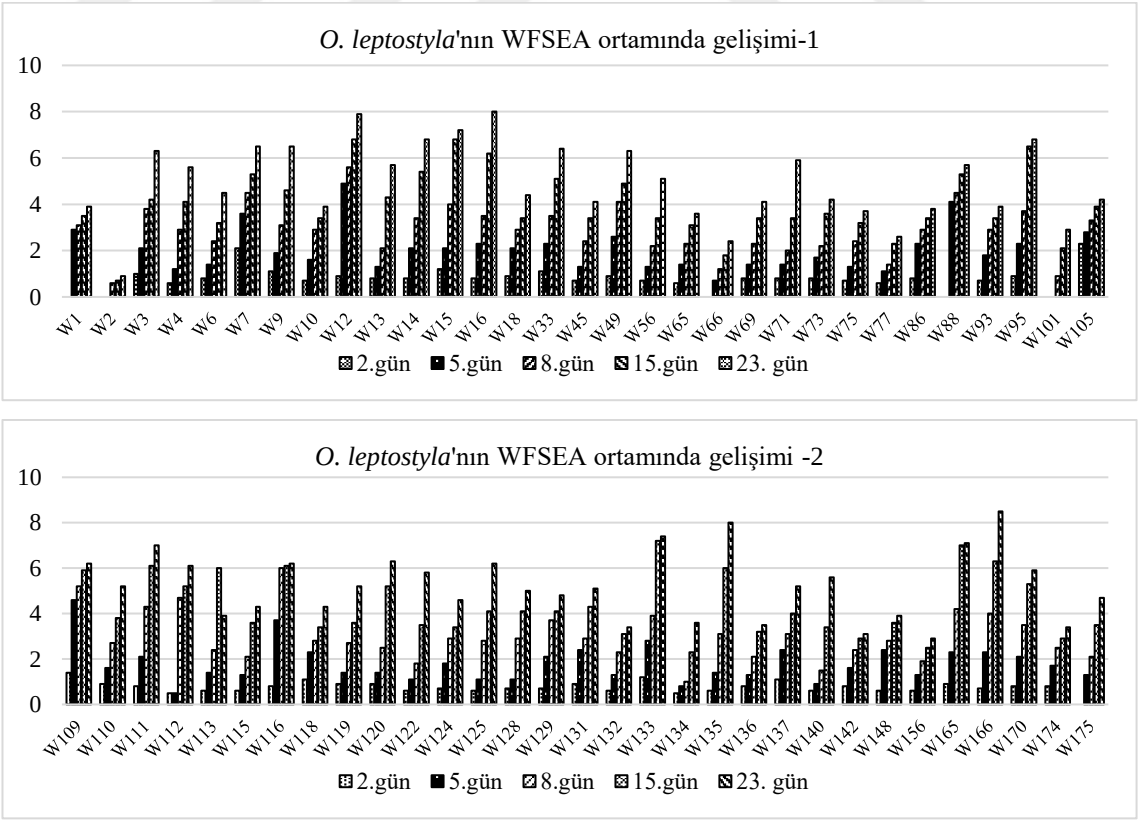
O. leptostyla izolatları WFSEA ortamında, 25ºC ve karanlık ortamda 23 gün inkubasyona bırakılıp koloni çapları ölçüldüğünde kolonilerin ortalama 5,15 cm çapa ulaştığı miselleri besiyerine batık, beyaz ve gri renkli geliştiği; kolonilerde halkasal bir gelişim göstermiştirlerdir (Şekil 4.18).

Yapılan ölçümlerde WFSEA ortamında izolatların oluşturduğu koloni gelişim hızlarının da farklılık gösterdiği, 23. gün sonunda 58 izolattan en hızlı W134 (7,83 cm), ve W165 (8,36 cm) gelişim gösterirken; W2 (0,8 cm), W66 (2,46 cm), W95 (2,73 cm), W131 (3,33

cm), W148 (2,80 cm) ve W170 (2,70 cm) izolatları ise en yavaş gelişim göstermiştir (Şekil 4.19; Çizelge 4.2).



Şekil 4.18. *O. leptostyla*'nın WFSEA ortamındaki gelişimleri (Orj.)

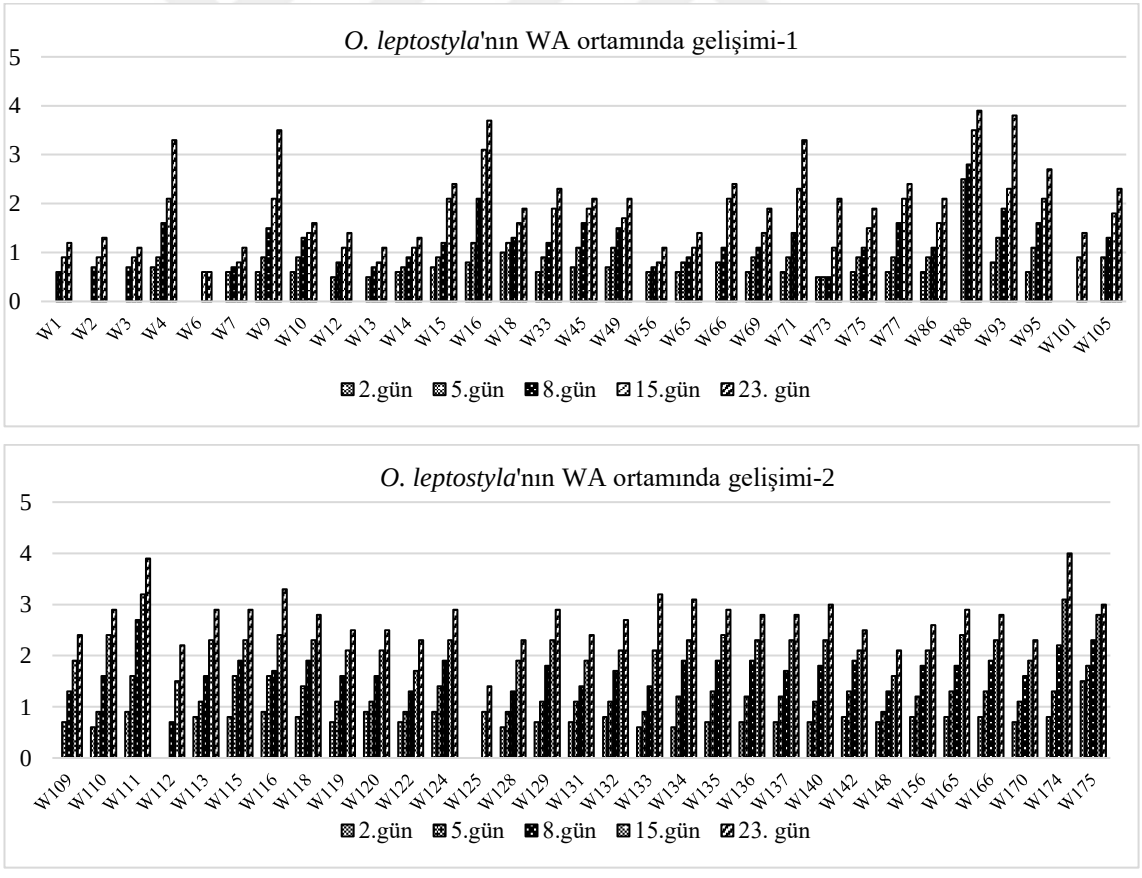


Şekil 4.19. *O. leptostyla* izolatlarının WFSEA ortamında 2, 9, 16 ve 23. gün gelişimleri

4.5.5. *Ophiognomonia leptostyla* İzolatlarının WA Ortamındaki Gelişimleri

O. leptostyla izolatları WA ortamında, 25ºC ve karanlık ortamda 23. gün inkubasyona bırakılıp koloni çapları ölçüldüğünde halkasal olmayan kolonilerin ortalama 2,41 cm çapa ulaştığı, miselleri şeffaf renkli geliştiği ve aservulus oluşturmadıkları görülmüştür.

Yapılan ölçümlerde WA ortamında izolatların oluşturduğu koloni gelişim hızlarının da farklılık gösterdiği; W9 (3,40 cm), W16 (3,60 cm), W88 (3,50 cm), W110 (3,80 cm) ve W174 (3,96 cm) en hızlı gelişim gösterirken; W7 (1,0 cm), W13 (1,0 cm), W56 (1,36 cm), W65 (1,50 cm), W95 (1,40 cm) ve W124 (1,23 cm) izolatları ise en yavaş gelişim göstermiştir (Şekil 4.20; Çizelge 4.2).



Şekil 4.20. *O. leptostyla* izolatlarının WA ortamında 2, 9, 16 ve 23. gün gelişimleri

4.6. *Ophiognomonia leptostyla* İzolatlarının Gelişme Hızları

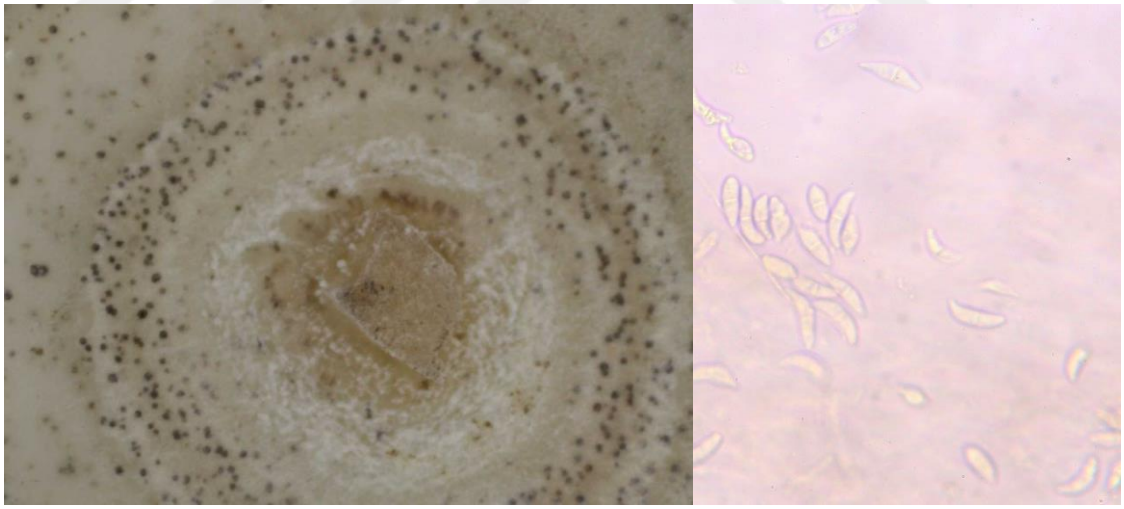
İzolatların bütün besiyeri ortamlarında gelişim gösterdikleri belirlenirken, kolonilerin PDA, OMA, WLEA, WFSEA ve WA ortamlarında gelişimleri sırasıyla 5,62, 5,06, 5,31, 5,15 ve 2,41 cm olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.2). İzolatların canlı bitki dokusu dışında farklı ortamlarda gelişim göstermeleri *O. leptostyla* fungusunun fakültatif saprofit bir fungus olduğunu göstermektedir. Bu özelliği de fungusun kışlaması ve zor şartlarda canlı kalabilmesinde önemli bir özellik olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.2. *O. leptostyla* izolatlarının farklı ortamlarda 23. gündeki gelişimleri

	PDA	OMA	WLEA	WFSEA	WA		PDA	OMA	WLEA	WFSEA	WA
W1	6.65±0.02 a	3.70±0.11c	4.33±0.15b	3.73±0.08c	1.06±0.08d	**W110**	7.40±0.16 a	5.80±0.26b	6.36±0.17 a	6.93±0.23 a	3.80±0.21c
W2	5.90±0.23b	2.66±0.08	1.90±0.11d	0.80±0.05d	1.33±0.08d	**W111**	5.35±0.14b	5.03±0.17b	5.83±0.23b	5.66±0.23b	2.03±0.12c
W3	7.70±0.30 a	4.90±0.11b	7.16±0.14 a	6.2±0.05 a	1.06±0.08d	**W112**	6.10±0.11 a	5.06±0.20b	4.23±0.20b	3.50±0.21c	2.60±0.25c
W4	5.30±0.50b	8.33±0.08 a	3.30±0.05c	5.40±0.11b	3.20±0.05c	**W113**	6.47±0.16 a	5.30±0.26b	5.13±0.14b	4.10±0.11b	2.60±0.21c
W7	5.87±0.08b	5.30±0.05b	7.06±0.08 a	4.33±0.08b	1.00±0.05d	**W115**	7.02±0.21 a	7.16±0.18 a	6.53±0.32 a	6.00±0.15 a	3.03±0.17c
W9	8.42±0.07 a	3.06±0.08c	4.20±0.05b	6.33±0.08 a	3.40±0.05c	**W116**	4.95±0.49b	4.90±0.11b	5.23±0.20b	4.13±0.12b	2.60±0.15c
W10	5.25±0.06b	6.50±0.15 a	3.23±0.08c	6.40±0.05 a	1.43±0.12d	**W118**	5.35±0.23b	5.66±0.20b	6.13±0.38 a	4.76±0.29b	2.30±0.11c
W12	4.00±0.12b	4.73±0.08b	8.33±0.08 a	3.70±0.11c	1.30±0.05d	**W119**	3.07±0.63c	3.96±0.17c	8.20±0.17 a	6.06±0.14 a	2.26±0.18c
W13	4.07±0.26b	7.06±0.08 a	7.06±0.08 a	7.63±0.14 a	1.00±0.05d	**W120**	4.87±0.06b	6.63±0.18 a	5.20±0.17b	5.70±0.05b	2.10±0.11c
W14	6.50±0.29 a	6.10±0.05 a	6.86±0.08 a	5.43±0.14b	1.13±0.12d	**W124**	3.50±0.09c	4.80±0.15b	6.23±0.08 a	5.80±0.23b	1.23±0.08d
W15	6.15±0.70 a	6.56±0.12 a	4.73±0.08b	7.03±0.08 a	2.23±0.12c	**W125**	3.10±0.14c	4.26±0.20b	6.33±0.23 a	4.66±0.23b	2.36±0.17c
W16	7.35±0.46 a	4.86±0.18b	5.66±0.17b	7.70±0.15 a	3.60±0.15c	**W128**	6.55±0.12a	5.30±0.15b	6.40±0.11 a	4.66±0.18b	2.53±0.18c
W18	8.25±0.06 a	4.06±0.08b	4.50±0.15b	4.20±0.11b	1.70±0.11d	**W129**	3.55±0.15c	5.20±0.15b	5.50±0.21b	5.43±0.20b	2.46±0.12c
W33	7.70±0.33 a	3.70±0.11c	6.16±0.14 a	6.20±0.11 a	2.10±0.11c	**W131**	6.77±0.27 a	4.76±0.29b	5.00±0.15b	3.33±0.23c	2.63±0.12c
W45	3.90±0.25c	2.90±0.14c	3.43±0.14c	6.83±0.17 a	2.16±0.17c	**W132**	3.47±0.35c	5.20±0.17b	5.60±0.17b	7.36±0.14a	3.00±0.15c
W49	7.45±0.16 a	6.60±0.20 a	4.96±0.17b	6.03±0.17 a	2.06±0.14c	**W133**	6.32±0.37 a	5.70±0.05b	3.43±0.14c	3.46±0.08c	2.90±0.11c
W56	6.42±0.14 a	4.40±0.15b	2.90±0.11c	5.20±0.05b	1.36±0.14d	**W134**	5.82±0.42b	5.90±0.11b	7.13±0.12 a	7.83±0.27 a	2.56±0.17c
W65	3.95±0.29c	3.33±0.18	3.83±0.23c	3.23±0.20c	1.50±0.21d	**W135**	5.00±0.13b	3.23±0.08c	4.20±0.05b	3.26±0.12c	2.93±0.18c
W66	6.12±0.21 a	3.23±0.20c	3.43±0.14c	2.46±0.23c	2.53±0.08c	**W136**	4.00±0.09b	8.40±0.05 a	4.83±0.18b	5.06±0.08b	2.40±0.21c
W69	5.20±0.68b	5.36±0.26b	7.13±0.12 a	4.50±0.23b	2.30±0.23c	**W137**	6.30±0.14 a	1.76±0.17d	3.06±0.08c	5.50±0.15b	2.86±0.08c
W71	6.20±0.54 a	2.63±0.12c	5.23±0.28b	5.66±0.39b	3.46±0.12c	**W140**	5.52±0.51b	2.36±0.17c	3.17±0.02c	3.23±0.08c	2.43±0.17c
W75	2.35±0.14c	7.33±0.22 a	6.30±0.32 a	3.93±0.15c	2.16±0.17c	**W142**	3.37±0.12c	4.90±0.15b	7.60±0.17 a	3.93±0.14c	1.90±0.11d
W86	5.07±0.41b	4.66±0.34b	4.80±0.28b	3.73±0.29c	2.20±0.26c	**W148**	5.70±0.73b	3.86±0.20c	4.36±0.17b	2.80±0.21c	2.33±0.14c
W88	5.62±0.13b	5.88±0.18b	5.86±0.12b	5.26±0.23b	3.50±0.30c	**W156**	2.80±0.14c	4.50±0.15b	7.63±0.24 a	6.70±0.23 a	2.83±0.17c
W93	6.87±0.31 a	4.26±0.23b	6.23±0.26 a	6.80±0.23 a	2.70±0.23c	**W165**	6.65±0.06 a	8.40±0.05 a	6.63±0.17 a	8.36±0.08 a	2.76±0.20c
W95	5.92±0.26b	4.53±0.33b	3.83±0.23c	2.73±0.08c	1.40±0.11d	**W166**	7.60±0.34 a	4.80±0.26b	5.06±0.18b	5.53±0.18b	2.10±0.11c
W101	7.00±0.12 a	4.90±0.17b	6.66±0.22 a	4.33±0.18b	2.03±0.17c	**W170**	6.70±0.09 a	5.53±0.33b	2.70±0.27c	3.30±0.21c	3.96±0.14c
W105	5.17±0.11b	6.86±0.20 a	5.03±0.12b	6.23±0.32 a	2.40±0.17c	**W174**	5.35±0.23b	5.50±0.15b	4.30±0.15b	4.70±0.23b	3.96±0.14c
W109	5.17±0.11b	6.10±0.17 a	5.53±0.08b	5.50±0.21b	2.80±0.26c	**W175**	5.85±0.03b	5.23±0.38b	4.23±0.12b	4.97±0.11b	2.76±0.12c

4.7. *Ophiognomonia leptostyla*'nın Eşeysiz Formunun (Marssoniella juglandis) Elde Edilmesi

Eşeysiz spor elde etmek için yaz döneminde toplanmış yapraklardan izole edilen aservuluslardan mikroskop altında (60X büyütme) konidiosporlar setril saf suya aktarılıp 24-48 saat 25°C sıcaklık ve karanlık ortamda tutulduktan sonra çimlenen konidiosporlar WA besiyerine aktarılmıştır. Takiben oluşan kolonilerlerden alınan miseller PDA ortamına aktarılmış bu ortamda gelişen ve olgunlaşan kolonilerden alınan miseller OMA ortamına aktarılıp 25°C'de, karanlık ortamda, 21 gün gelişime bırakıldıklarında açık sarı ve beyazımsı kolonilerin geliştiği, 2 hafta sonra küçük siyah ve koyu kahverengi farklı boyutlara (200-1030 x 160-850 µm) aservulusların oluşmaya başladıkları ve aservulusların içinde de bol miktarda yamuk şeklinde, her iki uc yuvarlak ve septasız, yaklaşık 9–12 x 2–3 µm ebatlarında mikrokonidilerin teşekkül ettiği görülmüştür (Şekil 4.21).



Sekil 4.21. OMA ortamında *O. leptostyla*'nın aservulus ve konidiosporları (Orj.)

4.8. *Ophiognomonia leptostyla*'nın Eşeyli Formunun (Peritesyum) Elde Edilmesi

Fungusun *in vitro* şarlarda eşeyli formunun elde edilmesi amacıyla 30 izolat (W3, W9, W12, W16, W45, W56, W65, W66, W71, W75, W88, W93, W95, W103, W105, W109,

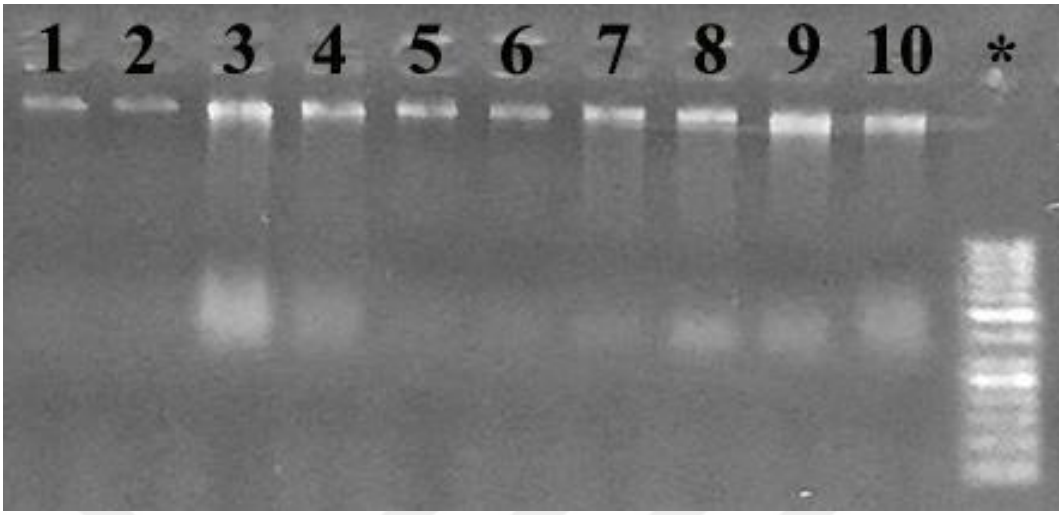
W110, W113, W118, W120, W124, W131, W135, W140, W142, W148, W156, W166, W170, W175) PDA ortamına alınıp 90 gün boyunca 10ºC sıcaklıkta ve 24 saat karanlıkta tutulduklarında siyah renkli, genelde tek olmakla birlikte bazen toplu şekilde, yarısı agar içinde yarısı üzerinde olmak üzere çapları 480 µm ulaşan peritesyumların oluşturğu görülmüştür (Şekil 4.21). Hazırlanan preparatlar mikrosokopta incelendiğinde periteslerden yamuk şekilli, 47-65 x 8-16 µm boyutlarında askusların oluştuğu, askuslar içerisinde de şeffaf, yamuk, iki hücreli, 15-19 x 2.5-5 µm boyutlarında askosporların geliştiği ve askosporların WA ortamına alındıktan 18-24 saat arasında 25ºC'de çim tüpleri oluşturdukları görülmüştür.

Denemede PDA ortamında 10ºC'de, 90 gün bekletildiğinde peritesiyum üreten izolatlar (W12, W16, W71, W75, W95, W103, W109, W113, W142, W175) homotal ve peritesiyum veya peritesyum içinde askus ve askospor üretmemiş izolatlar (W12, W16, W71, W75, W95, W103, W109, W113, W142, W175) ise heterotal olarak tanımlanmıştır.

4.9. *Ophiognomonia leptostyla* İzolatlarında DNA ve PCR Çalışmaları

4.9.1. Fungus izolatlarinin DNA'larının elektroforezleri

Farklı bölgelerden toplanan izolatlardan bölgeyi temsil edecek şekilde ve besiyer ortamlarında farklı morfolojik özellikleri gösteren *O. leptostyla* izolatlarından 10 izolattan (W4, W12, W33, W95, W105, W111, W124, W148, W165, W175) ekstrakte edilen DNA'lar elektroforezde yürütülmüş ve bütün izolatlardan DNA bantları elde edilmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. *O leptostyla* izolatlarından elde edilen DNA'ların %1 agaroz jeldeki görüntüleri
1: W4; **2**: W12; **3**: W33; **4**: W95; **5**: W105; **6**: W111; **7**: W124; **8**: W148; **9**: W165; **10**: W175 ve ***** Markır**:** (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp) (Orj.)

4.9.2. Fungus izolatlarının PCR ile tanılanması

O. leptostyla'nın W4, W12, W33, W95, W105, W111, W124, W148, W165 ve W175 izolatları ITS5 (F)-ITS4 (R), ITS1 (F)- ITS4 (R), EF1 (F)-EF1 728 (R), TEF1 (F)-EF1 1567 (R) pirimer çiftleri kullanılarak PCR gerçekleştirilmiş ve bu pirimer çiftlerinden sırasıyla 584 bp, 587 bp, 586 bp, 587 bp, 588 bp, 585 bp, 585 bp, 586 bp, 587 bp ve 586 bp'lik fragmentler; 560 bp, 566 bp, 1030 bp, 563 bp, 562 bp, 560 bp, 562 bp, 561 bp, 563 bp ve 564 bp'lik fragmentler; 1103 bp, 1081 bp, 1078 bp, 1106 bp, 1093 bp, 1086 bp, 1070 bp, 1085 bp, 1085 bp ve 1076 bp'lik fragmentler; ve 497 bp, 496 bp, 493 bp, 496 bp, 496 bp, 494 bp, 493 bp, 495 bp, 493 bp ve 495 bp'lik fragmentler elde edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *O. leptostyla* izolatlarından farklı primler çiftlerinden beklenen PCR ürünleri

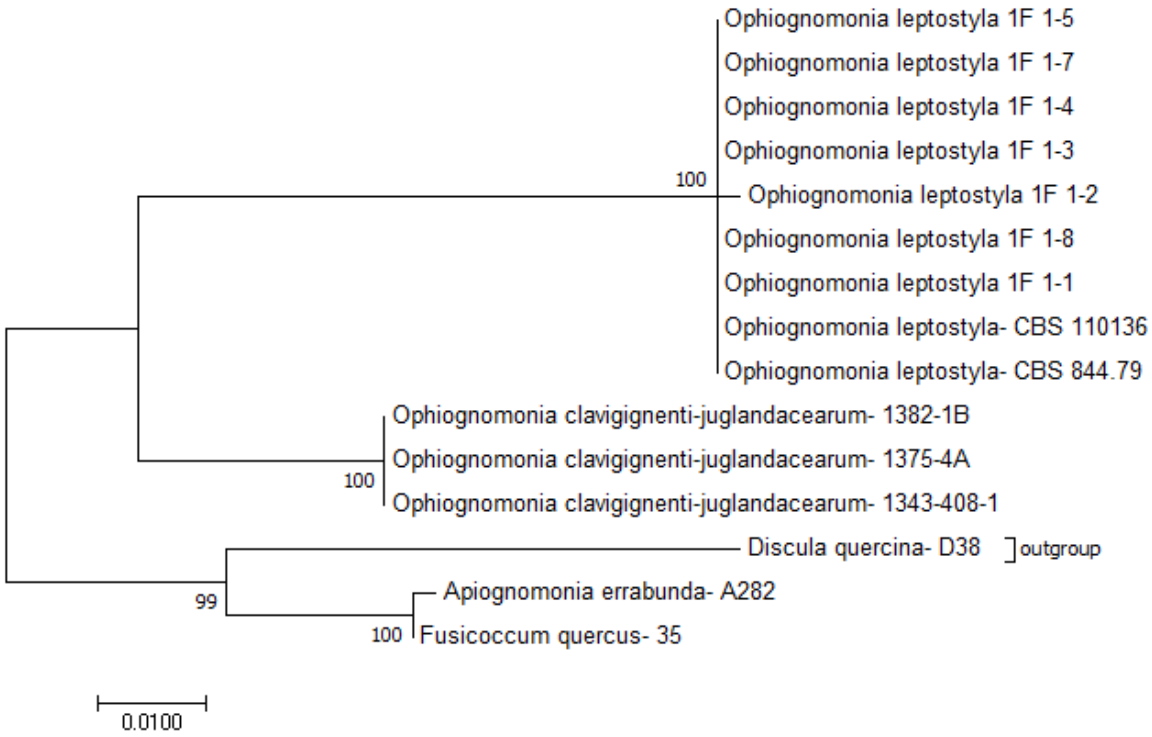
Pirimer çiftler	Beklenen Amplfikasyon Ürünü (bp)	Elde Edilen Amplifikasyon Ürünü (bp)
ITS5 (F) ve ITS4 (R)	1700 bp	584-588 bp
ITS1 (F)- ITS4 (R)	1735 bp	560-566 bp (1030 bp)
EF1 (F)-EF1 728 (R)	943 bp	1070-1106 bp
TEF1 (F)-EF1 1567 (R)	500 bp	493-496 bp

ITS5 (F)-ITS4 Primer Çiftinin Amplifiye Ettiği Bölgenin Sekans Diziliminin Flogenetik Diyagramları

O. leptostyla izolatlarının (W4, W12, W33, W95, W105, W111, W124, W148, W165, W175) ITS5 (F)-ITS4 (R), ITS1 (F)- ITS4 (R), EF1 (F)-EF1 728 (R), TEF1 (F)-EF1 1567 (R) primer çiftleri ile çoğaltılmış olan DNA'nnı korunmuş bölgelerinden elde edilen sekans sonuçları ve flogenetik diyagramları seçilerek verilmiştir (Şekil 4.23).

ITS5 (F)-ITS4 (R) Primer Çiftinin Amplifiye Ettiği Bölgenin Sekans Dizilimi (584 bp)

5'-GTAGTCGCGGAGGACATTGCTGGACAAACGTCCTCACGGGCGCTACCCA
GAAACCCTTTGTGAACATTCCTACTTTGTTGCCTCGGCATGGTTGGCTTCGA
ATGAAGTCCCGCGTCAGCGGAGCAAACCGGCCGGTGGCCCCTTACAAACTC
TTGTTTTTGTAGTATCTTCTGAGGAAAGAAAAATAAATGAATCAAAACTTTC
AACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC
ATTGCGCCCGGTGGTATTCCACCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCACC
CCTCAAAACTTTTGGTTTTGGTGTTGGAGGAATACTTTTCACCCGAGTACCC
TCTGAAATGTAGTGGCGGGCTCGCTAGAAATTTGAGCGTAGTACCTTTTTAC
CTCGTTTGTAAGATCTAGTGGGACTTCTTGCCATAAAACCCCCCCAACTCTC
TGAAATTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGAATATC
AAAAAACCGGGAAGAGAA-3'



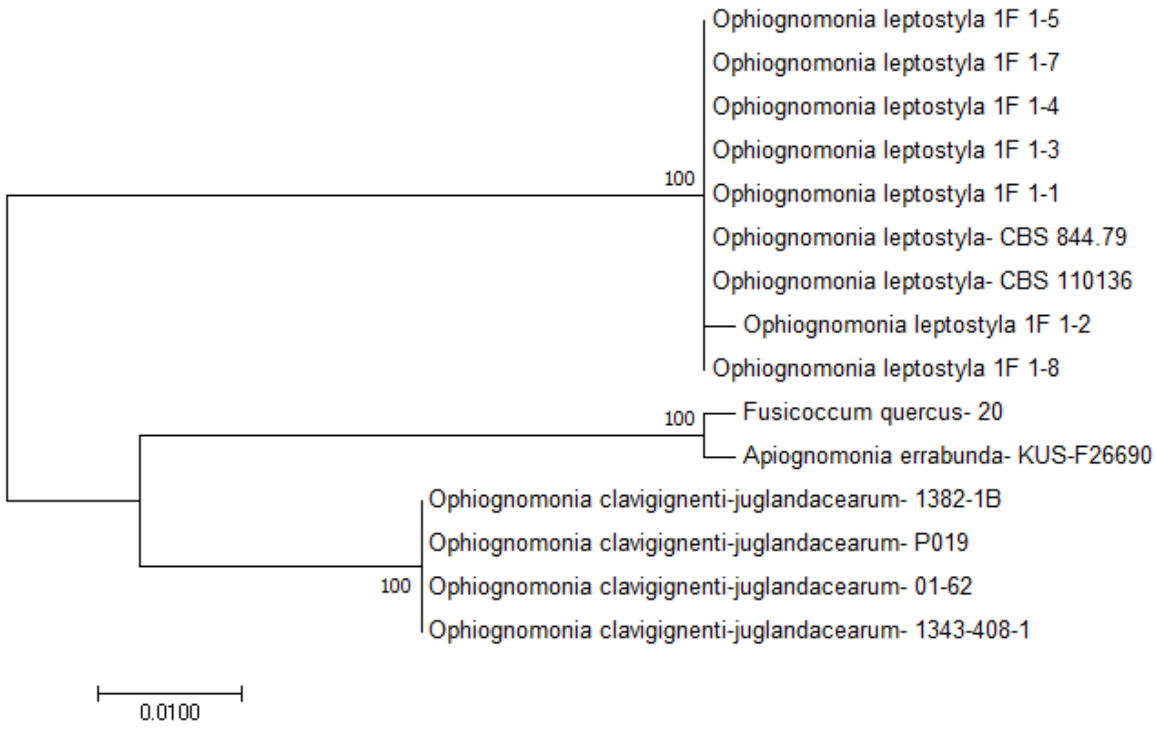
Şekil 4.23. ITS5 (F)-ITS4 (R) primer çiftlerinin amplifiye ettiği PCR ürünlerinin sekans verilerinin flogenetik diyagramı

ITS5 (F)-ITS4 (R) primeri ile elde edilen sekans dizilimi NCBI'dan *O. leptostyla* türünün CBS 110136 (Accesion number: DQ323535.1), CBS 844.79 ırkları (Accesion number: EU254910.1); *O. clavigignenti*-juglandacearum'un 1382-1B (Accesion number: GU993815.1), 1375-4A (Accesion number: GU993813.1) ve 1343-408-1 ırkı (Accesion number: GU993811.1) ile *Discula quercina* fungus türü filogenetik analizinde outgroup olarak seçilmiştir.

Floegenetik diyagram ITS5 (F)-ITS4 (R) primerlerinin amplifye ettikleri bölgeye göre yedi izolatın tamamının birbirleriyle %100 olarak aynı olduğunu göstermiştir. Diğer taraftan sekans verileri *O. leptostyla* için NCBI veri tabanına kayıtlı *O. leptostyla* CBS 110136 (DQ323535.1) ve CBS 844.79 (EU254910.1) ırkları ile %99; *O. clavigignenti-juglandacearum* türünün 1382-1B (GU993815.1), 1375-4A (GU993813.1) ve 1343-408-1 (GU993811.1) ırklarıyla %89 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.23).

ITS1 (F)- ITS4 (R) Primer Çiftinin Amplifiye Ettiği Bölgenin Sekans Dizilimi (560 bp)

5'-GACTCCAAGTCTCACGGGCGCTACCCAGAAACCCTTTGTGAACATTCCTA
CTTTGTTGCCTCGGCATGGTTGGCTTCGAATGAAGTCCCGCGTCAGCGGAGC
AAACCGGCCGGTGGCCCCTTACAAACTCTTGTTTTTGTAGTATCTTCTGAGG
AAAGAAAAATAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGG
CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGGTGGTATTCCACCG
GGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCACCCCTCAAAACTTTTGGTTTTGGTGTT
GGAGGAATACTTTTCACCCGAGTACCCTCTGAAATGTAGTGGCGGGCTCGCT
AGAAATTTGAGCGTAGTACCTTTTTACCTCGTTTGTAAGATCTAGTGGGACT
TCTTGCCATAAAACCCCCCCAACTCTCTGAAATTTGACCTCGGATCAGGTAG
GAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAGCCCGGAGAGAA-3'



Şekil 4.24. ITS1 (F) ve ITS4 (R) pirimer çifti ile elde edilen PCR ürününün filogenetik analizi

ITS1 (F)-ITS4 (R) primerileri ile elde edilen sekans dizilimi NCBI'dan *O. leptostyla* türünün CBS 110136 (Accesion number: DQ323535.1), CBS 844.79 ırkları (Accesion number: EU254910.1); *O. clavigignenti-juglandacearum*'un 1382-1B (Accesion number: GU993815.1) ve 1343-408-1 ırkı (Accesion number: GU993811.1) filogenetik analizi için seçilmiştir.

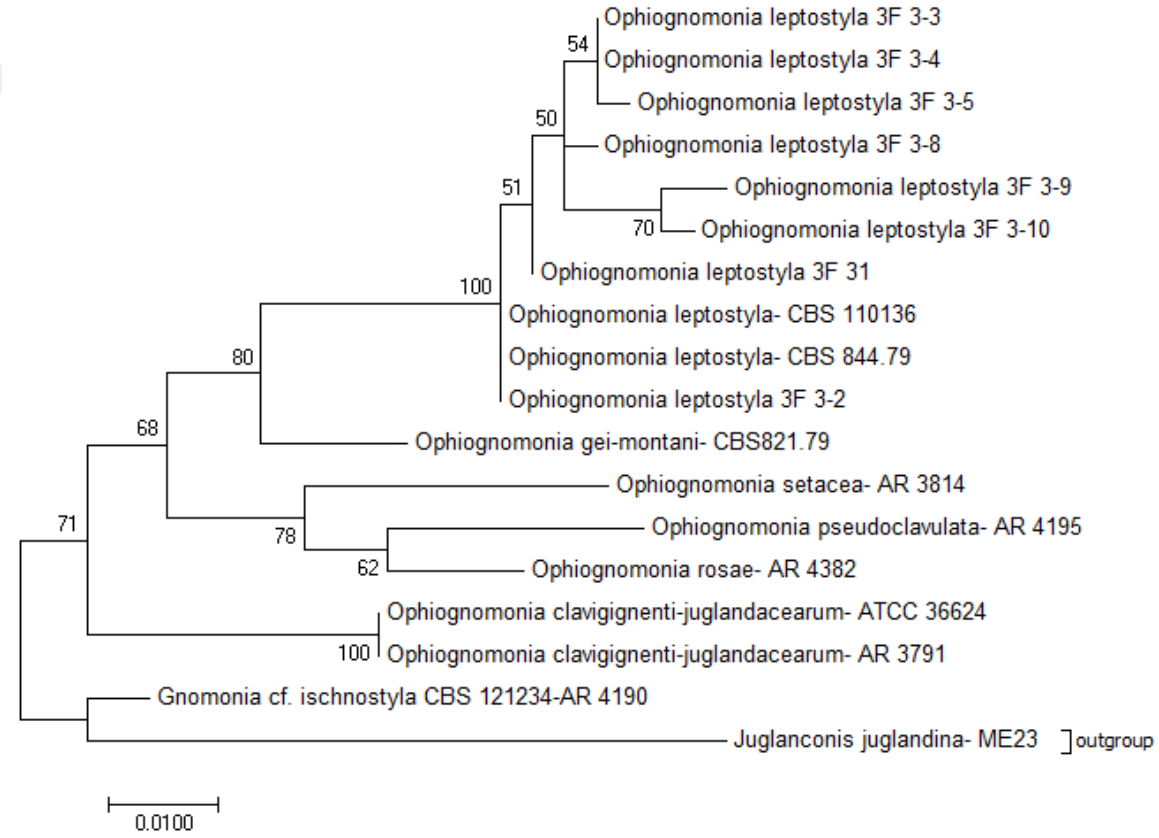
Floegenetik diyagram ITS5 (F)-ITS4 (R) primerlerinin amplifiye ettikleri bölgeye göre yedi izolatın tamamının birbirleriyle %100 olarak aynı olduğunu göstermiştir.

Diğer taraftan sekans verileri *O. leptostyla* için NCBI veri tabanına kayıtlı *O. leptostyla* CBS 110136 (DQ323535.1) ve CBS 844.79 (EU254910.1) ırkları ile %99 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.24).

EF1 728 (F)- EF1 1567 (R) Primer Çiftinin Amplifiye Ettiği Bölgenin Sekans Dizilimi (1103 bp)

5'-GAGACGGTCAGCTACAGCGAGTTTCCCGTCCTCAGCACTAGTGGCCATTA
CAAAGTGCTATTGCTCTCCAAGCGACAGCTTCCGCGACTGCAGAGTTGCCAC
TGTTTGCCCTGGGTGGCGGGGCAGCATGCCCTTTTTCGACTACCGCACATTT
TTTCCCTCTGGTGGTGCGGGGTTGGCCACCTTATCGAGATTCGGCAAACGTG
ACATACCACCCACCAAAGTCGCCCAGCATTATCCATCTTCAGCACACGACCT
GACACCTGGCTGCTCCCACTATTTCCCGCTCCTTGACCATACTCGCCGATCA
TGCTGATGCTAACTGAATTGTCTCCACAGCTGCTGAGCTTGGAAAGGGTTCA
TTCAAGTACGCTTGGGTTCTGGACAAGCTGAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGA
ATCACCATCGACATTGCTCTGTGGAAGTTCGAGACCCCCAAGTACTATGTCA
CCGTCATTGGTAAGTTTGCGCTTCCAGCGCTGTCGCTAGGACATATTCTGCC
TTTGCTCGAAACTTGTGCTAACATTCGCTCTCACAGACGCTCCCGGTCACCG
TGACTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACTTCCCAGGCCGACTGCGCCATT
CTCATCATCGCCTCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATG
GCCAGACTCGTGAGCACGCTCTGCTCGCCTACACCCTCGGTGTCAAGCAGCT
CATCATTGCTATGAACAAGATGGACATCGCCGAGTGGAAGCAGGCCCGTTA

CGAGGAGATCAAGAAGGAGACATCTTCTTTCATCAAGAAGGTCGGCTACAA
CCCCAAGGTTGTTCCCTTCGTCCCCATCTCCGGCTTCAACGGCGACACATGA
TCGAGGGTGAGACCCTTGACCCCCGTGCCAAGGCATGGTACAAAGGTTGGT
CCAAGCTCGGCTCTGACGGCAAGGAGGTCAAGGGAAACACCCTTCCTTCGA
CGCCATTGACTCCATCGAGCCCCCCCAGCGTTCTTACGGACAGCCCTTCGTC
TGCCCTCACGACGTCTACTGATCTGACAGTGTGTCAGTACGTACTAGTATAG
ATAAGTATACATCGACC-3'



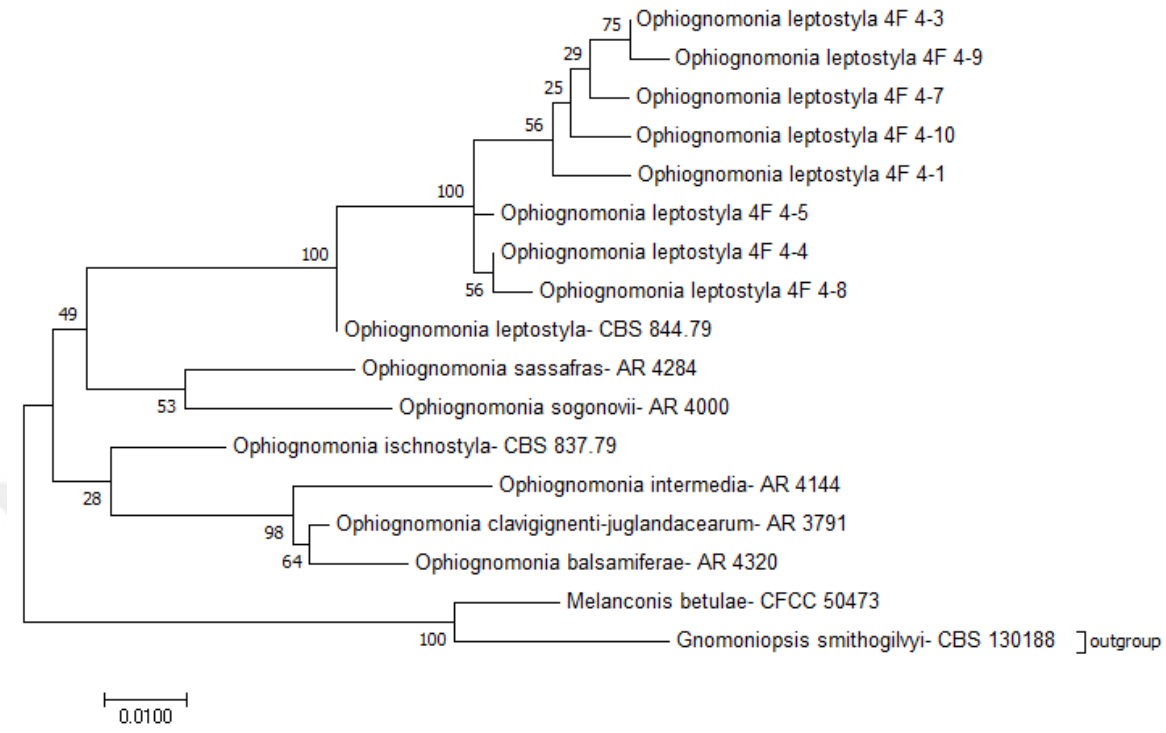
Şekil 4.25. EF1 728 (F)- EF1 1567 (R) primer çiftinin amplifiye ettiği bölgenin filogenetik analizi

EF1 728 (F)- EF1 1567 (R) primer çifti ile elde edilen fragmentin sekans dizilimi NCBI'dan *O. leptostyla* türünün CBS 110136 (Accesion number: JQ414147.1), CBS 844.79 ırkları ile *Juglanconis juglandina* ME23 türü filogenetik analizde outgroup olarak seçilmiştir.

Flogenetik diyagram EF1 728 (F)- EF1 1567 (R) primerlerinin amplifye ettikleri bölgeye göre yedi izolatın tamamının birbirleriyle farklılıklarını ortaya koyarken, *O. leptostyla* CBS 110136 ve CBS 844.79 ırkları ile çalışmada kullanılan yedi izolatı ile %100 benzerlik göstermiştir. Diğer taraftan sekans verileri *O. leptostyla* için NCBI veri tabanına kayıtlı *O. gei-montani* (CBS821.79) ile %80 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.25).

TEF1 983 (F)- EF1 1567 (R) Primer Çiftinin Amplifiye Ettiği Bölgenin Sekans Dizilimi (497 bp)

5'-CATATTGTCTTACAGTGCAGACTGCGCCATTCTCATCATCGCCTCCGGTA
CTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACTCGTGAGCACG
CTCTGCTCGCCTACACCCTCGGTGTCAAGCAGCTCATCATTGCTATGAACAA
GATGGACATCGCCAAGTGGAAGCAGGCCCGTTACGAGGAGATCAAGAAGG
AGACATCTTCTTTCATCAAGAAGGTCGGCTACAACCCCAAGGTTGTTCCCTT
CGTCCCCATCTCCGGCTTCAACGGCAACAACATGATCGAGGGTGAGACCCT
TGACCCCCGTGCCAAGGCATGGTACAAGGGTTGGTCCAAGCTCGGCTCTGA
CGGCAAGGAGGTCAAGGGAAACACCCTCCTCGACGCCTTTGACTCCATCGA
GCCCCCCAAGCGTCCTACCGACAAGGCCCTTCGTCTGCCCCTCCGGGACGTC
TACAGATCGGTGGACGGGGCGCCACAGTAGGTAACA-3'



Şekil 4.26. TEF1 983 (F)- EF1 1567 (R) pirimer çiftinin amplifiye ettiği bölgenin filogenetik analizi

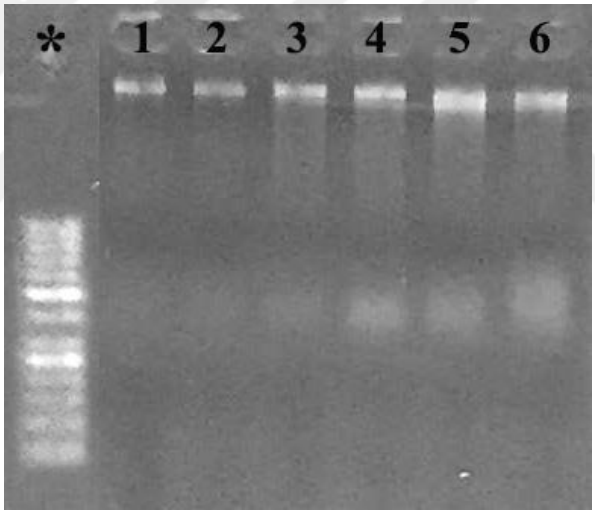
TEF1 983 (F)- EF1 1567 (R) elde edilen sekans dizilimi NCBI'dan *O. leptostyla* CBS 844,79 (Accesion number: EU221996.1), *O. sassafras* AR 4284 (Accession number: EU221941,1), *O. sogonovii* AR 4000 (Accession number: EU222002,1), *O. ischnostyla* CBS 837,79 (Accession number: EU221972,1) ve *Gnomoniopsis smithogilvyi* CBS 130188 ırkı filogenetik analizde outgroup olarak seçilmiştir.

Floegenetik diyagram TEF1 983 (F)- EF1 1567 (R) primerlerinin amplifiye ettikleri bölgeye göre yedi izolatın tamamının birbirleriyle yüksek derecede benzerlik gösterdiği halde kendi aralarında 3 ayrı grupla ayırılmıştır. Diğer taraftan sekans verileri *O. leptostyla* için NCBI veri tabanına kayıtlı *O. leptostyla* CBS 844,79 (DQ323535,1) ile %100, CBS 844,79 (EU221996.1) ile %99; *O. sassafras* AR4284 (EU221941.1) ile %94 ve *O. ischnostyla* CBS 837.79 ırkı (EU221956.1) ile ise %94 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.27).

TEF1 983 (F)- EF1 1567 (R) primerinin amplifiye ettiği sekans dizilimlerinin kendi aralarındaki mukayesesi ise bu izolatların arasında farklılık olduğunu göstermiş olmakla birlikte sekans dizilimine göre filogenetik analizi izolatların hepsisin *O. leptostyla* olduğunu doğrulamıştır.

4.9.3. Ceviz çeşitlerinin DNA ekstraksyonu, PCR ve sekans analizleri

Juglans regia L. türünden Chandler, Bilecik, Maraş-18, Sütyemez ve Şen-1 çeşitlerine ilaveten anaç olarak kullanılan genotipten elde edilen DNA'lar elektroforezde yürütülmüş ve çeşitlerin full genome DNA bantları elde edilmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Ceviz çeşitlerinde elde edilen DNA'nın jel görüntüsü
1: Sütyemez, **2**: Chandler, **3**: Bilecik, **4**: Şen-1, **5**: Maraş-18, **6**: Anaç ve ***** markır (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp) (Orj.)

4.9.3.a. Ceviz çeşitlerden R genlerin PCR ile belirlenmesi

Ceviz Çeşitlerini R gen içerip içermediklerinin belirlenmesi amacıyla NBS (NBS1/NBS5a6, S1INV/S2INV, H1145/H1146, S1/AS3, P-Loop/GLPL, RN1F/RN1R, LM637/LM638); LRR domain (NLRR inv1/inv2 primeri) ve STK domain (Pto kin1/kin2) bölgelerinden tasarlanmış 9 dejenere pirimer kullanılmış ve Bilecik, Chandler, Maraş-18, Sütyemez, Şen-1 ve anaç çeşitlerinden NBS1/NBS5a6, S1INV/S2INV,

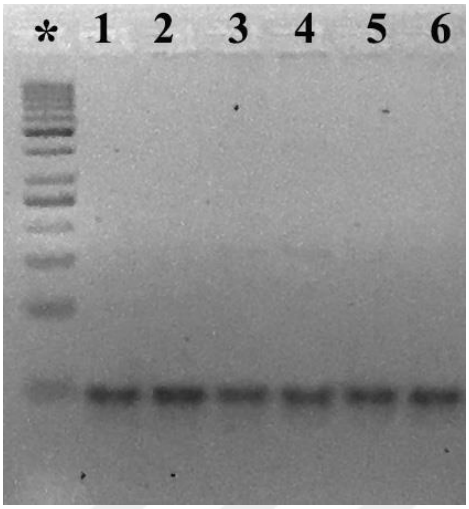
H1145/H1146, S1/AS3, RN1F/RN1R, LM637/LM638 ve Pto kin1/kin2 pirimer çiftlerinden sırasıyla 1 (131 bp), 4 (880, 459, 300, 151 bp), 5 (600, 300, 230, 200, 190 bp), 11 (766, 450, 161, 154, 105, 100, 94, 90, 84, 78, 73 bp), 7 (558, 343, 321, 285, 101, 92, 86 bp), 1 (350 bp) ve 26 (1012 , 906, 714, 585, 516, 487, 431, 400, 341, 262, 251, 233, 223, 216, 204, 194, 167, 158, 150, 139, 129, 110, 106, 102, 96, 93 bp) elde edilmiş (Çizelge 4.4). Pirimerlerden elde edilen faragmentlerin sekans dizilimleri çeşitlerin R gen içerdiklerini doğrulamıştır (Şekil 4.28; 4.30; 4.31; 4.32; 4.34; 4.36; 4.37). Bununla birlikte primer 9 (P-Loop-F ve GLPL-R) ile primer 12 (NLRR inv1-F ve NLRR inv2-R) çiftlerinden ise herhangi bir bant elde edilememiştir.

Çizelge 4.4. Ceviz çeşitlerinde primer çiftinden elde edilen PCR sonuçları

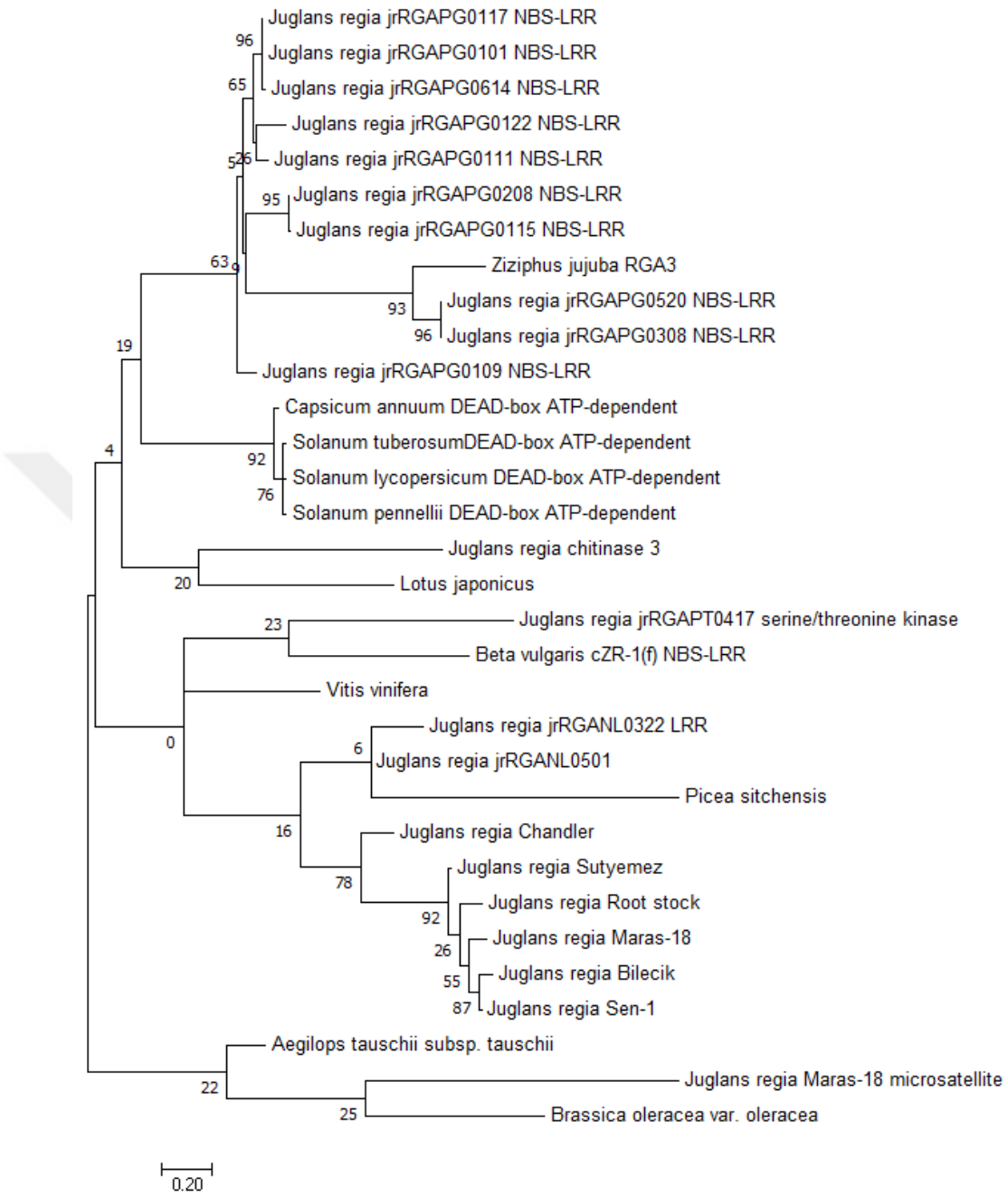
Primer çiftler	**Beklenen Amplfikasyon Ürünü (bp)**	**Elde Edilen Amplifikasyon Ürünü (bp)**
NBS1/NBS5a6	177-270 bp	131 bp
S1INV/S2INV	100-900 bp	880, 459, 300, 151 bp
H1145/H1146	180-800 bp	600, 300, 230, 200, 190 bp
S1/AS3	389 bp	766, 450, 161, 154, 105, 100, 94, 90, 84, 78, 73 bp
RN1F/RN1R	85-500 bp	558, 343, 321, 285, 101, 92, 86 bp
LM637/LM638	500, 1000 bp	350 bp
Pto kin1/kin2	750 bp	1012 , 906, 714, 585, 516, 487, 431, 400, 341, 262, 251, 233, 223, 216, 204, 194, 167, 158, 150, 139, 129, 110, 106, 102, 96, 93 bp

NBS1/NBS5a6 Primer Çiftinin Amplifiye Ettiği Bölgenin Sekans Dizilimi (131 bp) ve Flogenetik Diyagramı

5'-AGGTTATTCGTTAAAGTGGGGGACGTCATTCAGTTTTATGCGCTCCCGTG
TAACCAGAGGAGCTCAGCTGAGATAATGCCCCATCTCGACTTGGGGTTGTG
ATCCACACATCATCCACGACAACCAAAAA-3'



Şekil 4.28. NBS1/NBS5a6 ile elde edilen PCR ürününün jel görüntüsü
1: Sütyemez, **2**: Chandler, **3**: Bilecik, **4**: Şen-1, **5**: Maraş-18, **6**: Anaç ve * markır (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp) (Orj.)



Şekil 4.29. NBS1/NBS5a6 ile amplifye edilen NBS bölgelerinin filogenetik analizleri (Orj.)

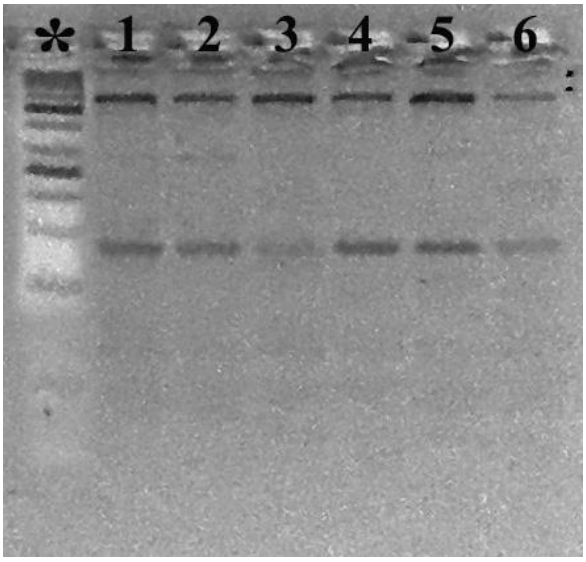
NBS1 (F)-NBS5a6 (R) primeri ile elde edilen fragmentlerinin sekans dizilimi NCBI'dan *J. regia* jrRGANL0322 LRR, *J. regia* jrRGANL0501, *J. regia* jrRGAPT0417 serine/threonine kinase ve *Beta vulgaris* cZR-1(f) NBS-LRR bölgeleri ile filogenetik mukayese edildiğinde NBS1 (F)-NBS5a6 (R) pirimerlerinin amplifiye ettikleri bölgenin Şen-1 ve Bilecik çeşitleri ile %87; Şen-1 ve Bilecik çeşitleri Maraş-18 ile %55, anaç

olarak kullanılan *J. regia* (Anaç) ile %26, *J. regia* Sütyemez çeşidi ile %92 oranında ortak baz dizilimine sahip olduğu görülmüştür. Diğer taraftan diyagram Bilecik ve Şen-1 çeşidinin birbirine yakın olduğunu takiben Maraş-18 ile ayrıştığını, Chandler çeşidi ile daha fazla farklılık taşıdığını ve benzerliğin %78 oranına düştüğünü ortaya koymuştur (Şekil 4.29).

Bunlara ilaveten bu primer çiftinin sekans verileri *J. regia* için NCBI veri tabanına kayıtlı *J. regia* jrRGANL0322 LRR bölgesi ve *J. regia* jrRGANL0501 sekans dizilimi ile %99.5, *J. regia* jrRGAPT0417 serine/threonine kinase ve *Beta vulgaris* cZR-1(f) NBS-LRR ile %99.2 oranında benzer çıkmıştır.

S1 INV (F)- S2 INV (R) Primer Çiftinin Amplifiye Ettiği Bölgenin Jel Görüntüleri

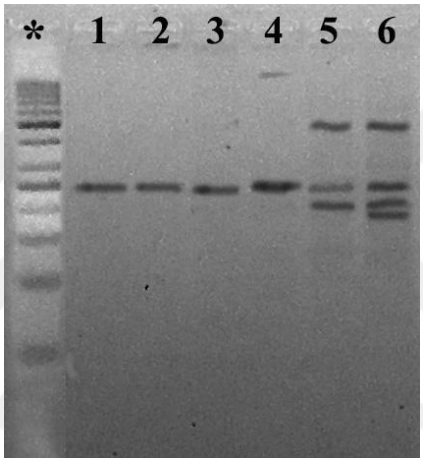
NBS bölgesinden tasralanmış olan S1 INV (F)- S2 INV (R) pirimer çiftinden Sütyemez 2 (880 bp, 151 bp), Chandler 3 (880 bp, 459 bp, 151 bp), Bilecik 2 (880 bp, 151 bp), Şen-1 2 (880 bp, 151 bp) ve Maraş-18 3 (880 bp, 459 bp, 151 bp), ve anaçtan ise 4 (880 bp, 459 bp, 300 bp, 151 bp) bantları elde edilmiştir (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Çeşitlerden S1INV/S2INV primer çiftleri ile elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüsü
1: Sütyemez, **2**: Chandler, **3**: Bilecik, **4**: Şen-1, **5**: Maraş-18, **6**: Anaç ve * markır (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp) (Orj.)

H1145 (F)- H1146 (R Primer Çiftinin Amplifiye Ettiği Bölgenin Jel Görüntüleri

H1145 (F)- H1146 (R) NBS bölğesinden dizayn edilmiş olan H1145 (F)- H1146 (R) primer çiftleri ile Sütyemez, Chandler, Bilecik ve Şen-1 çeşitlerinde 300 bp uzunluğunda tek bir bant Maraş-18 çeşidinde 600, 300 ve 200 bp uzunluğunda 3 bant, anaç olarak kullanılan çeşitten ise 600, 300, 230 ve 190 bp uzunluklarında 4 farklı bant elde edilmiştir (Şekil 4.31).



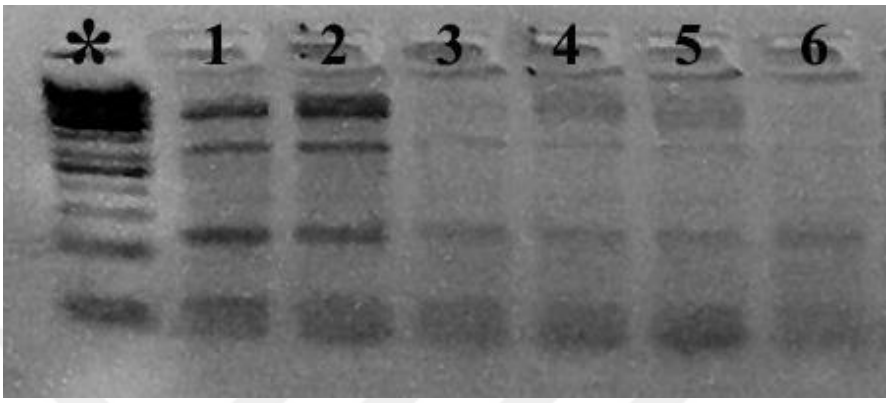
Şekil 4.31. H1145/H1146 pirimer çiftlerinden elde edilen PCR ürününün jel görüntüsü
1: Sütyemez, **2**: Chandler, **3**: Bilecik, **4**: Şen-1, **5**: Maraş-18, **6**: Anaç ve * markır (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp) (Orj.)

S1 (F)-AS3 (R) Primer Çiftinin Jel Görüntüleri

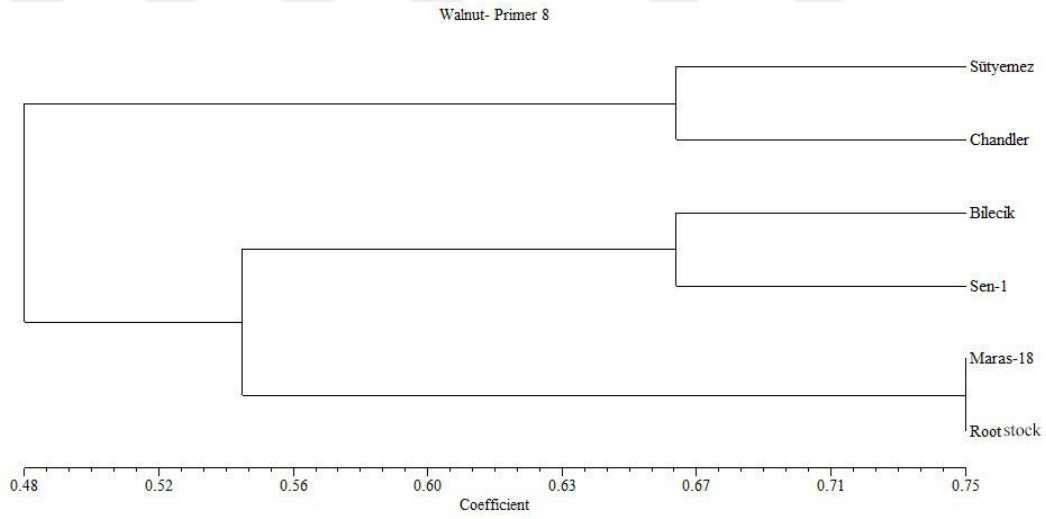
NBS bölgesinden tasralanmış olan S1 (F)-AS3 (R) pirimer çiftinden Sütyemez 5 (766 bp, 450 bp, 161 bp, 105 bp, 90 bp) ve Chandler'den 5 (766 bp, 450 bp, 154 bp, 105 bp, 84 bp), Bilecik'ten 4 (450 bp, 161 bp, 100 bp, 78 bp), Şen-1'den 4 (766 bp, 154 bp, 100 bp, 78 bp), Maraş-18 çeşidinden ise 5 bant (700 bp, 450 bp,154 bp, 94 bp, 73 bp) elde edilmiştir (Şekil 4.32).

Filogenetik analize göre çeşitler arasında, Maraş-18 ve anaç çeşit %75'lik benzerlikle bir gurup, Şen-1 ile Bilecik %66 benzerlikle ikinci bir gurup, Sütyemez ve Chandler ile %66 benzerlik göstermiştir. Maraş-18, Anaç, Bilecik ve Şen-1 %54 benzerlik ile tek gurup

oluşturmuştur. Diğer taraftan Sütyemez-Chandler grubu ile %48 benzerlik göstermiştir (Şekil 4.32; Şekil 4.33).



Şekil 4.32. Çeşitlerden S1/AS3 primer çiftinden elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüsü
1: Sütyemez, **2**: Chandler, **3**: Bilecik, **4**: Şen-1, **5**: Maraş-18, **6**: Anaç ve * markır (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp) (Orj.)



Şekil 4.33. S1/AS3 primer çiftlerinin amplifiye ettği bölgenin filogenetik diyagramı (Orj.)

P-Loop (F)- GLPL (R) Primer Çiftinin

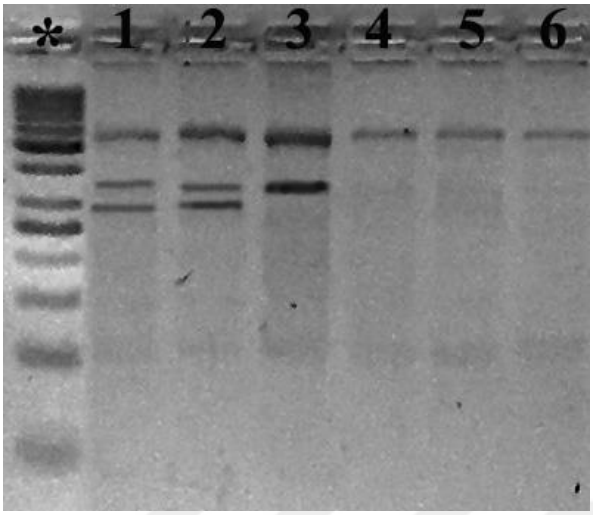
P-Loop (F)- GLPL (R) primeri NBS bölgesinde yer alıp farklı sıcaklıkta anneling ve gradient PCR kullanıldığında hiç bir bant görüntülenememiştir.

RN1 (F)- RN1 (R) Primer Çiftinin Amplifiye Ettiği Bölgenin Jel Görüntüsü

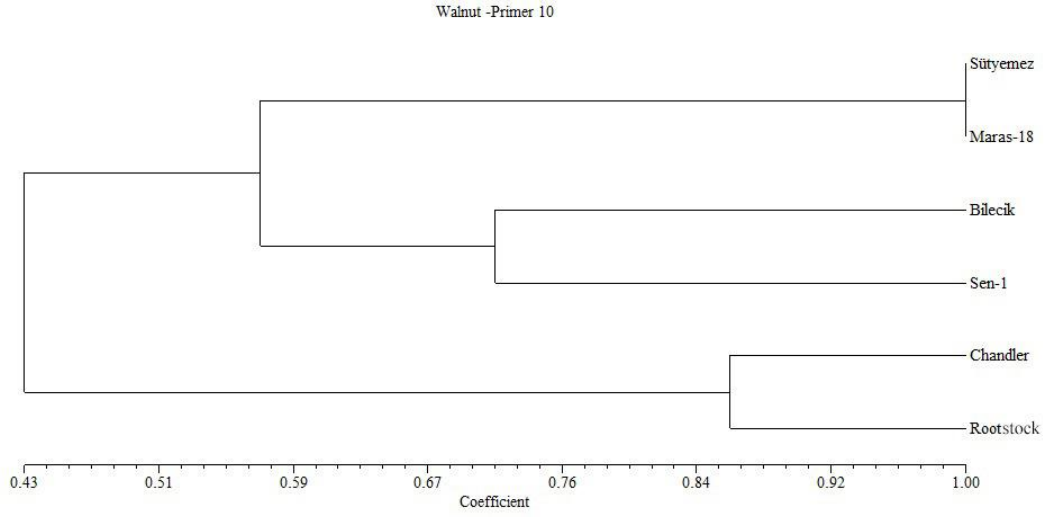
NBS bölgesinden tasralanmış olan RN1 (F)- RN1 (R) pirimer çiftinden Sütyemez 4 (558 bp, 321 bp, 285 bp, 92 bp) ve Chandler'den 4 (558 bp, 343 bp, 285 bp, 101 bp), Bilecik 3 (558 bp, 321 bp, 101 bp), Şen-1 3 (558 bp, 321 bp, 86 bp), Maraş-18 4 (558 321 bp, 285 bp, 285 bp, 92 bp) ve anaç olarak kullanılan çeşitten ise 3 bant (558 bp, 343 bp, 101 bp) edide dilmiştir (Şekil 4.34).

Bantların filogenetik analizi NTSYS programı ile incelendiğinde Sütyemez ve Maraş-18 çeşitleri birbiriyle 100% benzerlik gösterirken, Chandler ile anaç %86 oranında benzerlik göstermiştir. Ayrıca Bilecik ve Şen-1 %79 benzerlik gösterirken çeşitlerin tamamının birbiriyle %43 oranında benzerlik gösterdikleri ortaya çıkmıştır (Şekil 4.34; Şekil 4.35).

RN1F/RN1R pirimer çiftinden elde edilen bant görüntüsüne göre Maraş-18 ve Sütyemez çeşidi fragment konumu ve sayısına göre benzerlik gösterirken, Şen-1, Bilecik ve takiben Chandler ile Anaç çeşitleri Maraş-18 ve Sütyemez çeşidindn ayrı bir grup oluşturmuştur.



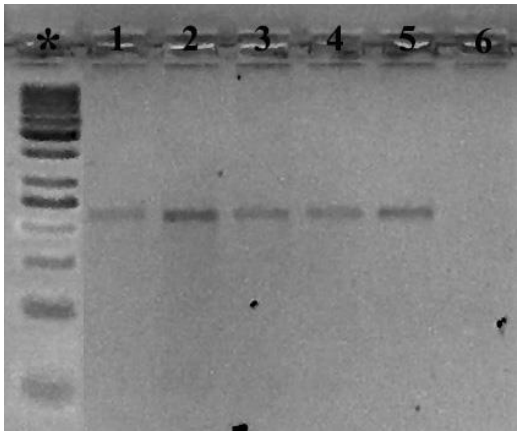
Şekil 4.34. RN1F/RN1R pirimer çifti ile elde edilen PCR ürününlerinin jel görüntüsü
1: Sütyemez, **2**: Chandler, **3**: Bilecik, **4**: Şen-1, **5**: Maraş-18, **6**: Anaç ve * markır (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp) (Orj.)



Şekil 4.35. RN1F/RN1R pirimer çifti ile elde edilen fragmentlerin filogenetik diyagramları (Orj.)

LM637 (F)- LM638 (R) Primerinden Elde Edilen Fragmentlerin Jel Görüntüleri

LM637 (F)- LM638 (R) primeri NBS bölğesinde yer alıp, ceviz çeşitlerinde (Sütyemez, Chandler, Bilecik, Şen-1, ve Maraş-18) 350 bp'lık olan tek bir bant vermiştir (Şekil 4.37).



Şekil 4.36. LM637/LM638 pirimer çifti ile elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüsü
1: Sütyemez, **2**: Chandler, **3**: Bilecik, **4**: Şen-1, **5**: Maraş-18, **6**: Anaç ve * markır (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp) (Orj.)

NLRR inv1 (F)- NLRR inv2 (R) Primerleri

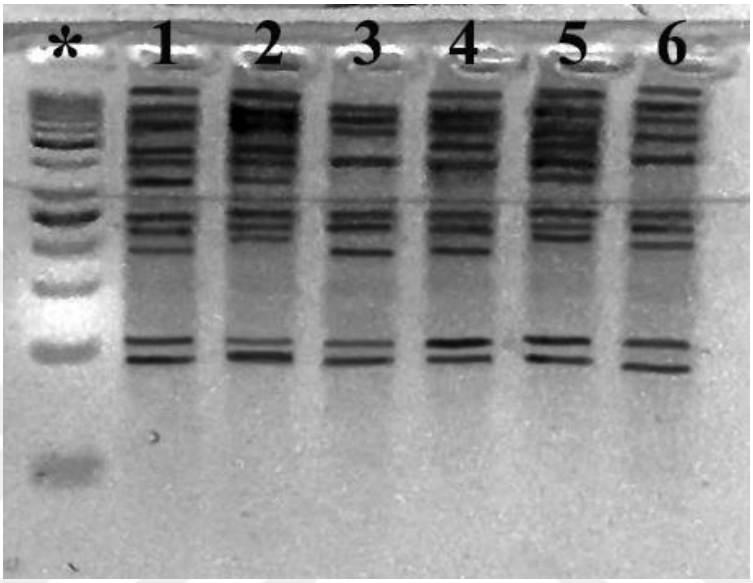
Ceviz DNA'sının LRR bölgesinden dizayn edilmiş olan NLRR inv1 (F)- NLRR inv2 (R) primer çiftlerinden ise çeşitlerin hiç birisinden herhangi bir bant elde edilemiştir.

Pto kin 1 (F)- Pto kin 2 (R) Primer Çiftinin Amplifiye Ettiği Bölgenin Jel Görüntüleri

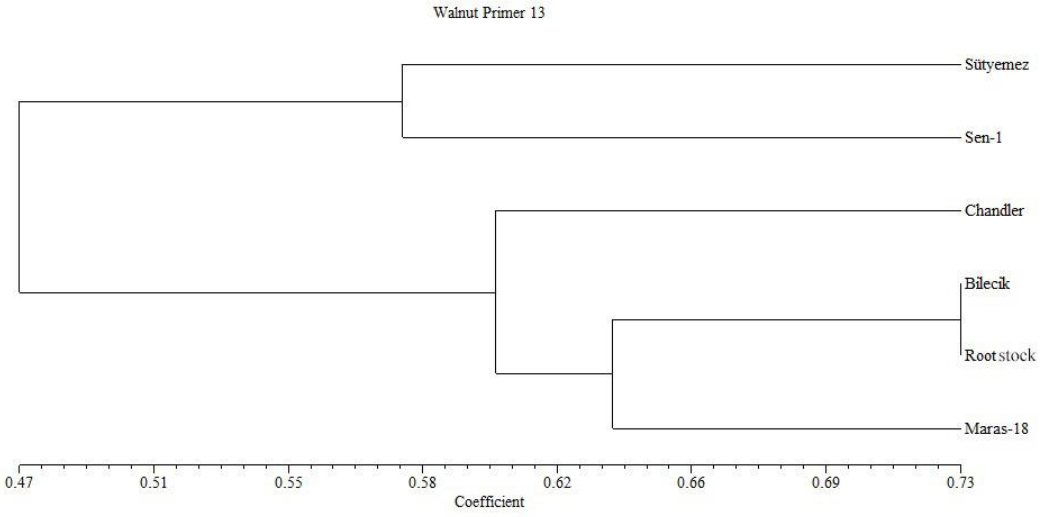
STK bölgesinden tasarlanmış olan Pto kin 1 (F)- Pto kin 2 (R) pirimer çiftinden Sütyemez çeşidinden 12 (906 bp, 714 bp, 487 bp, 431 bp, 341 bp, 251 bp, 223 bp, 194 bp, 158 bp, 129 bp,102 bp, 93 bp), Chandler çeşidinden 12 (1012 bp, 906 bp, 714 bp, 487 bp, 431 bp, 341 bp,262 bp, 233 bp, 167 bp, 139 bp, 106 bp, 96 bp), Bilecik çeşidinden 9 (906 bp, 585 bp, 431 bp, 262 bp, 223 bp, 194 bp, 139 bp, 106 bp, 96 bp), Şen-1 çeşidinden 9 (906 bp, 585 bp, 400 bp, 251 bp, 216 bp, 194 bp, 158 bp, 106 bp, 93 bp), Maraş-18 çeşidinden 12 (906 bp, 714 bp, 585 bp, 516 bp, 431 bp, 341 bp, 262 bp, 233 bp, 204 bp, 150 bp, 110 bp, 96 bp) ve anaç olarak kullanılan çeşitten ise 10 bant (906 bp, 714 bp, 585 bp, 431 bp, 251 bp, 223 bp, 204 bp, 150 bp, 106 bp, 96 bp) edide dilmiştir.

Bant sayısı ve konumlarının filogenetik analiz sonucuna göre Bilecik ve anaç çeşitleri birbiriyle %73 benzerlikle tek gurup oluştururken, bu iki çeşidin Maraş-18 ile %64

benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Diğer taraftan Bilecik-Anaç-Maraş-18 çeşitleri Chandler çeşiti ile %60 benzerlik gösterirken, Sütyemez ve Şen-1 birbiriyle %58 oranında; Chandler, Bilecik, anaç, Maraş-18 ise kendi aralarında %46 oranında benzerlik göstermiştir (Şekil 4.37; Şekil 4.38).



Şekil 4.37. Pto kin1/kin2 ile elde edilen PCR ürününün jel görüntüsü
1: Sütyemez, **2**: Chandler, **3**: Bilecik, **4**: Şen-1, **5**: Maraş-18, **6**: Anaç ve * markır (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp) (Orj.)



Şekil 4.38. Ceviz çeşitlerinden Pto kin1/kin2 primerleri ile elde edilen fragmentlerin filogenetik diygramı (Orj.)

4.10. Patojensite Çalışmaları

Patojensite ve virülanslık çalışmaları 2016-2017 yıllarında Haziran-Ekim ayları arasında iki yıl süresince R gen içerdikleri PCR ile belirlenmiş olan Bilecik, Chandler, Maraş-18 ve Sen-1 ceviz çeşitlerinin her birinden 36 olmak üzere her bir yıl için 144, toplamda 288 adet 1 yaşında aşılı fidanlar ile farklı lokasyonlardan toplanan ve besiyeri ortamlarında en hızlı gelişen *O. leptostyla*'nın iki izolatı (W105 ve W148) kullanılmış; gözlem ve ölçümler inokulasyondan 5 gün sonra enfekte olan yaprakların sayısı, lekelerin çapı ve aservulus oluşup oluşmamasına bakılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.39).

4.10.1. Ceviz çeşitlerinin hastalığa dayanıklık durumlarının değerlendirilmesi

Araştırmada ilk makroskopik simptomlar inokulasyondan 6 gün sonra yaprakların üst ayasında küçük lekeler halinde gelişirken, negatif kontrollerde herhangi bir symptom oluşmamıştır. Takiben lekeler daha sonra nekrozlara dönüşüp açık kahverengi etrafı beyaz-gri renkge dönüşmüş ve hiç bir lekede aservulus oluşumuna rastlanılmamıştır. Oluşan lekelerden tekrar patojen izole edilip PDA ve OMA ortamına aktarıldıklarında şefaf ve iki hücreli konidiosporlar elde edilmiştir.

Ceviz çeşitlerinin dayanıklık durumlarının değerlendirilmesi için PK (Pozitif Kontrol) ve NK (Negatif Kontrol) kontrol ile enfekte olan yaprakların sayısı, lekelerin çapı ve aservulus oluşup oluşmamasına göre karşılaştırıp değerlendirilmiştir.

Patojensite çalışmalarında enfekte olan yaprak sayılarına göre çeşit (Ç), yıl (Y), aktivatör (A), fungus izolatı (F) ve ölçüm zamanları (Ö.Z) istatiksel olarak analiz edildiğinde Ç x Y, Ç x U, Ç x F, Ç x ÖZ, Ç x Y x ÖZ ve Ç x Y x F x ÖZ'ı yine leke çapları baz alındığında Ç x Y, Ç x U, Ç x F, Ç x ÖZ, ve Ç x Y x F x ÖZ'ı arasındaki farklılığın çok önemli olduğu ($P<0,001$) (Çizelge 4.5) belirlenmiştir. Varyasyon kaynakların tekli, ikili ve üçlü olarak yüksek bir derecede enfekte olan yaprak sayısında ve leke çaplarında anlamlı olmuşken Ç x Y x ÖZ kumulatif etkileri leke çaplarında önemsiz olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.39. Şen-1 üzerinde antrakonz hastalığının enfeksiyon görüntüsü (Orj.)

Çizelge 4.5. Patojensite çalışmalarında varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	**Serbestlik Derecesi (df)**	**Kareler Ortalaması (MS)**	**F**	**ÖD (Özgün Değer**
Enfekte olan Yaprak Sayisi				
Corrected Model	159	367.74	17.795	**
Ceviz Çeşitleri (Ç)	3	616.56	29,837	**
Yıl (Y)	1	3847.66	186,196	**
Uygulamalar (U)	1	33617,27	1626,806	**
Fungus ırkı (F)	1	33,60	1,626	**
Ölçülen Zamanlar (ÖZ)	4	174,45	8,442	**
Ç×Y	3	879,43	42,557	**
Ç×U	3	616,563	29,837	**
Ç×F	3	67,17	3,251	**
Ç×ÖZ	12	41,44	2,005	**
Ç×Y×ÖZ	12	35,50	1,718	**
Ç×Y×F×ÖZ	135	46,45	1,061	**
Hata	960	43,78		
Yapraklarda leke çapı				
Corrected Model	479	3.03	18.489	**
Ceviz Çeşitleri (Ç)	3	25.44	155.225	**
Yıl (Y)	1	7.36	44.953	**
Uygulamalar (U)	5	137.59	839.560	**
Fungus ırkı (F)	1	3.12	19.021	**
Ölçülen Zamanlar (ÖZ)	4	32.31	197.157	**
Ç×Y	3	15,72	95,948	**
Ç×U	15	3,07	18,726	**
Ç×F	3	0,64	3,914	**
Ç×ÖZ	12	4,91	29,984	**
Ç×Y×ÖZ	12	0,10	0,630	Öd (ns)
Ç×Y×F×ÖZ	135	0,65	3,969	**
Hata	960	0,16		

Patojenisite çalışmalarında elde edilmiş olan sonuçlar ve veri analizlerine göre ceviz çeşitleri arasında enfekte olan yaprak sayısı ve yaprakların üzerinde bulunan leke çaplarının arasındaki farklılık çok önemli (P≤0,001); enfekte olan yaprak sayısı yıllara göre çok önemli (P≤0,001); yapraklar üzerinde oluşmuş leke çapları açısından önemsiz (P≤0,439); pozitif kontrol (PK) ve negatif kontrol (NK) grupları arasında enfekte olan yaprak sayısı ve leke çapları arasındaki farkın ise çok önemli (P≤0,001) olduğu ortaya çıkmıştır.

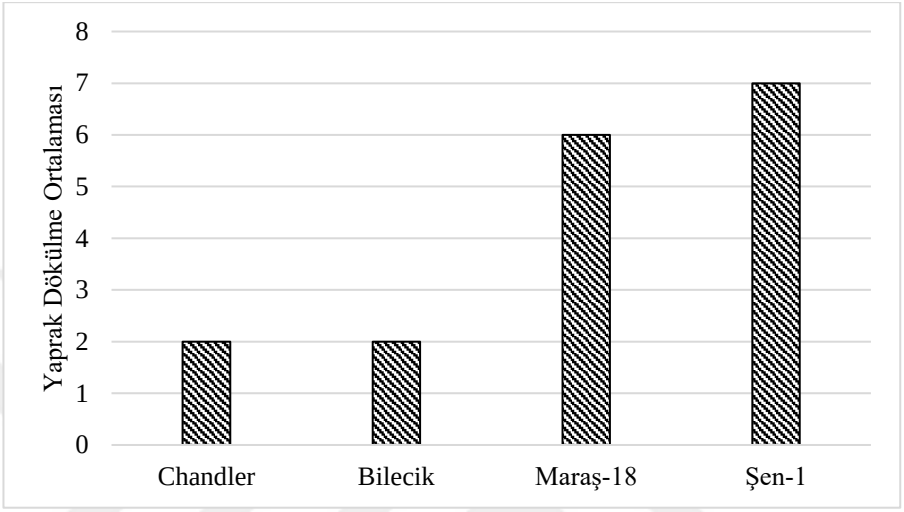
F'ler arasındaki fark enfekteli yaprak sayısı önemsiz (P≤0,203) ve lekelerin çaplarına göre önemli (P≤0,049); Ö.Z'ına göre efekte olan yaprak sayısı ve leke çapları arasındaki fark çok önemli (P≤0,001); Ç x Y arasındaki fark enfekte olan yaprak ve leke çaplarına göre çok önemli (P≤0,001); Y x Ö.Z'ının leke çaplarını üzerindeki etkisi önemsiz (P≤0,65); F x Ö.Z'nın leke çapları üzerine etkisi önemsiz (P≤0,582); Ç x Y x U x F x Ö.Z'nın enfekteli yaprak sayısı (P≤0,144) ve leke çapları üzerinde etkileri ise önemsiz (P≤0,111) bulunmuştur (Çizelge 4.5).

4.10.1.a. Ceviz çeşitlerinde antraknoz lekelerinin sayıları ve çapları

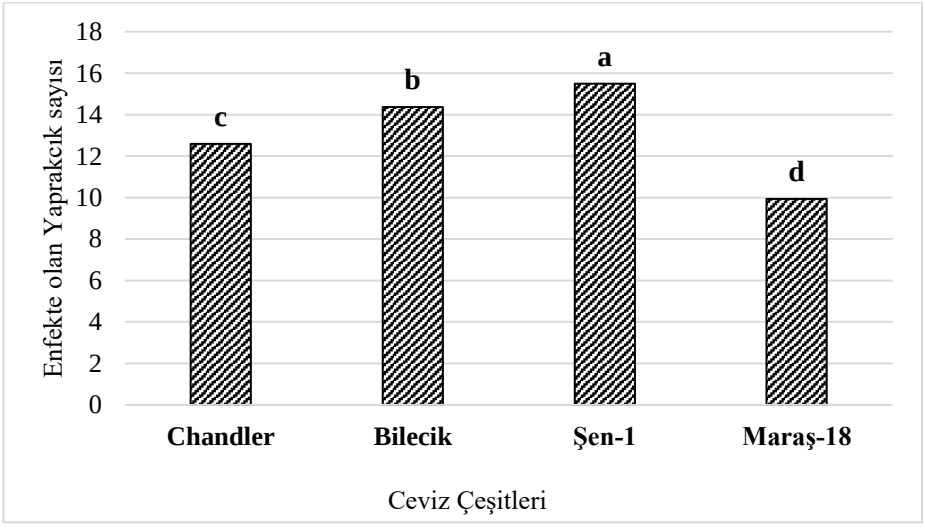
İlk hastalık simptomu Şen-1 takiben sırasıyla Maraş-18, Bilecik ve Chandler çeşitlerinde görülmüş, zamanla lekeler genişlemiş, renkleri kahverengileşmiş fakat hiçbir zaman çeşitlerin hiç birisinde lekeler birbiriyle birleşecek genişliğe ulaşamamıştır.

Çeşitlerde lekelerin çapları analiz edildiğinde, çeşitler arasında önemli farklılık olduğu, en büyük leke gelişimine Maraş-18 çeşidinin PK grubunda 35 mm olarak ölçülmüştür. Yine en fazla yaprak dökümü Şen1-'de tespit edilmiş bu çeşidi sırasıyla Maraş-18, Bilecik ve Chandler çeşitleri izlemiştir (Şekil 4.40). Her iki izolatta, her iki yılda en fazla enfekte olan yaprak sayısı Maraş-18 (9,93), Chandler (12,59), Bilecik (14,36) ve Şen-1 (15,49); Lekelerin çapları açısından bakıldığında sıralama Chandler (1,017 mm), Bilecik (1,142 mm), Şen-1 (1,408 mm) ve Maraş-18 (1,608 mm) çeşidi olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.41, 42).

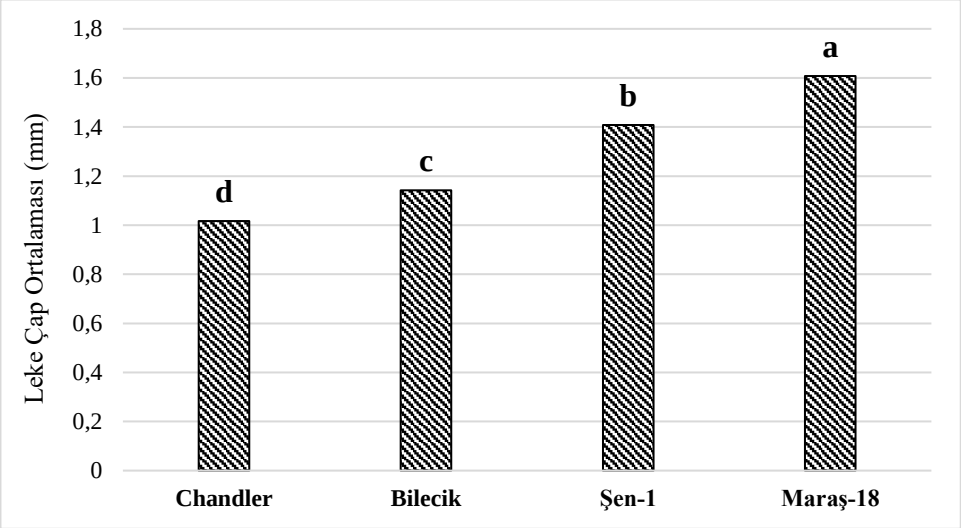
Lekelerin çap ortalamasına göre çeşitler mukayese edildiklerinde en küçük lekeler Chandler çeşidinde belirlenirken, en büyük leke ortalaması Maraş-18 ve Şen-1 çeşidinde ölçülmüştür (Şekil 4.43).



Şekil 4.40. Çeşitlerde yaprak döküm ortalamaları



Şekil 4.41. Enfekte olan yaprak sayılarının ortalaması



Şekil 4.42. Enfekte olan yapraklardaki leke çaplarının ortalamaları

4.10.1.b. Enfekteli yaprak sayısı ve leke çaplarına göre izolatlar arasındaki farklılıklar

İzolatlarda enfekteli ceviz çeşitlerindeki yaprak sayısı Bilecik, Chandler, Maraş-18 ve Şen-1 çeşitlerine ait pozitif kontrollerde 2016 yılında W105 izolatından sırasıyla 13,27; 15,51; 13;11 ve 18,61; W148 izolatından 10,36; 14,3; 14,14 ve 18,23; 2017 yılında W105 izolatından 15,16; 10,86; 6,34 ve 13,4; W148 izolatından ise 13,56; 9,67; 6,13 ve 14,77 olarak kaydedilmiştir.

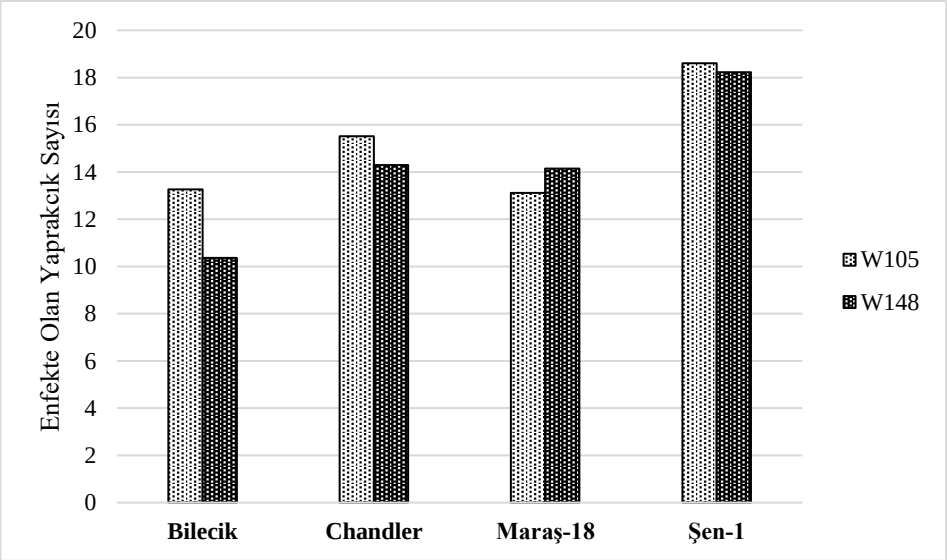
Yapraklarda oluşan leke çapları ise Bilecik, Chandler, Maraş-18 ve Şen-1 çeşitleri için 2016 yılında, W105 ve W148 izolatlarından 1,12, 1,05; 1,75 ve 1,01 ile 1.11; 0,95; 1,7 ve 1,06 mm; 2017 yılında ise 1,08; 0,83; 1,47 ve 1,63; W148 izolatı için 1,24; 1,22; 1,5 ve 1,92 mm olarak ölçülmüştür. Diğer taraftan negatif kontrol gruplarında herhangi bir enfeksiyon belirlenememiştir. 2016 ile 2017 yılları mukayese edildiğinde 2016 yılında enfekteli yaprak sayısı ile lekelerin çapları, 2017 yılına göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. W105 izolatı için butun çeşitlerde ortalama enfekteli yaprak sayısı 13,52 olurken W148 izolatı için 12,66 yaprak olarak gerçekleşmiştir. Diğer taraftan W105 izolatı için leke çaplarının ortalaması 1,25 mm olurken W148 izolatında 1,34 mm olarak belirlenmiştir. Leke çaplarına göre W148 izolatı daha virülans olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4; Şekil 4.44, 45, 46, 47).

Maraş-18 çeşitinde pozitif kontrol grubunda W105 ırkı 19,66 (2016 yılı) ve 8,66 (2017 yılı) yaprakta enfeksiyona neden olurken, W148 ırkı 34,33 (2016 yıl) ve 5 (2017 yılı) yaprakta enfeksiyona neden olmuştur. Leke çaplarına bakıldığında W105 ırkı 5,66 mm (2016 yılı) ve 3,66 mm (2017 yılı) leke oluştururken W148 ırkı 3,33 mm (2016 yılı) ve 2,33 mm (2017 yılı) büyüklükte leke oluşumuna neden olmuştur.

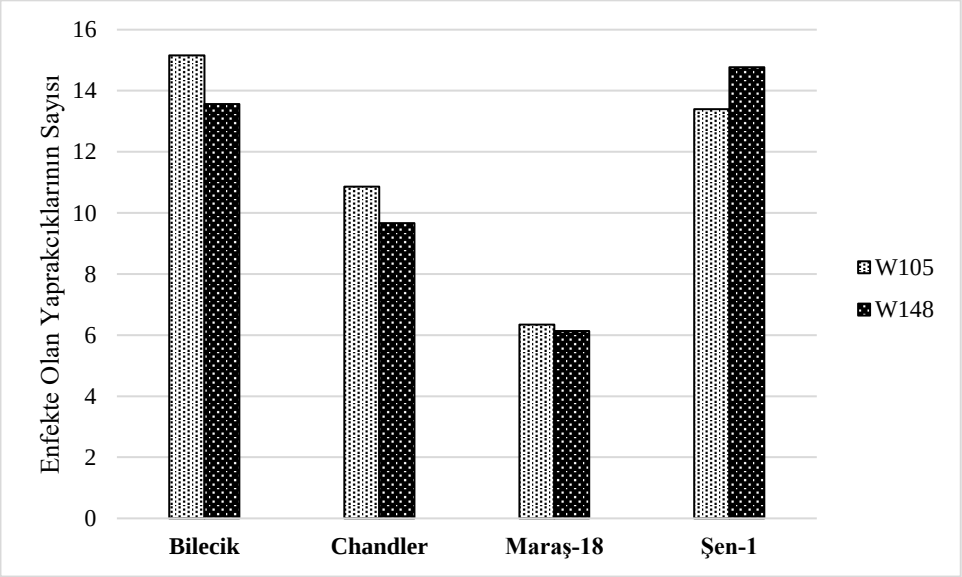
Şen-1 çeşidinin pozitif kontrol grubunda W105 ırkı 42,66 (2016 yılı) ve 11,66 (2017 yılı) ve W148 ırkı ise 45,0 (2016 yılı) ve 15,66 (2017 yılı) enfekteli olan yaprak kayıt edilmiştir. Oluşmuş olan leke çaplarına bakıldığında pozitif kontrol grubunda W105 ırkı 3 mm (2016 yılı) ve 4,33 mm (2016 yılı), W148 ırkı 3 mm (2016 yılı) ve 4,33 mm (2017 yılı) çaplarında lekelere neden olmuştur (Çizelge 4.6; Şekil 4.46,47,48,49).

Çizelge 4.6. İzolatların virülanslıkları

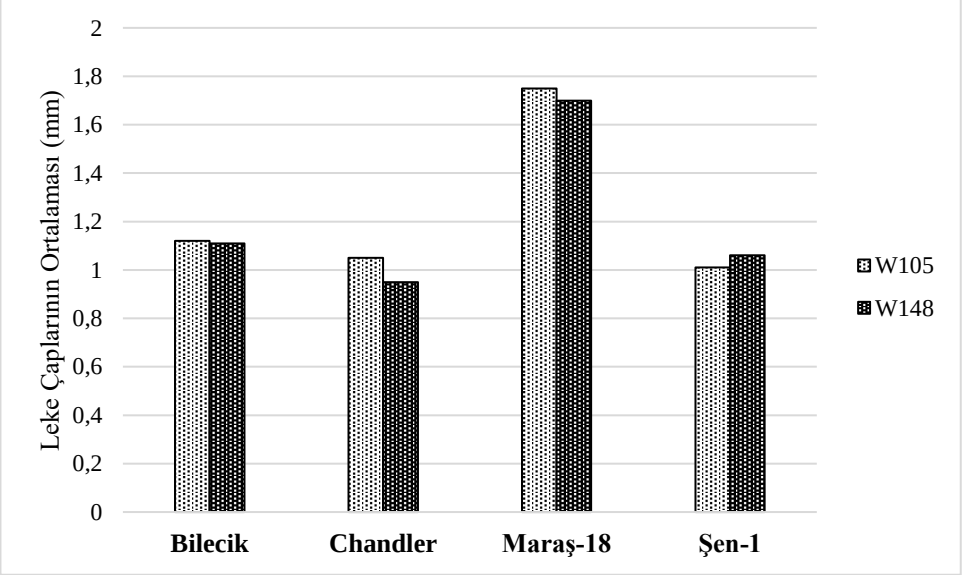
İzolat	Ortalama Leke Sayısı	Enfekteli Yaprak Sayısı	Leke Çaplarının Ortalaması
W105	13,52±0,23	66,53±0,83	1,24±0,002 mm
W148	12,66±0,26	66,79±0,83	1,34±0,002 mm



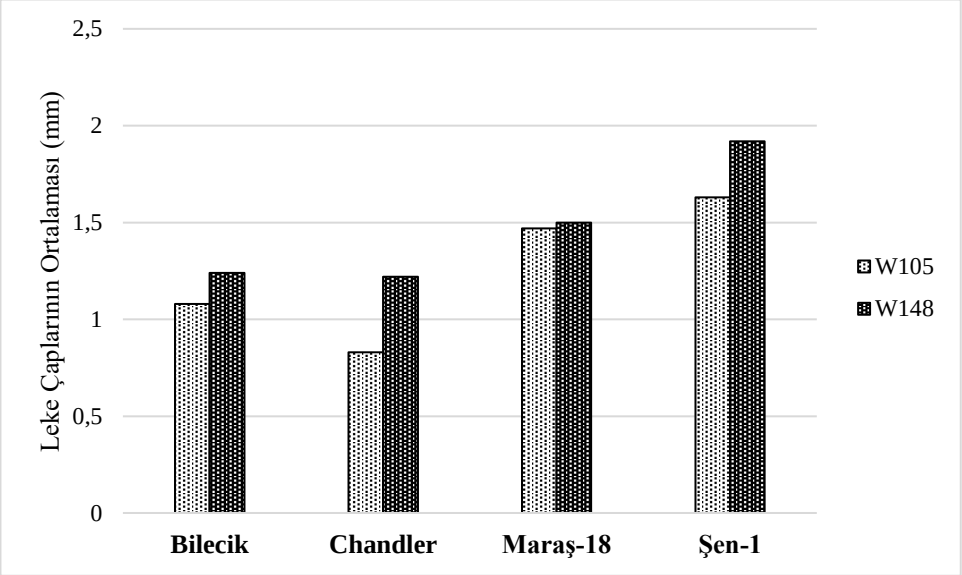
Şekil 4.43. İzolatların çeşitlerde neden oldukları enfekte yaprak sayıları (2016 yılı)



Şekil 4.44. İzolatların çeşitlerde neden oldukları enfekte yaprak sayıları (2017 yılı)



Şekil 4.45. Çeşitlerde leke çapı ortalamalarına göre izolatların etkileri (2016 yılı)



Şekil 4.46. Çeşitlerde izolatların neden oldukları lekelerin çap ortalamaları (2017 yılı)

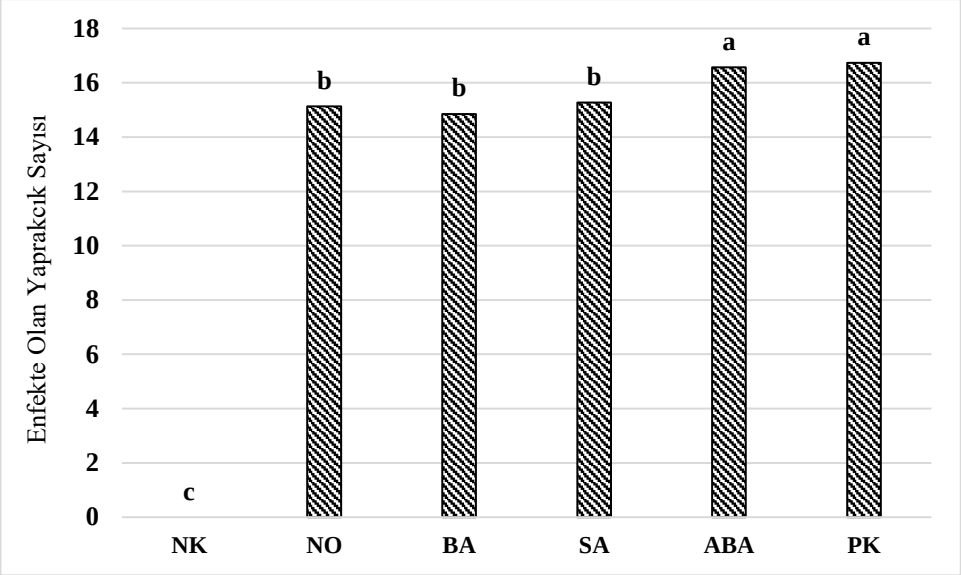
Çizelge 4.7. Enfekteli yaprak sayıları

Ceviz Çeşitler	Fungus İzolatları	Uygulamalar	Enfekteli Yaprak Sayısı									
			2016					2017				
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Chandler	W105	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO	4,66	9	16,33	23	23,33	7	8,66	9,66	10	11
		BA	11	13,33	15,66	23	28,33	8,33	8,66	9,33	9,66	9,66
		SA	13	13	18,66	19,66	20,33	10,66	11,33	12,66	12,66	12,66
		ABA	13,33	23	23,33	24,33	26	22	22,33	24	24	24,66
		PK	7,66	20,66	23,33	27	27,33	6	7,33	8,33	16,66	18,66
	W148	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO	4,66	12,33	12,33	28,33	29	14,66	16,33	18	18	18,66
		BA	8,66	8,66	10,33	12,66	13,66	12	12	12,66	12,66	12,66
		SA	8,66	16,33	17,33	18,33	27,33	7,33	8,33	9,66	10	10,66
		ABA	6,66	18	25,33	30	35,33	7	8	9	10	10,33
		PK	11	12,33	14,33	22	25,33	8,66	10	11	11	11,66
Bilecik	W105	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO	4,66	16,33	18	22,33	23,66	19,33	21,66	21,66	21,66	21,66
		BA	2	6,33	10	17	19,33	16,33	20	21	21	21,66
		SA	3,66	7,66	11,33	20,33	21	19,26	25	26	26	26
		ABA	10	19	19	23,33	24,66	15	18	22,33	23	23,33
		PK	6,33	17	18	22,66	34,66	10,33	14	18,66	18,66	19,33
	W148	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO	3,33	7,66	11	18	21,33	18	19,66	20,66	20,66	20,66
		BA	4,33	7,66	11,33	14	17,33	22,33	24	27	27,66	27,66
		SA	4	10,33	10,66	14,66	15	18,33	21,66	24,33	24,66	24,66
		ABA	2	12	12,66	17	17,66	7	8,66	15,66	15,66	15,66
		PK	6,66	15	18	19,66	20	13,33	16	22,66	23	23,33
Maraş-18	W105	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO	6,33	13	13	16,33	19,66	4,66	5,66	6,33	6,66	6,66
		BA	6,66	9,33	10,33	11,66	14,66	6,33	6,66	7,33	7,66	7,66
		SA	10,66	14,66	18,33	26	29	11	11,66	13	13,66	14
		ABA	15,33	18,33	21,66	24	32,66	3,33	4,66	4,66	4,66	5
		PK	7	8,66	11,33	15	19,66	7	7,66	8	8	8,66
	W148	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO	6,66	11,66	13	14	20,66	6	6,66	7	7,33	7,33
		BA	3,33	6,33	9,33	13,33	14	10,66	11,33	11,66	12,66	13
		SA	10	12,66	18,66	20,33	34	5,66	8	8,33	8,66	9
		ABA	8	15,66	23	26,66	29,66	4,66	5,66	6	7	7
		PK	14,33	18	18,33	27,33	34,33	2,66	3,33	4,66	4,66	5
Şen-1	W105	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO	11,66	19,33	20,33	26	27,33	8,66	11	11,33	14	14,66
		BA	15	17	17,33	28,66	30,33	18,33	20,66	20,66	21	21
		SA	8,66	9	13	15,66	25,33	13,66	15,33	15,66	22,66	27
		ABA	12,66	21,33	22	24	28,33	9	17	23,33	26	31,66
		PK	23,33	28	31	40,33	42,66	4,33	5,33	7,33	10,66	11,66
	W148	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO	12,33	23,66	24,33	26,66	39	12	13	14	15,33	18
		BA	8,66	11	18	22	23,66	18,66	18,66	21,33	23,66	28,33
		SA	6,33	10	9,33	14	25	10,33	10,66	12,33	13	14
		ABA	12,33	14,33	15,66	19	24	6	10,66	11	12	12,66
		PK	25,66	33	40,33	43,66	45	7	9	11,33	12,33	15,66

NK: Negetif Kontrol; NO: Nitrik oksit; BA: Borik asit; SA: Salisilik asit; ABA: Absisik asit; PK: Pozitif Kontrol

Çizelge 4.8. Enfekte olan yapraklarda lekelerin çap ortalamaları

Ceviz Çeşitleri	Fungus İzolatı	Uygulamalar	Enfekte Olan Yaprak Leke Çaplarının Ortalamaları (mm)									
			2016					2017				
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Chandler	W105	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO	0,66	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		BA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		SA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		ABA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.33
		PK	2	2,33	2,33	2,33	3	1	1	1.33	1.66	2
	W148	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.33
		BA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		SA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		ABA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		PK	1,3	1,33	1,33	2	2,66	1	3,66	3,66	4	4
Bilecik	W105	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO	1	1	1	1,33	2	1	1	1	1,33	1,33
		BA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		SA	1	1	1	1	1	1	1	1	1,33	1,66
		ABA	1	1	1	1	1	1	1,33	2	2,66	4
		PK	1,66	2	2,33	3	3,33	1	1,33	2	2,66	4
	W148	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO	1	1	1	1	1	1	1,33	1,66	1,66	1,66
		BA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		SA	1	1	1	1	1	1	1	1	1,33	2,33
		ABA	1	1	1	1	1	1,66	2	3	3	3,66
		PK	1,33	1,66	3,33	3,66	4,33	1,66	2	3	3	3,66
Maraş-18	W105	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO	1	1	2,33	2,33	3,33	1	1	1	1	1
		BA	1	2	2	2	2,33	1	1	1,33	1,66	2,33
		SA	1	1,33	2	2,66	3,33	1	2,33	2,33	3	3,66
		ABA	1	1	1	1,33	1,66	1	1,33	2	2,33	2,66
		PK	1	2,33	3,33	4,66	5,66	1	1,33	1,66	2,66	3,66
	W148	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO	1	1,66	2	2	2,66	1	1	1	1	1
		BA	1	2	2,33	2,66	3,66	1	1	2,33	2,66	3,33
		SA	1	1	1	1,33	1,66	1	2	2,33	3,33	3,66
		ABA	1	1,33	2	2,66	3,33	1	1	1	1,66	2
		PK	1	2,33	3	3,33	3,33	1,33	1,33	2,33	2,33	2,33
Şen-1	W105	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		BA	1	1	1	1	1	1	1,33	2	2,66	3,66
		SA	1	1	1	1	1	1	1	2	2,33	3
		ABA	1	1	1	1	1,66	1	1,33	2	2,66	3
		PK	1	1	2,33	2,33	3	1	2	3	3,66	4,33
	W148	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		NO	1	1	1	1	1	1,66	3	4	4,33	5
		BA	1	1	1	1	1	1	1,66	2,66	3,33	3,66
		SA	1	1	1	1	1	1	1	1,33	1,66	2
		ABA	1	1	1,33	1,66	2	1	1	1,33	1,66	2,33
		PK	1	1	2,33	2,33	3	1	1,33	2,66	3,66	4,33
NK: Negetif Kontrol; NO: Nitrik oksit; BA: Borik asit; SA: Salisilik asit; ABA: Absisik asit; PK: Pozitif Kontrol												



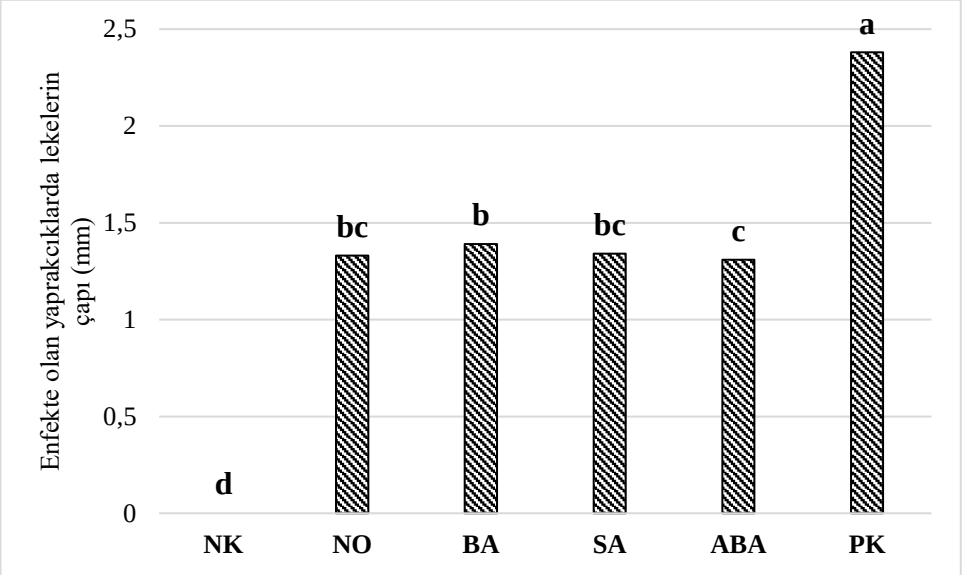
Şekil 4.47. Uygulamalara göre enfekte olan yaprak sayılarının ortalamaları

4.10.2. Aktivatörlerin dayanıklılık üzerine etkileri

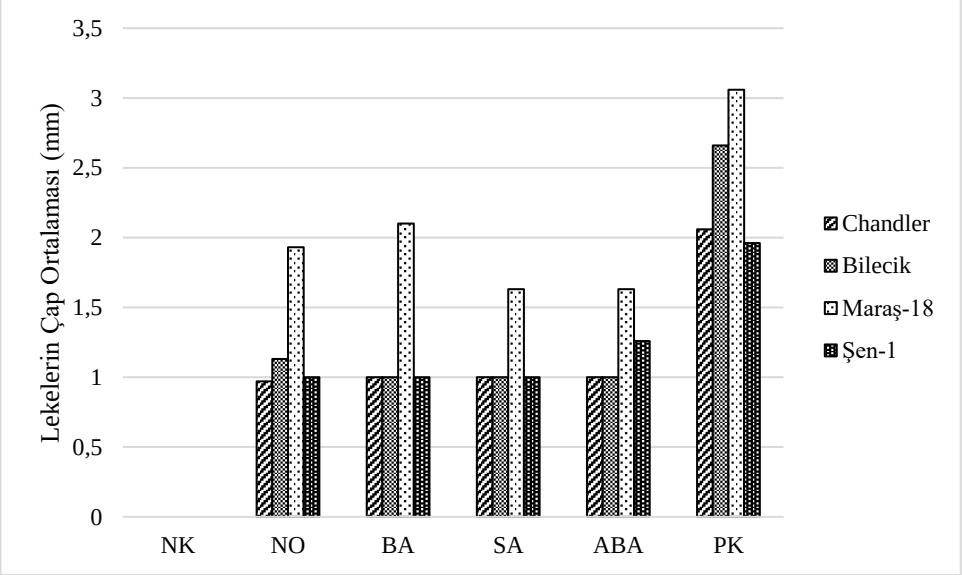
Aktivatör uygulamalarında bütün çeşitlerde ortalama enfekte olan yaprak sayısı Borik asit, Nitrik oksid, Salisilik asit ve Absisik asit için sırasıyla 14,85 (%11,23), 15,13 (%9,56), 15,27 (%8,72) ve 16,56 (%1,01) olarak ölçülmüştür. İnokulasyon yapılıp, aktivatör uygulanmayan positif kontrol gurubunda ile ortalama 16,73 yaprakta enfeksiyon tespit edilmiştir.

İstatistiki olarak enfekteli yaprak sayıları mukayese edildiklerinde ise aktivatörler arasındaki fark önemli olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7, 8). Enfekte olan yaprak sayısı ABA aktivatör grubunda pozitif kontrol grubu ile aradaki fark önemsiz olarak belirlenirken, positif kontrol ile diğer aktivatör NO, BA ve SA arasında farkın önemli olduğu görünmüştür. Aktivatör uygulamalarında leke çapları Nitrik oksid için %41,59, Salisilik asit için %43,96, Borik asit için %44,11 ve Absisik asit için ise %44,95 olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.7, 8, Şekil 4.48, 49, 50, 51, 52, 53). Aktivatörler istatiksel olarak yaprakların üzerinde daha leke sayısı ve küçük leke çaplarına oluşmasına neden olarak

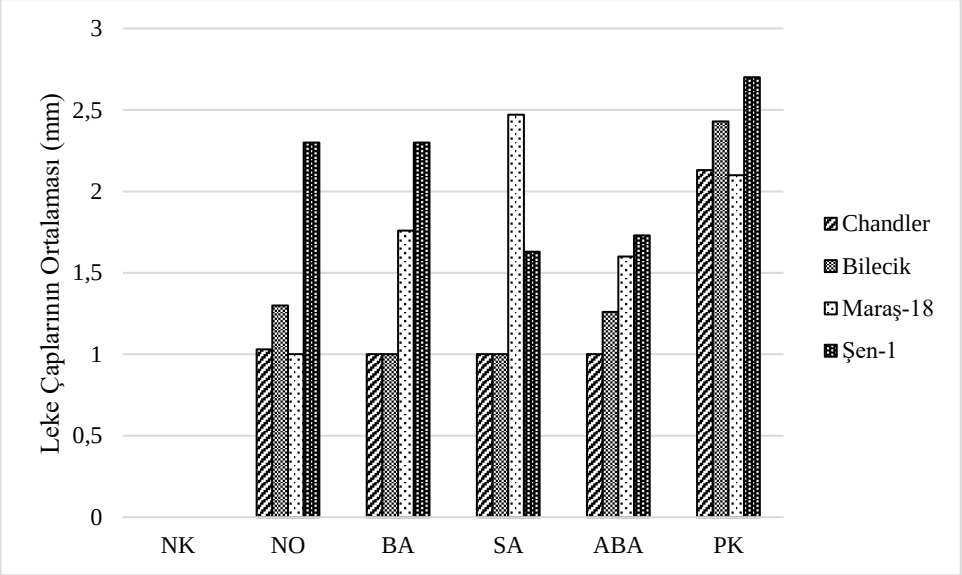
pozitif kontrol grubuna göre çeşitlerde nisbi bir şekilde üstünlük gösterip olumlu etki gösterdiği belirlenmiştir.



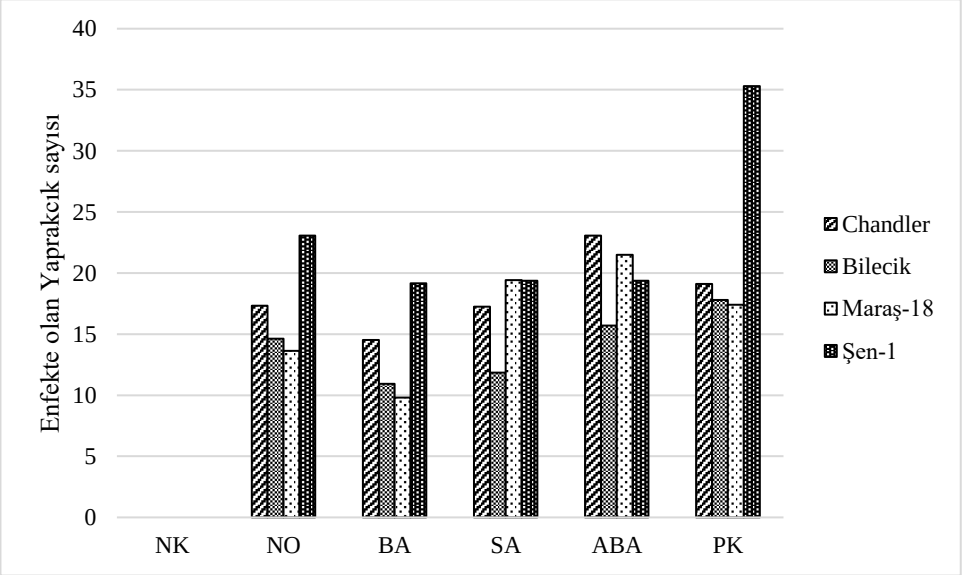
Şekil 4.48. Uygulamalara göre enfekte olan yaprak üzerindeki lekelerin çap ortalamaları



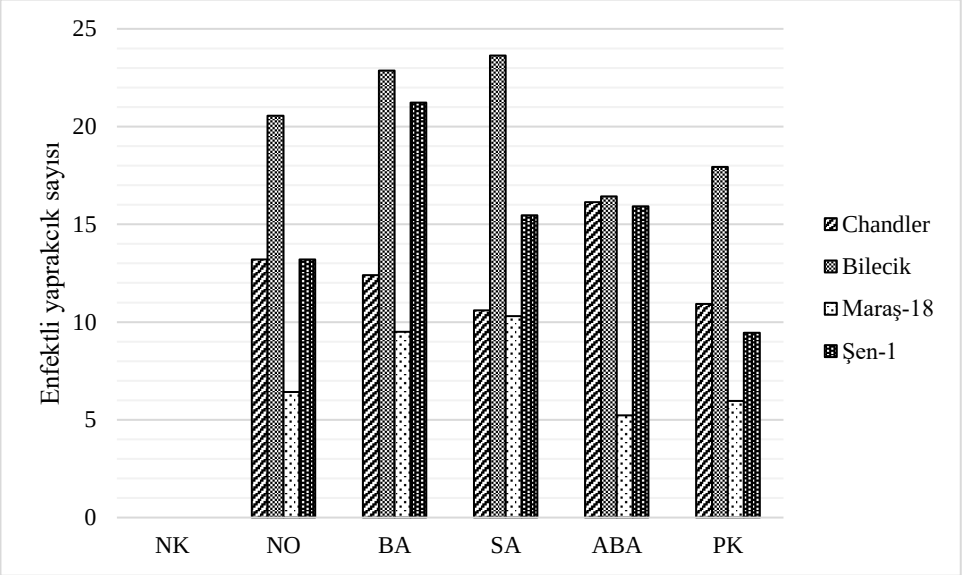
Şekil 4.49. Çeşitlerde aktivatörlere göre lekelerin çap ortalamaları (2016 yılı)



Şekil 4.50. Aktivatörlere göre çeşitlerde lekelerin çap ortalamaları (2017 yılı)



Şekil 4.51. Çeşitlerde aktivatörlere göre enfekteli yaprak sayıları (2016 yıl)



Şekil 4.52. Çeşitlerde aktivatörlere göre enfekte olan yaprak sayıları (2017 yıl)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan arazi çalışmalarında antraknozun (*Ophiognomonia leptostyla*) ceviz (*Juglans regia* L.) ağaçlarında yaygın ve ciddi derecede verim kayıplarına neden olduğu gözlenmiştir. Veriler üretim alanında artış olduğunu gösterirken birim alandan elde edilen verimde ciddi bir artışın olmadığını göstermektedir. Dikim alanı ve ağaç sayısındaki artışa rağmen verimde artış sağlanamamasının nedeni, geleneksel üretim yerine verimi yüksek aşılı çeşitlerden kapama bahçelerin tesis edilmesi ve yeni dikilen ağaçların henüz verimli dönemlerine ulaşmaması olabilir.

Hastalığının yaygın olarak görülmesinin nedeni ceviz yetiştiriciliğinin ihtiyaca yönelik karma bahçelerde yapılması ve hastalığa karşı herhangi bir mücadelenin yapılmamasından kaynaklanmaktadır. Nitekim sürvey alanında düzenli kapama bahçeye rastlanılmamıştır. Farklı meyve türlerinin birlikte bulunduğu karma bahçelerde dikimin düzenli olmadığı, ağaçların farklı yaşlarda olduğu, doğal olarak tohumdan geliştiği için çeşit standarttı olmadığı, ağaçların gübrelenip budanmadığı, antraknoz hastalığına karşı da herhangi bir mücadelenin de (kültürel ve kimyasal mücadelenin) yapılmadığı gözlenmiştir.

Budama, gübreleme gibi kültürel işlemeler yanında çeşit özellikleri, ağacın yaşı, yetişme ortamı ve yıllık iklim parametreleri de antaraknoza karşı dayanıklılıkta rol oynadığı gibi inokulum üzerinde de etkili olabilmektedir. Nitekim antraknoz hastalığının nemli ortamda hızlı gelişip yayıldığı, yaprakların daha erken dökülmesine neden olduğu, bu döngünün bir kaç yıl devam etmesi durumunda ağaçlarda kurumaların meydana geldiği (Cline and Neely 1983); hastalık şiddetinin ise çeşitlere, bahçenin konumuna, bölgeye ve yıllara göre değişim gösterdiği (Shawn 1995); sıcak ve nemli geçen yıllarda hastalığın daha fazla aservulus ürettiği bunun da hastalığın şiddetini etkilediği belirtilmiştir (Saremi and Amiri 2010).

Fungusun eşeyli formu olan *O. leptostyla*'nın askosporları PDA'da 25ºC'de karanlık ortamda, 21 gün; takiben 10ºC'de, karanlık ortamda, 90 gün inkübe edildikten sonra yapılan ölçümlerde peritesyumların yaklaşık 247–295 x 175-252 µm, peritesyumlar içerisinden gelişen askusların 29–30 x 15–16 µm, askuslar içerisinden gelişen askosporların da 14–15 x 2 µm olduğu belirlenmiştir. Nitekim fungusun eşeyli formu PDA ortamında, 10ºC sıcaklıkta, 24 saat karanlıkta 90 gün tutulmak suretiyle elde edilmiş ve yapılan ölçümlerde peritesyumların 480 µm boya kadar ulaştığı, peritesyumlardan yamuk şekilli 47-65 x 8-16 µm boyutlarında askusların oluştuğu, askuslar içerisinde de şeffaf, yamuk, iki hücreli, 15-19 x 2.5-5 µm boyutlarında askosporların geliştiği kaydedilmiştir (Matteoni and Neely 1979).

Fungusun eşeysiz formu olan *Marssoniella juglandis*'in aservuluslarından izole edilen konidiosporlar OMA besiyerinde, 25ºC sıcaklıkta, karanlık ortamda, 21 gün bekletildikten sonra elde edilen aservuluslarının düzensiz, yuvarlak veya kare şeklinde 130-240 x 120-210 µm, aservulusların içinde gelişen hilal şeklinde 2 hücreli, şeffaf ve uç kısımları ince 15-29 x 2,5-5 µm ebatlarında konidiosporların geliştiği belirlenmiştir. Yapılan araştırmalarda da bu etmen için en uygun aservulus ve konidiosporlar oluşumunun 21-26ºC arasında gerçekleştiği tespit edilmiştir (Matteoni and Neely 1979; Belisario *et al*. 2008).

Fungus izolatlarının PDA, OMA, WLEA, WFSEA ve WA ortamlarında gelişim hızlarının, koloni şekillerinin ve renklerinin farklılıklar gösterdikleri ve en iyi gelişimin PDA ve OMA ortamlarında olduğu görülmüştür. Benzer şekilde bu fungusun gelişimi için en uygun ortam olarak OMA (Salehi 2006); bazı araştırmacılar ise OMA yada CMA ortamını önerilmişlerdir (Saremi *et al*. 2002; Irani *et al*. 2006).

Ophiognomonia leptostyla fungusun popülasyonu içinde heterotal yada homotal izolatların olup olmadığının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada ise hem heterotal hem de homotal izolatlar belirlenmiştir. Yapılmış çalışmalarda da bu etmenin bazı izolatlarının homotal (Belisario *et al*. 2008); bazılarının ise heterotal olduğu rapor edilmiştir (Fayret 1976; Matteoni and Neely 1979).

Fungusun tanısında *in vitro* şartlarda morfolojik özelliklerinin belirlenmesine ilaveten hem tanı hemde farklı ırklarının olup olmadığının tespiti amacıyla fungus genomunun farklı bölgelerinden dizayn edilmiş 4 pirimer çifti kullanılarak farklı lokasyonlardan toplanan yedi izolatın ITS5 (F)-ITS4 (R), ITS1 (F)-ITS4 (R), EF1 728 (F)-EF1 1567 (R), TEF1 983 (F)-EF1 1567 (R) pirimerlerinin amplifye ettikleri bölgelerinin sekans dizilimleri çıkarılımıştır. Sekans dizilimleri mukayese edildiklerinde izolatların kendi aralarında sırasıyla %100 oranında benzer olduğu belirlenmiştir. Gerek NCBI veri tabanındaki izolatlarla gerekse kendi aralarında yapılan mukayese fungusun tanısını doğruladığı gibi sekans diziliminin çıkarıldığı bölge bazında bütün izolatların aynı olması en azından toplanmış izolatlar arasında farklı ırkların olmadığını göstermiştir. Nitekim yapılmış çalışmalarda W148'nın virülanslıkları arasında farklılıklar belirlenirken, fungusun farklı ırkları belirlenememiştir (Belisario and Hubbs 1997; Mianji *et al*. 2010; Jamshidi *et al*. 2010).

Morfolojik özellikleri ve elde edilen moleküler veriler bazında *O. leptostyla*'nın farklı ırkı belirlenememiş ve iki izolat (W105 ve W148) çeşitlerin hastalığa hassasiyet durumlarının belirlenmesi amacıyla patojenisite testlerinde kullanılmıştır.

Patojenisite testelerine başlamadan önce Bilecik, Chandler, Maraş-18 ve Sen-1 çeşitlerinin dayanıklılıkta belirleyici unsurlardan birisi olan R genleri içerip içermedikleri NBS1/NBS5a6, S1INV/S2INV, H1145/H1146, S1/AS3, RN1F/RN1R, LM637/LM638 ve Pto kin1/kin2 pirimer çiftleri ile belirlenmiş olmasına rağmen hastalığa karşı en dayanıklı çeşidin Chandler olduğu ve bunu da Bilecik, Maraş-18 ve Sen-1 çeşitlerinin izlediği tespit edilmiştir.

Bununla birlikte patojensite çalışmalarında enfekte olan yaprak sayılarına göre çeşit (Ç), yıl (Y), aktivatör (A), fungus izolatı (F) ve ölçüm zamanları (Ö.Z) istatiksel olarak analiz edildiğinde Ç x Y, Ç x U, Ç x F, Ç x ÖZ, Ç x Y x ÖZ ve Ç x Y x F x ÖZ'ı yine leke çapları baz alındığında Ç x Y, Ç x U, Ç x F, Ç x ÖZ, ve Ç x Y x F x ÖZ'ı arasındaki farklılığın çok önemli ($P<0,001$); leke çaplarına göre ise Ç x Y x ÖZ'ı arasındaki farkın önemsiz olduğu belirlenmiştir.

Bütün çeşitlerde bu R gen bölgeleri belirlenmiş olmasına karşın çeşitlerden pirimerlerin amplifiye ettikleri bantların ağırlıkları ve sayılarında farklılıklar olduğu görüşmüştür. Nitekim Chandler çeşidinde NBS1/NBS5a6, S1INV/S2INV, H1145/H1146, S1/AS3, RN1F/RN1R, LM637/LM638 ve Pto kin1/kin2 pirimer çiftlerinden sırasıyla 1 bant, 3 bant, 1 bant, 5 bant, 4 bant, 1 bant, 12 bant; Bilecik çeşidinde sırasıyla 1 bant, 2 bant, 1 bant, 4 bant, 3 bant, tek bant, 9 bant, Maraş-18 çeşidinde sırasıyla 1 bant, 3 bant, 3 bant, 5 bant, 4 bant, 1 bant, 12 bant ve Şen-1 çeşidinde ise sırasıyla 1 bant, 2 bant, 1 bant, 4 bant, 3 bant, 1 bant, 9 bant elde edilmiştir. Buda R genler dışında dayanıklılık yada hassasiyette konukçu-patojen arasındaki interaksiyonlar yanında farklı parametrelerinde belirleyici olabileceğini göstermektedir. Antraknoza karşı tam olarak dayanıklı genotip bulunmamasına rağmen bazı çeşitlerin geç yaprak oluşturduğu için diğerlerine göre hastalıktan daha az etkilendiği belirlenmiştir (Balaz *et al*. 1993; Arnaudov and Gandev 2009; Dastjerdi and Hasani 2010).

Denemelerde hastalığa karşı en hassas olarak belirlenen Şen-1 çeşidinin Maraş-18 çeşidinden 7 gün, Bilecik çeşitinden 10 gün ve Chandler çeşidinden 12 gün erken yaprak açtığı belirlenmiştir. En dayanıklı bulunan Chandler çeşidinin ise en geç yaprak açtığı gözlenmiştir.

Nitekim erkenci yada yada geçci olma özelliğinin pirimer enfeksiyondan kaçınma açısında hassasiyet ve dayanıklılıkta belirleyici unsurlardan birisi olarak belirtilmiştir (Burdon 1987). Bir diğer hususta yaprakların kimyasal içeriği olabilir. Nitekim hassasiyet ve dayanıklılıkta daha fazla juglone (5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone) ve hydrojuglone glucoside (HJG) içeren genç yapraklarda antraknoz hastalığının gelişiminin daha yavaş olduğu (Cline and Neely 1983) ve *O. leptostyla* ile enfekte olan ceviz ağacı yapraklarında enfeksyondan sonra juglonin miktarında artışlar olduğu kaydedilmiştir (Duroux *et al*. 1998; Razdan and Gupta 2009).

Cevizin genç yapraklarında serbest su hücreler arasında yaşlı yapraklara göre daha fazla olduğundan dolayı su buharlaşma miktarı yüksek olmaktadır ve buharlaşma süresinde juglan maddesi oksit olarak zehirli hale gelerek patojenlere karşı tolerans üretebildiği

tahmin edilmektedir. Yaşlı yapraklarda buharlaşma mıktarı azaldığı için juglan maddenin zehirli halı yapraklar üzerinde azaldığı için patojenler daha raha efeksyon yapabileceğine yönlendirebiliriz (Arasoğlu *et al*. 2016).

Cevizlerde antrakonuza karşı dayanıklılığı aktive edip etmediğinin belirlenmesi amacıyla aktivatör olarak kullanılan Borik asit, Nitrik oksid, Salisilik asit ve Absisik asit uygulamarının hastalığın gelişimini engellemede istatistiki olarak önemli bir rol oynamadığı belirlenmiştir. Bunda patojen ve bitki türü, bitkinin tek yada çok yıllık oluşu ile birlikte uygulanan dozun yetersizliği rol oynayabilir. Nitekim Absisik asit ve Salisili k asit uygulamalarının *Oryza sativa* bitki türlerinde *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*; ABA'nın *Blumeria graminis* ve *Alternaria brassicicola*'ya karşı dayanıklılıkta etkili olduğu belirlenmiştir (Ton and Mauch-Mani 2004; Flors *et al*. 2008).

Sonuç olarak İzole edilen izolatlar arasında farklı bir antraknoz ırkının olmadığı, antraknoza karşı çeşitler arasında hassasiyet farklılıkları olduğu, ancak dayanıklı çeşit olmadığı, hassasiyet farklılıklarının da belirlenmiş olan R genler dışındaki genler yada çeşitlerin özelliklerinden kaynaklanabileceği fikri öne çıkmıştır.

Çoruh Vadisi Ceviz popülasyonunda antraknoz (*Ophiognomoia leptostyla*) hastalığı etmeni fungusun yaygınlık durumunun olduğu belirlenip ciddi bir şekilde verim kaybına neden olduğu tespit edilmiştir. Fungus morfolojik ve klasik tanı yöntemlerine ilaveten PCR ile tanımlanmıştır. PCR ürünlerinin sekans analizi ile nükleotit dizilimlerinin belirlenmiştir. Farklı lokasyonlardan toplanan fungus izolatlarının besi ortamlarında morfolojik özelliklerine göre kendi aralarında mukayesesi edilmiştir. Ticari değeri yüksek olan ceviz çeşitlerinden Chandler, Bilecik, Maraş-18 ve Şen-1 üzerine patojensite testi yapılarak dayanıklılık durumları patojene karşı belirlenmiştir. Hastalığa en dayanıklılık göstern Chandler çeşiti olarak belirlenirken en hassas çeşit Şen-1 olarak belirlenmiştir. Ceviz çeşitlerin daynıklılık genleri içerip içermediklerine PCR ile tespit edilmiştir. Ayrıca, 4 farklı aktivatör etkilerini ceviz çeşitlerinin reaksyonlarına etkilerine bakılarak değerlendirilmiştir. Aktivatörler uygulanan gruplar ve pozitif kontrol grubuna bulunan

fidanların enfekte olan yaprak sayısı ve leke çeplarında anlamlı bir şekilde farklılıklar ortaya çıkmıştır.

Hastalık etmenin popülasyonu ülke bazında ve kapsamlı bir şekilde çalışılması ve aralarıdaki morfolojik farklılıklarına bakılması, farklı ceviz genotipleri ve çeşitlerin hassasiyet durumları patojene karşı incelenmesi ve daha sonra patojenlerin virülanslık seviyesinin belirlenmesi için en hassas genotiplerin üzerinde deneme yapılması, dayanıklık gösteren ve hassasiyet göstern genotiplerde ve çeşitlerde R genlerin taranması birbiri ile mükayesi edilmesi bir sonraki çalışmalara önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Alfieri Jr., S.A., Langdon, K.R., Wehlburg, C. and Kimbrough, J.W. 1984. Index of Plant Diseases in Florida (Revised). Florida Dept. Agric. and Consumer Serv., Div. Plant Ind. Bull. 11: 1-389.

Aly, M.A., Fjellstrom, R.G., McGranahan, G.H., Parfitt, D.E. 1992. Origin of walnut somatic embryos determined by RFLP and isozyme analysis. Hortscience, 27:61-63.

An, H. and Yang, K. 2014. Resistance gene analogs in walnut (*Juglans regia*) conferring resistance to *Colletotrichum gloeosporioides*. International Journal of Plant Breeding, 197: 175-190.

Andrew, M., Peever, T.L., and Pryor, B.M. 2009. An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored Alternaria species complex. Mycologia, 101: 95-109.

Anmin, L., Stone, D.E. and Grauke, L.J. 1999. Juglandaceae. Flora of China 4: 277–285.

Annunziati, M., Gras, M., Pollegioni, P., Mugh, G., Malvot,, M.E. and Anselmi, N. 2007. Resistance behavior to anthracnose disease by *Gnomonia leptostyla* (fr) ces. In Juglans spp. In: 51 Congresso Annnuale, Societa Italinana di Genetica Agraria (SIGA), Riva de Garda (TN) 23-26 Settembre.

Anselmi, N., Mazzaglia, A., Scaramuccia, L. and De Pace, C. 2006. Resistance attitude of *Juglans regia* L. provenances towards anthracnose (*Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces et De Not.). Proc. 5th Int. Walnut Symp. Eds. M. E. Malvolti and D. Avanzato. Acta Hort., ISHS, 705.

APS, 2017. Common Names of Diseases, The American Phytopathological Society, http://www.apsnet.org/Pages/default.aspx.

Aradhya, M.K., Potter, D., Gao, F. and Simon, C.J. 2007. Molecular phylogeny of Juglans (Juglandaceae): a biogeographic perspective. Tree Genetics and Genomes. 3: 363-378.

Aradhya, M., Woeste, K. and Velasco, D. 2010. Genetic diversity, structure and differentiation in cultivated walnut (*Juglans regia* L). Acta Horticultur, 861:127–132.

Arasoğlu, T., Mansuroğlu, B., Derman, S., Gümüş, B., Koçyiğit, B., Acar, T. and Kocacalışkan, İ. 2016. Enhancement of antifungal activity of juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) using a poly(d,I-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) natoparticle system. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64: 7087-7094.

Arnaudov, V.A. and Gandev, S.I. 2009. Susceptibility of some walnut cultivars to Gnomonia leptostyla (Fr.) ces. Et de not. Acta Horticulture, 825: 407-412.

Arnaudov, V., Gandev, S. and Dimova, M. 2014. Susceptibility of some walnut cultivars to *Gnomonia leptostyla* and *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* in Bulgaria. Agro Knowledge Journal, 15(1): 41-45.

Aslantaş, R. 2006. Identification of superior walnut (*Juglans regia*) genotypes in north-eastern Anatolia, Turkey. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 34; 231-237.

Balaz, J., Korac, M. and Cerovic, S. 1993. Susceptibility of walnut genotypes to *Gnomonia leptostyla*. Horticultural Abstract, 63 (6): 498.

Barkley, Y., and Brusven, A. 2007. Black Walnut. Alternative Tree Crops Information Series No.4., University of Idaho College of Natural Resources.

Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Ed. Burges Pubblishing Company, 234 Pp.

Barr, M.E. 1978. The Diaporthales in North America with emphasis on *Gnomonia* and its segregates. Mycologia Memoirs, 7: 1–232.

Bayazit, S., Kazan, K., Gülbitti, S., Çevik, V., Ayanoğlu, H. and Ergül, A. 2007. AFLP analysis of genetic diversity in low chill requiring walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from Hatay, Turkey. Science Horticulture, 111(4): 394-398. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.11.006

Beineke, W.F. and Masters, C.J. 1973. Black walnut progeny and clonal tests at Purdue University. Proceedings of the 12th South Forest Tree Improvement Conference. Baton Rouge LA. pp. 233-242.

Belisario, A., Forti, E., Balmas, V., Valier, A. and Corazza, L. 1999. La fusariosi del frutto, una malattia del noce comune. Informatore Agrario 21, 51-53.

Belisario, A. and Hubbes, M. 1997. "Genetic variability in *Gnomonia leptostyla*", III rd International Walnut Congress, Alcobaça, Portugal, ISHS Acta Horticulturae N. 442, Abstracts, www.actahort.org/books/442/

Belisario, A. 2002. Anthracnose, in Compendium of Nut Crop Diseases in Temperate Zones, B. L. Teviotdale, T. J. Michailides and J. W. Pscheidt, Eds. USA: APS Press, pp. 77-78.

Belisario, A., Are, M., Palangio, C.S. and Zonia, A. 1997. Walnut blight in the genus Juglans. Acta Horticulturae, 442: 357-359.

Belisario, A., Forti, E., Cichello, A.M., Zonia, A., Barbieri, E. and Valier, A. 2001. Epidemiological surveys of *G. leptostyla* in *Juglans regia* hedgerow trained orchard. Acta Horticulture, 544: 405-408.

Belisario, A., Scotton, M., Santori, A. and Onofri, S. 2008. Variability in the Italian population of *Gnomonia leptostyla*, homothallism and resistance of *Juglans* species to anthracnose. Forest Pathology, 38: 129-145.

Berry, F.H. 1960. Etiology and control of walnut anthracnose. Maryland Agricultural Experimental Station Research Bulletin. A- 113. 22pp

Berry, F.H. 1970: Walnut anthracnose. USDA For. Serv. Forest Pest Leaflet, 85: 1–4.

Berry, F.H. 1977. Control of walnut anthracnose with fungicide in a black walnut plantation. Plant Disease Report, 61:378-379.

Black, W.M. 1977. Ecology and epidemiology of walnut anthracnose Ph.D. thesis. University of Illinois, Urbana Champion, 83p.

Black, W.M. and Neely, D. 1978a. Effects of temperature, free moisture and relative humidity on the occurrence of walnut anthracnose. Phytopathology, 68: 1054-1056.

Black, W.M. and Neely, D. 1978b. Relative resistance of *Juglans* species and hybrids to walnut anthracnose. Plant Disease Reporter, 62: 497-499.

Boerema, G.H., Gruyter, J.de., Noordeloos, M.E., Hamers, M.E.C. 2004. *Phoma* identification manual differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. CABI Publishing, 470 Pp.

Burdon J.J. 1987. Phenotypic and genetic patterns of resistance to the pathogen *Phakopsora pachyrhizi* in populations of *Glycine canescens*. Oecologia 73 257–267. 10.1007/BF00377516

Charrier, G., Bonhomme, M., Lacointe, A. and Ameglio, T. 2011. Are budburst dates, dormancy and cold acclimation in walnut trees (*Juglans regia* L.) under mainly genotypic or environmental control? International Journal of Biometerology, 55(6): 763-774. DOI: 10.1007/s00484-011-0470-1.

Charrier, G., Poirier, M., Bonhomme, M, Laconite, A., Ameglio, T. 2013. Frost hardiness in walnut trees (*Juglans regia* L.): how to link physiology and modelling. Tree Physiology, 33(11) DOI: 10.1093/treephys/tpt090

Chen, X.M., Line, R.F. and Leung, H. 1998. Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley and wheat by high-resolution electrophoresis. Theor Appl Genet. 97: 345-355.

Chen, Y., Fan, C., Yang, Y. and He, Y. 2009. Relationship between resistance gene analogue and blast resistance in rice. Rice Science, 16: 99-105.

Ciarmiello, L.F., Piccirillo, P., Pontecorvo, G., Luca, A.D., Kafantaris, I., Woodrow, P. 2011. A PCR based SNPs marker for specific characterization of English walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. Mol Biol Rep. 38:1237–1249. doi: 10.1007/s11033-010-0223-y

Cline, S. and Neely, D. 1983. Penetration and infection of leaves of black walnut by *Marssonina juglandis* and resulting lesion development. Phytopathology, 73:494-497.

Collins, N., Park, R., Spielmeyer, W., Ellis, J. and Pryor, A. J. 2001. Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance genes. Genome, 44:375–381.

Dalzell, J.J., McMaster, S., Fleming, C.C. and Maule, A.G. 2010. Short interfering RNA mediated gene silencing in *Globodera pallida* and *Meloidogyne incognita* infective stage juveniles. International Journal Parasitology, 40:91–100.

Dangl, G.S., Woeste, K., Aradhya, M.K., Koehmstedt, A., Simon, C., Potter, D., Leslie, C.A. and McGranahan, G. 2005. Characterization of 14 microsatellite markers for genetic analysis and cultivar identification of walnut. J Am Soc Hort Sci. 130:348–354.

Dangl, J.L. and Jones, J.D.G. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. Nature, 411:826–833.

Dangl, J.L., Horvath, D.M. and Staskawicz, B.J. 2013. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. Science, 341(6147) DOI: 10.1126/science.1236011.

Dastjerdi, R. and Hasani, D. 2010. Response of walnut genotypes to *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. & de Note. in greenhouse. Improvement of Seeds and Seedlings Journal, 3(25-1): 433-449.

Dastjerdi, R., Hasani, D., Nikkhah, M.J., Farhannezhad, A. And Salehi, S. 2009. Evaluation of relative resistance levels of different variety and genotypes of walnut aganist anthracnose disease. Short article of 18th congress of plant protection, Hamadan, Iran. P 72.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19(1): 11-15.

Du, B., Zhang, W., Liu, B., Hu, J., Wei, Z., Shi, Z., He, R., Zhu, L., Chen, R., Han, B. and He, G. 2009. Identification and characterization of *Bph14*, a gene conferring resistance to brown planthopper in rice. PNAS, 106(52): 22163-22168.

Dudka, I.O., Heluta, V.P., Tykhonenko, Y.Y., Andrianova, T.V., Hayova, V.P., Prydiuk, M.P., Dzhagan, V.V., and Isikov, V.P. 2004. Fungi of the Crimean Peninsula. M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, 452 pages.

Duroux, L., Delmotte, F.M., Lancelin, J.M., Keravis, G. and Jay-Allemand, C. 1998. Insight into naphthoquinone metabolism: Beta-glucosidase-catalyzed hydrolysis of hydrojuglone beta-D-glucopyranoside. Biochemical Journal, 333: 275-283.

Durrant, W.E. and Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology, 42(1): 185-209.

Fahrentrapp, J., Broggini, G.A.L., Kellerhals, M., Peil, A., Richter, K., Zini, E., Gessler, C. 2012. A candidate gene for fire blight resistance in *Malus robusta* is coding for a CC–NBS– LRR. Tree Genet Genomes, 9:237–251.

FAO, 2017. http://www.fao.org/statistics/en/

Fayret, J. 1967. Cycle bologique naturel et in vitro, de *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. et de Not. Compt. Rend. Hebd. Se´ances Acad. Sci. Ser. D Sci. Nat. 265, 908–911.

Ferhatoglu, Y. 2001.Ceviz Yetistiriciligi. Tarım ve Köy İşleri Bakanlıgı. Ankara.s

Fjellstrom, R.G., Parfitt, D.E. and McGranahan, G.H. 1994. Genetic relationships characterization of Persian walnut (*Juglans regia* L.) cultivars using restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). J Am Soc Hort Sci. 119 (4): 833-839.

Flors, V., Ton, J., Van Doorn, R., Jakab, G., García-Agustín, P. et al. 2008. Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola* . Plant Journal, 54: 81–92.

Fornari, B., Cannata, F., Spada, M., Malvolti, M.E. 1999. Allozyme analysis of genetic diversity and differentioation in European and Asiatic walnut (*Juglans regia* L.) populations. Forest Genetics, 6:115-127.

Foroni, I., Rao, R., Woeste, K., Gallitelli, M. 2005. Characterization of *Juglans regia* L. through SSR markers and evaluation of genetic relationships among cultivars and the 'Sorrento' landrace. Journal of Horticulture Science and Biotechnology, 80:49–53.

French, A.M. 1989. California Plant Disease Host Index. Calif. Dept. Food Agric., Sacramento, 394 pages.

Fu, Z.Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S.H., Tada, Y., Zheng, N. and Dong, X. 2012. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. Nature, 486(7402): 228-232. DOI: 10.1038/nature11162.

Funk, D.T., Neely, D. and Bey, C.F. 1981. Genetic resistance to anthracnose of black walnut. Silvae Genetic, 30:115-117.

Gao, Y.L., Guo, W.Z., Wang, L. and Zhang, T.Z. 2006. Isolation and characterization of disease resistance gene analogs and defense gene analogs in sea-island cotton (*Gossypium barbadense* L.). Sci China C., 36: 97-108.

Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D. and Pugin, A. 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. MPMI, 19(7): 711-724. DOI: 10.1094/MPMI.

Greuter, W., Poelt, J. and Raimondo, F. M. 1991. A checklist of Sicillian fungi. Bocconea, 2: 222.

Greve, C., McGranahan, G., Hasey, J., Synder, R., Kelly, K., Goldhamerer, D. and Labavitch, J. 1992. Variation polyunsaturated fatty acids composition of persian walnut. Journal of American Society of Horticultural Science, 117:518-522.

Gupta, P.K. and Varshney, R.K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica, 113:163–185. doi: 10.1023/A:1003910819967.

Hedin, P.A., Collum, D.H., Langhans, V.E. and Graves, C.H. 1980. Distribution of juglone and related compounds in pecan and their effect on *Fusicladium effusum*. Journal of Agricultural Food and Chemistry, 28: 340-342.

Hedin, P.A., Langhans, V.E. and Graves, C.H.Jr. 1979. Identification of juglone in pecan as a possible factor of resistance to *Fusicladium effusum*. Journal of Agricultural Food and Chemistry, 27: 92-94.

Ho, W.C. and Ko, W.H. 1997. A single method for obtaining single-spore isolates of fungi. Bot. Bull. Acad. Sin. 38: 41-44.

Hunger, S., Gaspero, G.D., Mohring, S., Bellin, D., Schafer-Pregal, R., Borchardt, D.C., Durel, C.E., Werber, M., Weisschaar, B., Salamini, F. and Schneider, K. 2003. Isolation and linkage analysis of expressed disease-resistance gene analogues of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Genome, 46: 70-82.

Irani, H., Asadi, P., Karimi, M.R., Boland Andam, J., Khosro, F., Rabieifar, E. and Khabaz, H. 2006. Study of anthracnose disease in Iran. Short articles of 17th Plant Protection congress in Iran. P 362.

Jamshidi, S., Zamanizadeh, H.R., Zare, S., Rezaee, S. 2010. Study on sexual reproduction and some morphological and pathological traits of *Ophiognomonia leptostyla* in Iran. Rostaniha, 10(2): 161-177.

Jelenska, J., Yao, N., Vinatzer, B.A., Wright, C.M., Brodsky, J.L. and Greenberg, J.T. 2007. A J domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses. Current Biology, 17:499–508.

Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. Nature Reviews, 444. DOI: 10.1038/nature05286

Jones, J.D., Vance, R.E. and Dangl, J.L. 2016. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. Science, 354: 6316. pii.aaf6395

Joshi, R.K., Monhanty, S., Subudhi, E., Nayak, S. 2010. Isolation and characterization of NBS–LRR resistance gene candidates in turmeric (*Curcuma longa* cv. *surama*). Genet Mol Res 9: 1796–1806.

Juhasova, G., Ivanova, H., and Spisak, J. 2006. Biology of fungus *Gnomonia leptostyla* in agro-ecological environments of Slovakia. Mikol. Fitopatol. 40: 538-547.

Kafkas, S., Ozkan, H. and Sütyemez, M. 2005. DNA polymorphism and asessment of genetic relationships in walnut genotypes based on AFLP and SAMPL markers. Journal of American Society of Horticultural Science, 130:585-590.

Kar, B., Nanda, S., Nayak, P.K., Nayak, S. and Joshi, R.K. 2013. Molecular characterization and functional analysis of CzR1, a coiled-coil-nucleotide-binding-site-leucine-rich repeated R-gene from Curcuma zadoaria Loeb. that confers resistance to *Pythium aphanidermatum*. Physiol Mol Plant P, 83:59–68.

Karimi, R., Ershadi, A., Vahdati, K. and Woeste, K. 2010. Molecular characterization of Persian walnut populations in Iran with microsatellites markers. J Am Soc Hortic Sci, 45:1403–1406.

Kenneth, J. and Kessler, J.R. 1984. Similarity of annual anthracnose epidemics in young *Juglans nigra* plantations from 1978 through 1982. Plant Disease, 68:571–573.

Khadivi-Khub, A., Ebrahimi, A., Mohammadi, A. and Kari, A. 2015. Characterization and selection of walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from seedling origin trees. Tree Genetices & Genomes. DOI10.1007/s11295-015-0882-x

Krueger, W.H. 2000. Pollinaiton of English Walnuts: Practices and Problems. HortTechnology, 10(1): 127-130. https://doi.org/10.21273/HORTTECH.10.1.127

Langhans, V.E., Hedin, P.A. and Graves, C.H.Jr. 1978. Fungitoxic chemicals in pecan tissue. Plant Disease Reports, 62: 894-898.

Leslie, C.A. and G.H. McGranahan. 1998a. The Origin of Walnut. Pages 3-7 Walnut Production Manual. University of California Agriculture and Natural Resources Publication 3373, Oakland.

Leslie, C.A. and McGranahan, G. 1988b. Native populations of Juglans regia- a draft. International Conference on Walnuts, Ataturk Central Horticultural Research Institute, Yalove, Turkey. Pp. 111-124.

Lu, Y., Xu, W.H., Xie, Y.X., Zhang, X., Pu, J.J., Qi, Y.X. and Li, H.P. 2011. Isolation and characterization of nucleotide-binding site and C-terminal leucine-rich repeat-resistance gene candidates in bananas. Genet Mol Res, 10:3098–3108.

Mago, R., Nair, S. and Mohan, M. 1999. Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping. Theor Appl Genet, 99:50–57.

Manning, W.E. 1978. The classification with in Juglandaceae. Ann MO Bot Gard.; 65:1058–1087. doi: 10.2307/2398782.

Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganal, M.W., Spivey, R.Wu.T., Earle, E.D. and Tanksley, S.D. 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. Science, 262:1432–1436.

Martinez, M.L., Labuckas, D.O., Lamarque, A.L. and Maestri, D.M. 2010. Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products. Journal of Science and Food Agriculture, 90:1959-1967.

Martinez-Garcia, P.J., Crepeau, M.W., Puiu, D., Gonzalez-Ibeas, D., Whalen, J., Stevens, K.A., Paul, R., Butterfield, T.S., Britton, M.T., Reagan, R.L., Chakraborty, S., Walawage, S.L., Vasguez-Gross, H.A., Cardeno, C., Famula, R.A., Pratt, K., Kuruganti, S., Aradhya, M.K., Leslie, C.A., Dandekar, A.M., Salzberg, S.L., Wegrzyn, J.L., Langley, C.H. and Neale, D.B. 2016. The walnut (*Juglans regia*) genome sequence reveals diversity in genes coding for the biosynthesis of non-structural polyphenols. Plant Journal. 87(5): 507-532. DOI: 10.1111/tpj.13207

Matteoni, J.A. 1977. *Gnomonia leptostyla* and its pathogenesis in black walnut. M.S. thesis. Universirt of Illinois, Urbana Champion, 80pp.

Matteoni, J.A. and Neely, D. 1979. *Gnomonia leptostyla*: growth, sporulation, and heterothallism. Mycologia, 71(5): 1034-1042.

Mc Granahan, G.H. and Leslie, C. 1990. Walnuts (*Juglans*). Acta Horticulturae, 290:905–951.

Mianji, M., Abdollahi, H. and Jamshidi, S. 2011. Studiy the genetic diversity of causal agent of walnut anthracnose *Ophiognomonia leptostyla* (Fr.) Sogonov in the ITS and IGS region by using CAPS marker in the north west of Iran. New Knowledge of Agriculture, 19: 79-88. (In Persian).

Miller, R.N.G., Alves, G.S.C. and Sluys, M.A.V. 2017. Plant immunity: unravelling the complexity of plant response to biotic stresses. Annals of Botany, 119:681-687. DOI: 10.1093/aob/mcw284.

Monod, M. 1983. Monographie taxonomique des Gnomoniaceae (Ascomycetes de l'ordre des Diaporthales). I. Beih. Sydowia 9: 1-315.

Mulenko, W., Majewski, T. and Ruszkiewicz-Michalska, M. 2008. A Preliminary Checklist of Micromycetes in Poland. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences 9: 752.

Muller, W. and Leistner, E. 1978. Aglycones and glycosides of oxygenated naphthalenes and a glycosyltransferase from Juglans. Phytochemistry, 17: 1739-1742.

Muradoğlu, F., Oğuz, H., Yildiz, K. and Yilmaz, H. 2010. Some chemical composition of walnut (*Juglans regia* L.) selections from Eastern Turkey. African journal of agricultural research, 5(17):2379-2385.

Najafi, S., Jafari, H., Aminian, H., Marafat, A. and Etebarian, H. 2015. Study of Walnut Black Spot (Anthracnose) Disease in Zanjan Province and Evaluation of Partial Resistance of Some Local and Exotic Walnut Genotypes against the Disease. Applicable Research on Plant Protection, 3 (2): 1-15.

Neely, D. 1981. Application of nitrogen fertilizer to control anthracnose of black walnut. Plant Disease, 65: 580-581.

Neely, D. and Black, W.M. 1976. Anthracnose of black walnuts in the midwest. Plant Disease Reporter, 60: 519-521.

Nicese, F.P., Hormaza, J.I. and McGranhan, G.H. 1998. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. Euphytica, 101 (2): 199-206.

Nomura, H., Komori, T., Uemura, S., Kanda, Y., Shimotani, K., Nakai, K., Furuichi, T., Takebayashi, K., Sugimoto, T., Sano, S., Suwastika, N., Fukusaki, E., Yoshioka, H., Nakahira, Y. and Shiina, T. 2012. Chloroplast-mediated activation of plant immune signaling in Arabidopsis. Nature Communications, 3: 926, DOI: 10.1038/ncomms1926

Özaktan, H., Erdal, M., Akkopru, A. and Aslan, E. 2007. Evsluation of susceptibility of some walnut cultivars to *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* by immature nut test. Cost 873, WG3/WG4 Joint Meeting, Murica, Spain, http://www.cost873.ch/_uploads/_files/m_ozaktan_murica.pdf

Ozkan, G. and Koyuncu, M.A. 2005. Physical and chemical composition of some walnut (*Juglans regia* L.) genotypes grown in Turkey. International Journal of Fats and Oils, 56(2) https://doi.org/10.3989/gya.2005.v56.i2.122

Pantidou, M.E. 1973. Fungus-host index for Greece. Benaki Phytopathol. Inst., Kiphissia, Athens., 382 pages.

Park, S.W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S. and Klessig, D.F. 2007. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. Science, 318:113–116.

Pastore, M., Consoli, D. and Cristinzio, G. 1997. Susceptibility of 32 walnut varieties to *Gnomonia leptostyla* and *Xanthomonas compestris* pv. *juglandis*. Acta Horticulturae, 442: 379-385.

Poirier Y., Antonenkov, V.D., Glumoff, T. and Hiltunen, J.K. 2006. Peroxisomal beta-oxidation--a metabolic pathway with multiple functions. Biochim Biophys Acta, 1763(12):1413-1426.

Polito, V.S., Pinney, K., Weinbaum, S., Aradhya, M.K., Dangl, J., Yanknin, Y. and Grant, J.A. 2005. Walnut Pollination Dynamics: Pollen Flow In Walnut Orchards. ISHS Acta Horticulturae 705: V International Walnut Symposium. DOI: 10.17660/ActaHortic.2005.705.68

Pollegioni, P., Woeste, K., Mugnozza, G.S. and Malvolt, M.E. 2009. Retrospective identification of hybridogenic walnut plants by SSR fingerprinting and parentage analysis. Mol Breed. 24:321–335. doi: 10.1007/s11032-009-9294-7.

Pollegioni, P., Woeste, K.E., Chiocchini, F., Del Lungo, S., Olimpieri, I., Tortolano, V., et al., 2015. Ancient humans influenced the current spatial genetic structure of common walnut populations in Asia. PloS ONE; 10: e0135980. pmid:26332919

Pollegioni, P., Van der Lindenb, G., Belisarioc, A., Grasd, M., Anselmie, N., Olimpieria, I., Luongoc, L., Santinig, A., Turcog, E., Scarascia Mugnozzaf, G. and Malvoltia, M.E. 2012. Mechanisms governing the responses to anthracnose pathogen in *Juglans* spp.. Journal of Biotechnology, 159(4): 251-264.

Pollegioni, P., Woeste, K., Chiocchini, F., Del Lungo, S., Ciolfi, M., Olimpieri, I., Tortolano, V., Clark, J., Hemery, G.E., Mapelli, S. and Malvolti, M.E. 2017. Rethinking the history of common walnut (*Juglans regia* L.) in Europe: Its origins and human interactions. Plos One, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172541

Pospelov, A.G., Zaprometov, N.G. and Doinasheva, A.A. 1957. Fungi of the Kirghiz SSR. No. I. Systematic list of species and geographical distribution. 128pp. Bibliog. 24. Frunze, Kirgizskoi SSR.

Potter, D., Gao, F. Alello, G., Leslie, C. and McGranahan, G. 2002. Intersimple sequence repear markers for fingerprinting and determining genetic relationships of walnut (*Juglans regia*) cultivars. J Am Soc Hort Sci. 127 (1): 75-81.

Powell, W., Morganthe, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalsky, A. The combination of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding, 2:225-238.

Qi, Z., Verma, R., Gehring, C., Yamaguchi, Y., Zhao, Y., Ryan, C.A., and Berkowitz, G. A. 2010. Ca2+ signaling by plant Arabidopsis thaliana pep peptides depends on AtPepR1, a receptor with guanylyl cyclase activity, and cGMP-activated Ca2+ channels. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Americ, 107: 21193-21198.

Que, Y.X., Xu, L.P., Lin, J.W. and Chen, R.K. 2009. Isolation and characterization of NBS–LRR resistance gene analogs from sugarcane. Acta Agronomica Sinica, 35:631–639.

Rajesh, P.N. 2001. Chickpea genomics: BAC library construction, resistance gene analog (RGA) mapping and tagging double-podded trait. Ph.D. Dissertation, University of Pune, Pune, India.

Razdan, V.K. and Gupta, S. 2009. Integrated Pest Management: Innovation and development Process. Spring Science + Business Media B. V, pp. 369-389.

Rehner, S. 2001. Primers for Elongation Factor 1-a (EF1-a). Available from: http://ocid.nacse.org/research/deephyphae/EF1primer.pdf

Reid, W. 1990. Eastern black walnut: Potential for commercial nut producing cultivars. pp: 327- 331. In: Janick, J., and Simon, J. E.(eds.) Advances in New Crops. Timber Press Portland, Oregon, USA.

Revin, A.A. 1981. Selecting forms of walnut resistant to *Gnomonia leptostyla* in the Crimean foot hills.: 4-I sezd genetikov i selektsionerov Ukrainy, Odessa. Tez. dokl. 4: 104- 108. Kiev, Ukrainian SSR.

Rezae, R., Vahdati, K.i Grigoorian, V. and Valizadeh, M. 2008. Walnut grafting success and bleeding rate as affected by different grafting methods and seedling vigour. Journal of Horticulture Science and Biotechnology, 83(1): 94-99.

Rezaee, R., Hassani, Gh, Hassani, D. and Vahdati, K. 2008. Morphological characteristics of some newly selected walnut genotypes from seedling collection of Kahriz-Orumia. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology. 9(3): 205-2014.

Rieuf, P. 1960. Organisms pathogenes et saprophytiques des plantea au Maros. Pathogenic and Saprophytic Organisms on Plants in Norocgo. Morocco Serv. De la Pech. Agron. Et de l'Enseign., Cahiers de la Rech. Agron. 9. 359pp.

Salahi, S. 2007. Study of genetic diversity in *Gnomonia leptostyla* causal agent of walnut anthracnose by PCR and evaluation of its distribution and survival in east Azarbaijan, Iran. M.Sc. Thesis, University of Tehran, Tehran, Iran. (In Persian with English abstract).

Salehi, S. and Jamshidi, S. 2009. Evaluation the reaction of different walnut varities to casual agent of walnut anthracnose *Gnomonia leptostyla*. Danesh Novin Keshavarzi, 5 (16): 55-61.

Salehi, S., Nikkhah, M.J., Zad, J. and Jamshidi, S. 2009. Study of germination of conidia, penetration, infection and extension of *Gnomonia leptostyla* on Persian walnut leaf. Short article of 18th congress of plant protection, Hamadan, Iran. P 72.P69.

Saremi, H. and Amiri, M.E. 2010. Evaluation of resistance to anthracnose (*Marssonina juglandis*) among diverse Iraninan clones of walnut (*Juglans regia* L.). Journal of Food, Agriculture and Environment, 8(2): 375-378.

Saremi, H., Razaz Hashemi, S.R. And Jafari, H. 2002. Study of anthracnose disease of walnut in North west of Iran. Journal of Agricultural Sciences and Natural resurces of Gorgan. 9: 141-153.

Seehalak, W., Moonsom, S., Metheenukul, P. and Tantasawat, P. 2011. Isolation of resistance gene analogs from grapevine resistant and susceptible to downy mildew and anthracnose. Scientia Horticulture, 128(3): 357-363.

Seifert, K.A., Morgan-Jones, G., Games, W. and Kendrick, B. 2011. The Genera of Hyphomycetes. CBS Biodiversity Series 9. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.

Şen, S.M. 2011. Ceviz: yetiştiriciliği, Besin değeri ve folklore. ÜÇM Yayıncılık, 220p.

Seta, S., Gonzalez, M. and Lori, G. 2003. First report of walnut canker caused by Fusarium incarnatum in Argentina. New Disease Reports, 8: 11.

Shawn, A.M. 1995. Classical and molecular approaches to breeding fruit and nut crops for disease resistance. HortScience 30: 466- 477.

Simonyan, S.A. 1981. [Mycoflora of Botanical Gardens and Arboreta in Armenia.]. Hayka, 232 pages.

Smith I.M., Dunez J., Lelliott R.A., Phillips D.H. and Archer S.A. 1988. European handbook of plant diseases. Blackwell Scientific Publications.

Sogonov, M.V., Castlebury, L.A., Rossman, A.Y., Mejia, L.C. and White, J.F. 2008. Leaf-inhabiting genera of the Gnomoniaceae, Diaporthales. Studies in Mycology, 62: 1-77.

Soriano, J.M., Vilanova, S., Romero, C., Liacer, G. and Badenes, M.L. 2005. Characterization and mapping of NBS–LRR resistance gene analogs in apricot (*Prunus armeniaca* L.). Theor Appl Genet, 110:980–989.

Spaulding, P. 1961. Foreign Diseases of Forest Trees of the World. U.S.D.A. Agric. Handb. 197: 1-361.

Staub, J.E., Gabert, A. and Wehner, T. 1996. Plant variety protection: a consideration of genetic relationships. Horticultural Science, 31:1086-1091.

Stoykow, D.Y. 2005. New records of Diaporthales in Bulgaria. I. Mycol. Balcan. 2:69-74.

Stoykow, D.Y. and Denchev, C.M. 2007. New records of non-lichenized ascomycetes from Mt. Strandzha in Turkey (south-eastern Europe). Mycol. Balcan. 4: 157-159.

Svarano, F.R. 2002. Structure, Function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic Rainforest. Annual Botany, 90(4): 517-524.

Ton, J. and Mauch-Mani, B. 2004. β-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. Plant Jurnal, 38: 119–130.

TÜİK, 2014. http://www.tuik.gov.tr/

TÜİK, 2017. http://www.tuik.gov.tr/

Tulecke, W. and McGranahan, G. 1994. The walnut germplasm collection of the University of California, Davis, A description of the collection and a history of the breeding program of Eugene F. Serr and Harold I. Forde, Genetic Resources Conservation Program, University of California, Davis, USA.

USDA, 2017. http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/

Uzunova, G., Perifanova-Nemska, M., Stojanova, M. and Gandev, St. 2015. Chemical composition of walnut oil from fruits on different years old branches. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 21(3): 494-497.

Vahdati, K., Pourtaklu, S.M., Karimi, R., Barzehkar, R., Amin, R., Mozaffari, M., *et al*. 2014. Genetic diversity and gene flow of some Persian walnut populations in southeast of Iran revealed by SSR markers. Plant Syst. Evol. 301 (2): 691-696.

Van der Linden, G., Wouters, D.C.A.E., Mihalka, V., Kochieva, E.Z., Smulders, M.J.M. and Vosman, B. 2004. Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. Theoretical and Applied Genetics, 109: 384-393.

Venkatachalam, M. and Sathe, S.K. 2006. Chemical Composition of Selected Edible Nut Seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 4705-4714.

Victory, E.R., Glaubitz, J.C., Rhodes, O.E. and Woeste, K.E. 2006. Genetic homogeneity in *Juglans nigra* (Juglandaceae) at nuclear microsatellites. Am J Bot. 93:118–126. doi: 10.3732/ajb.93.1.118.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Horness, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M. and Zabeu, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23(21): 4407-4414.

Wang, G.L., Ruan, D.L., Song, W.Y., Sideris, S., Chen, L., Pi, L.Y., Zhang, S., Zhang, Z., Fauquet, C. *et al*. 1998. "The rice disease resistance gene, Xa21D, encodes a receptor-like molecule with a LRR domain that determines race specific recognition and is subject to adaptive evolution". Plant Cell 10 (5): 765–779.doi:10.2307/3870663. PMC 144027. PMID 9596635.

Wang, C., Yang, X., Chen, D., Zhang, J. and Liu, G. 2005. DNA molecular markers in peanut II: RGA marker. Jouranl of Peanut Science, 34:5–7.

Wang, H., Pei, D., Gu, R., Wang, B., 2008. Genetic diversity and structure of walnut populations in central and southwestern China revealed by microsatellite markers. Journal of Horticultural Science, 133:197–203.

Wang, X., Zhao, M., Su, G. *et al*. 2014. The antioxidant activities and the xanthine oxidase inhibition effects of walnut (*Juglans regia* L.) fruit, stem and leaf. Internatiınal Juornal of Food Science and Technology, 50(1) DOI: 10.111/ijfs.12672

Wang, Z.H., Borromeo, E.S., Teng, P., Leung, H. and Zhu, Y.Y. 2000. Differentiation of rice varieties cultivated in Yunnan. China, using PCR markers corresponding to conserved motifs of disease resistance genes. Int Rice Res Notes 25:11–12.

White, T.J., Burns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. In: Innis, M. A. Gelfand, D H Sninsky, J. J, White, T. J. (eds), PCR protocols: a guide to methods and applications. MA Innis Academic Press, San Diego. CA. USA.

Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalsk, J.A. and Tingey, S.V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods Enzymology, 218: 704-740.

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.A. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Researches, 18(22): 6531-6535.

Witsenboer, H., Michelmore, R. and Vogel, J. 1998. Identification, genetic localization, and allelic diversity of selectively amplified microsatellite polymorphic loci in lettuce and wild relatives (*Lactuca* spp.). Genome, 40(6): 923-936.

Woeste, K.E., and Beineke, W.F. 2001. An efficient method for evaluating black walnut for resistance to walnut anthracnose in field plots and the identification of resistant genotypes. Plant Breeding, 120: 454-456.

Woeste, K., Burns, R., Rhodes, O. and Michler, C. 2002. Thirty polymorphic nuclear microsatellite loci from black walnut. Journal of Heredity, 93:58–60.

Woeste, K., Mc Granahan, G.H. and Bernatzky, R. 1996. Randomly amplified polymorphic DNA loci from a walnut backcross (*Juglans hindsii* X *J. regia*) *x J. regia.* Journal of American Society of Horticultural Science, 121: 358-361.

Woeste, K., McGranahan, G. and Bernatzky, R. 1996. The identification and characterization of a genetic marker linked to hypersensitivity to the cherry leafroll virus in walnut. Molecular Breeding, 2(3): 261-266. https://doi.org/10.1007/BF00564203

Woeste, K.E. and Beineke, W.F. 2001. An efficient method for evaluating black walnut for resistance to walnut anthracnose in field plots and the identification of resistant genotypes. Plant Breeding, 120: 454-456.

Xu, Q., Wen, X. and Deng, X. 2005. Isolation of TIR and nonTIR NBS–LRR resistance gene analogues and identification of molecular markers linked to a powdery mildew resistance locus in chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt). Theor Appl Genet, 111:819–830.

Yun, H.Y. and Harrington, T.C. 2011. First report of the Walnut witches'-Broom *Phytoplasma* on Japanese and Black Walnut in Iowa. Plant Disease, 95(11): p1474. http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0412

Zhang, L., Meakin, H. and Dickinson, M. 2003. "Isolation of genes expressed during compatible interactions between leaf rust (Puccinia triticina) and wheat using cDNA-AFLP". Mol. Plant Pathol. 4 (6): 469–77.doi:10.1046/j.1364-3703.2003.00192.x. PMID 20569406.

Zhuang, W.Y.Ed. 2005. Fungi of northwestern China. Mycotaxon, Ltd., Ithaca, NY, 430 pages.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Gülestan ilinde Gonbad-e-kavus şehrinde ve Daşlıburun ilçesinde doğdu ve ilk okul eğitimini Ikhlas ilköğretim okulunda, ortaokul eğitimini Allame Tabatabayi ortaokul okulunda, lise eğitimini Allame Jafari lisesinde ve ünversite hazırlık eğitimini Seyyed Ahmad lise Okulunda tamamladı. Ziraat Bilimleri ve Doğal Kaynakları Gorgan Üniversitesi Tarım Fakültesi ve Bitki Koruma Bölümü'nde 2007 yıllında mezun olarak lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl Eylül ayında Zabol Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı ve Fitopatoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans programına kabul olup 2010 yıllında mezun olarak tamamladı. Gorgan'nın Ziraat Bilimleri ve Doğal Kaynakları Araştırma Merkezinde 2012 yılına kadar Fitopatoloji araştırmacısı olarak görev almıştır.