

Türkiye'de *Populus nigra* Ağaçlarının Kanseri ve Kuruma Belirtisi Gösteren Dokularından Elde Edilen *Cytospora chrysosperma* ve *Chondrostereum purpureum*'un ITS ve LSU-rDNA Nükleotid Dizilerine Dayanarak Kesin Teşhisi*

**Sibel DERVİŞ^{1*}, Osman ÇİFTÇİ², Şahimerdan TÜRKÖLMEZ³,
Çiğdem ULUBAŞ SERÇE⁴**

^{1*} Mardin Artuklu University, Vocational School of Kızıltepe, Department of Plant and Animal Production, 47000 Mardin, Turkey

² Diyarbakır Plant Protection Research Station, Diyarbakır, Turkey

³ GAP Agricultural Research Institute, Paşabağı Mah. Recep Tayyip Erdoğan Bulvarı No:106 PK:75 63040 Haliliye, Şanlıurfa, Turkey

⁴ Niğde Ömer Halisdemir University, Ayhan Şahenk Faculty of Agricultural Science and Technologies, Plant Production and Technologies Department, 51240 Niğde, Turkey

Corresponding author e-mail: sibeldervis@gmail.com

Accepted by 21 December 2017

ÖZET

Malatya ili Doğanşehir ilçesinde 2016 yılında yapılan arazi çalışmaları sırasında gövde, dal kanseri ve kuruma belirtileri gösteren kavak (*Populus nigra*) ağaçlarından alınan örneklerden yapılan laboratuvar çalışmaları sonucunda piknidyum içeren kabukların altından ve odun dokularından sırasıyla *Cytospora chrysosperma* ve *Chondrostereum purpureum* izole edilmiştir. İlkbaharda, kavak ağaçlarının sürgünlerine, tamamen gelişmiş olan dördüncü yapraklarının koparılması sonucu ortaya çıkan yaralar üzerine, *C. chrysosperma* ve *C. purpureum* izolatları tarafından kolonize edilmiş agar disklerinin yerleştirilmesiyle inokülasyon yapılmıştır. İnokülasyondan üç ay sonra *C. chrysosperma* ve *C. purpureum* ile inokülasyon bölgesinde sırasıyla 6,4 ve 3,3 cm uzunluğunda kanserler oluşmuş ve sürgünler büzülmüştür. Benzer bir şekilde, serada gerçekleştirilen patojenite testlerinde, kabuk dokusunda oluşturulan yaraların bu izolatlar ile inokülasyonundan yaklaşık 14 gün sonra kanser oluşumu gerçekleşmiştir. Hastalanan bitkilerin dokularından yapılan izolasyonlarda *C. chrysosperma* ve *C. purpureum*'un tekrar izole edilmesi ile hastalık etmenlerinin bu funguslar olduğu doğrulanmıştır. Steril ortam diskleri ile inoküle edilen kontrol sürgünlerdeki yaralarda kanser oluşmamıştır. Her fungal türün temsili izolatından tüm DNA'nın izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen toplam DNA'lar, rDNA'nın internal transcribed spacer (ITS) ve large subunit (LSU) gen bölgeleri için sırasıyla ITS6/ITS4 ve NL1/NL4 primer çiftleri kullanılarak amplifiye edilmiş ve dizilenmiştir. BLAST analizleri sonucunda, daha önce Gen Bankası'nda kaydedilen birçok *C. chrysosperma* ve *C. purpureum* ITS ve LSU nükleotid dizisi ile %99 benzerlik göstermiştir. Bu diziler Gen Bankasına kaydedilmiştir. *C. chrysosperma* ve *C. purpureum*'nın ITS-rDNA için NCBI'dan verilen erişim numaraları sırasıyla MF536529 ve MF536531; LSU-rDNA için veriler erişim numaraları ise sırasıyla MF536530 ve MF536532'dir. Bu fungus etmenlerinin Türkiye'deki varlığı daha önce bildirilmekle birlikte bu çalışma, *C. chrysosperma* ve *C. purpureum*'un ITS ve LSU-rDNA nükleotid dizilerine dayanarak moleküler karakterizasyonlarının ilk raporudur.

Anahtar Kelimeler: Kavak, kanser, *Cytospora chrysosperma* ve *Chondrostereum purpureum*, PCR

* Bu çalışma, II. International Iğdır Symposium'unda sözlü bildiri olarak sunulmuş, ancak sadece kısa abstract olarak basılmıştır.

**ITS and LSU-rDNA Nucleotide Sequences Based Confirmation of *Cytospora chrysosperma* and
Chondrostereum purpureum from Symptomatic Cankered Tissues of *Populus nigra* Trees in Turkey**

ABSTRACT

The fungi *Cytospora chrysosperma* and *Chondrostereum purpureum* were isolated from inner bark with pycnidia and underlying wood tissues of infected poplar plants (*Populus nigra*) with symptoms of stem and branch canker and drying in Doğanşehir, Malatya, in 2016, respectively. Twigs of poplar trees were inoculated during their first season of growth by removing the fourth fully expanded leaves and placing agar plugs colonized by representative isolates of *C. chrysosperma* and *C. purpureum* over the resulting wounds. Three months after inoculation, cankers in 6.4 and 3.3 cm length formed by *C. chrysosperma* and *C. purpureum*, respectively, and twigs were girdled. Pathogenicity tests in a greenhouse experiment by wounds made into the bark tissue and inoculation with these isolates in a similar manner also resulted in canker formation in and around inoculated wounds 14 days after inoculation. Subsequent re-isolations of *C. chrysosperma* and *C. purpureum* confirmed that these fungi were the causal agents of the disease, and no cankers formed in wounds that received only sterile plugs. DNA was extracted from representative isolates of each fungal species. Extracted total DNAs were amplified from rDNA internal transcribed spacer (ITS) and the large subunit (LSU) gene regions using ITS6/ITS4 and NL1/NL4 primer pairs, respectively. The amplicons were sequenced directly. BLAST analysis of the provided sequences revealed 99% similarity with isolates of the ITS and LSU sequences of *C. chrysosperma* and *C. purpureum* deposited in GenBank. The sequences were submitted to NCBI GenBank. The accession numbers of *C. chrysosperma* and *C. purpureum* were MF536529 and MF536531 for ITS-rDNA; MF536530 and MF536532 for LSU-rDNA, respectively. Existence of these fungi in Turkey was previously reported. However, this is the first report of molecular characterization of *C. chrysosperma* and *C. purpureum* based on ITS and LSU-rDNA nucleotide sequences in Turkey.

Keywords: Poplar, canker, *Cytospora chrysosperma* ve *Chondrostereum purpureum*, PCR

GİRİŞ

Asya ve Avrupa arasında yer alan Türkiye, orman ağaçları çeşitliliği açısından çok önemli bir alandır. Ülkemizde en yaygın orman ağacı türleri meşe (%26,34), kızılçam (%25,11) ve karaçamdır (%19,0). Kavak ise, söğütgiller (Salicaceae) familyasından *Populus* cinsini oluşturan hemen bütün taksonları ağaç halinde bulunan, çok hızlı büyüme niteliklerine sahip ve ekonomik açıdan büyük önem taşıyan bir ağaç türüdür. Kavak bitkisi, tohumları çimlenme özelliklerini çabuk yitirdiği için vejetatif olarak çelik yoluyla çoğaltılan bir bitkidir (Tunçtaner, 2008). Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Orman Genel Müdürlüğü, 2015 yılı verilerine göre toplam 16.288 ha alanda (bunun 6.445 ha'ı normal kapalı alan yani ormanlık alan, 9.843 ha'ı boşluklu kapalı alan olmak üzere) kavak yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bu alan tüm ormanlık alanların %0,07'sini oluşturmaktadır. Kavak dikimi ve üretimi Türkiye'de hemen hemen her bölgede yapılmaktadır ve halkımızın çok uzun yıllardan beri uyguladığı yaygın bir odun ve kereste üretme işletmeciliğidir. Türkiye'de *P. alba* (akkavak), *P. euphratica* (fırat kavağı), *P. nigra* (karakavak), *P. tremula* (titrek kavak), *P. afghanica* (servi kavağı), *P. canescens* (boz kavak) olmak üzere altı tür (Anonim, 2017) doğal olarak yayılış gösterir. Buna karşın her bölgenin doğal koşullarına bağlı kavak çeşitliliği vardır. Karasal iklim şartlarına sahip Orta, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde geleneksel olarak yerli piramidal karakavak kültürleri yetiştirilmektedir. Kavak ve Hızlı Gelişen Orman Ağaçları Araştırma Enstitüsü (KAE) tarafından sürdürülen genetik seleksiyon çalışmaları sonucunda “Gazi (TR-56/52)”, “Anadolu (TR-56/75)”, “Behiçbey (TR-62/154)”, “Geyve (TR-67/1)” ve “Kocabey (TR-77/10)” isimleri verilen beş ayrı yerli karakavak klonu Türkiye Ulusal Kavak Komisyonu tarafından tescil edilmiştir (Tunçtaner, 2008; Birlir, 2009). Bu yerli karakavak klonları ile dikim materyali olarak fidan veya sırik çeliği yetiştirilmekte ve ağaçlandırmalar tesis edilmektedir.

Cytospora chrysosperma (Pers.:Fr.) Fr. 1818 (Ascomycetes, Diaporthales) [= *Valsa sordida* Nitschke] ve *Chondrostereum purpureum* (Pers.:Fr.) Pouzar 1959 (Basidiomycetes, Polyporales) kavak ağaçları ve diğer pekçok familya ve cinsteki ağaçta gövde ve dallarda kanser ve odun dokularında çürüklük yapabilen iki önemli fungusdur.

Türkiye’de, kavakçılığın gelişimini olumsuz yönde etkileyen *Cytospora* kanseri (*C. chrysosperma* “Pers” Fr.) ile ilgili bazı çalışmalar (Anonymous, 1994; Güler ve Can, 1994) ya patojenin gözlemlere dayalı teşhisi ya da literatüre dayalı bilgiler şeklinde verilmiştir. Aktaş ve Şimşek (2006) Çankırı Kenbağ Orman Fidanlığı başta olmak üzere Orta Anadolu kavak alanlarında *C. chrysosperma*’nın biyolojisini, virulansını, değişik kavak klonlarının etmene karşı duyarlılık durumlarını, bazı zararlı böceklerin populasyon seyri ile kavak kanseri arasındaki ilişkileri incelemek amacıyla yürüttükleri çalışmada, *C. chrysosperma*’nın piknitlerden spor salınım tarihleri ile *Paranthrene tabaniformis*’in uçuş periyotlarının tamamen örtüştüğünü belirlemiştir. *C. chrysosperma*’nın zarar oranı Ankara, Kırıkkale ve Çankırı’da yetiştirilen kavak ağaçlarında sırasıyla %13,93, 9,37 ve 15,91 olmuştur (Aktaş ve Şimşek, 2010). Bununla birlikte, dünya genelinde kavak yetişen alanlarda değişik *Cytospora* türlerinin kanser ve çökmeye neden olduğu rapor edilmiştir. ABD’nin Colorado eyaletinde *P. tremuloides* üzerinde yaygın olarak bulunan *C. chrysosperma*, *C. nivea*, *C. translucens* ve diğer bazı türlerden farklı olarak yeni bir tür olan *C. notastroma* sp. nov rapor edilmiştir (Kepley ve ark., 2015). Çin’de kavak kanserinin yaygın olarak *C. chrysosperma*, *Phomopsis macrospora* ve *Fusicoccum aesculi* tarafından neden olduğu bildirilmiştir (Ren ve ark., 2011). Çin’de kavak ve söğüt bitkilerinde gövde kanserleri ve geriye ölüm belirtileri gösteren bitkilerden *C. chrysosperma* (*Valsa sordida*’nın eşeysiz dönemi), *C. translucens* (*Leucostoma translucens*’nin eşeysiz dönemi), *C. fugax* (*Valsa salicina*’nın eşeysiz dönemi), *C. atrocirrhata* ve *C. kantschaveli* türleri tanımlanmıştır (Wang ve ark., 2015).

Türkiye’de *C. purpureum*’un kesilmiş kavak kütüklerinde bulunuşu Kayseri ili Sarız ilçesi (Atila ve Kaya, 2013) ve Karaman ili Bucakışla ilçesi (Bostanözü Köyü)’nden (Doğan ve Öztürk, 2006) rapor edilmiştir. Ayrıca bu etmenin Malatya’da yetiştirilen kayısı ağaçlarının yapraklarında gümüş yaprak hastalığına neden olduğu bildirilmiştir (Özgönen ve ark., 2006). Doğu Anadolu Bölgesi’nde sert çekirdekli *Prunus* spp. ağaçlarında 2003 ve 2004 yıllarında yapılan sörveylerde belirti gösteren ağaçlarda *Cytospora* spp. ve *C. purpureum* etmenleri tanımlanan patojenler arasında yer almıştır (Sipahioğlu ve ark., 2006).

Chondrostereum purpureum odun dokusu içinde ya da üzerinde yaşayan, Basidiomycota şubesine ait bir fungus olup ılıman bölgelerde dağılmıştır. Geniş yapraklı ağaç türlerine karşı geniş spektrumlu bir fakültatif saprofittir; budama, kesme, rüzgar zararı ve don çatlakları gibi etkenlerin yarattığı taze yaralanmış dokularda birincil istilacıdır (Rayner ve Boddy, 1986). Bu fungus, tüm dünyadaki odunsu bitki örtüsü için biyolojik bir kontrol maddesi olarak kullanılır. *C. purpureum* miselyumu, biyolojik kontrol maddesi olarak kullanılmak üzere ABD ve Kanada’da "Chontrol Paste" adı altında kayıtlıdır ve pek çok sert ağaç türünün kütüklerinin yok edilmesi ve yeniden filizlenmesini engellemek için test edilmiştir. Kütüklerin *C. purpureum* ile muamele edilmesi, kırmızı kızılâğaç (*Alnus rubra*) başta olmak üzere birçok türdeki ağaç kütüğünün yeniden filizlenmesini engellemiştir. *C. purpureum*, elma, armut, erik, kiraz ve diğer meyve ağaçlarında gümüş yaprak hastalığının etken maddesi olarak da bilinir (Brooks ve Moore, 1926). Fungusun miselyumları ksilem damarlarını tıkarken yapraklara su vb. aktarımını engellediğinde hastalığın belirtileri ortaya çıkar (Setliff ve Wade, 1973; Bishop, 1979). Enfeksiyon sonucunda yaprak epidermisi palisadik parenkimden ayrılır ve bu tabakalar arasındaki hava boşluğu yapraklara "gümüşümsü" bir görünüm kazandırır. *C. purpureum* tarafından salınan pektinaz enzimleri de gümüş yaprak belirtilerine katkıda bulunabilir. *C. purpureum* ayrıca sterpuran seskiterpenler üretir. Sterpurik asit, sterepolid ve dihidrosterepolid gibi birçok sterpuranın yaprak sararması gibi toksite belirtilerine neden olduğu bildirilmiştir.

Malatya ilinde kavak yaygın olarak bulunmaktadır. Bu bölgede kavak yetiştiricilerinden gelen yaygın hastalık şikâyetleri üzerine bu çalışma, araştırmamız kapsamına alınmıştır. Mevcut çalışma ile Malatya ilinde yetiştirilen, kanser ve odun çürüklüğü belirtileri gösteren kavak ağaçlarından izole edilen patojenlerin moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlanması hedeflenmiştir. Bu araştırmada, fungal taksonomide yaygın olarak kullanılan, nüklear ribozomal RNA (rRNA) gen kompleksi olan Internal Transcribed Spacer (ITS) ve Large Subunit (LSU) gen bölgeleri kullanılmıştır. ITS bölgeleri ökaryot canlılarda rRNA’ların küçük ve büyük alt ünitelerini ayırır, hızlı bir evrim gösterir ve fungusların cins ve bazen tür seviyesinde tanımlanmasına olanak verir. ITS bölgeleri olan kısmi 18S rRNA, ITS1, 5,8S, ITS2 ve kısmi 26S rRNA bölgelerinin içeren nükleotid dizileri fungus teşhisi ve taksonomisinde barkod olarak seçilmiştir (Schoch ve ark., 2012). ITS bölgelerinin tek başına güvenilir bir barkod olması konusunda çok az tartışma vardır. Ancak, ITS bölgeleri çok değişkendir ve kullanıcı tarafından üretilen

TÜRKİYE'DE *POPULUS NİGRA* AĞAÇLARININ KANSER VE KURUMA BELİRTİSİ GÖSTEREN
DOKULARINDAN ELDE EDİLEN *CYTOSPORA CHRYSOSPERMA* VE *CHONDROSTEREUM*
PURPUREUM'UN ITS VE LSU-RDNA NÜKLEOTİD DİZİLERİNE DAYANARAK KESİN TEŞHİSİ

çelişkileri en aza indirmek için, ITS dizi verileri analizlerinde büyük özen gösterilmelidir (Nilsson ve ark., 2012). Bu nedenle, ITS bölgeleri verilerinin yanısıra başka bir gen bölgesinin de tanılama ve taksonomik çalışmalara dâhil edilmesi kabul görmektedir. Dolayısı ile ITS bölgelerinin dizi verileri ile birlikte LSU bölgesinin de verileri de elde edilerek tanılama yapılmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışma alanı ve örnekleme

Malatya ilinde Orman İşletme Müdürlüğü çalışanları tarafından gösterilen, kavaklarda yaygın olarak kurumaların hakim olduğu alanlardaki kavak ağaçları bitki örneklerini oluşturmuştur. Bu alandan örnekleme gövde ve dallarında kanser veya odun çürüklüğü belirtileri gösteren kavak ağaçlarından yapılmıştır. Sörvey ve izolasyon çalışmaları 2016 yılında; patojenite testleri ve moleküler analizler 2017 yılında yürütülmüştür.

İzolasyon

Kavak ağaçlarının piknidyum içeren kabuklarının altından ve bitkilerinin odun dokularından izolasyonlar yapılmıştır. Nekrotik doku parçaları alınarak 3-5 mm boyda parçalara ayrılmış yüzeysel sterilizasyondan sonra patates dekstroz agar (PDA) ve havuç rende agar (HRA) ortamına ekilmişlerdir. Fungal kolonilerin gelişen hif uçlarından küçük parçalar alınarak PDA ortamına aktarılmış ve saflaştırılmışlardır. Kültürler 20°C'de, karanlıkta inkübe edilmiş ve 2-8 gün aralıkla, 30 gün süreyle kültürel ve morfolojik özelliklerine göre incelenmişlerdir. *C. chrysoesperma*'nın morfolojik teşhisi stromatik dokular, locular boyutlar, şekil ve düzenlenmeleri, konidi oluşumu ve konidioma'nın spor özelliklerine ve koloni morfolojisine göre yapılmıştır (Adams ve ark., 2005). *C. purpureum* izolatlarının tanıları ise clump-connection yani hiflerde kanca oluşumu varlığı veya yokluğu ve koloni morfolojisine göre yapılmıştır (Schreiner, 1931; Boddy ve Rayner, 1982).

Patojenite testleri

Patojenite testlerinde, arazi şartlarındaki inokülasyonları, 6 yaşındaki karakavak (*Populus nigra*) ağaçlarının gövdelerindeki yeni sürgünlerin (her izolat için 10 adet sürgün) tamamen gelişmiş olan dördüncü yapraklarının koparılması sonucu ortaya çıkan yaralar üzerine *C. chrysoesperma* ve *C. purpureum*'un birer adet temsilci izolatu tarafından kolonize edilmiş agar disklerinin yerleştirilmesiyle yapılmıştır. İnokülasyondan üç ay sonra ağaçlar kontrol edilmiş ve oluşan lezyon boyları ölçülmüştür. Benzer bir şekilde, serada gerçekleştirilen patojenite testlerinde, bir yaşındaki Gazi (TR-56/52) karakavak klonu (*Populus nigra*) fidanları (her izolat için 5 adet fidan) gövde inokülasyon tekniği ile inoküle edilmiştir. Bu fidanlar, tüplü olarak hastalık içermeyen orman fidanlıklarından temin edilmiştir. *C. chrysoesperma* inokülasyonlarında fidan gövdelerindeki kabuk dokusunda ve *C. purpureum* için ise bir bistüri ile ksileme ulaşacak kadar derinlikte oluşturulan 1 cm çaplı yaralar üzerine 14 günlük PDA kültürlerinin kenarlarından alınan aynı çapta kültür diskleri yerleştirilmiştir. Daha sonra kabuklar kültürlerin üzerine kapatılmıştır. İnokülasyon yerleri nemlendirilmiş steril pamukla sarılmış, üzeri streç film ile kapatılmıştır. İnoküle edilen karakavak fidanları, 24°C'de, %80 nispi nemde muhafaza edilmiştir. Kontrol sürgün ve fidanlar üzerinde oluşturulan yaralara steril PDA diskleri konmuştur. İnokülasyondan 2 hafta sonra fidanlar kontrol edilmiş ve gözle görülebilen lezyonlar ölçülmüştür. Lezyon kenarlarından, inoküle edilen *C. chrysoesperma* ve *C. purpureum* yeniden izolasyonları PDA ortamında yapılmış ve gelişen koloniler incelenmiştir.

Moleküler analizler

Her fungal türün temsili izolatından tüm DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonu amacıyla 100 mg miselia sıvı azot yardımı ile toz haline getirilmiş ve DNA pürifikasyon kiti (Qiagen DNeasy Plant Mini Kit, GeneMark Technology Co., Valencia, CA, Catalogue no. 69104) ile firmanın önerileri doğrultusunda izole edilmiştir. İzole edilen DNA'lerden, rDNA'nın internal transcribed spacer yani tekrarlanan (ITS) ve large subunit yani büyük alt birim (LSU) gen bölgeleri için sırasıyla ITS6/ITS4 (Cooke ve ark., 2000) ve NL1/NL4 (O'Donnell, 1993) primer çiftleri kullanılarak amplifiye edilmiştir. ITS rDNA amplifikasyonu 94 °C de 3 dak; 35 döngü 94 °C

de 30 s, 55 °C de 45 s, ve 72 °C de 1 dak; sonra 72 °C de 10 dak. şeklinde uygulanmıştır. LSU rDNA amplifikasyonu 94 °C de 3 dak; 40 döngü 94 °C de 30 s, 60 °C de 45 s, ve 72 °C de 1 dak; sonra 72 °C de 10 dak şeklinde uygulanmıştır.

Elde edilen amplikonlar DNA dizileme yapan firmaya gönderilerek (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Bitki Koruma Bölümü) doğrudan, her iki uçtan DNA dizileme yapılmıştır. Elde edilen DNA dizilerinden her iki yönden dizilenen nükleik asitlerin birleştirilmesi, primer dizilerinin temizlenmesi işlemlerinden sonra NCBI'nin BLAST aracı ile analiz edilmiştir.

BULGULAR

Arazi gözlemleri ve izolatlar

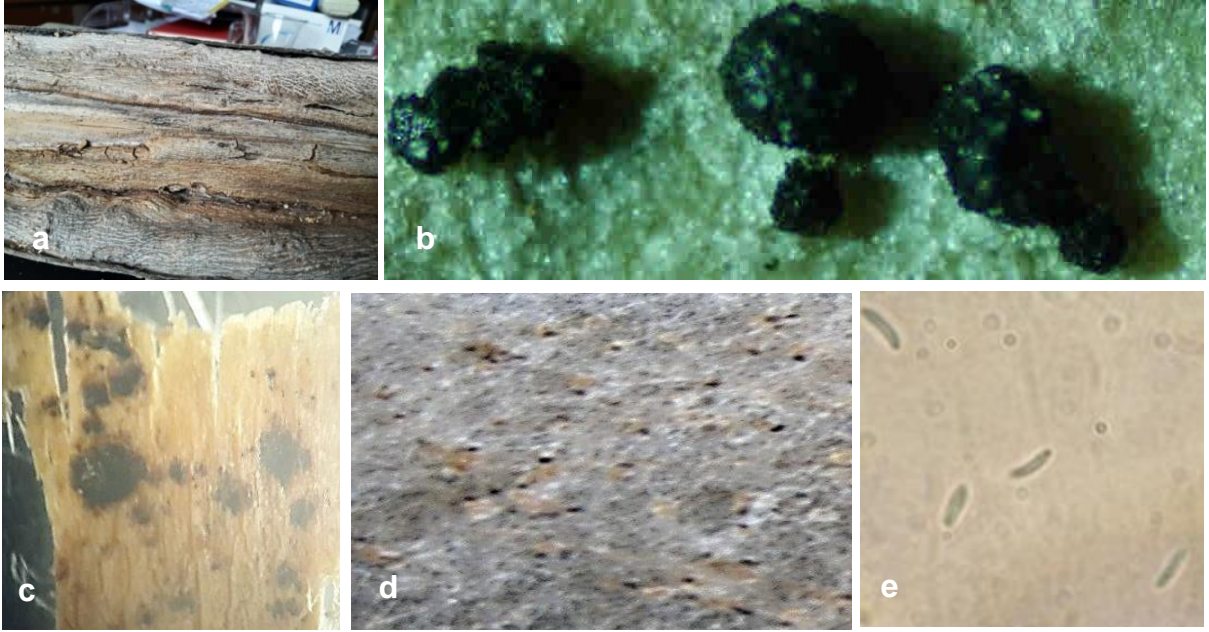
Malatya ili Doğanşehir ilçesinde kavak (*Populus nigra*) ağaçlarının gövde ve dallarında kanser belirtileri (Şekil 1a) gözlenmiştir. Bu ağaçların dallarının sarımsı kahverengine döndüğü, hafif olarak içe çöküp kambiyuma yapıştığı ve ölü kabuklarının üzerinde ise stereo-mikroskopla yapılan incelemede çok sayıda koyu renkli, toplu iğne başı büyüklüğünde piknidyum (multilokullar yapıda stroma) geliştiği (Şekil 1b) saptanmıştır. Bu dalların kabuklarının altındaki siyahlaşmış lezyonlardan yapılan izolasyonlarda (Şekil 1c) 14 adet *Cytospora chrysosperma* izolatu (Cc1-Cc14) elde edilmiştir. İlerleyen dönemlerde bu dallar üzerinde kıvrımlı iplikçikler halinde turuncu-kahverengi cirrus da gözlenmiştir. İzolasyon sonucu gelişen koloniler önce beyaz bir hafta sonra ise aynı şekilde beyaz veya soluk sarımsı bir renkte olmuştur. Dört hafta içerisinde PDA kültürlerinde piknidyumlar rastgele bir düzende gelişmiş (Şekil 1d), gelişen piknidyumlar ortalama 700 µm ($n = 20$) çapında olmuştur. Sporlar renksiz, bir hücreli, hafif kıvrık ve 1×6 µm ($n = 20$) boyutlarında olmuştur (Şekil 1e). Diğer izolatlara göre hızlı gelişim gösteren Cc5 izolatu patojenisite testlerinde ve moleküler analizlerde kullanmak için seçilmiştir.

Aynı ilçede kavak bitkilerinde yukarıda bahsedilen belirtilerden başka, odun dokusunda renk değişikliği, çürüme ve bazen ölüm belirtileri gözlenmiştir. Gelişme geriliği gösteren bitkilerin kahverengi kırmızımsıya dönmüş odun dokularından (Şekil 2 a, b, c) krem renginde ve bol havai miselyumlu (Şekil 2d) 10 adet *Chondrostereum purpureum* izolatu (Cp1-Cp10) elde edilmiştir. Bu izolatlarda clump-connection oluşmamış ve homokaryotik (Schreiner, 1931; Boddy ve Rayner, 1982; Eriksson ve Ryvander, 1976) olarak gruplandırılmıştır (Şekil 2e). Civardaki kavak bitkilerinin odun dokularında daha sonra etmenin resupinate yani ters basidiokarplarına da rastlanmıştır. Bu basidiokarplarda hymenium düz ve kahverengimsi menekşe renginde (Şekil 2f), üreme organlarının üst tarafı ise düz ve kremi beyaz renkte olmuştur (Şekil 2g). Basidiokarpın bir parçasının PDA'ya ekilmesiyle elde edilen izolatların hiflerinde clump-connection yani kanca oluşumuna rastlanmış ve ana hiften 45 derecelik dalların oluştuğu gözlenmiştir. PDA'da crustose yani kabarık olmayan yapıda gelişen bu izolatlar heterokaryotik olarak gruplandırılmıştır (Boddy ve Rayner, 1982). Kültürde oluşan bu heterokaryotik yapı bu izolatlardan birden fazla basidiospor izolatu olduğunu göstermiştir. Odun dokusundaki lezyonlardan izole edilen homokaryotik bir izolat (Cp3) oldukça hızlı geliştiği için patojenisite testlerinde ve moleküler analizlerde kullanılmak üzere seçilmiştir.

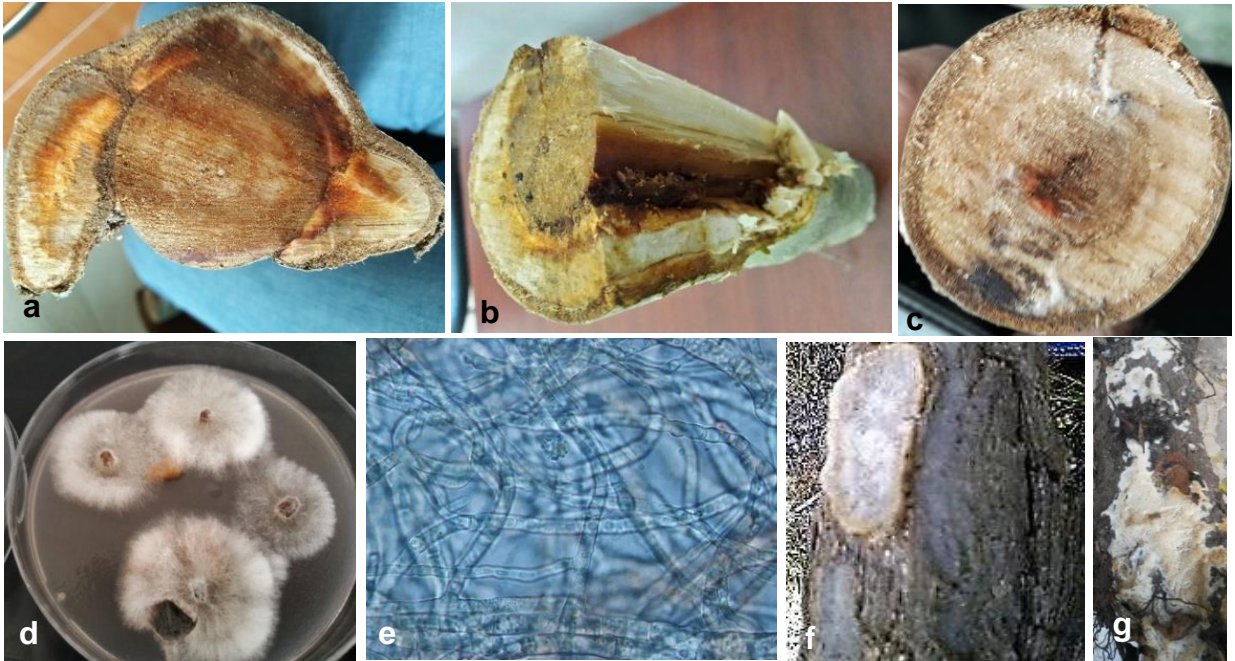
Patojenite testleri

Kavak ağaçlarının sürgünleri üzerinde açılan yaralar üzerine *C. chrysosperma* ve *C. purpureum* diskleri ile yapılan inokulasyonlardan üç ay sonra sırasıyla ortalama 6,4 ve 3,3 cm uzunluğunda kanser lekeleri ve çökük alanlar oluşmuş ve sürgünleri büzştürmüştür. Benzer bir şekilde kabuk dokusunda oluşturulan yaralar ve *C. chrysosperma* ve *C. purpureum* izolatlarının yara yerlerine inokulasyonu ile bir serada gerçekleştirilen patojenite testleri de inokulasyondan yaklaşık 14 gün sonra sırasıyla ortalama 13,2 ve 4,5 cm uzunluğunda kanser lezyonları oluşumu ile sonuçlanmıştır. *C. chrysosperma* ve *C. purpureum*'un bu dokulardan yeniden izolasyonu, hastalık etmenlerinin bu funguslar olduğunu doğrulamıştır. Steril ortam diskleri ile inokule edilen yaralarda kanser oluşmamıştır.

TÜRKİYE'DE *POPULUS NİGRA* AĞAÇLARININ KANSER VE KURUMA BELİRTİSİ GÖSTEREN DOKULARINDAN ELDE EDİLEN *CYTOSPORA CHRYSOSPERMA* VE *CHONDROSTEREUM PURPUREUM*'UN ITS VE LSU-RDNA NÜKLEOTİD DİZİLERİNE DAYANARAK KESİN TEŞHİSİ



Şekil 1. *Cytospora chrysosperma* tarafından oluşturulan eski kanser yaraları (a) ve bu dokularda kabuk altında görülen multilokullar yapıda stromalar (b) *C. chrysosperma*'nın izole edildiği iç kabuk dokuları (c), PDA ortamında 30 gün sonra piknidyum içeren koloni gelişimi (d) ve konidileri (e)



Şekil 2. Değişik kavak gövdelerinde *Chondrostereum purpureum* tarafından oluşturulan odun çürüklüğü (a, b, c) *C. purpureum*'un havuç rende agarda gelişen kolonileri (d) homokaryotik hifleri (e) arazi sörveylerinde kavak gövdelerinde rastlanan resupinate basidiokarpları (f) ve kesik odun dokuları üzerinde gelişen sporoforlarının üst tarafı (g)

Moleküler analizler

Mikroskopik gözlemlerle teşhisi yapılan iki fungus izolatının (85 ve 86 nolu izolatlar) ITS ve LSU bölgelerinin dizilenmesi sonucu 85 nolu izolatın ITS bölgelerinden 617 nt, LSU bölgesinden 570 nt; 86 nolu izolatın ITS bölgelerinden 703 nt, LSU bölgesinden 289 nt nükleotid dizisi elde edilmiştir. Bu dizilerin NCBI BLAST analizi yapıldığında 85 nolu izolatın ITS bölgelerine ait nükleotid dizileri *C. chrysosperma* izolatları ile %99 (erişim no: FJ478099) benzerlik göstermiştir. Aynı şekilde, izolatın LSU bölgesine ait nükleotid dizileri de *C. chrysosperma* izolatları ile %99 (erişim no: FJ755274) benzerlikte olmuştur. BLAST analizlerinde, 86 nolu izolatın ITS ve LSU bölgelerine ait nükleotid dizileri *C. purpureum* izolatları ile %99 (erişim no: KR264909) benzerlik göstermiştir. Bu nükleotid dizileri Gen Bankasına kaydedilmiştir. *C. chrysosperma* ve *C. purpureum*'nın ITS-rDNA için NCBI'dan verilen erişim numaraları sırasıyla MF536529 ve MF536531; LSU-rDNA için veriler erişim numaraları ise sırasıyla MF536530 ve MF536532 olmuştur.

TARTIŞMA

Araştırma kapsamında kavaklarda tespit edilen bu fungus türleri Türkiye'de kavak ağaçlarında bulunduğu daha önce rapor edilmiştir (Aktaş ve Şimşek, 2006, 2010; Doğan ve Öztürk, 2006; Atila ve Kaya, 2013). Bununla birlikte bu çalışma, Doğu Anadolu Bölgesinde kavak ağaçlarında *C. chrysosperma* ve *C. purpureum*'un bulunuşunun ilk raporudur. Ayrıca bu çalışma Türkiye'de *C. chrysosperma* ve *C. purpureum*'un ITS ve LSU-rDNA nükleotid dizilerine dayanarak moleküler karakterizasyonlarının ilk raporudur.

Cytospora chrysosperma *Cytospora*'nın tip türüdür ve konukçu bitkileri genellikle *Salix*, *Populus*, *Castanea*, *Morus* ve *Ulmus* ağaçlarıdır (Deng, 1963; Tai, 1979; Wei, 1979; Chen, 2002; Zhuang, 2005). Colorado'da *Populus tremuloides* üzerinde yaygın olarak bulunan *C. chrysosperma*, *C. nivea*, *C. translucens* ve diğer bazı türlerden farklı olarak yeni bir tür, *Cytospora notastroma* sp. nov., rapor edilmiştir (Kepley ve ark., 2015). Çin'de kavak kanserinin yaygın olarak *Cytospora chrysosperma*, *Phomopsis macrospora* ve *Fusicoccum aesculi* tarafından neden olduğu bildirilmiştir (Ren ve ark., 2011). Ayrıca, Çin'de kavak ve söğüt bitkilerinde gövde kanserleri ve geriye ölüm belirtileri gösteren bitkilerden *C. chrysosperma* (*Valsa sordida*'nın eşeysiz dönemi), *C. translucens* (*Leucostoma translucens*'nin eşeysiz dönemi), *C. fugax* (*V. salicina*'nin eşeysiz dönemi), *C. atrocirrhatta* ve *C. kantschaveli* türleri tanımlanmıştır (Wang ve ark., 2015). İsrail'de *Populus alba* L. kavak türlerinin yetişkin ağaçlarında ölüm belirtileri gösteren ağaçların dallarından *C. chrysosperma* (Pers.:Fr.) Fr. izole edilmiştir (Madar ve ark., 2004). Bütün bu çalışmalarda *Cytospora*'nın tür düzeyinde morfolojik karakterizasyonunun oldukça zor olduğu ve tür teşhisinin moleküler çalışmalarla desteklenmesi gerektiği vurgulanmıştır. Mevcut çalışmamızda da kavak ağaçları üzerinde *Cytospora* kanserine neden olan türün *C. chrysosperma* olduğu moleküler çalışmalarla kesinleştirilmiştir. Sipahioğlu ve ark. (2006), Doğu Anadolu Bölgesi'nde 2003 ve 2004 yıllarında Haziran-Kasım ayları arasında sert çekirdekli ağaçlarda yaptıkları sörveylerde kayısı ağaçlarında pek çok fungal tür yanında *Cytospora* spp. de izole ettiklerini rapor etmişlerdir. Malatya ili kavak ağaçlarında *C. chrysosperma*'nın bulunuşu Malatya'nın simgesi haline gelmiş kayısı ağaçları için patojenin ciddi bir sorun haline dönüşebileceğini göstermektedir.

C. purpureum geniş yapraklı ağaçlar, meyve ve süs ağaçları ve iğne yapraklı ağaçların odun dokularındaki taze yaraları saprofit olarak istila edebilir, ancak sağlıklı kozalaklı ağaçlarda hastalığa neden olduğu bildirilmemiştir (Etheridge ve Morin, 1963). Betulaceae familyasından huş ağacında (*Betula* L.), kavak (*Populus* L.) ve kızılgağaçda (*Alnus* Mill) patojen olduğu bildirilmiştir (Kaupilla ve Niemelä, 1986; Setliff, 2002; Ryvander, 1971). Geniş konukçu dizisine rağmen sadece ksilemdeki taze yaraları istila edebilen bir zayıflık patojeni olduğundan etkisi sınırlıdır. Yalnızca ciddi derecede zayıflamış ağaçları öldürebilirler. Sağlıklı ağaçlar fungal infeksiyonu antifungal metabolitlerle (fitoaleksinler) ve enfekte dokuları ayırarak engelleyebilirler. Fungus ancak saprofit olarak yaşayabildiği için daha yüksek bir virulense karşı daha az seleksiyon baskısı veya daha az konukçuya özelleşme

TÜRKİYE'DE *POPULUS NİGRA* AĞAÇLARININ KANSER VE KURUMA BELİRTİSİ GÖSTEREN
DOKULARINDAN ELDE EDİLEN *CYTOSPORA CHRYSOSPERMA* VE *CHONDROSTEREUM*
PURPUREUM'UN ITS VE LSU-RDNA NÜKLEOTİD DİZİLERİNE DAYANARAK KESİN TEŞHİSİ

vardır. Kısaca konukçu ağaç ölse bile *C. purpureum*, daha rekabetçi saprofitik türlerle değiştirilene kadar ölü dokularda üreme organlarını oluşturmaya devam edebilir.

C. purpureum ölmüş odun dokularında üretilen basidiocarp veya sporoforlardan çok sayıda basidiospor üretimiyle etrafa yayılır (Dye, 1974). Sporoforlar, dört adet basidiosporu oluşturan haploid çekirdeklerin füzyonundan sonra çok sayıda terminal dikaryotik hücrenin büyüyerek basidyumları oluşturmak üzere genişlemesiyle oluşur. Uygun koşullar altında, *C. purpureum* genellikle infeksiyondan iki yıl sonra üreme organları üretir (Wall, 1997) ve sporlar birkaç ay içerisinde serbest bırakılır (Dye, 1974). Yağış ve nispi nem, sporofor oluşumunda ve basidiospor salınımında temel faktörlerdir (Dye, 1974; Spiers, 1985, Spiers ve Hopcroft, 1988a). Havadaki basidiosporlar, muhtemelen kuruma ve ultraviyole (UV) radyasyona hassasiyet nedeniyle kısa ömürlüdür (<5h) (Grosclaude, 1969). Bununla birlikte, sporlar nemli yaralı bir yüzeye ulaşırlarsa çimlenebilir ve hifleri bitki dokularında hücreler içi ve hücreler arası gelişebilirler (Spiers ve Hopcroft, 1988b). Sporoforlar, sadece serbest suya daldırıldıktan sonra veya %75'den fazla nem içeriğine sahip bir substrat üzerinde yetiştirildiklerinde spor üretirler. Bu da yağmuru, spor yayılımını düzenleyen en önemli çevresel faktör haline getirir. Sporülasyonun optimum olarak ıslak koşullarda (>%90 nispi nem) ve 20°C'nin altında olduğu rapor edilmiştir. Sporlar 24 saat içinde 17,5-28°C'de ve >%75 su içeriğinde optimal şekilde çimlenmektedir; ancak 5°C'de de yüksek çimlenme oranı kaydedilmiştir. Spor üreten basidiocarpların, 12 aylık dehidrasyona rağmen canlılığını koruduğu ve 6-8 saatlik rehidrasyonla basidiospor üretimine devam edebileceği bildirilmiştir (Spiers ve Hopcroft, 1985).

Malatya koşullarında *C. chrysosperma* infeksiyonlarının konukçu duyarlılığını arttıran iklimsel koşullar (sıcaklık ve yağış), çeşit duyarlılığı ve patojenlerin virülensliğiyle teşvik edildiğini düşünülmektedir. *C. purpureum* sadece ksilemdaki taze yaraları istila edebilen bir zayıflık patojeni olduğundan ve yalnızca ciddi derecede tehlikeye düşmüş ağaçları öldürebilen bir fungus olduğundan, ağaçların sağlıklı tutulması, kültürel bakım işlemlerinin bitkiye zarar vermeyecek şekilde sürdürülmesi ve ağaçların odun dokusunda zarar verebilecek arthropod böceklerle karşı korunması önerilebilir. Aynı tedbirler *C. chrysosperma* için de etkili olacaktır. Ayrıca ülkemizde kavakta sorun olan bu patojenlere karşı dayanıklı çeşitler geliştirmek amacıyla kavak germplasm koleksiyonları seçilmeli ve bunlardan dayanıklı olanları ıslah çalışmaları için ebeveyn olarak kullanılmalıdır. Hibrid generasyonların da test edilmesi sonucunda çok sayıda kaliteli ve dayanıklı çeşit ortaya çıkabileceği düşünülmektedir.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Adams, G.C., Wingfield, M.J., Common, R., Roux, J. 2005. Phylogenetic relationships and morphology of *Cytospora* species and related teleomorphs (*Ascomycota*, *Diaporthales*, *Valsaceae*) from *Eucalyptus*. *Studies in Mycology* 52: 1–144.
- Aktaş, H., Şimşek, Z. 2010. Distribution and damage of *Cytospora chrysosperma* "Pers" Fr. and important wood-boring insects [*Melanophila picta* (Pall.), *Paranthrene tabaniformis* (Rott.)] in Central Anatolia Region. *Türk Entomol Derg* 34: 117-130.
- Aktaş, H., Şimşek, Z. 2006. Orta Anadolu Bölgesi önemli kavak alanlarında *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. hastalığının yayılışı, biyolojisi, çeşit reaksiyonları, zararlı böceklerle ilişkileri ve mücadelesi üzerinde araştırmalar. TÜBİTAK TOGTAG-3140 nolu Proje Kesin Raporu.
- Anonim, 2017. <http://www.bizimbitkiler.org.tr/v2/hiyerarsi.php?c=Populus>
- Anonymous, 1994. Türkiye'de kavakçılık. T.C. Orman Bak., Kavak ve Hızlı Gelişen Tür Orman Ağaçları Araşt. Md., İzmit, 224s.
- Atila, O.Y., Kaya, A. 2013. Macromycetes of Sarız (Kayseri/Turkey) district. *Biological Diversity and Conservation* 6: 50-54.
- Birler, A.S. 2009. Endüstriyel Orman Ağaçlandırmaları. Düzce Orman Fakültesi Yayın No 4. (ENAT A.Ş. Yayını), İstanbul.
- Bishop, G.C. 1979. Infection of cherry trees and production of a toxin that causes foliar silvering by different isolates of *Chondrostereum purpureum*. *Aust J Agr Res* 30: 659–665.
- Boddy, L. Rayner, A.D.M. 1982. Population structure, inter-mycelial interactions and infection biology of *Stereum gusapatum*. *Trans Brit Mycol Soc* 78: 337-351.
- Brooks, F.T., Moore, W.C. 1926. Silver-leaf disease. *J Pomol and Hort Sci* 5: 11–97.

- Chen, M.M. 2002. Forest fungi phytogeography: forest fungi phytogeography of China, North America, and Siberia and international quarantine of tree pathogens. Sacramento, California, USA.
- Cooke, D.E.L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G., Brasier, C.M. (2000) A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genet Biol* 30: 17-32.
- Deng, S.Q. 1963. Fungi of China. Beijing, China.
- Doğan, H.H., Öztürk, C. 2006. Macrofungi and their distribution in Karaman Province, Turkey. *Turk J Bot* 30: 193-207.
- Dye, M.H. 1974. Basidiocarp development and spore release by *Stereum purpureum* in the field. *N Z J Agric Res* 17: 93–100.
- Eriksson, R., Ryvander, L. 1976. The Corticiaceae of North Europe 2. *Fungifl ora*, Oslo, pp. 235–237.
- Etheridge, D.E., Morin, L.A. 1963. Colonization by decay fungi of living and dead stems of balsam fir following artificial injury. *Can J Bot* 41: 1532–1534.
- Güler, N., Can, P. 1994. Orta ve Güneydoğu Anadolu’da kullanılan kavak klonlarında görülen zararlılar. T.C. Orman Bak., Kavak Ve Hızlı Gelişen Tür Orman Ağaçları Araşt. Md. İzmit, 24S.
- Kaupilla, P., Niemelä, T. 1986. *Nahkamaisia lahopuiden sieninä*. *Sienilehti* 38: 5–20 (in Finnish).
- Kepley, J.B., Reeves, F.B., Jacobi, W.R., Adams, G.C. 2015. Species associated with cytospora canker on *Populus tremuloides*. *Mycotaxon* 130: 783-805.
- Madar, Z., Solel, Z., Kimchi, M. 2004. First report of Cytospora canker caused by *Cytospora chrysosperma* on white poplar in Israel. *Plant Disease* 88: 220-220.
- O’Donnell, K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. In *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*, pp. 225–233. Edited by D. R. Reynolds & J. W. Taylor. Wallingford, UK: CAB International.
- Özgönen, H., Erkiş, A., Koç, G., Baloğlu, S. 2006. First report of *Chondrostereum purpureum* causing silverleaf disease of apricot (*Prunus armeniaca*) in Malatya, Turkey. *N Z J Crop Hortic Sci* 34: 357.
- Rayner, A.D.M., Boddy, L. 1986. Population structure and the infection biology of wood-decay fungi in living trees. *Adv Plant Pathol* 5: 119–160.
- Ren, J.H., Ye, J.R., Liu, H., Xu, X.L., Wu, X.Q. 2011 Isolation and characterization of a new *Burkholderia pyrrocinia* strain JK-SH007 as a potential biocontrol agent. *World J Microbiol Biotechnol* 27: 2203-2215.
- Ryvander, L. 1971. The genera *Stereum* (*s. lato*) and *Hymenochaete* in Norway. *Norw J Bot* 18: 97–108.
- Schreiner, E.J. 1931. Two species of *Valsa* causing disease in *Populus*. *Am J Bot* 18: 1-29,
- Setliff, E.C. 2002. The wound pathogen *Chondrostereum purpureum*, its history and incidence on trees in North America. *Aust J Bot* 50: 645–651.
- Setliff, E.C., Wade, E.K. 1973. *Stereum purpureum* associated with sudden decline and death of apple trees in Wisconsin. *Plant Dis Rep* 57: 473–474.
- Sipahioğlu, H.M., Demir, S., Myrta, A., Al Rwahnih, M., Polat, B. 2006. Viroid, phytoplasma, and fungal diseases of stone fruit in eastern Anatolia, Turkey. *N Z J Crop Hortic Sci* 34: 1-6.
- Spiers, A.G. 1985. Factors affecting basidiospore release by *Chondrostereum purpureum* in New Zealand. *Eur J For Pathol* 15: 111–126.
- Spiers, A.G., Hopcroft, D.H. 1988a. Ultrastructural studies of basidial and basidiospore development and basidiospore release in *Chondrostereum purpureum*. *Eur J For Pathol* 18: 367–381.
- Spiers, A.G., Hopcroft, D.H. 1988b. Factors affecting *Chondrostereum purpureum* infection of *Salix*. *Eur J For Pathol* 18: 257–278.
- Tai, F.L. 1979. *Sylloge Fungorum Sinicorum*. Beijing, China.
- Tunçtaner, K. 2008. Kavaklarda genetik ıslah ve seleksiyon. Kavak ve Hızlı Gelişen Orman Ağaçları Araştırma Enstitüsü, İzmit.
- Wall, R.E. 1997. Fructification of *Chondrostereum purpureum* on hardwoods inoculated for biological
- Wang, Y.L., Lu, Q., Decock, C., Li, Y.X., Zhang, X.Y. 2015. *Cytospora* species from *Populus* and *Salix* in China with *C. davidiana* sp nov. *Fungal Biology* 119: 420-432.
- Wei, J.C. 1979. Identification of fungus handbook. Shanghai, China.
- Zhuang, W.Y. 2005. Fungi of northwestern China. Ithaca, New York.

